

**AKTIFITAS ANTIOKSIDAN ALGA LAUT *Gracilaria salicornia*,  
*Sargassum oligocystum*, *Turbinaria decurens*, *Halimeda  
macroloba*, *Halimena durvilae*, ISOLASI DAN ELUSIDASI  
SENYAWA AKTIF FRAKSI n-HEKSANA *Halimena durvilae***

**DISERTASI**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Doktor**



**OLEH:**

**GRACE SANGER**

**NIM: 107040100111078**

**PROGRAM STUDI ILMU PERTANIAN  
MINAT TEKNOLOGI HASILPERTANIAN**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2014**

# DISERTASI

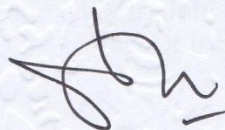
**AKTIFITAS ANTIOKSIDAN ALGA LAUT *Gracilaria salicornia*  
*Sargasum olygocystum*, *Turbinaria decurens*, *Halimeda*  
*macroloba*, *Halimena durvilae*, ISOLASI DAN ELUSIDASI  
SENYAWA AKTIF FRAKSI *n*-HEKSANA *Halimena durvilae*.**

Oleh :

**GRACE SANGER**

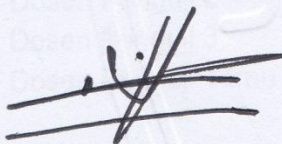
Dipertahankan di depan penguji  
Pada tanggal : 10 Februari 2014  
Dan dinyatakan memenuhi syarat

Komisi Penasehat,



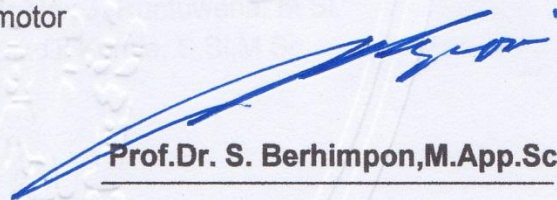
Prof. Dr. Ir. Simon B Widjanarko, M.App.Sc

Promotor



Dr. Ir. Joni Kusnadi, M.Si

Ko-Promotor 1



Prof. Dr. S. Berhimpon, M.App.Sc

Ko-Promotor 2

Malang, 30 APR 2014

Universitas Brawijaya  
Program Pascasarjana Fakultas Pertanian  
Dekan,



Prof. Ir. Sumeru Ashari, M.Agr.Sc., Ph.D.  
NIP. 19530328 198103 1 001

## TIM PENILAI UJIAN DISERTASI

### JUDUL DISERTASI

**Aktifitas Antioksidan Alga Laut *Gracilaria Salicornia*, *Sargassum oligocystum*,  
*Turbinaria decurens*, *Halimeda macroloba*, *Halimena durvilae*, Isolasi dan  
Elusidasi Senyawa Aktif Fraksi n-Heksana *Halimena durvilae*.**

NAMA MAHASISWA : GRACE SANGER  
NOMOR INDUK MAHASISWA : 107040100111078  
PROGRAM DOKTOR : ILMU PERTANIAN  
KEKHUSUSAN MINAT : TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN

### KOMISI PROMOTOR

PROMOTOR : Prof.Dr. Simon B. Widjanarko, MApp.Sc.Ph.D  
Ko-Promotor : Dr.Ir. Joni Kusnadi M.Si.  
Ko-Promotor : Prof Dr.Ir.S.Berhimpon MS.M.App.Sc.

### DOSEN PENGUJI

Dosen Penguji 1. : Prof.Dr.Haryono, MApp.Sc.PhD.  
Dosen Penguji 2 : Dr. Rurini Retnowati MSi.  
Dosen Penguji 3 : Dr. Ir.Max.J. Runtuwene, M.Si.  
Dosen Penguji Tamu : Dr.Dikdik Kurnia, S.Si,M.Sc.

## PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Nama Mahasiswa : Ir. Grace Sanger, M.Si  
NIM : 107040100111078 / PRODI: Teknologi Pangan  
Judul Disertasi : Aktifitas Antioksidan Alga Laut *Gracilaria salicornia*,  
*Sargasum oligocystum*, *Turbinaria decurens*, *Halimeda*  
*macroloba*, *Halimena durvilae*, Isolasi dan Elusidasi  
Senyawa Aktif Fraksi *n*-Heksana *Halimena durvilae*

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah Disertasi ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah Disertasi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur jiplakan, saya bersedia naskah Disertasi ini dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, pasal 25 ayat 2 yang berbunyi "Lulusan perguruan tinggi yang karya ilmiahnya digunakan untuk memperoleh gelar akademik, profesi, atau vokasi terbukti merupakan jiplakan dicabut gelarnya". dan pasal 70 yang berbunyi "Lulusan yang karya ilmiah yang digunakannya untuk mendapatkan gelar akademik, profesi, atau vokasi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 25 ayat (2) terbukti merupakan jiplakan dipidana dengan pidana penjara paling lama dua tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp200.000.000,00 (dua ratus juta rupiah).

Malang,  
Mahasiswa,



Ir. Grace Sanger, M.Si  
NIM. 107040100111078

## **RIWAYAT HIDUP**

Grace Sanger , lahir di Tomohon 9 Januari 1961, anak pertama dari pasangan Paulus Elly Sanger (bapak, almarhum) dan Anna Lengkong (ibu). Masuk SD GMIM XIII di Manado tahun 1967 dan lulus tahun 1972. Tahun 1973 masuk Sekolah Menengah Pertama Laboratorium IKIP Manado dan lulus tahun 1975, melanjutkan pendidikan SMA di SMA Negeri II di Manado tahun 1976 dan lulus tahun 1979, pada tahun yang sama melanjutkan pendidikan strata I di Fakultas Perikanan Unsrat dan selesai tahun 1985. Tahun 1994 melanjutkan pendidikan program strata II pada Pascasarjana Institut Pertanian Bogor Fakultas Teknologi Hasil Pertanian Program Studi Ilmu Pangan, lulus tahun 1997. Saat ini sedang menempuh pendidikan strata III pada Program Doktor Ilmu-ilmu Pertanian Minat Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang. Sampai saat ini sebagai staf pengajar di program studi Pengolahan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi Manado.

Malang, Pebruari 2014

Penulis

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur, hormat dan terima kasih dipanjatkan kepada Tuhan Yesus Kristus Juru Selamat, yang Maha Kuasa, Maha kasih dan Penyayang, yang senantiasa memberkati dan menyertai dalam segala hal, teristimewa kesehatan dan kekuatan sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi ini. Dalam melaksanakan penelitian dan penulisan disertasi penulis banyak mendapat bantuan doa dan dukungan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini perkenankan penulis menyampaikan rasa terima kasih sedalam-dalamnya kepada semua pihak yang terlibat, sebagai berikut .

1. Bapak Prof. Dr.Ir. Simon B. Widjanarko, M.App.Sc., selaku promotor, seorang peneliti yang ulet, yang telah membimbing dengan penuh kasih, memberikan semangat, dorongan dan teladan setiap saat serta memberikan motivasi yang kuat untuk berjuang dengan tekun mempergunakan waktu sebaik-baiknya. Beliau membimbing dengan teliti, cermat untuk mengoreksi demi penyempurnaan disertasi ini. Beliau memberikan waktu yang cukup ditengah-tengah kesibukannya yang sangat padat.
2. Bapak Dr. Ir. Joni Kusnadi, MSi, selaku ko-promotor 1, Beliau seorang pembimbing kebabakan yang sangat memperhatikan bimbingannya dalam penelitian maupun masalah-masalah yang dihadapi dan memberikan banyak masukan. Bapak tempat mengaduh untuk menengahi dalam menyelesaikan masalah dengan pembimbing lain.
3. Prof. Dr. Ir. Sigfried Berhimpon, M.App.Sc., selaku ko-promotor 2 yang telah membimbing, memberi nasihat dan selalu siap menyediakan waktu ditengah-tengah kesibukannya yang sangat padat. Banyak koreksi yang dikerjakan untuk perbaikan disertasi ini.
4. Bapak Prof Dr. Haryono M.App.Sc, sebagai dosen penguji, yang dalam proposal maupun seminar memberikan masukan dan saran. Memberikan banyak kemudahan dengan lemah lembut memberikan nasihat maupun saran untuk penyelesaian penelitian maupun penulisan disertasi.
5. Ibu Dr. Rurini Retnowati sebagai dosen penguji, yang sangat kritis memberikan arahan, pemikiran ilmiah terhadap isi disertasi. Beliau memberikan ilmu dengan tulus, dengan penuh keibuan memberikan masukan-masukan pada kesempurnaan disertasi ini.
6. Prof Dr. Grevo Gerung M.Sc yang membantu dalam menjelaskan tentang morfologi dan taxonomi dan habitat alga laut yang ada di Sulawesi Utara yang akan dipergunakan untuk penelitian.
7. Bapak Dr. Dikdik Kurnia MSc, sebagai kepala laboratorium penelitian kimia FMIPA UNPAD-Bandung, yang sangat membantu dalam isolasi, membagikan ilmu dengan tulus. Ibu Eti Aprianti dan pak Conan Filarianda sebagai tenaga laboran sebagai pendamping bagi penulis dalam melakukan isolasi zat murni dan menolong dalam cara menginterpretasi spektrum NMR, FTIR dan ESMS. Begitu pula Staf lab lain yang selalu menolong terutama pengadaan bahan kimia dan alat laboratorium.

8. Bapak Prof. Dr. Ir. Sumarno, MS, selaku Direktur PPs Universitas Brawijaya beserta staf yang telah memberi kesempatan kepada penulis mengikuti pendidikan program doktor.
9. Bapak Prof. Dr. Donald Rumokoy, MH, selaku Rektor Universitas Sam Ratulangi Manado yang telah memberikan kesempatan kepada penulis menempuh studi program doktor, juga kepada Rektor Universitas Brawijaya beserta staf yang telah membantu penulis untuk kelancaran akademik.
10. Bapak Ir.L.Lalamentik selaku Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi Manado yang telah memberikan dukungan, semangat dan ijin penulis mengikuti pendidikan doktor.
11. Prof. Dr. Ir. Remi Mangindaan, MSc, selaku kepala laboratorium kimia Bahan Alami Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Sam Ratulangi Manado yang telah memberi ijin penulis melakukan penelitian. Ibu Vera Losung, staf laboratorium yang banyak membantu penulis dalam penelitian. Bapak Wilmar Maarisip yang telah membagikan ilmu kepada penulis bagaimana melakukan isolasi zat murni.
12. Bapak Dr Edi Lengkong, kepala laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Pertanian yang telah memberi ijin penelitian, saudara Fenly, staf laboratorium Biologi Molekuler yang banyak membantu penulis melakukan penelitian
13. Bapak Prof Dr. .Eddy Ginting MS. Kepala Laboratorium Pusat Penelitian Universitas Sam Ratulangi bersama staf ibu Aneke Korua dan Ibu Youla, yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian antioksidan.
14. Staf administrasi laboratorium Farmakologi Intitut Pertanian Bogor yang banyak memfasilitasi penulis selama penelitian pengujian aktifitas antioksidan terutama pengadaan bahan kimia.
15. Ibu Monika dan Staf administrasi laboratorium WLN Manado yang banyak memfasilitasi penulis selama penelitian dalam pengadaan pelarut-pelarut organik.
16. Bapak Ir. Soni Sasongke yang sangat membantu dalam penyediaan sampel alga laut, dimana dan kapan saja dibutuhkan selalu bersedia menolong.
17. Teman-teman angkatan 2010 program kerja sama, Ibu Netty Salindeho, Bapak Yan Assa, Ibu Verly Dotulong, Ibu Lena Damongilala, yang memberi dukungan doa, tenaga dan pikiran. Bapak Noldi Pangkerego, Ibu Joula Mamuaya, , Ibu Ni Wayan Suryani dan Ibu Ema Moko yang membantu penulis selama mengikuti pendidikan.
18. Kepada penghuni Guest House Mahasiswa Sulut di Malang Nova Ogi, Feibe Pioh, Desly Kumampung, Ferry Warow, Yetty Rangan, Ivon Manayang dan yang lainnya yang saya tidak dapat sebutkan satu persatu, atas dukungan doa dan moril kepada penulis selama mengikuti pendidikan S<sub>3</sub>.
19. Secara khusus penulis sampaikan terima kasih yang tulus kepada kedua orang tua kandungku, papa tercinta Paulus E. Sanger (almarhum) dan ibu terkasih Anna Lengkong yang telah membesarkan dan mendidik penulis, kepada ibu yang senantiasa mendoakan dan memberi dukungan moril selama studi.Kepada

kedua orang tua mantuku Bapak Frederik Rarung (almarhum) dan Ibu terkasih Ibu Sabina Laboy (almarhum) yang selalu mendoakan rumah tangga kami.

20. Kepada Tanteku Corry Lengkong, Grietje Lengkong dan pamanku Joseph Lengkong yang selalu mendoakan dan banyak membantu menjaga anak-anak saya dan membantu dalam biaya untuk penyelesaian studi.
21. Kepada saudara-saudaraku, Vonny (almarhum), peters (almarhum), Moudy Yetje (Almarhum) dan Nonce yang turut membantu dalam rumah tangga saya untuk kelancaran menyelesaikan pendidikan menolong dalam mendoakan dan menjaga anak-anak saya.
22. Kepada Bapak Pendeta Robby Ticoalu dan Ibu Lenny Mewengkang bersama jemaat Bukit Zaitun Kleak Kampus Manado yang selalu memberi semangat dan berdoa untuk kelancaran studi.
23. Terima kasih dan penghargaan yang sangat mendalam kepada Suamiku tercinta Lexy Karel Rarung dan Anakku tersayang Daniel Samuel Rarung, Johannes Abraham Rarung dan Angel Debora Rarung yang selalu mendoakan dan memberi motivasi untuk menyelesaikan pendidikan. Secara spesial disertasi ini kupersembahkan kepada Suamiku dan Anak-anakku terkasih yang senantiasa mempedulikan dan memperhatikanku.

Akhirnya kepada semua saudara, teman sekerja, yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah mendoakan dan mendukung memberikan motivasi, kekuatan dan kesabaran saya sampaikan terima kasih sebesar-besarnya, kiranya Tuhan selalu memberkati. Mohon maaf sebesar-besarnya jika ada kesalahan dan kekurangan yang penulis lakukan selama menjalankan program S3 ini. Akhirnya bantuan dan kerja sama yang saudara berikan diberkat oleh Tuhan.

Malang, Pebruari 2014

Penulis



## RINGKASAN

**Grace Sanger (NIM.107040100111078). Program Doktor Ilmu Pertanian. Minat Studi Teknologi Hasil Pertanian. Aktifitas Antioksidan Alga Laut *Gracilaria salicornia*, *Sargassum oligocystum*, *Turbinaria decurens* *Halimeda macroloba*, *Halimena durvilae*, Isolasi dan Elusidasi Senyawa Aktif Fraksi n-Heksana *Halimena durvilae*. Komisi Promotor: Prof. Dr. Ir. Simon Widjanarko, M.App.Sc (Promotor). Dr. Jony Kusnadi Msi (Ko. Promotor 1), Prof. Dr.Ir. S. Berhimpon, MS. M.App.Sc (promotor 2).**

---

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat oksidasi molekul lain. Adanya kekhawatiran terhadap efek samping antioksidan sintetik, membuat antioksidan alami menjadi alternatif yang terpilih. Antioksidan alami mampu melindungi tubuh terhadap kerusakan yang disebabkan spesies oksigen reaktif, mampu menghambat penyakit degeneratif serta mampu menghambat peroksidasi lipid pada makanan. Menurut Sanchez-Moreno (2002), aktifitas antioksidan dapat diukur dengan mengetahui komponen-komponen bioaktif dalam suatu bahan dengan cara ekstraksi. Ekstraksi padat cair paling banyak digunakan dalam usaha mengisolasi senyawa bioaktif yang terkandung didalam bahan dari alam. Sifat-sifat dari bahan alam tersebut merupakan faktor yang berperan sangat penting terhadap sempurna atau mudahnya ekstraksi dijalankan. Kesempurnaan suatu ekstraksi tergantung pada beberapa faktor seperti: pH, jenis pelarut, konsentrasi pelarut dan volume pelarut. Isolasi dan pemurnian dilakukan untuk mengetahui senyawa biofungsional yang terkandung dalam ekstrak alga laut.

Alga laut merupakan sumber senyawa bioaktif yang tinggi, seperti: karotenoid, protein, asam lemak esensial, serat makanan, vitamin dan mineral. Alga laut dan ekstraknya mempunyai beberapa komponen senyawa kimia protektif seperti senyawa fenol dan PUFA. Tidak saja dimakan, tetapi juga sebagai anti helmitik, pengobatan gumpalan, pembengkakan, masalah urinasi tanpa efek samping juga sebagai anti piretik, analgetik, anti peradangan, antidiabetes dan aktifitas antioksidan. Di perairan Sulawesi *Gracillaria salicornia*, *Turbinaria decurens*, *sargassum oligocystum*, *Halimeda macroloba* dan *Halimena durvilae* banyak ditemukan dan dapat dibudidaya. Tetapi penelitian tentang senyawa bioaktif alga laut ini belum banyak dilakukan. Oleh karena itu penelitian kearah itu perlu dilakukan sehingga potensi alga laut yang ada dapat dimanfaatkan terutama untuk manfaat kesehatan. Penelitian ini terdiri dari 3 tahap yaitu: Ekstraksi, fraksinasi dan isolasi struktur senyawa aktif,

Tahap 1. Ekstraksi alga laut *Gracillaria salicornia*, *Turbinaria decurens*, *Sargassum oligocystum*, *Halimeda macroloba* dan *Halimena durvilae* dengan konsentrasi metanol 30, 50 dan 70% metanol dalam air. Tujuan penelitian adalah untuk mencari

alga laut yang mempunyai rendemen tertinggi dan aktifitas antioksidan tertinggi. Jenis analisis aktifitas antioksidan terdiri dari kadar total fenol, aktifitas antioksidan DPPH, daya reduksi dan pengkelat ion. Analisis data menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dalam faktorial. Perlakuan yang signifikan diuji lanjut dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

Tahap 2. Fraksinasi ekstrak metanol 70% *H.durvilae* dengan heksana, kloroform dan air. Tujuan dari penelitian ini untuk mengukur fraksi yang mempunyai rendemen tertinggi dan aktifitas antioksidan tertinggi. Jenis analisis aktifitas antioksidan terdiri dari kadar total fenol, aktifitas antioksidan DPPH, daya reduksi dan pengkelat ion. Analisis data menggunakan statistik deskriptif, pembahasan dilakukan dengan menggunakan teori dan penelitian terbaru.

Tahap 3. Fraksi Heksana ekstrak metanol 70% *H.durvilae* diisolasi menggunakan Kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kolom (KK). Fraksi yang mempunyai senyawa murni dielusidasi dengan FTIR, MS, C-NMR, H-NMR, DEPT 135, HMQC dan HMBC. Tujuan dari penelitian ini untuk mencari metoda isolasi yang tepat mendapatkan senyawa murni dan mengidentifikasi senyawa murni.

Hasil Tahap I. Konsentrasi metanol memberikan pengaruh yang nyata ( $p < 0.05$ ) terhadap aktifitas antioksidan *Gracilaria salicornia*, *Sargassum oligocystum*, *Turbinaria decurens*, *Halimeda macroloba* and *Halimena durvilae*. Konsentrasi ekstrak metanol 30% *S.oligocystum*, *T.decurens* dan *H.macroloba* mempunyai aktifitas pengkelat ion tertinggi. Konsentrasi ekstrak 70% metanol *G.salicornia*, *Turbinaria decurens*, *H.macroloba* dan *H.durvilae* mempunyai kadar total fenol, DPPH, daya reduksi dan pengkelat ion tertinggi. Karena ekstrak metanol 70% *H.durvilae* mempunyai rendemen, kadar total fenol dan DPPH tertinggi, walaupun *G.salicornia* mempunyai daya reduksi tertinggi tetapi tidak signifikan ( $p > 0.05$ ) dengan *H. durvilae*, sehingga fraksinasi dilakukan pada ekstrak metanol 70% *H.durvilae*

Hasil Tahap II. Kadar total fenol tertinggi ekstrak metanol 70% terdapat pada fraksi heksana diikuti oleh fraksi kloroform dan fraksi air dengan nilai masing-masing  $11.19 \pm 0.80$ ,  $10.51 \pm 0.53$ ,  $6.39 \text{ g} \pm 0.45$  GAE/100g ekstrak. Aktifitas antioksidan DPPH tertinggi adalah fraksi air  $76.99 \pm 1.80\%$  dan kloroform  $61.06 \pm 2.13\%$ . Aktifitas daya reduksi tertinggi adalah fraksi kloroform, diikuti oleh fraksi air dan fraksi heksana dengan nilai masing-masing  $29.00 \pm 3.51$ ,  $23.587 \pm 0.17$ ,  $10.206 \pm 1.14$  g GAE/100gr ekstrak. Nilai tertinggi aktifitas pengkelat ion adalah fraksi heksana ( $37.597 \pm 1.95\%$ ), diikuti fraksi kloroform dan air dengan nilai masing- masing  $37.597 \pm 1.95\%$ ,  $15,17 \pm 1.39\%$   $8.646 \pm 1.18\%$ . Karena fraksi heksana mempunyai redemen, kadar total fenol dan pengkelat ion tertinggi, maka untuk isolasi, pemurnian dan identifikasi struktur denyawa dilakukan pada ekstrak metanol 70% *H.durvilae* fraksi heksana.

Hasil Tahap III. Berdasarkan spektrum infra merah, diduga isolat fraksi heksana ekstrak metanol 70% *H.durvilae* merupakan sebuah senyawa golongan asam lemak. Hal ini terlihat dari serapan-serapan yang muncul hanya terdiri dari karbonil dan ikatan C-H sp<sup>3</sup>. Berdasarkan spektrum ESMS<sup>-</sup> isolat murni memiliki sinyal tertinggi pada m/z 241, artinya bobot molekul senyawa isolat murni adalah m/z 242. Hal ini sesuai dengan dugaan struktur senyawa, bahwa rumus molekul C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub> adalah asam pentadekanoat. Berdasarkan hasil pembahasan pergeseran kimia dan pengukuran spektrum C-NMR, H-NMR, DEPT 135, HMQC dan HMBC menunjukkan adanya gugus alifatik suatu asam lemak rantai panjang, dengan adanya gugus metil singlet (CH<sub>3</sub>, s) muncul pada δH 0,88 (t, J = 7,2 Hz), dan beberapa gugus metilen (CH<sub>2</sub>) yang muncul pada δH 1,30 (11 xCH<sub>2</sub>), δ1,63 (CH<sub>2</sub>, multiplet) dan δ2,34 (2H, t, 7,5 Hz). Berdasarkan hasil ini, diduga sebagai komponen utama merupakan asam lemak jenuh pentadekoat (C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>). Komponen minornya adalah asam lemak tak jenuh, dengan kandungan sekitar (0,375/2) 18%. Dugaan sebagai asam pentadekanoat diperkuat dengan hasil pengukuran <sup>13</sup>C-NMR, dengan adanya gugus karboksilat (-COOH) pada δC 180,19, gugus metil (CH<sub>3</sub>) pada δC 14,32, dan yang lain adalah beberapa gugus metilen (CH<sub>2</sub>). Disamping itu adanya sinyal kecil dari ikatan rangkap yang muncul pada δC 130. Disimpulkan bahwa hasil Isolasi dengan KLT dan KK serta elusidasi dengan FTIR, ESMS dan NMR diperoleh senyawa murni fraksi heksana *H.durvilae* adalah asam pentadekanoat (C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>), dengan berat molekul m/z 242. Banyaknya ekstrak isolat murni 11.34 mg. Berdasarkan pengujian secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan DPPH 0.05% dalam metanol aktifitas antioksidan isolat murni adalah > 0.8 ppm. Kesimpulan dari penelitian ini adalah alga laut *G. salicornia*, *T. decurens*, *S. oligocystum*, *H. macroloba* dan *H. durvilae* mempunyai kapasitas antioksidan dan dapat dimanfaatkan sebagai sumber antiosidan alamiah, terutama dimanfaatkan untuk tujuan kesehatan.

**Kata Kunci :** *Antioksidan, Ekstraksi, Fraksinasi, Isolasi dan Asam pentadekanoat.*

## SUMMARY

**Grace Sanger (NIM.107040100111078). Doctoral Program Agricultural Science in Agriculture Product Technology. Antioxidant Activity of Marine Algae *Gracilaria salicornia*, *Sargassum oligocystum*, *Turbinaria decurens*, *Halimeda macroloba* *Halimena durvilae*. Isolation and Elucidation of Active Compound *n*-Hexane Fraction of *Halimena durvilae*. Supervisors: Prof. Dr. Ir. Simon Widjanarko, M.App.Sc. Dr. Joni Kusnadi Msi, Prof. Dr. Ir. S. Berhimpon, MS.M.App.Sc.**

---

Antioxidant is a compound that has function to prevent oxidation process. Due to the growing concern about the side effect of sintetic antioxidant, natural antioxidant has become a preferred altenative. Antioxidant can protect the human health from damage caused by reactive oxygen species , inhibit degenerative disease, and delay lipid peroxidation in food. Antioxidant activity could be measured by knowing the bioactive compounds in a product by using extraction method. Liquid-solid extractions are commonly used to isolate the bioactive compound in natural product. Characteristic of the product is important factor in the success of extraction process. Completeness of extraction depends on some factors, such as pH, kind and concentration of solvent and volume of solution. Isolation and purification have been used to find out he biofunctional molecule compound in seaweed extracts.

Seaweeds is a rich source of bioactive compound, such as carotenoid, protein, essential fatty acid, dietary fiber, vitamin and minerals. Seaweed and its extract have also some protective compounds like phenol and PUFA. Bioactive compounds from seaweed functions as antihelmetic, antidiabetic, anticholesterol, antiinflammation, antipyretic, analgesick etc. In North Sulawesi various kinds of seaweed can be found and cultivated, including *Gracillaria salicornia*, *Turbinaria decurens*, *Sargassum oligocystum*, *Halimeda macroloba* dan *Halimena durvilae*. But Researchs about of bioactive compound of seaweeds, however have not yet adequately conducted. Therefore the such research is necessary, so that the potency of sea weeds can benefit for humans health. The research consists of three steps: extraction, fractination and isolation of the active compound structure.

Step I was extraction of *G. salicornia*, *T. decurens*, *S. oligocystum*, *H. macroloba* dan *H. durvilae* seaweeds by using 30, 50,70% methanol in water. The purpose of this research was to find out a seaweed that highest yield and highest antioxidant activity, such as Total phenol Content, DPPH, FRAP and FIC assay. Data was analized using completely randomized design using soft ware Statgraf-Centurion 9. Significant effect by using LSD.

Step II was the fractination of 70 % methanol extract of *H.durvilae* with hexane, chloroform and water. The purpose of the research is to find out the fraction that

have highest yield and highest antioxidant activity, such as Total Phenol Content, DPPH, FRAP and FIC assay. The data were analyzed using descriptive statistics and conferred to latest theory and researches.

Step III was the isolation and purification of hexane fraction of *H.durvilae* using TLC and Column Chromatography. Fraction pure compound was then elucidated using FTIR, ESMS, C-NMR, H-NMR, DEPT-135, HMBC dan HMQC. The purpose of this research is to found out the best method of isolation to obtain pure compound and to identify the compound structure.

The result of step I. Methanol concentration showed significantly effect ( $p < 0.05$ ) in antioxidant activity on *Gracilaria salicornia*, *Sargassum oligocystum*, *Turbinaria decurens*, *Halimeda macroloba* and *Halimena durvilae*. Concentration extract 30 % methanol of *S.oligocystum*, *T.decurens* and *H.macroloba* had highest FIC value activity. Concentration extract 70% methanol of *G.salicornia*, *Turbinaria decurens*, *H.macroloba* and *H.durvilae* had highest Total Phenol Content, DPPH, Ferrous Reducing Activity Power (FRAP) and Ferrous Ion Gelating (FIC). Because extract 70% methanol of *H.durvilae* had highest yield, total phenol content and DPPH, although the FRAP value of *G.salicornia* were highest but it was not significant ( $p > 0.05$ ) with *H.durvilae*, that *H.durvilae* was subjected to fractionation.

The result of step II. The highest total phenol content of extract 70% methanol of *H.durvilae* was found in hexane fraction, followed by chloroform and water fraction ( $11.19 \pm 0.80$ ,  $10.51 \pm 0.53$ ,  $6.39 \text{ g} \pm 0.45$  GAE/100g extract. The highest antioxidant activity DPPH was found in water fraction  $76.99 \pm 1.80\%$  and chloroform  $61.06 \pm 2.13\%$ . FRAP activity was strongest in chloroform fraction, was followed by water and hexane fraction  $29.00 \pm 3.51$ ,  $23.587 \pm 0.17$ ,  $10.206 \pm 1.14$  g GAE/100gr extract. The highest value of FIC was found in hexane fraction ( $37.597 \pm 1.95\%$ ) followed by chloroform fraction ( $15.17 \pm 1.39\%$ ) and the lowest value of FIC was in water fraction ( $8.646 \pm 1.18\%$ ). Because the hexane fraction had highest value of yield, total phenol content and FIC, that fraction was subjected to isolation, purification and identification of its compound structure.

The result of step III. Based on FTIR the isolate of hexane fraction of *H.durvilae* was presumed to be from a group of fatty acid, consisting of carbonyl and C-H  $sp^3$  bonds. Based on MS spectrum the hexane fraction isolate had highest signals at  $m/z$  241, which means the hexane fraction had molecule mass of  $m/z$  242. The result was the same with the structure of pentadecanoic acid ( $C_{15}H_{30}O_2$ ). NMR discussion showed the presence of an aliphatic group of long chain fatty acid, with singlet methyl ( $CH_3$ ) at  $\delta_H$  0.88 (t,  $J = 7.2$  Hz) and several methylenes ( $CH_2$ ) at  $\delta$  1,30 (11x  $CH_2$ ),  $\delta$  1,63 ( $CH_2$  multiplet) and  $\delta$  2,34 (2H, t, 7.5 Hz). Therefore the major component was assumed to be saturated fatty pentadecanoic acid. This assumption was supported by the  $^{13}C$ -NMR measurement that showed carboxyls (COOH) in  $\delta_C$  180.19, methyl ( $CH_3$ ) cluster in  $\delta$  14.32 and several groups of methylene ( $CH_2$ ) also. In addition there

were also small signal of double bounding at  $\delta C$  130. Based on those elucidations, it could be safely concluded that the pure compound of hexane fraction of *H.durvilae* is pentadekanoic acid ( $C_{15}H_{30}O_2$ ). With a molecular mas of m/z 242. The weight of pure isolate astract was 11.34 mg. The measurement by using DPPH 0.05% in methanol the antioxidant activity of the hexane fraction isolate of *H.durvilae* was  $>0.8$  ppm.

Therefore, it is Concluded that *G. Salicornia*, *T. Decurens*, *S. Oligocystum*, *H. Macroloba* and *H. Durvilae* seaweeds have antioxidant capability and can be used as a source of natural antioxidant for human health.

*Key word: Antioxidant, Extraction, Fractination, Isolatio dan Pentadekanoic Acid.*

## KATA PENGANTAR

Segala Puji Syukur dipanjatkan Kepada Tuhan Yesus Kristus Juru Selamat, Yang Maha Pengasih, karena dengan kasih anugrahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi dengan judul: Aktifitas Antioksidan Alga laut *Gracilaria salicornia*, *Turbinaria decurens*, *Sargassum oligocystum*, *Halimeda macroloba*, *Halimena durvilae*, Isolasi dan Elusidasi Senyawa Aktif Fraksi *n*-Heksana *Halimena durvilae*.

Alga laut banyak tumbuh di seluruh perairan Indonesia dan keberadaannya selalu dalam jumlah yang melimpah, tumbuh mulai dari perairan pantai sampai perairan dalam, terapung dan melekat pada substrat batu karang serta hampir semua alga laut tumbuh pada segala musim. Sulawesi Utara dengan Perairan laut yang begitu luas yang banyak ditumbuhi oleh berbagai jenis alga laut termasuk *Gracilaria salicornia*, *Turbinaria decurens*, *Sargassum oligocystum*, *Halimeda macroloba*, *Halimena durvilae*. Saat ini alga laut belum banyak dimanfaatkan terutama untuk tujuan pengobatan sebagai sumber antioksidan yang berfungsi mengambat pembentukan radikal bebas. Radikal bebas yang dihasilkan oleh polusi maupun radiasi sinar matahari maupun reaksi dalam tubuh akan menyebabkan penyakit kanker, katarak, penuaan dini maupun penyakit degeneratif lainnya.

Kiranya hasil penelitian ini dapat memberikan informasi untuk memanfaatkan alga laut sebagai sumber antiosidan alamiah yang mempunyai banyak fungsi biologis sehingga usaha budidaya dan pengolahan alga laut dapat ditingkatkan.

Kiranya Untuk kesempurnaan tulisan ini penulis mohon saran.

Malang, Pebruari 2014

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>LEMBAR PENGESAHAN.....</b>	<b>i</b>
<b>TIM PENILAI UJIAN DISERTASI .....</b>	<b>ii</b>
<b>ORISINALITAS .....</b>	<b>iii</b>
<b>RIWAYAT PENDIDIKAN .....</b>	<b>iv</b>
<b>UCAPAN TERIMA KASIH .....</b>	<b>v</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>viii</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>xi</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xix</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>xxi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xxv</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN.....</b>	<b>xxix</b>
<b>I. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	4
<b>II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Alga laut.....	5
2.2 Manfaat Alga laut.....	5
2.3 Komposisi Kimi Alga laut .....	6
2.3.1 Polisakarida .....	6
2.3.2 Protein.....	7
2.3.3. Lipida.....	7
2.3.4 Mineral/vitamin .....	8
2.4. Morfologi Dan Komposisi Kimia Alga laut <i>G.salicornia</i> , <i>S.oligocystum</i> , <i>T.decurens</i> , <i>H.macroloba</i> dan <i>H.durvilae</i> .....	8
2.4.1 <i>Gracilaria salicornia</i> .....	8
2.4.2 <i>Sargassum oligocystum</i> .....	10
2.4.3 <i>Turbinaria decurens</i> .....	11
2.4.4 <i>Halimeda macroloba</i> .....	12
2.4.5 <i>Halimena durvilae</i> .....	13
2.5 Antioksidan Alga laut.....	14
2.6 Spesies Oksigen Reaktif .....	23
2.6.1 Superoksida ( $O_2 \cdot^-$ ) .....	24
2.6.2 Radikal Hidroksil ( $OH \cdot$ ).....	25



2.6.3	Hidrogen Peroksida (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	25
2.6.4	Singlet Oksigen (1O <sub>2</sub> ).....	26
2.6.5	Radikal Peroksil (ROO•)dan radikal alkoksil (RO•).....	27
2.6.6	Radikal Nitrit Oksida (NO•).....	27
2.6.7	Radikal Peroksi Nitrit (ONOO•).....	28
2.7	Jenis dan Manfaat Antioksidan.....	28
2.8	Mekanisme Reaksi Antioksidan .....	32
2.8.1	Antioksidan enzimatik .....	32
2.8.1.1	Superoksida Dismutase (SOD).....	32
2.8.1.2	Katalase (CAT).....	33
2.8.1.3	Glutathion Peroksidase (GP).....	33
2.8.1.4	Glutathion S-transferase (GSTs).....	34
2.8.1.5	Glutathion Reduktase .....	34
2.8.2	Antioksidan non-enzimatik.....	35
2.8.2.1	Glutathion (GSH).....	35
2.8.2.2	Vitamin C.....	36
2.8.2.3	Vitamin E... ..	37
2.8.2.4	Karotenoid.....	39
2.8.2.5	Flavonoid .....	42
2.9	Antioksidan dalam sistim biologi .....	46
2.10	Antioksidan dalam sistim pangan .....	52
2.11	Analisis kadar Total Fenol dan Aktifitas Antioksidan .....	54
2.11.1	Fenol.....	54
2.11.2	DPPH .....	56
2.11.3	Daya Reduksi.....	58
2.11.4	Pengkelat Ion .....	59
2.12	Metoda Isolasi dan Elusidasi .....	61
2.12.1	Metoda Ekstraksi .....	61
2.12.2	Kromatografi Lapis Tipis .....	62
2.12.3	Kromatografi Kolom .....	62
2.12.4	<i>Nuclear Megnetic Resonance</i> (NMR) .....	63
2.12.5	<i>Fourier Transform Infra Red</i> (FTIR) .....	64
2.12.6	<i>Electrospray Mass Spectra</i> (ESMS) .....	66
<b>III</b>	<b>KERANGKA KONSEP PENELITIAN.....</b>	<b>68</b>
3.1	Kerangka Pikir.....	68
3.2	Kerangka Operasional dan Pengukuran .....	72
<b>IV</b>	<b>METODOLOGI PENELITIAN.....</b>	<b>75</b>
4.1	Tempat Dan Waktu Penelitian .....	75
4.2	Bahan dan Alat Penelitian.....	75
4.2.1	Bahan Penelitian .....	75
4.2.2	Alat Penelitian .....	76

4.3	Tahapan Penelitian.....	76
4.3.1	Tahap I. Ekstraksi dengan Metanol 30, 50 dan 70% Alga laut <i>G.salicornia</i> , <i>S.oligocystum</i> , <i>T.decurens</i> <i>H.macroloba</i> , <i>H.durvilae</i> dan Mengukur Aktifitas Antioksidan .....	76
4.3.2.1	Prosedur Penelitian .....	76
4.3.2.2	Analisis Statistik .....	77
4.3.2	Tahap II. Fraksinasi Ekstrak Metanol 70% Alga laut <i>H.durvilae</i> dengan n-n-Heksana, Kloroform, Air dan Mengukur Aktifitas Antioksidan .....	78
4.3.2.1	Prosedur Penelitian.....	78
4.3.3	Tahap III.Isolasi, Elusidasi Dan Identifikasi struktur Senyawa <i>H.durvilae</i> .....	79
4.3.3.1	Prosedur Penelitian.....	79
<b>V</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>83</b>
5.1	Tahap I. Ekstraksi dengan metanol 30, 50 dan 70% Alga laut <i>G.salicornia</i> , <i>S.oligocystum</i> , <i>T.decurens</i> , <i>H.macroloba</i> , <i>H.durvilae</i> dan Mengukur aktifitas Antioksidan .....	83
5.1.1	Rendemen.....	83
5.1.2	Kadar Total Fenol.....	84
5.1.3	Aktifitas Antioksidan DPPH.....	85
5.1.4	Aktifitas Antioksidan Daya Reduksi .....	87
5.1.5	Aktifitas Antioksidan Pengkelat Ion .....	89
5.1.6	Pembahasan .....	92
5.1.7	Kesimpulan .....	97
5.2	Tahap II. Fraksinasi Ekstrak Metanol 70% Alga laut <i>H.durvilae</i> dengan <i>n</i> -Heksana, Kloroform, Air dan Mengukur Aktifitas Antioksidan...	98
5.2.1	Rendemen.....	98
5.2.2	Kadar Total Fenol .....	98
5.2.3	Aktifitas Antioksidan DPPH .....	100
5.2.4	Aktifitas antioksidan Daya Reduksi .....	101
5.2.5	Aktifitas Antioksidan Pengkelat Ion.....	103
5.2.6	Pembahasan .....	105
5.2.6	Kesimpulan .....	108
5.3	Tahap III: Isolasi, Elusidasi Dan Identifikasi Senyawa <i>H. durvilae</i> .....	108
5.3.1	Isolasi dan Pemurnian Dengan KLT Dan KK .....	110
5.3.2	Aktifitas Antioksidan Isolat murni .....	120
5.3.5	Interpretasi Spektrum NMR .....	120
5.3.3	Interpretasi Spektrum FTIR .....	134
5.3.4	Interpretasi Spektrum MS .....	137
5.3.6	Pembahasan .....	140
5.3.6	Kesimpulan .....	148

<b>VI</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>149</b>
6.1	Kesimpulan.....	149
6.2	Saran .....	152
	<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>153</b>
	<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>171</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
5.1	Remdemen Ekstraksi Alga laut <i>G. salicornia</i> , <i>S. oligocystum</i> , <i>T. decurens</i> dan <i>H. macroloba</i> . <i>H.durvilae</i> dengan Metanol 30, 50 dan 70%...	83
5.2	Kadar Total Fenol (g GAE/ 100 g Ekstrak) Ekstrak Metanol 30, 50 dan 70% <i>G.salicornia</i> , <i>S.oligocystum</i> , <i>T.decurens</i> , <i>H.macroloba</i> dan <i>H.durvilae</i> . (BNT=0.415).....	84
5.3	Aktifitas Antioksidan DPPH (%) Ekstrak Metanol 30, 50 dan 70% <i>G. salicornia</i> , <i>S. oligocystum</i> , <i>T. decurens</i> and <i>H. macroloba</i> , <i>H.durvilae</i> (10 mg/ml). BNT=9.776) .....	86
5.4	Daya Reduksi ((g GAE/ 100 g Ekstrak)) Ekstrak Metanol 30, 50, dan 70% <i>G. salicornia</i> , <i>S.oligocystum</i> , <i>T.decurens</i> and <i>H. macroloba</i> , <i>H.durvilae</i> (10mg/ml). BNT=6.797).....	88
5.5	Aktifitas Pengkelat Ion (%) ekstrak Metanol 30, 50 dan 70% <i>G.salicornia</i> , <i>S.oligocystum</i> , <i>T. decurens</i> and <i>H. macroloba</i> , <i>H.durvilae</i> ( 10 mg/ml) (BNT=7.372).....	90
5.6	Hasil Kromatografi Kolom 1. Fraksi f-H dengan Pelarut <i>n</i> -Heksana-Aseton. ....	113
5.7	Hasil Kromatografi Kolom 2 Fraksi f-H-3 dengan Pelarut <i>n</i> -Heksana-Aseton .....	114
5.8	Hasil Kromatografi Kolom 3 Fraksi f-H-3-2 dengan Pelarut <i>n</i> -Heksana-Aseton. ....	116
5.9	Kromatografi Kolom 4 Fraksi f-H-3-3 dengan Pelarut <i>n</i> -Heksana-Aseton.....	118
5.10	Data Pergeseran Kimia $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ dan 2 D NMR Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	132
5.11	Data $^1\text{H}$ - dan $^{13}\text{C}$ -NMR Isolat f-H-3-3-3 dan Asam Pentadekanoat $\beta$ -D-Glukosida.....	133
5.12	Tafsiran spektrum infra merah isolat fraksi <i>n</i> -heksana <i>H.durvilae</i> .....	135

5.13	Taksiran Spektrum Infra Merah Asam Pentadekanoat $\beta$ -D-glukosida.....	136
5.14	Puncak-Puncak Hasil Fragmentasi Isolat Fraksi n-heksana <i>H.durvilae</i> .....	139

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
2.1	<i>Gracilaria Salicornia</i> .....	9
2.2	<i>Sargassum oligocystum</i> .....	10
2.3	<i>Turbinaria decurens</i> .....	11
2.4	<i>Halimeda macroloba</i> .....	12
2.5	<i>Halimena durvilae</i> .....	13
2.6	Beberapa jenis phlorotannin; Phloroglucinol (1), Tetrafucol A (2), Tetraphlorethol B (3), Fucodiphlorethol A (4), Tetrafuhalol A (5), Phlorofucofuroeckol (6), dan Tetraisofuhalol (7). (Lopez <i>et al.</i> , 2012).....	18
2.7	Beberapa Jenis Antioksidan sintetik(1) <i>2-Butilated hydroxyanisol</i> (2- BHA), <i>3- butilated hydroxyanisol</i> (3-BHA) (2), <i>p-butilated hydroxy</i> <i>toluena</i> (BHT) (3). <i>Tert-butil hydroxyquinon</i> (TBHQ) (4), <i>Propil galat</i> (PG) (5) (Pokorny <i>et al.</i> , 2001).....	29
2.8	Mekanisme Reaksi Asam Askorbat dengan Radikal Bebas (Swaran, 2009).....	36
2.9	Jenis-Jenis Tokoferol dan Tokotrienol (Acoh and Min, 1997).....	38
2.10	Mekanisme Reaksi $\alpha$ -Tokoferol dengan Radikal Peroksida Lipida (Pokorny <i>et al.</i> , 2001) .....	39
2.11	Beberapa Jenis Karotenoid (Pokorny <i>et al.</i> , 2001).....	40
2.12	Produk yang Dihasilkan Melalui Reaksi $\beta$ -Karoten dengan Radikal Peroksida (Acoh and Min, 1997).....	42
2.13	Golongan Flavonoid Utama (Pokorny <i>et al.</i> , 2001).....	43
2.14	Beberapa Jenis Flavonoid yang Mempunyai Sifat Antioksidan (Denisov dan Aranas'ev, 2005).....	44
2.15	Struktur Flavonoid yang Mempunyai Aktifitas Antioksidan Terdapat pada: Kathekol dari Cincin (b) (1), Ikatan Rangkap pada Posisi 2,3- yang Berkonyugasi dengan Gugus Karboksil pada Cincin C.(2.), Kehadiran Hidroksil pada Posisi 3 dan 5 (3) (Pokorny <i>et al.</i> , 2001).....	45
2.16	Mekanisme Reaksi Superoksida dengan Flavonoid yang Mempunyai 2- <i>o</i> -hidroksil Substitusi (Denisov dan Aranas'ev, 2005).....	45

2.17	Mekanisme Reaksi Pengkelat Ion Flavonoid (Pokorny <i>et al.</i> , 2001).....	46
2.18	Sumber Radikal Bebas Dalam Tubuh (Young and Woodside, 2001).....	47
2.19	Pembentukan Spesies Oksigen Reaktif dan Sistem Pertahanan Antioksidan (Mates <i>et al.</i> , 1999, Wilcox, 2012).....	50
2.20	Mekanisme Kerja Antioksidan Asam Askorbat, Tokoferol dan GSH (Basu <i>et al.</i> , (1999).....	51
2.21	Ikatan Hidrogen Fenol Tersubstitusi Ortho pada Reaksi Radikal (Pokorsny <i>et al.</i> , 2001).....	56
2.22	Mekanisme Reaksi Senyawa Antioksidan dengan DPPH (Brand-Williams, 1995).....	57
2.23	Struktur N-Asetil Sistein (NAC) Menggambarkan 2 Sisi Pengkelat (Thiol dan Hidroksil) (Swaran, 2009).....	61
3.1	Kerangka Konsep Teori Penelitian .....	71
3.2	Kerangka Konsep Operasional dan Pengukuran.....	73
4.1	Ekstraksi <i>Gracilaria salicornia</i> , <i>Sargassum oligocystum</i> , <i>Turbinaria decurens</i> , <i>Halimeda macroloba</i> dan <i>Halimena durvilae</i> .....	77
4.2	Fraksinasi <i>H. durvilae</i> .....	79
4.3	Isolasi dan Identifikasi Senyawa <i>H.durvilae</i> .....	82
5.1	Aktifitas Antioksidan Pengkelat ion Ekstrak metanol 70% <i>G.salicornia</i> , <i>S.oligocystum</i> , <i>T.decurens</i> , <i>H.macroloba</i> <i>H.durvilae</i> .....	91
5.2	Perbandingan Aktifitas Antioksidan DPPH, Daya reduksi dan Pengkelat Ion (10 mg/g) Ekstrak metanol 30, 50 dan 70% <i>G. salicornia</i> , <i>S. oligocystum</i> , <i>T. decurens</i> and <i>H. macroloba</i> , <i>H.durvilae</i> (10 mg/g) dengan BHT (50, 100,150, 200 µg/ml).....	94
5.3	Kadar Total Fenol <i>H.durvilae</i> .....	99
5.4	Aktifitas Antioksidan DPPH <i>H.durvilae</i> .....	100
5.5	Aktifitas Antioksidan Daya Reduksi <i>H.durvilae</i> .....	102
5.6	Aktifitas Antioksidan Pengkelat Ion <i>H.durvilae</i> .....	103
5.7	Aktifitas Antioksidan Pengkelat ion Pada Beberapa Konsentrasi Ekstrak <i>H. durvilae</i> .....	104

5.8	Hasil Isolasi, Elusidasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	109
5.9	KLT fraksi (f-H) Heksana dari Sampel 2 Kali Ekstraksi dengan Pelarut <i>n</i> -Heksana-Etil Asetat (9:1,8:2,7:3,6:4,5:5).....	110
5.10	KLT fraksi (f-H) <i>n</i> -Heksana dengan Pelarut <i>n</i> - Heksana-Aseton (9:1,8:2,7:3,6:4,5:5,3:7,0:9).....	111
5.11	KLT fraksi (fH) Heksana dengan Pelarut <i>n</i> -Heksana -Aseton ( 7:3) yang Disemprot dengan DPPH 0.05%. .....	112
5.12	KLT fraksi (fH3-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13) Heksana dengan Pelarut <i>n</i> -Heksana-Aseton (9:1) .....	115
5.13	KLT Fraksi (fH-3-2-5,6,7,8,9,10,11,12,13) Heksana dengan Pelarut <i>n</i> -Heksana-Aseton (9:1) .....	117
5.14	KLT fraksi (f-3-3,4,5,6,7,7.1,7.2,8,8.1,9) Heksana dengan Pelarut <i>n</i> -Heksana-Aseton (9:1).....	119
5.15	KLT Isolat Murni f-H-3-3-9 dengan Pelarut Heksana-Aseton (4:1) Dichelupkan dengan Larutan DPPH 0.05% Dalam Metanol.....	120
5.16	Spektrum <sup>13</sup> C-NMR 1 isolat f-H-3-3-9 (125 MHz dalam KloroformD).....	121
5.17	Spektrum <sup>13</sup> C-NMR 2 isolat F-H-3-3-9 (125 MHz dalam Kloroform-D).....	122
5.18	Spektrum <sup>13</sup> C-NMR 3 Isolat f-H-3-3-9 (125 MHz dalam Kloroform-D).....	123
5.19	Spektrum DEPT Isolat f-H-3-3-9 (125 MHz dalam Kloroform-D).....	124
5.20	Spektrum HMQC Isolat f-H-3-3-9 (125 MHz dalam Kloroform-D).....	125
5.21	Spektrum <sup>1</sup> H-NMR Isolat f-H-3-3-9 (500 MHz dalam Kloroform-D).....	126
5.22	Spektrum HMBC 1 Isolat f-H-3-3-9 (500 MHz dalam Kloroform-D).....	128
5.23	Spektrum HMBC 2 Isolat f-H-3-3-9 (500 MHz dalam Kloroform-D).....	129
5.24	Spektrum HMBC 3 Isolat f-H-3-3-9 (500 MHz dalam Kloroform-D).....	130
5.25	Spektrum HMBC 4 Isolat f-H-3-3-9(500 MHz dalam Kloroform-D).....	130
5.26	Spektrum HMBC 5 Isolat f-H-3-3-9 (500 MHz dalam Kloroform-D).....	131



5.27	Fragmen-Fragmen Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	132
5.28	Dugaan Struktur Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	133
5.29	Struktur Asam Pentadekanoat $\beta$ -D-glukosida .....	134
5.30	Struktur Isolat Fraksi <i>n</i> -heksana <i>H.durvilae</i> .....	134
5.31	Spektrum Infra Merah Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	135
5.32	Spektrum Massa Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	138
5.33	Fragmentasi Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	140
5.34	Struktur Senyawa <i>H. porphyroides</i> (N-[2,3,4-trihidroksil-1-(hidroksimetil) octadesil] siklononadekanepentanamida (Beno <i>et al.</i> , 1990).....	141
5.35	Mekanisme Reaksi Asam Karboksilat dengan DPPH.....	142
5.36	Mekanisme Reduksi Lithium Aluminium oleh Asam Karboksilat (Hildebrandt <i>et al.</i> , 2013).....	143
5.37	Pengkelat Ion EDTA dan Asam Sitrat (Swaran, 2002) .....	144
5.38	Mekanisme Reaski Pengkelat Ion Asam Lipoat (Swaran, 2009).....	145

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul	halaman
<b>6.3</b>	<b>Prosedur Analisis Laboratorium .....</b>	<b>171</b>
	Lampiran 1. Pengukuran Kadar Total Fenol dengan metoda Folin Ciocalteau (Chew et al, 2008).....	171
	Lampiran 2. Pengukuran Aktifitas Antioksidan DPPH (1,1-diphenyl-2- d picrylhydrazyl), (Chew et al. (2008).....	171
	Lampiran 3. Pengukuran Daya Reduksi (FRAP) Chew et al, 2008.....	172
	Lampiran 4. Pengukuran Pengkelat ion (FIC) (Singh & Rajini (2004).....	172
	Lampiran 7. Prosedur analisis NMR .....	173
	Lampiran 5. Prosedur analisis FTIR.....	174
	Lampiran 6. Prosedur analisis ESMS .....	175
<b>6.4</b>	<b>Data Hasil Analisis Laboratorium Dan Analisis Statistik Kadar Total Fenol dan Aktifitas antioksidan Alga laut <i>G.salicornia</i>, <i>S.oligocystum</i>, <i>T.decurens</i>, <i>H.macroloba</i> dan <i>H.durvilae</i>.....</b>	<b>176</b>
	Lampiran 1. Data Hasil Analisis Kadar Total Fenol.....	176
	Lampiran 2. Analisis Keragaman Kadar Total Fenol .....	177
	Lampiran 3. Uji BNT Kadar Total Fenol .....	178
	Lampiran 4. Data Hasil Analisis Aktifitas Antioksidan DPPH.....	179
	Lampiran 5. Analisis Kewragaman Aktifitas Antioksidan DPPH .....	180
	Lampiran 6. Uji BNT Aktifitas Antioksidan DPPH .....	181
	Lampiran 7. Data Hasil Analisis Daya Reduksi.....	183
	Lampiran 8. Analisis Analisis Keragaman Aktifitas Antioksidan Daya Reduksi.....	184
	Lampiran 9. Uji BNT Aktifitas Antioksidan Daya Reduksi .....	185

Lampiran 10. Data Hasil analisis Aktifitas Antioksidan Pengkelat ion.....	186
Lampiran 11. Analisis Keragam Aktifitas Antioksidan Pengkelat Ion.....	187
Lampiran 12. Uji BNT Aktifitas ntioksidan Pengkelat Ion Antar.....	188
<b>6.3 Data Hasil Analisis Kadar Total Fenol dan Aktifitas Antioksidan Hasil Fraksinasi <i>H.durvilae</i> .....</b>	<b>188</b>
Lampiran 1. Data Hasil Analisis Kadar Total Fenol <i>H.durvilae</i> .....	188
Lampiran 2. Data Hasil Analisis Aktifitas Antioksidan DPPH <i>H.durvilae</i> .....	189
Lampiran 3. Data Hasil Analisis Aktifitas Daya reduksi Hasil Partisi <i>H.durvilae</i> .....	189
Lampiran 4. Data Hasil Analisis Aktifitas Pengkelat Ion <i>H.durvilae</i> .....	190
<b>6.5 Spektrum NMR Fraksi <i>n</i>-Heksana <i>H.durvilae</i>.....</b>	<b>191</b>
Lampiran 1. Spektrum NMR-H-1 Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> ....	191
Lampiran 2. Spektrum NMR-H-2 Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> ....	192
Lampiran 3. Spektrum NMR-H-3 Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> ....	193
Lampiran 4. Spektrum NMR-H-4 Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	194
Lampiran 5. Spektrum NMR-1-DEPT-1 Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	195
Lampiran 6. Spektrum NMR-1-DEPT-2 Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	196
Lampiran 7. Spektrum NMR-1-Dataslate-1 Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	197
Lampiran 8. Spektrum NMR-1-Dataslate-2 Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	198
Lampiran 9. Spektrum NMR-1-Dataslate-3 Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	199

Lampiran 10. Spektrum NMR-1-HMQC-1 Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	200
Lampiran 11. Spektrum NMR-1-HMQC-2 Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	201
Lampiran 12. Spektrum NMR-1.HMQC-3- Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	202
Lampiran 13. Spektrum NMR--1HMQC-4 Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	203
Lampiran 14. Spektrum NMR-1-HMQC-5 Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	204
Lampiran 15. Spektrum NMR-1-HMBC-1 Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	205
Lampiran 16. Spektrum NMR-1-HMBC-2 Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	206
Lampiran 17. Spektrum NMR-1-HMBC-3 Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	207
Lampiran 18. Spektrum NMR-1.HMBC-4 Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	208
Lampiran 19. Spektrum NMR-1-MMBC-5 Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	209
Lampiran 20. Spektrum NMR-1-HMBC-6 Isolat Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	210
<b>6.6 Spektrum FTIR Fraksi <i>n</i>-Heksana <i>H.durvilae</i> .....</b>	<b>211</b>
<b>6.7 Spektrum MS Fraksi <i>n</i>-Heksana <i>H.durvilae</i> .....</b>	<b>212</b>
Lampiran 1. Spesifikasi Alat Spektroskopi Massa.....	212
Lampiran 2. Spektrum ESMS-1 Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	213
Lampiran 3. Spektrum ESMS-2 Fraksi <i>n</i> -Heksana <i>H.durvilae</i> .....	214

<b>6.4. Determinasi Alga laut .....</b>	<b>215</b>
<b>6.5 Peta Lokasi Pengambilan Sampel.....</b>	<b>216</b>
<b>6.6 Jurnal Disertasi .....</b>	<b>217</b>
<b>6.7 Keterangan Bebas plagiasi.....</b>	<b>226.</b>

**DAFTAR SIMBOL, SINGKATAN DAN NOMENKLATUR**

$\mu$	Micromolar (i.e. micromoles l <sup>-1</sup> )
A•	Antioksidan radikal
AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
ABTS	2,20-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
ADP	Adenosine diphosphate
AH	Antioksidan
ATP	Adenosine triphosphate
AGE	Advanced glycation end-products
BHT	Butylated hydroxyl toluene
<sup>13</sup> C-NMR	Carbon-Nuclear magnetic resonance
CAT	Catalase
CYP450	Sitochrome-P450
2D-NMR	2-Dimensional-NMR
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer pada 2D-NMR
DMSO	Dimetilsulfoksida
DPPH	1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EPA	Eicosapentaenoic acid
Fe <sup>2+</sup>	Ferrous ion
Fe <sup>3+</sup>	Ferric ion
FeSO <sub>4</sub> ,	Ferro sulfat

FIC	Ferrous Ion Chelating
FRAP	Ferrous Reducing activity Power
FTIR	Fourier Transform Infra Red (Penentuan gugus fungsi)
GC	Gas chromatography (Penentuan Massa molekul)
GPX	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GAE	Gallic Acid Equivalent
GRAS	Generally Recognized as Safe
GSH	Glutathione (reduced)
G Px	Glutathione peroxidase
GSSH	Glutathione (xxx oxidized)
GST	Glutathione transferases
<sup>1</sup> H-NMR	Hydrogen- Nuclear magnetic resonance
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hydrogen peroksida
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Hydrogen sulfida
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation (2D-NMR)
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation (2D-NMR)
HOO•	Radikal hidrosil
HPLC	high performance liquid chromatography
IC <sub>50</sub>	Inhibition Concentration 50%
K <sub>3</sub> F <sub>6</sub> (CN) <sub>6</sub>	Kalium Ferricyanat
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
LOXs	Lipoxygenases
MDA	Malonaldehyde

mg	Milligrams
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natrium karbonat
NADPH	Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NMR	Nuclear magnetic resonance (Penentuan struktur senyawa)
NO•	Nitrat oksida
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oksigen Singlet
O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	Radikal superoxide
OCl <sup>-</sup>	Hipoklorite
OH•	Radikal hidroksil
ppm	Part permillion
δppm	Pergeseran kimia ppm pada spectrum FTIR,MS dan NMR)
δH	Pergeseran kimia Hidrogen pada spectrum H-NMR)
δC	Pergeseran kimia Carbon pada spectrum <sup>13</sup> NMR)
ODS	Okta Dexil xylan
ONOO <sub>2</sub>	Peroksinitrit
ORAC	Oxygen radical absorbing capacity
PUFA	PUFA polyunsaturated fatty acid
Rf	Rate of flow pada KLT
RNS	Reactive nitrogen species
ROOH	Alkylperoksida
R•	Radikal asam lemak
RO•	Radikal alkoksil
ROO•	Radikal Alkilperoksida
SD	Standart Deviasi



SOD	Superoksida Oksida Dismustase
TBA	Thio Barbituric Acid
TBARS	TBA-reactive substances
TCA,	Trichloro acetat Acid
TOH	Tocopherol
USA	United States of America
UV	Ultra Violet
WHO	World Health Organization

## BAB I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Di Tahun 2007 total produksi perikanan untuk alga laut sebesar 4.643 MT. Perkembangan terbesar pada Aquakultur dengan kenaikan 23,60%. Total produksi aquakultur tahun 2007 sebesar 3,19 juta MT, dimana masih rendah jika ditinjau dari area potensial yang tersedia untuk aquakultur. Produksi aquakultur Indonesia 2006 terbesar adalah alga laut 1,73 juta MT diikuti udang 0,36 juta MT. Karena itu masih ada potensi yang besar untuk pertumbuhan. Masih banyak alga laut yang belum dimanfaatkan dan usaha budidaya terus dilakukan (Saifuddin, 2009).

Pembentukan spesies oksigen reaktif dan radikal bebas lainnya selama metabolisme adalah sebuah kebutuhan dan normal yang secara ideal diimbangi dengan suatu sistem antioksidan endogenous. Tetapi karena perubahan diet dan gaya hidup dapat terjadi pembentukan radikal yang berlebihan atau kondisi *stres oksidatif*. *Stres oksidatif* berhubungan erat dengan terjadinya *kardiovaskuler*, kanker, diabetes dan penyakit kronis lainnya yang merupakan penyebab kematian terbesar saat ini (Chew *et al.*, 2008),

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat oksidasi molekul lain. Mekanisme aktifitas antioksidan seperti penghambatan inisiasi rantai, dekomposisi peroksida, pencegahan berlanjutnya abstraksi hidrogen, penangkapan radikal bebas, daya reduksi dan pengikatan katalis ion logam transisi. Tubuh tidak mempunyai sistem pertahanan antioksidatif yang berlebihan, sehingga jika terjadi paparan radikal bebas berlebihan tubuh membutuhkan antioksidan eksogen. Kekhawatiran terhadap efek samping antioksidan sintetik, maka antioksidan alami menjadi alternatif yang terpilih. Antioksidan alami mampu melindungi tubuh terhadap

kerusakan yang disebabkan spesies oksigen reaktif , mampu menghambat penyakit degeneratif serta mampu menghambat peroksidasi lipid (Ganesan *et al.*, 2008)

Alga laut merupakan sumber senyawa bioaktif yang tinggi, seperti: karotenoid, protein, asam lemak esensial, serat makanan, vitamin dan mineral. Alga laut dan ekstraknya mempunyai beberapa komponen senyawa kimia protektif seperti senyawa fenol dan PUFA. Selain dapat dimakan, alga laut juga dimanfaatkan sebagai anti helmitik, pengobatan gumpalan, antipembengkakan, pengobatan masalah urinasi tanpa efek samping, juga sebagai antipiretik, analgesik, antiperadangan dan aktifitas antioksidan dan antidiabetes (Kim *et al.*, 2008).

Fereira *et al.*, (2012) melaporkan bahwa alga laut merah mengandung antioksidan antheraxanthin (karotenoid), phikoeritrin ( pigmen bikobilin), galaktan dan sulfat galaktan. Alga laut coklat mengandung fukosantin dan phlorotannin dan polisakarida sulfat. *Halimeda sp* mengandung katekin (polifenol), *Sargassum sp* mengandung asam askorbat. Sedangkan senyawa aktif *Sargassum fillipendula* merupakan karotenoid dan asam benzena dikarboksil

Alga laut mengandung fenolphloroglucinol (phlorotannin) yang berfungsi sebagai peredam spesies oksigen reaktif, pengkelat logam, modulator enzim dan mencegah peroksidasi lipida (Mantanjun *et al.*, 2008). Chew *et al.*, (2008) melaporkan kadar total fenol ekstrak metanol 20, 50 dan 100% *P.antillarum*, *Caulerpa rasemosa* dan *Kappaphycus alvarezii*, menunjukkan bahwa pada konsentrasi 50% mengandung kadar total fenol tertinggi yaitu masing-masing sebesar  $243\pm 2,08$ ,  $144\pm 2,20$ ,  $115\pm 1,38$  mg GAE/gr ekstrak.

Menurut Chakraborty *et al.*, 2013, fraksi etil asetat *Turbinaria sp* mengandung metabolik sekunder potensial, dilihat dari kemampuan meredam radikal bebas DPPH. Yuan *et al.*, 2005 melaporkan bahwa fraksi heksana, kloroform

dan ekstrak metanol *Porphyra yezoensis* menunjukkan aktifitas antioksidan dengan kehadiran  $\beta$ -karoten, klorofil analog (fephitin) dan senyawa amin (leusin, fenilalanin dan asam amino mikosporin).

Kandungan senyawa bioaktif akan berbeda sesuai dengan lokasi, terutama perubahan musim mempengaruhi variasi faktor abiotik seperti: suhu, pH dan salinitas; juga faktor biotik seperti morfologi dan epifauna, dimana perbedaan-perbedaan ini mempengaruhi pada proses biosintesis senyawa metabolik sekunder (fitokimia) (Kumar *et al.*, 2008).

Menurut Sanchez-Moreno, 2002, aktifitas antioksidan dapat diukur dengan mengetahui komponen-komponen bioaktif dalam suatu bahan dengan cara ekstraksi. Ekstraksi padat cair paling banyak digunakan dalam usaha mengisolasi senyawa bioaktif yang terkandung didalam bahan dari alam. Sifat-sifat dari bahan alam tersebut merupakan faktor yang berperan sangat penting terhadap sempurna atau mudahnya ekstraksi dijalankan. Kesempurnaan suatu ekstraksi tergantung pada beberapa faktor seperti: pH, jenis pelarut, konsentrasi pelarut dan volume pelarut. Pada umumnya dalam suatu ekstraksi terlibat beberapa macam solut.

Kegunaan dan potensi alga laut yang sangat luas memberikan dorongan dilakukannya penelitian lebih lanjut mengenai potensi alga laut sebagai antioksidan karena belum ada penelitian tentang aktifitas antioksidan alga laut teristimewa yang ada di Sulawesi Utara. Ekstraksi alga laut menggunakan variasi konsentrasi metanol, fraksinasi menggunakan beberapa jenis pelarut dan isolasi bertujuan untuk mengetahui aktifitas antioksidan serta struktur senyawa antioksidan isolat murni. Penelitian ini akan bermanfaat untuk memberikan informasi dalam upaya pemanfaatan alga laut sebagai sumber antioksidan alami untuk tujuan yang lebih luas terutama untuk kesehatan.

## 1.2. Perumusan masalah

- a. Apakah konsentrasi metanol mempunyai pengaruh terhadap kemampuan aktifitas antioksidan alga laut ?
- b. Apakah kepolaran pelarut mempengaruhi aktifitas antioksidan alga laut?
- c. Bagaimana metoda isolasi yang tepat untuk mendapatkan senyawa murni dan bagaimana menginterpretasi spektrum FTIR, MS dan NMR.

## 1.3. Tujuan Penelitian

- a. Untuk menganalisis aktifitas antioksidan tertinggi ekstrak metanol 30, 50 dan 70% dari alga laut *G. salicornia*, *S. oligocystum*, *T. decurens* and *H. macroloba* dan *H.durvilae*.
- b. Untuk menganalisis aktifitas antioksidan hasil fraksinasi ekstrak metanol 70% *H.durvilae*.
- c. Mengisolasi dan mengidentifikasi struktur senyawa yang berhasil disolasi dari fraksi *n*-heksana *H.durvilae* dan mengukur aktifitas antioksidan isolat murni.

## 1.4. Manfaat Penelitian

- a. Memanfaatkan alga laut sebagai sumber antioksidan alamiah terutama untuk tujuan kesehatan
- b. Penemuan tentang alga laut *G. salicornia*, *S. oligocystum*, *T. decurens*, *H. macroloba* dan *H.durvilae*,. mempunyai aktifitas antioksidan akan memungkinkan memperbaiki nilai alga laut ini di Sulawesi Utara sebagai bahan makanan fungsional sumber antioksidan alami untuk dieksplorasi secara industri.

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Alga Laut

Menurut Barsanti dan Gualtieri, 2006, ganggang adalah bersifat autotrophik, organisme aerobik yang mengandung klorofil dan berfotosintesis seperti tumbuhan vaskular. Mereka tumbuh di air atau di garis pantai dan "alga laut" adalah nama umum untuk ganggang. Alga laut mengandung komponen yang tidak biasa dibandingkan dengan tanaman darat, sebagai hasil adaptasi terhadap kondisi ekstrim di mana mereka tumbuh. Alga laut dikelompokkan berdasarkan nutrisi dan komposisi kimia yang terkandung di dalamnya. Menurut Dawczynski *et al.*, 2007, lebih dari 200 tahun yang lalu, alga laut berdasarkan warna *tallus* dikelompokkan menjadi 3 jenis, yaitu alga laut merah (Rhodophyta), alga laut hijau (Chlorophyta) dan alga laut coklat (Phaeophyta). Variasi warna *tallus* pada setiap jenis alga laut dipengaruhi oleh adanya perbedaan jenis pigmen dan kandungan pigmen dominan yang terdapat di dalamnya.

### 2.2. Manfaat Alga Laut

Sebagai produk pangan sumber mineral, vitamin dan *calory dietary fiber* yang larut dalam air (alginat, fukan dan laminarian), antioksidan (karotenoid, senyawa fenol, vitamin E dan C), banyak jenis alga laut mempunyai aktifitas antiproliferatif, antimikroba, antikoagulan dan antivirus. Ekstrak alga laut juga telah dibuat tablet pengganti garam untuk hipertensi dan obat rematik (Yuan and Walsh, 2006). Aplikasi antioksidan alami menjadi berubah dan mengarah pada bahan makanan yang berfungsi sebagai makanan kesehatan. Penduduk Asia Timur menggunakan sayuran alga laut secara teratur sejak dahulu kala. Hasilnya dengan mengkonsumsi alga laut dengan kadar yodium yang tinggi mengakibatkan insident penyakit kanker paru-paru yang rendah. Eksplorasi bahan alami yang mempunyai

aktivitas biologis menjadi salah satu target para peneliti teristimewa alga laut, setelah senyawa-senyawa sintetik yang mempunyai aktivitas biologi seperti senyawa antioksidan sintetik (*butylated hydroxytoluen* (BHT), *butylated hydroxyanisole* (BHA) dan *tetrabutylhydroxyquinone* (TBHQ) dilarang penggunaannya karena bersifat karsinogenik (Juntacho *et al.*, 2007).

### **2.3. Komposisi Kimia Alga Laut**

Rohani-Chadikolaei *et al.*, (2011) melaporkan bahwa komposisi kimia alga laut tergantung pada spesies, habitat, kematangan dan kondisi lingkungan. Alga laut mengandung sejumlah besar polisakarida, tetapi rendah akan kandungan protein dan lemak. Kualitas protein dan lemak alga laut baik untuk dikonsumsi karena tingginya asam amino esensial serta asam lemak tak jenuh, yang sangat berbeda dengan tumbuhan darat. Alga laut mengandung vitamin dan senyawa bioaktif seperti: terpenoid dan polisakarida sulfat yang merupakan antioksidan alami yang tidak ditemukan pada tanaman darat, demikian juga mineral nutrisi yang ada pada alga laut berbeda dengan tanaman darat. Alga laut kaya akan yodium dan kalsium. Merupakan sumber yang luar biasa akan vitamin A, B1, B12, C dan E (Takeshi *etal.*, 2005)

#### **2.3.1. Polisakarida**

Menurut Ferreira *et al.*, 2012, alga laut mengandung polisakarida yang struktur kimianya tergantung pada taksonomi dan struktur sel. Sulfat polisakarida menghambat aktifitas banyak spesies bakteri dan juga virus. Polisakarida alga laut dapat mempunyai aktifitas sebagai prebiotik yang merupakan senyawa yang menstimulasi pertumbuhan bakteri yang menguntungkan, memperbaiki kesehatan dan antioksidan non-toksik. Kandungan polisakarida alga laut lebih besar 70% dan paling banyak dalam bentuk galaktan, fukoidan, laminaran dan alginat. *Sargassum*

*mangarevense* dan *Turbinaria ornata* mengandung serat kasar 38,1–42,8% (Zubia *et al.*, 2003). *Ulva sp.* adalah alga laut hijau yang tumbuh tersebar diseluruh dunia mengandung struktur *dietary fiber* glukosamin glikan, kaya akan polisakarida sulfat yang tidak dapat dicerna oleh enzim-enzim pencernaan. Karbohidrat didalam Phaeophyceae mengandung larutan serat alginat, laminaran, fukan dan selulosa yang tidak larut (Kolb *et al.*, 2004)

### **2.3.2. Protein**

Senyawa bioaktif protein yang sangat penting yang diekstrak dari alga laut adalah lesitin yang berikatan dengan karbohidrat. Lesitin berperan dalam banyak proses biologi seperti interaksi intraselular, mempunyai aktifitas sebagai anti bakteri, anti virus dan anti peradangan (Cunningham and Joshi, 2010). Kandungan protein yang tinggi terdapat pada *S. mangarevense* sebesar  $30,6 \pm 1,9\%$ . Semua jenis alga laut mempunyai pola kandungan asam amino yang dominan adalah asam aspartat dan asam glutamat (38,1- 42,8%). *Ulva sp.* kaya akan asam amino dengan komposisi yang sesuai dengan “*the ratio of reference protein*” yang disarankan oleh FAO, WHO dan UNO, kecuali triptofan (Zubia *et al.*, 2007).

### **2.3.3. Lipida**

Fosfolipid dan glikolipid adalah golongan utama lipida yang ditemukan pada alga laut. Jika penurunan temperatur lingkungan terjadi, alga laut dapat mengakumulasi asam lemak tak jenuh (PUFA). Spesies yang hidup didaerah dingin mengandung PUFA lebih banyak daripada daerah temperatur lebih tinggi. PUFA rantai panjang (paling sedikit 20 karbon dan satuikatan rangkap) menjadi perhatian karena sangat penting untuk memelihara kesehatan manusia disebabkan mereka hanya dapat disintesa oleh tanaman. Pada *Enteromorpha spp.* terdapat n-3 rantai panjang (LC PUFA) sebanyak 10,38% dari total asam lemak (Morales *et al.*, 2005).



### 2.3.4. Vitamin dan Mineral

Menurut Kolb *et al.*, 2004, dibandingkan dengan tumbuhan darat, alga laut mempunyai kandungan vitamin 10 kali lebih tinggi, dengan jumlah yang unggul untuk vitamin A,D,E dan B kompleks . Kandungan jodium, B1, B2, B6, aniacin, beta karoten dan mineral yang tinggi dan kandungan logam berat yang diabaikan didalam *edible* alga laut coklat (*Undaria pinnatifida* Wakame dan *Laminaria digitata* japonica Kombu). Alga laut kaya akan mineral karena mengakumulasi ion-ion logam dari air laut dan yang sebagian besar sebagai garam-garam karbonat. *Sargassum ringgoldianum* subsp. coreanum, mengandung kalium 2,7 g/L, magnesium 0,19 g/L dan kalsium 0,16g/L *Codium fragile* 1,2 g/L.

## 2.4. Morfologi dan Komposisi Kimia *Gracilaria salicornia*, *Sargassum oligocystum*, *Turbinaria decurens*, *Halimeda macroloba* dan *Halimena durvilae*

### 2.4.1. *Gracilaria salicornia*

Menurut Abbot *et al.*, 2002, *G. salicornia* ditemukan pada daerah pasang dan hamparan karang daerah intertidal sampai subtidal pada kedalaman 4 meter. Melekat pada batu kapur dan substrat dasar. Tallusnyapadat, rapuh, berbentuk silinder dengan panjang 3-18cm, dengan cabang-cabang yang biasanya tidak teratur. Bentuknya sering bersujud dan tumpang tindih, dengan cabang lateral yang berjalani sepanjang substrat (Gambar 2.1).

*Gracilaria salicornia* mengandung lemak yang terbatas berkisar 0,99- 2,00 g/100 g berat kering, kandungan mineral 3,91 g/100 g berat kering, protein kasar sebesar 9,58 g /100 g berat kering dan total asam amino sebesar 889,78 ± 22,64 mg /g protein berat kering .



**Gambar 2.1. *Gracilaria salicornia***

Klasifikasi dan taxonomi *G.salicornia* menurut Ohba *et al*, 2007, sebagai berikut:

**Domain** *Eukaryota*

**Kingdom** *Plantae*

**Phylum** *Rhodophyta*

**Subphylum** *Eurhodophytina*

**Class** *Florideophyceae*

**Subclass** *Rhodymeniophycidae*

**Order** *Gracilariales*

**Family** *Gracilariaceae*

**Genus** *Gracilaria salicornia*

*Gracilaria salicornia* sangat melimpah akan asam lemak C12:0, C16:0, C20:4 ω6, C22:5 ω3 dan C18:1 sebagai sumber asam lemak ω3 dan ω6. *G. salicornia* mempunyai kandungan kalium yang tinggi diantara alga laut dan terdapat mineral Ca, Na and Fe yang lebih tinggi dari tumbuhan darat (Tabarsa *et al.*, 2002)

Komposisi nilai nutrisi alga laut merah *Gracillaria verrucosa* sebagai berikut: kadar air 72,90%, karbohidrat 4,94%, protein 7,30%, lemak 0,09%, serat kasar 2,50%, abu 12,54%. mineral Ca 29,925 ppm, Fe 0,701 ppm, Cu 3,581 ppm, Pb 0,190 ppm (Atmadja, 1996). *Glacilaria sp* dimanfaatkan sebagai makanan segar, menambah tekstur yang renyah dan lezat pada makanan, umumnya dicampur dengan bahan dasar ikan untuk diolah menjadi banyak variasi dalam suatu hidangan (Paul and Chen, 2008).

#### 2.4.2. *Sargassum oligocystum*.

Abbot *et al.*, (2002) menyatakan bahwa *Sargassum* sp. ditemukan di seluruh daerah tropis di dunia, tumbuh di daerah-daerah pantai dekat terumbu karang dan di daerah berbatu atau kerikil cukup terpapar atau terlindung. Tallus *Sargassum* berwarna coklat tua sampai coklat kekuningan, menempel pada batu oleh pegangan erat, bercabang kasar, batang pendek berbentuk silinder. Thalli hingga 40 cm dengan cabang primer silinder, bantalan cabang sekunder teratur bergantian dengan berbagai proliferasi. *Cryptostomata* tersebar pada permukaan daun bulat telur atau bulat dan banyak vesikel melekat pada cabang sekunder, tersier dan cabang terminal baik secara tunggal atau dalam kelompok (Gambar 2.2)



**Gambar 2.2. *Sargassum oligocystum***

Klasifikasi dan taxonomi *Sargassum oligocystum* (Ohba, 2007) sebagai berikut:

**Domain** Eukariota

**Phylum** Heterokontophyta

**Class** Phaeophyta

**Ordo** Fucales

**Family** Sargassaceae

**Genus** *Sargassum*

**Spesies** *Sargassum oligocystum*

Komposisi kimia *Sargassum* sp. sebagai berikut: kadar air 68,65%, kadar protein total 13,2% (protein yang larut dalam air 8,55% dan protein yang larut dalam

etanol 2,32%), kadar abu total 8,42% (kadar abu yang tidak larut dalam asam 0,46%). Spesies *Sargassum* tropis sering dikonsumsi oleh ikan *herbivora* dan *Ekinoida*, mempunyai kandungan yang relatif rendah akan fenolat dan tanin (Atmadja *et al.*, 1996).

#### **2.4.3. *Turbinaria decurens***

*Turbinaria decurens* memiliki daun persegi tiga yang tebal, sedikit cekung di pusat dan memiliki gerigi tajam kecil di margin wadah bercabang. *T. decurens* ditemukan di bebatuan dan karang mati diintertidal rendah sampai zona subtidal sepanjang garis pantai terkena gelombang kuat sampai kedalaman 2 meter (Anggadiredja, 2006)



**Gambar 2.3. *Turbinaria decurens***

Klasifikasi dan taxonomi *Turbinaria decurens* (Ohba,2007) sebagai berikut:

**Domain** *Eukaryota*

**Kingdom** *Chromista*

**Phylum** *Ochrophyta*

**Class** *Phaeophyceae*

**Order** *Fucales*

**Family** *Sargassaceae*

**Genus** *Turbinaria*

**Spesies** *Turbinaria decurens*

Zubia *et al.*, (2008) melaporkan bahwa *Turbinaria sp.* mengandung pola asam amino dengan dominasi asam aspartat dan glutamat (28,10-33,77% dari total asam amino). Memiliki komposisi asam lemak, dengan konsentrasi tinggi bentuk tak jenuh ganda, terutama C18 dan C20. *T. Ornata* mempunyai kandungan mineral yang tinggi, terutama kalsium, magnesium, kalium besi dan seng.

#### **2.4.4. *Halimeda macroloba***

*Halimeda macroloba* (Gambar 2.4) adalah alga laut hijau dimana tallusnya disusun oleh segmen kalsium hijau. Kalsium karbonat membentuk jaringannya, itulah sebabnya alga laut ini tidak dapat dimakan oleh pada umumnya karnivora. Merupakan organisme individual yang disusun oleh sel-sel multinuklet. Seluruh *meadow* terdiri dari individual alga laut yang dihubungkan oleh *threads running* melalui substrat, tumbuh pada aliran air yang kaya nutrisi pada perairan terbuka (Atmadja *et al.*, 1998)



**Gambar 2.4. *Halimeda macroloba***

*Halimeda macroloba* mempunyai tallus tipis agak kasar, mempunyai percabangan hijau keputih-putihan. *Hold fast* berkapur dan menempel kuat pada substrat, tumbuh pada daerah perairan dangkal biasanya batu karang (Abbot, 2002).

Klasifikasi dan taxonomi *H. macroloba* (Ohba, 2007) sebagai berikut::

**Division** *Chlorophyta*

**Class** *Bryopsidophyceae*

**Order** *Bryopsidales*

**Family** *Halimedaceae*

**Genus** *Halimeda*

**Spesies** *Halimeda macroloba*

*Halimeda. macroloba* umumnya mempunyai pigmen klorofil a dan b dan juga karoten dan xantofil dengan kandungan karbohidrat  $17,2\pm 0.71\%$ , protein  $28,94\pm 0.68\%$ , dan lipida  $0,26\pm 0,07\%$ . Dinding selnya tersusun dari selulosa, pektin dan peptidoglikan (Manivannan *et al.*,2009).

#### 2.4.5. *Halimena durvilae*

Genus *Halimena*(Gambar 5) mempunyai tallus yang lembut, bercabang, dan memiliki tekstur licin berlendir waktu segar. Medula luar (*inner cortex*) berbentuk bintang yang kemudian akan membentuk filamen-filamen. Filamen-filamen ini mempunyai percabangan dua atau 3 kali (Gumaires dan Fujii ,1998)



**Gambar 2.5. *Halimena durvilae***

Spesies *H. durvilae* sebagai makan di Myanmar, *H. venusta* dikultur untuk dijadikan sumber makanan.( Zemke-White dan Ohno, 1999)

Klasifikasi dan taxonomi *Halimena durvilae* sebagai berikut:

**Domain** Eukaryota

**Kingdom** Plantae

**Phylum** Rhodophyta

**Subphylum** Eurhodophytina

**Class** Florideophyceae

**Subclass** Rhodymeniophycidae

**Order** Halymeniales

**Family** Halymeniaceae

**Genus** *Halimena*

**Spesies** *Halymena durvilae*

## 2.5. Antioksidan Alga Laut.

Yuan *et al.*, (2005<sup>b</sup>) melaporkan bahwa alga laut mengandung senyawa antioksidan, seperti fukosantin dan astaxantin, phlorotannin, klorofil, fosfolipid, flavonoid, bromfenol dan polisakarida. Senyawa antioksidan aktif dari alga laut yang telah diidentifikasi adalah phylopheophyllin didalam *Eisenia bicyclis*, phlorotannin didalam *Sargassum kjellmanianum*, fucoxantin didalam *Hijikia fusiformis* (Ganesan *et al.*, 2008).

Menurut Ferreira *et al.*, 2012, pigmen utama alga laut adalah karotenoid, klorofil dan fikobiliprotein. Pigmen adalah polien yang larut dalam lipida. Spesies alga laut yang berbeda mengandung jenis karotenoid yang berbeda, dimana karotenoid mempunyai aktifitas antioksidan yang kuat.  $\beta$ -karoten dan lutein yang terdapat pada *Chondrus crispus* dan *Mastocarpus stellatus* mempunyai aktifitas sebagai antimutagenik sebagai proteksimelawan kanker payu darah. Menurut Yang *et al.*, 2010, klorofil a, klorofil a1, klorofil c1, isomer *transfukosanthin*, isomer *cis fukosanthin*,  $\beta$ -kriptoxanthin, zeaxanthin, violaxanthin, fucoxantol, feofitin a, feofitin a' dan  $\beta$ -karoten merupakan pigmen yang ditemukan pada hampir semua alga laut coklat.

Fikobiliprotein adalah pigmen yang larut dalam air dihasilkan oleh *cyanobacteria (blue-green algae)*, alga lautmerah dan *Cryptomonad* (Song *et al.*, 2005). Senyawa ini selain sebagai antioksidan juga sebagai anti peradangan dan bersifat melindungi saraf (Holdt dan Kraan, 2011). *Fikoerythrin* umumnya terdapat pada alga laut merah berfungsi sebagai ameliorasi komplikasi diabetes (Yabuta, 2010). Alga laut merah mempunyai sifat adaptik kromatik, yaitu mempunyai penyesuaian antara proporsi pigmen dengan berbagai kualitas pencahayaan sehingga pada kenyataan di alam, alga laut merah menunjukkan variasi warna lain seperti pirang, violet, merah tua, merah muda, coklat, kuning dan hijau (Atmadja, 2007, Song 2005).

Fikosianin merupakan salah satu dari tiga pigmen (klorofil, fikosianin dan karotenoid) yang mampu menangkap radiasi matahari paling efisien. Fikosianin bermanfaat dalam proses fotosintesis karena merupakan prekursor bagi klorofil dan haemoglobin dengan kandungan magnesium dan besi (Arlyza, 2005).

Alga laut menghasilkan polifenol untuk melindungi dirinya dari kondisi eksternal seperti stres dan herbivora. Fenolik mempunyai aktifitas antioksidan yang kuat, jenis-jenis senyawa fenolik adalah; flavonoid, isoflavon, asam sinamat, asam benzoat, quercetin dan lignan (Gupta dan Ghannan, 2011). Fukosantin terdapat pada alga laut coklat bermanfaat sebagai anti defisiensi retinol. Phlorotannin yang terdapat pada *Sargassumpallidum* dan *Fucus vesiculosus* bersifat sebagai anti peradangan, bakteriosidal, dan anti hipertensi (Cornich dan Garbary, 2010). Di India alga laut terutama dieksploitasi sebagai sumber fikokoloid seperti agar-agar, alginat dan karagenan terutama untuk makanan dan obat, serta secara sistematik dipelajari untuk potensial terapi (Vinayak *et al.*, 2010).



Menurut Moon & Shibamoto, 2009, senyawa polifenol adalah antioksidan alami yang paling banyak ditemukan pada tanaman. Ekstrak airalga laut mengindikasikan korelasi yang kuat antara aktifitas antioksidan DPPH dengan kadar total fenolik (Duan *et al.*, (2006) dan Dudonné *et al.*, 2009).

Matsukawa *et al.*, (1997) melaporkan bahwa *Sargassum Sp.* mempunyai aktifitas penghambatan lipoksigenase dimana aktifitas ekstrak etanol mempunyai aktifitas yang lebih tinggi dari ekstrak air. Penghambatan lipoksigenase tidak mempunyai korelasi dengan aktifitas antioksidan. Aktifitas penghambatan lipoksigenase mungkin disebabkan oleh berhentinya penambahan enzimatis oksigen pada substrat asam lemak dan pembentukan hidroperoksida. Antioksidan alga laut dapat menghambat konsumsi oksigen dan pembentukan hidroperoksida.

Sukar untuk membandingkan aktifitas antioksidan antara spesies karena dikoleksi pada periode waktu yang berbeda dan lokasi yang berbeda. Produksi senyawa antioksidan seperti fenolik dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti: faktor ekstrinsik (tekanan herbivora, iradiasi, kedalaman, salinitas, nutrient dan sebagainya) dan faktor intrinsik (jenis, umur dan tingkat reproduksi (Conan *et al.*, 2006).

Menurut Swanson dan Druehl 2002, kadar total fenol dan aktifitas pengkelat ion menunjukkan korelasi yang negatif, karena itu kehadiran beberapa senyawa lain selain fenol, beberapa peptida dan protein yang menyebabkan kemampuan mengkelat logam transisi. Prabhansankar, *et al.*, 2009), melaporkan bahwa polisakarida seperti alginat dan fucoidan pada *Ascophyllum* adalah lebih efektif dari phlorotannin dalam kemampuan mengkelat ion logam untuk detoksifikasi. Beberapa peptida dan juga protein ditemukan dalam ekstrak alga laut mempunyai kemampuan aktifitas pengkelat ion.

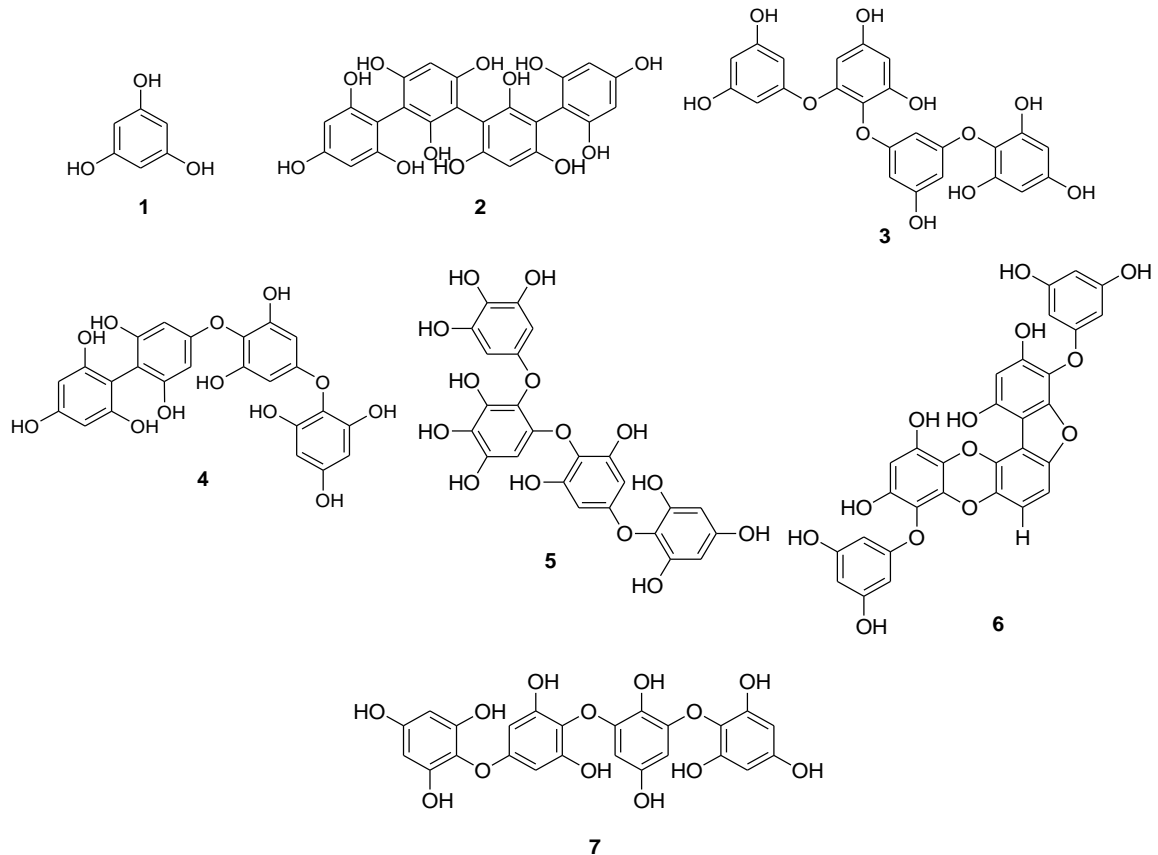
Alga laut coklat ditemukan pada beberapa ekstrak menunjukkan nilai nutraceutical sebagai antioksidan potensial melalui pengurangan radikal toksisitas yang terinduksi, antiobesitas, daya reduksi dan pengkelat ion. *Turbinaria* menunjukkan potensial mempunyai kemampuan meredam DPPH<sup>•</sup>, kapasitas reduksi HO<sup>•</sup> dan aktifitas pengkelat ion Fe<sup>2+</sup> (Kim *et al.*, 2008, Mantanjun *et al.*, 2008). Yuan *et al.*, (2005) melaporkan bahwa isoflavon berpotensi memiliki sifat-sifat antioksidan yaitu dapat mengurangi resiko terserang penyakit kanker dalam jangka waktu panjang, dengan mencegah kerusakan DNA oleh radikal bebas.

Menurut Lopez *et al.*, 2012, umumnya penggolongan polifenol pada tumbuhan darat berdasarkan struktur, yang terdiri dari polimer flavonoid dan asam galat. Dalam alga laut adalah phlorotannin dengan besar molekul 126- 650 kDa). Salah satunya phloroglucinol (unit-unit 1,3,5 trihidrobenzena). Phlorotannin terdapat dalam alga laut coklat dan dibiosintesa melalui jalur asetat malonat dalam badan golgi di area inti sel. Konsentrasi phlorotannin pada alga laut coklat bervariasi antara spesies yang dipengaruhi oleh besar, usia, jenis jaringan, salinitas, musim, tingkat nutrisi, intensitas herbivora, intensitas cahaya dan temperatur. Konsentrasi maksimum pada antlantik tropis lebih besar 20% dari berat kering dan minimum pada daerah pasifik tropis dan indopasifik.

Phlorotannin merupakan senyawa penting dalam dinding sel dan berperan mengabsorpsi radiasi UV. Phlorotannin potensial berguna untuk kesehatan, sifat-sifat phlorotannin dalam sistem biologi seperti antiperadangan, antialergi, antivirus, antikanker, antibakteri, antioksidan dan aktifitas antidiabetes (Lopez *et al.*, 2012)

Phlorotannin dapat dibagi dalam 6 golongan spesifik (fucol, phlorethol, fucophlorethol, fuhanol, isofuhanol dan echol) yang dibedakan pada gugus hidroksil

yang mengikat unit phloroglucinol, Beberapa Jenis Phlorotannin dapat dilihat pada Gambar 2.6)



**Gambar 2.6. Beberapa jenis phlorotannin; Phloroglucinol (1), Tetrafucol A (2), Tetraphlorethol B (3), Fucodiphlorethol A (4), Tetrafuhalol A (5), Phlorofucofuroeckol (6), dan Tetrakisofuhalol (7). (Lopez et al., 2012)**

Komponen bioaktif utama *Hijikia fusiformis* didalam ekstrak aseton adalah pigmen karotenoid, diidentifikasi dengan C-NMR spectroscopy adalah *fucoxantin*, yang termasuk antioksidan dengan aktifitas melawan oksigen singlet. *Fucoxantin* mempunyai struktur karbon ganda alenad yang tidak umum. Berbeda dengan  $\beta$ -karoten,  $\beta$ -cripxoxanthin, zeaxanthin dan lutein yang tidak mempunyai pengaruh aktifitas meredam DPPH (Xiaojun et al., 1999).

. Menurut Chen *et al.*, 2007, poliphenol seperti phlorotannin yang adalah bi-polar yang banyak pada alga laut coklat, berfungsi melawan luka pada hati yang disebabkan oleh karbon tetraklorid, sebagai antioksidan dengan keberadaan multifenolnya untuk melawan *stress oksidatif* sebagai peran adaptasi dalam melawan *grazer*, seperti herbifora laut.

Chew *et al.*, 2008, melaporkan bahwa *Padina antillarum* merupakan alga laut coklat diolah sebagai makanan dalam bentuk serpihan kering serta dimanfaatkan sebagai tablet pengganti garam untuk pasien tekanan darah tinggi, mengandung alginat yang tinggi, sebagai antikoagulan dan antivirus, *Caulerpa racemosa* dimanfaatkan sebagai hidangan salad, maupun dimasak, digunakan untuk menurunkan tekanan darah tinggi dan rematik. Sedangkan *Kappaphycus alvarezii* sebagai sumber karagenan komersial. Berdasarkan analisa KadarTotal phenol dan aktifitas antioksidan maka ke 3 jenis alga laut ini merupakan antioksidan hidrofilik maupun hidrophobik.

Kumar *et al.*, 2008, mengemukakan bahwa membran sel adalah bilayer fosfolipid dengan ekstrinsik protein, yang adalah target langsung oksidasi lipida. Saat oksidasi lipida membran sel meningkat polaritas permukaan lipida dan pembentukan oligomer protein meningkat, serta mobilitas molekul lipida, jumlah golongan SH dan ketahanan denaturasi termal menurun. Malonaldehid adalah satu dari produk oksidasi lipida yang dapat bereaksi dengan asam amino bebas protein, fosfolipida, dan asam nukleat yang menyebabkan modifikasi struktural yang mengakibatkan disfungsi sistem imun.

Penghambatan peroksidasi lipida mungkin karena kehadiran antioksidan polifenol melalui donasi proton radikal asam lemak pada reaksi terminal rantai. Ekstrak alga laut coklat *Turbinaria spp.* adalah penghambat peroksidasi lipida

sangat baik. Kemampuan mereduksi *Turbinaria* spp lebih tinggi dari  $\alpha$ -tokoferol (Chakraborty *et al.*, 2013).

Yuan *et al.*, 2005 mengemukakan bahwa polisakarida memegang peranan penting sebagai antioksidan peredam radikal in-vitro untuk pencegahan kerusakan oksidatif organisme hidup. Aktifitasnya tergantung pada beberapa parameter struktural, seperti tingkat sulfat, berat molekul, posisi sulfat, jenis gula dan cabang glikosida. Beberapa laporan menjelaskan bahwa sulfat dan golongan fosfat didalam polisakarida menyebabkan perbedaan aktifitas biologi. Glukan fosfat dan glukan sulfat dilaporkan mempunyai kemampuan aktifitas antioksidan lebih baik dari glukan atau polisakarida netral lainnya, yang mengindikasikan bahwa polielektrolit seperti glukan fosfat atau glukan sulfat meningkatkan peredaman radikal. Kandungan fosfat polisakarida *Porphyra yezoensis* menunjukkan aktifitas antioksidan. *K.alvarezii* disusun oleh karagenan yaitu sebuah polisakarida sulfat, mempunyai kemampuan antioksidan, disamping kehadiran asam askorbat, vitamin A dan senyawa fenolik. *K.alvarezii* sebagai sumber karagenan (D-galaktosa 4-sulfat dan residu 3,6-anhidro D-galaktosa) yang potensial sebagai antioksidan. Senyawa-senyawa seperti polisakarida berat molekul rendah, pigmen, protein atau peptida juga mempengaruhi aktifitas antioksidan (Siriwardhana *et al.*, 2003).

*Gracilaria aerosa* menunjukkan pengaruh antioksidan melawan peroksidasi lipida, memindahkan hidroksil radikal dan menghambat degradasi 2-deoksi-2-ribosa. OH<sup>•</sup> diketahui mampu memecah atom hidrogen dari membran dan menghasilkan reaksi peroksidasi lipida (Kitada *et al.*, 1978). Menurut Devi *et al.*, 2008, spesies oksigen reaktif mengakibatkan peroksidasi lipida (PUFA) menghasilkan oksidan sekunder seperti heptanol dan heksanal yang berkontribusi ketengikan oksidatif, perubahan flavor makanan, yang tidak hanya menyebabkan kehilangan kualitas

makanan, tetapi juga diyakini sangat berhubungan dengan karsinogenesis, mutagenesis, arthritis, diabetes, peradangan, kanker dan genotoksisitas.

Chew *et al.*, (2007) melaporkan aktifitas antioksidan dari *Padinaantilarum*, *Caulerpa rasemona* dan *Kappaphycus alvarezzi*. Hasil analisis Kadar total phenol tertinggi pada *P. antilarum* sedangkan DPPH tertinggi adalah *C.rasemona*. Karena karena kadar total fenol *C.rasemosa* rendah, maka tingginya nilai DPPH diduga karena tingginya asam folat. Kemampuan mengkelat tertinggi adalah *P.antilarum* yaitu 15,7 mg GAE/100 gr, ini disebabkan karena pada alga laut coklat terdapat phlorotannin yang merupakan pengkelat logam berat yang kuat. Menurut Nwosu *et al.*, 2011, ekstrak *Ascophyllum* mempunyai 3-4 kali kurang efektif dari *Alaria* didalam menghambat proliferasi sel kanker kolon, sedangkan kandungan fenolnya 40 kali lebih besar dari *Alaria*.

Menurut Lopes, 2012, yang menjadi perhatian saat ini yaitu antiperadangan dari phlorotannin. Pengaruh ekstrak alga laut terhadap menurunkan produksi Nitrat oksida (NO) pada sel dalam respons peradangan. NO adalah mediator penting peradangan yang disintesa dari arginin oleh nitrat dioksida sintetase (NOS). NO adalah dapat mendifusi radikal bebas yang berpengaruh pada sistim biologi sebagai vasodilator, neurotransmitter dan sistim imun, pertahanan melawan sel tumor, parasit dan bakteri. IsoNOS mengakibatkan produksi NO yang besar yang mengakibatkan multi disfungsi organ. Produksi isoNOS menyebabkan dislatasi dan kerusakan jaringan. Polifenol bereaksi dengan enzim bakteri dan protein menghasilkan antimikroba aktifitas.aktifitas bakterisidal dan phlorotannin *Ecklonia kurome* dapat melawan bakteri pathogen.

Kadar total fenol ekstrak metanol *S.polycystum* dari perairan Borneo Utara 45,16±3,01 mg PGE/g ekstrak kering, dengan aktifitas antioksidan TEAC (*Trolox*

*equivalent antioxidant capacity*) dan daya reduksi masing-masing  $1,86 \pm 0,02$  dan  $366.69 \pm 11.85 \mu\text{M}/\text{mg}$  berat kering (Mantanjun *et al.*, 2008). Senyawa metabolik primer dan sekunder yang diproduksi terutama dari alga laut merah dan coklat meliputi indol, terpen, asetogenin, fenol, asam lemak dan hidrokarbon halogen volatile, mempunyai aktifitas biologi termasuk antibakteri dan antitumor (Cardozo *et al.*, 2007).

Senyawa-senyawa antioksidan mungkin berperan melalui penghambatan atau pencegahan oksidasi selular substrat yang dapat teroksidasi dan secara selektif menghambat aliran spesies oksigen reaktif. Ekstrak yang mempunyai aktifitas antioksidan tinggi menunjukkan tingginya kadar total fenol (Zakaria *et al.*, 2011). *Epigallocatekin galat*, *epigallocatekin*, *epicatekin galat* dan *epicatekin* adalah senyawa yang paling penting dalam kemampuan antioksidan. Baikalein, quercetin, luteolin and apigenin adalah jenis flavonoid mempunyai aktifitas sebagai anti karsinogenik (Yoshie *et al.*, 2002). Alga laut coklat sebagai sumber antioksidan alami meliputi fenolik dan isoprenoid (Sroka and Cisowski, 2003). Menurut Moon and Shibamoto, 2009, polifenol mengandung sifat mereduksi sebagai zat yang mendonasikan hidrogen atau elektron.

Boonchum *et al.*, (2011) mengemukakan bahwa senyawa hidrofobik fenolik didalam alga laut tidak mengandung antioksidan yang potensial. Fenomena ini dapat diterangkan melalui observasi bahwa ekstrak etanol *H. maculosa*, yang mengandung kadar fenolik yang tinggi tetapi memiliki aktifitas antioksidan yang sangat rendah. *Turbinaria conoides* menunjukkan aktifitas anti-peroksidasi lipida, yang tidak ada hubungan dengan kadar fenolnya. Tetapi aktifitas anti-peroksidasi lipida berlangsung pada kondisi hidrofobik. Senyawa aktif ekstrak air adalah molekul yang tinggi polaritasnya dan tidak bereaksi baik dengan non polar atau

polaritas rendah molekul radikal bebas didalam jalur peroksidasilipida. Yang menarik dari ekstrak air adalah lebih potensial dari ekstrak etanol, karena ekstrak air bersifat non-toksik, mudah menggunakannya, dapat dikerjakan oleh semua orang dan produksi komersial (Matu dan Stade, 2003).

Kadar total fenol dari alga laut merah *Gracillaria edulis* untuk ekstrak metanol  $0.14 \pm 0.031$  g GAE/100 g, Fraksi petroleum eter  $1.6 \pm 0.14$  gr GAE/100 gr, etil asetat  $0.78 \pm 0.076$  gr GAE/100 gr ekstrak, Fraksi DSM  $0.15 \pm 0.010$  g GAE/100 g ekstrak, fraksi butanol  $0.0015 \pm 0.004$  g GAE/100g ekstrak dan air  $0.399 \pm 0.020$  g/100 g ekstrak (Chandini *et al.* 2008). Dibandingkan dengan *G.edulis* yang diambil diperairan lain di India kadar penolnya jauh lebih besar yaitu  $32.7 \pm 13.5$  g GAE/100 gr ekstrak (Devi *et al.*, 2008).

Boonchum *et al.*, (2011) melaporkan bahwa alga laut yang diekstrak dengan air dan metanol, secara umum menunjukkan ekstrak air mempunyai hasil yang lebih tinggi. Paling banyak ekstrak terlarut dalam pelarut yang polaritasnya lebih tinggi dari pada didalam pelarut yang polaritasnya lebih rendah. Mantajun *et al.*, (2008) melaporkan bahwa senyawa yang lebih polar ditemukan didalam ekstrak alga laut dan peningkatan polaritas pelarut meningkatkan hasil reaksi. Di antara ekstrak air dari beberapa alga laut menunjukkan bahwa *S. binderi* mempunyai hasil ekstraksi yang lebih tinggi yaitu 12,25% diikuti oleh *T.conoides* 6,41%, *Amphiroa sp* 2,94% dan *H.macroloba* 2,25%. Sedangkan hasil ekstraksi dengan etanol ditemukan pada *T. conoides*, *H. macroloba* dan *S. binderi* masing-masing 3,11; 2,27 dan 1,14%.

## 2.6. Spesies Oksigen Reaktif (SOR).

Radikal bebas dapat didefinisikan sebagai molekul yang mengandung sebuah elektron tidak berpasangan didalam sebuah orbital atom, kehadiran elektron tidak berpasangan mengakibatkan sifat umum tertentu. Banyak radikal sangat reaktif



dan dapat mendonasikan elektron atau menarik elektron dari molekul lain, karena itu bersifat sebagai oksidan atau reduktan (Young dan Woodside, 2001).

SOR dihasilkan oleh organisme hidup selama metabolisme dalam bentuk superoksida anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), radikal hidroksil ( $OH^{\cdot}$ ), radikal alkoksil ( $RO^{\cdot}$ ), radikal peroksil ( $ROO^{\cdot}$ ), hydrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), nitrat oksida ( $NO^{\cdot}$ ), nitrat dioksida ( $NO_2$ ), dan peroksinitrit ( $OONO^{\cdot}$ ). Nilai ROS yang berlebihan menyebabkan oksidasi biomolekuler yang mengakibatkan kerusakan sel, kematian dan *strees oksidatif* yang menyebabkan berbagai jenis penyakit, seperti kanker, diabetes, arteriosklerosis, katarak, parkinson dan dapat menyebabkan inaktivasi enzim terganggu serta kerusakan oksidatif sistem selular (Yan *et al.*, 1999 dan Stief, 2003). Pengaruh berbahaya ROS diimbangi oleh antioksidan non enzimatis dengan penambahan antioksidan enzim (Swaran, 2009)

### 2.6.1. Superoksida ( $O_2^{\cdot-}$ )

Denisov dan Aranas'ev, (2005), melaporkan bahwa superoksida dihasilkan melalui difusi radikal bebas anion dioksigen secara enzimatis. Superoksida relatif bukan radikal yang berbahaya tetapi merupakan precursor untuk banyak spesies reaktif. Menurut Halliwell dan Gutteridge, 1999, anion superoksida dapat bereaksi dengan nitrit oksida ( $NO^{\cdot}$ ) membentuk peroksinitrit ( $ONOO^{\cdot}$ ). Konyugasi asam peroksnitrit dan asam peroksinitrous dapat mengurai dan menghasikan hidroksil radikal dan nitrat dioksida. Superoksida dapat mereduksi  $Fe^{2+}$  menjadi  $Fe^{3+}$  (Haber-Weiss reaction).

Anion superoksida bereaksi dengan proton di dalam air membentuk hidroperoksida yang dapat bertindak sebagai substrat untuk pembentukan hidroksilradikal dan oksigen singlet (Stief, 2003). Superoksida berperan bersama-

sama dengan hidropoksida dalam aktivasi fosforilasi p38 MAP kinase selama *hipoxia* pada kardiomyosit (Denisov dan Aranas'ev, 2005).

### **2.6.2. Radikal Hidroksil (OH•)**

Radikal hidroksil sangat reaktif, dapat bereaksi dengan lipida, polipeptida, protein dan DNA. Rantai karbon akan membentuk radikal (R•) yang kemudian akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksil (ROO•) dan radikal alkoksil (RO•). OH• mempunyai waktu paruh pendek, paling reaktif dan merusak, menyebabkan kerusakan oksidatif pada DNA, lipida dan protein (Spencer *et al.*, 1994).

Radikal hidroksil dapat merusak membran sel dan lipoprotein melalui peroksidasi lipida. Peroksidasi lipida terjadi melalui reaksi rantai radikal asam linoleat yang terutama terdapat dalam membran sel glikolipid dan fosfolipid, karena itu membran sel mudah teroksidasi dan kehilangan fungsinya. Protein dapat juga dirusak oleh ROS yang menyebabkan perubahan struktur dan kehilangan aktifitas enzim. Kerusakan oksidatif DNA juga menyebabkan mutasi DNA (Charboorgi *et al.*, 2003).

### **2.6.3. Hidrogen Peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Hidrogen peroksida dapat dihasilkan melalui reaksi dismutasi anion superoksida oleh superoksida dismutase. Enzim oksidase monomerik yang terdapat pada membran luar mitokondria, seperti asam amino oksidase, xanthine oksidase juga menghasilkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dari anion superoksida. Hidrogen peroksida dapat dengan mudah berdifusi dan menyeberang plasma membran dengan mudah (Halliwell dan Chirico, 1993). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adalah senyawa non-radikal dan adalah biologi potensial karena kemampuannya menetralkan membran biologi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sendiri tidak reaktif tetapi

kadang-kadang menjadi toksik pada sel karena dapat memberikan peningkatan radikal hidroksil dalam sel (Stief, 2003)

$H_2O_2$  dimetabolisme oleh katalase dan glutathion peroksidase menghasilkan air dan oksigen. Walaupun  $H_2O_2$  adalah kurang reaktif diantara SOR tetapi sangat merusak karena dapat mengkonversi radikal hidroksil dengan adanya logam seperti  $Fe^{2+}$  atau  $Cu^{2+}$  melalui reaksi Fenton, dimana  $Fe^{2+}$  dioksidasi menjadi  $Fe^{3+}$  dan  $H_2O_2$  dikonversi menjadi  $OH\cdot$  dan  $H_2O$ . Hydrogen peroksida adalah zat oksidator rendah dan dapat menginaktifkan beberapa enzim secara langsung, biasanya melalui oksidasi golongan thiol esensial (-SH).  $H_2O_2$  dapat menembus membran sel dengan cepat dan sekali ada didalam sel dapat mungkin bereaksi dengan  $Fe^{2+}$  dan  $Cu^{2+}$  membentuk radikal hidroksil dan ini mungkin menjadi dasar banyak pengaruh toksik pada sel tersebut. Karena itu menguntungkan untuk sel mengontrol jumlah hidrogen peroksida yang memungkinkan untuk mengakumulasi (Halliwell, *et al.*, 1992).

#### **2.6.4. Oksigen Singlet ( $^1O_2$ )**

Oksigen singlet bukan radikal karena tidak ada elektron yang tidak berpasangan. Singlet oksigen dihasilkan dari reaksi katalis logam Haber-Weiss dimana reaksi ini terjadi dalam larutan berair dengan kehadiran logam transisi seperti besi dan tembaga. Oksigen singlet dapat dihasilkan melalui mekanisme Russell dari radikal peroksil. Reaksi singlet oksigen dengan hidrokarbon satu atau lebih ikatan rangkap menghasilkan endoperoksida dan alil hidroperoksida. Tokoferol, karotenoid, fenolik, urat dan asam askorbat dapat memadamkan singlet oksigen (Fang *et al.*, 2002).

### 2.6.5. Radikal Peroksil (ROO•) dan Radikal Alkoksi (RO•)

Menurut Denisov and Aranas'ev, 2005, radikal peroksil dibentuk oleh reaksi langsung oksigen dengan radikal alkil (R•), sebagai contoh reaksi antara radikal lipida dan oksigen. Superoksida tidak dapat memecah atom hidrogen walaupun dari posisi paling aktif senyawa tidak jenuh, sedangkan radikal peroksil memecah atom hidrogen dari asam lemak linoleat, linolenat dan arakhidonat dengan tingkat konstanta  $1-3 \times 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Radikal peroksil mungkin sebagai inisiator peroksidasi lipida. Paling sedikit ada dua sistem biologi dimana radikal peroksil berperan. Dimana radikal peroksil dapat memecah atom hidrogen dari NADH dan kompleks gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenase NADH (GAPDH –NADH). Dekomposisi alkil peroksida (ROOH) juga menghasilkan radikal peroksil dan alkoksil. Radikal peroksil dan alkoksil adalah zat pengoksidasi dalam tingkat propagasi peroksidasi lipida. (Halliwell and Gutteridge, 1992).

### 2.6.6. Radikal Nitrat Oksida (NO•)

Menurut Denisov dan Aranas'ev, 2005, nitrit oksida dihasilkan oleh NO sintase. Kemungkinan NO• dihasil oleh enzim atau nonenzim lain. Xanthin oksida mereduksi nitrit menjadi nitrit oksida dengan kondisi anaerobik dengan kehadiran NADH atau xanthin. NO• dapat juga dibentuk melalui reaksi hidrogen peroksida dengan D dan L-arginin. Sumber penting produksi NO• adalah S-nitrosothiol seperti S-nitrosoglutathion dan S-nitrosocystein yang berperan dalam penyimpanan dan transport nitrat oksida. S-nitrosothiol diurai menjadi bentuk oksida nitrat dengan kehadiran ion logam transisi dan reduktan. Dekomposisi S-nitrosothiol diinduksi oleh superoksida yang dihasilkan oleh xanthin oksidase. NO• radikal memegang peranan penting dalam respons peradangan dan toksisitas ganda, ketika bereaksi dengan

radikal  $O_2^{\cdot-}$  membentuk peroksinitrit, yang merusak biomolekul seperti protein, lipida dan asam nukleat. Oksida nitrat dihasilkan ketika natrium nitroprusid bereaksi dengan oksigen membentuk nitrit. (Virag *et al.*, 2003).

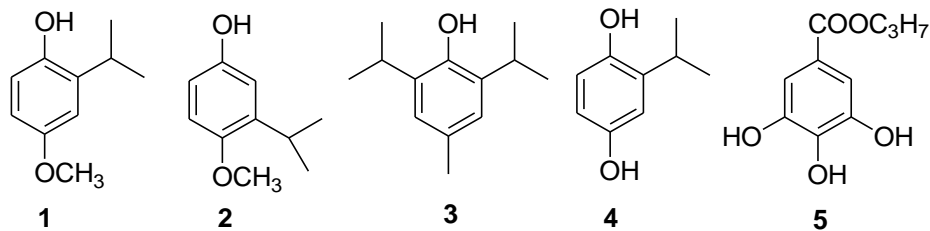
#### **2.6.7. Radikal Peroksi Nitrit (ONOO $^{\cdot}$ ).**

Peroksinitrit dibentuk dengan sebuah tingkat difusi terkontrol dari superoksida dan nitrit oksida. Peroksi nitrit dapat menjadi spesies yang paling penting bertanggung jawab untuk kerusakan dalam sistem biologi. NO sintase dapat memproduksi superoksida dan nitrat oksida secara simultan, peningkatan yang besar memungkinkan produksi peroksinitrit dengan kehadiran nitrit. Peroksinitrit sangat reaktif mampu bereaksi dengan biomolekul termasuk asam askorbat, vitamin E dan asam urat, thiol, DNA, fosfolipida dll. Reaksi peroksi nitrit dengan banyak biomolekul dengan tingkat konstant  $10^{-3}$ -  $10^1 \text{ mol}^{-1}\text{S}^{-1}$ . Peroksinitrit dalam larutan basa relatif stabil dalam konformasi cis, yang mencegah pengatur kembali menjadi nitrat dan memungkinkan untuk berdisosiasi menjadi larutan asam. Trans-peroksinitrit dalam kondisi asam dengan cepat diubah menjadi nitrat. Peroksinitrit adalah radikal bebas yang sangat berperan dalam proses peradangan (Denisov dan Aranas'ev, 2005)

#### **2.7. Jenis dan Manfaatnya Antioksidan**

Antioksidan dibagi menjadi dua golongan yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami. Antioksidan sintesis yang banyak digunakan di pasaran adalah *butylated hydroxyanisole* (BHA), *butylated hydroxy toluene* (BHT), propil galate (PG) dan *tert-butylated hydroquinone* (TBHQ) (Gambar 2.7). Antioksidan sintetik ini banyak menimbulkan akibat buruk terhadap kesehatan konsumen. Beberapa hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa BHA, BHT dan TBHQ pada binatang percobaan dapat menyebabkan pembengkakan organ hati, dan mempengaruhi aktivitas enzim di dalam hati, disamping itu BHT dapat

menyebabkan perubahan tiroid, stimulasi sintesa DNA dan induksi enzim (Chang et al., 1982).



**Gambar 2.7. Beberapa Jenis Antioksidan sintetik(1) 2-Butilated hydroxyanisol (2-BHA), 3-butilated hydroxyanisol (3-BHA) (2), p-butilated hydroxy toluena (BHT) (3). Tert-butyl hydroxyquinon (TBHQ)(4), Propil galat (PG) (5).(Pokorny et al., 2001).**

Beberapa antioksidan sintetik penggunaannya dibatasi karena berpotensi menghasilkan racun dan bersifat karsinogenik. Oleh sebab itu yang lebih efektif dan aman adalah menggunakan antioksidan alami untuk menggantikan antioksidan sintetik. (Yen et al., 2002, Juntachote et al., 2007).

Antioksidan alami tersebar di beberapa bagian tanaman, seperti pada kayu, kulit kayu, akar daun, buah, bunga, biji dan serbuk sari. Senyawa alami ini umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol. Secara umum antioksidan memiliki ciri-ciri sebagai berikut: a. Aman dalam penggunaan, b) tidak memberikan flavor, odor dan warna pada produk c) efektif pada konsentrasi rendah d) tahan terhadap proses pengolahan produk, berkemampuan antioksidan yang baik e) tersedia dengan harga yang cukup murah (Tartati dan Efram, 2006)

Beberapa tahun terakhir ini material berjenis-jenis tanaman mengandung senyawa fenolik telah digunakan efektif sebagai antioksidan. Flavonoid, senyawa antioksidan paling potensial dari tanaman sayuran, buah beri, daun teh dan tanaman herbal. Sifat antioksidan dari herbal dan bumbu-bumbu nyata dari

kandungan fenolnya, dimana aksi antioksidannya sama dengan antioksidan fenolik sintetik. Etanolik ekstrak dari Holy Basil (*Ocimum sanctum* Linn) menunjukkan aktifitas antioksidan yang kuat melawan sistim  $\beta$ -karotenoid linoleat, aktifitas peredam anion superoksida, aktifitas pengkelat  $Fe^{2+}$  dan juga beraksi sebagai peredam radikal dan peghambat lipogenase (Juntachote *et al.*, 2007).

Fenol dan antosianin menunjukkan kemampuan yang besar untuk menangkap radikal bebas yang menyebabkan *stress oksidatif*. Mereka mempunyai aktifitas antiperadangan, antialergi, antitrombotik, antimikrobia dan antineoplastik. Polifenol bersifat antikarsinogenik dan antioksidan. Polifenol seperti kondensat dan hidrolisat tanin dengan berat molekul yang relatif tinggi menunjukkan aktifitas antioksidan lebih tinggi daripada fenol sederhana. Umumnya dipercaya bahwa antioksidan meredam radikal bebas dan spesies oksigen reaktif sertasangat penting didalam menghambat mekanisme oksidatif yang mengarah pada penyakit-penyakit degeneratif (Gluzman *et al.*, 2007).

Menurut Swanson, 2009, secara kinetik antioksidan diklasifikasikan sebagai berikut:

1. Antioksidan yang memecah rantai melalui reaksi dengan radikal peroksil yang mempunyai ikatan O-H atau N-H (fenol, naphthol, hidroquinon, amin aromatik dan amino fenol).
2. Antioksidan yang memecah rantai melalui reaksi dengan radikal alkil (quinon, nitron, iminoquinon)
3. Antioksidan dekomposisi hidroperoksida (sulfid, fosfit, trifosfat)
4. Antioksidan pengkelat logam (diamin, asam hidroksil dan senyawa biofungsional)
5. Antioksidan terminasi rantai siklik (aromatik amin, radikal nitroksil dan senyawa logam berbagaivalensi).

6. Aksi sinergi beberapa antioksidan (fenolik dan sulfida (golongan fenolik bereaksi dengan radikal peroksil dan golongan sulfida bereaksi dengan hidroperoksida.

Semua sel dalam tubuh mempunyai enzim yang dapat menangkal serangan radikal bebas. Namun dengan meningkatnya usia terjadilah penurunan jumlah enzim dalam tubuh sehingga radikal bebas tidak sepenuhnya dimusnahkan. Belum lagi radikal bebas dari luar yang menyusup masuk kedalam tubuh akan mempersulit tubuh untuk mengatasi gempuran radikal bebas (Halliwell *et al.*, 1992).

Antioksidan dalam tubuh dapat berfungsi untuk mencegah pembentukan senyawa radikal bebas baru, yang mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang berkurang dampak negatifnya, sebelum radikal bebas ini dapat bereaksi. Contoh antioksidan ini adalah enzim SOD yang sebelumnya sudah ada dalam tubuh kita, bekerjanya membutuhkan bantuan zat-zat gizi mineral seperti mangan, seng dan tembaga. Selenium juga berperan sebagai antioksidan. Jadi jika ingin menghambat gejala dan penyakit degeneratif, mineral-mineral tersebut hendaknya tersedia cukup dalam makanan yang dikonsumsi setiap hari (Halliwell *et al.*, 1992).

Antioksidan diperlukan untuk memperbaiki kerusakan sel-sel dan jaringan yang disebabkan radikal bebas. Contoh enzim yang memperbaiki DNA pada inti sel adalah metionin sulfoksidan reduktase. Adanya enzim-enzim perbaikan DNA ini berguna mencegah penyakit kanker. Hasil berbagai penelitian dengan menggunakan hewan percobaan telah mendukung teori bahwa mengkonsumsi antioksidan yang memadai dapat mengurangi terjadinya berbagai penyakit seperti kanker, kardiovaskuler, katarak, serta penyakit degeneratif lain. (Halliwell dan Gutteridge, 1999).



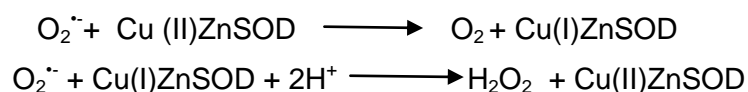
## 2.8. Mekanisme Reaksi Antioksidan.

Spesies oksigen reaktif dapat menyebabkan kerusakan subselular atau selular melalui peroksidasi membran lipida, denaturasi protein selular, memecah rantai DNA yang mengganggu fungsi sel. Sel mempunyai sistem pertahanan antioksidan sendiri dalam bentuk jalur enzimatik maupun non-enzimatik (Patra, *et al.*, 2008). Menurut Lee and Min, 2004, antioksidan jalur non-enzimatik yaitu  $\beta$ -karoten, Vitamin E dan Vitamin C sebagai penangkap radikal bebas, yang berfungsi meningkatkan respon kekebalan dengan mengontrol produksi radikal bebas dalam sel. Vitamin E dan Vitamin C melindungi neutrofil dari kerusakan oleh radikal bebas yang dihasilkan. Suplementasi dengan kedua antioksidan ini berfungsi untuk menormalkan kemotaksis tereduksi dan aktifitas bakterisidal neutrofil yang aktifitasnya tergantung pada individu (Grimble, *et al.* 1998.).

### 2.8.1. Antioksidan Enzimatis

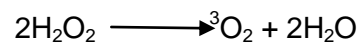
#### 2.8.1.1. Superoksida Dismutase (SOD)

Menurut Halliwell *et al.*, 1992, SOD adalah enzim yang mengandung kofaktor ion logam, yang tergantung pada isozyme tembaga, besi, mangan dan seng. SOD pada manusia adalah SOD tembaga dan SOD seng yang terdapat pada sitosol, SOD mangan terdapat di dalam mitokondria, sedangkan SOD besi terdapat pada kloroplast. SOD berfungsi sebagai pelindung hancurnya sel-sel dalam tubuh serta mencegah proses peradangan karena radikal bebas. Enzim ini menjaga konsentrasi yang rendah akan anion superoksida, yang mengkatalisa dismutasi anion superoksida menjadi oksigen dan hidrogen peroksida:



### 2.8.1.2. Katalase(CAT)

Menurut Halliwell and Gutteridge, 1999. katalase adalah sebuah heme protein yang terdapat dalam peroxisom sel eukariotik, mengkatalisadetoksifikasi hidrogen peroksida. Selama siklus enzimatis, katalase membentuk intermediat yaitu kompleks  $\text{CatFe(III)H}_2\text{O}_2$  (senyawa 1),  $\text{CatFe(II)H}_2\text{O}_2$ (senyawa 2) dan kompleks superokso inaktif enzim alam  $\text{CatFe(III)O}_2^{\bullet-}$ . Pengaruh kerusakan hidrogen peroksida tergantung pada pembentukan radikal hidroksil NADPH. Satu molekul NADPH berikatan kuat pada setiap empat sub unit katalase didalam eritrosit (Denisov dan Avanas'ev, 2005) Katalase mereduksi  $\text{H}_2\text{O}_2$  menjadi air dan molekul oksigen:



### 2.8.1.3. Glutathion Peroxidase (GP)

GP adalah enzim yang mangandung kofaktor selenium, terdapat dalam sitoplasma dan mitokondria, yangberperan penting untuk detoksifikasi peroksida didalam sel, bekerja sama dengan GSH sebagai sebuah sumber pereduksi. GP mengkatalis reduksi  $\text{H}_2\text{O}_2$  menjadi air dan peroksida organik menjadi alkohol, dan mereduksi GSH(Lee and Min, 2004, Mezzetti,1990).

GP berperanpenting dalammitokondria dimana katalase tidak ada. Ada 2 jenis GP, yaitu yang umum adalah glutathione peroksidase (cGP) dan fosfolipida hidroperoksidaglutathion peroksidase (PHGP). PHGP adalah antioksidan enzimintraselular yang mampu secara langsung mereduksi peroksida fosfolipida dankolesterol didalammembran. PHGP dapat menekan kematian sel disebabkan oleh kalsium sianida dan rotenon pada mitokondria (Denisov and Avanas'ev, 2005).

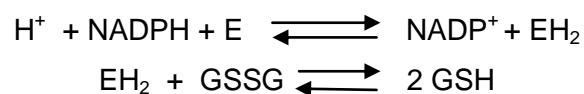
#### 2.8.1.4. Glutathion Transferase (GSTs)

GSTs dikenal sebagai ligan, sebuah metabolik isozym phase II eukariotik dan prokariotik, kemampuannya mengkalisis konyugasi bentuk tereduksi GSH menjadi substrat xenobiotik untuk tujuan detoksifikasi. Struktur GSTs terdiri dari Sitosol GSTs, mitokhondria GSTs dan MAPEG. Sitosol GSTs lebih dari 40%, sedangkan yang lain kurang dari 25%. GSTs mengkalisis konyugasi GSH melalui gugus sulfhidril menjadi pusat elektrofilik pada substrat untuk membuat senyawa mudah larut. Aktifitas mendetoksifikasi senyawa endogenous seperti peroksida lipida dalam jumlah besar di hati dan penghancuran xenobiotik. GSTs dapat juga mengikat toksin dan berfungsi sebagai transport protein (Udomsinprasert *et al.*, 2005).

GSTs memegang peranan penting dalam melindungi sel melawan kerusakan oksidatif, dengan cara mengikat glutathion dengan baik dan mengikat molekul kedua yang berdekatan. Reaksi ini diperlukan untuk detoksifikasi xenobiotik toksin, seperti obat dan senyawa asing lainnya. Konyugasi GSH dan xenobiotik bertujuan untuk ekskresi (Wilce, 1994, Mezzetti, 1990)

#### 2.8.1.5. Glutathion Reduktase

Glutathione reduktase adalah flavoprotein, menggunakan kekuatan mereduksi untuk jalur pentose fosfat (NADPH) yang memelihara glutathion didalam sel dalam tingkat sangat tereduksi. Mereduksi hidrogenperoksida menjadi air dan mereduksi peroksida lipida (Wilce, 1994, Mezzetti, 1990). Glutathion reduktase adalah enzim yang mengandung FAD. Yang mengkatalisa reaksi:



Dimana intermediat  $\text{EH}_2$  adalah bentuk stabil tereduksi 2 elektron enzim. Fungsi dari enzim ini untuk memelihara konsentrasi yang tinggi akan bentuk tereduksi GSH dan bentuk teroksidasi (GSSG) yang rendah. Perbandingan GSH dan GSSG kira-kira 300:1. Glutathion reduktase menggunakan NADPH sebagai sumber ekuivalen reduksi. Substrat GSSG maupun GSH adalah penting untuk fungsi selular yang luas, yaitu sebagai divisi sel, transport asam amino melalui membran, regulasi aktifitas enzim, perbaikan kerusakan, metabolisme obat dan detoksikasi. Enzim ini diaplikasikan sebagai obat antitumor *carmustin* (Pay dan Schulz, 1983)

## **2.8.2. Antioksidan Non Enzimatis**

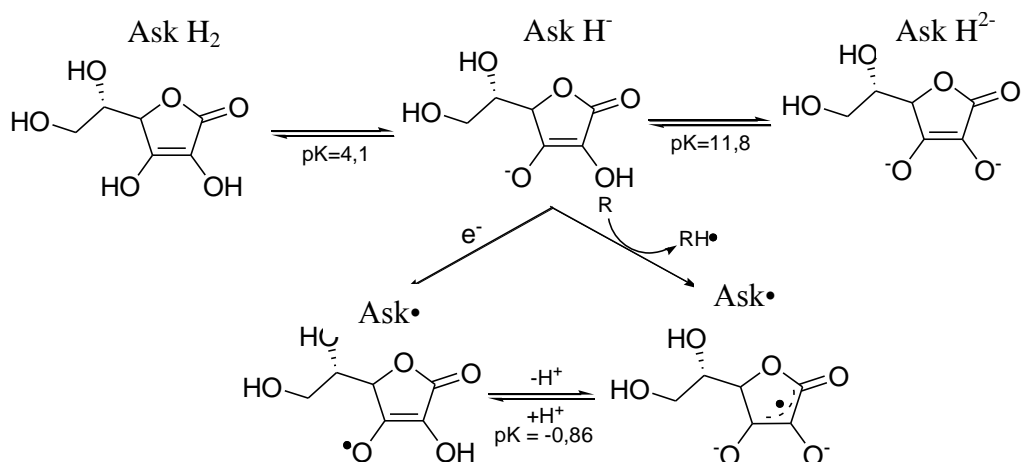
### **2.8.2.1. Glutathion (GSH)**

GSH ( $\gamma$ - glutamil sisteinil glisin) adalah enzim utama non-protein sulfhidril didalam organisme aerobik, paling banyak disintesa didalam sel. Tripeptida dibentuk melalui kombinasi asam glutamat dan sistein dikatalis oleh  $\gamma$ - glutamilsisteinil sintetase, glisin kemudian ditambahkan oleh glutathion sintetase membentuk GSH. Manfaat dari glutathion pada organism adalah berperan dalam metabolisme transport dan katalisa ketersediaan thiol dalam protein. GSH sebagai antioksidan peredam radikal bebas dan sebagai donorelektron didalam siklus redoks. Atom sulfur dalam sistein dapat mengion pada pH netral, seperti terdapat dalam pH sel normal. (Halliwell dan Gutteridge, 1999, Mezzetti, 1990). Menurut Swaran, 2009, GPX mereduksi peroksida menjadi air. Antioksidan ini menghilangkan peroksida sebagai substrat potensial reaksi Fenton. Metabolisme glutathione adalah mekanisme pertahanan oksidatif yang paling essential. GPx dengan GSH menambah 2 elektron untuk mereduksi hidroperoksida, GPX mereduksi peroksida menjadi air:



### 2.8.2.2. Vitamin C

Vitamin C (asam askorbat) adalah sebuah vinil asamkarboksilat, dimana ikatan rangkap (vinil) mentransmisikan pasangan elektron diantara hidroksil dan karbonil. Antioksidan asam karboksilat memiliki kemampuan oksidasi. SOR mengoksidasi (mengambil elektron dari) asam askorbat, pertama-tama menjadi monodehidroaskorbat dan kemudian dehidroaskorbat (Gambar 2.8). SOR direduksi oleh air, sementara bentuk teroksidasi asam askorbat relatif stabil tidak reaktif, dan tidak menyebabkan kerusakan selular. Konversi asam askorbat menjadi beberapa bentuk tereduksi pada variasi pH mengindikasikan kemampuan mengikat sisi elektronbebas yang bertanggung jawab sebagai antioksidan dan pengkelat ion. Vitamin C meredam SOR melalui transfer elektron sangat cepat yang menghambat peroksidasi lipida. Asam askorbat mengkelat ion Zn(II) dan Mn(II) terjadi melalui 2 gugus hidroksil, Cd(II) melalui 3 atom O, sedangkan interaksi ion Hg(II) mengakibatkan oksidasi asam askorbat (Swaran, 2009).

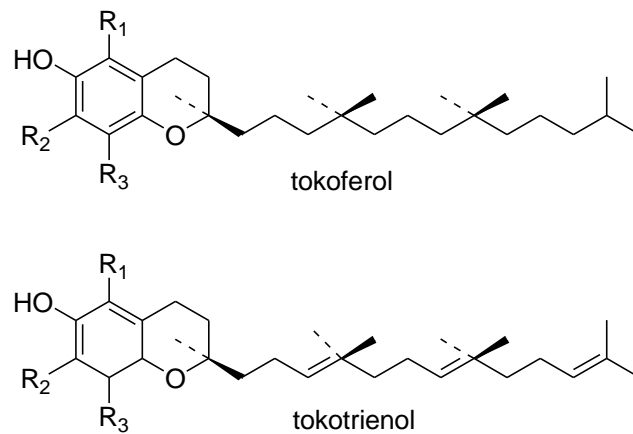


**Gambar 2.8. Mekanisme Reaksi Asam Askorbat dengan Radikal Bebas. (Swaran, 2009).**

Asam askorbat adalah antioksidan yang larut dalam air, yang esensial untuk biosintesa kolagen, karnitin, neurotransmitter dan jaringan pengikat. Vitamin C berfungsi sebagai antioksidan, antiaterogenik, antikarsinogenik (Naidu, 2003), berfungsi sebagai pertahanan terdepan melawan radikal bebas dihasilkan oleh proses metabolisme. Mekanisme kerja Vitamin C didasarkan pada donasi atom hidrogen pada radikal lipida, memadamkan oksigen singlet dan memindahkan molekul oksigen. Asamaskorbat akan bereaksi dengan hidrogen peroksida, radikalhidroksil, radikalperoksil dan oksigen singlet yang kemudian akan membentuk radikal semidehidroaskorbat dan dehidroaskorbat. Asam askorbat membantu pembentukan tokoferol melalui donasi sebuah atom hidrogen pada radikal tokoferoksil. Vitamin C bersama-sama dengan Vitamin E membentuk  $\alpha$ -tokoferol dari radikal  $\alpha$ -tokoferol didalam membran dan lipoprotein. Suplement asam askorbat dan tokoferol dapat mengurangi kerusakan oksidatif (Fang *et al.*, 2002, Patra *et al.*, 2008).

### **2.8.2.3. Vitamin E**

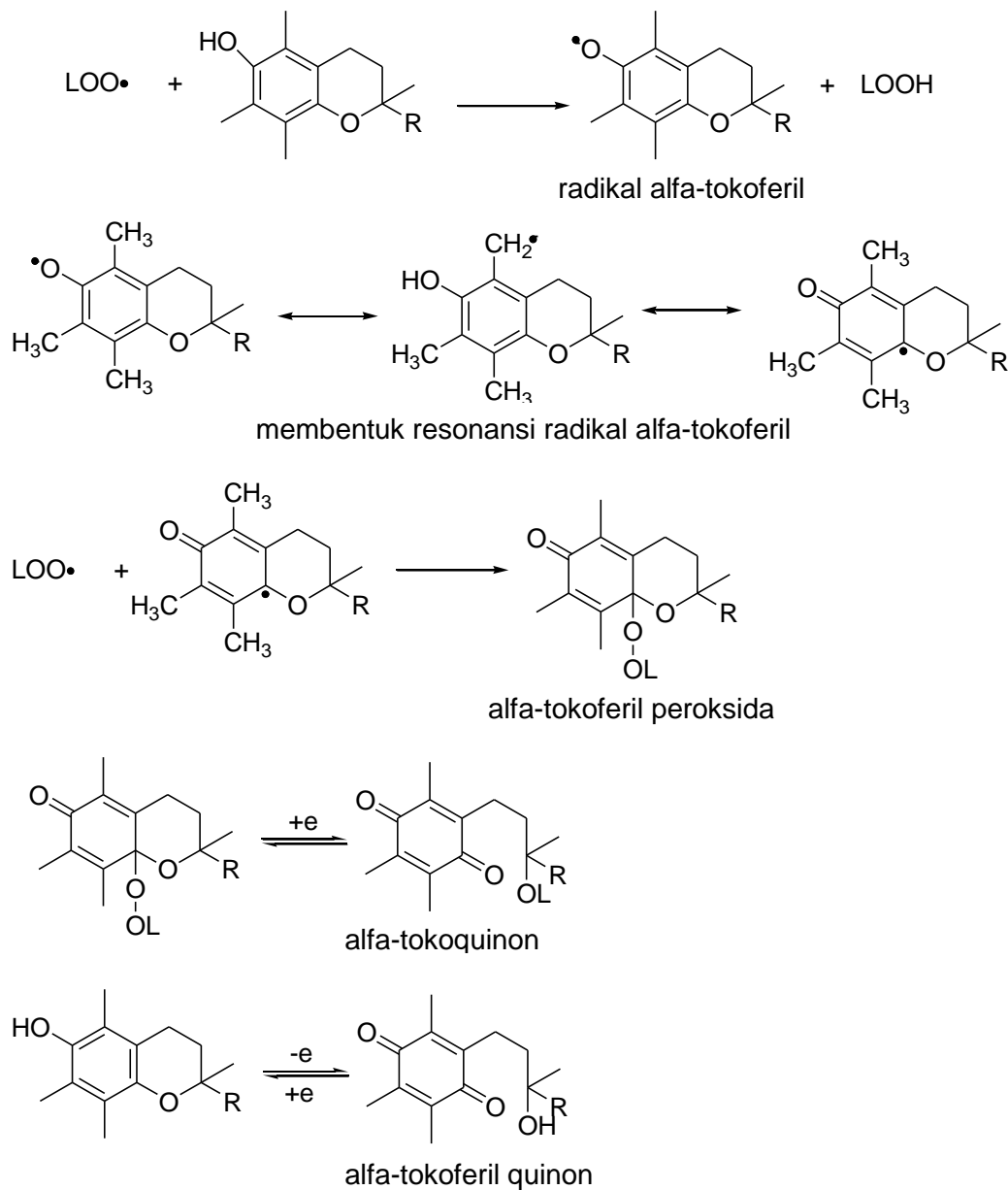
Vitamin E adalah antioksidan yang larut dalam lemak, yang terdiri dari tokoferol dan tokotrienol yang masing-masing mempunyai 4 isomer ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  dan  $\delta$ ) (gambar 2.8), dimana yang paling penting adalah  $\alpha$ -tokoferol. Tokoferol dapat melindungi PUFA diantara membran dan LDL, serta menghambat proliferasi sel otot polos. Tokoferol dapat menurunkan resiko sakit jantung, memperlambat penyakit alzheimer, dan mencegah kanker (Zhu, 2000).



Tokoferol dan tokotrienol	R1	R2	R3
$\alpha$ -R <sub>1</sub> -R <sub>2</sub> -R <sub>3</sub> - trimetil	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\beta$ -R <sub>1</sub> -R <sub>3</sub> -dimetil	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
$\gamma$ -R <sub>2</sub> -R <sub>3</sub> -dimetil	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\delta$ -R <sub>3</sub> -metil	H	H	CH <sub>3</sub>

**Gambar 2.9. Jenis-Jenis Tokoferol dan Tokotrienol (Akoh and Min,1997).**

Tokoferol mempunyai pengaruh yang menguntungkan untuk pengobatan penyakit kardiovaskular, baik melalui penghambatan oksidasi LDL dan melalui penurunan hidrokisi-methylglutarat CoA reduktase (HMG-CoA reduktase), sebuah enzimkunci "pathway" mevalonat. Mekanisme antioksidan tokoferol (Gambar 2.10) yaitu melalui donasi hidrogen atau golongan hidrogen pada radikal peroksil, yang akan membentuk radikal tokoferil yang distabilkan melalui delokalisasi struktur cincin aromatik. Radikal ini membentuk produk non-radikal, meliputi peroksida stabil yang dapat direduksi menjadi tokoquinon dan dimer tokoferol..  $\alpha$ -tokoferol dapat juga memperlambat dekomposisi hidroperoksida (Pokorny *et al.*, 2001).



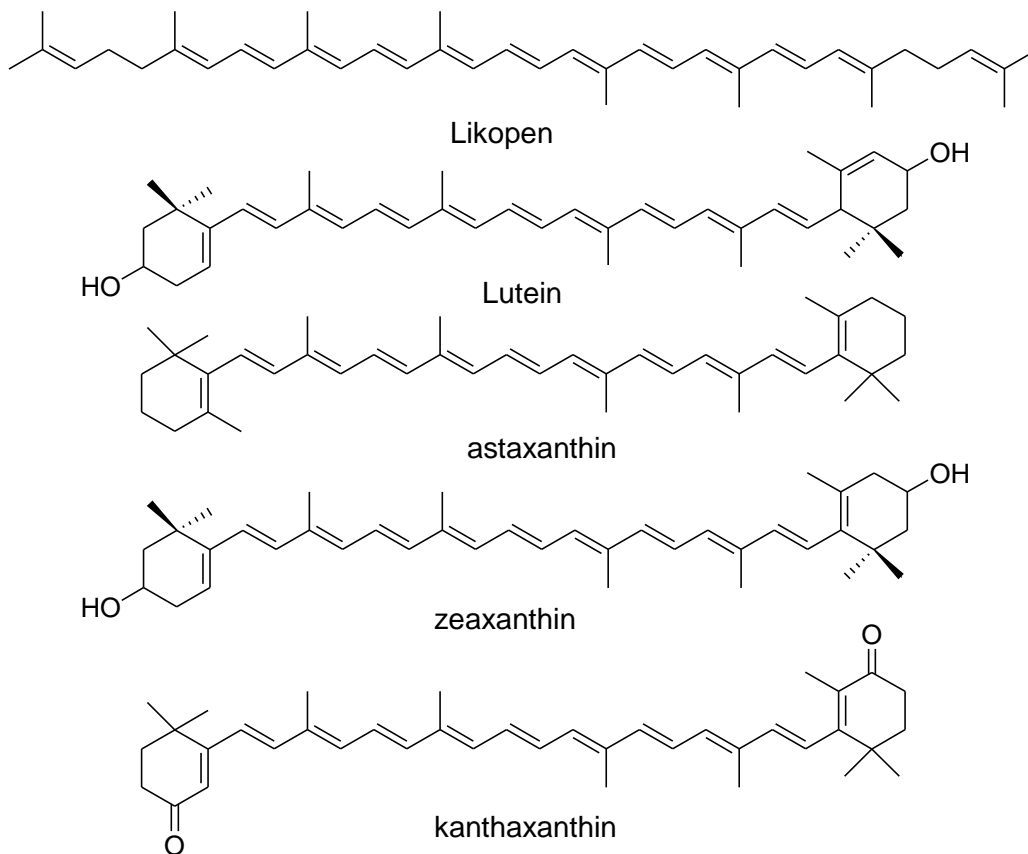
**Gambar 2.10. Mekanisme Reaksi  $\alpha$ -Tokoferol dengan Radikal Peroksi Lipida (Pokorny *et al.*, 2001)**

#### 2.8.2.4. Karotenoid

Swaran (2009) melaporkan bahwa karotenoid adalah pigmen yang ditemukan dalam tumbuhan dan mikroorganisme. Karotenoid dapat mencegah atau menghambat jenis tertentu kanker, *atherosclerosis*, degenerasi penuaan otot dan



penyakit lain. Aktifitas antioksidan karotenoid karena kemampuannya mengkonjugasi struktur ikatan rangkap untuk mendelokalisasi elektron tidak berpasangan. Hal inilah yang menyebabkan kemampuan yang luarbiasa untuk memadamkan singlet oksigen tanpa degradasi. Reaksi kimia  $\alpha$ -karoten yaitu dengan radikal bebas seperti radikal peroksil ( $\text{ROO}^\bullet$ ), hidroksil ( $\text{OH}^\bullet$ ) dan superoksida ( $\text{O}^{2-}$ ). Beberapa jenis karoten yang berperan penting dalam mencegah kerusakan oksidatif dapat dilihat pada Gambar 2.11.

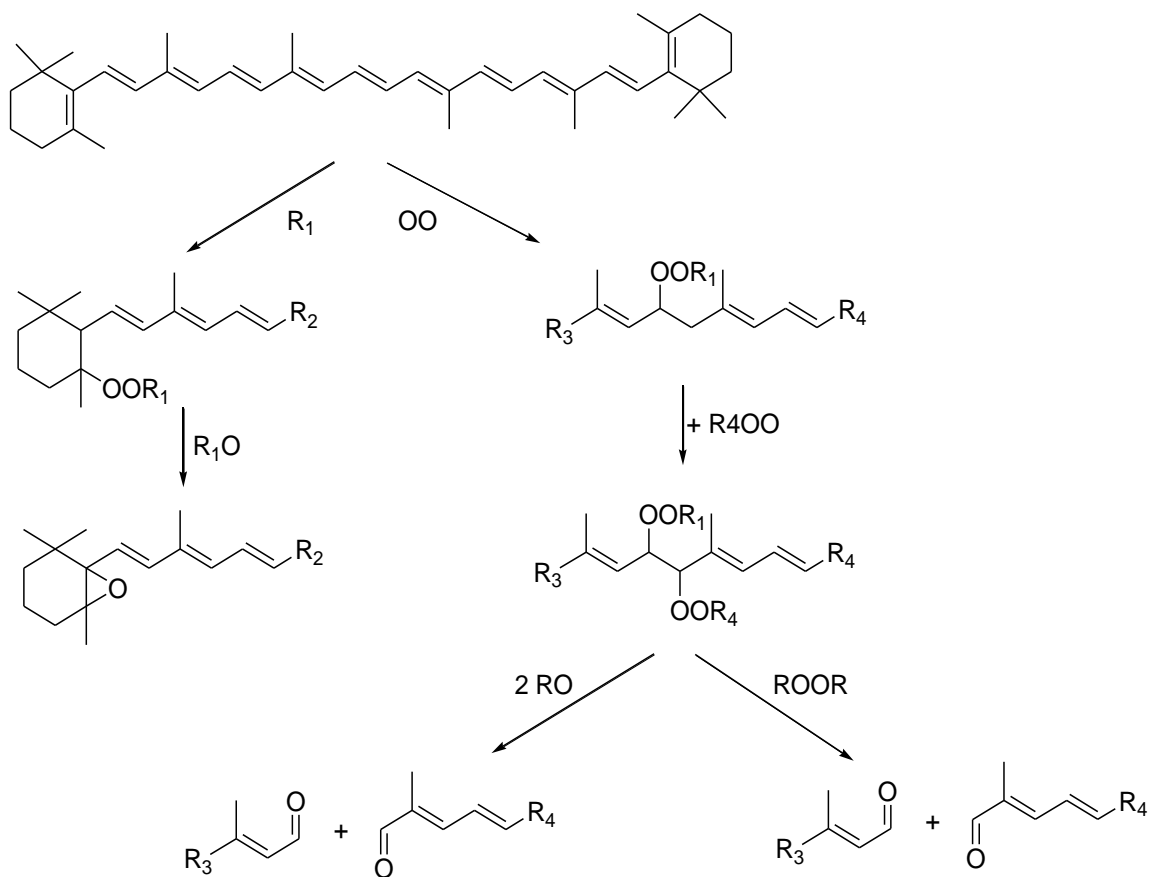


### 2.11. Beberapa Jenis Karotenoid(Akoh and Min, 2001).

Konsentrasi cukup tinggi karoten dapat melindungi lipida dari kerusakan oksidatif. karotenoid mempunyai pengaruh antiproliferasi pada beberapa *cell lines* kanker,

dimana likopen menunjukkan penghambatan perkembangan siklus sel pada payu darah, paru-paru dan prostat.  $\beta$ -karoten menunjukkan penghambatan pada ekspresi antiapoptosis protein Bcl-2 pada sel kanker, mereduksi pertumbuhan sel kanker dan menurunkan resiko kanker paru-paru. Karotenoid paling banyak pada pangan adalah:  $\alpha$  dan  $\beta$ -karoten,  $\beta$ - kriptosantin, likopen, lutein dan zeaxantin (Holdt dan Kraan, 2011, Fang *et al.*, 2002).

Menurut Pokorni *et al.*, 2001,  $\beta$ -karoten dapat mendonasikan elektron pada radikal peroksil dan menghasilkan sebuah radikal kation  $\beta$ -karoten dan sebuah anion peroksil. Radikal kation  $\beta$ -karoten distabilkan oleh resonansi dan tidak langsung bereaksi dengan oksigen membentuk peroksida. Tetapi radikal kation  $\beta$ -karoten cukup kuat untuk beroksidasi. Donor lain hidrogenlipofilik termasuk tokoferol dan ubiquinon. Penambahan peroksil radikal pada siklik atau rantai polien diikuti oleh pelepasan sebuah radikalalkoksil yang mengarah pada pembentukan 5,6 dan 15,15' epoksida. Eliminasi radikal alkoksi dari posisi 15,15' dapat menyebabkan pemecahan rantai polien yang mengakibatkan pembentukan aldehid (Gambar 2.12)

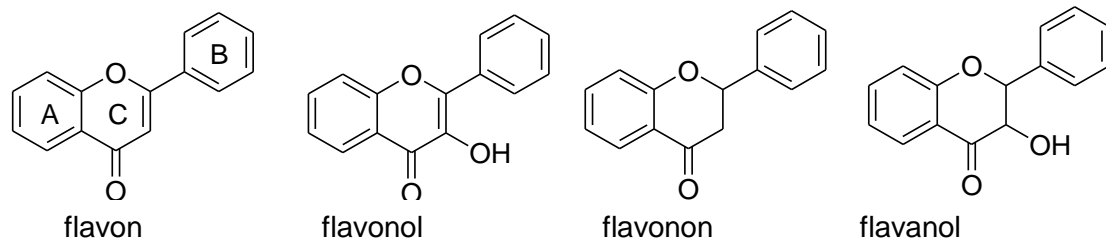


**Gambar 2.12. Produk-Produk yang Dihasilkan Melalui Reaksi  $\beta$ -Karoten dengan Radikal Peroksil (Akoh and Min, 1997)**

### 2.8.2.5. Flavonoid

Menurut Swaran, 2005, flavonoid adalah polifenol dengan berat molekul rendah yang adalah turunan benzo- $\gamma$ -piron. Golongan flavonoid utama terdiri flavan, flavonol, flavonon dan flavanol (Gambar 2.13). Flavonoid berfungsi sebagai penangkap radikal bebas dan pengkelat ion logam yang mempunyai banyak fungsi biologi seperti menunjukkan antiperadangan, antialergi, antivirus dan antikanker. Aktifitas antioksidan flavonoid tergantung pada reaktifitas gugus hidroksil didalam reaksi pemecahan atom hidrogen. Flavonoid dapat bereaksi dengan radikal peroksil, radikal hidroksil dan superoksida. Flavonoid bereaksi dengan superoksida

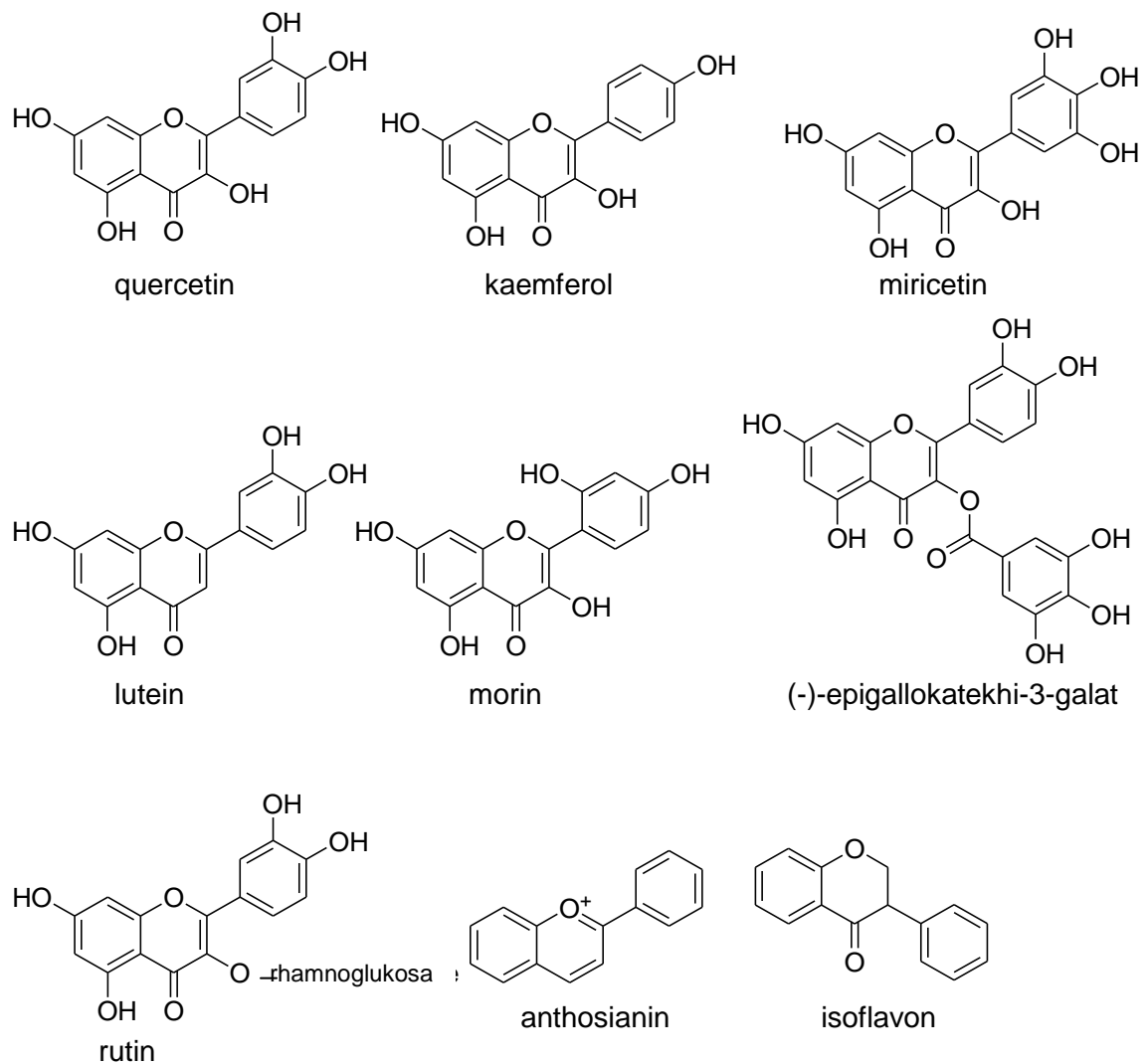
dengan tingkat reaksi difusi terkontrol kira-kira  $0.1-5^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Tingkat reaksi ini mengakibatkan senyawa ini sangat bermanfaat sebagai farmakolog untuk pengobatan penyakit yang berhubungan dengan produksi radikal bebas yang banyak. Mekanisme reaksi adalah abstraksi sebuah proton atau atom hidrogen oleh superoksida dari *o*-hidroksil molekul flavonoid (Denisov dan Aranas'ev, 2005)



**Gambar 2.13. Golongan Flavonoid Utama (Pokorny et al., 2001)**

Flavonoid dapat mempengaruhi peroksidasi lipida microsomal. Beberapa jenis flavonoid dapat dilihat pada Gambar 2.13. Kaempferol, quercetin, 7,8 dihydroxyflavon dan  $\gamma$ -catechin menghambat peroksidasi fraksimitokondria sistem xanthin oxidase hati tikus. *Cathechin*, rutin dan naringin menghambat peroksidasi lipida, aktifitas xanthine oksidase dan pemecahan DNA. *Myricetin* menghambat oksidasi DNA diinduksi nitritotriasetat dan peroksidasi lipida kultur primer hepatosit dan mengaktifasi proses perbaikan DNA.

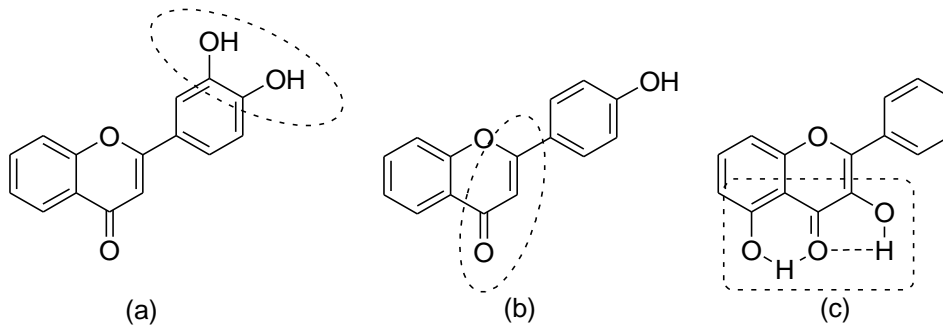
Antosianin adalah senyawa golongan flavonoid dan merupakan glikosida, yang terdiri dari *2-phenil benzopyrillium* (flavilium). Seluruh senyawa antosianin merupakan turunan dari kation flavilium. Antosianin dapat dimanfaatkan sebagai pigmen alami, mempunyai fungsi fisiologis sebagai antioksidan, antikanker, dan perlindungan terhadap hati, kardiovaskular, dan arteri koroner (Zhu, 2000).



**Gambar 2.14. Beberapa Jenis Flavonoid yang Mempunyai Sifat Antioksidan(Denisov dan Aranas'ev, 2005)**

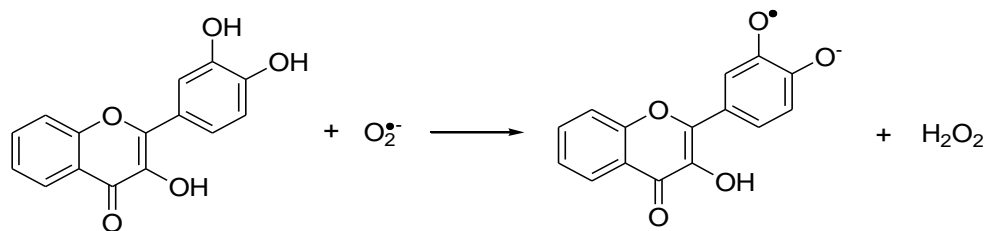
Menurut Denisov dan Aranas'ev, 2005, kemampuan flavonoid menghambat produksi superoksida melalui xanthin oksidase dapat melalui peredaman superoksida maupun mengambat aktifitas enzim, dimana kedua mekanisme ini tergantung pada struktur flavonoid, seperti rutin tidak efektif menghambat xantin oksidase. Pengaruh penghambatan flavonoid berdasarkan sifatnya menangkap radikal dan mengkelat ion. Jumlah dan posisi hidroksil serta besarnya

sistemterkonyugasi adalah faktorpenting flavonoid sebagai antioksidan dan prooksidan (Gambar 2.15).



**Gambar 2.15. Struktur Flavonoid yang Mempunyai Aktifitas Antioksidan Terdapat pada: Kathekol dari Cincin (b) (a), Ikatan Rangkap pada Posisi 2,3- yang Berkonyugasi dengan Gugus Karboksil pada Cincin C.(b), Kehadiran Hidroksil pada Posisi 3 dan 5 (c) (Pokorny *et al.*, 2001).**

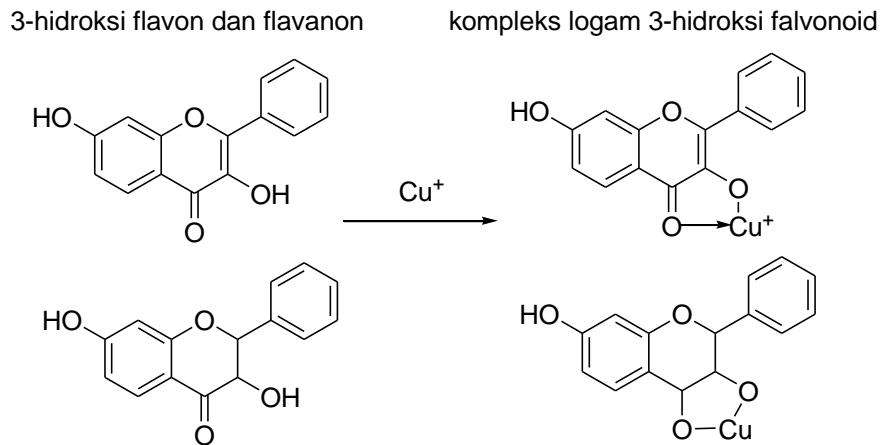
Senyawa reaktif terutama superoksida akan bereaksi dengan flavonoid yang mempunyai 2 *o*-hidroksil pada cincin B (Gambar 2.16) Sedangkan jika terdapat 3 hidroksil pada cincin B beberapa flavonoid akan bersifat prooksidan (Denisov dan Aranas'ev, 2005).



**Gambar 2.16. Mekanisme Reaksi Superoksida dengan Flavonoid yang Mempunyai 2-*o*-hidroksil Substitusi (Denisov dan Aranas'ev, 2005).**

Menurut Pokorny *et al.*, 2001, ikatan rangkap yang berkonyugasi dengan C-4 karbonil dapat menstabilkan radikal melalui "rearrangement" elektron. Aktifitas pengkelat ion flavonoid membutuhkan kehadiran konfigurasi 3',4' dihidroksi dan lebih

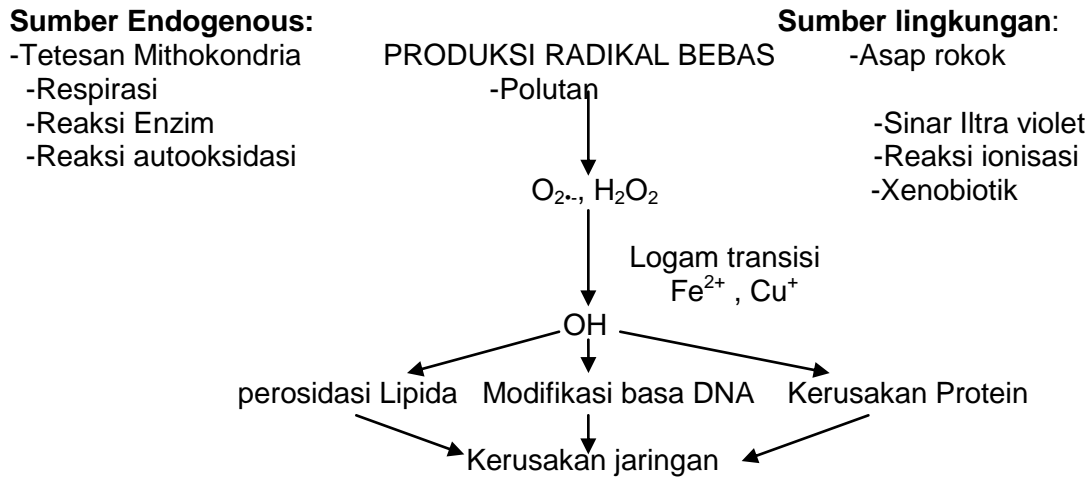
penting C-4 quinon dan C-3 atau C-5-OH. Hidrogenasi C2:C3 ikatan rangkap mengakibatkan hilangnya aktifitas pengkelat logam, yang dapat diasumsikan akibat kekurangan "rearrangement" elektron selama pembentukan kompleks logam-flavonoid (Gambar 2.17).



**Gambar 2.17. Mekanisme Reaksi Pengkelat Ion Flavonoid (Pokorny *et al.*, 2001)**

## 2.9. Antioksidan dalam Sistem Biologi

Young and Woodside (2001) melaporkan bahwa akibat dari reaktifitas yang tinggi, sehingga paling banyak radikal mempunyai waktu paruh yang sangat singkat ( $10^{-6}$  detik atau kurang) dalam sistem biologi, terutama superoksida dan radikal hidroksil. Pembentukan radikal didalam tubuh terjadi melalui beberapa mekanisme endogenous dan faktor lingkungan (Gambar 2.18).



**Gambar 2.18. Sumber Radikal Bebas Dalam tubuh (Young and Woodside, 2001)**

ROS dan RNS dihasilkan selama 1. iradiasi UV, X ray dan gamma ray 2. reaksi katalis logam 3. Polusi atmosfer 4. Dihasilkan oleh neutrofil dan macrophage dalam peradangan. 5. *By produk* reaksi transport elektron mitokondria. Konsentrasi ROS yang tinggi yang diakibatkan kerusakan struktur sel meliputi lipida, membran protein dan asam nukleat.

Menurut Young dan Woodside, 2001, Beberapa molekul termasuk adrenalin, flavin nukleotida, senyawa thiol, glukosa, dapat teroksidasi di dalam kehadiran logam transisi seperti besi dan tembaga. Rantai transport elektron di dalam membran inner mitokondria melakukan reduksi oksigen menjadi air. Selama proses ini intermediat radikal dibentuk, yang umumnya terikat kuat pada komponen rantai transport elektron. Tetapi, ada pemasukan konstan beberapa elektron ke dalam matriks mitokondria yang menghasilkan pembentukan superoksida. Aktifitas beberapa enzim seperti sitokrom p450 oksidase di dalam hati dan enzim termasuk sintesis hormon adrenalin, juga hasil penirisan beberapa elektron ke dalam lingkungan sitoplasma yang terjadi pembentukan superoksida. Ada juga produksi secara



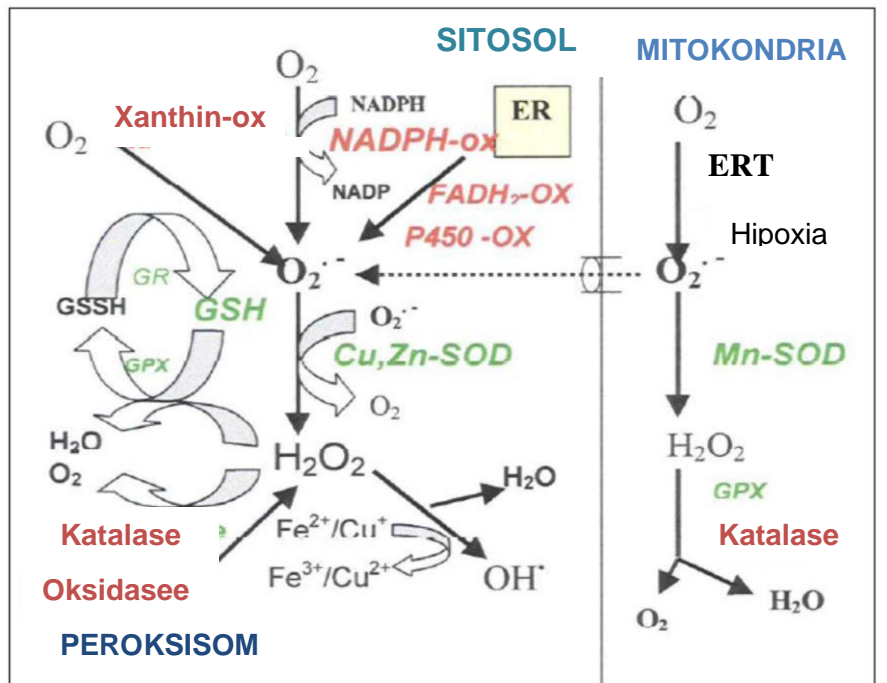
kontinyu superoksida oleh vasculer endotelium untuk menetralsir nitrat oksida. Produksi superoksida melalui sel lain untuk mengatur pertumbuhan dan difrensiasi sel, dan produksi superoksida melalui pagocytat sel selama pembakaran respirasi. Lipoksigenase (LOXs) sebagaimana enzim prostaglandin sintase (siklooksigenase), LOXs adalah enzim yang mengkatalisia asam lemak tidak jenuh yang mengandung ikatan rangkap cis. Lipoksigenase mengkonfersi PUFA menjadi hidroperoksida. Enzim ini berperan dalam pembentukan oksidasi lipida In vivo (Halliwell and Chirico. 1993).LOX terdapat pada tumbuhan jamur dan hewan. LOXs terdiri dari beberapa enzim utama yang fungsi fisiologi dan patologi tergantung pada posisi ikatan rangkap substrat. 5-LOXs menghasilkan prekursor untuk leukotrien yang meliputi respons peradangan dan alergi. 12-LOX asam arakhidonat oxygenase (AA) pada karbon12, berperan untuk aksi hipertropi, proliferasi dan hipertensi didalam endothelium, sel otot polos, platelet dan leukosit. 15-LOX mamalia bersama-sama dengan 13LOX tumbuhan mengoksidasi asam amino, asam lemak 20 karbon dan fosfolipida mitokondria (Denisov dan aranas'ev, 2005).

Antioksidan telah didefinisikan oleh Halliwell dan Gutheridge (2007) sebagai zat apapun yang, ketika hadir pada konsentrasi rendah dibandingkan substrat yang dapat teroksidasi, secara signifikan memperlambat atau mencegah oksidasi substrat itu. Ketika radikal bebas yang dihasilkan banyak, antioksidan in-vivo yang berperan dalam pertahanan organisme dari kerusakan oksidatif. Vitamin E sebagai antiosidan yang berfungsi meredam radikal peroksil. Vitamin E berfungsi menjaga PUFA didalam membran biologi fosfo lipida dan liprotein plasma. Vitamin E akan bereaksi dengan peroksi radikal membentuk radikal tokoferil.

Sebagai pertahanan baris pertama, antioksidan preventif seperti peroksidase dan logam pengkelat protein menekan pembentukan radial bebas. Selanjutnya,

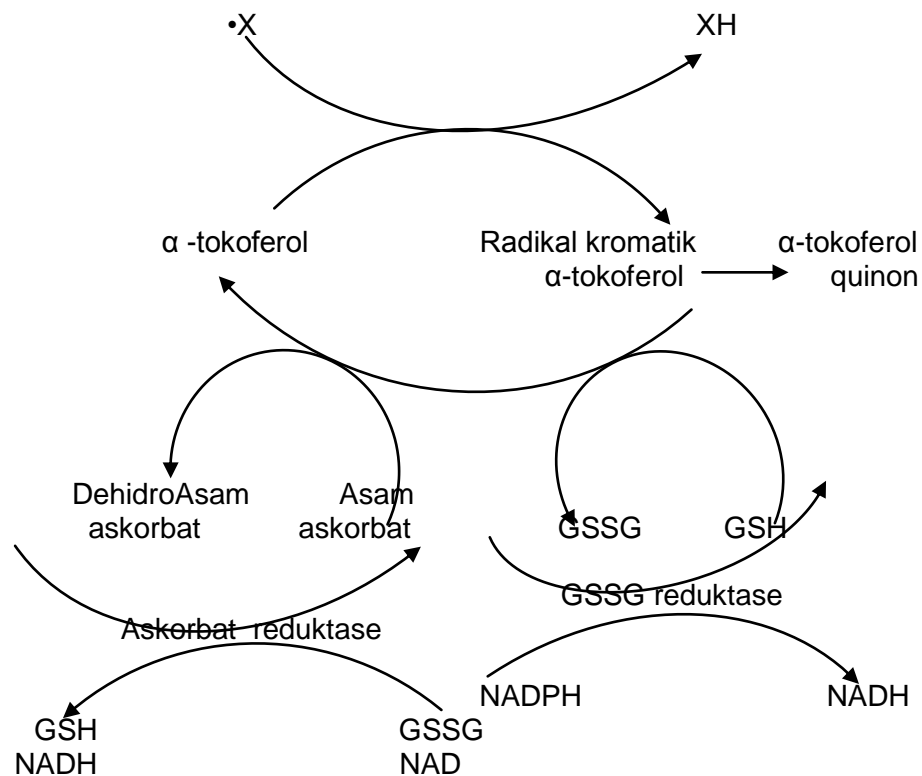
antioksidan peredam radikal seperti vitamin C dan vitamin E menangkap radikal untuk menghambat inisiasi rantai oksidasi dan mencegah propagasi rantai sebagai baris pertahanan kedua. Ini juga mungkin termasuk pemutusan reaksi terminasi rantai dengan reaksi dari dua radikal. Perbaikan dan de novo enzim bertindak sebagai pertahanan baris ketiga dengan memperbaiki kerusakan dan membangun kembali membran, termasuk lipase, protease, enzim perbaikan DNA dan transferase (Niki,1997).

Terdapat jaringan proses kerja yang luas antioksidan intraseluler dan ekstraseluler dengan peran beragam dalam setiap bidang pertahanan. Misalnya, vitamin C bertindak sebagai antioksidan sitosol sementara vitamin E melindungi membran seldang glutathion bertindak untuk melindungi keduanya. Glutathione(GSH) diperlukan oleh tiga enzim terpisah, peroksidase, reduktase, dan sebuah transferase. Enzim antioksidan SOD, glutathione peroksidase (GPX), dan katalase (CAT) bekerja dalam sel untuk menghapus paling banyak superoksida dan peroksida sebelum mereka bereaksi dengan ion logam untuk membentuk radikal bebas lebih reaktif (Gambar 2.19). Reaksi rantai peroksidatif diprakarsai oleh radikal bebas yang lolos dari pertahananantioksidan yang diakhiri oleh pemutusan rantai air atau antioksidan larut lemak (Mates *et al.* 1999, Wilcox, ).



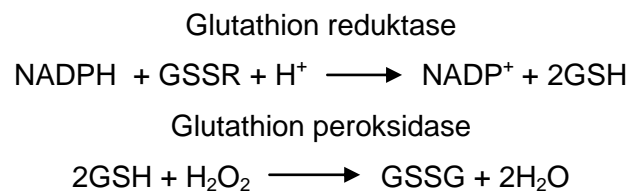
**Gambar 2.19. Pembentukan Spesies Oksigen Reaktif dan Sistem Pertahanan Antioksidan (Mates et al, 1999, Wilcox, 2002)**

Basu *et al.*, (1999) menyatakan bahwa oksidan biologi dan ROS direduksi langsung oleh tokoferol membentuk radikal tokoferil kromanoksi. Radikal tokoferil kromanoksi direduksi kembali secara klinis menjadi tokoferol oleh asam askorbat atau GSH. Asam dehidroksi askorbat direduksi kembali secara klinis dengan pengeluaran GSH atau NADH dan glutathion teroksidasi direduksi kembali menjadi GSH oleh NADPH dengan kehadiran glutathion reduktase (Gambar 2.20). Glutathione tereduksi (GSH) adalah tiol yang paling banyak melimpah dalam sel dan berperan dalam beberapa proses metabolisme, yang berperan penting dalam proses detoksifikasi ROS.



**Gambar 2.20. Mekanisme Reaksi Antara Antioksidan Asam Askorbat, Tokoferol dan GSH (Basu *et al.*, 1999).**

Sebagai konsekuensi oksidasi, 2 molekul GSH digabung oleh ikatan disulfida membentuk GSH teroksidasi (GSSG). Ratio GSH dan GSSG adalah indikator paling banyak dan paling ensitif digunakan sebagai biomarker stres oksidatif (Latuka *et al.*, 2013). Siklus reaksi redoks glutathione terdiri dari NADPH, glutathione tereduksi, glutathione reduktase dan glutathione peroksidase, sebagai berikut:



Diet memainkan peran penting dalam produksi sistem pertahanan antioksidan karena beberapa antioksidan seperti vitamin E, C, dan,  $\beta$ -karoten adalah nutrisi

esensial dan enzim antioksidanm lainnya juga yang tergantung pada mineral penting, SOD mengandung seng dan glutathion peroksidase mengandung selenium. Diet juga memainkan peranan penting dalam proses oksidasi dengan mempengaruhi substrat yang adalah substrat oksidatif, seperti oksidasi lipid. Asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) yang memiliki dua atau lebih ikatan ganda, semakin rentan terhadap serangan radikal bebas sebesar dengan jumlah kenaikan ikatan rangkap (Halliwell *et al.*, 1992).

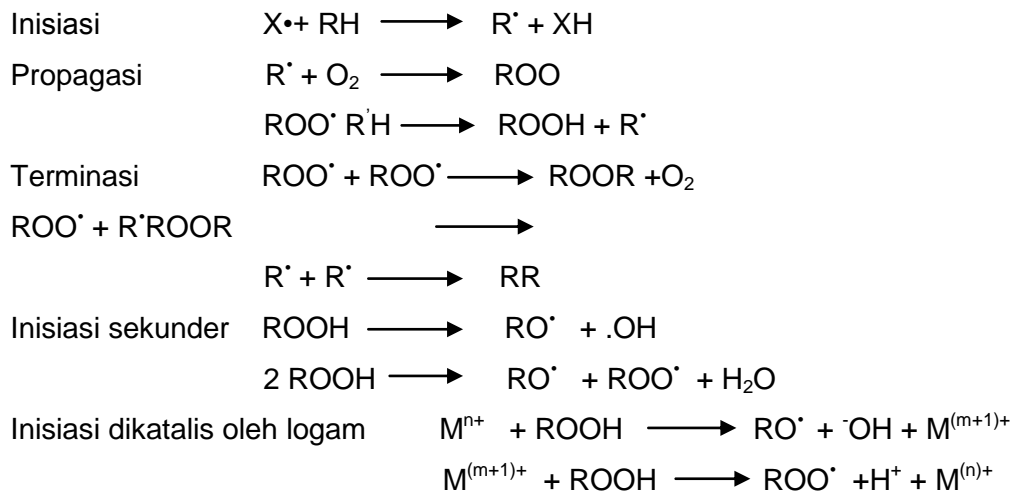
### **2.10. Antioksidan dalam Sistim Pangan**

Oksidasi lemak mempengaruhi kualitas produk dalam pengolahan, pemasakan dan penyimpanan bahan makanan yang mengarah pada hilangnya warna, aroma dan rasa yang disukai serta berkurangnya masa simpan. Oksidasi lipida didalam otot daging terutama diawali didalam asam lemak tidak jenuh tinggi dari membran phosfolipida (Botsoglou *et al.*, 2003).

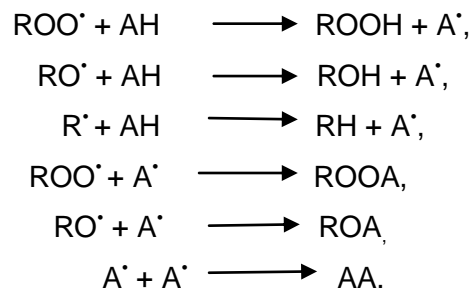
Antioksidan merupakan senyawa yang terdapat secara alami dalam hampir semua bahan pangan, tetapi jika bahan pangan tersebut diolah maka senyawa tersebut dapat mengalami degradasi sehingga fungsinya berkurang. Antioksidan digunakan untuk menghambat proses otooksidasi minyak dan lemak tidak jenuh. Kerja antioksidan dapat memperlambat laju terbentuknya radikal bebas pada langkah inisiasi dan reaksi berantai pada tahap propagasi dari reaksi otooksidasi pada asam lemak (Wong, 1989,). Kecepatan oksidasi minyak selain tergantung pada ikatan rangkap juga dipengaruhi oleh suatu zat tertentu yang secara alamiah sudah ada dalam minyak atau ditambah dari luar.

Menurut Akoh *et al.*, 2008, mekanisme kerja antioksidan secara umum adalah menghambat terjadinya oksidasi lemak. Oksidasi lemak terdiri dari tiga tahap

utama, yaitu inisiasi, propagasi, dan terminasi. Pada tahap inisiasi terjadi pembentukan radikal asam lemak, yaitu suatu senyawa turunan asam lemak yang bersifat tidak stabil dan sangat reaktif akibat dari hilangnya satu atom hidrogen. Pada tahap selanjutnya, yaitu propagasi, radikal asam lemak akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksil. Radikal peroksil lebih lanjut akan menyerang asam lemak menghasilkan hidroperoksida dan radikal asam lemak baru. Hidroperoksida yang terbentuk bersifat tidak stabil dan akan terdegradasi lebih lanjut menghasilkan senyawa-senyawa karbonil rantai pendek seperti aldehida dan keton yang bertanggung jawab atas flavor makanan berlemak.



Pokorny et al., (2001) melaporkan bahwa penambahan antioksidan (AH) primer dalam konsentrasi rendah pada lipida dapat menghambat atau mencegah reaksi autooksidasi lemak dan minyak. Penambahan tersebut dapat menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi. Radikal-radikal yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru. Radikal-radikal antioksidan dapat saling bereaksi membentuk produk non radikal.



Akoh *et al.*, (2008) melaporkan bahwa antioksidan primer bereaksi dengan lipida dan peroksid radikal dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil dan non-radikal. Antioksidan mendonorkan elektron pada radikal lipid dan memproduksi turunan lipid dan antioksidan radikal ( $\text{A}^\bullet$ ) yang lebih stabil dan kurang siap melakukan reaksi autooksidasi berikutnya. Antioksidan primer dapat juga bereaksi langsung dengan radikal lipid. Antioksidan sekunder berfungsi menangkap senyawa yang mencegah terjadinya reaksi berantai. Kombinasi antioksidan primer dan sekunder sering ditambahkan pada lemak dan minyak yang dapat memberikan efek sinergis sehingga menambah keefektifan kerja antioksidan primer. Antioksidan sekunder ini bekerja dengan satu atau lebih mekanisme yaitu: memberikan suasana asam pada medium (sistem makanan), b) meregenerasi antioksidan utama c) mengkelat atau mendeaktifkan kontaminan logam prooksidan, d) menangkap oksigen. e) mengikat singlet oksigen dan mengubahnya ke bentuk triplet oksigen (Min dan Boff, 2004).

## 2.11. Analisa Kadar Total Fenol dan Aktifitas Antioksidan

### 2.11.1. Kadar Total fenol

Metoda untuk mengukur kadar total fenol alga laut menggunakan spektrofotometer dengan reagen Folin-Ciocalteu menghasilkan warna biru dengan mengurangi anion heteropolifosfomolibat-tungstat yang berwarna kuning (Cox *et al.*, 2010). Metoda pengukuran fenol menggunakan reagen folin-ciocalteu

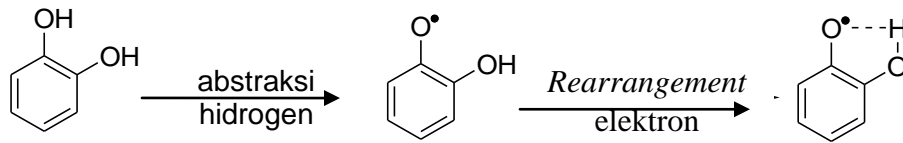
sebenarnya mengukur *reducing capacity* dari sampel dan tidak merefleksikan total fenol sebenarnya (Zahra *et al.*, 2007).

Pada penentuan kadar total fenol digunakan asam galat sebagai larutan standar. Serapan maksimum asam galat diperoleh pada panjang gelombang 765 nm. Sebelum dilakukan pemeriksaan kadar total fenol, terlebih dahulu dibuat kurva kalibrasi larutan standar asam galat dengan beberapa konsentrasi (mg/L). Pembuatan kurva kalibrasi ini berguna untuk membantu menentukan kadar total fenol dalam sampel melalui persamaan regresi dari kurva kalibrasi (Szabo *et al.*, 2007).

Aktifitas antioksidan yang multifungsional sangat tinggi dihubungkan pada cincin fenol yang bertindak sebagai elektron untuk menangkap radikal peroksil dan radikal hidroksil. Aktifitas antioksidan asam fenolik dan turunannya tergantung pada banyaknya dan posisi group hidroksil yang diikat pada cincin aromatik, sisi ikatan dan jenis dari substituent.

Pokorni (2001) melaporkan bahwa kapasitas mendonasi elektron metil, etil tertier dan butil pada posisi orto dan para pada golongan hidroksil memperkuat aktifitas antioksidan fenol, demikian pula substitusi hidroksil pada posisi ini. Fenol tersubstitusi ortho seperti 1,2-dihidroksibenzena akan membentuk ikatan hidrogen intramolekular selama reaksi radikal, akan memperkuat stabilisasi radikal fenoksil (Gambar 2.21) Methoksi tersubstitusi ortho pada hidroksil memberikan aktifitas antioksidan yang lemah.





**Gambar 2.21. Ikatan Hidrogen Fenol Tersubstitusi Ortho pada Reaksi Radikal (Pokorsny et al. 2001).**

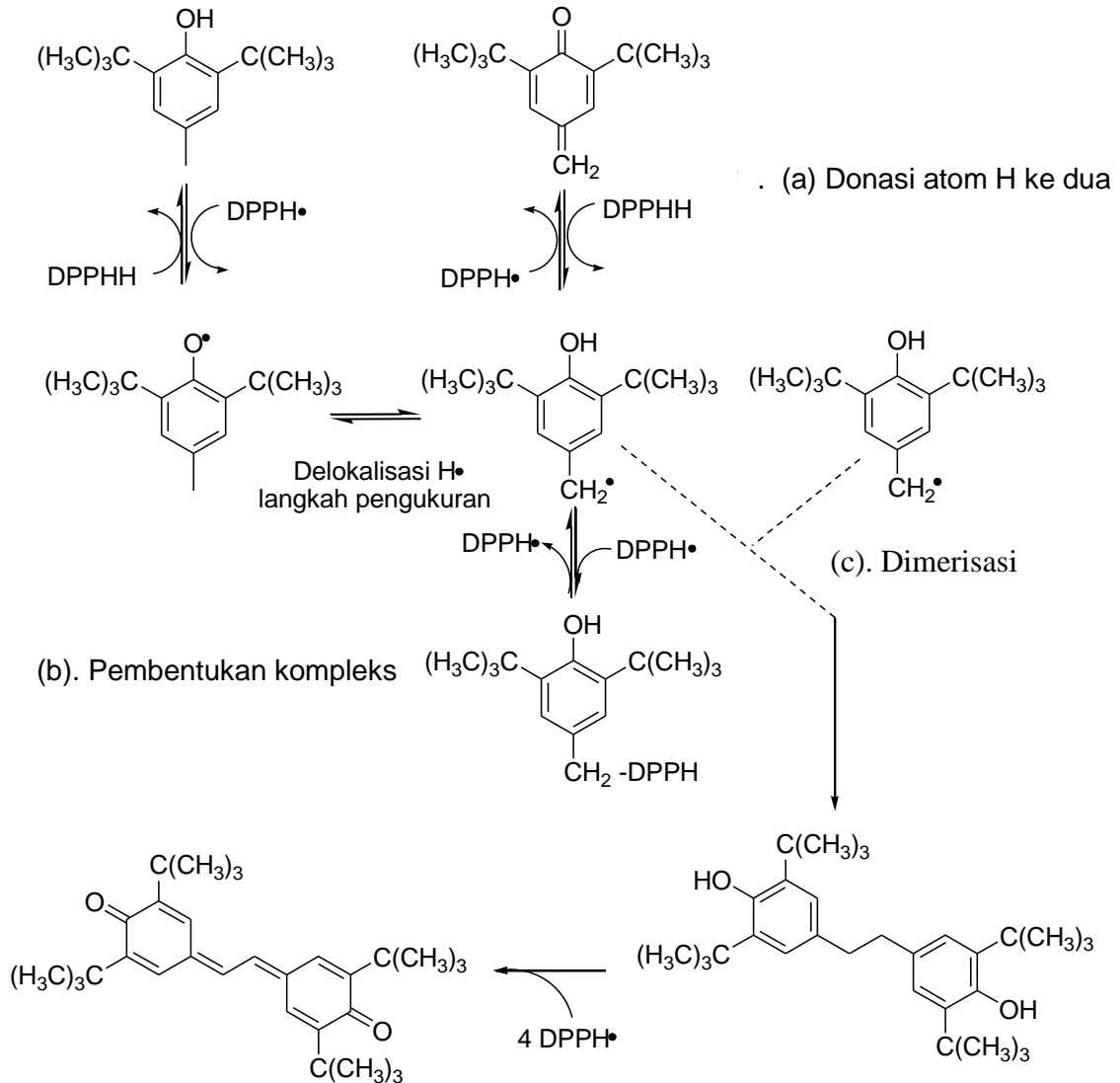
Menurut Chakraborty *et al.*, 2013, alga laut mengandung senyawa polifenolik seperti phlorotannin yang bereaksi sebagai penangkap elektron dan bertanggung jawab sebagai sifat antioksidan multifungsi seperti penangkap radikal hidroksil, radikal peroksil atau radikal superoksida, ekstrak alga laut coklat memiliki aktifitas peredam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 2.11.2. Uji Aktivitas Antioksidan Dengan Metoda DPPH

DPPH adalah senyawa yang stabil pada suhu kamar telah digunakan secara ekstensif sebagai radikal bebas untuk mengevaluasi senyawa-senyawa pereduksi dan merupakan reagen yang bermanfaat untuk menginvestigasi aktifitas senyawa peredam radikal bebas, (Chandini *et al.*, 2008, Huang dan Prior, 2005).

Menurut Brand-Williams, 1995 ada tiga langkah mekanisme reaksi antara DPPH dengan zat antioksidan, dicontohkan senyawa monofenolat (Gambar 2.22). Langkah pertama meliputi delokalisasi satu elektron pada gugus yang tersubstitusi para dari senyawa tersebut, kemudian memberikan atom hidrogen untuk mereduksi DPPH. Langkah berikutnya meliputi dimerisasi antara dua radikal fenoksil, yang akan mentransfer radikal hidrogen yang akan bereaksi kembali dengan radikal DPPH. Langkah terakhir adalah pembentukan kompleks antara radikal aril dengan radikal DPPH. Pembentukan dimer maupun kompleks antara zat antioksidan dengan DPPH tergantung pada kestabilan dan potensial reaksi dari struktur molekulnya.

Berdasarkan mekanisme tersebut, maka dapat dikatakan bahwa senyawa antioksidan mempunyai sifat yang relatif stabil dalam bentuk radikalnya.



**Gambar 2.22. Mekanisme Reaksi Senyawa Antioksidan dengan DPPH (Brand-Williams, 1995).**

Pada pengujian aktifitas antioksidan jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang dan absorbansi pada panjang gelombang 517 nm akan hilang. Perubahan ini dapat diukur secara stoikiometri sesuai dengan jumlah elektron atau atom hidrogen

yang ditangkap oleh molekul DPPH akibat adanya zat antioksidan (Gurav *et al.*, 2007).

Aktivitas antioksidan merupakan kemampuan suatu senyawa atau ekstrak untuk menghambat reaksi oksidasi yang dapat dinyatakan dengan persen penghambatan. Parameter yang dipakai untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah harga konsentrasi efisien atau *Efficient Concentration* ( $EC_{50}$ ) atau *Inhibition Concentration* ( $IC_{50}$ ) yaitu konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan % penghambatan 50%. Zat yang mempunyai aktivitas antioksidan tinggi, akan mempunyai harga  $EC_{50}$  atau  $IC_{50}$  yang rendah (Gurav *et al.*, 2007).

### 2.11.3. Daya Reduksi

Daya Reduksi atau FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) adalah aktifitas antioksidan diukur berdasarkan kemampuannya senyawa antioksidan didalam sampel untuk mereduksi senyawa ferri (III) menjadi senyawa Ferro (II) didalam reaksi redoks kolorimetrik yang meliputi transfer single elektron. Absorbansi dihitung pada panjang gelombang 700 nm. Daya reduksi dianggap sebagai indikator potensial yang signifikan untuk mengetahui aktifitas antioksidan sebuah senyawa atau sampel. Kehadiran reduktan (seperti antioksidan), menyebabkan reduksi  $Fe^{3+}$  /ferricyanat kompleks menjadi bentuk Ferrous. Karena itu melalui pengukuran pembentukan Perl's Prussian blue pada 700 nm jumlah  $Fe^{2+}$  dapat dimonitor (Chew *et al.* 2008).

Polifenol adalah senyawa pereduksi dan bersama-sama dengan pereduksi lain seperti *dietary fiber*, vitamin C, E dan karotenoid, adalah antioksidan yang berfungsi melindungi jaringan tubuh melawan *stress oksidatif* yang berhubungan dengan patologi seperti kanker, penyakit jantung koroner dan peradangan. Asam askorbat, askorbil palmitat, asam erithorbat, natrium erithorbat dan sulfat mencegah

oksidasi melalui merendam oksigen dan bertindak sebagai reduktan (Acoh dan Min, 2008). Asam askorbat merupakan senyawa yang utama bertanggung jawab merendam radikal HO<sup>•</sup>. *Turbinaria sp* hasil isolasi mempunyai kemampuan mereduksi ternyata sangat esensial untuk melindungi sistem biologi (Matanjan *et al.*, 2008).

#### 2.11.4. Pengkelat Ion

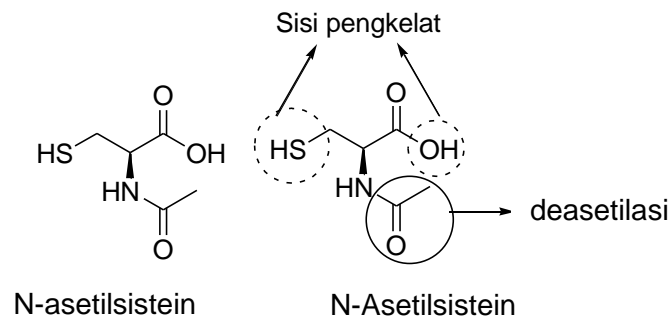
Pengkelat Ion atau FIC (Ferrous Ion Chelating) yaitu pengukuran aktifitas antioksidan berdasarkan pengikatan antioksidan pada ion logam. Ekstrak dengan kemampuan mengikat logam lebih tinggi akan mencegah atau menghambat reaksi, seperti tipe reaksi Fenton yang menghasilkan radikal hidroksil reaktif. Ferrozine membentuk sebuah kompleks (warna merah) dengan ion Fe<sup>2+</sup> melalui interaksi kuantitatif. Walaupun gangguan didalam kehadiran zat pengkelat menghasilkan penurunan pembentukan warna merah complex, warna reduksi ini ketika diukur memberikan suatu estimasi kemampuan mengkelat logam dari kehadiran pengkelat didalam pencampuran reaksi. Zat-zat pengkelat yang membentuk ikatan  $\sigma$  dengan sebuah logam, adalah efektif sebagai antioksidan sekunder karena mereduksi potensial redoks, sehingga menstabilkan bentuk teroksidasi ion logam (Kuda *et al.*, 2005).

Beberapa logam berat dengan valensi lebih dari 2 (Fe, Cu, Mn, Cr, Ni, V, Zn, Al) menyebabkan oksidasi melalui reaksi katalisa radikal bebas. Reaksi reduksi oksidasi logam transisi mentransfer elektron selama perubahantingkat oksidasi. Mekanisme oksidasi oleh logam, yaitu logam bereaksi dengan hidropersida atau bereaksi langsung dengan molekul lipida tak jenuh. Pengkelat yang baik mempunyai beberapa sifat yaitu kelarutan dalam air harus tinggi, resisten pada biotransformasi, kemampuan mencapai sisi logam, sanggup berada dalam kapasitas mengkelat pada

pH cairan tubuh dan bersifat membentuk kompleks logam yang toksisitasnya lebih rendah dari ion logam bebas (Swaran, 2009)

Senyawa berat molekul rendah pada alga laut coklat *Scytosiphon lomentaria* mempunyai aktifitas pengkelat  $Fe^{2+}$ . Phlorotannin yang biasanya hadir didalam fraksi pelarut polar dari alga laut coklat adalah pengkelat logam berat yang kuat. Kemampuan mengkelat  $Fe^{2+}$  alga laut karena kehadiran senyawa non-fenolik, seperti karbohidrat yang ada dalam ekstrak alga laut. Molekul dengan hidroksil, sulfhidril, karbonil dan golongan fosfat memiliki konfigurasi gugus fungsi yang menguntungkan didalam kemampuan mengkelat  $Fe^{2+}$ ; Senyawa-senyawa asam fenolik, quercetin, flavonoid, dan glikosida fenolik dapat mengkelat ion logam transisi seperti  $Fe^{2+}$ . Senyawa-senyawa aktif ini dapat mempunyai pengaruh sinergis, berperan penting mengatur aktifitas antioksidan melalui penghambatan oksidasi dan pengaruh pengkelat ion (Ahn *et al.*, 2004).

Menurut Swaran, 2009, N-asetil-L-sistein (NAS) adalah antioksidan thiol yang dimanfaatkan untuk kondisi stress oksidatif. NAS mereduksi kerusakan hati disebabkan oleh *over dosis* parasetamol pada manusia dan mengurangi kerusakan hati dan penurunan GSH plasma tikus. NAS menstimulasi sintesa GSH. NAS dengan cepat diasetililasi menjadi sistein sehingga dapat meningkatkan tingkat GSH melalui penyediaan substrat untuk sintesa GSH. Struktur NAS pada sisi mengkelat ion dapat dilihat pada Gambar 2.23.



**Gambar 2.23. Struktur N-Asetil Sistein (NAS) Menggambarkan 2 Sisi Pengkelat (Thiol dan Hidroksil) (Swaran, 2009).**

## 2.12. Metoda Isolasi dan Elusidasi

### 2.12.1. Metoda ekstraksi

.Teori Nerst menyatakan bahwa solut yang larut dalam suatu fasa cairan yang berkesinambungan dengan fasa cairan lainnya yang tak saling campur dengan fasa cairan yang pertama, akan menyebar diantara kedua fasa itu sedemikian rupa sehingga ratio (nisban ) konsentrasi-konsentrasi dalam kedua fasa itu konstan pada suhu tetap. Pada umumnya dalam suatu ekstraksi terlibat beberapa macam solut. Ekstraksi akan berhasil memisahkan solut dari satu solut lainnya bila masing-masing solut mempunyai ratio penyebaran (D) yang sangat berbeda (Hemström dan Irgum, 2006).

Jenis ekstraksi yang tepat harus memperhatikan tekstur dan kandungan air dari bahan alamiah terutama tumbuhan dan jenis senyawa yang akan diisolasi. Makin sempurnanya satu komponen terekstraksi, makin besar kontaminasi yang disebabkan oleh terekstraksinya komponen-komponen lain. Oleh sebab itu dalam suatu ekstraksi harus ditentukan terlebih dahulu sasaran yang ingin dicapai, apakah ingin dicapai suatu hasil yang banyak atau hasil dengan kemurnian tinggi (Huie, 2002).

### **2.12.2. Kromatografi Lapis Tipis**

Kromatografi lapis tipis adalah teknik kromatografi yang secara luas digunakan untuk analisa kualitatif senyawa organik, isolasi senyawa tunggal dari campuran banyak komponen, analisa kuantitatif dan isolasi skala preparatif. Banyak plat KLT yang secara komersil tersedia seperti: lapisan adsorbent anorganik (silika atau silika gel, alimina), lapisan adsorbent organik (poliamid, selulosa); organik polar, modifikasi matriks silika gel (diol, cyanopropil dan amino propil) dan lapisan organik non polardengan densitas matriks silika yang berbeda. Adsorben ini dilapiskan pada penyangga padat seperti pelat gelas, plastik dan aluminium (Nielson, 1998).

Tempat kedudukan noda pada kertas atau lapis tipis dinyatakan dengan  $R_f$  (faktor retardasi), yaitu ratio jarak antara titik penotolan senyawa sampai dengan titikpusat noda terhadap jarak antara titik penotolan sampai dengan batas naiknya pelarut. Analisa kuantitatif senyawa yang sudah dipisahkan dapat dengan mengekstraksi senyawa dari noda pada lapis tipis atau pada kertas dan menentukannya dengan metoda spektrofotometri atau metoda lain ataumengukur densitas noda dengan densitometer (Pesek, 2005).

### **2.12.3. Kromatografi Kolom (KK)**

Menurut Hemström dan Irgum, 2006, kromatografi cair menggunakan kolom mula-mula diperkenalkan oleh Tswett untuk memisahkan pigmen dari bahan alami. Pengelusian dapat dilakukan secara: 1. Isokratik, pelarut atau campuran pelarut yang sama dipakai untuk keseluruhan proses. 2) Landaian bertahap, susunan pelarut diubah tahap-demi tahap lebih polar dari tahap sebelumnya, 3) Landaian,

susunan pelarut terus-menerus diubah dari medium yang kurang polar ke medium yang lebih polar (Yang dan Xindu, 2011).

Salah satu masalah KK adalah pemantauan pelarut ketika keluar dari kolom. Masalah ini terutama pada senyawa tidak berwarna. Pemantauan dapat dilakukan dengan membagi eluat menjadi beberapa fraksi baik secara manual maupun memakai pengumpul fraksi. Fraksi dianalisis untuk memeriksa zat terlarut dan konsentrasinya dirajah lawan nomor fraksi untuk memperoleh suatu kurva. Kemudian bentuk kurva dipakai sebagai petunjuk mengisolasi produk, Selain itu dapat juga digunakan KLT. Fraksi kolom yang mengandung senyawa yang sama (pakai KLT) digabungkan dan pelarutnya diuapkan, lebih baik dikerjakan pada tekanan rendah (Xiaodong dan Christopher, 2008.).

#### **2.12.4. Nuclear Magnetic Resonance (NMR).**

*Nuclear magnetic resonance* adalah cabang elektroskopi yang bermanfaat untuk menganalisis karena sensitifitas yang tinggi magnetik inti atom (Spin inti) pada lingkungannya. *Electron spin resonance* (ESR) dan NMR adalah sama, yaitu mengukur sifat magnetik dari spin. Lingkungan magnet diukur melalui struktur molekul dan ion serta mosion dan interaksi. Diukur melalui komposisi kimia, distribusi massa diantara fase berbeda (padat, kental, cair), mobilitas molekul (difusi rasional dan translasi) serta kimia dan fisik didalam material makanan (Nielson, 1998)

Menurut Supratman 2010, resonansi magnet inti (NMR) berhubungan dengan sifat magnet dari inti atom. Spektroskopi NMR didasarkan pada penerapan gelombang radio oleh inti tertentu dalam molekul organik, bila molekul ini berada dalam magnet yang sangat kuat dan homogen. Mempelajari molekul senyawa organik secara spektroskopi resonansi magnet inti akan memperoleh gambaran



perbedaan sifat magnet dari berbagai inti yang ada dan untuk menduga letak inti tersebut dalam molekul.

#### 2.12.5. Fourier transform Infra Red (FTIR).

Menurut Nielson, 1998, infra red adalah alat yang digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi didalam senyawa organik. Radiasi IR adalah energi elektromagnetik dengan panjang gelombang lebih panjang dari sinar tampak tetapi lebih pendek dari gelombang mikro. Umumnya panjang gelombang IR berkisar 0.8-100  $\text{cm}^{-1}$  ( $\mu\text{m}$ ) yang dibagi menjadi : *Near IR* (0.8- 2.5  $\mu\text{m}$ ), *Mid IR* (2.5 -15  $\mu\text{m}$ ) dan *Far IR*(15 -100  $\mu\text{m}$ ). Near IR dan mid-IR adalah daerah spektrum yang paling berguna untuk analisis makanan secara kuantitatif dan kualitatif. Radiasi IR diukur dalam frekwensi,karena frekwensi berhubungan langsung dengan energi radiasi. Molekul dapat mengabsorpsi radiasi IR jika molekul itu terjadi fibrasi, karena itu moment dipole elektrik berubah selamavibrasi. Walaupun ada banyak kemungkinan vibrasi didalam molekul polyatom, tetapi vibrasi yang paling penting adalah *stretching* (regang) dan *bending* (lentur/tekuk). Vibrasi *stretching* pada frekwensi yang lebih tinggi dari *bending/scissoring*). Vibrasi *stretching* adalah vibrasi yang terjadi sepanjang ikatan sehingga terjadi perpanjangan atau pemendekan ikatan. Sedangkan vibrasi *bending* disebabkan oleh sudut ikatan sehingga terjadi pembesaran atau pengecilan sudut ikatan. Gerakan vibrasi yang teramati dalam spektrum IR jika menghasilkan perubahan momen dipol ( $\mu \neq 0$ ) sedangkan jika ( $\mu = 0$ ) akan teramati dalam spektrum raman (Supratman, 2010).

Frekwensi fibrasi, intensitas relatif, bentuk dari *band absorpsi* infra red dapat digunakan didalam karakterisasi secara kwalitatif dari sampel. Kehadiran sebuah *band* pada frekwensi tertentu tidak harus digunakan sebagai suatu petunjuk

kehadiran gugus fungsi tertentu. Konfirmasi harus selalu dilakukan dengan band yang lain atau teknik analisis lain. Sebagai contoh jika absorpsi tajam diobservasi pada daerah  $3100-3000\text{ cm}^{-1}$  ( $3,23-3,33\ \mu\text{m}$ ) sampel dapat mengandung senyawa aromatik atau olefinat dan absorpsi observasi pada fibrasi *stretching* karbon-hidrohen ( $=\text{C-H}$ ). Jika band tidak diobservasi pada daerah dimana absorpsi aromatik lain diduga, maka senyawa aromatik tidak ada dalam sampel, demikian juga alkena (Socrates,1994)

Ada dua jenis spektroskopi IR,yaitu *dispersive instrument* dan *fourier Transform*. *Dispersive instrumen* menggunakan monokromator untuk mendispersi frekwensi radiasi individual dan berturut-turut melewatikan sampel sehingga absorpsi dari setiap frekwensi dapat diukur. Pada Instrumen *fourier transform* radiasi tidak didispersikan,tetapi semua panjang gelombang tiba pada detektor secara simultan dan secara matematik diubah kedalam spektrum IR. Sebagai ganti monokromator menggunakan interferometer (Nielson,1998).

FT-IR spectroscopy suatu teknik yang telah dilakukan untuk analisa bahan selama lebih dari 70 tahun. Spectrum IR- merepresentasikan salinan dari sampel dengan puncak absorpsi yang bertanggung jawab pada frekwensi getaran dari ikatan-ikatan atom yang menyusun bahan. Tidak ada 2 bahan yang menghasilkan spektrum IR yang sama karena masing-masing bahan merupakan kombinasi atom yang berbeda. Spektroskopi IR dapat menghasilkan identifikasi positif (analisa kualitatif) dari tiap bahan berbeda. Ukuran puncak pada spektrum mengidentifikasikan jumlah bahan yang ada. IR merupakan alat yang bagus untuk analisa kuantitatif dengan menggunakan intuitive software algorithms (Supratman, 2010).

Pada infrared (IR) spectroscopy, radiasi IR melewati suatu sampel. Beberapa radiasi infra red diserap oleh sampel dan beberapa dilewatkan (transmitted). Hasil spektrum menunjukkan penyerapan dan transmisi molekular menghasilkan salinan molekular dari sampel.

#### **2.12.6. *Electrospray Mass Spectro*(ESMS)**

Menurut Nielson, 1998, Spektroskopi massa adalah unik diantara beberapa teknik spektroskopi baik dalam teori maupun instrumentasi. Spektroskopi mencakup interaksi radiasi elektromagnetik atau beberapa bentuk energi denganmolekul. Molekulmengabsorbsi radiasi danmenghasilkan sebuah spektrum, baikselama proses absorpsi maupun saat eksitasi molekul kembali kepada tingkat dasar (*ground state*). Spektroskopimassa bekerja melalui penempatan perintah pada sebuahmolekul yangmenyebabkan molekul itu berubah menjadi sebuah ion dalamsebuah proses yang disebut ionisasi.

Spektrum Massa digunakan untuk kualifikasi bahan organik volatil dan semi volatil dalam campuran, menentukan berat molekul dan kadang komposisi elemen dari bahan organik yang tidak diketahui dari campuran dan menentukan struktur dari bahan organik dari campuran dengan cara mencocokkan spektrum bahan dengan katalog dan dengan cara interpretasi spektrum.

Spektrum massa adalah alur kelimpahan (*abundance*) jumlah relatif fragmen bermuatan berlainan versus massa per muatan (*m/z* atau *m/e*) dari fragmen-fragmen tersebut. Muatan ion darikebanyakan partikel yang dideteksi dalam suatu spektrometer massa adalah +1; maka nilai *m/z* sama dengan massa molekulnya (M). Bagaimana suatu molekul atau ion pecah menjadi fragmen-fragmennya bergantung pada kerangka karbon dan gugus fungsional yang ada. Oleh karena itu, struktur dan massa fragmen memberikan petunjuk mengenai

struktur molekul induknya dan juga mungkin untuk menentukan berat molekul suatu senyawa dari spektrum massanya (Supratman, 2010). *Elektrospray* adalah teknik LCMS yang paling populer saat ini yang dikembangkan oleh Fenn dan rekan-rekannya 1984, adalah teknik yang paling sensitif dengan sebuah batas sensitifitas normal. Secara normal senyawa polar dapat di *elektrospray* dengan jenis ion yang dihasilkan tergantung pada awal perintah, positif perintah menghasilkan ion positif, secara negatif menghasilkan senyawa seperti yang mengandung gugus fungsi asam karboksilat bebas akan menghasilkan ion negatif (Nielson, 1998).

Tabrakan antara sebuah molekul organik dan salah satu elektron berenergi tinggi menyebabkan lepasnya sebuah elektron dari molekul itu dan terbentuk suatu ion organik. Ion organik yang dihasilkan oleh penembakan elektron berenergi tinggi tersebut tidak stabil dan pecah menjadi fragmen kecil, baik berbentuk radikal bebas maupun ion-ion lain. Dalam sebuah spektroskopi massa yang khas fragmen bermuatan positif ini akan dideteksi (Supratman, 2010)

### BAB III. KERANGKA KONSEP PENELITIAN

#### 3.1. Kerangka pikir

Alga laut kaya akan yodium yang dapat menyebabkan rendahnya resiko gondok dan penyakit kelenjar. Sejarah mengungkapkan bahwa negara-negara maritim telah menggunakan alga laut sebagai, anastesi, minyak untuk batuk, luka, gondok dan memulihkan penyakit. Alga laut juga mempunyai peranan penting didalam modifikasi metabolisme lipida dalam tubuh manusia. Alga laut kaya akan mineral, konsumsi yang tinggi kalsium, kalium dan natrium, mempunyai hubungan erat dengan rendahnya tekanan sistolik dan resiko hipertensi. Karagenan yang diekstrak dari alga laut merah atau algin dari alga laut coklat diolah menjadi gula-gula kaya akan sumber-sumber serat larut.

Kegunaan dan potensi alga laut yang sangat luas memberikan dorongan dilakukannya penelitian lebih lanjut mengenai potensinya sebagai antioksidan. Penelitian yang akan dilakukan adalah mengekstrak beberapa jenis alga laut dengan metanol. Ekstrak yang mempunyai aktifitas antioksidan tertinggi dilakukan fraksinasi secara bertingkat menggunakan pelarut dengan kepolaran yang berbeda kemudian dilakukan pengujian/pengukuran terhadap kadar total fenol dan aktivitas antioksidan. Ekstrak yang mempunyai aktifitas antioksidan tertinggi dilakukan isolasi untuk menentukan komponen senyawa bioaktif.

Sampel dimaserasi dengan menggunakan konsentrasi metanol 30, 50 dan 70%. Alasan menggunakan metanol dalam mengekstraksi senyawa metabolik sekunder karena metanol sangat baik dapat melarutkan senyawa polar maupun non-polar (Yuan dan Walsh, 2006). Penggunaan konsentrasi metanol 30, 50 dan 70% didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Chew *et al.*, (2008) menggunakan ekstrak metanol 20%, 50% dan 100% menemukan bahwa pada konsentrasi 50%

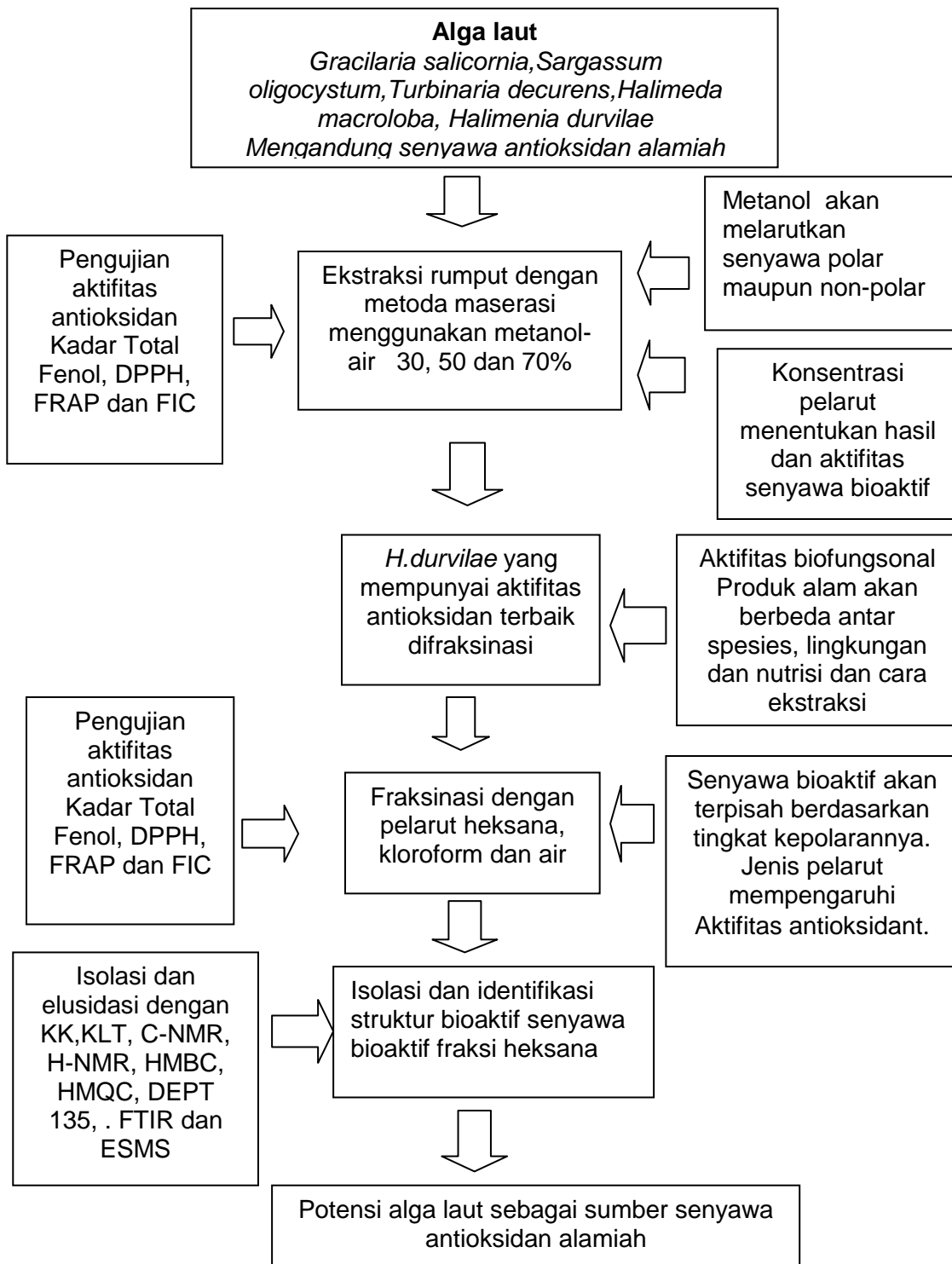
mempunyai kadar total fenol tertinggi, sedangkan pada konsentrasi metanol 100% kadar total fenol menurun. Penggunaan 70% pada penelitian ini bertujuan melihat apakah masih terjadi peningkatan kadar total fenol.

Ekstrak metanol telah secara luas digunakan karena menunjukkan aktifitas antioksidan paling tinggi pada banyak spesies alga laut dibandingkan dengan pelarut organik lainnya. Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa proses ekstraksi, meliputi waktu dan konsentrasi pelarut mempengaruhi hasil total ekstraksi. Ekstraksi 72 jam kadar total polifenol lebih tinggi dari ekstraksi 24 jam (Matanjun *et al.*, 2008). Karena itu pada penelitian ini ekstraksi dilakukan 3 kali ekstraksi selama 3 hari.

Teknik maserasi yang digunakan dipilih sebagai metoda ekstraksi, karena karakteristik senyawa-senyawa yang terkandung dalam alga laut belum diketahui. Penggunaan teknik soxletasi dihindari karena teknik ini menggunakan suhu tinggi yang dapat mengakibatkan dekomposisi atau rusaknya senyawa fitokimia yang tidak tahan panas dalam ekstrak. Walaupun terdapat beberapa kekurangan dalam teknik maserasi seperti ekstraksinya memerlukan waktu yang lebih lama serta pelarut yang diperlukan lebih banyak jika dibandingkan dengan menggunakan metoda soxletasi.

Selanjutnya ekstrak yang memiliki aktifitas antioksidan paling tinggi dilakukan fraksinasi secara bertahap menggunakan 3 pelarut yaitu heksana, kloroform dan air. Penggunaan metode partisi dengan berbagai pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda-beda dalam isolasi senyawa bertujuan untuk memisahkan senyawa-senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya. Setiap tahapan ekstraksi yang dilakukan pada ekstrak alga laut diharapkan dapat mengekstrak senyawa yang mempunyai kepolaran sama dengan kepolaran pelarut, yang sesuai dengan kaidah *like dissolve like*. Setiap tahapan ekstraksi dilakukan semaksimal mungkin sehingga komponen terekstraksi secara sempurna, dimana ekstraksi dihentikan pada saat

pelarut hasil ekstraksi sudah tidak berwarna. Kemudian maserat yang diperoleh dievaporasi dengan suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak dan fraksi kental. Penggunaan suhu 40°C evaporator bertujuan untuk mencegah dekomposisi senyawa yang terkandung dalam ekstrak. Evaporator dilengkapi dengan pompa vakum atau *aspirator*, yang berfungsi menjaga tekanan dalam sistim lebih rendah, agar penguapan pelarut berlangsung dengan waktu yang lebih cepat. Kerangka Konsep Teori Penelitian Dapat dilihat pada Gambar 3.1.



**Gambar 3.1 Kerangka Konsep Teori Penelitian**



### 3.2. Kerangka Konsep Operasional dan pengukuran.

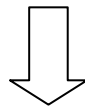
Alga laut segar diambil dari perairan Arakan Sulawesi Utara yang terdiri dari 5 jenis alga laut, masing-masing *Gracillaria salicornia*, *Turbinaria decurens*, *Sargassum oligocystum*, *Halimeda macroloba* dan *Halimena durvilae*. Alga laut dibersihkan dari pasir dan epyptes kemudian ditiriskan. Masing-masing jenis alga laut diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan metanol dalam air 30, 50 dan 70%, selama 24 jam sebanyak 3 kali. Ekstrak kental metanol masing-masing alga laut dianalisis rendemen, kadar total fenol, Aktifitas antioksidan DPPH, daya reduksi dan pengkelat ion dengan spectrometer UV-VIS. Analisis data menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan uji beda nyata BNT menggunakan software Statgraf Centurion IX.

Alga laut *H.durvilae* difraksinasi meggunakan pelarut heksana, klorofom dan air. Masing-masing fraksi dianalisis, rendemen, kadar total fenol, Aktifitas antioksidan DPPH, daya reduksi dan pengkelat ion. Ekstrak pekat alga laut (metanol, n-heksana, kloroform dan air) masing-masing dianalisis kadar total fenol dan aktifitas antioksidan dengan spectrometer UV-VIS.

Fraksi heksana *H.durvilae* dilakukan isolasi dan pemurnian menggunakan KLT dan Kolom kromatografi, elusidasi isolat murni menggunakan dan C-NMR, H-NMR, DEPT 135, HMBC, HMQC, FTIR dan ESMS. Kemudian spektrum yang dihasilkan diinterpretasi. Kerangka Operasional Dan Pengukuran secara lengkap dapat dilihat pada Gambar 3.2.

### Penelitian Tahap I

- Memaserasi alga laut *Gracilaria salicornia*, *Sargassum oligocystum*, *Turbinaria decurens*, *Halimeda macroloba* dan *Halimena durvilae* dengan konsentrasi metanol 30%, 50% dan 70%
- Mengevaporasi maserat dan mengukur banyaknya rendemen yang dihasilkan pada tiap-tiap konsentrasi metanol masing-masing alga laut.
- Mengukur Kadar total Fenol dan aktifitas Antioksidan DPPH, Daya Reduksi dan Pengkelat Ion.
- Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi metanol terhadap aktifitas antioksidan.
- Mengetahui jenis alga laut yang mempunyai aktifitas antioksidan tertinggi.



### Penelitian Tahap II

- Fraksinasi secara bertingkat *H. durvilae* yang mempunyai aktifitas antioksidan yang paling tinggi dari ke 5 jenis alga laut dengan pelarut-pelarut heksana, kloroform dan air
- Mengetahui berapa banyak rendemen yang diperoleh masing-masing fraksi setelah dievaporasi dengan vacuum evaporator.
- Mengetahui kadar total fenol dan aktifitas antioksidan masing-masing fraksi.
- Mengetahui fraksi yang mempunyai aktifitas antioksidan tertinggi dengan jumlah rendemen terbanyak



### Penelitian Tahap III

- Isolasi dan elusidasi senyawa fraksi heksana yang mempunyai kadar total fenol dan Aktifitas Pengkelat Ion tertinggi dengan menggunakan Kromatografi lapis Tipis (KLT) dan Kromatografi Kolom (KK).
- Menguji aktifitas antioksidan DPPH dengan KLT secara kualitatif pada fraksi yang diperoleh dari KK.
- Mengukur aktifitas antioksidan DPPH isolat murni fraksi heksana secara kualitatif dan kuantitatif.
- Elusidasi senyawa menggunakan dan C-NMR, H-NMR, HMBC, HMQC dan DEPT, FTIR, ESMS.
- Menginterpretasi spektrum C-NMR, H-NMR, HMBC, HMQC dan DEPT, FTIR, ESMS, untuk mengetahui struktur senyawa aktif fraksi *n*-heksana *H. durvilae* sebagai sumber. antioksidan alami.

**Gambar 3.2. Kerangka Konsep Operasional Dan Pengukuran**

Tahapan penelitian yang dilakukan dapat diuraikan sebagai berikut:

I. Ekstraksi dengan metanol 30, 50 dan 70%. alga laut *Gracillaria salicornia*, , *Sargassum oligocystum*, *Turbinaria decurens*, *Halimeda macroloba* dan *Halimena durvilae*, dan mengukur aktifitas antioksidan. Ekstraksi Bertujuan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak metanol alga laut yang mempunyai aktifitas antioksidan tertinggi.

II. Fraksinasi ekstrak metanol 70% *H.durvilae* dengan *n*-heksana, kloroform, air dan mengukur aktifitas antioksidan, kerana *H.durvilae* pada konsentrasi 70% mempunyai aktifitas antioksidan yang tertinggi. Fraksinasi bertujuan untuk mengetahui fraksi yang memiliki aktifitas antioksidan tertinggi.

III. Isolasi dan elusidasi senyawa aktif yang ada pada fraksi *n*-heksana *H.durvilae*, karena fraksi ini mempunyai kadar total fenol dan aktifitas pengkelat ion yang paling tinggi serta rendemen terbanyak. Isolasi bertujuan untuk mengetahui struktur senyawa dan aktifitas antioksidan isolat murni.

## BAB IV. METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1. Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2012 – April 2013. Alga laut *Gracillaria salicornia*, *Sargassum oligocystum*, *Turbinaria decurens*, *Halimeda macroloba* dan *Halimena durvillae*. diambil diperairan Sulawesi Utara Desa Arakan Kabupaten Minahasa Selatan. Jarak dari garis pantai 500 -1500 m, dengan kedalaman kira-kira 1-5 meter. Tempat pelaksanaan penelitian sebagai berikut:

1. Preparasi, ekstraksi dan fraksinasi dilakukan di Laboratorium Fakultas FPIK UNSRAT Manado,
2. Pengukuran aktifitas antioksidan dilaksanakan di di Laboratorium terpadu Universitas Sam Ratulangi Manado, Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian Unsrat. Laboratorium Farmacology Kedokteran Hewan IPB Bogor, Fakultas MIPA Kimia Universitas Padjadjaran Bandung.
3. Isolasi dan Pemurnian dilaksanakan di Fakultas MIPA Kimia Universitas Padjadjaran Bandung.
4. Elusidasi dilaksanakan di Laboratorium Kimia LIPI PUSPITEK Serpong.

### 4.2. Bahan dan Alat Penelitian

#### 4.2.1. Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini adalah 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) dibeli dari Sigma Aldrich; ferozin iron reagent, Follin-Ciocalteu's phenol, natrium karbonat, metanol, n-heksana, kloroform, etil asetat, aseton, silica gel 60 F<sub>254</sub>, kalium dihidrogen fosfat, iron (III) kloride-6-hidrat, asam trikloroacetat, kalium ferricyanida dan kertas saring Whatman no.1. dibeli dari Merk. Pelarut-pelarut dan senyawa kimia lainnya sesuai standart analisis.

#### 4.2.2. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *rotary vacuum evaporator*, destilator Buchi, vacuum desikator, freeze dryer, timbangan digital, mikropipet, spektrofotometer UV, oven, kolom diameter 0,5 cm dan 1,5 cm, lampu UV 254 dan 365 nm. Jeol NMR JNM ECA-500 (500 MHz untuk H-NMR dan 125 MHz untuk C-NMR), FTIR Simadzu dan ESMS menggunakan instrument ACQ-TOD, Water TQ detector Tune mass lynx 4.1 Scn 714 serta peralatan gelas lainnya.

#### 4.3 . Tahapan Penelitian

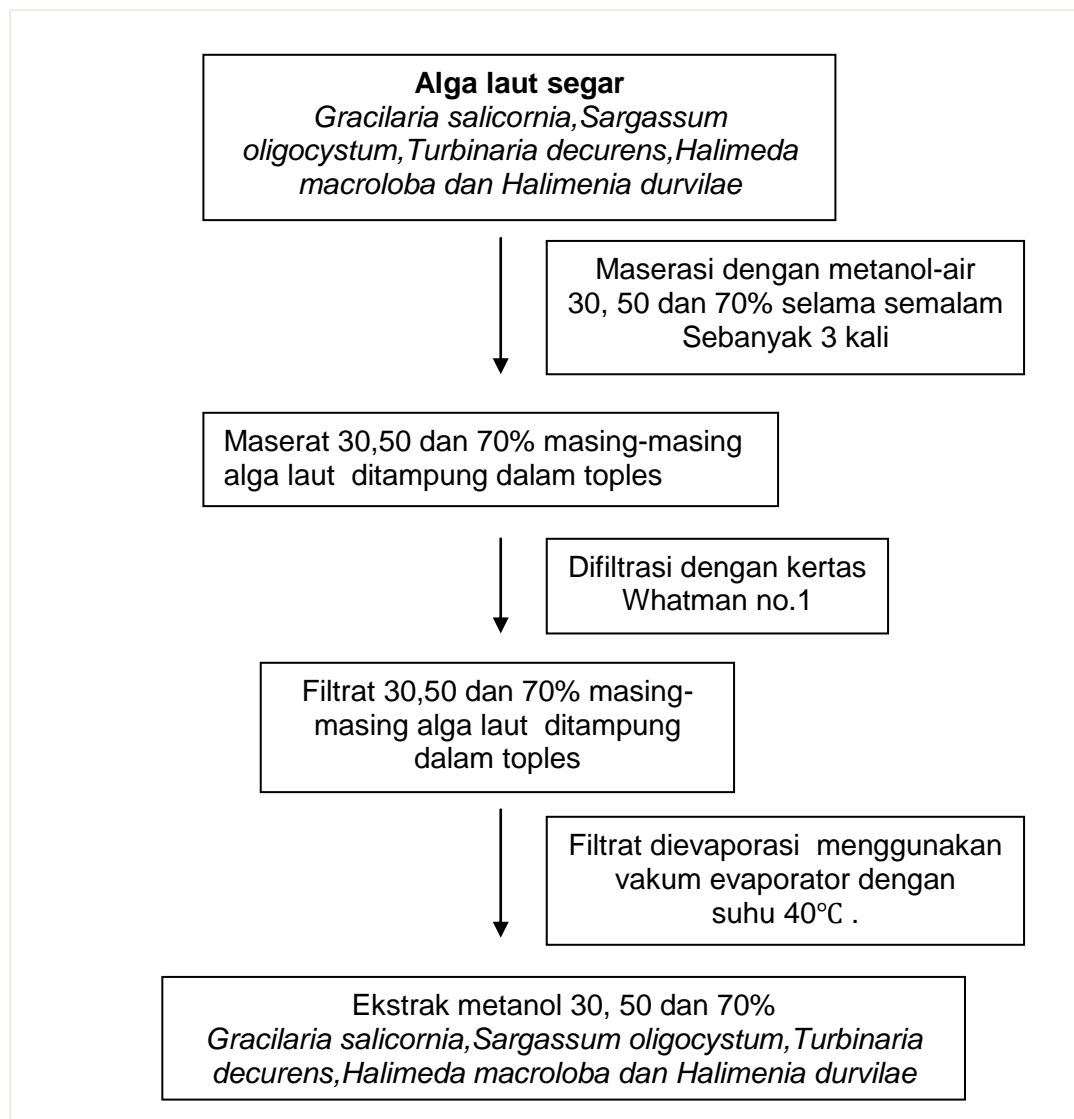
##### 4.3.1. Tahap I. Ekstraksi dengan Metanol 30, 50 dan 70% Alga Laut *G. salicornia*, *T. decurens*, *S. oligocystum*, *H. macroloba*, *H. Durvilae* dan Mengukur Aktifitas Antioksidan.

##### 4.3.1.1. Prosedur penelitian

250 g sampel segar alga laut *G. salicornia*, *T. decurens*, *S. oligocystum*, *H. macroloba* dan *H. Durvilae* masing-masing dihancurkan dengan blender kemudian diekstraksi menggunakan konsentrasi metanol dalam air 30%, 50%, dan 70% dengan perbandingan 1:2 (b/v), kemudian direndam selama semalam. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3x, dengan cara yang sama (Devi *et al.*, 2008). Maseratnya ditampung, kemudian difiltrasi dengan kertas saring Whatman no.1 Filtrat dikumpulkan diuapkan menggunakan evaporator vakum (40<sup>0</sup>C) hingga didapatkan ekstrak metanol 30,50 dan 70% dari 5 jenis alga laut. Kemudian semua ekstrak alga laut dianalisis kadar total fenol, DPPH, daya reduksi dan pengkelat ion (Gambar 4.1). Sebagai pembanding digunakan antioksidan BHT (*Butilated Hydroxy Toluena*) dengan konsentrasi 200 ppm, prosesur pengukurannya sama dengan sampel uji alga laut.

#### 4.3.1.2. Analisis Statistik

Semua data dihitung rata-rata dengan standart deviasi ( $n=3$ ) dan disajikan dalam tabel atau histogram. Data hasil penelitian ekstrak metanol 30, 50 dan 70% dari 5 jenis alga laut dianalisis menggunakan Racangan Acak Lengkap dengan 2 faktor, bila terjadi perbedaan signifikan dilanjutkan uji BNT, menggunakan Software Statgraf Centurion 9. Uji korelasi diantara rata-rata perbedaan yang signifikan dinyatakan pada level  $p<0.05$ .

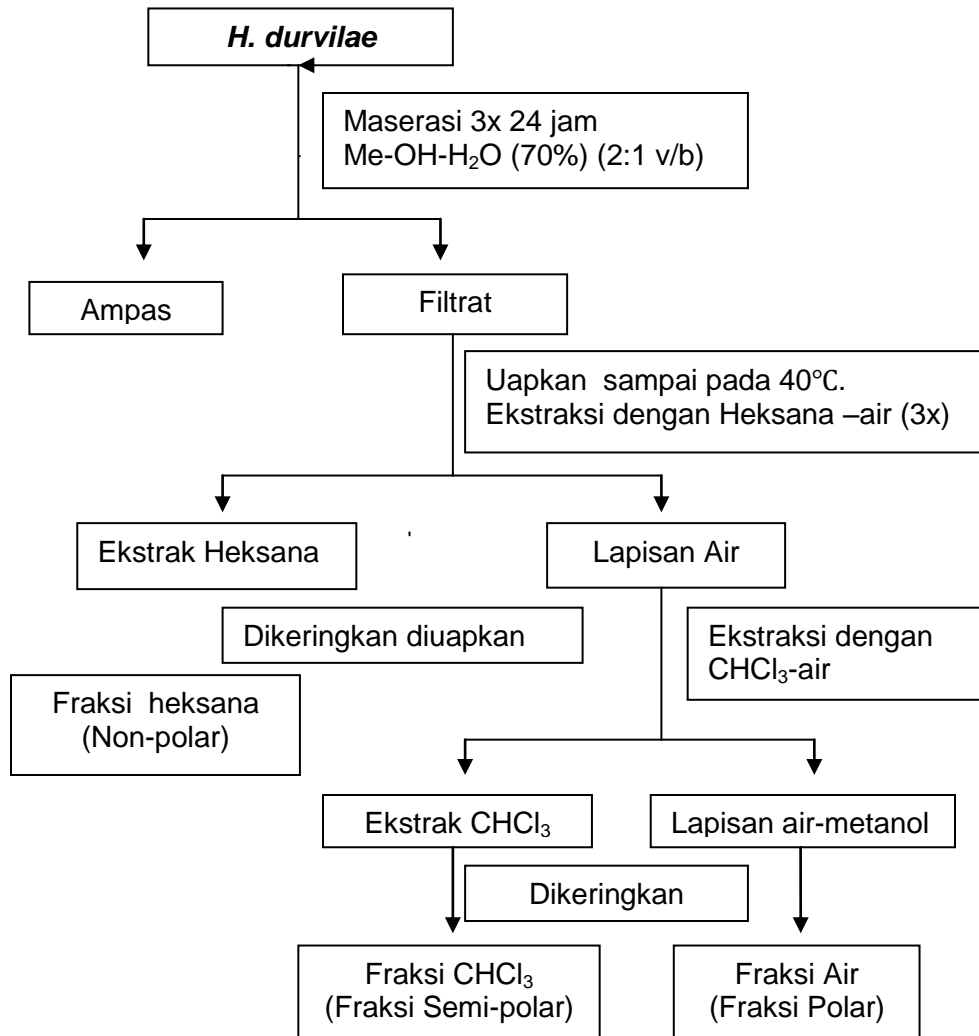


**Gambar 4.1. Ekstraksi Alga laut *Gracilaria salicornia, Sargassum oligocystum, Turbinaria decurens, Halimeda macroloba dan Halimena durvilae*.**

### **4.3.2 Tahap II. Fraksinasi Ekstrak Metanol 70% Alga Laut *H. durvillae* dengan Heksana, Kloroform, Air dan mengukur Aktifitas Antioksidan.**

#### **4.3.2.1. Prosedur Penelitian**

Alga laut *H.durvillae* segar sebanyak 18 kg diblender menjadi butiran-butiran yang sangat kecil, agar senyawa kimia yang terkandung dapat terekstraksi dengan baik. Sampel kemudian diekstraksi dengan cara maserasi dalam suhu ruang dengan pelarut metanol 70% (1:2 b/v) selama 24 jam, sebanyak tiga kali. Menurut Nazir *et al.* 2011, ekstrak pekat metanol ini didekantasi dengan etil asetat sebanyak 3 kali, kemudian dievaporasi, Selanjutnya ekstrak pekat yang diperoleh dilarutkan dalam akuades dan dipartisi secara bertingkat/ berkesinambungan dalam corong pisah dengan menggunakan pelarut *n*-heksana sehingga diperoleh fraksi *n*-heksana dan fraksi air. Fraksi air dipartisi dengan kloroform, sehingga diperoleh fraksi kloroform dan fraksi air. Fraksi-fraksi hasil partisi (*n*-heksana, kloroform dan air) diuapkan pelarutnya dengan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 40°C (Gambar 4.2). Kemudian semua ekstrak dan fraksi alga laut dianalisis Kadar Total Fenol, DPPH, Daya reduksi dan Pengkelat Ion.



**Gambar 4.2. Fraksinasi Alga laut *H. durvilae***

### 4.3.3. Tahap III. Isolasi, Elusidasi dan Identifikasi Senyawa Aktif *H.durvilae*.

#### 4.3.3.1. Prosedur Penelitian

##### - Penentuan Eluen yang Sesuai

Fraksi heksana *H. durvilae* hasil fraksinasi di KLT (Kromatografi Lapis Tipis) untuk menentukan jenis dan perbandingan pelarut yang akan digunakan pada Kromatografi Kolom. Pelarut yang digunakan adalah heksana-etilasetat dan heksana-aseton, hasilnya pelarut paling cocok adalah heksana-aseton. Kemudian



fraksi heksana di kolom kromatografi. Setiap fraksi hasil KK di KLT. Setiap Hasil KLT disemprot dengan  $H_2SO_4$  dan DPPH 0.05% untuk melihat penampakan noda dan melihat fraksi yang mempunyai aktifitas antioksidan. Penampakan noda dilihat pada lampu UV 254 nm dan 365 nm.

#### **-Pelaksanaan Kromatografi Lapis Tipis**

Plat KLT dipotong dengan ukuran 5 x10 cm kemudian diberi tanda titik untuk tempat menotolkan sampel. Sampel yang telah dilarutkan dengan heksana ditotol dengan menggunakan pipa kapiler, tiap-tiap titik ditotol sebanyak 3- 5 kali. Kemudian chamber yang telah diisii dengan campuran heksana-aseton, ditutup untuk menjenuhkan semua ruangan. Setelah itu plat kromatografi yang telah ditotol dengan sampel fraksi heksana dimasukkan dalam chamber kemudian chamber ditutup, setelah eluent telah naik sampai batas tertentu, maka plat KLT dikeluarkan kemudian dikeringkan. Penampakan noda dilihat dibawah lampu UV 254 nm dan 365 nm. Penyemproten dengan  $H_2SO_4$  juga dilakukan untuk melihat penampakan noda.

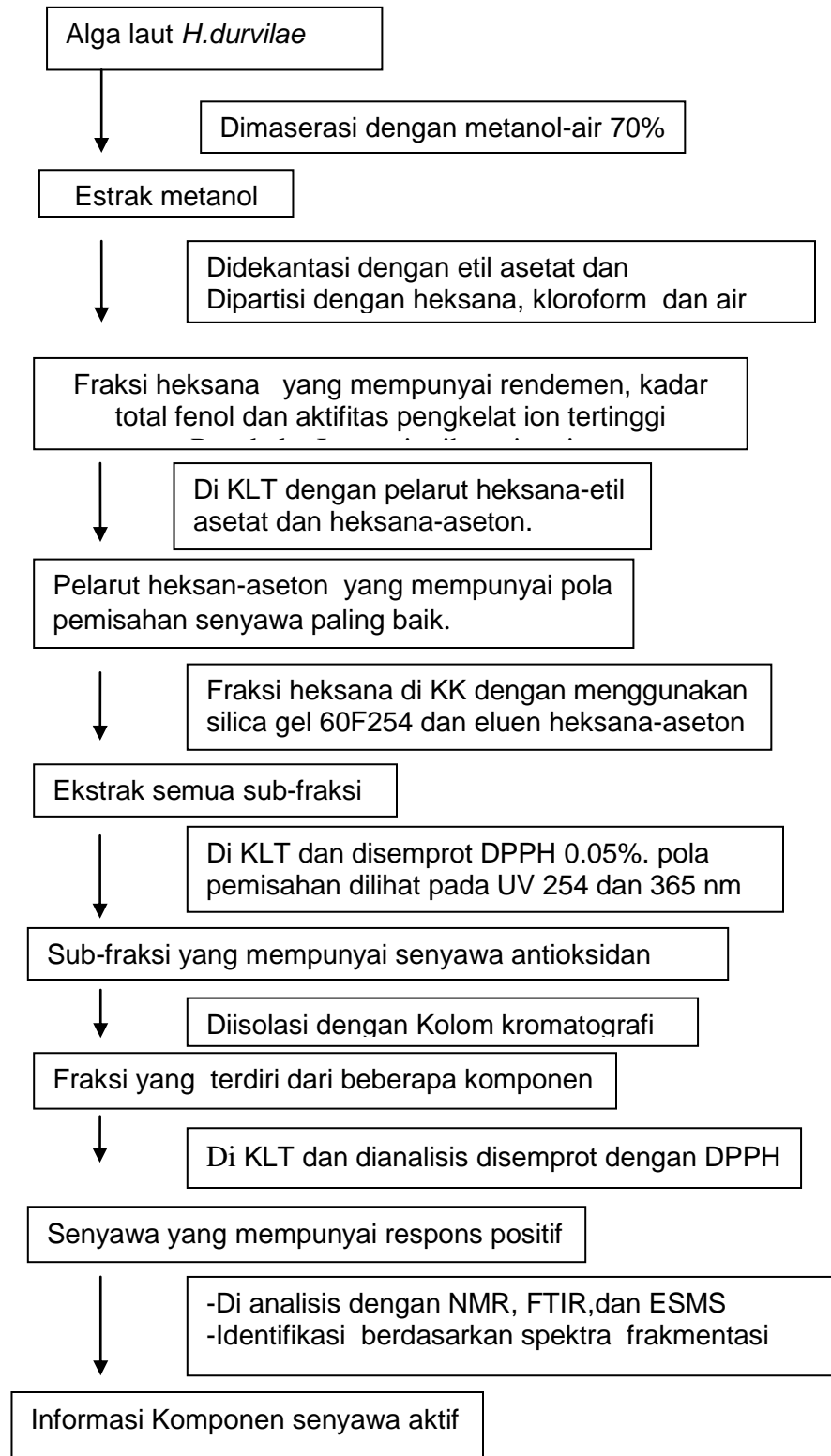
#### **- Pelaksanaan Impraknasi**

789.4 gr fraksi *n*-heksana *H.durvillae* ditambahkan aseton dan silika gel 60F<sub>254</sub> secukupnya, dicampur agar homogen, kemudian dievaporasi sampai berbentuk padat, sampel dikeluarkan dari labu dengan cara dikerok setelah itu dimasukkan dalam KK untuk difraksinasi. Impraknasi bertujuan agar sampel yang dimasukkan dalam KK homogen.

#### **- Pelaksanaan Kolom Kromatografi**

Prosedur pelaksanaan kromatografi kolom sebagai berikut: sebuah tabung gelas diameter 0.5 - 1 cm dan panjang ± 0.5- 1 m yang telah berisi pelarut diisi dengan adonan fase diam, yaitu silika gel. Bagian bawah kolom diberi kapas untuk

menahan butiran silika gel. Penambahan adonan silika gel dilakukan terus hingga membentuk unggun (packing) silika gel sampai pada ketinggian tertentu. Selanjutnya larutan analit yang dipisahkan dituangkan kedalam kolom dan diikuti dengan penuangan pelarut perlahan-lahan sambil menampung cairan yang keluar dari kolom dengan volume tertentu (fraksi-fraksi kecil). Selanjutnya fraksi-fraksi kecil diperiksa dengan menggunakan KLT, dan masing-masing hasil KLT disemprot dengan DPPH dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Pemisahan dengan KK dilakukan sebanyak 4 kali, hasil KLT yang mempunyai satu spot setelah dilihat dibawah lampu UV 254 nm dan 365 nm, ditimbang beratnya, kemudian dievaporasi vakum dan setelah itu dimasukkan dalam vakum desikator selama 8 jam. Isolat yang telah dimurnikan dielusidasi menggunakan <sup>13</sup>C-NMR, <sup>1</sup>H-NMR, DEPT135, HMQC dan HMBC FTIR, ESMS Spektra fragmentasi diinterpretasi untuk mendapatkan struktur molekul senyawa. Identifikasi senyawa murni hasil interpretasi dibahas dengan membandingkan hasil penelitian struktur senyawa dari alga laut jenis lain dalam golongan yang sama, menurut kemiripan spektra fragmentasi. Tahapan isolasi dan identifikasi komponen senyawa *H.durvillae* dilihat pada Gambar 4.3.



**Gambar 4.3. Isolasi, Elusidasi dan Idetifikasi Senyawa Aktif *H. Durvillae***

## BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1. Tahap I. Ekstraksi dengan metanol 30, 50 dan 70% Alga Laut *G. salicornia*, *S. oligocystum*, *T. decurens*, *H. macroloba*, *H. durvilae* dan Mengukur Aktifitas Antioksidan.

#### 5.1.1. Rendemen

Rendemen hasil ekstraksi alga laut *G. salicornia*, *S. oligocystum*, *T. decurens*, *H. macroloba* dan *H. durvilae* dengan metanol 30, 50 dan 70% disajikan pada Tabel 5.1. Rendemen ekstraksi masing-masing alga laut berkisar 0,26±0,04–2,96±0,08%. Rata-rata rendemen ekstrak *H. durvilae* menunjukkan hasil tertinggi, kemudian diikuti oleh *G. salicornia*, *H. macroloba*, *T. decurens* dan *S. oligocystum*.

**Tabel 5. 1. Rendemen ekstrak metanol 30, 50 dan 70% *G. salicornia*, *S. oligocystum*, *T. decurens* *H. macroloba* dan *H. durvilae*.**

Jenis alga laut	Rendemen (%)		
	Konsentrasi Metanol		
	30%	50%	70%
<i>G. salicornia</i>	1,28±0,06	0,97±0,03	1,13±0,02
<i>S. oligocystum</i>	0,27±0,02	0,26±0,04	0,27±0,03
<i>T. decurens</i>	0,82±0,05	0,05±0,003	0,38±0,02
<i>H. macroloba</i>	0,48±0,03	0,48±0,03	0,68±0,07
<i>H. durvilae</i>	2,96±0,08	2,88±0,07	1,14±0,06

Alga laut merah (*G. salicornia* dan *H. durvilae*) menunjukkan hasil ekstraksi lebih tinggi dari alga laut coklat maupun hijau. Hal ini sejalan dengan yang dilaporkan oleh Chandini *et al.*, (2008), dimana pada ekstraksi *Padina tetrastomatica* (alga laut merah), *S. marginatum* (alga laut coklat) dan *T. conoides* (alga laut hijau) menunjukkan bahwa rendemen ekstraksi tertinggi terdapat pada alga laut merah *P. tetrastomatika*, dengan persen rendemen masing-masing alga laut sebesar 12,31±0,82, 5,45±0,64 dan 5,76±0,66%. Chew *et al.*, (2008), menemukan bahwa

hasil ekstraksi tergantung pada jenis alga laut. Ganesan *et al.*, (2008) melaporkan bahwa hasil total ekstraksi metanol dari beberapa jenis alga laut merah yaitu *Euchema kappaphycus* ( $2,86 \pm 0,21\%$ ), *Gracilaria.edulis* ( $3,98 \pm 0,09\%$ ) dan *Acanthophora spicifera* ( $5,01 \pm 0,84\%$ ). Variasi hasil ekstraksi dapat disebabkan oleh komposisi kimia yang dikandung oleh alga laut, lokasi dan waktu pengambilan sampel.

### 5.1.2. Kadar total fenol

Hasil Pengukuran kadar total fenol berkisar  $2,07 \pm 0,33$  sampai  $18,83 \pm 0,77$  g GAE/100 g ekstrak (Tabel 5.2). Berdasarkan hasil analisis keragaman (Lampiran 6.2) menunjukkan bahwa konsentrasi metanol memberikan pengaruh ( $p < 0.05$ ) terhadap kadar total fenol tiap-tiap jenis alga laut. Makin tinggi konsentrasi ekstrak metanol, kadar total fenol makin tinggi. *H.durvilae*, mempunyai kadar total fenol tertinggi, sedangkan *G.salicornia* yang mempunyai kadar total fenol terendah.

**Tabel 5.2. Kadar Total Fenol (g GAE/ 100 g Ekstrak) Ekstrak Metanol 30, 50 dan 70% *G.salicornia*, *S.oligocystum*, *T.decurens*, *H.macroloba* dan *H.durvilae* (BNT=0.415).**

Alga Laut	Kadar Total Fenol (g GAE/100g ekstrak)		
	Konsentrasi metanol		
	30%	50%	70%
<i>G.salicornia</i>	$3,02 \pm 0,68^{ax}$	$2,95 \pm 0,61^{ax}$	$6,33 \pm 0,51^{ay}$
<i>S.oligocystum</i>	$3,16 \pm 0,81^{ax}$	$5,86 \pm 0,66^{by}$	$14,32 \pm 0,32^{bz}$
<i>T. decurens</i>	$3,86 \pm 0,37^{bx}$	$5,26 \pm 0,28^{by}$	$13,71 \pm 0,98^{cz}$
<i>H. macroloba</i>	$9,60 \pm 0,32^{cx}$	$11,11 \pm 1,12^{cx}$	$18,42 \pm 0,65^{dz}$
<i>H.durvilae</i>	$2,07 \pm 0,33^{dx}$	$2,95 \pm 0,43^{ay}$	$18,83 \pm 0,77^{dz}$

Semua nilai adalah rata-rata  $\pm$  SD: standart deviasi (n=3).

a,b,c,d. simbol yang sama pada kolom adalah non-sigifikant ( $P > 0.05$ ).

x,y,z simbol yang berbeda pada baris adalah signifikan ( $P > 0.05$ )

Kadar total fenol alga laut merah ekstrak metanol 70% *G. salicornia* dan *H. durvillae* menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $P < 0.05$ ). Menurut Yoshie *et al.*, 2002, komposisi senyawa fenol dan senyawa fenolik lainnya akan berbeda antar spesies alga laut, seperti pada *Halimeda spp.* Jumlah yang sangat besar pada *H. macroloba* adalah epigallokatekin sebesar 20.000 ppm berat kering. Asam kafeat dan hesperidin hanya terdapat pada *H. macroloba*. Katekol pada *H. macroloba* 5 kali dari *H. opuntia*. Miricetin dan morin pada *H. macroloba* rata-rata 2 kali lebih besar dari *H. opuntia*. Menurut Chandini *et al.*, 2008, senyawa fenolik umumnya ditemukan didalam tumbuh-tumbuhan dan dilaporkan mempunyai beberapa aktifitas biologi termasuk aktifitas antioksidan. Jenis-jenis senyawa fenolik yang terdapat dalam alga laut adalah *katekin*, *epikatekin*, *epigallokatekin*, *katekin gallat*, *epikatekin gallat*, *epigallokatekin gallat*, *quercitrin*, *hesperidin*, *miricetin*, *morin*, *luteolin*, *quercetin*, *apigenin*, *kaempferol*, *baicalein* dan senyawa fenol yang lain adalah *asam kafeat* dan *katechol*.

Fenol adalah komponen yang sangat penting dalam alga laut karena kemampuan meredam radikal bebas, oleh karena gugus hidroksil. Senyawa fenolik mempunyai keterkaitan dengan aktifitas antioksidan dan memegang peranan penting dalam menstabilkan peroksidasi lipida. Aktifitas antioksidan senyawa fenol akan berbeda sesuai dengan kondisi lingkungan. Karotenoid seperti fukosantin yang ada pada alga laut coklat mempunyai aktifitas antioksidan yang rendah pada sampel yang dikeringkan di udara terbuka daripada yang dikeringkan beku segar (Vinayak *et al.*, 2010).

### **5.1.3. Aktifitas Antioksidan DPPH**

Hasil Pengukuran aktifitas antioksidan DPPH ekstrak metanol alga laut *G. salicornia*, *S. oligocystum*, *T. decurens*, *H. macroloba* dan *H. durvillae* dapat dilihat

pada Tabel 5.3. Hasil Analisis Keragaman aktifitas antioksidan (Lampiran 6.2) menunjukkan bahwa konsentrasi metanol menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) pada masing-masing spesies terhadap aktifitas antioksidan DPPH.

**Tabel 5.3. Aktifitas Antioksidan DPPH (%) Ekstrak Metanol 30,50 dan 70% *G.salicornia*, *S. oligocystum*, *T. decurens* and *H. macroloba*, *H.durvilae* (10 mg/ml). BNT=9,776.**

Jenis Alga Laut	Aktifitas Antioksidan DPPH (% penghambatan)		
	Konsentrasi Metanol		
	30%	50%	70%
<i>G.salicornia</i>	14,94±2,95 <sup>ax</sup>	14,31±2,06 <sup>ax</sup>	15,57±1,83 <sup>ax</sup>
<i>S. oligocystum</i>	36,07±1,74 <sup>bx</sup>	38,19±3,40 <sup>bx</sup>	26,88±3,16 <sup>by</sup>
<i>T.decurens</i>	35,18±4,72 <sup>bx</sup>	42,08±1,35 <sup>bx</sup>	48,46±3,89 <sup>cy</sup>
<i>H. macroloba</i>	33,29±2,74 <sup>bx</sup>	39,26±4,15 <sup>bx</sup>	57,73±3,13 <sup>dy</sup>
<i>H.durvilae</i>	38,19±4,67 <sup>dx</sup>	38,04±2,14 <sup>bx</sup>	64,63±2,28 <sup>ey</sup>

Semua nilai adalah rata-rata ± SD: standart deviasi.

a,b,c,d symbol yang sama pada kolom adalah non-sigifikant ( $P > 0.05$ )

x,y,z symbol yang berbeda pada baris adalah signifikan ( $P > 0.05$ )

Konsentrasi ekstrak metanol 70% *H.durvilae* mempunyai aktifitas antioksidan DPPH tertinggi sedangkan aktifitas yang terendah adalah *G. salicornia*. Tingginya aktifitas antioksidan *H.durvilae* selain disebabkan oleh tingginya kadar total fenol dapat juga disebabkan oleh senyawa non-fenolik seperti pigmen. Alga laut merah memiliki pigmen fikoeretrin (*phycoerethrin*) dan fikosianin (*phycocyanin*) yang struktur dasarnya pirol dan berprotein. Fikoeretrin adalah pigmen yang berwarna merah cerah dan memancarkan warna oranye, sedangkan fikosianin berwarna biru dan memancarkan warna merah tua (Atmadja *et al.*, 1996).

Aktifitas antioksidan DPPH ekstrak metanol 70% *H. macroloba* cukup tinggi dengan penghambatan 57,73±3,13%. Menurut Zubia *et al*, 2007, dari beberapa jenis alga laut merah, hijau dan coklat, menunjukkan bahwa alga laut hijau tergolong tinggi, seperti pada *H. monile* dengan nilai  $EC_{50}$  6.17 mg/ml. Alga laut

merupakan sumber yang kaya berbagai antioksidan alami. yang mempunyai aktifitas sebagai penangkap elektron, Senyawa-senyawa seperti polifenol, flavonol, flavonol glukosida dan phlorotanin terdapat pada ekstrak metanol alga laut merah dan coklat. Keunikan dari molekul skeletonnya dan strukturnya mengkontribusi aktifitas antioksidan yang kuat (Zakaria *et al.*, 2011).

Jenis-jenis antioksidan yang terdapat dalam alga laut seperti polisakarida, serat kasar, mineral, protein, asam amino, vitamin, polifenol dan karotenoid (Burtin, 2003). Alga laut coklat mengandung phlorotannins yang mempunyai lebih dari 8 cincin yang saling berhubungan, karena itu mereka lebih potensial sebagai peredam radikal bebas dari pada polifenol lain dari tanaman darat (termasuk *catechin* tea hijau), yang hanya mempunyai tiga sampai empat cincin. Polifenol dapat bertindak sebagai antioksidan melalui mekanisme meredam radikal, memadam singlet oksigen dan mengkelat ion logam (Sroka and Cisowski, 2003, Mukai *et al.*, 2005). Senyawa fenolik didalam alga coklat adalah phlorotannin, merupakan senyawa utama dinding sel. Phlorotannin disekresikkan dari sel dan membentuk kompleks dengan asam alginat. Phlorotannin dibagi dalam 2 jenis yaitu : phlorotannin yang larut dari matriks sitoplasma alga laut atau sitoplasmik phlorotannin dan phlorotannin yang terikat dalam dinding sel yang menyatu pada membran sel atau dinding sel (Koivikko *et al.* (2005)

#### **5.1.4. Aktifitas Antioksidan Daya Reduksi**

Hasil Pengukuran aktifitas antioksidan daya reduksi ekstrak metanol 30, 50 dan 70% alga laut *G. salicornia*, *S. oligocystum*, *T. decurens* and *H. macroloba* dan *H. durvillae* dapat dilihat pada Tabel. 5.4. Hasil Analisis Keragaman (Lampiran 6.2), menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak metanol memberikan pengaruh yang nyata



( $p < 0,05$ ) terhadap kemampuan mereduksi pada masing-masing spesies alga laut. Kemampuan mereduksi alga laut meningkat dengan meningkatnya konsentrasi metanol, kecuali *S. oligocystum*. Kemampuan mereduksi tertinggi pada semua konsentrasi ekstrak metanol adalah *G. salicornia*. Kemampuan mereduksi suatu senyawa tergantung pada kehadiran reduktan yang mempunyai kemampuan antioksidan, melalui pemecahan rantai radikal bebas dengan mendonorkan atom hidrogen (Devi *et al.*, 2008).

**Tabel 5.4. Aktifitas Antioksidan Daya Reduksi ((g GAE/ 100 g Ekstrak)) Ekstrak Metanol 30, 50, dan 70% *G.salicornia*, *S.oligocystum*, *T.decurens*, *H. macroloba*, dan *H.durvilae* (10mg/ml). BNT=6,797 .**

Jenis Alga laut	Aktifitas Antioksidan Daya Reduksi gr GAE/100gr Ekstrak		
	Konsentrasi Metanol		
	30%	50%	70%
<i>G. salicornia</i>	19,02±2,55 <sup>ax</sup>	32,81±2,31 <sup>ay</sup>	42,95±2,24 <sup>az</sup>
<i>S. oligocystum</i>	25,42±2,43 <sup>bx</sup>	25,39±1,30 <sup>bx</sup>	25,72±2,82 <sup>bx</sup>
<i>T. decurens</i>	18,62±2,15 <sup>ax</sup>	23,88±1,90 <sup>bx</sup>	35,57±3,40 <sup>cy</sup>
<i>H. macroloba</i>	7,8±2,04 <sup>cx</sup>	11,46±2,24 <sup>cx</sup>	14,89±2,78 <sup>dy</sup>
<i>H. durvilae</i>	15,63±2,68 <sup>ax</sup>	22,55±3,12 <sup>by</sup>	38,85±2,97 <sup>cz</sup>

Semua nilai adalah rata-rata ± SD: standart deviasi (n=3).

a,b,c,d symbol yang sama pada kolom adalah non-sigifikant ( $P > 0.05$ )

x,y,z symbol yang berbeda pada baris adalah signifikan ( $P > 0.05$ )

Yuan dan Walsh (2006) melaporkan bahwa alga laut merah mempunyai kemampuan mereduksi yang lebih rendah dari alga laut coklat. Alga laut yang diperoleh dari perairan Hawaii menunjukkan bahwa alga laut coklat mempunyai aktifitas paling tinggi yaitu rata-rata nilai daya reduksi  $3,55 \pm 3,16 \mu\text{M}/\mu\text{g}$  ekstrak, diikuti oleh alga laut hijau yaitu rata-rata  $2,29 \pm 2,34 \mu\text{M}/\mu\text{g}$  ekstrak. Sedangkan alga laut merah daya reduksinya paling kecil adalah  $1,59 \pm 1,17 \mu\text{M}/\mu\text{g}$  ekstrak. Hal yang sama ditemukan di perairan Wailoko dan Taman Laut Richardson menunjukkan bahwa *Turbinaria.ornata* (alga laut coklat) mempunyai nilai daya reduksi yang paling

tinggi, diikuti *Gayralia oxysperma* dan *Chatomorpha antennima* (alga laut hijau); serta yang mempunyai aktifitas antioksidan paling rendah adalah alga laut merah *polysiphonia howei* (Kelman *et al.*, 2012). Pada penelitian ini kapasitas daya reduksi *G. salicornia* dan *H.durvilae* lebih tinggi daripada alga laut lain. Hal ini dapat disebabkan oleh faktor lingkungan terutama temperatur, sumber nutrisi dimana alga laut itu tumbuh sangat berbeda (Conan *et al.*, 2006)

*Turbinaria.decurens* mempunyai daya reduksi yang cukup tinggi dengan penghambatan  $35,57 \pm 3,40\%$ . Zhu *et al.*, (2002) melaporkan bahwa ekstrak air *T.conoides* mempunyai aktifitas antioksidan yang luas melalui sistim transfer elektron tunggal dan transfer atom hidrogen serta menunjukkan daya reduksi yang tinggi dengan kemampuan mendonasi elektron, lagi pula mempunyai kemampuan yang tinggi mendonasi atom hidrogen pada DPPH. Karena itu senyawa aktif didalam ekstrak air *T.conoides* dapat bertindak sebagai antioksidan primer dan antioksidan sekunder (Prior *et al.*, 2005).

#### **5.1.5. Aktifitas Antioksidan Pengkelat Ion**

Data hasil pengukuran aktifitas antioksidan Pengkelat Ion *G.salicornia*, *S. oligocystum*, *T decurens* and *H. macroloba* dan *H.durvilae* disajikan pada Tabel 5.5. Hasil Analisis Keragaman (Lampiran 6.2) menunjukkan bahwa konsentrasi metanol memberikan pengaruh ( $p < 0,05$ ) terhadap kapasitas pengkelat ion pada masing-masing alga laut. Kemampuan mengkelat ion alga laut merah *G. salicornia* dan *H.durvilae* meningkat dengan meningkatnya konsentrasi metanol, sedangkan alga laut coklat dan hijau *S. oligocystum*, *T. decurens* dan *H. macroloba* kemampuan mengkelat ion menurun dengan meningkatnya konsentrasi metanol. Hal ini mungkin disebabkan senyawa pengkelat ion alga laut ini mengandung vitamin C dan GSH

yang merupakan antioksidan yang labil, dimana pada konsentrasi metanol yang lebih tinggi antioksidan ini akan rusak. Sifat pengkelat ion senyawa rumput dapat berfungsi untuk mengobati penyakit kanker.

**Tabel 5.5 Aktifitas antioksidan pengkelat ion (%) ekstrak metanol 30, 50 dan 70% *G. salicornia*, *S. oligocystum*, *T. decurens*, *H. macroloba* dan *H.durvilae*. (10 mg/ml) BNT=7,372.**

Jenis alga laut	Aktifitas antioksidan pengkelat Ion (%)		
	Konsentrasi Metanol		
	30%	50%	70%
<i>G. salicornia</i>	17,50±3,10 <sup>ax</sup>	15,83±1,35 <sup>ay</sup>	54,07±3,01 <sup>az</sup>
<i>S.oligocystum</i>	76,14±3,36 <sup>bx</sup>	71,80±0,50 <sup>by</sup>	17,50±2,59 <sup>bz</sup>
<i>T.decurens</i>	86,18±0,50 <sup>cx</sup>	70,57±5,01 <sup>by</sup>	62,98±4,45 <sup>cz</sup>
<i>H.macroloba</i>	72,24±1,53 <sup>bx</sup>	70,01±1,50 <sup>by</sup>	2,89±1,02 <sup>dz</sup>
<i>H.durvilae</i>	7,91±2,27 <sup>dx</sup>	12,79±0,94 <sup>ay</sup>	67,82±3,82 <sup>cx</sup>

Semua nilai adalah rata-rata ± SD: standart deviasi.

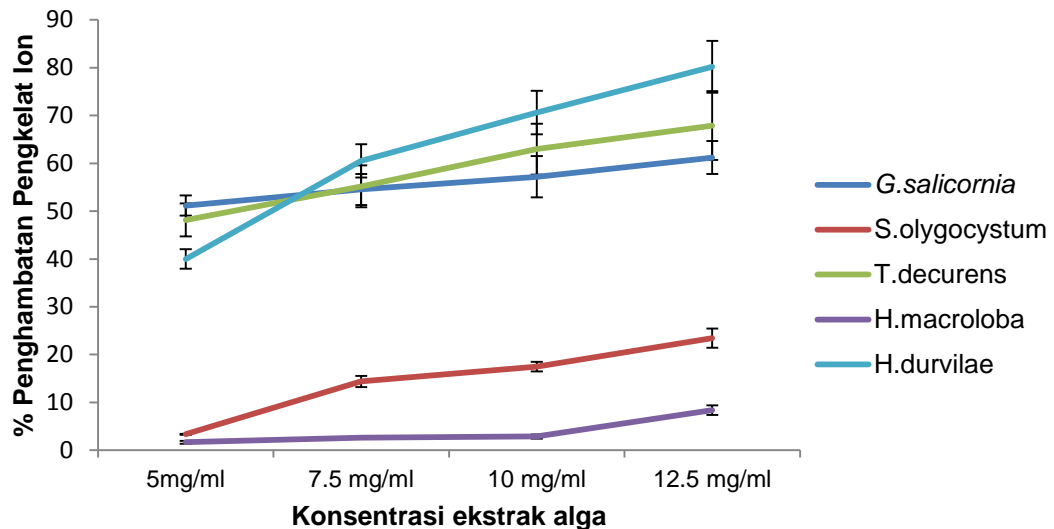
a,b,c,d symbol yang sama pada kolom adalah non-sigifikant ( $P>0.05$ )

x,y,z symbol yang berbeda pada baris adalah signifikan ( $P>0.05$ )

Pada konsentrasi ekstrak metanol 30% *S. Oligocystum* mempunyai aktifitas pengkelat ion yang paling tinggi. Patra *et al.*, (2008) melaporkan bahwa penelitian yang dilakukan pada ekstrak berair *Sargassum sp.* dengan konsentrasi 800 µg/ml signifikan menghambat peroksidasi lipida pada mitokondria dan mikrosom. Peroksidasi membran lipida oleh SOR atau faktor lain mempengaruhi struktur dan fungsi dari sel. Induksi peroksidasi lipida oleh besi in-vivo dan in-vitro, dapat bereaksi dengan reaktan lain melalui abstraksi hidrogen, tambahan hidrogen atau transfer elektron. Kapasitas mengikat logam *dietary fiber* (karagenan, agar dan alginate) melalui penghambatan absorpsi ferro (Wang *et al.*, 2009)

Aktifitas antioksidan pengkelat ion ekstrak metanol 70% alga laut *G. salicornia*, *S. oligocystum*, *T. decurens* and *H. macroloba* dan *H.durvilae* yang diuji pada konsentrasi 5,0-12.5 mg/ml (Gambar 5.1) menunjukkan bahwa makin

meningkatnya konsentrasi ekstrak makin meningkat pula aktifitas antioksidannya *Gracilaria salicornia* dan *T.decurens*, pada konsentrasi ekstrak 10 mg/ml rata-rata mencapai penghambatan 50%, dan mengalami peningkatan sampai 67% pada konsentrasi ekstrak 12.5 mg/ml.



**Gambar 5.1. Aktifitas Antioksidan Pengkelat Ion Ekstrak Metanol 70% *G.salicornia*, *S.olygocystum*, *T.decurens*, *H.macroloba* dan *H.durvilae*.**

Besi diketahui menghasilkan radikal bebas melalui reaksi Fenton & Haber-Weiss. Kemampuan mengkelat ion logam dari sebuah molekul antoksidan yaitu mencegah pembentukan radikal yang mengakibatkan terjadi kerusakan oksidatif. Kapasitas mengkelat ion logam berperan secara nyata didalam mekanisme proses antioksidan, karena dapat mereduksi pembentukan logam transisi didalam lipoperoksidasi (Patra *et al.*,2008). Terapi mengkelat telah lama digunakan untuk mereduksi beban toksik logam pada tubuh. Senyawa pengkelat mengikat logam kemudian dikeluarkan menjadi urin. Sebuah pengkelat logam membentuk kompleks dengan logam yang melindungi target logam dalam sistim biologi (Swaran, 2012).

Protein pengikat logam, termasuk metalothionein adalah potensial untuk mengkelat logam berat dan adalah pusat respon alamiah tubuh pada toksik logam. GSH adalah gelator lain yang potensial meliputi respon selular, transport dan ekskresi kation logam serta sebuah *biomarker* untuk toksik yang berlebihan (Sears, 2013).

#### 5.1.6. Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi metanol 30, 50 dan 70% memberikan pengaruh yang nyata ( $P < 0.05$ ) terhadap kadar total fenol dan aktifitas antioksidan. Kadar total fenol meningkat dengan meningkatnya konsentrasi metanol, demikian pula aktifitas antioksidan DPPH dan FRAP meningkat dengan meningkatkan konsentrasi fenol. Dari penelitian ini dapat dilihat bahwa meningkatnya kadar total fenol, rata-rata aktifitas antioksidan DPPH meningkat pula. Menurut Kumar *et al.* 2008, aktifitas antioksidan alga laut paling banyak dihubungkan dengan kandungan senyawa fenoliknya, ditemukan terdapat hubungan yang tinggi antara aktifitas penghambatan radikal bebas DPPH dengan kandungan total poliphenol dengan  $r = 0,971$ . Menurut Chew *et al.*, 2008 pengaruh penghambatan fenol tanaman, seperti asam tanat, asam elaginat, asam firulat, asam kafeat, silibin, quercetin, kurkumin, dan klorogenat melawan aktifitas enzim GST. Senyawa fenolik seperti asam tanat potensial mengikat protein, termasuk enzim GST melalui pembentukan ikatan hidrogen yang menyebabkan *hindrance steric* yang dapat mengakibatkan inaktivasi enzim.

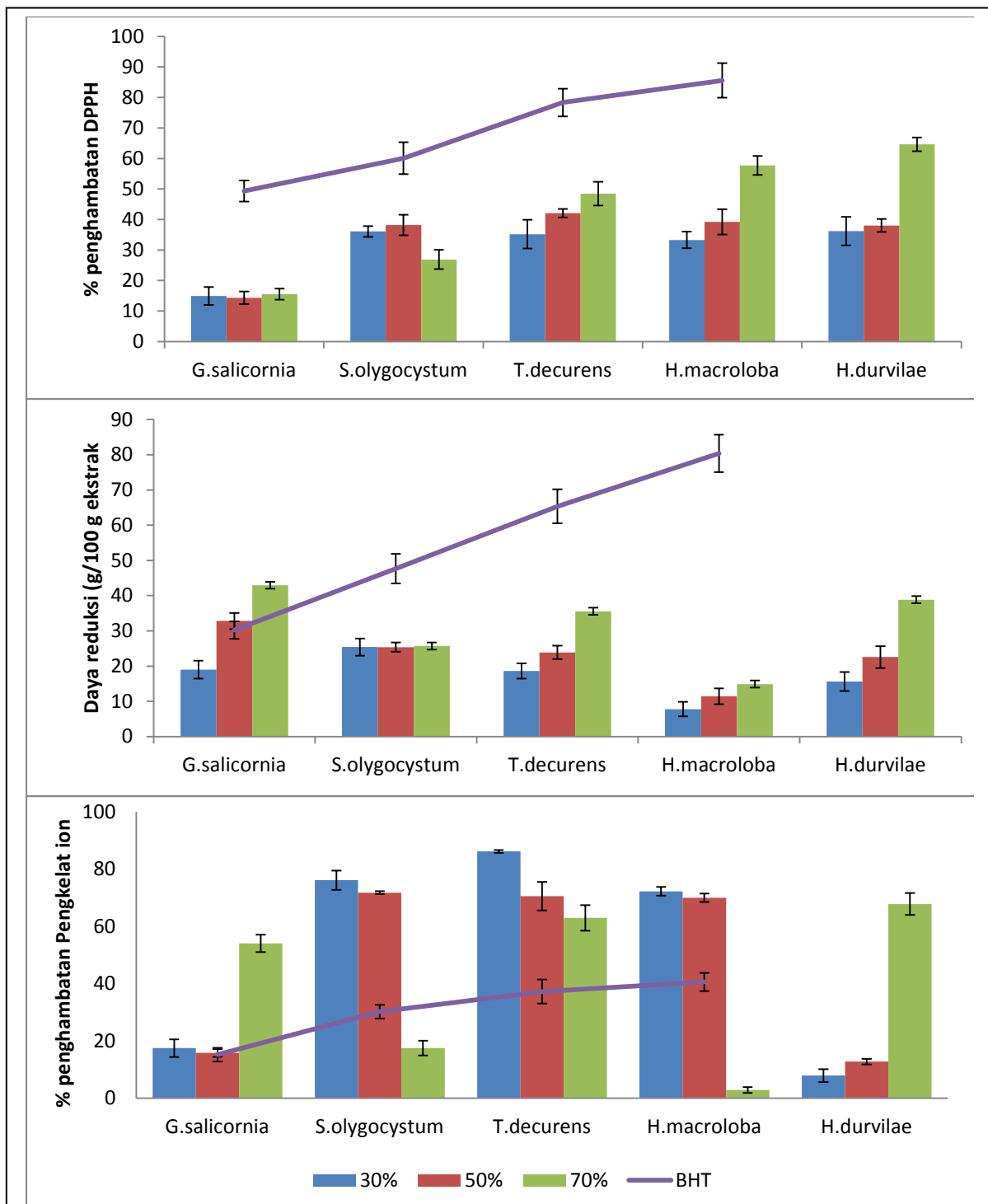
Pada penelitian ini aktifitas antioksidan tertinggi DPPH terdapat pada *H. durvillae* sejalan dengan kandungan fenolnya yang tertinggi pada konsentrasi ekstrak metanol 70%. Menurut Rastian *et al.*, 2007, ekstrak heksana, kloroform dan 70% metanol *Cystoseira myrica* setelah dianalisa aktifitas antoksidan menggunakan daya reduksi dan kadar total fenol dengan Folin Ciocalteu menunjukkan rata-rata

pada ekstrak 70% metanol-air menunjukkan paling aktif dengan daya reduksi  $50,95 \pm 4,33$  mmol Fe II/100 g alga laut kering dan kadar total fenol 10,08 mg GAE/100 g alga laut kering. *H.durvilae* merupakan jenis alga laut merah yang mengandung pigmen yang tinggi dan mempunyai kandungan polisakarida yang tinggi. Komponen seperti polisakarida dengan berat molekul rendah, pigmen, protein atau polipeptida juga mempengaruhi aktifitas antioksidan (Kumar *et al.*, 2008).

Aktifitas antioksidan daya reduksi menunjukkan bahwa alga laut merah *G. salicornia* dan *H.durvilae* mempunyai kemampuan yang paling tinggi, sedangkan yang paling rendah adalah alga laut coklat. Devi *et al.*, (2008) melaporkan bahwa alga laut merah *G. aserosa* secara signifikan mempunyai kemampuan mereduksi dan sebagai sumber antioksidan yang baik. (Matanjun, 2008).

Aktifitas antioksidan DPPH, daya reduksi dan pengkelat ion alga laut *G. salicornia*, *S. oligocystum*, *T. decurens*, *H. macroloba* dan *H. durvilae* dibandingkan dengan kontrol positif BHT (Gambar 5.2) menunjukkan bahwa, aktifitas antioksidan BHT masih lebih tinggi. Walaupun demikian banyak senyawa hasil isolasi alga laut ditemukan mempunyai aktifitas biofungsional walaupun DPPH rendah, hal ini menunjukkan bahwa aktifitas biofungsionalnya adalah antioksidan enzimatik. Semua organisme hidup mengandung sistim kompleks antioksidan enzim, seperti sistim thioredoxin yang dibutuhkan untuk hidup. Antioksidan didalam sistim biologi mempunyai fungsi ganda, termasuk pertahanan melawan kerusakan oksidatif dan berperan didalam jalur signal utama sel. Peran utama antioksidan dalam sel adalah untuk mencegah kerusakan disebabkan oleh spesies oksigen reaktif (Devi *et al.*, 2011).

*Sargassum .polycystum* mempunyai beberapa senyawa aktif yang menghambat pembentukan radikal bebas selama peroksidasi lipida pada



**Gambar 5.2. Perbandingan Aktifitas Antioksidan DPPH, Daya Reduksi dan Pengkelat Ion Ekstrak Metanol 30, 50 dan 70% *G. salicornia*, *S. olygocystum*, *T. decurens* and *H. macroloba* dan *H. durvilae* (10 mg/g) dengan BHT (50, 100, 150, 200  $\mu$ g/ml).**

acetaminophen hepatitis. *S.polycystum* menurunkan peroksidasi lipida dan ditandai juga oleh peningkatan aktifitas SOD dan CAT, peningkatan radikal hidroksil selama induksi hepatitis ditangkap oleh dismutasi melalui penangkap radikal senyawa sulfat yang ada dalam *S. polycystum* (Rahendra *et al.*, 2005).

Alga laut merah *G.Salicornia* dan *H. durvillae* pada konsentrasi metanol 70% berdasarkan penelitian ini memiliki aktifitas antioksidan daya reduksi yang paling tinggi dibandingkan dengan alga laut lain. Menurut Nazir *et al.*, 2011, Hasil elusidasi struktur senyawa fraksi etil asetat *G.salicornia* terutama mengandung kolesterosterol, demosterol, 22-dehidrokolesterol dehidrokolesterol, asam oleat dan stigmasterol. Asam oleat adalah asam lemak tidak jenuh tunggal yang ditemukan di alam yang dikenal sebagai asam lemak omega-9, merupakan sumber lemak yang paling sehat, merendahkan resiko penyakit jantung koroner. Asam oleat juga mempunyai pengaruh perlindungan melawan kardiovaskular, komplikasi diabetes karena kadar glutathion, total lipida dan trigliserida menguntungkan dipengaruhi, menurunkan aktifitas faktor jaringan didalam penderita diabetes-hiperglicemik dapat melindungi jaringan dari resiko thrombosis (Deveri *et al.*, 2001). Alga laut merah sebagai zat *chemopreventif* melawan kanker payudara (Aceves *et al*, 2005). *Oxygenated desmosterols* yang diisolasi dari alga laut merah *Galaxaura marginata* dan *G. oblongata* mempunyai aktifitas sitotoksik untuk beberapa tipe sel kanker (Huang *et al*, 2005).

Aktifitas antioksidan pengkelat ion *T.declarens* pada peneltian ini menunjukkan yang paling tinggi pada konsentrasi metanol 30%. Alga laut coklat *Turbinaria sp.* ditemukan mempunyai aktifitas antioksidan dan antiperadangan. Spesies ini dicatat mempunyai senyawa nutrisi yang esensial yaitu garam mineral (K, Ca dan Fe), serat larut, protein yang dapat dicerna dan sedikit PUFA (Chakraborty,



2013). Bioaktif protein pada tingkat jenuh ammonium sulfat alga laut coklat *T.decurens* menunjukkan aktifitas yang kuat dengan daerah penghambatan untuk *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypi* masing-masing 18,33 mm dan 13,30 mm (Dali *et al.*, 2013).

*Sargassum oligocystum* mempunyai aktifitas daya reduksi yang cukup tinggi yang telah terbukti dengan banyak laporan penelitian menunjukkan banyak fungsi biologis. Lim *et al.*, 2002, melaporkan bahwa ekstrak *S. siliquastrum* tidak hanya menunjukkan aktifitas peredam radikal tetapi juga menghambat haemolisis sel darah merah, menekan peroksidasi, meredam radikal superoksida. Raghendran *et al.*, 2006 melaporkan bahwa *S. polycystum* mengandung beberapa zat *antiulcer* yang dapat mengatur volume/ keasaman cairan gastrik dan memperbaiki sistim pertahanan antioksidan mukosa gastrik. Banyak spesies rumput mengandung poliphloroglucinol fenolik (phlorotannin) (Mantanjun *et al.*, 2008). Phlorotannin adalah senyawa fenolik utama yang terdapat dalam alga laut coklat. Phlorotannin adalah kelompok molekul yang heterogen yang aktifitas biologinya mempunyai kisaran yang sangat luas (Liao *et al.*, 2008).

*Halimeda macroloba* mempunyai aktifitas antioksidan DPPH pengkelat ion yang tinggi. Menurut Gamal, 2010, beberapa spesies alga laut hijau *Halimeda* mengandung senyawa halimedatrial (diterepene trialdehyde) dan halimedalactone yang berfungsi sebagai antimikroba dan sitotoksik. Jimenez *et al.*, 2012 melaporkan bahwa alga hijau juga mempunyai senyawa sesquiterpen yang aktif melawan mikroorgaisme patogen manusia.

Beberapa spesies alga laut ditemukan memproduksi metabolik sekunder dengan aktifitas antitumor (blund, *et al.*, 2006). *Sargassum stenophyllum*, *Capsosiphon fulvescens* menghambat migrasi dan viabilitas cell melanoma manusia

in-vitro dan in-vivo (Dias et al. 2005) dan rata-rata menginduksi apoptosis pada sel gastrik manusia.

Monogalaktosil diasilgliserol yang diisolasi dari *S. thunbergii* mempunyai aktifitas DPPH yang tinggi (Kim et al., 2007, Gamal, 2010). Fucans dengan berat molekul rendah yang diekstraksi dari *Ascophillum nodosum* menunjukkan aktifitas antiproliferatif melawan *adenocarcinoma colon* manusia (Ellouali et al, 1993) dan *cell line carcinoma bronchopulmonary* (Riou et al, 1996).

Jimenez et al., (2011), melaporkan bahwa aktifitas antivirus, antihelmitik, antijamur, antibakteri terdeteksi dalam alga laut hijau, coklat dan merah. Ekstrak kasar organik dari alga laut merah menunjukkan aktifitas antiprotozoa dan antimicobacterium, fraksi yang lain mengandung sesquiterpen yang aktif melawan bakteri pathogen manusia.

#### **5.1.5. Kesimpulan**

- Berdasarkan hasil ekstraksi dengan metanol 30, 50 dan 70% pada alga laut *G. salicornia*, *S. oligocystum*, *T. decurens* and *H. macroloba* dan *H.durvilae* menunjukkan bahwa *H.durvilae* mempunyai hasil ekstraksi tertinggi.
- Ekstrak metanol 70% *H.durvilae* berdasarkan hasil analisis menunjukkan Kadar Total Fenol dan aktifitas antioksidan DPPH tertinggi.
- *G. salicornia* mempunyai aktifitas Daya Reduksi tertinggi pada ekstrak metanol 70%, tetapi tidak berbeda nyata ( $p>0.05$ ) dengan *H.durvilae*.
- *S.oligocystum*, *T.decurens* dan *H.macroloba* mempunyai aktifitas pengkelat ion tertinggi pada konsentrasi ekstrak metanol 30%.
- Berdasarkan hal-hal diatas maka fraksinasi akan dilakukan pada *H.durvilae* dengan proses ekstraksi menggunakan metanol 70% dengan alasan bahwa

disamping mempunyai rendemen, kadar total fenol, DPPH, dan daya reduksi yang tinggi, *H.durvilae* ini belum pernah diteliti kandungan senyawa antioksidan.

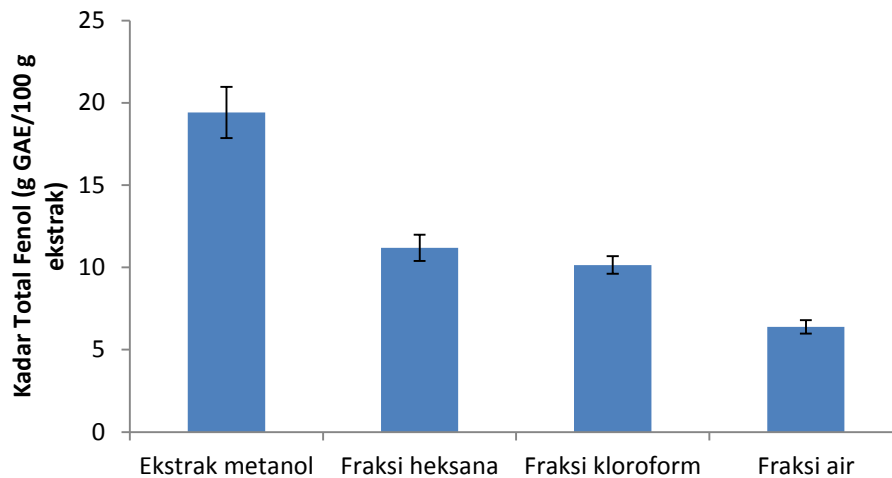
## **5.2. Tahap II. Fraksinasi Ekstrak Metanol 70% Alga laut *Halimena durvilae* dengan *n*-Heksana, Kloroform, Air dan Mengukur Aktifitas Antioksidan.**

### **5.2.1. Rendemen Fraksinasi**

Rendemen fraksinasi ekstrak metanol 70% *H.durvilae* menunjukkan bahwa fraksi heksana mempunyai rendemen tertinggi, yaitu sebesar  $46,91 \pm 4,56\%$  diikuti fraksi kloroform dan air yaitu masing-masing sebesar  $34,10 \pm 3,18$  dan  $23,95 \pm 3,13\%$ . Hal ini menunjukkan bahwa pada alga laut *H. durvilae* paling banyak mengandung senyawa tidak saja yang bersifat non-polar. Hal ini sejalan dengan hasil fraksinasi *T.conoides*, *P.tetrastomata* dan *S.magninatum*, bahwa fraksi non polar mempunyai hasil tertinggi, dengan hasil ekstraksi sebagai berikut: petroleum 28,40%, etil asetat 27,54 % dan fraksi air 30,27%. Variasi dalam hasil ekstraksi menunjukkan bahwa polaritas senyawa bioaktif berbeda.

### **5.2.2. Kadar Total Fenol**

Kadar total fenol hasil frasinasi ekstrak metanol 70% *H. Durvilae* menunjukkan bahwa fraksi heksana mempunyai kadar total fenol tertinggi yaitu sebesar  $11,19 \pm 0,80$  g GAE/100 ekstrak, sedangkan yang terendah pada Fraksi air  $6,39 \pm 0,40$  g GAE/100 g ekstrak (Gambar 5.3). Senyawa fenolik yang ditemukan dalam alga laut laut mempunyai aktifitas antioksidan yang kuat (Jimenez-Escrig *et al*,. 2001). Menurut Ragan *et al*, 1986, beberapa senyawa antioksidan memiliki kemampuan detoksifikasi karena kemampuannya mengkelat ion. Saat ini ditemukan berbagai aktifitas biologi seperti anti kanker dan antiproliferatif didalam senyawa fenolik.



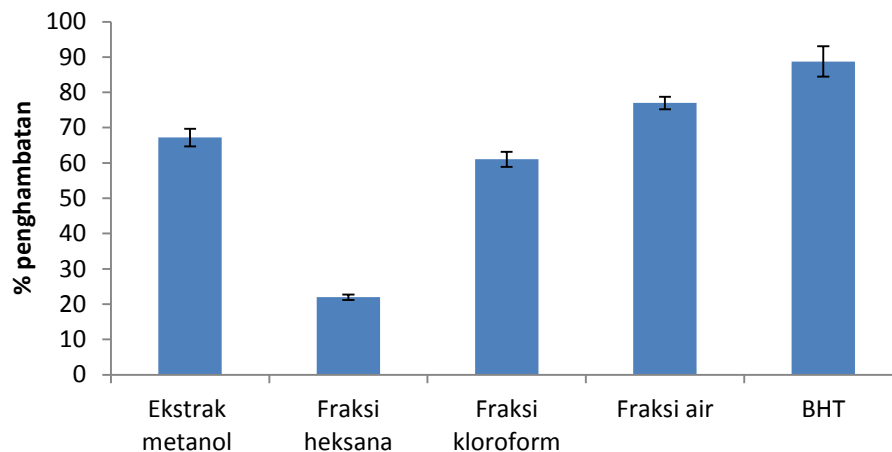
**Gambar 5.3 Kadar Total Fenol *H. durvillae*.**

Saat ini ditemukan berbagai aktifitas biologi seperti anti kanker dan antiproliferatif terdapat didalam senyawa fenolik. Senyawa fenolik penting dalam mekanisme pertahanan melawan invasi bakteri dan jenis-jenis lain stres lingkungan seperti luka/peradangan, sinar yang kuat dan radiasi ultra violet. Aktifitasnya tergantung pada aktifitas mengkelat logam dari senyawa senyawa fenolik. Sebagai contoh flavonoid mempunyai kemampuan mengkelat logam berhubungan dengan penghambatan kanker dan peradangan (Wang, 2008).

Fenol adalah suatu molekul yang banyak jenisnya. Cincin benzena dengan sebuah hidroksil adalah sisi yang bersifat antioksidan. Paling sedikit ada sejuta senyawa fenolik yang belum ditemukan. Tetapi ada beberapa senyawa fenolik yang telah diidentifikasi dan dipelajari secara lengkap, termasuk flavonon, flavonol *anthocyanin*, tannin dan sebagainya. Selain itu fenolik dari alga laut coklat *Ascophyllum nodosum* mempunyai aktifitas biologi dapat mengikat protein dan dapat menghambat aktifitas enzim tanin. Lagi pula sejumlah laporan tentang ekstrak fenolik alga laut menunjukkan menghambat aktifitas  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase (Zhang *et al*, 2007; Otha, 2002).

### 5.2.3. Aktifitas Antioksidan DPPH

Hasil perhitungan aktifitas antioksidan hasil fraksinasi ekstrak metanol 70% *H.durvilae* (Gambar 5.4) menunjukkan bahwa aktifitas antioksidan DPPH tertinggi adalah fraksi air ( $76,99\pm 1,80\%$ ), kemudian diikuti oleh fraksi kloroform ( $61,07\pm 2,13\%$ ) dan fraksi heksana ( $21,99\pm 0,77\%$ ).



**Gambar 5.4. Aktifitas Antioksidan DPPH *H. durvilae***

Hal ini sejalan dengan yang dilaporkan oleh Yasbi *et al.*, 2008, bahwa aktifitas antioksidan menggunakan pelarut dichlorometana (DCM), metanol, etil asetat dan air dari alga laut *H. flagelliformis*, *C.myrisca* dan *S. boveanum* menunjukkan bahwa ekstrak air potensial sangat tinggi. Koefisien korelasi ( $R^2$ ) dari total fenol dan  $IC_{50}$  megindikasikan bahwa aktifitas antioksidan dari fraksi tidak dipengaruhi oleh kadar total fenol. Aktifitas antioksidannya mungkin juga karena kehadiran senyawa-senyawa lain seperti protein atau peptida, asam askorbat, polisakarida dengan berat molekul rendah, *fucoidan*, reaksi Maillard dan *micosporin* asam amino (Kuda *et al.*, 2005, 2006; Kuda and Ikemori, 2009; Wang *et al.*, 2009; Zubia *et al.*, 2008).

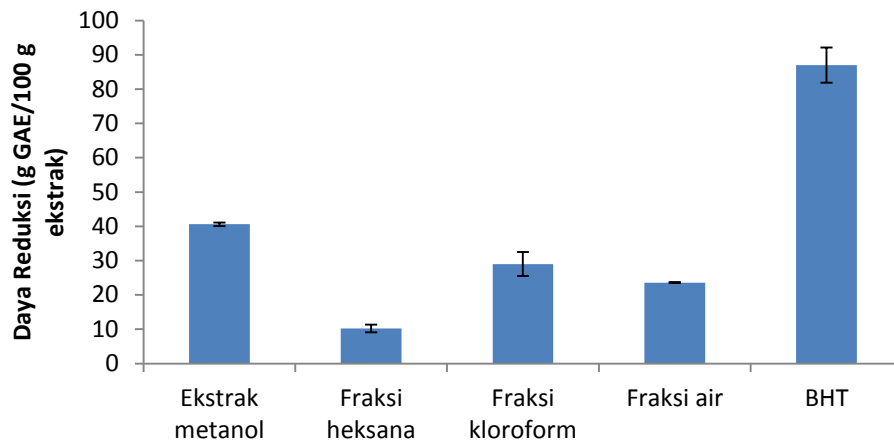
Aktifitas antiosidan yang lebih tinggi dari fraksi mungkin karena intervensi senyawa lain didalam ekstrak kasar metanol, dilaporkan juga bahwa pelarut yang digunakan untuk ekstraksi sangat mempengaruhi pada jenis senyawa kimia. Beberapa senyawa aktif utama alga laut coklat adalah phlorotannin dan fukosantin. Aktifitas antioksidan bukan disebabkan oleh sifat pigmennya (Yuan *et al.*, 2005).

Yuan *et al.*, 2005b melaporkan bahwa fraksi heksana, kloroform dan ekstrak metanol *Porphyra yezoensis* menunjukkan aktifitas antioksidan dengan kehadiran  $\beta$ -karoten, khlorofil analog (pheophytin) dan senyawa amin (leusin, phenilalanin dan asam amino seperti mycosporine dan usujiren). Laporan lain mengklam bahwa alga laut mengandung senyawa antioksidan yang merupakan beberapa pigmen seperti fukosantin dan astaxantin, polifenol seperti phlorotannin, khlorofil, fosfolipid, flavonoid, bromfenol dan polisakarida.

#### **5.2.4. Aktifitas antioksidan daya reduksi**

Hasil perhitungan daya reduksi hasil fraksinasi ekstrak metanol 70% *H.durvilae* (Gambar 5.5), menunjukkan bahwa daya reduksi ferrous dari fraksi kloroform menunjukkan aktifitas yang paling kuat diikuti oleh fraksi air dan fraksi heksana dengan nilai berturut-turut  $29,00 \pm 3,51$ ,  $23,587 \pm 0,17$ , dan  $10,206 \pm 1,14$  g/100 ekstrak.

Aktifitas antioksidan daya reduksi *S. swartzii* dan *Cystoseira myrica* pada fraksi metanol yaitu  $73,92 \pm 12,36$  dan  $50,95 \pm 4,33$  mmol  $Fe^{II}$ /100 g ekstrak kering pada konsentrasi 10 ppm mempunyai aktifitas yang paling tinggi dibandingkan dengan fraksi heksana, etil asetat dan kloroform, yang sejalan dengan kadar total fenol tertinggi yaitu sebesar  $12,00 \pm 0,55$  dan  $10,08 \pm 1,13$  (g asam galat/100 g ekstrak) (Sadati *et al.*, 2011).



**Gambar 5.5. Aktifitas Antioksidan Daya Reduksi *H.durvillae***

Zhu *et al.*, 2002, melaporkan bahwa paling banyak aktivitas antioksidan non enzimatis seperti penangkap radikal bebas, penghambatan peroksidasi dimediasi oleh reaksi redoks. Senyawa-senyawa yang mempunyai daya reduksi mengindikasikan bahwa mereka adalah donor elektron dan dapat mereduksi intermediat teroksidasi dari proses peroksidasi lipida, karena itu mereka dapat berfungsi sebagai antioksidan primer dan antioksidan sekunder.

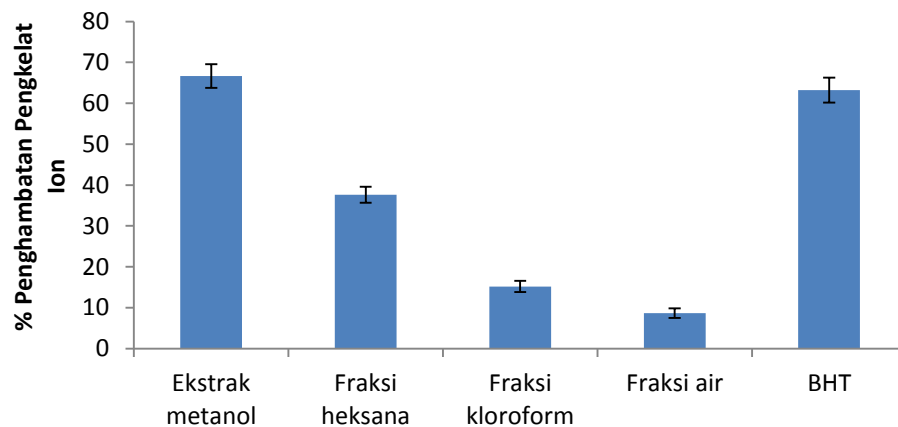
Didalam alga laut khlorofil terutama khlorofil a dan senyawa yang berhubungan dengan cincin *porphyrin* menunjukkan beberapa aktifitas antioksidan. Khlorofil a berperan meredam radikal peroksil, Bereaksi dengan vitamin E dan mempertegas aktifitas antioksidan  $\alpha$ -tokoferol. Karoten dan xantofil memadamkan radikal. mengeksitasi molekul *sensitized* dan singlet oksigen dan dapat bereaksi didalam kondisi dimana oksigen singlet tidak dibentuk (Sanaa dan Shanab, 2007).

*Gracilaria changgi* mengandung mineral, dan senyawa antioksidan seperti, vitamin A, C,  $\beta$ -karoten, asam lemak dan asam amino. aktifitas Vitamin A sebesar 865  $\mu$ g retinol equivalen/100 g sampel. Kandungan asam lemak tak jenuh sebesar 74% terutama asam lemak omega dan 26% asam lemak jenuh (terutama asam

palmitat) serta kandungan kalsium dan besi yang tinggi. Asam amino utama adalah argini, alanin dan asam glutamat ( Norziah dan Ching, 2000)

### 5.2.5. Aktifitas Antioksidan Pengkelat ion

Perhitungan Aktifitas antioksidan pengkelat ion hasil fraksinasi ekstrak metanol 70% *H.durvilae* dapat dilihat pada Lampran 2 . Fraksi heksana mempunyai aktifitas pengkelat ion yang paling tinggi, kemudian diikuti fraksi kloroform dan fraksi air yaitu masing-masing sebesar (Gambar 5.6)



**Gambar 5.6. Aktifitas Antioksidan Pengkelat Ion *H. durvilae***

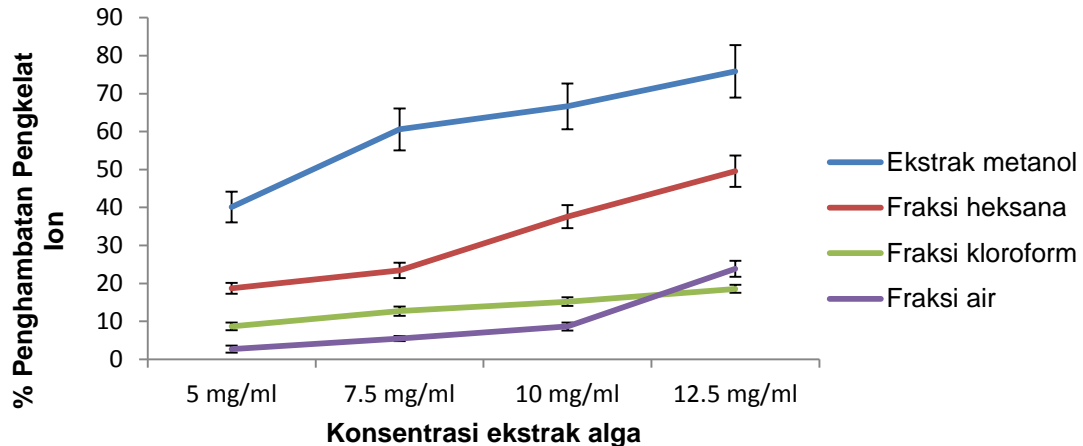
Kuda *et al.*, (2008) melaporkan bahwa kapasitas mengkelat ion logam senyawa fenolik terutama tergantung pada keberadaan gugus fungsional dan tidak dapat lebih lama mengikat logam ketika group fenolik berkonyugasi dengan golongan karbohidrat karena terjadi ikatan fenolik glikosida. Logam transisi, seperti besi membantu peroksida anion (O<sup>-</sup>) (Fenton reaksi) dan hidrogen peroksida mengkonversi menjadi radikal hidroksil (OH) yang reaktif ekstrim (Haber-Weiss) yang menyebabkan kerusakan berat pada membran-membran protein dan DNA. Mereka juga mendekomposisi peroksida lemak menjadi radikal peroksil dan radikal



alkoksil serta meningkatkan peroksidasi lemak. Didalam proses yang panjang dapat mengakibatkan kematian selular seperti pada karsinogenik dan mutagenik.

Allophycocyanin (APC) yang terdapat dalam *phycobilisome* pada alga laut merah adalah biliprotein dengan dua sub unit yang berbeda  $\alpha$ - dan  $\beta$ , tiap sub unit mempunyai satu *phycobilin*. Biliprotein sebagai biaktif protein yang berperan memadamkan radikal peroksil yang terutama sebagai antitumor (Chen *et al.*, 2011).

Gambar 5.7 menunjukkan bahwa makin meningkatnya konsentrasi ekstrak (5-12.5 mg/mL), aktifitas pengkelat ion makin tinggi. Aktifitas pengkelat ion pada fraksi metanol adalah  $IC_{50}$  7,29  $\pm$ 0,21 mg/mL. Sebuah ekstrak dengan kemampuan mengkelat yang lebih tinggi mungkin tidak hanya menghambat reaksi oksidatif logam tetapi juga dapat menjadi penyerang penyakit yang dimediasi oleh spesies oksigen reaktif.



**Gambar 5.7** Aktifitas Antioksidan pengkelat ion beberapa konsentrasi *H. durvillae*.

*Dietary fiber* digunakan sebagai terapi mengkelat ion dengan tujuan menghalangi resirkulasi enterohepatik. Dan memodulasi floraintestinal dan

mereduksi merkuri didalam otak dan darah. Polimer alam lain sebagai adsorben logam berat seperti alginat polisakarida (Searsh, 2013)

Senyawa aktif yang terdapat dalam polisakarida alga terutama polisakarida sulfat. Paling banyak penelitian melaporkan bahwa polisakarida sulfat dapat meperkuat respons imun alamiah melalui promosi aktifitas tumorsidal *macrophage* dan sel pembunuh alamiah. Sel-sel antigen bermigrasi kedalam dan keluar jaringan tumor ke antigen tumor sel T-herpel, sama seperti memproduksi *cytokine* seperti interleukin-1-beta dan TNF-alfa yang menstimulasi T-helper sel. Sebagai akibat T-helper sel mempromosikan aktifitas sitotoksik T-sel, yang mempunyai pengaruh sitotoksik yang kuat pada sel tumor (Yim *et al.*, 2005, Zhou *et al.*, 2005). Ekstrak alkohol alga merah *Acanthophora spicifera* menghambat aktifitas tumor pada sel *Ehlich carcinoma* yang dikembangkan pada tikus dengan doses 20 mg/kg, dapat menurunkan volume dan jumlah sel aktif, menghambat pembentukan vakuola. *Palmaria palmate* efektif mempunyai aktifitas antioksidan yang mampu menghambat proliferasi sel kanker. ekstrak alkohol *Gracilaria foliifera* menunjukkan aktifitas sitotoksik. (Boopathy and K. Kathiresan, 2010).

### 5.2.6 Pembahasan

Aktifitas antioksidan DPPH ekstrak metanol *H.durvilae* tertinggi terdapat pada fraksi air. Demikian juga yang ditemukan pada *K.alvarezi* dimana aktifitas antioksidan ekstrak air lebih tinggi dari ekstrak etanol (Fayaz *et al.*, 2005 dan Kumar *et al.*, 2008). *T. conoides* dengan pelarut air dapat mengurangi radikal bebas, sebagai peredam radikal atau melalui donasi sebuah atom hidrogen pada molekul (Molyneux, 2004).

Aktiitas antioksidan ekstrak air yang tinggi ditemukan karena senyawa polifenol yang berbeda (Boonchum *et al.*, 2011). Banyak senyawa hidrofilik yang

terdapat dalam alga laut seperti epigallokatekin gallat (Santoso *et al.*, 2004), epikatekin (Takeshi *et al.*, 2005) dan phlorotannin yang merupakan senyawa antioksidan yang kuat. Aktifitas antioksidan ekstrak air bukan hanya hasil senyawa fenolik, tetapi juga disebabkan oleh senyawa hidrofilik lain, seperti peptida, *fucoidan* dan produk reaksi Mailard (Kuda dan Ikemori, 2009).

Kadar total fenol hasil fraksinasi ekstrak metanol 70% *H.durvilae* tertinggi pada fraksi heksana tetapi nilai DPPH rendah. Senyawa Hidrofobik fenolik didalam alga laut tidak mengandung antioksidan yang potensial. Fenomena ini dapat diterangkan melalui observasi bahwa ekstrak etanol *H.macroloba*, yang mengandung kadar fenolik yang tinggi tetapi memiliki aktifitas antioksidan yang sangat rendah. *T.conoides* menunjukkan aktifitas anti-peroksidasi lipida, yang tidak ada hubungan dengan kadar total fenolnya. Tetapi aktifitas antiperoksidasi lipida berlangsung pada kondisi hidrofobik. Senyawa aktif ekstrak air adalah molekul yang tinggi polaritasnya dan tidak bereaksi baik dengan non polar atau polaritas rendah molekul radikal bebas didalam jalur peroksidasi lipida. Yang menarik dari ekstrak air adalah lebih potensial dari ekstrak etanol karena ekstrak air bersifat non-toksik, mudah menggunakannya, dapat dikerjakan oleh semua orang dan produksi komersial (Matu dan Stade, 2003).

Semua ekstrak hasil fraksinasi *H. durvilae* mempunyai aktifitas yang lebih tinggi daripada kontrol negatif tetapi aktifitasnya lebih rendah dari BHT. Aktifitas antioksidan tidak hanya diukur dengan aktifitas non-enzimik, karena banyak jenis alga laut ditemukan memiliki aktifitas enzimatik mempunyai sifat biofungsional. Senyawa vidalol adalah golongan bromefenol yang diisolasi dari alga laut merah *Vidalia obtusaloba* mempunyai aktifitas antiperadangan melalui penghambatan enzim fosfolipase. *Venustatriol*, *thyrsiferol* dan *thyrsiferil* asetat diisolasi dari alga

merah *Laurencia venusta* menunjukkan aktifitas antivirus melawan virus *vesicular stomatitis* (VSH) dan virus *Herps simplex type 1* (HSV-1). Sumber *sulfo quinivosyldiacyl glycerol* pada *Caulerpa* sebagai antivirus melawan virus *Herpes simplex 2* (Wang *et al.*, 2007).

Lee dan Sung (2003), melaporkan bahwa antioksidan alga laut mempunyai mekanisme dalam penghambatan kanker kandung. Melalui konsumsi kelp alga laut dapat memicu peningkatan aktifitas enzim antioksidan dan mengurangi peroksidasi lipida pada hati tikus. Pengaruh antioksidan atau antimutagenik serat alga laut telah diamati melalui studi *model rodent* menunjukkan penghambatan pembentukan tumor kolon dan kulit. Karena alga laut tidak hanya mengandung antioksidan yang labil (askorbat dan glutanthion), juga molekul yang stabil seperti karotenoid, *mycosporin* menyerupai asam amino (MAAs) dan beberapa jenis polifenol seperti katekin dan phlorotannin (Yossie *et al.*, 2002)

Ekstrak alga laut tidak hanya efektif meredam radikal peroksil dan menstabilkan radikal tetapi juga menghambat peroksidasi lipida dan proliferasi sel. *P.palmate* mempunyai senyawa metabolik sekunder yang unik yaitu MAAs yang berfungsi untuk “*sunscreen*” sebagai molekul penyerap radiasi UV. Pada Rhodophyta jenis MAAs, seperti *mycosporin* glisin, *micosporin* palithin, dan *micosporin* paliten (Yuan *et al.*, 2006).

Boopathy dan Kathiresan (2010), melaporkan bahwa sterol dan turunannya terdapat dalam alga laut yang dapat merendahkan tingkat kolesterol plasma darah. Alga laut memproduksi bentuk asam lemak dalam susu manusia sebagai pengkelat logam, yang saat ini ekstensif disintesis sebagai obat baru. Lipida yang melimpah terutama prostaglandin, steroid (kolesterol dan clinoasterol) terdapat pada *Gracilaria crassa*, *G. oronopfolia* dan *G.longa* (Layse *et al.*, 2011)

*Dietary fiber* alga laut mempunyai berbagai fungsi seperti, antioksidan, anti mutagenik, antikoagulan dan alga laut juga sebagai antitumor. Semua alga laut mempersembahkan tingkat extraordinary potassium yang sangat mirip dengan tingkat plasma alamiah (Boopathy dan Kathiresan, 2010),

*Thyresenol A* dan *B* adalah turunan polieter squalen dan *dehydrothyrsiferol* yang diisolasi dari alga laut merah *Laurensia Viridis* potensial mempunyai aktifitas sitotoksik. Polieter triterpenoid *dehydrothyrsiferol* diisolasi dari *Laurencia pinnatifida* menyebabkan apoptosis estrogen sel kanker payu darah ( Gamal, 2009). Diterpenbenzoat, *bromophycolida* dan non halogenaat *bromophycolida* alga merah *Callopphyeus serratus* bersifat antibakteri dan antijamur dan juga sitotoksik melawan beberapa *cell line* tumor manusia melalui induksi apoptosis spesifik (Kubanek et al., 2005). Pirene, *Furoplocamioid*, *perfuroplocamioid* dan *tetrakorincykloheksana* dari alga laut merah serta *plocumium cartilagineum* adalah sitotoksik melawan *cell line* tumor manusia. (de Ines et al., 2004).

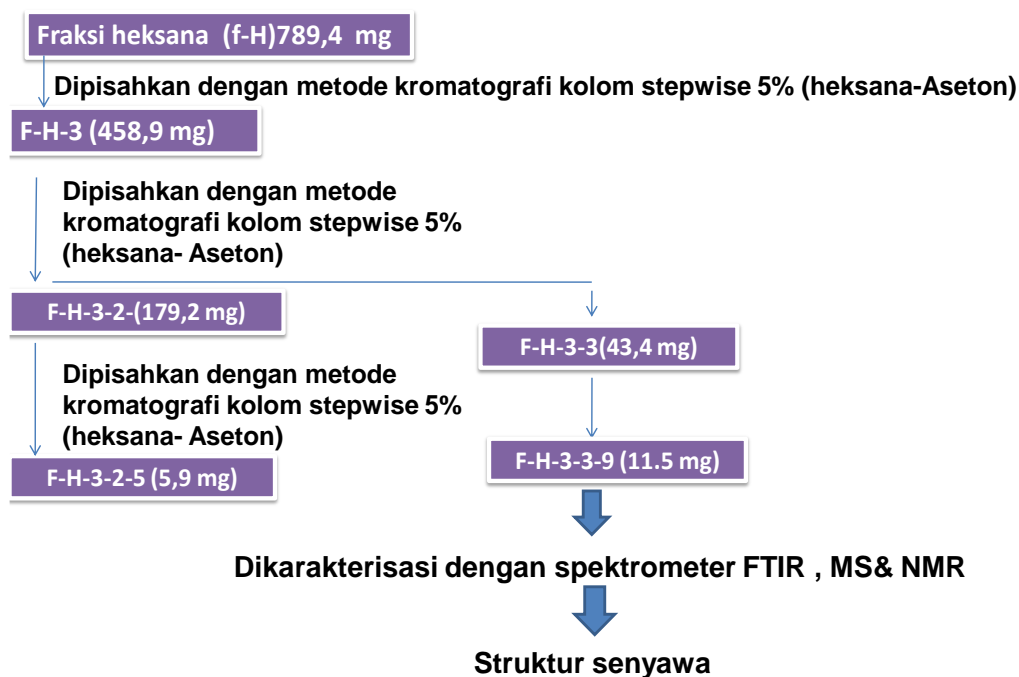
#### **5.2.7. Kesimpulan**

- Hasil Fraksinasi ekstrak metanol 70% alga laut *H. durvilae* menunjukkan kadar fenol dan aktifitas pengkelat ion tertinggi serta jumlah rendemen terbanyak terdapat pada fraksi heksana.
- Berdasarkan kriteria diatas maka pada tahap isolasi senyawa murni dilakukan pada fraksi heksana.

#### **5.4. Tahap III. Isolasi, Pemurnian dan identifikasi senyawa .**

Tahap-tahap Isolasi senyawa aktif fraksi heksana (F-H) *H.Durvilae* adalah sebagai berikut: Pertama-tama dilakukan KLT untuk menentukan eluent yang cocok untuk dipakai pada KK. Dari beberapa kali pengujian menggunakan pelarut heksana-etilasetat dan heksana-aseton maka diperoleh eluent yang terbaik adalah

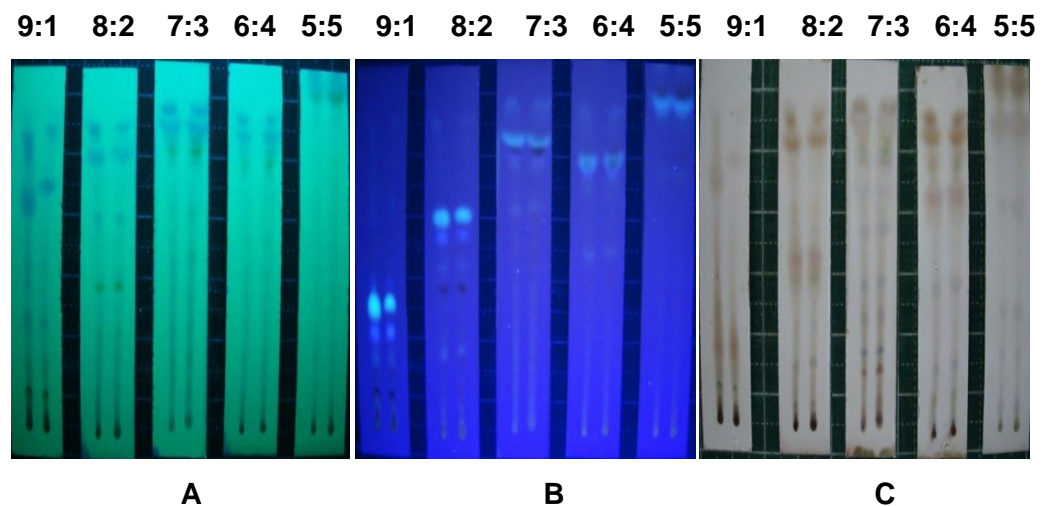
heksana - aseton dengan perbandingan. Setelah itu sampel sebanyak 789,4 gr dipisahkan dengan metoda kolom kromatografi stepwise 5% (heksana - aseton). Sebanyak 17 fraksi (F-H-1 s/d F-H-17) yang diperoleh di KLT kemudian disemprot dengan DPPH 0.05%. Hasil kolom kromatografi pertama ditemukan jumlah sampel yang terbanyak dan yang mempunyai aktifitas antioksidan adalah fraksi f-H-3 sebesar 458,9 g. Kemudian fraksi f-H-3 di KK dan diperoleh fraksi f-H3-2) sebanyak 179 mg dan f-H-3-3 sebanyak 43,4 mg. Ke 2 fraksi ini di KK dan diperoleh f-H-3-2-5 dan f-H-3-3-9 dengan berat masing-masing 5.9 dan 11.5 mg, kemudian di KLT dan diperoleh senyawa murni setelah dideteksi dibawah sinar UV. Isolat senyawa murni di uji aktifitas antioksidan DPPH. Selanjutnya isolat dielusidasi dengan FTIR, MS dan NMR (Gambar 5.8).



**Gambar 5.8. Hasil Isolasi, Elusidasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Fraksi *n*-Heksana *H.durvillae*.**

#### 5.4.1. Isolasi dan Pemurnian dengan KLT Dan KK

Hasil dari 2 kali partisi fraksi heksana di isolasi dengan KLT menggunakan pelarut n-heksana - etil asetat dengan perbandingan . 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 dan 5:5. KLT ini bertujuan untuk melihat apakah 2 kali partisi ini mempunyai komponen senyawa yang sama. Penampakan noda diamati dibawah sinar UV 254 nm dan 365 nm. Kemudian Hasil KLT ini juga disemprot dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% dalam metanol.

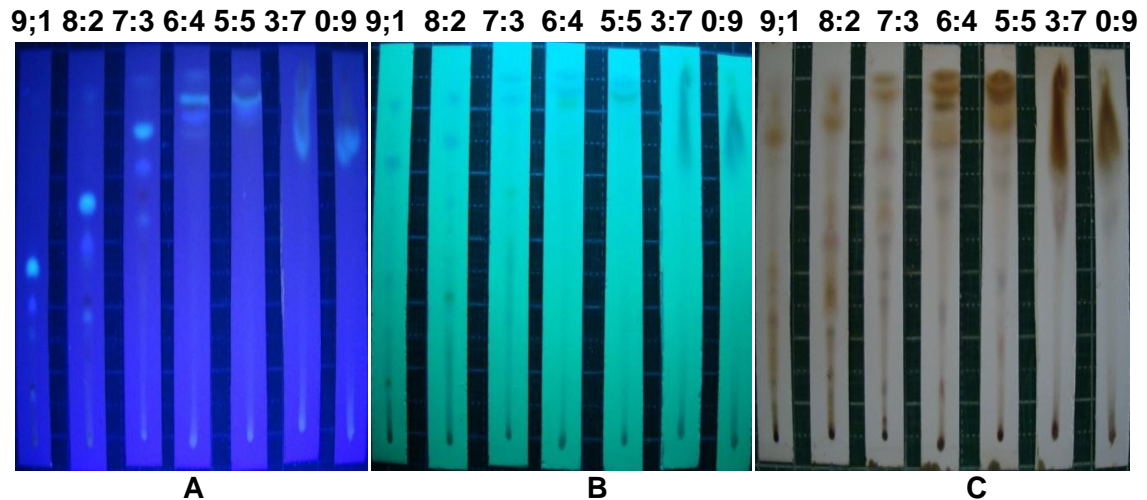


Keterangan: A. Dilihat dibawah sinar UV 254 nm  
 B. Dilihat dibawah sinar UV 365 nm  
 C. Disemprot dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

**Gambar 5.9. KLT Fraksi (f-H) *n*-Heksana dari Sampel 2 Kali Ekstraksi dengan Pelarut *n*- Heksana-Etil Asetat 9:1,8:2,7:3,6:4,5:5**

Dari hasil KLT ini (Gambar 5.9) dapat dilihat bahwa sampel fraksi heksana dari 2 kali partisi adalah mengandung komponen senyawa yang sama, terlihat dari pola penampakan noda sama pada semua perbandingan pelarut n-heksana-etilasetat. KLT berikut pada fraksi heksana dilakukan menggunakan pelarut yang lain yang berbeda kepolarannya, untuk membandingkan pola pemisahan senyawa melalui penampakan noda. Pelarut yang digunakan adalah heksana-aseton dengan

perbandingan 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 3:7 dan 0:9 yang bertujuan untuk mendapatkan pelarut yang lebih baik pola pemisahan senyawa yang akan digunakan untuk KK.



Keterangan: A. Dilihat dibawah sinar UV 254 nm  
 B. Dilihat dibawah sinar UV 365 nm  
 C. Disemprot dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

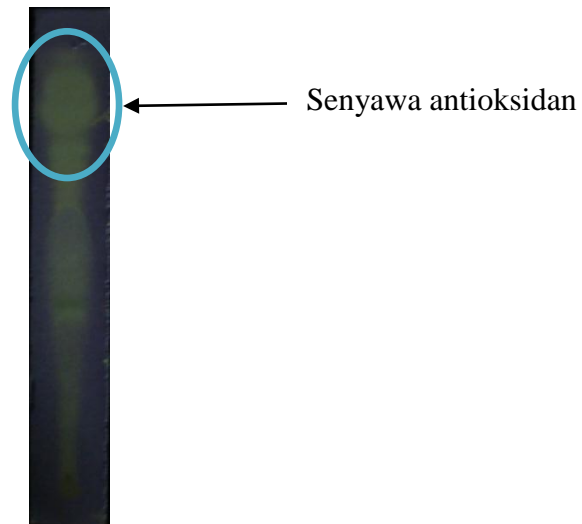
**Gambar 5.10. KLT Fraksi (f-H) *n*-Heksana *H-durvila* dengan Pelarut *n*- Heksana Aseton (9:1,8:2,7:3,6:4,5:5,3:7,0:9)**

Menurut Hadad dan Hadad, 2002, kromatografi lapis tipis (KLT) adalah metoda kromatografi cair yang paling sederhana. KLT menggunakan prinsip adsorpsi dan kecepatan gerak dari sampel yang ditotolkan diatas fase diam. Adsorpsi dan kecepatan gerak sampel tergantung pada : 1. Sifat senyawa (kemampuan terikat pada fase diam & kemampuan larut pada fase gerak. 2. Sifat fase diam (kekuatan elektrostatik yang menarik senyawa diatas fase diam, 3. Sifat fase gerak (kemampuan melarutkan senyawa

Berdasarkan hasil penampakan noda KLT dengan sinar UV 234 nm, 365 nm serta penyemprotan dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%. dengan beberapa perbandingan pelarut



n-heksana-aseton menunjukkan bahwa perbandingan n-heksana-aseton 7:3 (Gambar 5.10) terjadi pemisahan paling baik. Kemudian pada perbandingan 7:3 ini dilakukan penyemprotan DPPH 0.05%.



**Gambar 5.11. KLT Fraksi (f-H) *n*-Heksana dengan Pelarut *n*-Heksana-Aseton (7:3) yang Disemprot dengan DPPH 0.05%.**

Hasil KLT fraksi heksana dengan perbandingan n-heksana-aseton (7:3) setelah disemprot dengan DPPH menunjukkan terbentuk warna kuning (Gambar 5.11) Hal ini membuktikan bahwa sampel fraksi heksana dari *H. Durvillae* mengandung senyawa antioksidan. Setelah itu sampel ini di kromatografi kolom.

Menurut Hemström dan Irgum, (2006), kromatografi kolom dapat diterapkan secara langsung pada pemurnian dan pemisahan skala preparatif, sebab setidaknya secara prinsip, orang dapat memilih ukuran kolom dan kandungannya (isinya) agar sesuai dengan dimensi-dimensi sampel yang akan difraksinasi. Pemilihan pelarut pengemulsi merupakan hal yang penting dalam kromatografi kolom. Kromatografi kolom memerlukan waktu yang lama dan bahan yang cukup banyak, karena itu harus dipastikan terlebih dahulu pelarut atau campuran pelarut mana yang dapat menghasilkan pemisahan yang diinginkan. Pengelusian harus

secepat-cepatnya untuk meminimumkan difusi, sepanjang terdapat keseimbangan yang baik antara pelarut, linarut dan penyerap. Keseimbangan yang baik memerlukan penyerap yang ukuran partikelnya kecil. Sebaiknya, Jika ukuran partikel sangat kecil berarti pelarut tidak mengalir melalui penyerap dengan cepat.

Kromatografi kolom I dilakukan menggunakan sampel fraksi heksana sebanyak 789.4 mg, 1.57 g silika gel, kolom berdiamter 1.8 cm dan pelarut n-heksana-aseton Tinggi silika gel dalam kolom kromatografi 18 cm.. Hasil kromatografi kolom I fraksi heksana (f-H) dengan pelarut n-heksana-aseton dapat dilihat pada Tabel 5.6.

**Tabel 5.6. Hasil Kromatografi Kolom 1. Fraksi Heksana (f-H) dengan Pelarut *n*-Heksana-Aseton**

Fraksi f-H	Volume (ml)		Massa (mg)
	n-Heksana	Aseton	
1	50.0	-	7.42
2	47.5	2.5	5.26
3	45.0	5.0	458.9
4	42.5	7.5	5.64
5	40.0	10.0	5.26
6	38.75	12.5	2.20
7	37.5	12.5	1.48
8	36.25	13.75	1.13
9	35.0	15.0	0.83
10	32.5	17.5	0.72
11	30.0	20.0	0.53
12	25.0	25.0	0.61
13	20.0	30.0	0.88
14	10.0	40.0	0.46
15	5.0	45.0	0.34
16	-	50.0	0.40

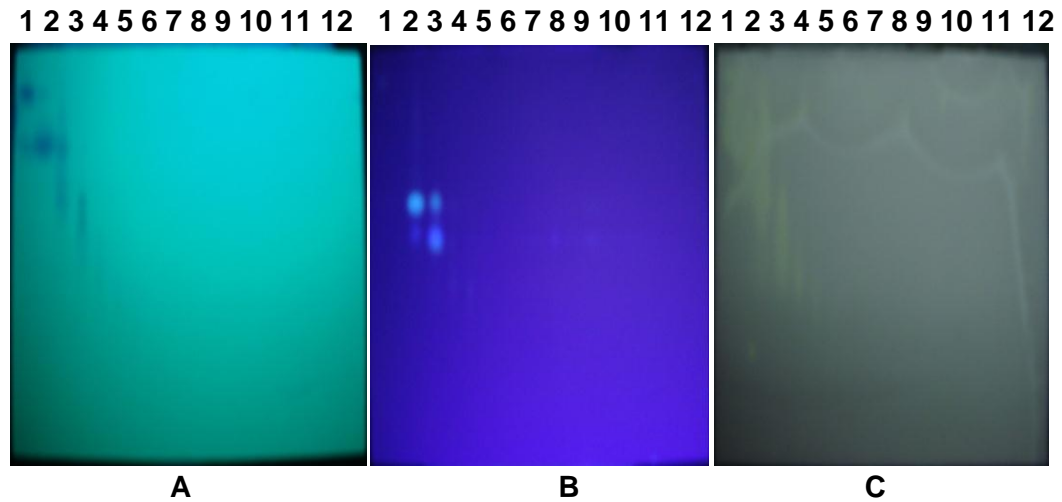
Hasil kromatografi kolom 1, diperoleh 16 fraksi (f-H-1s/d f-16) dimana jumlah terbanyak terdapat pada fraksi f-H-3 yaitu sebesar 458.9 mg. setelah disemprot dengan DPPH0 5% menghasilkan warna kuning. Sebab itu untuk kolom

kromatografi ke 2. menggunakan fraksi f-H-3 dengan silica gel sebanyak 1.2 g dengan diameter kolom 1.8 mm. Hasil kromatografi kolom ke 2 dapat dilihat pada Tabel 5.7.

**Tabel 5.7. Hasil Kromatografi Kolom 2. Fraksi F-H-3 dengan Pelarut n-Heksana-Aseton**

Fraksi f-H-3	Volume (ml)		Massa (mg)
	n-Heksana	Aseton	
1	10	0	-
2	9.5	0.5	179
3	9.0	1.0	43.4
4	8.5	1.5	8.1
5	8.0	2.0	1.9
6	7.5	2.5	1.1
7	7.0	3.0	1.1
8	6.5	3.5	0.8
9	6.0	4.0	0.6
10	5.5	4.5	0.8
11	5.0	5.0	0.9
12	4.5	5.5	1.1
13	4.0	6.0	1.6
14	3.5	6.5	1.8
15	3.0	7.0	1.8
16	2.5	7.5	1.1
17	2.0	8.0	1.2
18	1.5	8.5	1.4
19	1.0	9.0	1.3
20	0.5	9.5	1.6
21	0	10	0.3

Hasil kromatografi kolom 2 di KLT menggunakan pelarut n-heksana aseton (9:1) setelah diamati dibawah sinar UV 254 dan 365. menunjukkan belum terdapat senyawa murni dan setelah disemprot dengan DPPH 0.05% semua fraksi menunjukkan mengandung senyawa antioksidan dan untuk f-H-3-1s/d f-H-3-5 menunjukkan warna yang lebih kuat, berarti mempunyai aktifitas antioksidan yang kuat (Gambar 5.12).



Keterangan :

A. Dilihat dibawah sinar UV 254 nm

B. Dilihat dibawah sinar UV 365nm

C. Penampakan noda disemprot dengan  $H_2SO_4$

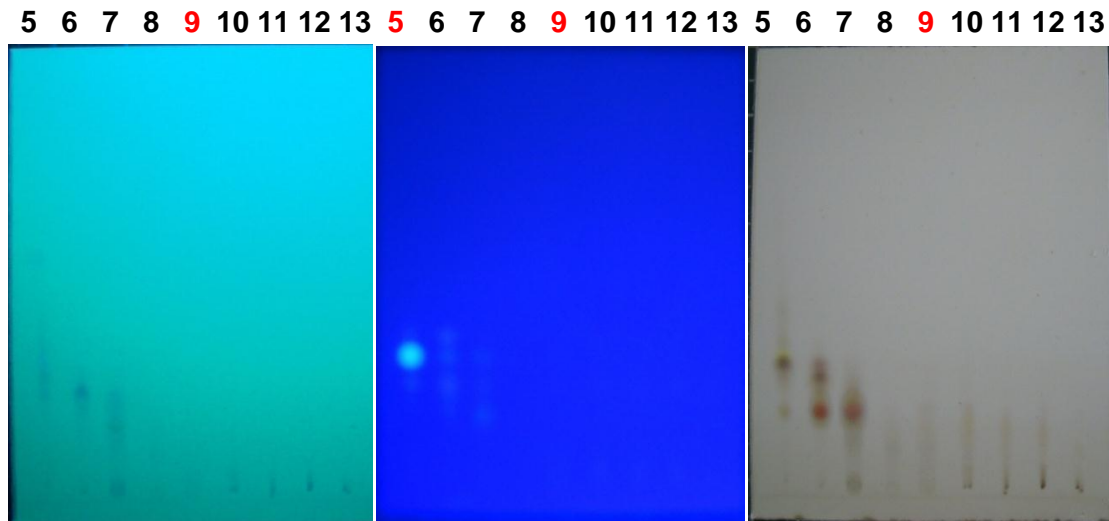
**Gambar 5.12. KLT Fraksi Heksana (f-H-3-1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13) dengan Pelarut *n*-Heksana-Aseton (9:1)**

Potensi antioksidan penangkap radikal ditentukan menggunakan DPPH, suatu radikal stabil dalam larutan air atau metanol dan mampu menerima sebuah elektron atau radikal hidrogen untuk menjadi molekul diamagnetik yang stabil (Oke *et al.*, 2002; Hou *et al.*, 2002). DPPH pada uji ini ditangkap oleh antioksidan yang melepaskan hidrogen, sehingga membentuk DPPH-H tereduksi.

Kolom kromatografi ke 3 dilakukan pada fraksi f-H-3-2, dengan masa 179 mg menggunakan silica gel sebanyak 1 gr. Diameter kolom 0.5 cm. Hasil kromatografi kolom 3 (Tabel 5.8) di KLT dan dilihat dibawah lampu UV 254 dan 365 nm dan disemprot dengan DPPH 0.5%. Hasil KLT dapat dilihat pada Gambar 5.13.

**Tabel 5.8. Hasil Kromatografi Kolom 3. Fraksi F-H-3-2 dengan Pelarut *n*-Heksana-Aseton.**

Fraksi f-H-3-2	Volume (ml)		Massa (mg)
	n-Heksana	Aseton	
1	6	0	-
2	5.94	0.06	1.2
3	5.88	0.12	1.7
4	5.82	0.18	1.9
5	5.76	0.24	5.7
6	5.70	1.30	18.3
7	5.64	0.36	16.1
8	5.58	0.42	5.9
9	5.52	0.48	9.8
10	5.46	0.54	2.0
11	5.40	0.60	6.8
12	5.34	0.66	3.8
13	5.28	0.72	6.8
14	5.22	0.78	1.0
15	5.16	0.84	6.1
16	5.10	0.90	8.5
17	5.04	0.96	2.0
18	4.98	1.02	1.3
19	4.92	1.08	1.3
20	4.86	1.14	2.1
21	4.80	1.20	1.0



A B

Keterangan : A. Dilihat dibawah sinar UV 254 nm  
 B. Dilihay dibawah sinar UV 365nm  
 C. Penampakan noda disemprot dengan  $H_2SO_4$

**Gambar 5.13. KLT Fraksi Heksana (f-H-3-2-5,5,6,7,8,9,10,11,12,13) dengan Pelarut n-Heksana-Aseton (9:1)**

Penampakan noda pada KLT fraksi (f-H-3.2-5) dibawah lampu UV 254 nm menunjukkan senyawa murni, dengan masa 5,7 mg (Gambar 5.13). Sejumlah besar teknis KLT telah dikembangkan dengan berhasil untuk diaplikasikan pada analisa aktifitas antioksidan secara kuantitatif maupun kualitatif, sebuah radikal bebas stabil DPPH sering digunakan untuk tujuan ini. Uji bioautografi ini adalah metoda yang dipilih karena mempunyai beberapa keuntungan yaitu fleksibel, sederhana dan output yang tinggi. Sesudah pemisahan sampel dengan KLT kemudian disemprot dengan reagen DPPH. Foto KLT diuji dengan metoda "*Chem Patern 2 Professional Verssion*" (sejenis perangkat lunak proses "*finger print chromatografi*"). Hasil Band Warna agak kekuningan pada KLT dikonversi pada peak kromatografi. Respons kromatografi ("peak area") dari ekstrak langsung dikorelasikan pada kemampuan antioksidan ekstrak. Tujuan proses ini untuk mendapatkan total peak area. Garis

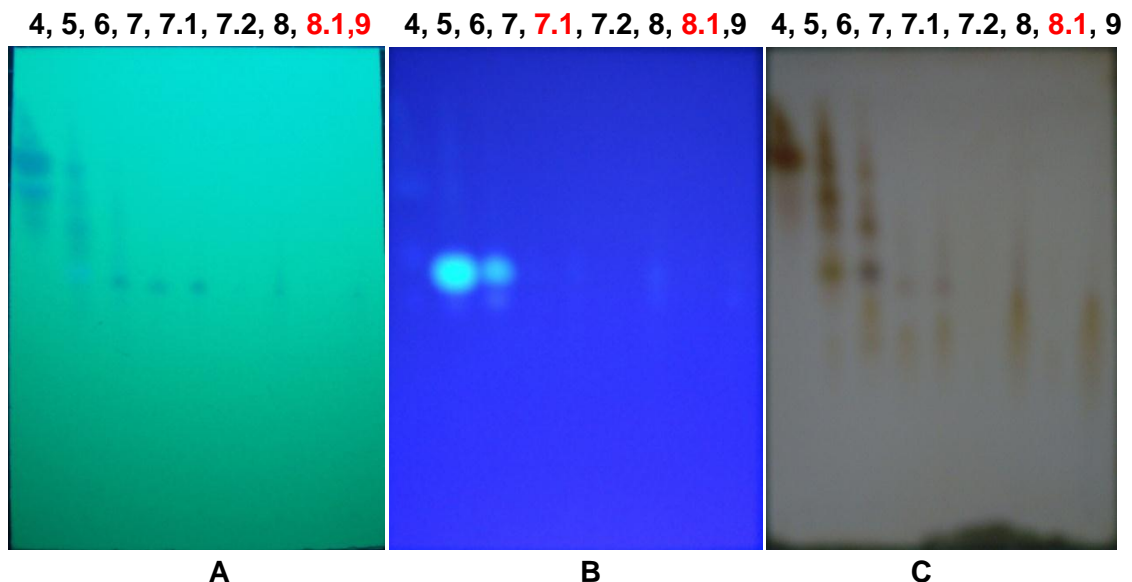
dasar dari puncak ditandai secara manual sebagai satu garis awal sampai akhir (Wang *et al.*, 2012; Laponik, 2002).

Kromatografi Kolom 4 dilakukan pada f-H-3-3 dengan berat sampel 179,2 mg menggunakan silika gel 736 g, diameter kolom 0.5 cm Hasil KK diperoleh 21 fraksi (Tabel 5.9).

**Tabel 5.9. Hasil Kromatografi Kolom 4. Fraksi f-H-3-3 dengan Pelarut n-Heksana-Aseton**

Fraksi f-3-3	Volume (ml)		Massa (mg)
	n-Heksana	Aseton	
1	20.0	0	
2	19.8	0.2	0.7
3	19.6	0.4	0.3
4	19.4	0.6	42.5
5	19.2	0.8	30.9
6	19	1.0	32.7
7	18.8	1.2	23.3
8	18.6	1.4	18.0
9	18.4	1.6	11.5
10	18.2	1.8	2.9
11	18.0	2.0	4.1
12	17.8	2.2	2.2
13	17.6	2.4	0.1
14	17.4	2.6	0.1
15	17.2	2.8	0.2
16	17.0	3.0	0.1
17	16.8	3.2	0.01
18	16.6	3.4	0.03
19	16.4	3.6	0.01
20	16.2	3.8	0.1
21	16.0	4.0	1.0

Kemudian dilakukan KLT pada fraksi yang mempunyai jumlah sampel yang banyak yaitu pada f-H-3-3-1 s/d f-H-3-3-9. Untuk fraksi f-H-3-3-7 dan f-H-3-3-8 dilakukan pemurnian sehingga diperoleh fraksi f-H-3-3-7, f-H-3-3-7.1, f-H-3-3-7.2 dan f-H-3-3-8, f-H-3-3-8.1.



**Keterangan :** A. Dilihat dibawah sinar UV 254 nm  
 B. Dilihay dibawah sinar UV 365nm  
 C. Penampakan noda disemprot dengan  $H_2SO_4$

**Gambar 5.14. KLT Fraksi (f-H-3-3,4,5,6,7,7.1,7.2,8,8.1,9) dengan Pelarut n-Heksana-Aseton (9:1)**

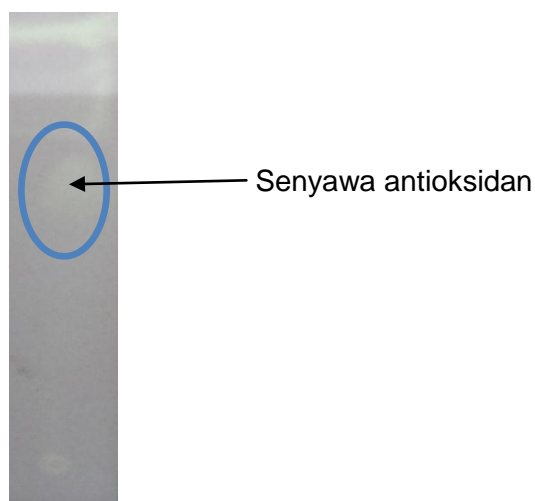
Hasil KLT (Gambar 5.14) dari semua hasil pengamatan diperoleh bahwa senyawa murni pada f-H-3-3-7.1, f-H-3-3-8.1 dan f-H-3-3-9) dengan berat masing-masing 2,5 mg, 4,3 mg dan 11,4 mg.

Dari hasil pemisahan KK dan KLT setelah diidentifikasi berdasarkan penampakan noda dan penyemprotan larutan DPPH 0.5%, maka diperoleh 5 fraksi yang menunjukkan terdapat senyawa murni dan mempunyai aktifitas antioksidan yaitu f-H-3-2-5 , f-H-3-3-7.1, f-H-3-3-8.1 dan f-H-3-3-9, tetapi yang dapat diidentifikasi struktur senyawa murni adalah f-H-3-3-9 (isolat fraksi heksana), karena massanya cukup untuk analisa FTIR, MS dan NMR dan uji aktifitas antioksidan.



### 5.3.2. Aktifitas Antioksidan DPPH isolat murni

Isolat murni f-H-3-3-9 diuji aktifitas antioksidan dengan menggunakan DPPH 0.05% dalam metanol menunjukkan memiliki aktifitas antioksidan lebih besar 800 ppm. Pada pengujian antioksidan secara kualitatif menggunakan metode KLT yang diidentifikasi menggunakan DPPH terbukti memiliki aktifitas antioksidan. Hal ini ditunjukkan dengan noda berwarna kuning (ditandai dengan lingkaran biru) yang dihasilkan (Gambar 5.15).



**Gambar 5.15. KLT Isolat Murni f-H-3-3-9 dengan Pelarut Heksana-Aseton (4:1) Dichelupkan dengan Larutan DPPH 0.05% dalam Metanol.**

### 5.4.5. Interpretasi Spektrum NMR.

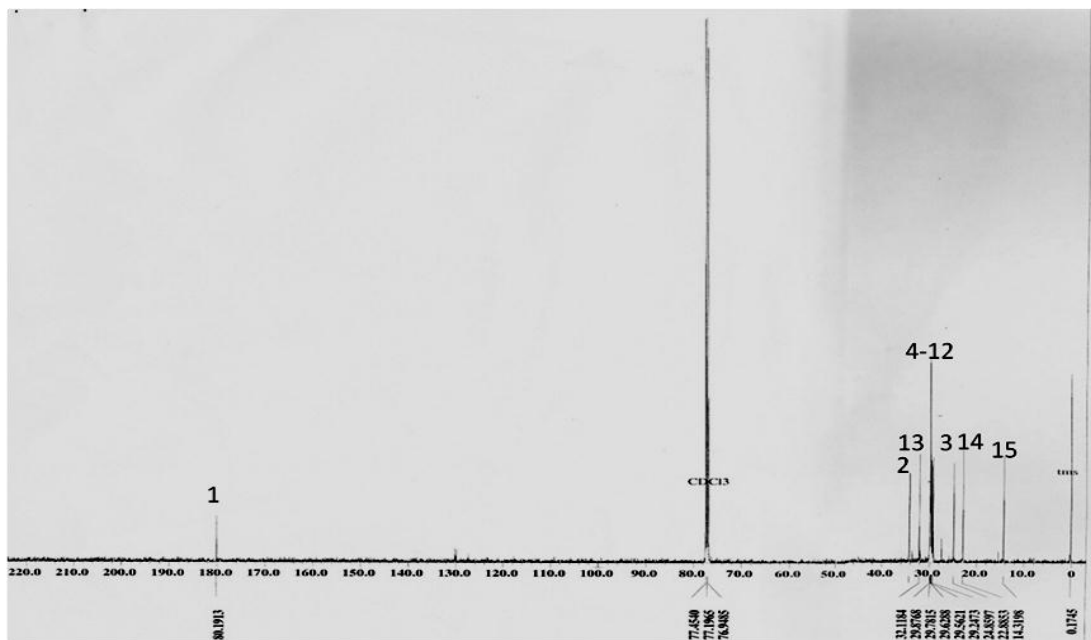
Isolat f-H-3-3-9 berupa padatan amorf berwarna putih yang larut dalam kloroform. Berdasarkan data spektrum  $^{13}\text{C}$ - dan  $^1\text{H}$ -NMR, Isolat f-H-3-3-9 memiliki 15 atom karbon, 30 atom hidrogen dan 2 atom oksigen dengan rumus molekul  $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_2$ . Dengan mengetahui dugaan rumus molekul tersebut, maka dapat diperoleh dugaan nilai atau harga (*double bond equivalen*) DBE dari isolat 1 dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{DBE} = \sum \text{atom C} - \frac{\sum \text{atom H}}{2} - \frac{\sum \text{Halogen}}{2} + \frac{\sum \text{atom N}}{2} + 1$$

Berdasarkan perhitungan rumus DBE tersebut, diperoleh harga DBE sebesar 1, artinya isolat f-H-3-3-9 diduga memiliki 1 buah karbonil.

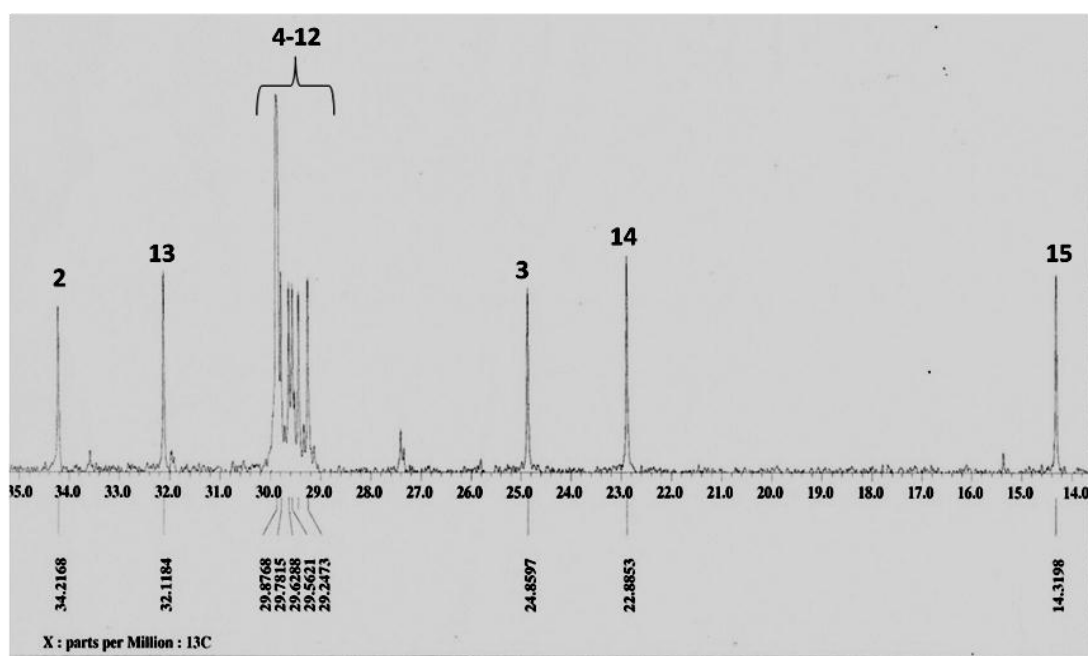
Isolat f-H-3-3-9 diukur menggunakan spektrometer NMR (*nuclear magnetic resonance*) untuk mengetahui jumlah, jenis dan lingkungan proton/hidrogen dan untuk mengetahui jumlah, jenis serta pemecahan sinyal karbon yang tergantung dari jumlah proton yang terikat (metin, metilen, metil dan karbon kuarterner).

Data spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR pada gambar 5.16, memperlihatkan adanya 15 sinyal karbon, yang terdiri dari empat belas karbon ikatan tunggal ( $\text{Csp}^3$ ) pada daerah pergeseran kimia di bawah 40 ppm dan satu karbon rangkap dua ( $\text{Csp}^2$ ) pada daerah pergeseran kimia 180 ppm yang merupakan ciri khas karbonil. Dari data tersebut telah diketahui jumlah dan jenis karbon-karbon yang terdapat pada isolat f-H-3-3-9.



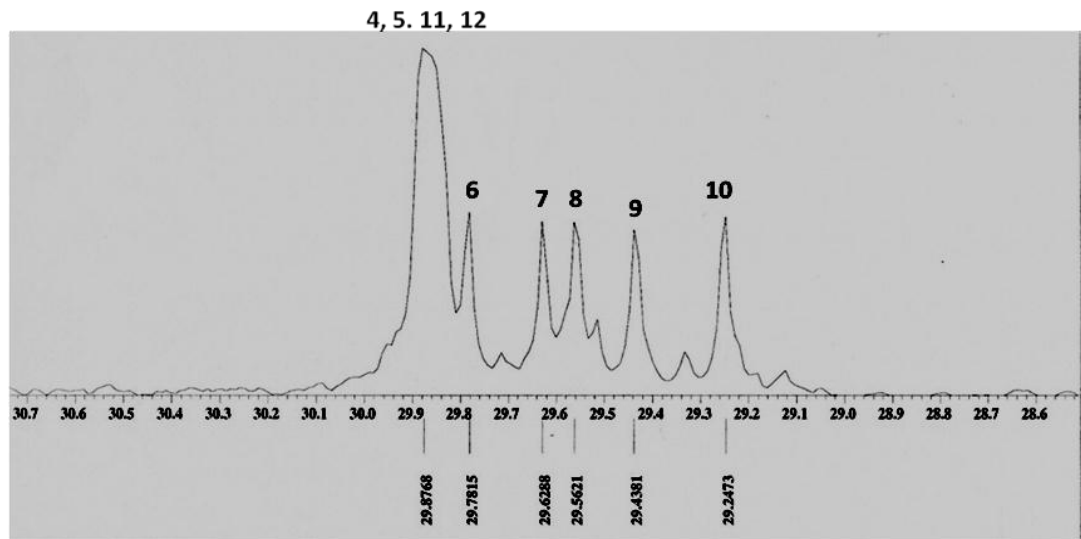
**Gambar 5.16.** Spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR 1 Isolat f-H-3-3-9 (125 MHz dalam Kloroform-D).

Semua sinyal karbon (Gambar 5.17) yang dimiliki isolat **f-H-3-3-9** adalah karbon ikatan tunggal (C sp<sup>3</sup>) kecuali sinyal karbon pada  $\delta_c$ 180,2(C-1) merupakan ciri khas dari karbon karbonil (C=O). Semua sinyal karbon ikatan tunggal isolat f-H-3-3-9 merupakan karbon metilen kecuali karbon pada ppm $\delta_c$ 14,3(C-15) merupakan ciri khas dari karbon metil (CH<sub>3</sub>). Sedangkan tiga belas sinyal karbon pada daerah 22-32 ppm merupakan karbon metilen (CH<sub>2</sub>) yaitu: 34,2(C-2); 32,1(C-13); 29,8(C-4, C-5, C-11, C-12); 29,7(C-6); 29,6(C-7); 29,5(C-8); 29,4(C-9); 29,2(C-10); 24,8(C-3) dan 22,8(C-14) ppm.



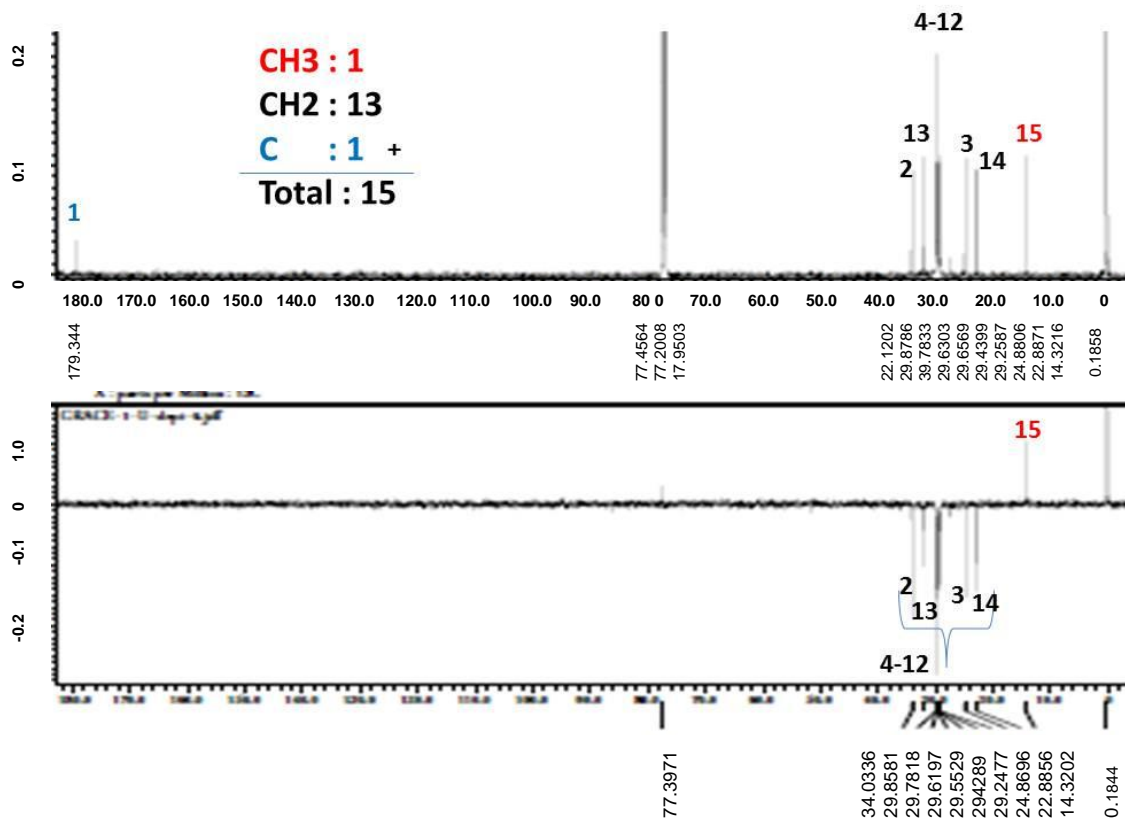
**Gambar 5.17. Spektrum <sup>13</sup>C-NMR 2 Isolat f-H-3-3-9 (125 MHz dalam Kloroform-D).**

Sinyal karbon pada pergeseran 29 ppm diperjelas pada Gambar 5.18. Ada enam buah sinyal pada gambar 5.18 ini, salah satu sinyalnya ( $\delta_c$  29,8 ppm) memiliki intensitas 4x lebih besar dari sinyal yang lainnya. Oleh karena itu, diduga sinyal ini mewakili empat karbon yang memiliki lingkungan yang sama yaitu C-4, C-5, C-11 dan C-12.



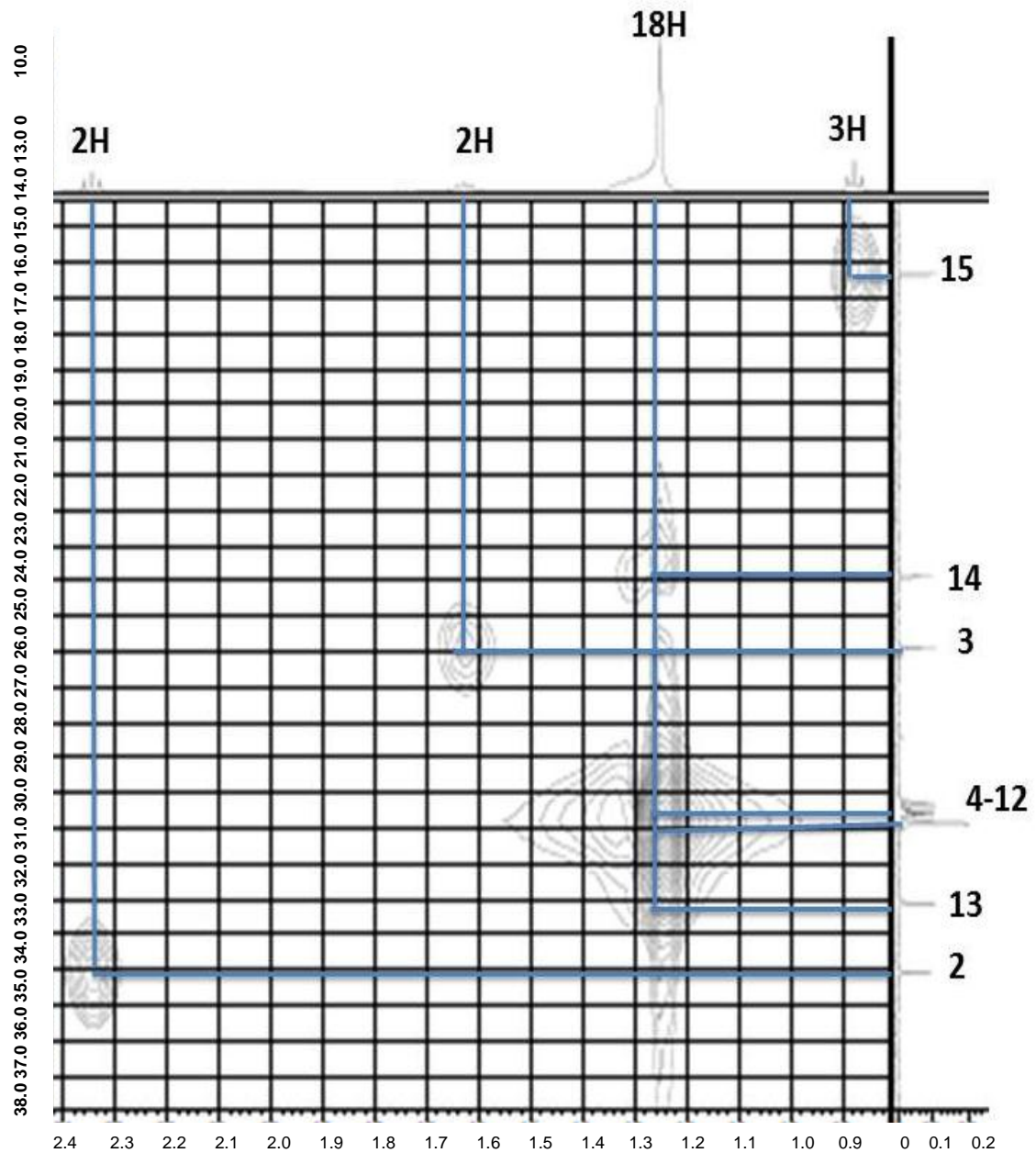
**Gambar 5.18. Spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR 3 Isolat f-H-3-3-9 (125 MHz dalam Kloroform-D).**

Untuk mengetahui informasi tentang pemecahan sinyal dari setiap karbon, dapat dilakukan pengukuran  $^{13}\text{C}$ -NMR dengan teknik DEPT  $135^\circ$  atau pengukuran dua dimensi HMQC. Dengan kata lain, dari spektrum DEPT dan HMQC akan diperoleh informasi jenis karbon metin ( $\text{CH}$ ), metilen ( $\text{CH}_2$ ), metil ( $\text{CH}_3$ ) dan karbon quarterner ( $\text{C}$ ). Spektrum DEPT  $135^\circ$  memperlihatkan sinyal karbon metil dan metin ke atas, sinyal karbon metilen ke bawah dan untuk karbon kuartener tidak muncul. Untuk membedakan karbon metil dan karbon metin dilihat dari jumlah hidrogen atau proton yang terikat pada spektrum HMQC. Dengan membandingkan data spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR dengan data spektrum DEPT  $135^\circ$  pada Gambar 5.19 dan spektrum HMQC pada Gambar 5.20, diketahui senyawa 1 memiliki satu karbon quarterner ( $\text{C}$ ) yang ditandai dengan warna biru, tiga belas karbon metilen ( $\text{CH}_2$ ) yang ditandai dengan warna hitam dan satu karbon metil ( $\text{CH}_3$ ) berwarna merah.



**Gambar 5.19. Spektrum DEPT Isolat f-H-3-3-9 (125 MHz dalam Kloroform-D).**

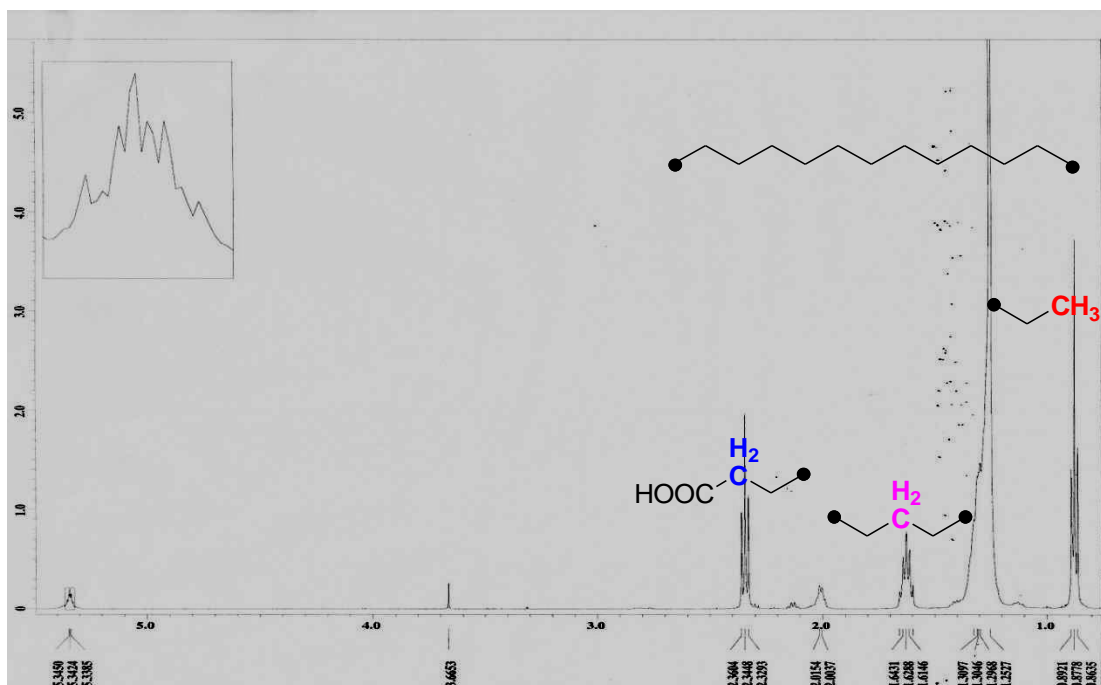
Sinyal karbon metil dan karbon metin yang tidak dapat dijelaskan pada spektrum DEPT dapat kita ketahui pada spektrum HMQC (Gambar 5.20). Dari interpretasi spektrum NMR dua dimensi HMQC akan diperoleh data korelasi atau hubungan antara suatu proton dengan suatu karbon sebanyak satu ikatan. Spektrum ini untuk menentukan dugaan suatu karbon tertentu yang terikat dengan proton dan berapa jumlah proton yang terikat pada karbon tersebut.



**Gambar 5.20. Spektrum HMQC Isolat f-H-3-3-9 (125 MHz dalam Kloroform-D).**

Pada Gambar 5.20. ditunjukkan semua 14 karbon yang berikatan dengan hidrogen. Karbon yang tidak berkorelasi dengan hidrogen merupakan karbon kuartener seperti C-1 yang tidak tampak pada spektrum ini. Semua karbonnya kecuali C-15 yang merupakan metil ( $\text{CH}_3$ ), merupakan metilen ( $\text{CH}_2$ ).

Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  menginformasikan jumlah, jenis dan lingkungan dari setiap proton-proton yang terdapat pada suatu senyawa. Pada Gambar 5.21 dapat dilihat jumlah dan jenis hidrogen yang terdapat pada isolat f-H-3-3-9. Jumlah proton atau hidrogen ditentukan dengan nilai integrasi, sedangkan jenis lingkungan ditentukan oleh nilai pergeseran kimia dan multiplisitasnya. Multiplisitas singlet menunjukkan tidak adanya proton tetangga, doublet menunjukkan memiliki satu proton tetangga, triplet menunjukkan memiliki dua proton tetangga, quartet menunjukkan memiliki tiga proton tetangga dan multiplet menunjukkan memiliki lebih dari empat proton tetangga.



**Gambar 5.21. Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  Isolat f-H-3-3-9 (500 MHz dalam Kloroform-D).**

Pada Gambar 5.21 ditunjukkan bagaimana jenis dan lingkungan proton/hidrogen pada isolat f-H-3-3-9. Sinyal hidrogen pada pergeseran kimia 0,87 (3H;t;7,15) merupakan hidrogen metil yang bertetangga dengan metilen. Hal ini

ditunjukkan dengan sinyal triplet yang berarti tiga hidrogen metil ini memiliki dua buah hidrogen tetangga yaitu hidrogen pada metilen. Ilustrasi untuk penjelasan ini ditunjukkan dengan fragmen berwarna merah. Sinyal hidrogen dengan intensitas tinggi pada 1,29(2H;s) merupakan ciri khas dari sinyal hidrogen asam lemak (Supratman, 2010). Hal ini disebabkan karena banyaknya hidrogen metilen yang memiliki lingkungan yang sama sehingga sinyalnya menumpuk (bertumpang tindih). Interpretasi dari sinyal ini ditunjukkan dengan fragmen berwarna hitam (rantai 11 karbon metilen (CH<sub>2</sub>)).

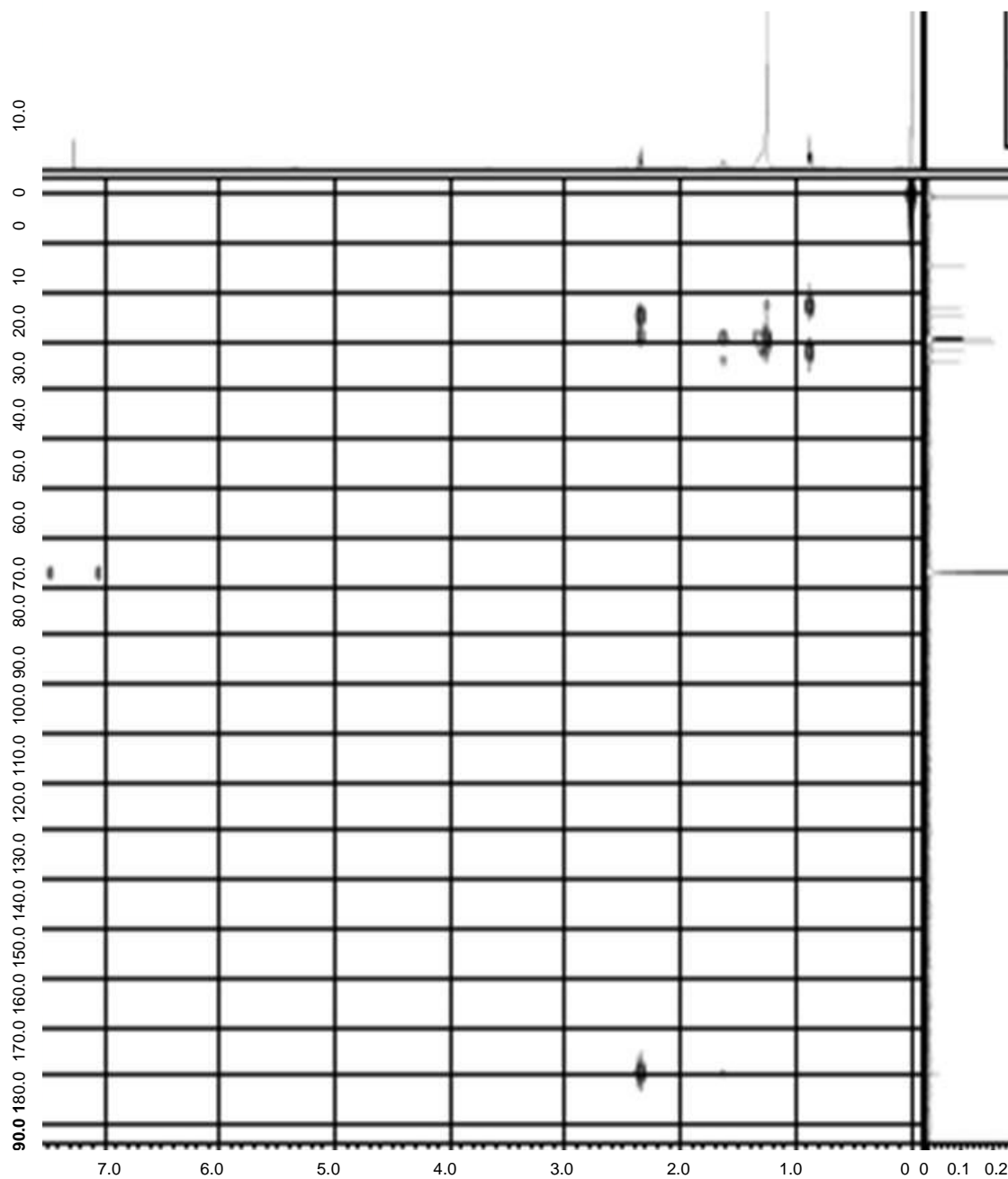
Selanjutnya pada sinyal hidrogen 1,62(2H;m;7,1) merupakan hidrogen metilen yang diapit diantara dua karbon metilen. Hal ini diduga karena bentuk sinyalnya mutiplet yang mengartikan hidrogen ini memiliki lebih dari tiga buah hidrogen tetangga. Fragmen yang mengilustrasikan dugaan ini ditunjukkan dengan fragmen berwarna merah muda.

Sinyal hidrogen terakhir pada isolat f-H-3-3-9 adalah sinyal hidrogen pada pergeseran kimia 2,34(2H;t;7,8) yang juga merupakan sinyal dari metilen (CH<sub>2</sub>). Karena bentuk sinyalnya triplet, diduga hidrogen pada metilen ini memiliki dua buah hidrogen tetangga. Mengingat isolat f-H-3-3-9 ini tidak memiliki karbon metin (CH) maka hidrogen tetangga untuk karbon metilen ini berasal dari hidrogen metilen yang lain. Sedangkan pada satu sisi lainnya, karbon metilen ini harus mengikat karbon kuarterner (C) yang tidak lain adalah karbonil yang merupakan satu-satunya karbon kuarterner yang dimiliki isolat ini. Penjelasan ini diilustrasikan dengan fragmen berwarna biru.

Spektrum *HMBC* (*Heteronuclear Multiple Bond Connectivity*) dapat digunakan untuk menentukan posisi gugus fungsi pada suatu senyawa dengan korelasi antara proton dan karbon yang jaraknya dua sampai tiga ikatan (<sup>2</sup>J dan <sup>3</sup>J),

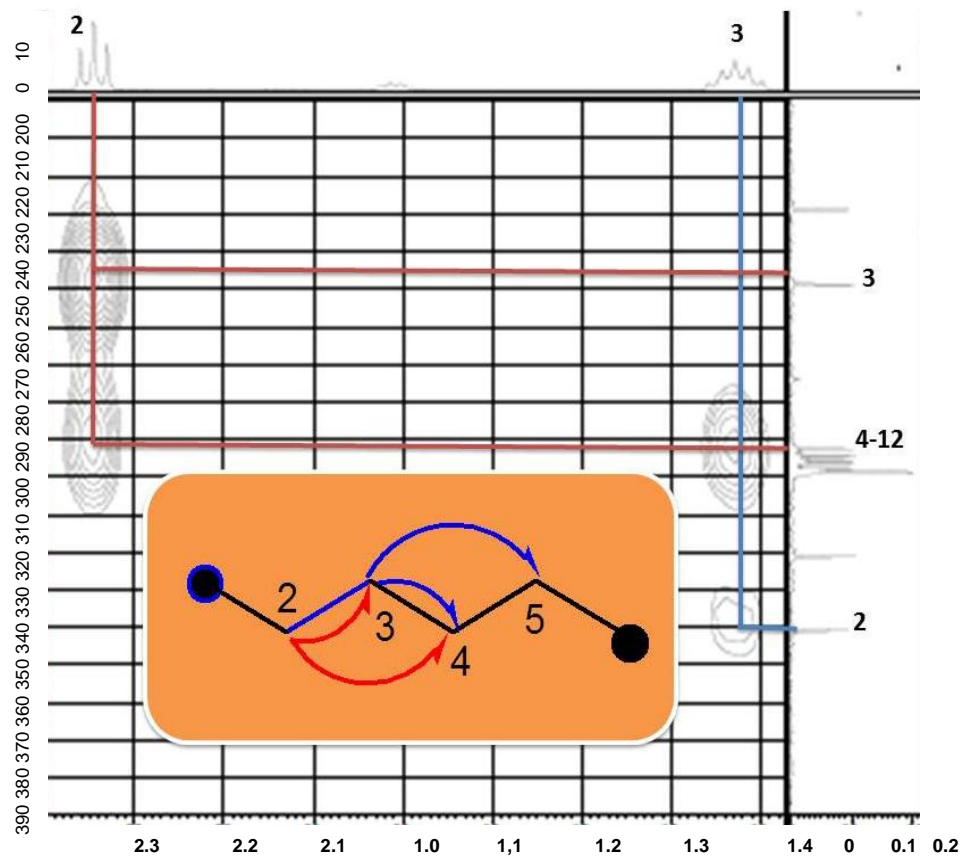


namun terkadang mampu mengukur sampai empat ikatan ( $^4J$ ). Berikut spektrum HMBC senyawa f-H-3-3-9 ditunjukkan pada Gambar 5.22.



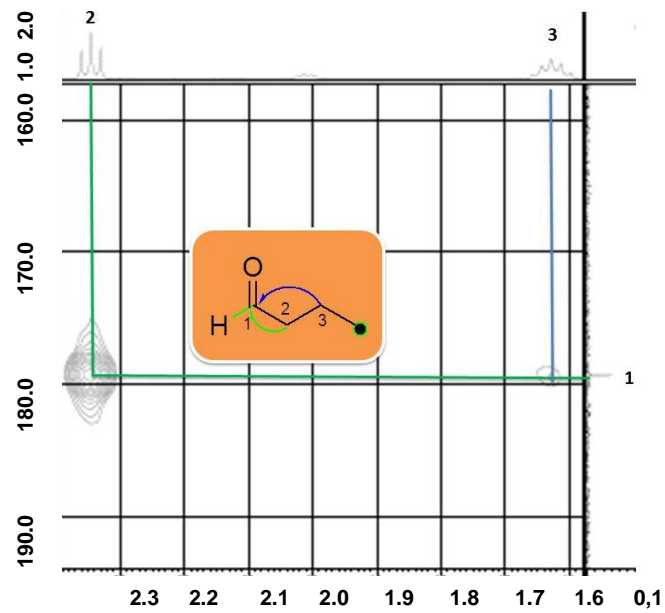
**Gambar 5.22. Spektrum HMBC 1 Isolat f-H-3-3-9 (500 MHz dalam Kloroform-D).**

Pada Gambar 5.23. Terlihat korelasi atau hubungan antara H-2 dengan C-3 dan C-4 yang ditandai dengan panah berwarna merah, dan korelasi antara H-3 dengan C-4 dan C-5 yang ditandai dengan panah berwarna biru.

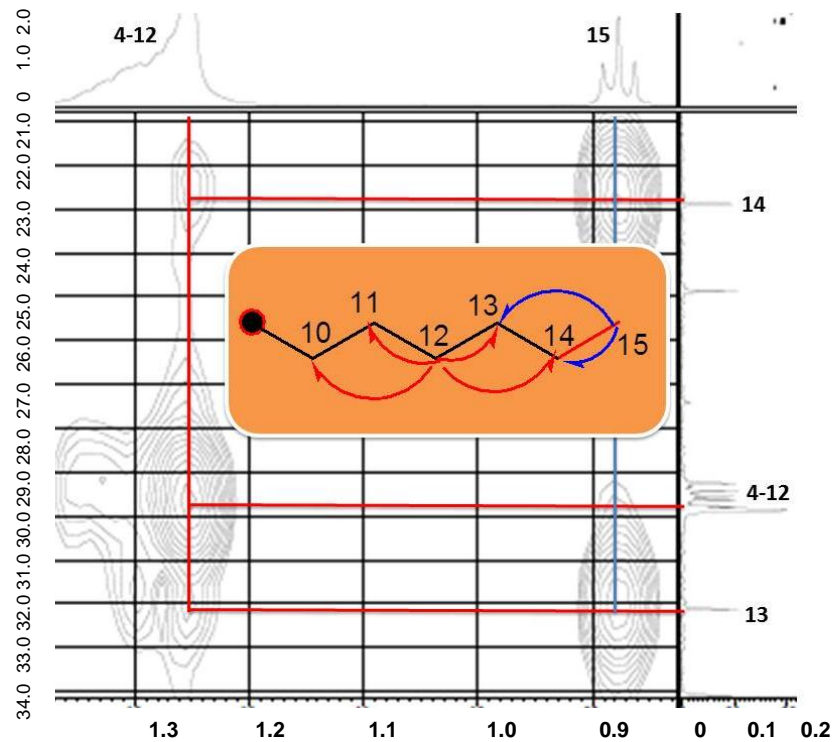


**Gambar 5.23. Spektrum HMBC 2 Isolat f-H-3-3-9 (500 MHz dalam Kloroform-D).**

Sedangkan pada Gambar 5.24. terdapat korelasi antara H-2 (ditunjukkan dengan panah berwarna hijau) dan H-3 (panah berwarna biru) dengan C-1.

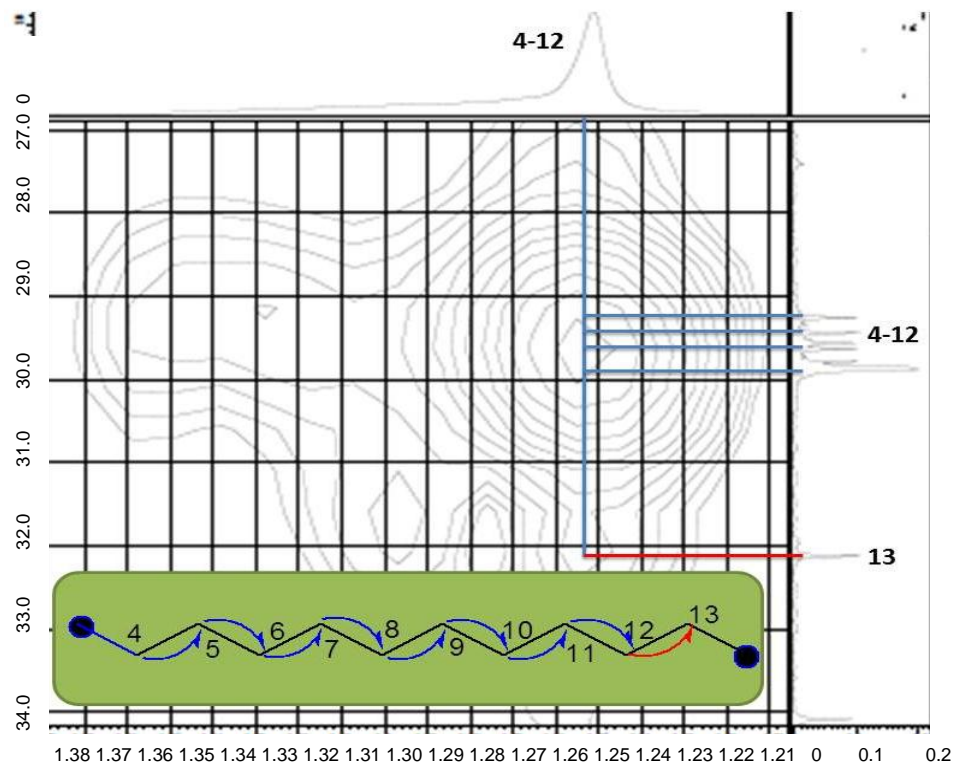


**Gambar 5.24.** Spektrum HMBC 3 Isolat f-H-3-3-9 (500 MHz dalam Kloroform-D)



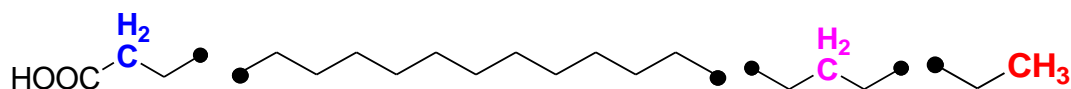
**Gambar 5.25.** Spektrum HMBC 4 Isolat f-H-3-3-9 (500 MHz dalam Kloroform-D)

Korelasi H-12 dengan empat karbon yang lain (C-10, C-11, C-13 dan C-14) dan hubungan hidrogen metil (H-15) terhadap C-13 dan C-14 ditunjukkan pada Gambar 5.25. Sedangkan pada gambar 5.26. menunjukkan adanya hubungan antara sinyal hidrogen pada  $\delta_H 1,25$  ppm yang merupakan H-14 s/d H-12 (lihat kembali Gambar 5.25.) dengan sinyal karbon pada  $\delta_C 29,5-29,8$  ppm (C-4 s/d C-12). Hubungan atau korelasi ini diduga saling berhimpitan atau tumpang tindih sehingga tidak terlihat dengan jelas. Oleh karena itu, agar lebih mudah diilustrasikan seperti yang terlihat pada fragmen struktur yang terdapat panah biru. Selain itu ada korelasi antara sinyal hidrogen pada  $\delta_H 1,25$  ppm yang merupakan H-14 s/d H-12 dengan sinyal karbon 32,1 ppm (C-13), diduga ini merupakan korelasi antara H-12 terhadap C-13 (ditunjukkan dengan panah berwarna merah).



**Gambar 5.26. Spektrum HMBC 5. Isolat f-H-3-3-9 (500 MHz dalam Kloroform-D)**

Dari data pergeseran kimia  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - dan 2D-NMR (Tabel 5.10), dapat disimpulkan bahwa fragmen-fragmen yang dimiliki isolat f-H-3-3-9 (isolat fraksi *n*-heksana *H.durvilae*) (Gambar 5.27) adalah sebagai berikut:

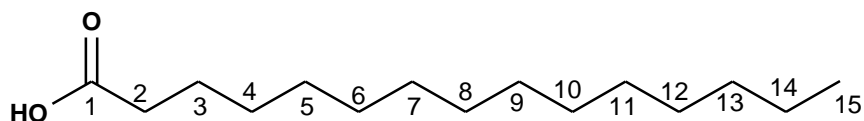


Gambar 5.27. Fragmen-Fragmen isolat fraksi *n*-heksana *H.durvilae*

Tabel 5.10. Data Pergeseran Kimia  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - dan 2D-NMR Isolat Fraksi *n*-Heksana.

No	$\delta_{\text{C}}$ 125 MHz (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (Int., mult., $J$ =Hz) 500 MHz (ppm)	HMBC	
			2J	3J
1	180,2	-	H-2	H-3
2	34,2	2,34(2H;t;7,8)	H-3	-
3	24,8	1,62(2H;m;7,1)	H-2	-
4	29,8		H-3, H-5	H-2, H-6
5	29,8		H-4, H-6	H-3, H-7
6	29,7		H-5, H-7	H-4, H-8
7	29,6		H-6, H-8	H-5, H-9
8	29,5		H-7, H-9	H-6, H-10
9	29,4	1,25(22H;s)	H-8, H-10	H-7, H-11
10	29,2		H-9, H-11	H-8, H-12
11	29,8		H-10, H-12	H-9, H-13
12	29,8		H-11, H-13	H-10, H-14
13	32,1		H-14	H-15
14	22,8		H-13, H-15	H-12
15	14,3	0,87(3H;t;7,15)	-	-

Dengan mengacu pada semua data interpretasi NMR yang telah diuraikan diatas, didapat dugaan struktur dari isolat fraksi heksana berupa senyawa golongan asam lemak yang ditunjukkan pada gambar 5.28.



**Gambar 5.28. Dugaan Struktur Isolat Fraksi *n*-Heksana *H.durvilae***

Data perbandingan nilai pergeseran kimia  $^1\text{H}$ - dan  $^{13}\text{C}$ -NMR isolat fraksi *n*-heksana dengan senyawa pembandingnya yaitu asam pentadekanoat  $\beta$ -D-glukosida (Pandey *et al.*, 2006) dapat dilihat pada Tabel 5.11.

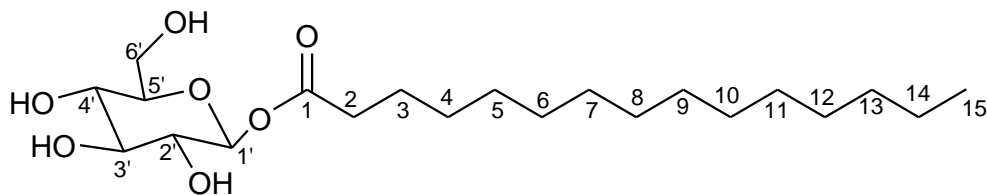
**Tabel 5.11. Data  $^1\text{H}$ - dan  $^{13}\text{C}$ -NMR Isolat Fraksi *n*-Heksana *H.durvilae* dan Asam Pentadekanoat  $\beta$ -D-Glukosida.**

No	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)		$\delta_{\text{H}}$ (Int., mult., $J$ =Hz) (ppm)	
	<sup>a</sup> Asam pentadekanoat $\beta$ -D-glukosida	<sup>b</sup> Isolat 1	<sup>a</sup> Asam pentadekanoat $\beta$ -D-glukosida	<sup>b</sup> Isolat 1
1	176,0	180,2	-	-
2	36,1	34,2	2,20(2H;t,7,5)	2,34(2H;t,7,8)
3	26,3	24,8	1,95(2H;m)	1,62(2H;m;7,1)
4	31,9	29,8	1,25(2H;s)	1,29(2H;s)
5	31,9	29,8	1,25(2H;s)	1,29(2H;s)
6	31,9	29,7	1,25(2H;s)	1,29(2H;s)
7	31,9	29,6	1,25(2H;s)	1,29(2H;s)
8	31,9	29,5	1,25(2H;s)	1,29(2H;s)
9	31,9	29,4	1,25(2H;s)	1,29(2H;s)
10	31,9	29,2	1,25(2H;s)	1,29(2H;s)
11	31,9	29,8	1,25(2H;s)	1,29(2H;s)
12	31,9	29,8	1,25(2H;s)	1,29(2H;s)
13	34,5	32,1	1,25(2H;s)	1,29(2H;s)
14	24,5	22,8	1,25(2H;s)	1,29(2H;s)
15	14,0	14,3	0,83(3H;t,7,5)	0,87(3H;t,7,15)
1'	97,1	-	5,01 (1H)	-
2'	73,2	-		-
3'	79,0	-		-
4'	72,1	-	4,25-4,61 ( <i>m</i> )	-
5'	78,3	-		-
6'	62,9	-		-

a) Spectrometers use pyridin solvent in 75 MHz

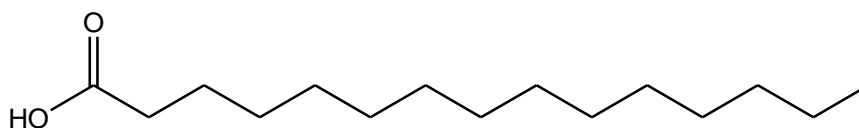
b) Spektrometer JEOL, usecloroform-D solvent in 125 MHz

Struktur senyawa pembanding asam pentadekanoat  $\beta$ -D-glukosida dapat dilihat pada Gambar 5.29.



**Gambar 5.29. Struktur Asam Pentadekanoat  $\beta$ -D-Glukosida.**

Data pergeseran kimia isolat fraksi heksana *H.durvilae* isolat fraksi *n*-heksana mirip dengan data pergeseran kimia asam pentadekanoat. Adapun perbedaan pergeseran kimia ini disebabkan oleh perbedaan pelarut yang digunakan pada saat mengukur NMR dan daya alat spektroskopi NMR yang digunakan. Semakin besar daya alat yang digunakan, semakin sensitif data yang diberikan. Sehingga diduga isolat fraksi *n*-heksana *H.durvilae* adalah asam pentadekanoat (Gambar 5.30).

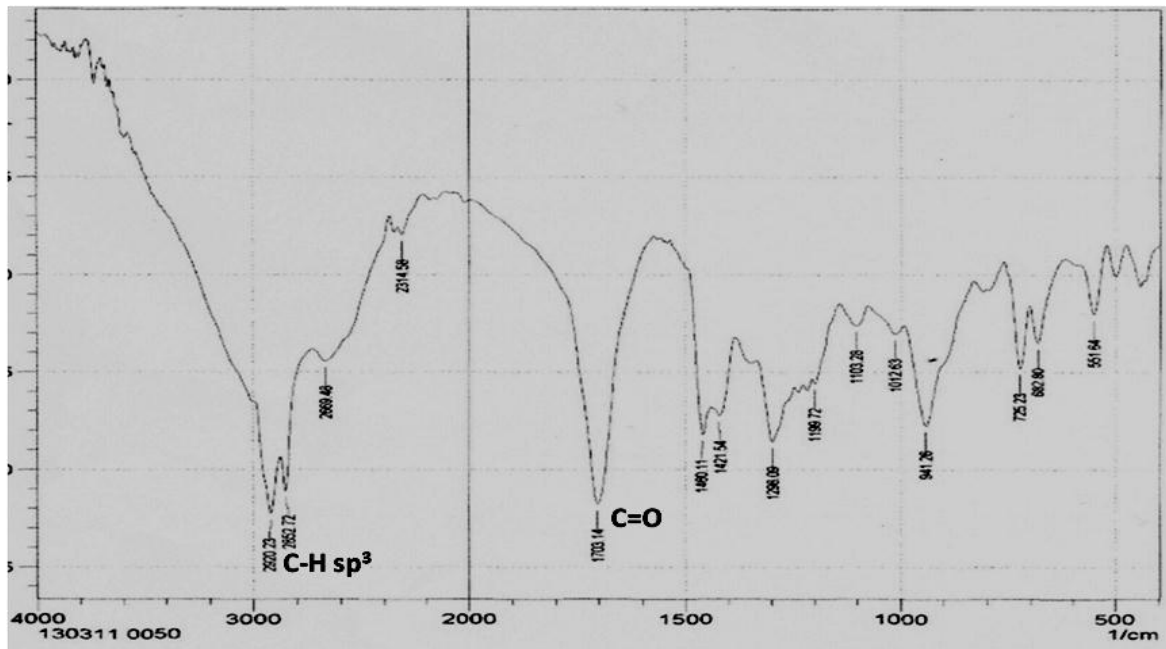


**Gambar 5.30 Struktur Isolat Fraksi *n*-Heksana *H.durvilae***

### 5.3.3 Interpretasi Spektrum FTIR (Fourier Transform Infra Red)

Pengukuran serapan gelombang inframerah atau *infrared* (IR) dalam suatu penentuan struktur bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat pada suatu molekul. Identifikasi gugus fungsi tertentu ditunjukkan oleh serapan khas pada bilangan gelombang tertentu, yang merupakan hasil transisi antara tingkat energi

vibrasi (getaran) dari setiap interaksi atom-atom dalam suatu molekul, baik berupa *bending* ataupun *stretching*. Spektrum inframerah isolat fraksi heksana dapat dilihat pada Gambar 5.31.



**Gambar 5.31** Spektrum Infra Merah Isolat Fraksi *n*-Heksana *H.durvilae*

Berdasarkan Gambar 15.31 terdapat serapan pada bilangan gelombang 2920,23 dan 2852,72  $\text{cm}^{-1}$  membuktikan adanya gugus CH ikatan tunggal. Kemudian bilangan gelombang 1703,14  $\text{cm}^{-1}$  merupakan ciri khas dari serapan karbonil. Tafsiran secara keseluruhan dari spektrum inframerah dapat dilihat pada Tabel 5.12.

**Tabel 5.12.** Tafsiran Spektrum Inframerah Isolat Fraksi *n*-Heksana *H.durvilae*

Bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )	Bentuk puncak	Intensitas	Dugaan struktur/gugus fungsi
2920,23	tajam	tinggi	CH $\text{sp}^3$
2852,72	tajam	tinggi	CH $\text{sp}^3$
1703,14	tajam	tinggi	C=O



Berdasarkan spektrum infra merah, diduga isolat fraksi heksana merupakan sebuah senyawa golongan asam lemak. Hal ini terlihat dari serapan-serapan yang muncul hanya terdiri dari karbonil dan ikatan C-H  $sp^3$ . Spektrum infra merah asam pentadekanoat  $\beta$ -D-glukosida yang diisolasi dari *Clerodendrum inerme* (Pandey *et al.*, 2006) menunjukkan serapan yang sama dengan spektrum inframerah isolat fraksi heksana.

Serapan pada bilangan gelombang  $3424\text{ cm}^{-1}$  yang menjadi ciri khas dari gugus fungsi OH muncul pada spektrum asam pentadekanoat  $\beta$ -D-glukosida. Namun pada spektrum isolat fraksi heksana tidak terlihat dengan jelas hal ini mungkin terjadi karena adanya tumpang tindih dengan serapan C-H atau karena hidrogen pada asam terlepas ketika pengukuran terjadi.

Pada spektrum asam pentadekanoat  $\beta$ -D-glukosida (Tabel 5.13), serapan untuk karbonil muncul pada  $1720\text{ cm}^{-1}$ , hal ini merupakan karbonil ester. Sedangkan serapan karbonil pada isolat fraksi *n*-heksana terjadi pada bilangan gelombang  $1703,14\text{ cm}^{-1}$  yang diduga merupakan karbonil dari karboksilat karena serapannya lebih rendah. Menurut Supratman, 2010 dan Socrates, 1994, serapan karbonil pada gugus fungsi aldehyd  $1740\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ , asam karboksilat  $1705\text{ - }1725\text{ cm}^{-1}$ , keton  $1705\text{-}1725\text{ cm}^{-1}$ , ester  $1740\text{ -}1710\text{ cm}^{-1}$ .

**Tabel 5.13. Tafsiran Spektrum Inframerah Asam Pentadekanoat  $\beta$ -D-Glukosida**

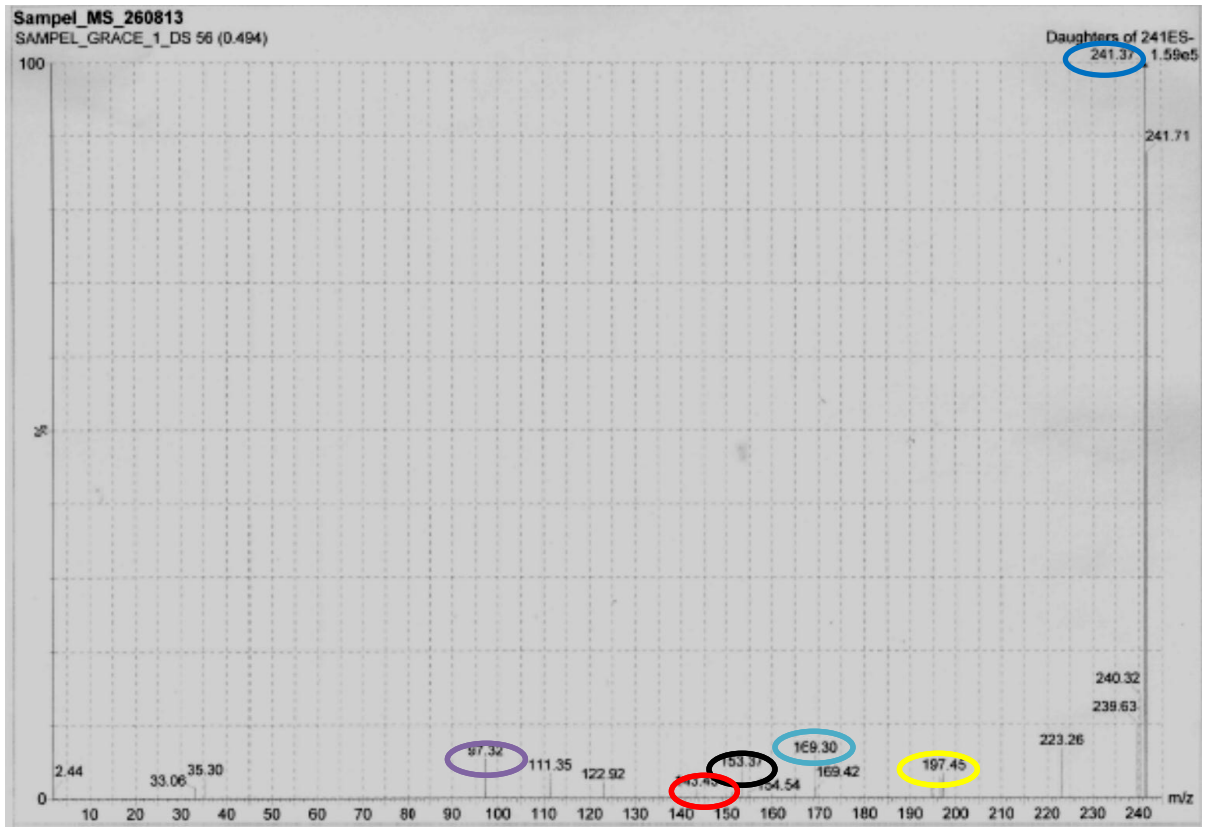
Bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )	Dugaan struktur/ gugus fungsi
3424	OH
2923	CH $sp^3$
2855	CH $sp^3$
1720	C=O

#### 5.4.4 Interpretasi Spektrum ESMS

Spektrum massa dipaparkan sebagai grafik batangan. Setiap puncak dalam spektrum menyatakan suatu fragmen molekul. Fragmen-fragmen disusun sedemikian rupa sehingga pucak-puncak ditata menurut kenaikan  $m/z$  dari kiri ke kanan dalam spektrum. Intensitas puncak sebanding dengan kelimpahan relatif fragmen-fragmen bergantung pada stabilitas relatifnya. Berikut spektrum massa senyawa isolat fraksi  $n$ -heksana ditunjukkan pada Gambar 5.32

Spektrometer yang digunakan adalah ESMS (*Electrospray Mass Spectroscopy*) dengan jenis spektrum yang dihasilkan adalah spektrum  $ES^+$ . Sinyal pada spektrum  $ES^+$  ini bermuatan positif karena sinyal yang teridentifikasi oleh alat merupakan fragmen yang kehilangan satu buah elektron sehingga fragmen tersebut bermuatan positif.

Gambar 5.32 menunjukkan bahwa spektrum  $ES^+$  senyawa isolat fraksi  $n$ -heksana memiliki sinyal tertinggi ( $m/z$  241 (ditandai dengan lingkaran biru), artinya bobot molekul senyawa f-H-3-3-9 adalah  $m/z$  242, yang merupakan puncak ion molekul. Hal ini sesuai dengan dugaan struktur senyawa isolat fraksi  $n$ -heksana yakni asam pentadekanoat yang memiliki rumus molekul  $C_{15}H_{30}O_2$ .



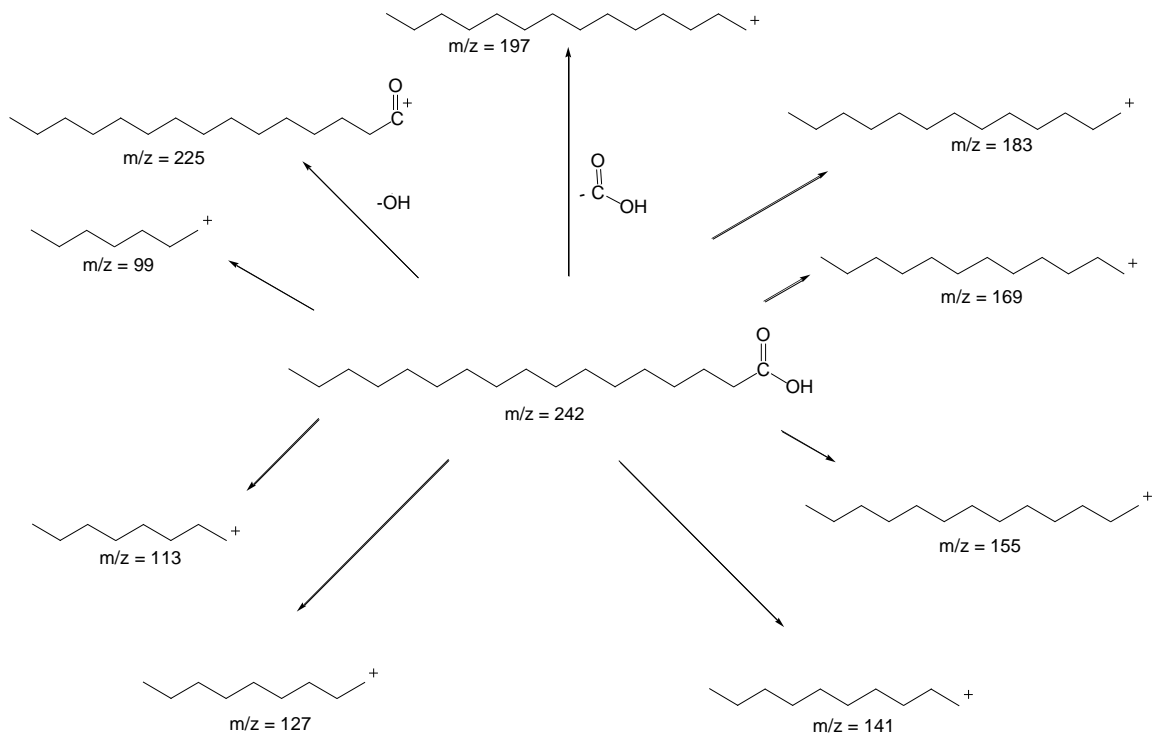
**Gambar 5.32. Spektrum Massa Isolat Fraksi *n*-Heksana *H.durvilae***

Menurut McLafferty and Turacek, 1998, untuk senyawa asam lemak pola fragmentasi M-OH dan M-COOH merupakan puncak m/z utama dimana pada spektrum massa isolat fraksi *n*-heksana ditunjukkan pada m/z 225 dan m/z 179, karena terjadinya pemutusan ikatan disebelah C=O. Selanjutnya terjadi pemutusan alkil yang bersebelahan dengan C=O menghasilkan satu seri puncak dengan m/z:

183, 169, 155, 141 dan 127. Puncak-puncak ini menunjukkan kemiripan dengan spektrum masa isolat fraksi heksana *H.durvilae* (Gambar 5.32). Puncak-puncak hasil fragmentasi disajikan pada Tabel 5.14. Pola fragmentasi tersebut sebagai akibat adanya pemutusan yang disajikan pada Gambar 5.33

**Tabel 5.14. Puncak-Puncak Hasil Fragmentasi ESMS Isolat Fraksi *n*-heksana *H.durvilae*,**

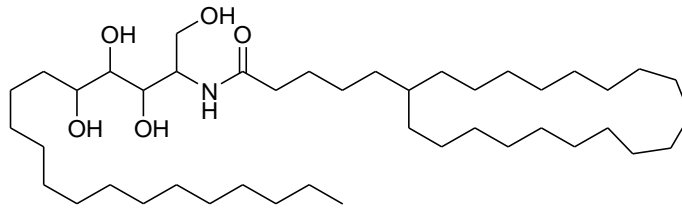
Puncak m/z	Fragmen yang dilepaskan	
241	M <sup>+</sup>	(ion molekul)
225	M-17	(M- -OH)
197	M-45	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{M} - \text{C} - \text{OH} \end{array}$
183	M-59	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{M} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{OH} \end{array}$
169	M-73	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{M} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{OH} \end{array}$
155	M-87	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{M} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{OH} \end{array}$
141	M-95	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{M} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{OH} \end{array}$
127	M-109	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{M} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{OH} \end{array}$
113	M-123	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{M} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{OH} \end{array}$
99	M-137	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{M} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{OH} \end{array}$



**Gambar 5.33. Pola Fragmentasi Asam Pentadekanoat**

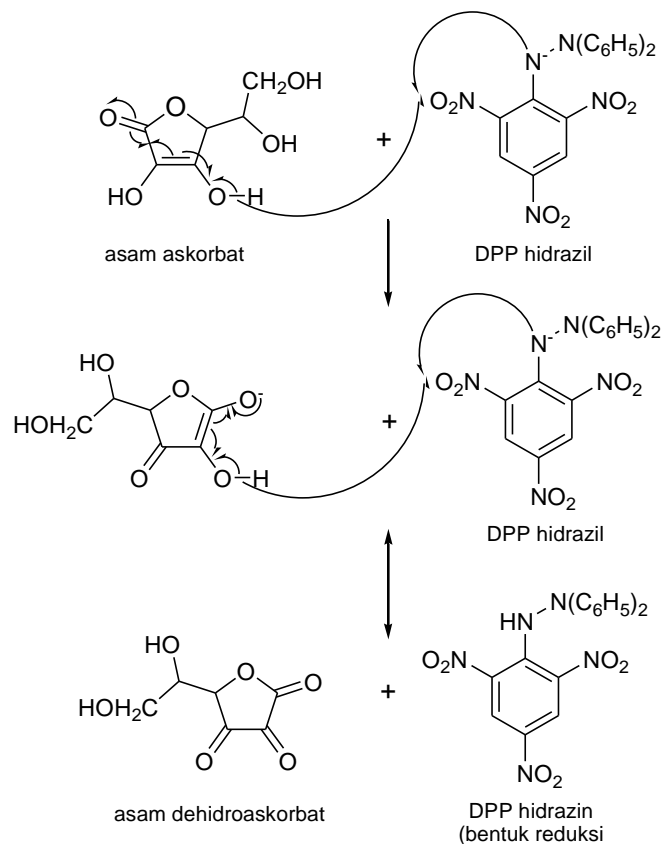
### 5.3.6. Pembahasan

Hasil isolasi dan pemurnian dengan KLT dan KK serta elusidasi dengan dengan C-NMR, H-NMR, DEPT 135, HMBC, HMBC, FTIR dan MS, menunjukkan bahwa isolat murni fraksi heksana *H.durvilae* (F-H-3-3-9) adalah asam lemak pentadekanoat ( $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_2$ ), dengan berat molekul 242. Beno *et al.*, 1990 melaporkan hasil isolasi dan identifikasi senyawa murni rumput laut merah *Halymenia porphyroides* adalah N-[2,3,4-trihidroksil-1-(hidroksimetil) octadesil] siklo nonadekanepentanamida (Gambar 5.34), dengan komposisi C 74.19%; H 12.31%; N 2.01%; O 11.49%. dengan berat molekul 696.148.



**Gambar 5.34. Struktur Senyawa *H. porphyroides* (N-[2,3,4-trihidroksil-1-(hidroksimetil) octadesil] siklononadekanepentanamida (Beno *et al.*, 1990)**

Aktifitas antioksidan DPPH asam pentadekanoat fraksi heksana *H.durvillae* adalah lebih besar 800 ppm, hal ini berarti bahwa senyawa pentadekanoat bersifat sebagai donor elektron atau proton yang mungkin disebabkan oleh adanya ikatan rangkap pada gugus karboksil yang bersifat mendonor elektron atau proton. Uji Aktifitas antioksidan berdasarkan kemampuan sampel untuk mereduksi radikal bebas stabil DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH, akan menetralkan karakter radikal bebas DPPH (Molyneux, 2004, Huang dan Prior, 2005,). Mekanisme reaksi DPPH dengan vinil karboksilat (asam askorbat ) (dapat dilihat pada Gambar 5.35. Asam askorbat adalah antioksidan multi fungsi dengan aktifitas memadamkan singlet oksigen, mereduksi radikal bebas, radikal antioksidan primer, dan mengeluarkan molekul oksigen karena kehadiran ion logam (Acoh dan Min, 2008).

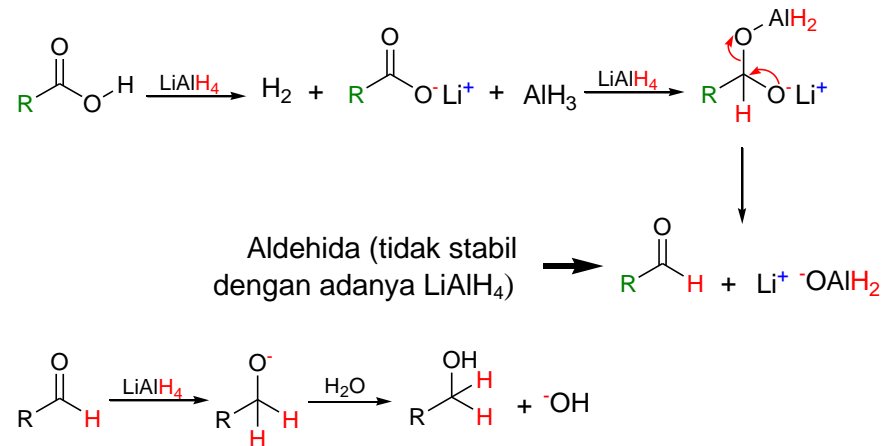


**Gambar 5.35. Mekanisme Reaksi Asam Karboksilat dengan DPPH.**

Asam lemak pentadekanoat fraksi heksana *H.durvilae* dapat mempunyai aktifitas daya reduksi, karena asam-asam organik mempunyai kemampuan untuk mereduksi. Kemampuan mereduksi ekstrak kimia atau senyawa umumnya tergantung pada reduktan yang berperan sebagai antioksidan melalui memecah rantai radikal bebas dengan donasi atom hydrogen (Acoh dan Min, 2008).

Menurut Hildebrandt *et al.*, 2013, asam karboksilat dapat mereduksi logam dan akan menjadi keton, aldehida dan alkohol. Mekanisme reduksi asam karboksilat dengan lithium aluminium nitrat sebagai berikut: pertama-tama terjadi reaksi asam basa dimana terbentuk anion asam karboksilat. Anion asam karboksilat secara nukleofilik diserang oleh sebuah hidrat yang disuplai oleh aluminium hidrat, yang akan membentuk kompleks karbonil oksigen oleh sisa aluminium. Eliminasi

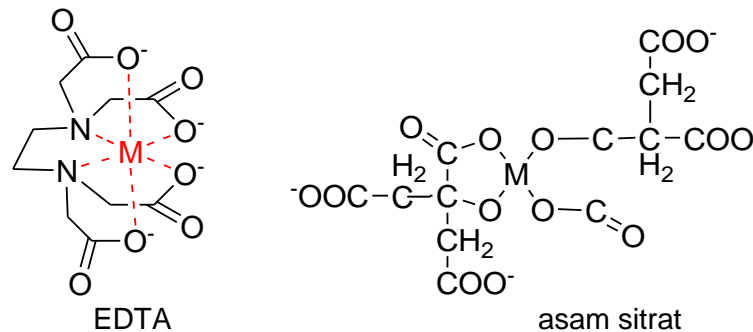
oxoaluminium anion hidrat menghasilkan aldehyd. Karbon karbonil aldehyd masih bersifat elektrofilik, karena itu secara nukleofilik diserang oleh anion berikut yang disuplai oleh hidrat aluminium lithium, sehingga hidrolisis terjadi menghasilkan alkohol primer (Gambar 5.36)



**Gambar 5.36. Mekanisme Reduksi Lithium Aluminium oleh Asam Karboksilat (Hildebrandt et al., 2013).**

Isolat murni fraksi *n*-heksana *H.durvilae* dapat berfungsi sebagai pengkelat ion. Pengkelat logam dapat menurunkan pengaruh prooksidasi melalui potensial redoksnya dan menstabilkan bentuk logam teroksidasi. Jenis asam organik yang dapat bersifat sebagai pengkelat logam yaitu asam fosforic, asam sitrat, asam askorbat, ethylene diamin tetra asetat (EDTA) asam lipoat dan lain-lain. Sifat pengkelat ion asam lemak yaitu melalui pembentukan kompleks logam atau garam bebas, atau koordinasi senyawa. Pengkelat asam organik paling sedikit memiliki 2 mol ligan dan satu mol logam (M) seperti yang ditunjukkan pada gambar berikut (5.37).

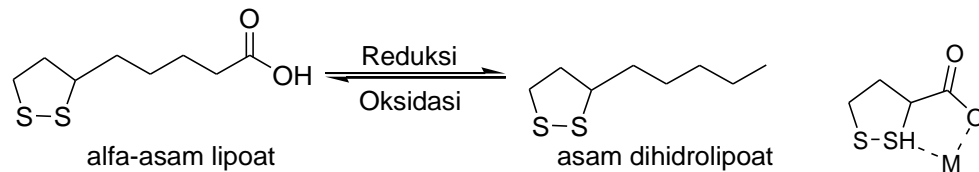




**Gambar 5.37. Pengkelat Ion EDTA dan Asam Sitrat (Swaran, 2002)**

Swaran *et al.*, 2002, Wiberg (2001) melaporkan bahwa didalam koordinasi kimia,  $\text{EDTA}^{4-}$  adalah ligand golongan amino poli asam karboksilat, biasanya mengikat kation logam melalui dua amin dan 4 karboksilat. menghasilkan banyak koordinasi senyawa. Oktahedral kompleks EDTA adalah kiral.anion  $[\text{Co}(\text{EDTA})]$  diuraikan menjadi enantiomer. Menurut DeBusk, 2002 kompleks  $\text{EDTA}^{4-}$  mengadopsi lebih banyak struktur kompleks melalui penambahan sebuah ikatan pada air dan penukaran tempat satu tangan karboksilat oleh air (7 koordinat kompleks, Bentuk kompleks EDTA adalah relevan untuk aplikasi, karena densitasnya tinggi dan mempunyai afinitas yang tinggi untuk kation logam. EDTA membentuk kompleks yang kuat terutama dengan  $\text{Mn}(\text{II})$ ,  $\text{Cu}(\text{II})$ ,  $\text{Fe}(\text{III})$ ,  $\text{Pb}(\text{II})$  dan  $\text{Co}(\text{III})$ . ), dimana kompleks ferri EDTA adalah 7 koordinat.

L-2-oxothiazolidin-4-asam karboksilat atau asam lipoat (AL) adalah turunan thiazolidin, berfungsi meningkatkan sistein dan GSH.  $\alpha$ -asam lipoat direduksi menjadi asam dihydro lipoat (DHAL) oleh lipoamide dehidrogenase (5.38). DHAL adalah thiol yang reaktif mereduksi GSSG menjadi GSH juga mempengaruhi tingkat oksidasi thioedoksin dan protein lain yang mengandung thiol (Park *et al.*, 2012).



**Gambar 5.38. Mekanisme Pengkelat Ion Asam Lipoat (Swaran, 2009).**

Sifat mengkelat ion DHLA membantu tubuh membersihkan toksin tercernak yang terakumulasi yang dapat menyebabkan kematian sel karena pecahnya lisosom. Besi intralisosom yang mengkatalisa reaksi Fenton dapat merusak membran lisosom. Pengaruh antioksidan AL melalui interaksi dengan radikal peroksil, radikal askorbil vitamin C. AL meregenerasi GSH dari GSSG dan asam dihidrolipoat (DHLA), mendaur ulang (*recycling*) asam askorbat dan dihidroksi asam askorbat (DHAA). DHAA juga membentuk kembali vitamin C (Swaran, 2002).

Beberapa hasil penelitian melaporkan bahwa asam lemak alga laut yang mempunyai kemampuan mengkelat ion bersifat sebagai antikanker. Asam lemak sebagai molekul bioaktif yang mempunyai tingkat sitotoksik yang berbeda terhadap sel kanker (Kim *et al.*, 2006). Kriteria pengkelat logam berat adalah harus dapat memasuki sel dengan mudah, mengkelat logam dari kompleksnya dengan metalothionin atau protein lain dan meningkatkan eksresi logam tanpa redistribusi pada organ atau jaringan lain. Jika antioksidan memiliki kriteria-kriteria ini maka senyawa pengkelat logam yang digunakan untuk terapi tidak akan ada efek samping (Swaran, 2009).

Pengaruh toksik dan karsinogenik pada manusia dan hewan karena logam berat tertentu. Toksik dan karsinogenik logam berat dapat bereaksi dengan inti protein dan DNA menyebabkan deteriorasi makromolekul biologi. Penelitian 2 dekade

terakhir menunjukkan besi, cadmium, chromium, merkuri, arsenic memiliki kemampuan memproduksi radikal bebas dimana reaksi rantai menghasilkan oksidasi lipida seperti peroksidasi lipida, oksidasi protein, oksidasi DNA dan RNA (Swaran, 2009).

Berdasarkan hasil penelitian isolasi dan elusidasi menunjukkan bahwa alga laut merah banyak mengandung jenis-jenis asam lemak, dan berdasarkan uji in-vitro maupun in-vivo terbukti mempunyai banyak sifat biofungsional yang sangat bermanfaat untuk kesehatan. Menurut Nassir *et al.*, 2011, pemisahan dan pemurnian komponen senyawa ekstrak etil asetat alga laut merah *Hypnea flagelliformis* dikerjakan dengan silica gel KK dan HPLC untuk mendapatkan senyawa murni. Elusidasi dengan H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, HMBC, HSQC, DEPT, and EI-MS. Berdasarkan hasil interpretasi struktur senyawa isolat *H. flagelliformis* sebagai 22-dehidrokolesterol, kolesterol, asam oleat, kolesterol oleat, dan (22E)-cholesta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol-7-one.

Komposisi asam lemak *Laurencia brandenii* fraksi aktif adalah 9,12, asam oktadekanoat (Z,Z)-(49.75%) diikuti oleh asam heksanoat 14.24%, dimana asam lemak ini dapat mempunyai aktifitas biologi (Manilai *et al.*, 2009). Hasil analisa GC-MS menurut Huang and wang (2004) pada kandungan lipofilik beberapa alga laut dari pantai Qingdao menunjukkan senyawa dominan adalah asam heksadekanoat, asam eikosa pentanoat dan asam 9-oktadekanoat.

Banyak dari struktur ekstrak alga diidentifikasi sebagai asam lemak dan hidroksil asam lemak tak jenuh, glikolipid, steroid, fenolik, terpenoid, asam laurat, asam palmitat, asam linolenat, asam oleat dan asam stearat, yang diketahui mempunyai aktifitas antibiotik dan antifungal. Sejumlah besar ekstrak alga ditemukan mempunyai aktifitas antimikroba.

Rhodophyta kaya akan glikolipida, diikuti oleh lipida netral dan phospholipida (Bhaskar *et al.*, 2004). Beberapa halogenat dengan bromin, khlorin dan yodium alga merah mempunyai aktifitas antibakteri, ichtiotoksik, antioksidan, antimalaria, insektisidal dan sitotoksik (Mao *et al.*, 2010). Asam lemak sebagai molekul bioaktif mempunyai tingkat sitotoksik yang berbeda terhadap sel kanker (Suzuki *et al.*, 2001).

Spesies makro alga laut umumnya mengandung zat gizi yang penting C18 dan C20 PUFA termasuk n-3 PUFA berada dalam jumlah yang substansial tinggi sebagai antiarthimik, anti inflamasi dan anti thrombotik (Kumari *et al.*, 2013 dan Gillies *et al.* 2011). Mohammed *et al.*. (2004) melaporkan bahwa asam oleat memiliki pengaruh melawan komplikasi kardivascular, diabetes karena tingkat glutathion (GSH), total lipid, triasilgliserol (TAG) dapat terkontrol. Didalam diabetes hiperlipidemik asam lemak dapat melindungi jaringan dari resiko thrombosis (Alturfan *et al.*, 2002). Alga laut juga kaya akan sumber PUFA dan asam lemak ini yang berfungsi menghalangi pertumbuhan penyebaran sistemik kanker payudara (Deveri *et al.*, 2001).

Menurut WHO 80% populasi penduduk dunia terutama negara berkembang menyadari bahwa tumbuhan dapat berfungsi sebagai obat untuk memelihara kesehatan. Produk alam dan turunannya mempersembahkan 50% dari obat didalam penggunaan klinik, dimana 60% telah terbukti digunakan untuk pengobatan kanker dari produk alam, sebagai sumber utama vitamin C, B, E, karotenoid dan serat yang memberikan pengaruh pada pencegahan kanker. Terdapat korelasi yang positif antara konsumsi serat antioksidan alamiah, mengurangi kematian penyakit jantung koroner, dan kanker. Formulasi obat herbal untuk pencegahan dan pengobatan kanker digunakan saat ini sebagai zat khemoterapi.

Menurut Shahidi, 2009, Alga laut sebagai sumber potensial antioksidan alami tidak mengandung kontaminasi senyawa lain, dan mempunyai berbagai fungsi yang aman digunakan sebagai : obat, supplement, *nutraceutical* dan kosmetik yang bertujuan untuk memperbaiki kesehatan, mengurangi pengaruh penyakit yang berbahaya, dan aspek fungsi sistim imun.

Alga merah sebagai sumber senyawa metabolik biologi yang paling penting dibandingkan dengan alga jenis lain. Antioksidan yang terdapat alga merah, yang potensial sebagai antioksidan dan sifat antikanker dari ekstrak tanaman atau produk isolasi dari tumbuhan asli dapat dieksplorasi untuk dikembangkan sebagai obat (Boopathy dan Kathiresan, 2010).

### 5.3.3. Kesimpulan

1. Isolasi dan pemurnian senyawa aktif fraksi *n*-heksana *H. durvillae* menggunakan KLT dan KK. Pelarut yang digunakan adalah heksana-aseton. KK dilakukan sebanyak 4 kali.
3. Isolat fraksi *n*-heksana *H.durvillae* dengan uji kualitatif maupun kuantitatif menunjukkan mempunyai aktifitas antioksidan DPPH lebih besar 800 ppm.
3. Berdasarkan hasil interpretasi spektrum C-NMR, H-NMR, DEPT 135, HMQC, dan HMBC, isolat murni fraksi *n*-heksana adalah asam pentadekanoat (C<sub>15</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>).
4. Berdasarkan interpretasi spektrum FTIR isolat fraksi *n*-heksana *H.durvillae*, memiliki gugus fungsi CH-sp<sup>3</sup> dan C=O yang adalah karbonil asam karboksilat.
5. Berdasarkan interpretasi spektrum ESMS, diduga isolat fraksi *n*-heksana *H.durvillae* adalah asam pentadekanoat dengan berat molekul m/z 242.

## BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1 Kesimpulan

1. Konsentrasi metanol memberikan pengaruh ( $p>0.05$ ) terhadap aktifitas antioksidan alga laut *Gracilaria salicornia*, *Sargassum oligocystum*, *Turbinaria decurens*, *Halimeda macroloba* dan *Halimena durvilae*.
2. Konsentrasi ekstrak metanol 30% *S.oligocystum*, *T.decurens*, dan *H.macroloba* mempunyai aktifitas Pengkelat Ion tertinggi.
3. Konsentrasi metanol 70% *G.salicornia* dan *H.durvilae* mempunyai Kadar Total Fenol, DPPH, Daya Reduksi dan Pengkelat Ion tertinggi.
- 4..Merupakan suatu kebaruan dalam menemukan Aktifitas antioksidan alga laut *Gracilaria salicornia*, *Sargassum oligocystum*, *Turbinaria decurens*, *Halimeda macroloba* dan *Halimena durvilae* dari perairan Sulawesi Utara.
5. Alga laut *H.durvilae* pada konsentrasi ekstrak metanol 70% mempunyai rendemen hasil ekstraksi tertinggi, Kadar Total Fenol dan nilai DPPH tertinggi serta daya reduksi yang tinggi yang tidak berbeda nyata ( $p>0.05$ ) dengan *G.salicornia*.
6. Hasil fraksinasi ekstrak metanol 70% *H.durvilae* menunjukkan bahwa pelarut heksana, kloroform dan air mempunyai kadar total fenol, DPPH, Daya Reduksi dan Pengkelat ion yang berbeda.
7. Kadar Total Fenolik ekstrak metanol 70% *H. Durvilae* tertinggi adalah fraksi heksana sedangkan yang terendah pada Fraksi air. Kadar Total phenol fraksi air, fraksi heksana dan fraksi kloroform berturut-turut sebesar  $11.19\pm 0.80$  dan  $10.51\pm 0.53$  dan  $6.39 \text{ g} \pm 0.45 \text{ GAE}/100\text{g}$  ekstrak.
8. Aktifitas antioksidan DPPH tertinggi adalah fraksi air dengan ( $76.99\pm 1.89 \%$ ) diikuti oleh oleh Fraksi kloroform ( $61.06 \pm 2.13 \%$ ).

9. Aktifitas Daya Reduksi yang kuat fraksi kloroform diikuti oleh fraksi air dan fraksi heksana dengan nilai berturut-turut  $29.00 \pm 3.51$  g/100,  $23.587 \pm 0.17$  dan  $10.206 \pm 1.14$  gr GAE/100 gekstrak.

10. Fraksi *n*-heksana metanol 70% *H.durvilae* mempunyai aktifitas pengkelat ion yang paling tinggi, kemudian diikuti, fraksi kloroform dan Fraksi air yaitu masing-masing sebesar  $37.60 \pm 1.95$ ,  $15.17 \pm 1.39$  dan  $8.65 \pm 1.18\%$ .

11. Merupakan suatu kebaruan dalam menemukan kadar total fenol dan aktifitas antioksidan hasil fraksinasi dengan pelarut heksana, kloroform dan air *H.durvilae*.

12. Metoda Isolasi dan pemurnian senyawa fraksi *n*-heksana *H.durvilae* menggunakan KLT dan KK. Pada KK pelarut yang digunakan adalah *n*-heksana-aseton dengan silica gel 60 F254, pengelusidasi secara isokratik. Penampakan noda hasil KLT dilihat dibawah sinar UV 254 dan UV 365 dan setelah di KLT disemprot dengan  $H_2SO_4$ . Deteksi aktifitas antioksidant kualitatif menggunakan KLT yang telah ditotol dengan isolat setelah itu direndam dalam DPPH 0.05% dalam metanol selama 10 menit, Analisis kuantitatif menggunakan DPPH 0.05% dalam metanol dengan menghitung nilai % penghambatan.

13. Berdasarkan hasil isolasi menggunakan KLT dan KK dan uji DPPH diperoleh bahwa senyawa murni dari fraksi *n*-heksana *H.durvilae* sebanyak 11.34 mg dengan aktifitas antioksidan lebih besar 800 ppm.

14. Berdasarkan interpretasi spektrum C-NMR, H-NMR, DEPT 135, HMQC dan HMBC isolat murni fraksi heksana *H.durvilae* adalah asam pentadekanoat. Hasil pembahasan H-NMR menunjukkan adanya gugus alifatik suatu asam lemak rantai panjang dengan adanya gugus metil singlet ( $CH_3$ , s) muncul pada  $\delta H$  0.88 (t,  $J=7.2$  Hz), dan beberapa gugus metilen ( $CH_2$ ) yang muncul pada  $\delta H$  130 ( $11 \times CH_3$ ) pada  $\delta H$  168 ( $CH$ , multiplet) dan pada  $\delta H$  234 (2H, t, 7,5 Hz). Berdasarkan hal ini

diduga komponen utama sebagai asam lemak ( $C_{15}H_{30}O_2$ ), komponen minornya adalah asam lemak takjenuh (0.375/2) 18%. Dugaan sebagai asam pentadekanoat diperkuat dengan hasil C-NMR, dengan adanya gugus karboksilat pada  $\delta C$  180,19, gugus metil ( $CH_3$ ) pada  $\delta C$  14.32, dan yang lain adalah beberapa gugus metil ( $CH_2$ ) disamping itu adanya sinyal-sinyal kecil dan ikatan rangkap yang muncul pada  $\delta C$  130.

15. Merupakan suatu kebaruan menemukan struktur senyawa murni dan aktifitas antioksidan *H.durvilae*.

16. Berdasarkan tafsiran spektrum FTIR serapan-serapan yang muncul terdiri dari ikatan  $sp^3$  pada bilangan gelombang 2 920,23 dan 2852.72  $cm^{-1}$  dan karbonil pada bilangan gelombang 1703 yang merupakan karbonil asam karboksilat.

17. Merupakan suatu kebaruan menemukan beberapa gugus fungsi isolat murni *H.durvilae*.

18. Berdasarkan spectrum ESMS senyawa isolat fraksi heksana memiliki sinyal tertinggi  $m/z$  241 artinya mempunyai bobot molekul 242 yang diduga adalah struktur asam pentadekanoat yang memiliki rumus molekul  $C_{15}H_{30}O_2$ .

19. Merupakan suatu kebaruan menemukan pola fragmentasi dan berat molekul isolat murni *H.durvilae*.



## 6.2 Saran.

1. Menguji aktifitas biofungsional *Gracilaria salicornia*, *Sargassum oligocystum*, *Turbinaria decurens* dan *Halimeda macroloba* dan *H.durvilae*.
2. Proses ekstraksi dan maserasi alga laut *H.durvilae* dilakukan menggunakan pelarut, air karena aktifitas antioksidan DPPH tertinggi terdapat pada fraksi air.
3. Mengisolasi senyawa murni *H.durvilae* menggunakan fraksi kloroform dan air.
3. .Mengukur aktifitas antioksidan daya reduksi dan pengkelat ion isolat murni *H.durvilae*.
4. Menganalisis aktifitas biofungsional fraksi heksana, kloroform dan air serta isolat murni fraksi heksana *H.durvilae*.
3. Dari semua data menerangkan alga laut *Gracilaria salicornia*, *Sargassum oligocystum*, *Turbinaria decurens* dan *Halimeda macroloba* dan *H.durvilae* dari Sulawesi Utara ini, dapat dijadikan suatu sumber senyawa antioksidan alami yang dibutuhkan untuk eksplorasi dikemudian hari, untuk dimanfaatkan sebagai makanan fungsional. maupun obat untuk pencegahan maupun pengobatan penyakit akibat stress oksidatif.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbott, I., Fisher A, J. and McDermid, K.J. 2002. Newly Reported and Revised Marine Algae from the Vicinity of Nha Trang, Vietnam. In: *Taxonomy of Economic Seaweeds with Reference to Some Pacific Species*, Vol. 8: 291-321.
- Abourriche, A., Charrouf, M., Berrada. M., Bennamara, A., Chaib, N. and Francisco C. 1999. Antimicrobial Activities and Cytotoxicity of the Brown Algae *Cytoseira tamariscifolia*. *Fitoterapia*, 70: 611–614.
- Aguinaldo, A.M., Espeso, El., Guevara, B.Q. and Nonato, M.G. 2005. Phytochemistry. In: Guevara BQ (ed.) *A Guidebook to Plant Screening: Phytochemical and Biological*. University of Santo Tomas, Manila, Philippines.
- Ahn, C.B., Joon Y.J. and Kang D.S. 2004. Free Radical Scavenging Acrivity of Enzymatic Extract from a Brown Seaweed *Scytophon lomentaria* by Electron Spin Resonance Spectrometry. *Journal of Food Research International* 37: 253-258.
- Ahn, G.N., Kim, K.N., Cha, S.H., Song C.B. and Lee J. 2007. Antioxidant Activities of Phlorotannins Purified from *Ecklonia cava* on Free Radical Scavenging Using ESR and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mediated DNA Damage. *Eur. Food Res.Technol.*, 226: 71-79.
- Acoh, C.C. and Min B.D. 1997. Food Lipid Chemistry. In *Nutrition Biotechnology*, New York: Marcel Dekker Inc.
- Andjelkovic, M., Cham, J.V., Meulenaer, B.M., Depaemalaere,G., Cocaciu C., Verlo, M. and Verhe, R. 2006. Iron Chelating Properties of Phenolic Acid Bearing Catechol Groups. *Food Chem*, 99: 23-31.
- Anggadiredja, J., Irawati, S. dan Kusmiyati. 2006. *Algae: Pembudidayaan, Pengolahan, dan Pemasaran Komoditas perikanan Potensial*, Jakarta: Penebar Swadaya.
- Arlyza, I., 2005, Phycocyanin dari Mikroalga Bernilai Ekonomis Tinggi sebagai Produk Industri, *Oseana* Vol. 30. No. 3: 27-36.
- Armitage, D.B., Hettarachchy, N.S. and Monssor M.A. 2002. Natural Antioxidants as a Component of an Egg Albumin Film in the Reduction of Lipid Oxidation in Cooked and Uncooked Poultry. *J.Food Science* 67 : 631 – 634.
- Arnold, T.M. and Targett, N.M. 2000. Evidence for Metabolic Turnover of Polyphenolics in Tropical Brown Algae. *J. Chem. Ecol.*, 26: 1393-1408

- Atmadja, 1996. Pengenalan Jenis Alga Merah (Rhodophyta). Pengenalan Jenis-Jenis Alga Indonesia. Jakarta Puslitbang Oseanologi LIPI.
- Atmadja, W.S., Kadi,A., Sulistijo dan Rachmaniar S. 1996. Pengenalan Jenis-jenis Algae Indonesia. Jakarta Puslitbang Oseanologi LIPI.
- Barsanti, L. and Gualtieri, P. 2006. Alga: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology. Taylor & Francis Group, *CRC Press*, 320 pages.
- Basu, T.K., Temple, N.J. and Garg, M.L. 1999. Antioxidants and Human Health and Disease. CABI Publishing. New York. USA, 450 p.
- Bhaskar, N. and Miyashita, K. 2005. Lipid Composition of *Padina Tetratomica* (Dictyotales, Phaeophyta), Brown Seaweed of the West Coast of India. *Ind J. of Fish*, 52: 263-268.
- Blunt, J.W., Copp, B.R, Munro, M.H.G., Northcote, P.T. and Prinsep, M.R. 2003. Marine Natural Products. *Nat. Prod Rep*, 20:1–48
- Boonchum, W., Y. Peerapornpisal, P. Vacharapiyasophon, J. Pekkoh, C. Pumas, U. Jamjai, D. Amornlerdpison, T. Noiraksar and D.Kanjanapothi, 2011. Antioxidant Activity of Some Seaweed from the Gulf of Thailand. *Int. J. Agric. Biol.*, 13: 95–99.
- Boopathy, N.S. and Kathiresan, K. 2010. Anticancer Drugs from Marine Flora: An Overview. *Journal of Oncology*. Volume 2010, Article 18 pages.
- Botsoglou, N.A., Gririporopoulou, S.H., Botsoglou, E., Govaris, A. and Papageorgiou G, 2003. The Effect of Dietary Oregano Essential Oil and Tocoferyl Acetate on Lipid Oxidation in Raw and Cooked Turkey During Refrigerated Storage. *Journal of Meat Science* 65 (2003) 1193-1200.
- Brand-Williams, W., Velier, M.E.C.U. and Berset, C. 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *Lebensmittel-wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30.
- Burtin, P. 2003. Nutritional Value of Seaweeds. *Electron. J. Environ. Agric. Food chem.*, 2:498-503.
- Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros M.P., Falcão V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza Anderson, O., Colepicolo, P. and Pinto, E 2007. Metabolites from algae with Economical Impact. *Comparative Biochem. Physiol, Part C*. 146: 60-78.
- Chakraborty, K., . Praveen, N.K., Vijayan, K.K. and Rao,G.S. 2013. Evaluation of Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Brown Seaweeds Belonging to *Turbinaria* spp. (Phaeophyta, Sargassaceae) Collected from Gulf of Mannar Asian Pac. *J. Trop. Biomed*, 3(1): 8–16.

- Chandini, S.K, Ganesan, P. and Baskhar, N. 2008. In Vitro Antioxidant Activities of Three Selected Brown Seaweeds of India. Science Direct. Food Chemistry, 107:707-713.
- Chang, S.S., Wu, J.W., Min-Hsiung lee and Chi-Tang Ho. 1982. Elucidation of the Chemical Structures of Natural Antioxidant Isolated from Rosemary. JAOCS. Vol.59.No.8.
- Chen, Y., Shaofang Liu, Cui, Y., Jiang P., Chen, H., Li, F., and Qin, S. 2011. Biosynthesis and Immobilization of Biofunctional Allophycocyanin, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume, Article ID 751452, 6 pages.
- Chew, Y.L., Lim, Y.Y., Omar, M. and Khoo, K.S. 2008. Antioxidant Activity of Three Edible Seaweeds from Two Areas in South East Asia. Science Direct LWT, 41: 1067-1072.
- Cle Ine´s, C., Argandona, V.H., Rovirosa, J., San-Martín, A., D´yaz-Marrero, A.R., M. Cueto, M. and Gonza´lez-Coloma, A. 2004. Cytotoxic Activity of Halogenated Monoterpenes from *Plocamium cartilagineum*. Z. Naturforsch, 59c: 339-344.
- Connan, S., F. Delisle, E. Deslandes and E.A. Gall, 2006. Intra-Thallus Phlorotannin Content and Antioxidant Activity in Phaeophyceae of Temperate Waters. Bot. Mar., 49: 34-46.
- Cordozo, K.H.M., Guarantini, T., Baros, M.P., Falcao, V.R., Tanon, A.P., Lopes, N.P., Campos S., Torres, M.A., Anderson, O.S. Colepecolo, P. and Pinto E. 2007. Metabolites from Algae with Economical Impact. Comparative Biochem. Part C. 145:60-78.
- Cornish, L.M., and Carbery, D.J. 2010. Antioxidant from Macro-Algae: Potential Applications in Human Health and Nutrition. Alga, 25(4):1-17.
- Cox, S., Abu-Ghannam, N. and S. Gupta, 2010. An Assessment of the Antioxidant and Antimicrobial Activity of Six Species of Edible Irish Seaweeds. Int. Food Res. J., 17: 205-220.
- Cunningham, S., and Joshi, I. 2010. Transgenic Crop Plants, Cole, C. Ed. Springer-Verlag Berlin, Heiderberg. 343-357.
- Dali, S., Natsir, H., Usman, H. and Ahmad, A 2013. Bioactivity of Protein Fraction in Brown Algae, *Turbinaria decurrens*, as Antibacterial Agent. Marina Chimica Acta, 14 (1).
- Dawczynski, C., Schubert, R. and Jahreis, G. 2007. Amino Acids, Fatty Acids, and Dietary fibre in Edible Seaweed Products. Food Chemistry, 103:891-899.

- De Busk, R. 2002. "Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)". Retrieved 2007-07-25.
- Deninov, E.T. and Aranas'ev, I.B. 2005. Oxidation and Antioxidant Inorganic Chemistry and Biology.
- Devery, R., Miller, A. and Stanton, C. 2001. Conjugated Linoleic Acid and Oxidative Behavior in Cancer Cells. *Biochem. Soc. Trans*, 29: 341-344.
- Devi, K.P., Suganthy, N., Kesika, P. and Pandian, S.K. 2008. Bioprotective Properties of Seaweeds: *In vitro* Evaluation of Antioxidant Activity and Antimicrobial Activity Against Food Borne Bacteria in Relation to Polyphenolic Content *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8(3): 882-888.
- Devi, G.K., Manivannan, K., Thirumaran, G., Rajathi, F. A. A. and Anantharaman, P. 2011. In Vitro Antioxidant Activities of Selected Seaweeds from Southeast Coast of India *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 205-211.
- Dias P.F., Siqueira, J.M. Jr. and L. F. Vendruscolo, "Antiangiogenic And Antitumoral Properties of A Polysaccharide Isolated from The Seaweed *Sargassum Stenophyllum*," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, Vol. 56, No. 4, Pp. 436-446, 2005. View at Publisher · View At Google Scholar · View At Scopus.
- Diaz, M.N., Frei, B., Vita, J.A. and Keaney, J.F. Jr. 1997 Antioxidants and Atherosclerotic Heart Disease. *N. Engl. J. Med.* 337: 408-416.
- Duan, X., Zhang, W., Li, X. and Wang, B. 2006. Evaluation of Antioxidant Property of Extract and Fractions Obtained from a Red Algae, *Polysiphonia Urceolata*. *Food Chem.*, 95: 37-43.
- Dudonné, S., Vitarc, X., Coutière, P., Woillez, M. and Mérillon, J. 2009. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD And ORAC Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 1768-1774.
- Ellouali, M., Boisson-Vidal, C., Durand, P. and Jozefonvicz, J. 1993. Antitumor Activity of Low Molecular Weight Fucans Extracted from Brown Seaweed *Ascophyllum Nodosum*," *Anticancer Research*, Vol. 13, no. 6, pp. 2011-2019.
- Fang, Y.Z., Yang, S and Wu, G. (2002). Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*. 18: 872-879.
- Fayaz M., Namitha, K.K., Murthy, C., Swani, K.M. Sarata, M., Khanam, S.R., Subbarao, P.V and Ravishankar G.A., 2005. Chemical Composition, Iron

- Bioavailability, and Antioxidant Activity. J. of Food Agriculture and Food Chemistry, 53,792-797.
- Fereira, L.G., M.D. Nosedá, M.D., A.G. Goncalves, D.R.B. Ducatti, M.T. Fujii, and M.E.R. Duarte. 2012. Chemical Structure of the Complex pyrUVilated and Sulfated Agaran from the Red Seaweed *Palisada flagelifera* (Ceramilales, Rhodophyta). Carbohydra. Res. 347, 83-94.
- Gamal, A.A.E. 2009. Biological Importance of Marine Algae. Saudi Pharm 18(1):1–25.
- Ganesan, P, Kumar, C.S., and Baskar, N. 2008. Antioxidant Properties of Methanol Extract and Its Solvent Fraction Obtain from Selected Index Red Sea Weeds. Journal Science Direct. Bioresources Technology 99(2008) 2717-2723.
- Gillies, P.J. Harris W.S. and Kris-Etherton P.M. 2011. Omega-3-Fatty Acid in Food and Pharma: The Enabling Role of Biotechnology. Curr. Atheroscler. Rep. 13. 467-473.
- Gluzman N.E.R, Laredo, R.F.G., Perez, F.J.I., Brumen C.A.N. and Infante, J.A.G. 2007. Effect of Pressure Cooking on The Aktifivity Antioxidant of Extracts from Three Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L) Cultivars. Journal of Food Chemistry 100 (2007) 31-35.
- Grimble, R.F., Modification of Inflammatory Aspects of Immune Function by Nutrients, *Nutrition Research*, 18:1297-1317, 1998.
- Gross, H., D. E. Goeger, Hills P. et al., “Lophocladines, Bioactive Alkaloids from The Red Algae *Lophocladia* sp,” *Journal of Natural Products*, vol. 69, no. 4, pp. 640–644, 2006.
- Guimarães, S. M. P. B. and Fujii, M. T, 1998. Two Species of *Foliose* Halymenia (*Halymeniaceae*, Rhodophyta) from Brazil. *Botanica Marina* vol. 41. P 495-504
- Gupta, S. and Abu-Ghannam, N. 2011. Bioactive Potential and Possible Health Effects of Edible Brown Seaweeds. *Trends Food Sci. Technol.*, 22: 315-326.
- Gurav, S., Deshkar, N., Gulkari, V. N., Duragkar, A. and Patil, A. 2007, Free Radical Scavenging Activity of *Polygala chinensis* Linn, *Pharmacologyonline*, 2 : 245-253.
- Hadad, P. and Hadad, P. 2002. Sampel Preparation in Chromatography, *Journal of Chromatography Library*. 1-930 p.
- Halliwell, B. 2007. “Dietary Polyphenols: Good, Bad, or Indifferent for Your Health?” *Cardiovascular Research*, vol. 73, no. 2, pp. 341–347,

- Halliwell, B. and Chirico, S. 1993. Lipid peroxidation: Its Mechanism, Measurement, and Significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57: 715S-724S; Discussion. 724S-725S.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd Ed. Oxford University Press-New York, pg.106.
- Halliwell, B., J.M. Gutteridge, and C.E. Cross. (1992). Free Radicals, Antioxidant and Human Disease: Where Are We Now? *J. Lab. Clin. Med.* 119: 598-620.
- Haslam, H. and Cui Y. 1994 Plant Pofenol (Vegetable Tannins): Gallic Acid Methabolism. *Nat.Prod. Rep.* 11. 41-66.
- Hemström, P. and Irgum, K. (2006). "Hydrophilic Interaction Chromatography". *Journal of Separation Science* 29 (12): 1784–821.
- Hildebrandt, H., Höfker, U. and Fels, G.. 2013. Reactions with Organolithium Compounds and Metal Hydrides: Reactions of Carboxylic Acids. Wiley Information Services GmbH. Chem Garoo. 1-6.
- Holdt, S.L. and Kraan, S. 2011. Bioactive Compounds in Seaweed: Functional Food Applications and Legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23 (3), 543-597.
- Huang, D., Ou, B. and Prior, R.L.. 2005.The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem.* 53: 1841-1856.
- Huang, X., Zhou, H., and Zhang, H. 2006. The Effect of *Sargassum fusiforme* Polysaccharide Extracts on Vibriosis Resistance and Immune Activity of the Shrimp *Fenneropenaeus chinensis*," *Fish Shellfish Immunology*, Vol. 20,pp. 750-757. 12
- Huang, H.L. and Wang, B.G. 2004.Antioxidant Capacity and Lipophilic Content and Seaweeds Collected from the Qingdao Coast Line. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 52, 4993-4997.
- Huie, CW., 2002 A review of Modern Sample-Preparation Techniques for the Extraction and Analysis of Medicinal Plants. *Anal Bioanal Chem* , 373:23-30.
- Jassbi A.R., Mohabatia, M., Eslamia, S. Sohrabipourb, J. and Miria, R. 2008. Biological Activity and Chemical Constituents of Red and Brown Algae from the Persian Gulf. *J. Appl. Phycol.*, 40: 215-223.
- Jiang, H., Zhan, W.Q., Liu, X.. and Jiang S.X. 2008. Antioxidant Activities of Extracts and Flavonoid Compounds from *Oxytropis falcate* Bunge. *Nat. Prod. Res.* 22(18): 1650-1656.

- Jiménez, R., Dorta, F., Medina, C., Ramírez, A., Ramírez, I. and Peña-Cortés, H. 2011 Anti-Phytopathogenic Activities of Macro-Algae Extracts .Mar Drugs.; 9(5): 123-131.
- Juntachote, T., Berghofer, E. Sliebenhandle, S. and Bauer, F. 2007. Antioxidative Effect of Added Dried Holy Basil and Its Ethanol Extracts Activity of *Polygala chinensis* Linn, *Pharmacologyonline*, 2 : 245-253.
- Kangralkar V.A., Patil, S.D. and Bandivadekar, R.M. 2010. Oxidative Stress and Diabetes: A Review. International Journal of Pharmaceutical Applications. Vol 1. Issue 1, 38-45.
- Kelman, D., Posner, E. K., McDermid, K. J., Tabandera, N. K., Wright, P. R. and Wright, A. D. 2012. Antioxidant Activity of Hawaiian Marine Algae. Mar Drugs; 10(2): 403–416.
- Khotimah, K.K., Darius, D D. and Sasmito, B. B. Uji Aktivitas Senyawa Aktif Algae Coklat (*Sargassum fillipendulla*) Sebagai Antioksidan Pada Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*).
- Kim, M.S., Kim, J. Y.W., Choi, H. and Lee, S. S. 2008. Effects of Seaweed Supplementation on Blood Glucose Concentration, Lipid Profile, And Antioxidant Enzyme Activities in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. Nutr Res Pract. Summer; 2(2): 62–67.
- Kim, K.N., Lee, K.W. Song, C.B. Ahn, C.B. and Jeon, Y.J. 2006. Cytotoxic Activities of Red Algae Collected from Jeju Island Against Four Tumor Cell Lines. J. food Science and Nutrition, 11: 3.
- Kitada, M., Igarashi, K., Hirose, S. and Kitagawa, 1979. H. Inhibition of lipid peroxide formation by polyamines in rat liver microsomes. Biochem Biophys Res Commun. 87: 388-394.
- Kolb, N., Vallorant, L., Milanovic, N. and Stochi. V. 2004, Evaluation of, Marine Algae Wakame (*Undaria pinnatifida* and Kombo (*Laminaria digitata japonica*) as Food Supplements 57-61.
- Koivikko, R. 2008. Brown Algal Phlorotannins: Improving and Applying Chemical Methods. University of Turku, Turku, Finland, pp: 1-61.
- Kubanek, A.S., Prusak, A.C., Snell, T.W., Giese, R.A., Fairchild, C.R., Aalbersberg, W. and Hay, M.E. Bromophycolides C.-I. from the Fijian Red Alga *Callophycus serratus*. J. Nat. Prod. 2006;69:731–735.
- Kuda, T.T., Sunekawa, M., Goto, H. and Araki Y. 2005. Antioxidant Properties of Four Edible Algae Harvested in the Noto Peninsula, Japan. J Food Compos Anal 18:625-633.



- Kuda, T., Hishi, T. and Maekawa. 2006. Antioxidant Properties of Four Edible Agae Harvested In the Noto Peninsula, Japan. *J. Food Compos. Anal.*, 625-633.
- Kuda, T. and Ikemori, T. 2009. Minerals, Polysaccharides and Antioxidant Properties of Aqueous Solutions Obtained from Macroalgal Beach-Coasts in the Noto Peninsula, Ishikawa, Japan. *Food Chem.*, 112: 575-581.
- Kumar, C.S., Sarada, D. and Rengasamy, R. 2008. Seaweed Extracts Control the Leaf Spot Disease of the Medicinal Plant *Gymnema sylvestre* Indian. *J Sci Technol.* ;3:1-5.
- Kumar, K.S., Ganesan, K. and Subba-Rao, P.V. 2008. Antioxidant Potential of Solvent Extracts of *Kappaphycus Alvarezii* (Doty) Doty-An Edible Seaweed. *Food Chem.*, 107: 289-295.
- Kumari, P., Bijo, A.J., Mantri, V.A., Reddy, C.R.K. and Jha, B. 2013. Fatty Acid Profiling of Tropical Marine Macroalgae: An Analysis from Chemotaxonomic and Nutritional Perspectives. *Phytochemistry* 86:44-56.
- Laponik, B. Wondra, A.G. and Prosek, M. 2004. Comparison of TLC and Spectrofotometric Method for Evaluation of the Antioxidant Activity of Grape and Berry Antioxidant. *J. Planar Chromatogr.*, 3, 207-212,
- Lattuca, M.E. , Pérez, A. F., Giarratano, E. and Malanga G. 2013. Baseline Levels of Biomarkers of Oxidative Damage in *Odontesthes nigrican* (Pisces, *Atherinopsidae*) from Two Coastal Areas of the Beagle Channel, Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural* 86: 453-464.
- Layse, C.F., de Almeida, H., de, S., Falcão, G. R., de M. Lima, C., de A. Montenegro, N. S., Lira, P. F., de Athayde-Filho, L. C., Rodrigues, M., de Fátima, V., de Souza, J. M., Barbosa-Filho and L. M. Batista. 2011. Bioactivities from Marine Algae of the Genus *Gracilaria*. *Natural Pharma International* 6 p.
- Lee, J.K., N. and Min, D.B. 2004) Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehen Rev. Food Sci. Food Safety.* 3: 21- 33.
- Lee, E.J. and Sung, M.K. 2003. Chemoprevention of Azoximethane Induced Rat Colon Carcinogens by Seatangle, A Fiber-Rich Seaweeds. *Plant Foods for Human Nutrition* 58,1-8.
- Liao, K. and Yin, M. 2000. Individual and Combined Antioxidant Effects of Seven Phenolic Agent in Human Erythrocyte Membran Ghosts and Phosphatidylcholine Liposome Systems: Importance of the Partition Coefficient, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48:2266-2270.

- Liao, H., Banbury, L. K. and Leach, D. N. 2008. Antioxidant activity of 45 Chinese Herbs and The Relationship with Their TCM Characteristics," Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 5, no. 4, pp. 429–434.
- Lim, S. N., Cheung, P. C., Ooi, A. E. and Ang, P. O., 2002. Evaluation of Antioxidative Activity of Extracts from A Brown Seaweed, *Sargassum siliquastrum*," Journal of Agriculture and Food Chemistry, Vol. 50, pp.3862-3866.
- Lohrmann, N. L., Logan, B. A. and Johnson, A. S. 2004. Seasonal Acclimatization of Antioxidants and Photosynthesis in *Chondrus crispus* And *Mastocarpus stellatus*, Two Co-Occurring Red Algae with Differing Stress Tolerances. Biol. Bull. 207:225-232.
- Lopes, G., Sousa, C., Silva, L.R., Pinto, E., Andrade, P.B., et al. 2012. Can Phlorotannins Purified Extracts Constitute a Novel Pharmacological Alternative for Microbial Infections with Associated Inflammatory Conditions? PLoS ONE, 7(2): e31145.
- Mac-Artain, P., Gill, C.J.R., Brooks, M., Cambell, R. and Rowland, I.R. 2007. Nutritional Value of Edible Seaweeds. Nutritional Reviews 65. 535-543.
- Maclafferty, F.W. and Turacek F. 1998. Interpretation of Mass-spectra, 4<sup>th</sup> Ed. Univ. science Book. California, USA.
- Maeda, H., Tsukui, T., Sashima, T., Hosokawa, M. and Miyashita K. 2008. Seaweed Carotenoid, Fucoxanthin, as a Multi-Functional Nutrient. Asia Pac. J. Clin. Nutr. 17:196–199.
- Mahadik, S.P., Evans, D. and Lal, H. 2001. Oxidative Stress And Role of Antioxidant and Omega-3 Essential Fatty Acid Supplementation in Schizophrenia. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 25 (3). 463-93.
- Manach, C., A., Sealbert, C., Morand, C., Remesy and Jimenez, L.D. 1999. Polyphenols, Food Sources and Bioavailability. AM.J.Clin.Nutri.79:727-747.
- Manilal, A., Sujith, S., Kiran, G. S. Selvin J. and Shakir, C. 2009. Cytotoxic Potentials of Red Alga, *Laurencia brandenii* Collected from the Indian Coast Global Journal of Pharmacology, 3 (2): 90-94, 2009
- Manivannan K., Thirumaran, G., Karthikai, G. Devi, P., Anantharaman, P. and Balasubramanian, T. 2009. Proximate Composition of Different Group of Seaweeds from Vedalai Coastal Waters (Gulf of Mannar): Southeast Coast of India Middle-East Journal of Scientific Research 4 (2): 72-77.

- Mao, S.C. and Guo, Y.W.2010. Sesquiterpens from Chinese. Red algae *Laurencia okumurai*. Chin. J. Nat.Med. 8. 321-325.
- Matanjun, P., Mohamed, S. Mustapha, N.M., Muhammad, K. and Ming, C.H. 2008. Antioxidant Activities and Phenolics Content of Eight Species of Seaweeds from North Borneo. *J. Appl. Phycol.*, 20: 367–373.
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C. and Nunez De Castro. 1999.. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry* 32:595-603.
- Matsukawa, R., Z. Dubinsky, Kishimoto, E., Masak, K., Masuda, Y. *et al.*, 1997. A Comparison of Screening Methods for Antioxidants Activity in Seaweeds. *J. Applied Phycol.*, 9: 29-35.
- Matu, E.N. and van Staden, J. 2003. Antibacterial and Anti-Inflammatory Activities of Some Plants Used for Medicinal Purposes in Kenya. *J. Ethnopharmacol.*, 87: 35–41.
- Mezzetti, A., Di Ilio C., Calafiore, A.M., Aceto, A., Marzio, L., Frederici, G. and Cuccurullo, F. 1990 Glutathione Peroxidase, Glutathione Reductase and Glutathione Transferase Activities in the Human Artery, Vein And Heart. *J. Mol.Cell. Cardiol.* 22: 935-938.
- Meenakshi, S; Manicka, D., Gnanambigai, S., Tamil M., Arumugam, M. and Balasubramaniam, T. 2009 . Total Flavonoid in-vitro Antioxidant Activity of Two Seaweeds of Rameshwaran Coast. *Global J. Pharmacol.*, 3(2), 59-62.
- Min, D.B. and Boff, J.M. 2002. Chemistry and Reaction of Singlet Oxygen in Foods. *Compr. Rev. Food Sci. Saf.*, 1: 58-72.
- Mohammed, A.S., Lai O.M., Muhammad, S.K.S., Long,K., Ghazali, H.M. and *Moringa*, O. 2003. Potentially A New Source of Oleic Acid-Type Oil for Malaysia. in: Hassan M.A., Editor. Investing in Innovation: Bioscience and Biotechnology. Selangor: Universiti Putra Malaysia Press, Serdang Press;. pp. 137–40.
- Mohan, S. and Pinto, B.M. 2007. Zwitterionic Glycosidase Inhibitors: Salacinol and Related Analogues. *Carbohydrate Research*, 342, 1551-1580.
- Molyneux, P., 2004. The Use Of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, 26: 211–219.
- Moon, J. and Shibamoto, T. 2009. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 1655–1666.
- Morales A.M., Casas-Valdes, M., Carillo-Domingues, S., Onzales Acosta, B. and Peres-gil, 2005. Chemical Composition and Microbiolgy assay of Marine

- Algae *Enteromorpha* spp. as a potential Food source. *J. Compost, anal.*18. 79-88.
- Mukai, K., Nagai, S. and Ohara, K. 2005. Kinetic Study of the Quenching Reaction of Singlet Oxygen by Tea Catechins in Ethanol Solution. *Free Radical Biol. Med.*, 39: 752-761.
- Nakai, M., Kageyama, N., Nakahara, K. and Mild, W. 2006. Phlorotannins As Radical Scavengers from The Extract of *Sargassum Ringgoldianum*. *Mar. Biotechnol.*, 8: 409-414.
- Nasir M., Saeidnia, S. Mashinchian-Moradi, A. and Gohari, A. R. 2011. Sterols from the Red Algae, *Gracilaria salicornia* and *Hypnea flagelliformis*, from Persian Gulf. *Pharmacogn Mag.* 2011 Apr-Jun; 7(26): 97–100.
- Naidu K.A. 2003. Vitamin C in Human Health and Disease is Still a Mystery ? An Overview. *Nutrition Journal* 2:7.324-331.
- Nielsen, S. 1998. *Food Analysis*. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. 628 p.
- Niki, E. 1997. Free Radicals in Chemistry and Biochemistry. (Ch. 1) In: *Food and Free Radicals*, Ed. Hiramatsu et al, Plenum Press, New York, pg.2, .
- Nonita, P. Peteros, N.P. and Uy, M. M. 2010. Antioxidant and Cytotoxic Activities and Phytochemical Screening of Four Philippine Medicinal Plants. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(5), pp. 407-414.
- Norziah, M.H and Ching, C.Y. 2000. Nutritional Composition of Edible Seaweed *Gracilaria changgi*. *Food Chemistry* 68:69-76.
- Nwosu, F., Morris, J., Lund, V.A., Stewart, H.A., Ross, A. and McDougall, G.J. 2011. Antiproliferative and potential anti-diabetic effect of phenolic-rich extracts from edible marine algae. *Food Chem.* 2011, 23, 797-810.
- Ohba, H., Victor, S., Golbuu, Y. and Yukihiro, H. (2007) *Taxonomy of Tropical Marine Plants of Palau* PICRC & JICA. pp. 153.
- Ohta, T., Sasaki, S., Oohori, T. Yoshikawa, S. and Kurihara, H. 2002.  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activity of A 70% Methanol Extract from Ezoishige (*Pelvetia Babingtonii* De Toni) And Its Effect on The Elevation of Blood Glucose Level in Rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66 (7): 1552-1554.
- Pandey, K., Verma, R.K. and Gupta, M.M. 2006. Pentadecanoic Acid  $\beta$ -D-Glucosidase from *Clerodendium inerme*. *Indian Journal*. Vol.45B. 1261-1263.

- Park S.J, Lee, K. S., Lee, S. J., Kim, S. R., Park, S. Y., Jeon, M. S., Lee, H. B. and Lee Y.C. 2012. L-2-Oxothiazolidine-4-Carboxylic Acid or  $\alpha$ -Lipoic Acid Attenuates Airway Remodeling: Involvement of Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), Nuclear Factor Erythroid 2p45-Related Factor-2 (Nrf2), and Hypoxia-Inducible Factor (HIF). *Int J Mol Sci.*, 13(7): 7915–7937.
- Patra J.K., Rath, S.K. Jena, K., Rathod, V.K. and Thato, H. 2008. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activity of Seaweed (*Sargassum* sp.) Extract:A Study on Inhibition of Glutathione-S-Transferase Activity. *Turk.J. Biol* 32 (2008) 119-125.
- Paul, R.E. and Chen, N.J. 2008. Post Harvest Handling and Storage of Edible Red Sea Weed *Glacilaria*. *Science Direct. Post Harvest Biology and Technology*, 48: 302-308.
- Pay, E.F. and Schulz, G.E. 1983. The Catalytic Mechanism of Glutathione Reductase as Derived from X-Ray Diffraction Analysis of Reaction Intermediates. *J.Biol. Chem*, 258:1752-1757.
- Pesek, J. Matyska, J., and Prabhakaran, S. J. (2005). "Synthesis and Characterization of Chemically Bonded Stationary Phases on Hydride Surfaces by Hydrosilation of Alkynes and Dienes". *Journal of Separation Science* 28 (18): 2437.
- Pokorsny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. 2001, *Antioxidants in Food: Practical applications*, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, pp. 22-69.
- Prabhasankar, P.P., Ganesan, Bhaskar, N., Hirose, A., Stephen, N., Gowda, L.R. and Miyashita K. 2009. Edible Japanese Seaweed, Wakame (*Udaria pinnatifida*) as an ingredient in pasta. *Food Chem*:115:501-508.
- Prior, R.L., Wu, X. and Schaich, X. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 4290–4302.
- Ragan, M.A. and Glombitza, K.W. 1986. Phlorotannins, Brown Algae Polyphenols. In: *Progress in Phycological Research*, Round, F.E. and D.J. Chapman (Eds.). Biopress Ltd., Bristol, UK., pp: 129-241.
- Raghavendran, H.B., Sathivel, A. and Devaki, T. 2006. Defensive Nature of *Sargassum polycystum* (Brown Algae) Against Acetaminophen-Induced Toxic Hepatitis in Rats: Role of Drug Metabolizing Microsomal Enzyme System, Tumor Necrosis Factor-Alpha and Fate of Liver Cell Structural Integrity. *World J. Gastroenterol.* 2006 Jun 28;12(24):3829-34.
- Rastian, Z., Mehranian, M., Vahabzadeh, F. and Sartavi, K. 2007. Antioxidant Activity of Extract from A Brown Algae, *Sargassum boveanum*. *Afr. J. Biotech.* (2007) 6: 2740-2745.

- Rioux, L.E., Turgeon, S. and Beaulieu, M. 2010. Structural Characterization of Laminaran and Galactofucan Extracted from the Brown Seaweed *Saccharia Longicuris*. *Phytochemistry*, 71:1586–1595.
- Rohani-Chadikolaei, K. , Abdulalian, E. and Ng, W.K. 2011. Evaluation of Proximate, Fatty Acid and Mineral Composition of Representative Green, Brown and Red Algae from the Persian Gulf of Iran as Potential Food and Food Resources *J. Food Sci. Technol.*
- Sadati, N., Khanavi, M., Mahrokh, A., Nabavi, S.M.B., Sohrabipour, J. and Hadjiakhoondi, A. 2011. Comparison of Antioxidant Activity and Total Phenolic Contents of Some Persian Gulf Marine Algae. *J. Med. plants*. Vol. 10. No.37. 73-79.
- Saeidnia, S., Gohari, A.R., Shahverdi, A.R., Permeh, P., Nasiri, M., Mollazadeh, K. and Farahani, F. 2009. Biological Activity of Two Red Algae, *Gracilaria salicornia* and *Hypnea flagelliformis* from Persian Gulf. *Phcog. Res.*, 1: 428-430.
- Saifuddin, 2000. Indonesian Fisheries Book. Ministry of Marine Affairs and Fisheries Japan International Cooperation Agency, 5-42.
- Sanaa, M.M. and Shanab. 2007. Antioxidant and Antibiotic Activities of some Seaweeds (Egyptian Isolates). *International Journal of Agriculture & Biology*, 220-225.
- Sancheti ,S., Sancheti, S. and Seo, Y.S. 2009. Chaenomeles Sinensis: A Potent  $\alpha$  and  $\beta$ -Glukosidase Inhibitor. *American Journal of Pharmacology and Taxonomy*, 4(1):8-11.
- Sanchez-Moreno, C. 2002. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food. Sci. Technol. Inter.*, 8: 121-137
- Santoso, J., Yoshie, Y. and Suzuki, T. 2004. Polyphenolic compounds from seaweeds: Distribution and their antioxidative effect. *Dev. Food Sci.*, 42: 169–178.
- Sathivel, A, Raghavendran H.R.B, Srinivasan, P. and Devaki, T. (2008) Antiperoxidative And Anti-Hyperlipidemic Nature of Ulva Lactucacruce Polysaccharide On D-Galactosamine Induced Hepatitis In Rats. *Food Chem Toxicol.*, 46:3262–3267.
- Sears, M.E. 2013. Chelation: Harnessing and Enhancing Heavy Metal Detoxification—A Review. *Scientific WorldJournal*, 2013; 1-5.
- Seo, Y., Park, K.E. and Nam, T.J. 2007. Isolation of a new chromene from the brown algae *Sargassum thunbergii*. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 28: 1831-1833.

- Shahidi, F., 2009. Nutraceuticals and Functional Food: Whole Versus Processed. *Trends Food Science Tech.*20:376-387.
- Siriwardhana, N., Lee, K.W., Kim, S.H., Ha J.W. and Jeony, J.2003. Antioxidant activity of *Hizikia fusiformis* on Reactive Spesies Oxygen Scavenging and Lipid Peroksidasi Inhibition. *Food Science Technology International*, 9,339-347.
- Socrates, G. 1994. Infrared Charakteristik Group Frequency, Table and Charge, 2'nd edition. John Whisley & Sons. New York, 249 p.
- Song, Y., Manson, J.E., Buring, J.E., Sesso, H.D. and Liu, S., 2005. Associations of Dietary Flavonoids with Risk Of Type 2 Diabetes, And Markers of Insulin Resistance and Systemic Inflammation in Women: A Prospective Study and Cross-Sectional Analysis. *Journal of the American College of Nutrition*, 24 (5), 376-384.
- Spencer, J.P., Schroeter, H., Kuhnle, G., Srai, S.K., Tyrrell, R.M., Hahn, U. and Rice-Evans, C. 2001. Epicatechin and Its in Vivo Metabolite, 3'-O-Methylepicatechin, Protect Human Fibroblasts from Oxidative-Stress-Induced Cell Death Involving Caspase -3 Activation. *Biochem J.*, 354: 493-500.
- Sroka, Z. and Cisowski, W. 2003. Hydrogen Peroxide Scavenging, Antioxidant and Anti-Radical Activity of Some Phenolic Acids. *Food Chem. Toxicol.*, 41: 753-758.
- Stadtman, E.R. and R.L. Levine. 2003. Free Radical-Mediated Oxidation of Free Amino Acids and Amino Acid Residues in Proteins. *Amino Acids*, 25: 207-218.
- Stief, T.W. 2003.The Physiology and Pharmacology of Singlet Oxygen. *Med. Hypotheses*, 60: 567-572.
- Sukoso, H., Nursyam, S., Rasminah, Ch. and Sormin, R. B.D. 2012. Potent Antibacterial and Cytotoxic Activities of *Porphyra* Sp Extract International Journal of Current Agricultural Research Vol. 1, No. 1. 19 -21.
- Supratman, U. 2010. Elusidasi Struktur Senyawa Organik. Metoda Spektroskopi untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik. Widya Padjadjaran. 404 hal.
- Suzuki, R., Noguchi, R., Ota, T., Abe, M., Miyashita, K. and Kawada T. (2001), Cytotoxic Effect of Conjugated Trienoic Fatty Acids on Mouse Tumour and Human Monocytic Leukemia Cells. *Lipids* 36, 477D482.
- Swanson, A.K. and Druehl, L.D. 2002. Induction, Exudation and The UV Protective Role of Kelp Phlorotannins. *Aquat. Bot.*, 73: 241-253.

- Swaran, J.S.F. 2009. Structural, Chemical and Biological Aspects of Antioxidants for Strategies Against Metal and Metalloid Exposure. *Oxid Med Cell Longev.* 2(4): 191–206.
- Swaran J.S. Flora\* and V. Pachauri. 2010. Chelation in Metal Intoxication. *Int. J. Environ Res Public Health*, 7(7): 2745–2788.
- Szabo, M.R., Toiuc, E., Chambro, D. and Lupea, A.X. 2007. Improve DPPH (Short Communication. Faculty of Chemistry Slovak. Acad of Science. Chem. Pap., 61 (3) 214-216.
- Tabarsa, M., Rezaei, M., Ramezanzpour, Z. and Waaland, J.R. 2002. Chemical Compositions of The Marine Algae *Gracilaria Salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva Lactuca* (Chlorophyta) as a Potential Food Source. *Journal of Sci. Food Agric.* ,92 (12) 2500-6.
- Takeshi, S., Yumiko, Y. and Joko, S. 2005, Mineral Components and Antioxidant Activities of Tropical Seaweeds. *J. Ocean University China*, 4: 205–208.
- Udomsinprasert, R., Pongjaroenkit, S., Wongsantichon, J., Oakley, A.J., Prapanthadara, L.A., Wilce, M.C. and Ketterman, A.J. 2005. "Identification, Characterization and Structure of a New Delta Class Glutathione Transferase Isoenzyme". *Biochem. J.* 388 (Pt 3): 763–71.
- Veitch, N.C. 2007. Isoflavonoids of the Leguminosae. *J. Nat. Prod. Rep.*, 24: 417-464.
- Vinayak, R.C., Sabu, A.S. and Chatterji, A. 2010 Bio-Prospecting of a Few Brown Seaweeds for their Cytotoxic and Anioxidant Ativity. *Complementary and Alternative Medicine*, Vol. 2011.1-9.
- Vijayabaskar, P. and Shiyamala, V. 2012. Antioxidant Properties of Seaweed Polyphenol from *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh, 184. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, (2012)S90-S98
- Virag, L., Szabo, E., Gergely, P. and Szabo, C. 2003. Peroxynitrite-Induced Cytotoxicity: Mechanism and Opportunities for Intervention. *Toxicol. Lett.*,140-141: 113-124 (2003).
- Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z. and Li, Z. 2008. Antioxidant Activity of Sulfated Polysaccharide Fractions Extracted from *Laminaria japonica*," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 42, no. 2, pp. 127–132.
- Wang, T., Jonsdottir. R. and Olafsdottir, G. 2009. Total Phenolic Compounds, Radical Scavenging and Metal Chelation of Extracts from Icelandic Seaweeds. *Food Chem.*, 116: 240-248.



- Wang, J. Yong-De and Fang, Y. 2012. TLC Screening Antimicrobial Extracts from Fifteen Bamboo Species and Identification Antioxidant Flavon Glycosidase from Leaves *Bambusa Textilis* MC Clure, *Molecules*. ISSN, 2420-3049.
- Wiberg, A.F.. 2001. Inorganic Chemistry. San Diego: Academic Press. ISBN 0-12-352651-5.
- Wilce, M.C. and Parker, M.W. 1994. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim. Biophys. Acta*, 1205: 1-18.
- Wilcox J.K. 2002. Investigation of an Interactive Effect of Flavonoids on the Antioxidant Activity of Alpha Tocopherol. A Dissertation for the Degree Doctor of Philosophy Faculty of North Carolina State University.
- Wong, D.W.S. 1989. Mechanism and Theory In Food Chemistry. Van Nostrand Reinhold. New York.
- Wu, X.W., Yang, M. and Huang, X. Effect of *Laminaria japonica* Polysaccharides on Radioprotection and Splenic Lymphocyte Apoptosis," *Medical Journal of Wuhan University*, vol. 25, no. 3, pp. 239–252, 2004. 197
- Xiaodong, L. and Christopher, P. 2008. New Hydrophilic Interaction/Reversed-Phase Mixed-Mode Stationary Phase and its Application for Analysis of Nonionic Ethoxylated Surfactants". *Journal of Chromatography A* 1191 (1–2): 83–89.
- Yabuta, Y., Fujimura, H., Kwak, C.S., Enomoto T. and Watanabe, E. 2010. Antioxidant Activity of the Phycoerythrobilin Compound Formed from A Dried Korean Purple Laver (*Porphyra* Sp.) During In Vitro Digestion. *Food Science Technol. Res.*, 16;347-351.
- Yan, X., Chuda, Y., Suzuki, M. and Nagata, T.1999. Fucoxanthin as The Major Antioxidant in *Hijikia Fusiformis*, A Common Edible Seaweed," *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 63, no. 3, pp. 605–607.
- Yang, E.J., Moon, J.Y., Kim, M.J., Kim, D. S., Kim, C.S., Lee, W. J.N., Lee, H. and Hyun, C.G. 2010. Inhibitory Effect Of Jeju Endemic Seaweeds on the Production of Pro-Inflammatory Mediators in Mouse Macrophage Cell Line RAW 264.7\* *J Zhejiang Univ. Sci B*. 11(5): 315–322.
- Yen, G.C, Chang, Y.C. and Chen, J.P. 2002. Antioksidant Activity of Mycelia from *Aspergillus Candidus*. *J. Food Science*, 67: 567- 572.
- Yoshie, Y., Wand, W., Hsieh, Y.P. and Suzuki, T. 2002. Compositional Difference of Phenolic Compounds between two Seaweeds, *Halimeda* spp. *J.Tokyo Univ Fish*, 88:21-24.

- Young, S. and Woodside, J.W. 2001. Antioxidant in Health and Disease. 2001. J.Clin. Pathol; 54: 176-186.
- Yuan, Y. V., Carrington, M. F. and Walsh, N. A. 2005. "Extracts from Dulse (*Palmaria Palmata*) are Effective Antioxidants and Inhibitors of Cell Proliferation in Vitro," Food and Chemical Toxicology, vol. 43, no. 7, pp. 1073–1081,
- Yuan, H., Zhang, W., Li, X., Lu, X., Li. N., Gao, X. et al., 2005<sup>b</sup>. Preparation and invitro antioxidant activity of k-carrageenan olygosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives. Carbohydrate Research, 340,685-692.
- Yuan, Y.and Walsh, N.A. 2006. Antioxidant and Antiproliferative Activity of Extraxts from A Variety of Edible Seaweeds. Food And Chemical Toxicology, 44,1144-1150.
- Zahra, R, Mehnarz, M., Farzaneh, V., Kohzad, S. 2007. Antioxidant Activity of An Extract from a Brown Algae, *Sargassum boveanum*. Afr. J. Biotechnol., 6(24): 2740-2745.
- Zakaria N.A., Ibrahim, D. Sulaiman, S. F. and Supardy, N. A. 2011 Assessment of Antioxidant Activity, Total Phenolic Content and *Invitro* Toxicity of Malaysian Red Seaweed, *Acanthophora spicifera*. J. Chem. Pharm. Res., 2011, 3(3):182-191.
- Zemke-White and Ohno, M. 1999. World Seaweed Utilisation: An End-of-Century Summary Journal of Applied Phycology 11: 369-376.
- Zhang, J., Tiller, C., Shen, J., Wang, C., Girouard G.S., Dennis D., Barrow, C.J., Miao, M. and Ewart, H.S. 2007 Antidiabetic Properties of Polysaccharide- and Polyphenolic-Enriched Fractions from The Brown Seaweed *Ascophyllum nodosum*. Can J Physiol Pharmacol. ;85(11):1116-23.
- Zhou, H., Xin, W., Sheng, Y., Sun, Z., Li, Z. and Xu, Z. 2005. In Vivo Growth-Inhibition of S180 Tumor by Mixture of 5-Fu and Low Molecular  $\Lambda$ -Carrageenan from *Chondrus ocellatus*," Pharmacological Research, vol. 51(2), 153–157,
- Zhu, Q., Huang, Y., and Chen Z., 2000. Interaction between Flavonoids and  $\alpha$ -Tocopherol in Human Low Density Lipoprotein. J. Nutr. Biochem. 11:14-21.
- Zhu, Q.Y., Hackman, R.M., Ensunsa, J.L., Holt, R.R. and Keen, C.L. 2002. Antioxidative Activities of Oolong Tea. J. Agric. Food Chem., 50: 6929–6934.
- Zubia M.C., E. Payri E. Deslandes, and J. Guezennec. 2003. Chemical Composition of Attached and Drift Specimens of *Sargassum mangarevense* and

*Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales) from Tahiti, French Polynesia. *Botanica Marina*. 46(6): 562–571,

Zubia, M., Payri, C. and Deslandes, E. 2008. Alginate, Mannitol, Phenolic Compounds and Biological Activities of two Range-Extending Brown Algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti (French Polynesia). *J. Applied Phycol.*, 20: 1033-1043.

Zubia, M., Robledo, D.Y. and Freile-Pelegrin, Y. 2007. Antioxidant Activities in Tropical Marine Macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *J. Applied Phycol.*, 19: 449-458.

## LAMPIRAN

### 6. 1. Prosedur Analisis Laboratorium.

#### Lampiran 1. Pengukuran Kadar Total Fenol dengan metoda Folin-Ciocalteau (Chew *et al*, 2008)

##### a. Pembuatan kurva kalibrasi asam galad.

Ditimbang 0.0075 gr asam Galad dilarutkan dalam 30ml aquades, diperoleh larutan asam galat induk 250 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 0. 20,40, 60,80, 100, 120, 140, 160, 180 dan 200 ppm. Kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 750 nm.

##### b. Pengukuran Kadar Fenol

1. Ditimbang 0.1 gr ekstrak dan larutkan dengan metanol pa 10ml, didiamkan semalaman.
2. Dipipet 0.1 ml ekstrak sampel dan tambahkan 1 ml larutan Folin-Ciocalteau 50%, divortex dan selama 5 menit.
3. Tambahkan 1 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7%, kemudian inkubasi selama 30 menit
4. Ukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm, pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali
5. Kadar fenol dinyatakan sebagai mg GAE/gr ekstrak.

#### Lampiran 2. Pengukuran Aktifitas Antioksidan DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), (Chew *et al*. (2008)

1. Ditimbang 0.0036 gr DPPH kemudian dilarutkan dalam metanol pa. 100 ml
2. Timbang 0,1 grekstrak sampel dilarutkan dalam metanol 10 ml
3. Pipet 0.5 ml ekstrak , ditambahkan 2 ml DPPH (93 mM), divortex kemudian diinkubasi pada ruangan gelap selama 30 menit.
4. Ukur absorbansinya dengan spectrophotometer pada panjang gelombang 517 nm

5. Aktifitas antioksidan DPPH dinyatakan dalam:

$$\% \text{ penghambatan} = [A \text{ Kontrol} - A \text{ sampel}/A \text{ Kontrol}] \times 100\%.$$

**Lampiran 3. Pengukuran Daya Reduksi (FRAP) (Chew *et al*, 2008).**

1. Pembuatan larutan buffer Fosfat pH 6.6: 62.5 ml Na phospat monobasis ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0,2 M ditambahkan 37 ml  $\text{MNa}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$  0,2 M kemudian dilarutkan dengan aquades sampai 200 ml.
2. Timbang 0,1gr ekstrak dan dilarutkan dalam 10 ml aquades
3. Pipet 1ml ekstrak sampel dan ditambahkan 1 ml buffer fosfat pH 6.6.
4. Tambahkan 1 ml  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  1%, divortex.
5. Incubasi dalam oven dengan suhu  $50^\circ\text{C}$  selama 20 menit.
6. Tambahkan 1 ml larutan TCA 10%, divortex selama 3 menit, kemudian disentrifus dengan 3000 rpm selama 10 menit.
7. Ambil larutan paling atas 1ml, tambahkan 1ml aquabides.
8. Tambahkan 0.5 ml  $\text{FeCl}_3$  0,1% dan difortex
9. Ukur absorbansi dengan spectrophotometer pada panjang gelombang 700 nm
10. Aktifitas antioksidan dinyatakan sebagai g GAE/100 g ekstrak

**Lampiran 4 Pengukuran Pengkelat ion (FIC) (Singh and Rajini (2004)**

1. Timbang 0,1 gr ekstrak dan dilarutkan dalam metanol 10 ml.
2. Pipet 0.5 ml ekstrak sampel dan tambahkan 1,85 ml aquades steril
3. Tambahkan 0.5 ml  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1mM, kemudian divortex.
4. Tambahkan 0.1 ml Ferozin 0,25 mM dan divortex, setelah itu diinkubasi 20 menit
5. Ukur absorbansinya dengan spectrophotometer pada panjang gelombang 562 nm
6. Aktifitas antioksidannya dinyatakan sebagai % kemampuan mengkelat.

$$\% \text{ penghambatan} = [A \text{ Kontrol} - A \text{ sampel}/A \text{ Kontrol}] \times 100\%.$$

**Lampiran 5. Prosedur NMR (JMN-ECA, 2004)**

1. Sampel senyawa organik hasil isolasi dilarutkan dengan pelarut organik deuterium yang sesuai.
2. Masukkan contoh yang telah dilarutkan ke dalam tube NMR.
3. Tube NMR berisi contoh dimasukkan ke dalam *sample holder* dan ditera menggunakan *sample gauge*.
4. Setelah ditera, tube NMR berisi contoh dimasukkan ke dalam *super conductor magnet* (SCM) dengan cara meng “click” tombol *load sample*.
5. Pilih jenis pelarut deuterium yang sesuai dengan pelarut deuterium yang digunakan.
6. Klik tombol “*Expmnt*” pada *Spectrometer Control Window* untuk memilih jenis analisa yang akan digunakan.
7. Pilih jenis pelarut deuterium yang sesuai dengan pelarut deuterium yang digunakan pada preparasi sampel pada bagian solven.
8. Klik tombol “*Expmnt*” pada *SpectrometerControl Window* untuk memilih jenis analisa yang akan dilakukan.
9. Pilih jenis analisa yang akan dilakukan dengan cara mengklik jenis analisa yang tersedia dalam *Open Experiment Window*.
10. Atur parameter dalam *Experiment Tool Window*.
11. Klik tombol *Submit* untuk memasukan nilai-nilai parameter analisa.

## Lampiran 6 Prosedur analisis FTIR

### Spesifikasi alat:

Merk : IR Prestige

Kapasitas : 9 – 10 ton

Lama Pengepresan : 1-3 menit

### 1. Persiapan sampel

- a. Menimbang sampel 1mg dan dihomogenkan dengan 100 mg Kalium bromida (KBr) anhydrous dalam mortar agate.
- b. Campur sampel dan KBr ditekan dengan press hidrolik vakum, dengan tekanan 1,2 psi sehingga diperoleh pellet yang transparan.
- c. Pellet siap dianalisis dengan FTIR

### 2. Petunjuk pemakaian alat

- a. Menghubungkan alat FTIR dengan sumber tegangan 220 volt
- b. Menyalahkan alat FTIR dengan menekan tombol ON
- c. Menyalahkan komputer dan memilih program IR solution
- d. Memilih menu (measurement) yang ada pada menu Bar dan memilih (initialize) kemudian menunggu sampai terhubung dengan alat FTIR.
- e. Sebelum mengukur sampel, sampel compartment (rang dalam alat yang disediakan untuk tempat sampel) dikosongkan terlebih dahulu.
- f. Memilih menu background (BKg) dan menunggu hingga proses scanning selesai.
- g. Untuk mencetak hasil pilih menu print selanjutnya pilih untuk template yang diinginkan dan OK
- h. Untuk keluar dari program IR solution, pilih menu file, pilih close atau close all atau menutup tampilan yang ada, selanjutnya klik exit.
- i. Mematikan komputer dan alat FTIR.

**Lampiran 7. Prosedur Mass Spektrofotometer**

1. Larutkan sampel dengan pelarut yang sesuai, homogenkan dengan sonikasi atau vortex. (konsentrasi larutan yang dibuat mulai dari 10000 ppm)
2. Masukkan sampel pada kompartemen sampel spektroskopi massa
3. Set rentang bobot molekul yang akan diukur, kemudian klik RUN sehingga spectrum massa akan muncul padalayar



**6.2. Data Hasil Analisis Laboratorium Dan Analisis Statistik Kadar Total Fenol dan Aktifitas Antioksidan *G.salicornia*, *S.oligocystum*, *T.decurens*, *H.macroloba* dan *H.durvilae*.**

**Lampiran 1. Data Hasil Analisis Kadar Total Fenol**

Jenis Rumput Laut	Konsentrasi Metanol (%)	Penghambatan (%)	Rata-rata	SD
<i>G.salicornia</i>	30	2.23	3.02	0.68
		3.44		
		3.40		
	50	3.02	2.95	0.61
		2.31		
		3.53		
	70	5.75	6.33	0.51
		6.51		
		6.72		
<i>S.oligocystum</i>	30	2.23	3.16	0.81
		3.62		
		3.65		
	50	6.59	5.86	0.66
		5.29		
		5.71		
	70	14.49	14.32	0.32
		14.53		
		13.94		
<i>T.decurens</i>	30	3.49	3.86	0.37
		3.86		
		4.24		
	50	4.95	5.26	0.28
		5.50		
		5.33		
	70	13.94	13.71	0.98
		14.57		
		12.64		
<i>H.macroloba</i>	30	9.53	9.60	0.32
		9.32		
		9.95		
	50	9.82	11.11	1.12
		11.63		
		11.89		
	70	17.68	18.42	0.65
		18.94		
		18.65		
<i>H.durvilae</i>	30	1.72	2.07	0.33
		2.10		
		2.39		
	50	2.60	2.95	0.43
		3.44		
		2.81		
	70	18.02	18.83	0.77
		18.90		
		19.57		

## Lampiran 2. Analisis Keragaman Kadar Total Fenol

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:Spesies	367.283	4	91.8208	221.36	0.0000
B:% Metanol	884.148	2	442.074	1065.75	0.0000
INTERACTIONS					
AB	179.311	8	22.4138	54.04	0.0000
RESIDUAL	12.444	30	0.4148		
TOTAL (CORRECTED)	1443.19	44			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for Kadar Fenol with 95.0% Confidence Intervals

			<i>Std.</i>	<i>Lower</i>	<i>Upper</i>
<i>Level</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Error</i>	<i>Limit</i>	<i>Limit</i>
GRAND MEAN	45	8.09867			
Spesies					
Gs	9	4.10111	0.214683	3.66267	4.53955
Hd	9	7.95	0.214683	7.51156	8.38844
Hm	9	13.0456	0.214683	12.6071	13.484
So	9	7.78333	0.214683	7.34489	8.22178
Td	9	7.61333	0.214683	7.17489	8.05178
% Metanol					
30	15	4.34467	0.166293	4.00505	4.68428
50	15	5.628	0.166293	5.28838	5.96762
70	15	14.3233	0.166293	13.9837	14.6629
Spesies by % Metanol					
Gs,30	3	3.02333	0.371842	2.26393	3.78274
Gs,50	3	2.95333	0.371842	2.19393	3.71274
Gs,70	3	6.32667	0.371842	5.56726	7.08607
Hd,30	3	2.07	0.371842	1.3106	2.8294
Hd,50	3	2.95	0.371842	2.1906	3.7094
Hd,70	3	18.83	0.371842	18.0706	19.5894
Hm,30	3	9.6	0.371842	8.8406	10.3594
Hm,50	3	11.1133	0.371842	10.3539	11.8727
Hm,70	3	18.4233	0.371842	17.6639	19.1827
So,30	3	3.16667	0.371842	2.40726	3.92607
So,50	3	5.86333	0.371842	5.10393	6.62274
So,70	3	14.32	0.371842	13.5606	15.0794
Td,30	3	3.86333	0.371842	3.10393	4.62274
Td,50	3	5.26	0.371842	4.5006	6.0194
Td,70	3	13.7167	0.371842	12.9573	14.4761

### Lampiran 3. Uji BNT Kadar Total Fenol

Method: 95.0 percent LSD

<i>Species</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Gs	9	4.10111	0.214683	X
Td	9	7.61333	0.214683	X
So	9	7.78333	0.214683	X
Hd	9	7.95	0.214683	X
Hm	9	13.0456	0.214683	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
Gs - Hd	*	-3.84889	0.620051
Gs - Hm	*	-8.94444	0.620051
Gs - So	*	-3.68222	0.620051
Gs - Td	*	-3.51222	0.620051
Hd - Hm	*	-5.09556	0.620051
Hd - So		0.166667	0.620051
Hd - Td		0.336667	0.620051
Hm - So	*	5.26222	0.620051
Hm - Td	*	5.43222	0.620051
So - Td		0.17	0.620051

\* denotes a statistically significant difference.

**Lampiran 4. Data Hasil Analisis Aktifitas Antioksidan DPPH.**

Jenis Rumput Laut	Konsentrasi Metanol (%)	Penghambatan (%)	Rata-rata	SD
<i>G.salicornia</i>	30	13.13	14,94	2.95
		18.35		
		13.35		
	50	12.35	14.31	2.06
		14.13		
		16.46		
	70	13.46	15.57	1.83
		16.80		
		16.46		
<i>S.oligocystum</i>	30	35.48	36.07	1.74
		38.04		
		34.70		
	50	38.93	38.19	3.40
		34.48		
		41.16		
	70	23.36	26.88	3.16
		27.81		
		29.48		
<i>T.decurens</i>	30	30.48	35.18	4.72
		35.15		
		39.93		
	50	40.60	42.08	1.35
		42.38		
		43.27		
	70	44.72	48.46	3.89
		48.16		
		52.50		
<i>H.macroloba</i>	30	30.14	33.29	2.74
		35.15		
		34.59		
	50	34.70	39.26	4.15
		40.27		
		42.82		
	70	54.84	57.73	3.13
		61.07		
		57.28		
<i>H.durvillae</i>	30	33,15	38.19	4.67
		39.04		
		42.38		
	50	35.71	38.04	2.14
		38.49		
		39.93		
	70	66.85	64.63	2.28
		64.74		
		62.29		

### Lampiran 5. Analisis Keragaman Aktifitas Antioksidan DPPH

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:Spesies	5926.62	4	1481.65	151.57	0.0000
B:% Metanol	1000.8	2	500.401	51.19	0.0000
INTERACTIONS					
AB	1862.17	8	232.771	23.81	0.0000
RESIDUAL	293.258	30	9.77526		
TOTAL (CORRECTED)	9082.84	44			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for DPPH with 95.0% Confidence Intervals

			<i>Std.</i>	<i>Lower</i>	<i>Upper</i>
<i>Level</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Error</i>	<i>Limit</i>	<i>Limit</i>
GRAND MEAN	45	36.1902			
Species					
Gs	9	14.9433	1.04218	12.8149	17.0718
Hd	9	46.9533	1.04218	44.8249	49.0818
Hm	9	43.4289	1.04218	41.3005	45.5573
So	9	33.7156	1.04218	31.5871	35.844
Td	9	41.91	1.04218	39.7816	44.0384
% Metanol					
30	15	31.5373	0.807269	29.8887	33.186
50	15	34.3787	0.807269	32.73	36.0273
70	15	42.6547	0.807269	41.006	44.3033
Species by % Metanol					
Gs,30	3	14.9433	1.80511	11.2568	18.6299
Gs,50	3	14.3133	1.80511	10.6268	17.9999
Gs,70	3	15.5733	1.80511	11.8868	19.2599
Hd,30	3	38.19	1.80511	34.5035	41.8765
Hd,50	3	38.0433	1.80511	34.3568	41.7299
Hd,70	3	64.6267	1.80511	60.9401	68.3132
Hm,30	3	33.2933	1.80511	29.6068	36.9799
Hm,50	3	39.2633	1.80511	35.5768	42.9499
Hm,70	3	57.73	1.80511	54.0435	61.4165
So,30	3	36.0733	1.80511	32.3868	39.7599
So,50	3	38.19	1.80511	34.5035	41.8765
So,70	3	26.8833	1.80511	23.1968	30.5699
Td,30	3	35.1867	1.80511	31.5001	38.8732
Td,50	3	42.0833	1.80511	38.3968	45.7699
Td,70	3	48.46	1.80511	44.7735	52.1465

**Lampiran 6. Uji BNT Aktifitas Antioksidan DPPH**

Method: 95.0 percent LSD

<i>Species</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Gs	9	14.9433	1.04218	X
So	9	33.7156	1.04218	X
Td	9	41.91	1.04218	X
Hm	9	43.4289	1.04218	X
Hd	9	46.9533	1.04218	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
Gs - Hd	*	-32.01	3.01004
Gs - Hm	*	-28.4856	3.01004
Gs - So	*	-18.7722	3.01004
Gs - Td	*	-26.9667	3.01004
Hd -Hm	*	3.52444	3.01004
Hd - So	*	13.2378	3.01004
Hd - Td	*	5.04333	3.01004
Hm - So	*	9.71333	3.01004
Hm - Td		1.51889	3.01004
So - Td	*	-8.19444	3.01004

\* denotes a statistically significant difference.

### Lampiran 7. Data hasil analisis aktifitas antioksidan Daya Reduksi

Jenis Rumput	Metanol (%)	Nilai FRAP (mgGAE/KG)	Rata-Rata Nilai FRAP (mg GAE/Kg)	
<b>1. Gracilaria salicornia</b>	30	16.82	19.02	2.55
		18.43		
		21.83		
	50	31.52	32.81	2.31
		35.48		
		31.43		
	70	42.39	42.95	2.24
		41.04		
		45.43		
<b>2. Sargassum oligocystum</b>	30	26.69	25.42	2.43
		26.96		
		22.61		
	50	24.39	25.39	1.30
		24.91		
		26.87		
	70	29.96	25.72	3.82
		24.69		
		22.52		
<b>3. Turbinaria decurens</b>	30	20.56	18.62	2.15
		16.30		
		19.00		
	50	23.69	23.88	1.90
		22.08		
		25.87		
	70	35.17	35.57	3.40
		39.17		
		32.39		
<b>4. Halimeda macroloba</b>	30	10.13	7.8	2.04
		6.22		
		7.13		
	50	9.26	11.46	2.24
		11.39		
		13.74		
	70	16.25	14.89	2.78
		11.69		
		16.74		
<b>5. Halimena durvilae</b>	30	13.48	15.63	2.68
		14.78		
		18.65		
	50	25.26	22.55	3.12
		19.13		
		23.26		
	70	42.00	38.85	2.97
		38.48		
		36.08		



### Lampiran 8. Analisis Keragaman Aktifitas Daya Reduksi

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A: Spesies	2032.29	4	508.071	74.75	0.0000
B: % Metanol	1547.62	2	773.812	113.85	0.0000
INTERACTIONS					
AB	697.475	8	87.1844	12.83	0.0000
RESIDUAL	203.902	30	6.79673		
TOTAL (CORRECTED)	4481.29	44			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Table of Least Squares Means for FRAP with 95.0% Confidence Intervals

			Std.	Lower	Upper
Level	Count	Mean	Error	Limit	Limit
GRAND MEAN	45	24.0416			
Spesies					
Gs	9	31.5967	0.869018	29.8219	33.3714
Hd	9	25.68	0.869018	23.9052	27.4548
Hm	9	11.3944	0.869018	9.61967	13.1692
So	9	25.5111	0.869018	23.7363	27.2859
Td	9	26.0256	0.869018	24.2508	27.8003
% Metanol					
30	15	17.306	0.673138	15.9313	18.6807
50	15	23.2187	0.673138	21.8439	24.5934
70	15	31.6	0.673138	30.2253	32.9747
Spesies by % Metanol					
Gs,30	3	19.0267	1.50518	15.9527	22.1007
Gs,50	3	32.81	1.50518	29.736	35.884
Gs,70	3	42.9533	1.50518	39.8793	46.0273
Hd,30	3	15.6367	1.50518	12.5627	18.7107
Hd,50	3	22.55	1.50518	19.476	25.624
Hd,70	3	38.8533	1.50518	35.7793	41.9273
Hm,30	3	7.82667	1.50518	4.75267	10.9007
Hm,50	3	11.4633	1.50518	8.38933	14.5373
Hm,70	3	14.8933	1.50518	11.8193	17.9673
So,30	3	25.42	1.50518	22.346	28.494
So,50	3	25.39	1.50518	22.316	28.464
So,70	3	25.7233	1.50518	22.6493	28.7973
Td,30	3	18.62	1.50518	15.546	21.694
Td,50	3	23.88	1.50518	20.806	26.954
Td,70	3	35.5767	1.50518	32.5027	38.6507

### Lampiran 9. Uji BNT Aktifitas Antioksidan Daya Reduksi

Method: 95.0 percent LSD

<i>Species</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Homogeneous Groups</i>
Hm	9	11.3944	0.869018	X
So	9	25.5111	0.869018	X
Hd	9	25.68	0.869018	X
Td	9	26.0256	0.869018	X
Gs	9	31.5967	0.869018	X

<i>Contrast</i>	<i>Sig.</i>	<i>Difference</i>	<i>+/- Limits</i>
Gs - Hd	*	5.91667	2.50991
Gs - Hm	*	20.2022	2.50991
Gs - So	*	6.08556	2.50991
Gs - Td	*	5.57111	2.50991
Hd - Hm	*	14.2856	2.50991
Hd - So		0.168889	2.50991
Hd - Td		-0.345556	2.50991
Hm - So	*	-14.1167	2.50991
Hm - Td	*	-14.6311	2.50991
So - Td		-0.514444	2.50991

\*denotes a statistically significant difference

**Lampiran 10. Data Hasil Analisis Aktifitas Antioksidan Pengkelat Ion**

Jenis Rumput Laut	Konsentrasi Metanol (%)	Penghambatan (%)	Rata-rata	SD
<i>G.salicornia</i>	30	14.05	17.50	3.10
		20.07		
		18.39		
	50	14.38	15.83	1.35
		16.05		
		17.06		
	70	53.85	54.07	3.01
		57.19		
		51.17		
<i>S.oligocystum</i>	30	79.26	76.14	3.36
		76.59		
		72.57		
	50	71.91	71.79	0.50
		71.24		
		72.24		
	70	15.38	17.50	2.59
		16.72		
		20.40		
<i>T.decurens</i>	30	86.29	86.17	0.50
		86.62		
		85.62		
	50	65.55	70.56	5.01
		75.58		
		70.57		
	70	67.89	62.98	4.45
		59.19		
		61.87		
<i>H.macroloba</i>	30	73.91	72.24	1.53
		71.91		
		70.90		
	50	69.90	70.01	1.50
		71.57		
		68.56		
	70	4.01	2.89	1.02
		2.67		
		2.00		
<i>H.durvilae</i>	30	9.70	7.91	2.27
		8.70		
		5.35		
	50	11.70	12.79	0.94
		13.38		
		13.30		
	70	67.22	67.82	3.82
		71.91		
		64.33		

### Lampiran 11. Analisis Keragaman Aktifitas Pengkelat Ion

#### Analysis of Variance for Pengkelat Ion - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Spesies	12437.6	4	3109.4	421.75	0.0000
B:% Metanol	926.011	2	463.006	62.80	0.0000
INTERACTIONS					
AB	25079.7	8	3134.96	425.22	0.0000
RESIDUAL	221.177	30	7.37255		
TOTAL (CORRECTED)	38664.5	44			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

#### Table of Least Squares Means for Pengkelat Ion with 95.0% Confidence Intervals

			Std.	Lower	Upper
Level	Count	Mean	Error	Limit	Limit
GRAND MEAN	45	47.0827			
Spesies					
Gs	9	29.1344	0.905081	27.286	30.9829
Hd	9	29.51	0.905081	27.6616	31.3584
Hm	9	48.3811	0.905081	46.5327	50.2295
So	9	55.1456	0.905081	53.2971	56.994
Td	9	73.2422	0.905081	71.3938	75.0906
% Metanol					
30	15	51.9953	0.701073	50.5635	53.4271
50	15	48.1993	0.701073	46.7675	49.6311
70	15	41.0533	0.701073	39.6215	42.4851
Spesies by % Metanol					
Gs,30	3	17.5033	1.56765	14.3018	20.7049
Gs,50	3	15.83	1.56765	12.6284	19.0316
Gs,70	3	54.07	1.56765	50.8684	57.2716
Hd,30	3	7.91667	1.56765	4.7151	11.1182
Hd,50	3	12.7933	1.56765	9.59176	15.9949
Hd,70	3	67.82	1.56765	64.6184	71.0216
Hm,30	3	72.24	1.56765	69.0384	75.4416
Hm,50	3	70.01	1.56765	66.8084	73.2116
Hm,70	3	2.89333	1.56765	-0.308235	6.0949
So,30	3	76.14	1.56765	72.9384	79.3416
So,50	3	71.7967	1.56765	68.5951	74.9982
So,70	3	17.5	1.56765	14.2984	20.7016
Td,30	3	86.1767	1.56765	82.9751	89.3782
Td,50	3	70.5667	1.56765	67.3651	73.7682
Td,70	3	62.9833	1.56765	59.7818	66.1849

### Lampiran 12. Uji BNT Aktifitas Pengkelat Ion

Multiple Range Tests for Pengkelat Ion by Spesies  
Method: 95.0 percent LSD

Spesies	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Gs	9	29.1344	0.905081	X
Hd	9	29.51	0.905081	X
Hm	9	48.3811	0.905081	X
So	9	55.1456	0.905081	X
Td	9	73.2422	0.905081	X

Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
Gs - Hd		-0.375556	2.61407
Gs - Hm	*	-19.2467	2.61407
Gs - So	*	-26.0111	2.61407
Gs - Td	*	-44.1078	2.61407
Hd - Hm	*	-18.8711	2.61407
Hd - So	*	-25.6356	2.61407
Hd - Td	*	-43.7322	2.61407
Hm - So	*	-6.76444	2.61407
Hm - Td	*	-24.8611	2.61407
So - Td	*	-18.0967	2.61407

\* denotes a statistically significant difference.

### 6.3. Data Hasil Analisis Kadar Total Fenol dan Aktifitas Antioksidan hasil Fraksinasi *H. durvilae*

#### Lampiran 1. Data Hasil Analisis Kadar Total Fenol Hasil *H.durvilae*.

Fraksi	Kadar total fenol	Rata-rata	SD
Metanol	20.06	19.41	1.05
	18.48		
	19.70		
Heksana	11.03	11.19	0.80
	10.50		
	12.08		
Kloroform	9.91	10.51	0.53
	10.75		
	10.88		
Air	5.94	6.39	0.40
	6.51		
	6.72		

**Lampiran 2. Data Hasil Analisis Aktifitas Antioksidan DPPH  
*H. durvilae***

Fraksi	Penghambatan DPPH (%)	Rata-rata Penghambatan DPPH (%)	SD
Metanol	69.27	67.21	2.47
	67.89		
	64.48		
Heksana	21.11	21.99	0.77
	22.50		
	22.38		
Kloroform	60.30	61.06	2.13
	63.46		
	59.42		
Air	74.97	76.99	1.80
	76.61		
	79.39		

**Lampiran 3. Data Hasil Analisis Aktifitas antioksidan Daya Reduksi  
*H.durvilae***

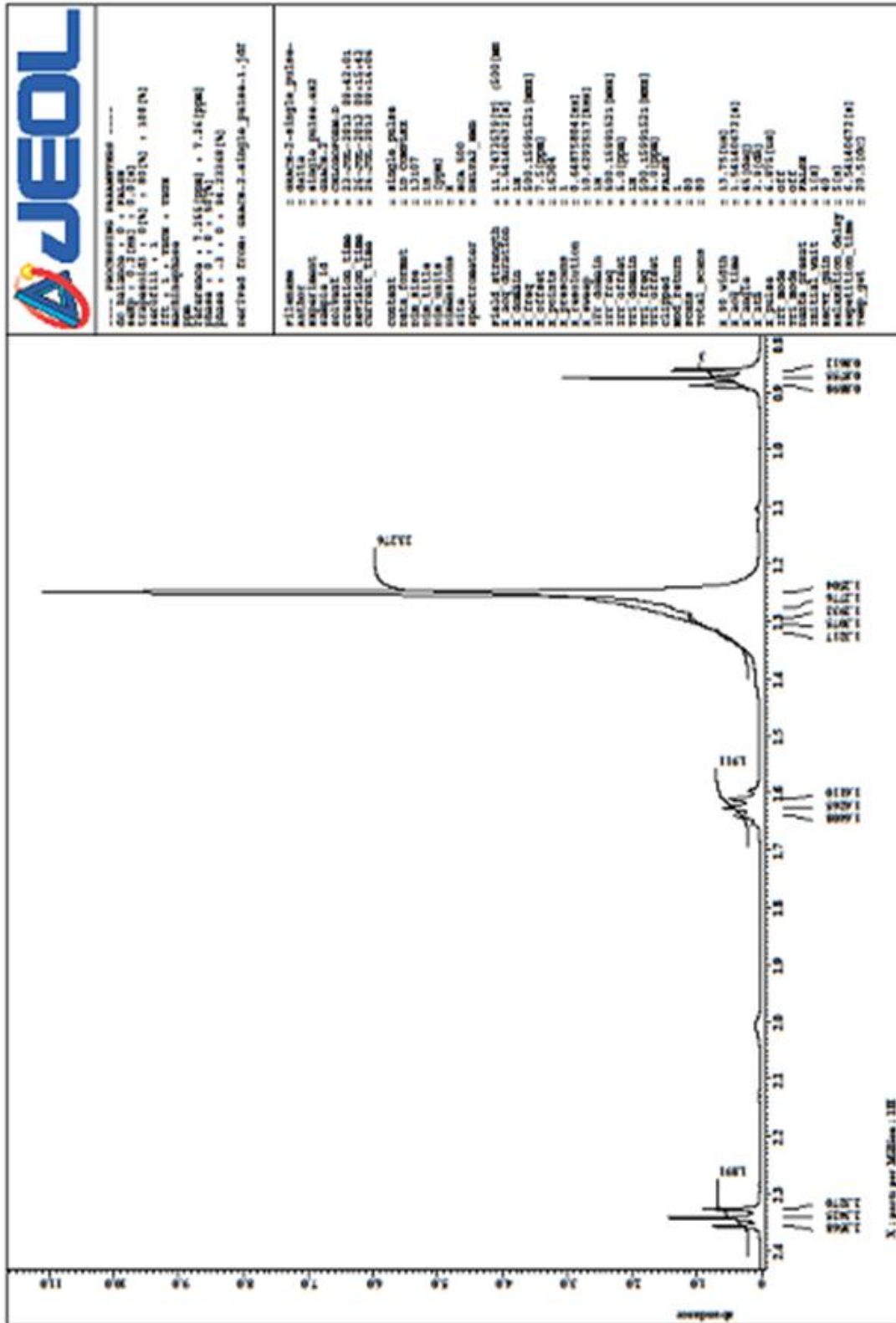
Fraksi	Nilai Daya Reduksi (g GAE/100g)	Rata-Rata Nilai Daya Reduksi (g GAE/100 g ekstrak)	SD
Metanol	40.714	40.587	0.54
	40.00		
	41.048		
Heksana	11.238	10.206	1.14
	8.950		
	10.429		
Kloroform	26.00	29.000	3.51
	28.143		
	32.857		
Air	23.57	23.587	0.17
	23.429		
	23.762		

**Lampiran 4. Data Hasil Analisis Aktifitas antioksidan (%)  
pengkelat ion *H.durvilae***

<b>Fraksi</b>	<b>Nilai Pengkelat Ion</b>	<b>Rata-Rata Pengkelat Ion (%)</b>	<b>SD</b>
<b>Metanol</b>	69.698	66.643	2.89
	63.953		
	66.279		
<b>Heksana</b>	37.597	37.597	1.95
	41.473		
	39.147		
<b>Kloroform</b>	15.116	15.170	1.39
	14.341		
	17.054		
<b>Air</b>	8.139	8.646	1.18
	9.689		
	10.465		





Lampiran 2. Spektrum NMR- <sup>1</sup>H-2 Isolasi Fraksi Heksana



```

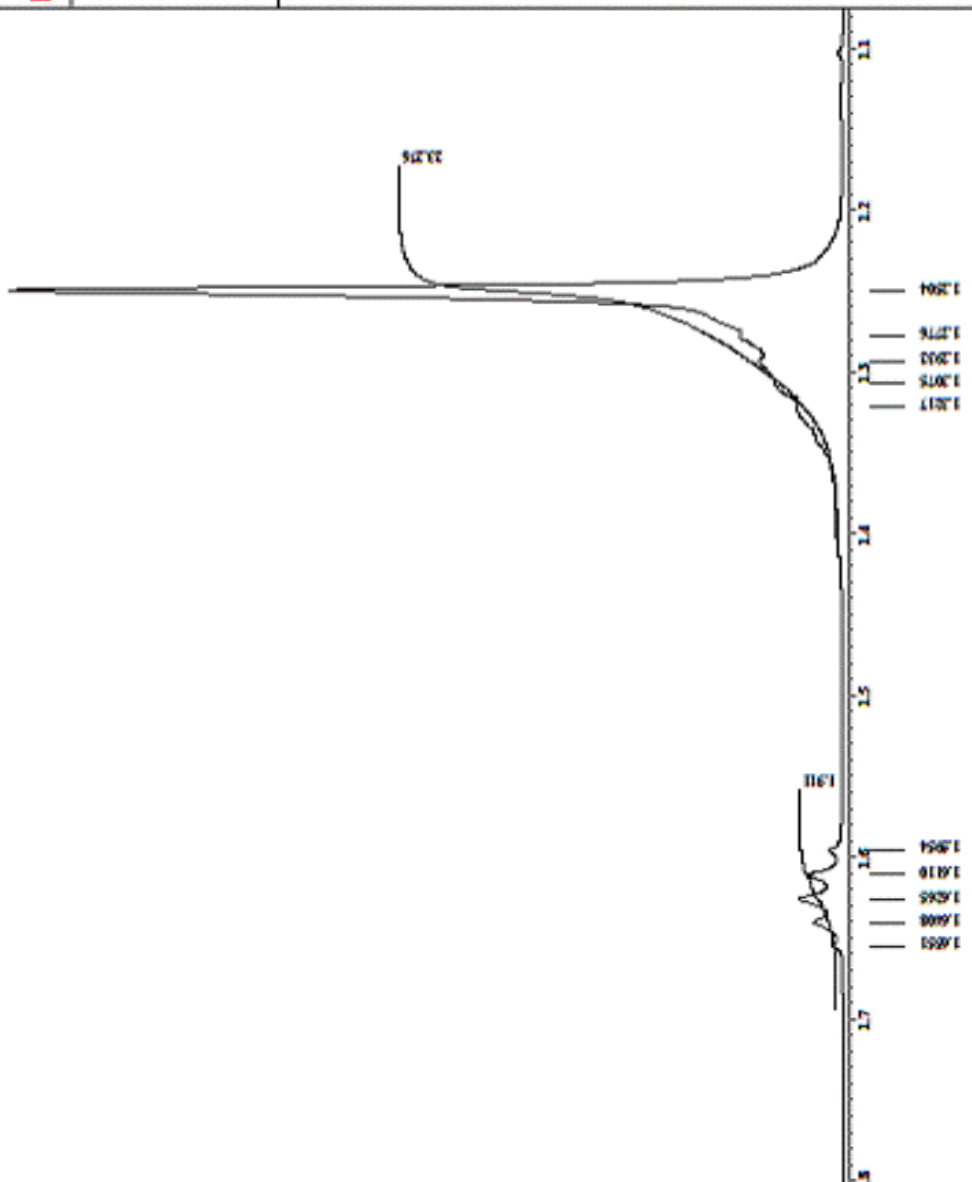
----- PROCESSTING PARAMETERS -----
AQ Balance : 0.00000000
AQX : 1.072 [ms] : 0.0 [s]
CPD : 0.00000000
CPD1 : 0.00000000
CPD2 : 0.00000000
CPD3 : 0.00000000
CPD4 : 0.00000000
CPD5 : 0.00000000
CPD6 : 0.00000000
CPD7 : 0.00000000
CPD8 : 0.00000000
CPD9 : 0.00000000
CPD10 : 0.00000000
CPD11 : 0.00000000
CPD12 : 0.00000000
CPD13 : 0.00000000
CPD14 : 0.00000000
CPD15 : 0.00000000
CPD16 : 0.00000000
CPD17 : 0.00000000
CPD18 : 0.00000000
CPD19 : 0.00000000
CPD20 : 0.00000000
CPD21 : 0.00000000
CPD22 : 0.00000000
CPD23 : 0.00000000
CPD24 : 0.00000000
CPD25 : 0.00000000
CPD26 : 0.00000000
CPD27 : 0.00000000
CPD28 : 0.00000000
CPD29 : 0.00000000
CPD30 : 0.00000000
CPD31 : 0.00000000
CPD32 : 0.00000000
CPD33 : 0.00000000
CPD34 : 0.00000000
CPD35 : 0.00000000
CPD36 : 0.00000000
CPD37 : 0.00000000
CPD38 : 0.00000000
CPD39 : 0.00000000
CPD40 : 0.00000000
CPD41 : 0.00000000
CPD42 : 0.00000000
CPD43 : 0.00000000
CPD44 : 0.00000000
CPD45 : 0.00000000
CPD46 : 0.00000000
CPD47 : 0.00000000
CPD48 : 0.00000000
CPD49 : 0.00000000
CPD50 : 0.00000000
CPD51 : 0.00000000
CPD52 : 0.00000000
CPD53 : 0.00000000
CPD54 : 0.00000000
CPD55 : 0.00000000
CPD56 : 0.00000000
CPD57 : 0.00000000
CPD58 : 0.00000000
CPD59 : 0.00000000
CPD60 : 0.00000000
CPD61 : 0.00000000
CPD62 : 0.00000000
CPD63 : 0.00000000
CPD64 : 0.00000000
CPD65 : 0.00000000
CPD66 : 0.00000000
CPD67 : 0.00000000
CPD68 : 0.00000000
CPD69 : 0.00000000
CPD70 : 0.00000000
CPD71 : 0.00000000
CPD72 : 0.00000000
CPD73 : 0.00000000
CPD74 : 0.00000000
CPD75 : 0.00000000
CPD76 : 0.00000000
CPD77 : 0.00000000
CPD78 : 0.00000000
CPD79 : 0.00000000
CPD80 : 0.00000000
CPD81 : 0.00000000
CPD82 : 0.00000000
CPD83 : 0.00000000
CPD84 : 0.00000000
CPD85 : 0.00000000
CPD86 : 0.00000000
CPD87 : 0.00000000
CPD88 : 0.00000000
CPD89 : 0.00000000
CPD90 : 0.00000000
CPD91 : 0.00000000
CPD92 : 0.00000000
CPD93 : 0.00000000
CPD94 : 0.00000000
CPD95 : 0.00000000
CPD96 : 0.00000000
CPD97 : 0.00000000
CPD98 : 0.00000000
CPD99 : 0.00000000
CPD100 : 0.00000000

```

```

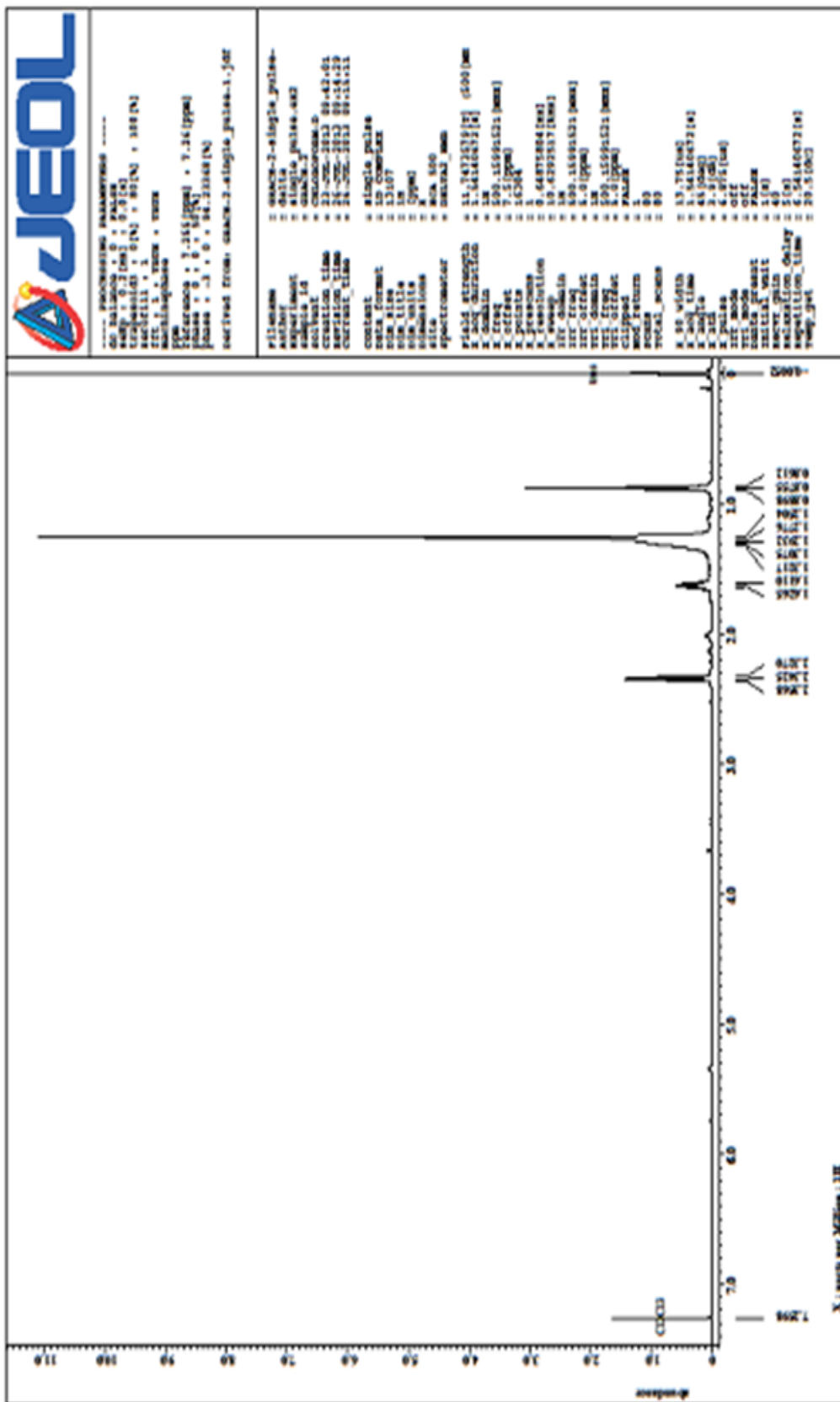
----- PROCESSTING PARAMETERS -----
AQ Balance : 0.00000000
AQX : 1.072 [ms] : 0.0 [s]
CPD : 0.00000000
CPD1 : 0.00000000
CPD2 : 0.00000000
CPD3 : 0.00000000
CPD4 : 0.00000000
CPD5 : 0.00000000
CPD6 : 0.00000000
CPD7 : 0.00000000
CPD8 : 0.00000000
CPD9 : 0.00000000
CPD10 : 0.00000000
CPD11 : 0.00000000
CPD12 : 0.00000000
CPD13 : 0.00000000
CPD14 : 0.00000000
CPD15 : 0.00000000
CPD16 : 0.00000000
CPD17 : 0.00000000
CPD18 : 0.00000000
CPD19 : 0.00000000
CPD20 : 0.00000000
CPD21 : 0.00000000
CPD22 : 0.00000000
CPD23 : 0.00000000
CPD24 : 0.00000000
CPD25 : 0.00000000
CPD26 : 0.00000000
CPD27 : 0.00000000
CPD28 : 0.00000000
CPD29 : 0.00000000
CPD30 : 0.00000000
CPD31 : 0.00000000
CPD32 : 0.00000000
CPD33 : 0.00000000
CPD34 : 0.00000000
CPD35 : 0.00000000
CPD36 : 0.00000000
CPD37 : 0.00000000
CPD38 : 0.00000000
CPD39 : 0.00000000
CPD40 : 0.00000000
CPD41 : 0.00000000
CPD42 : 0.00000000
CPD43 : 0.00000000
CPD44 : 0.00000000
CPD45 : 0.00000000
CPD46 : 0.00000000
CPD47 : 0.00000000
CPD48 : 0.00000000
CPD49 : 0.00000000
CPD50 : 0.00000000
CPD51 : 0.00000000
CPD52 : 0.00000000
CPD53 : 0.00000000
CPD54 : 0.00000000
CPD55 : 0.00000000
CPD56 : 0.00000000
CPD57 : 0.00000000
CPD58 : 0.00000000
CPD59 : 0.00000000
CPD60 : 0.00000000
CPD61 : 0.00000000
CPD62 : 0.00000000
CPD63 : 0.00000000
CPD64 : 0.00000000
CPD65 : 0.00000000
CPD66 : 0.00000000
CPD67 : 0.00000000
CPD68 : 0.00000000
CPD69 : 0.00000000
CPD70 : 0.00000000
CPD71 : 0.00000000
CPD72 : 0.00000000
CPD73 : 0.00000000
CPD74 : 0.00000000
CPD75 : 0.00000000
CPD76 : 0.00000000
CPD77 : 0.00000000
CPD78 : 0.00000000
CPD79 : 0.00000000
CPD80 : 0.00000000
CPD81 : 0.00000000
CPD82 : 0.00000000
CPD83 : 0.00000000
CPD84 : 0.00000000
CPD85 : 0.00000000
CPD86 : 0.00000000
CPD87 : 0.00000000
CPD88 : 0.00000000
CPD89 : 0.00000000
CPD90 : 0.00000000
CPD91 : 0.00000000
CPD92 : 0.00000000
CPD93 : 0.00000000
CPD94 : 0.00000000
CPD95 : 0.00000000
CPD96 : 0.00000000
CPD97 : 0.00000000
CPD98 : 0.00000000
CPD99 : 0.00000000
CPD100 : 0.00000000

```



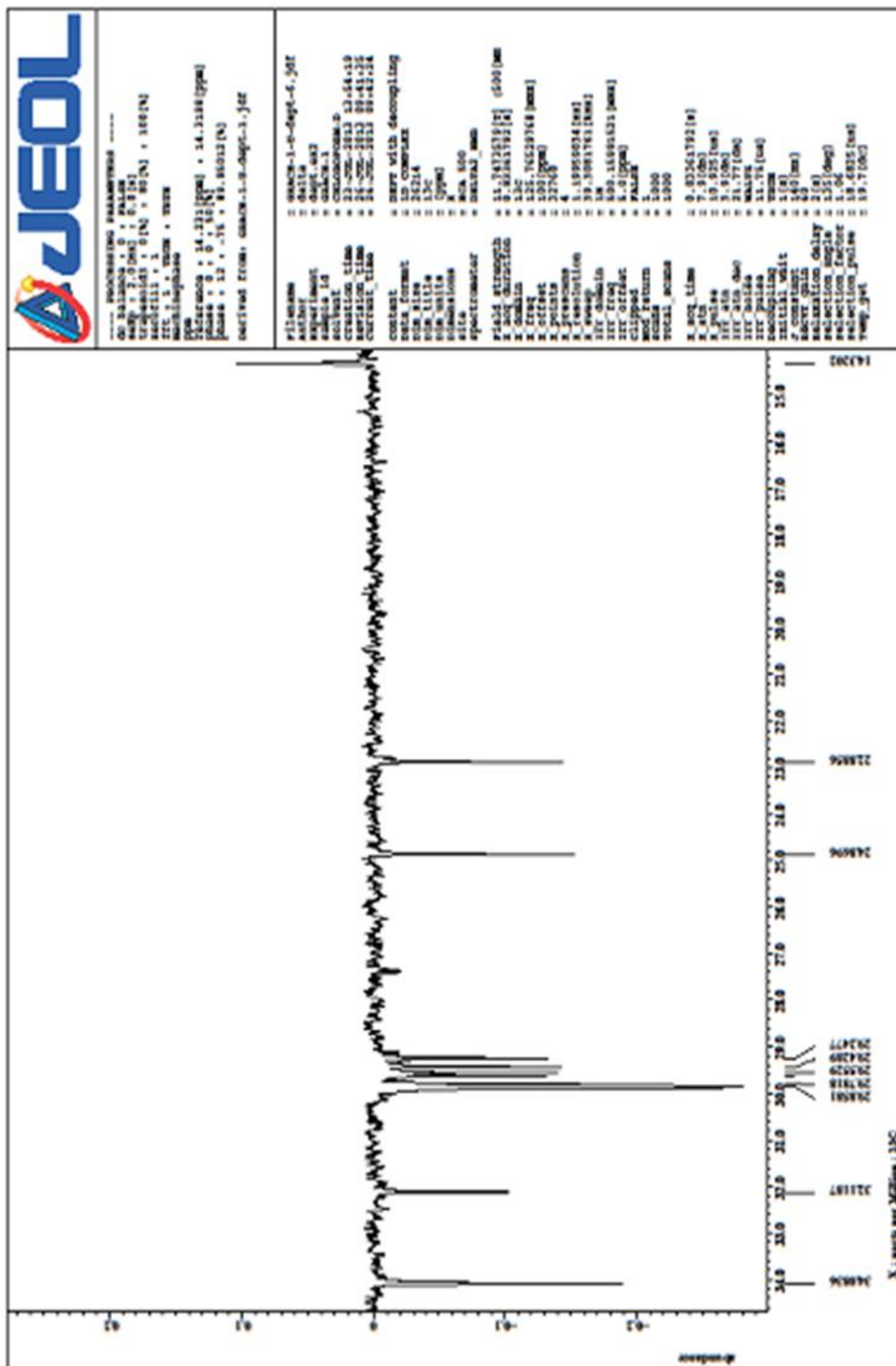
X : parts per Million : Hz

Lampiran 3. Spektrum NMR-H-3 Isolat Fraksi Heksana



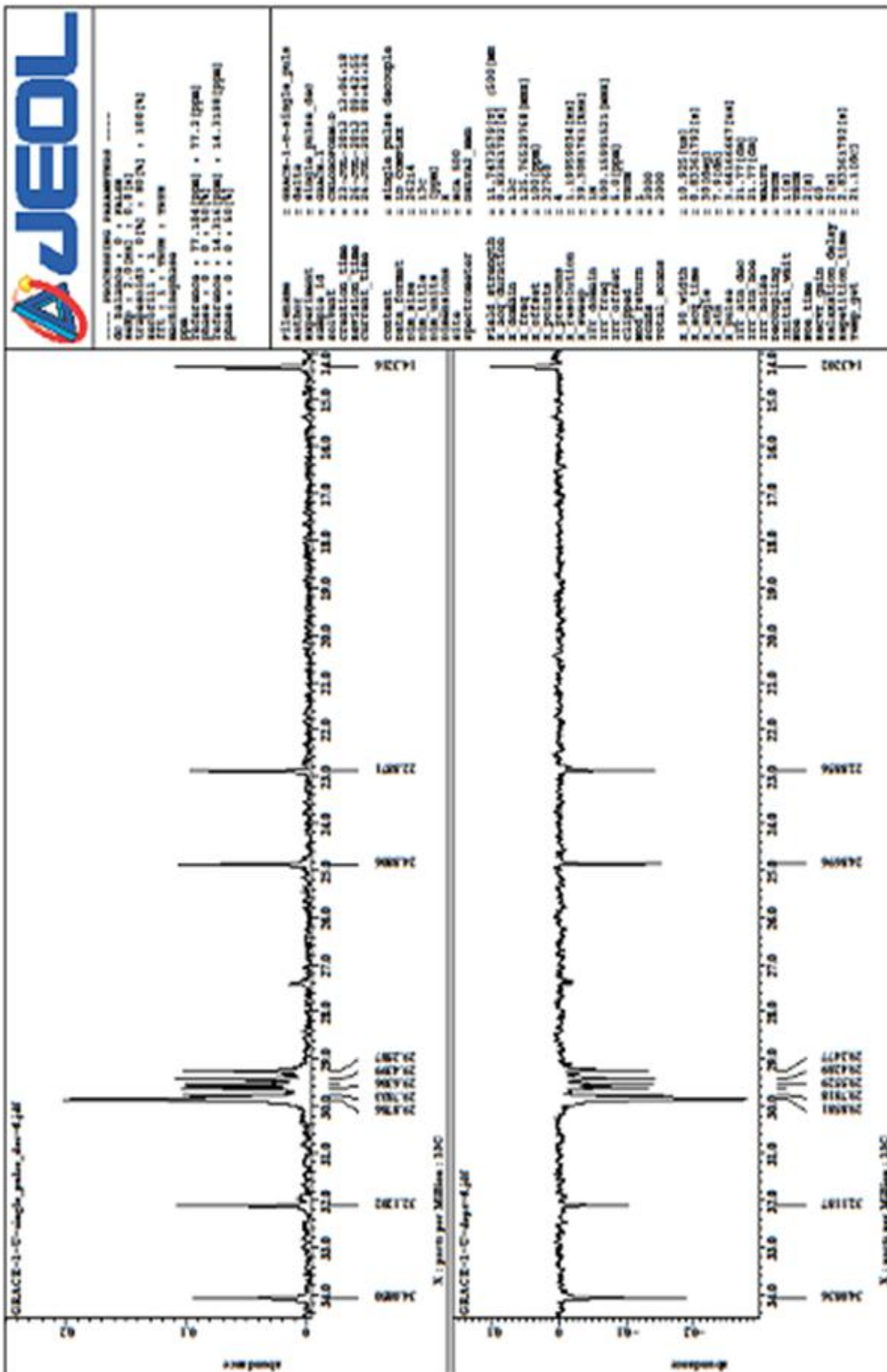
Lampiran 4. Spektrum NMR- H-4 Isolat Fraksi Heksana





Lampiran 6. Spektrum NMR 1-DEPT-2 Isolat Fraksi Heksan

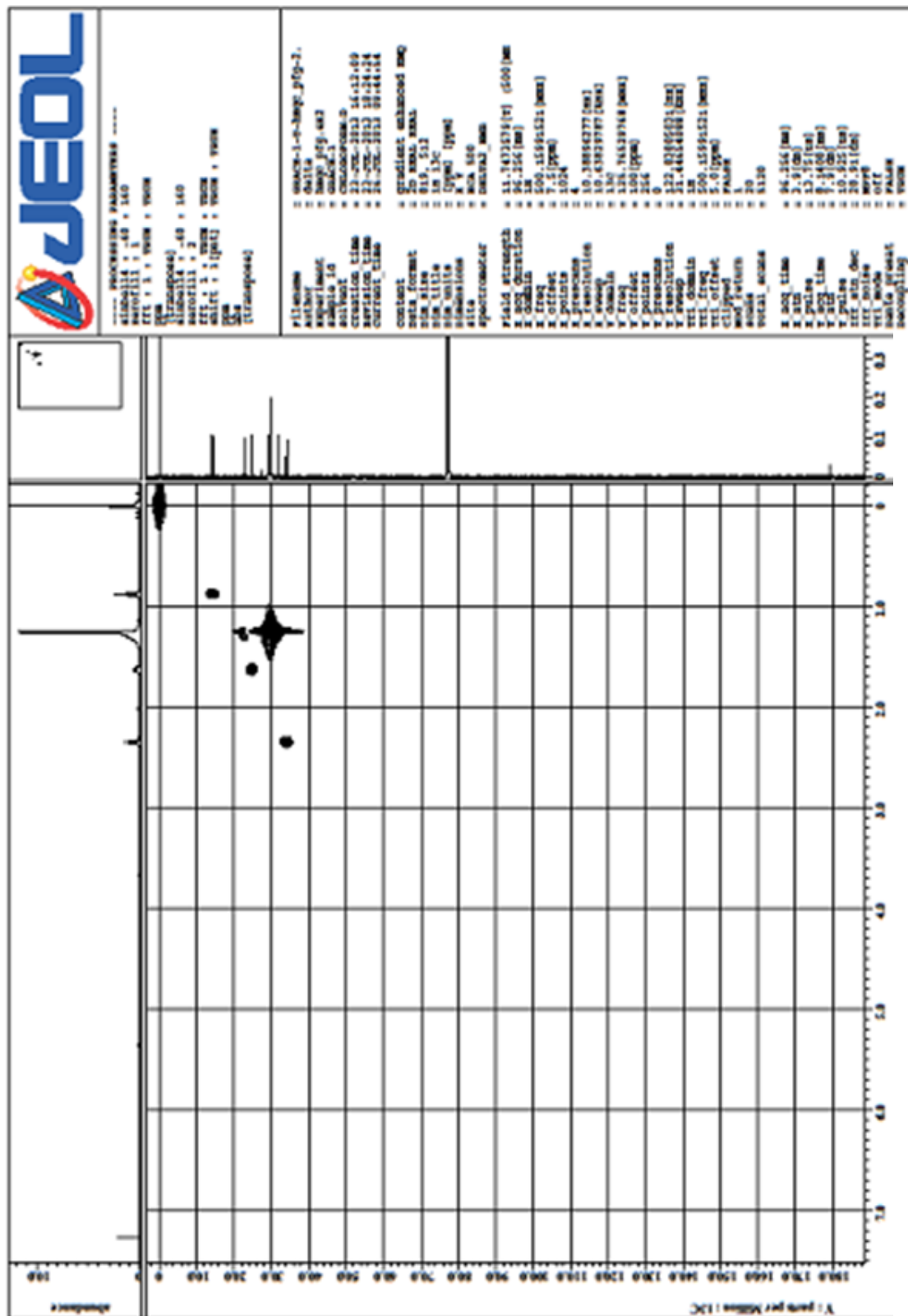




Lampiran 8. Spektrum NMR -Datalsate-2 Isolat Fraksi Heksan







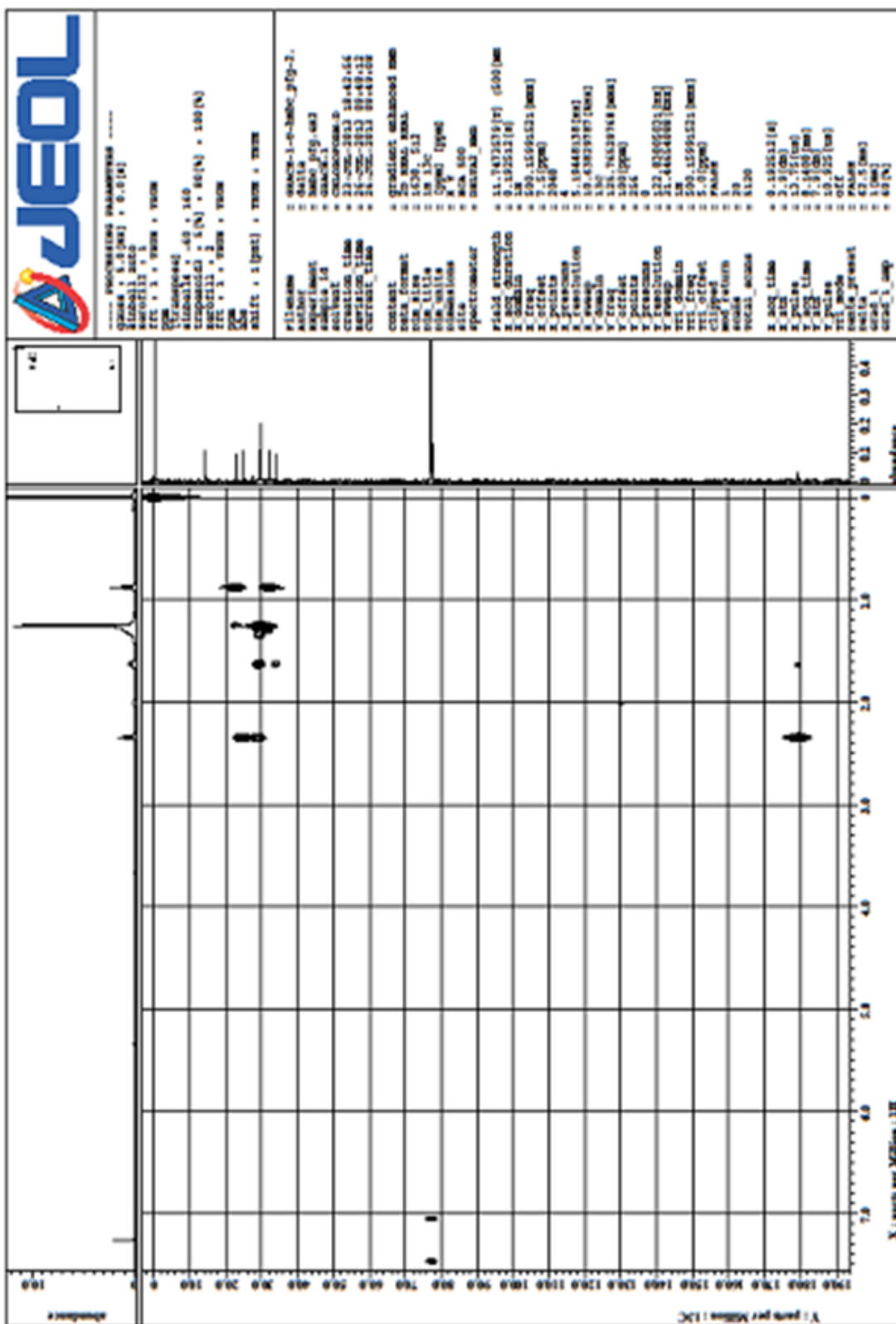
Lampiran 10. Spektrum NMR -1-HMQC-1 Isolat Fraksi Heksan



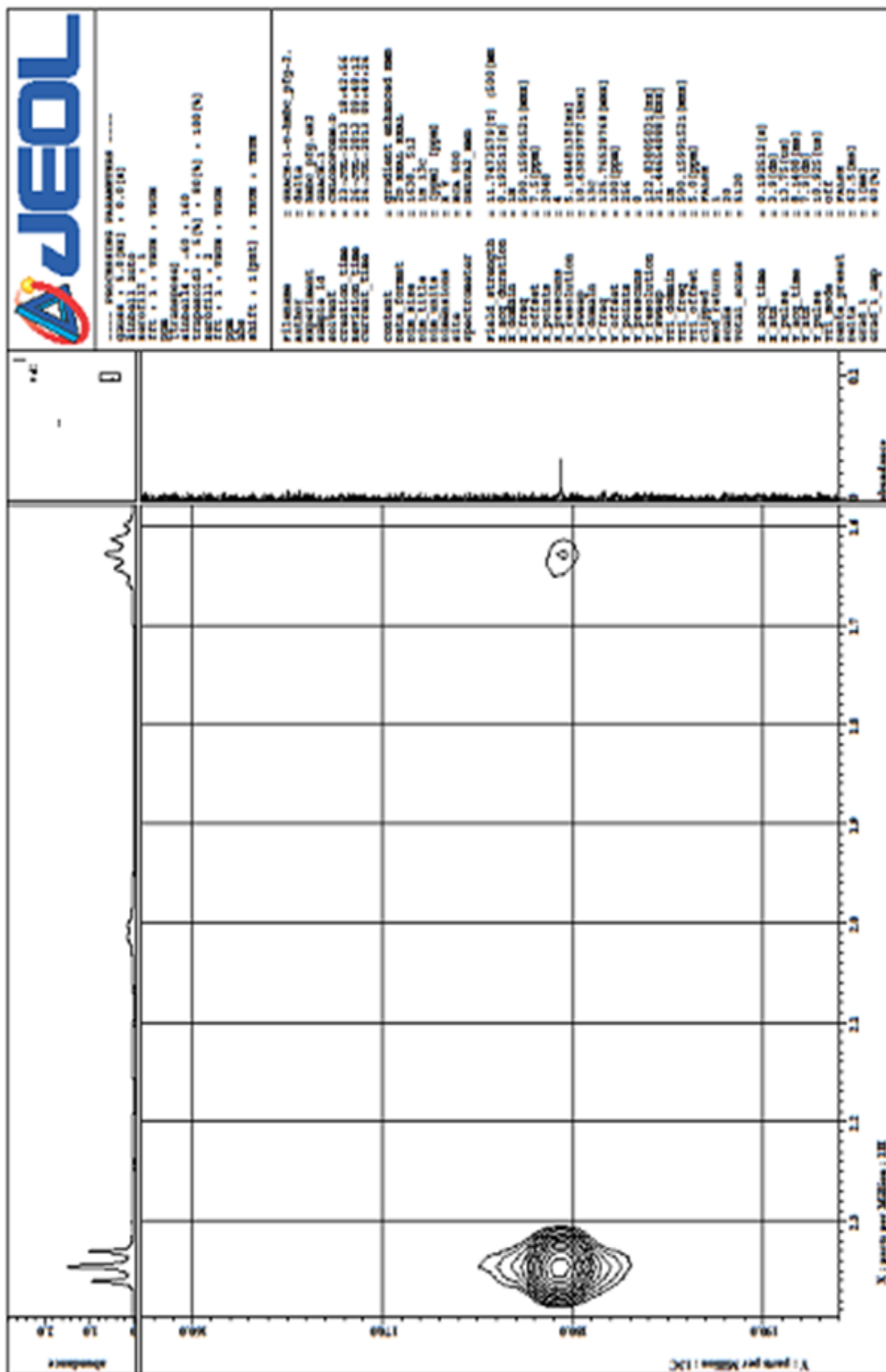




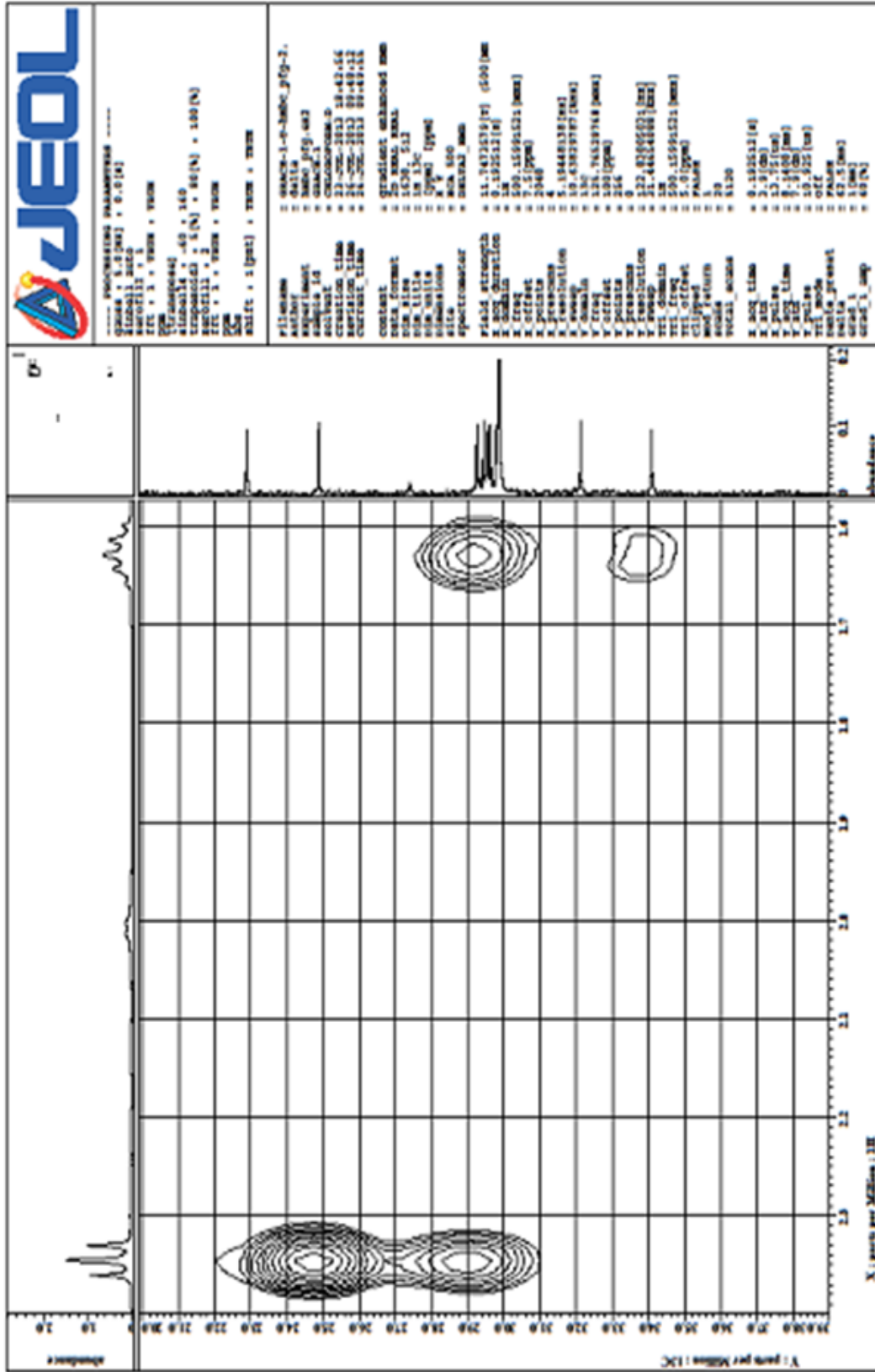




Lampiran 15. Spektrum NMR-1-HMBC1 Isolat Fraksi Heksana



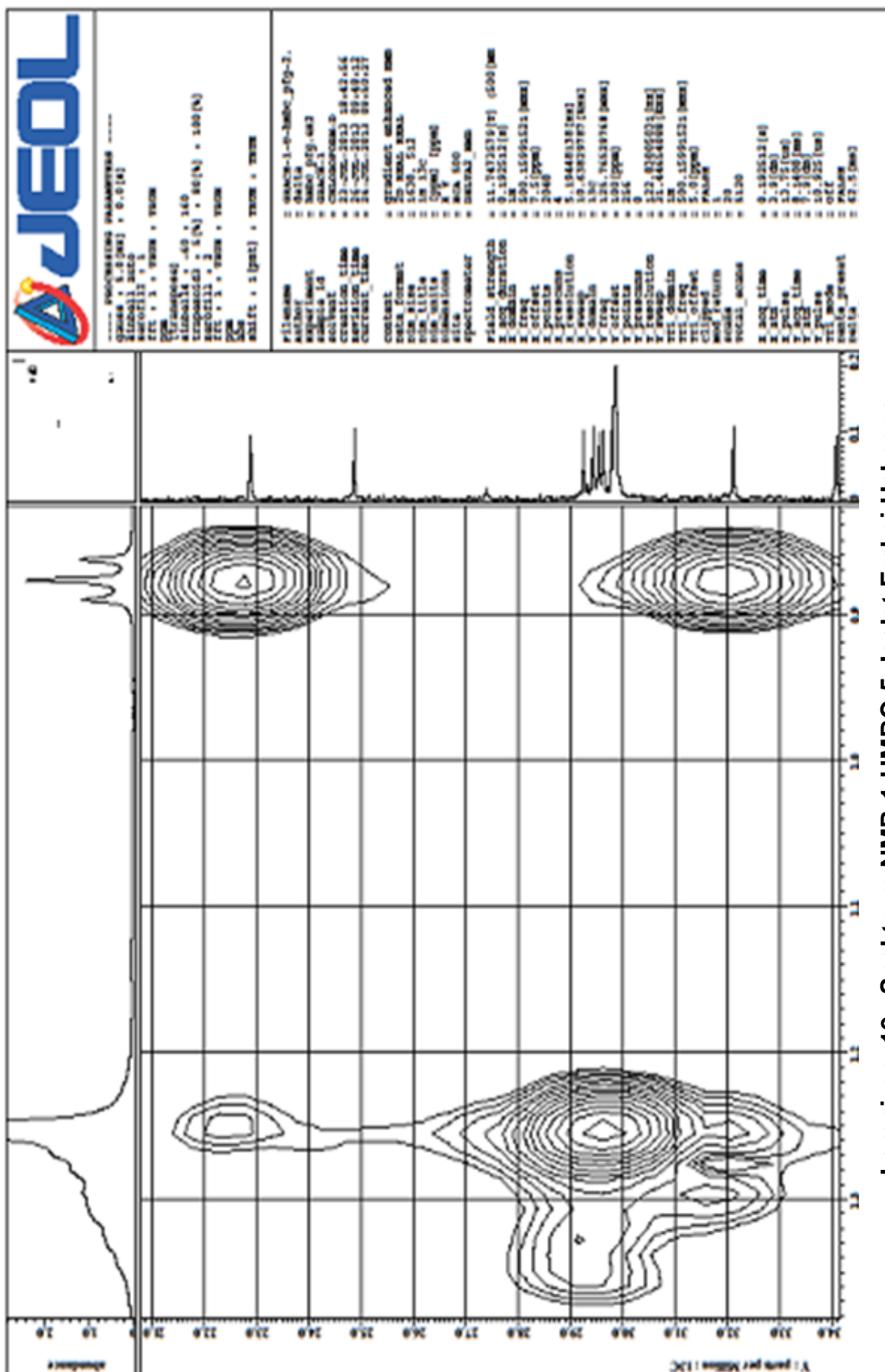
Lampiran 16. Spektrum NMR-1-HMBC-2 Isolat Fraksi Heksan



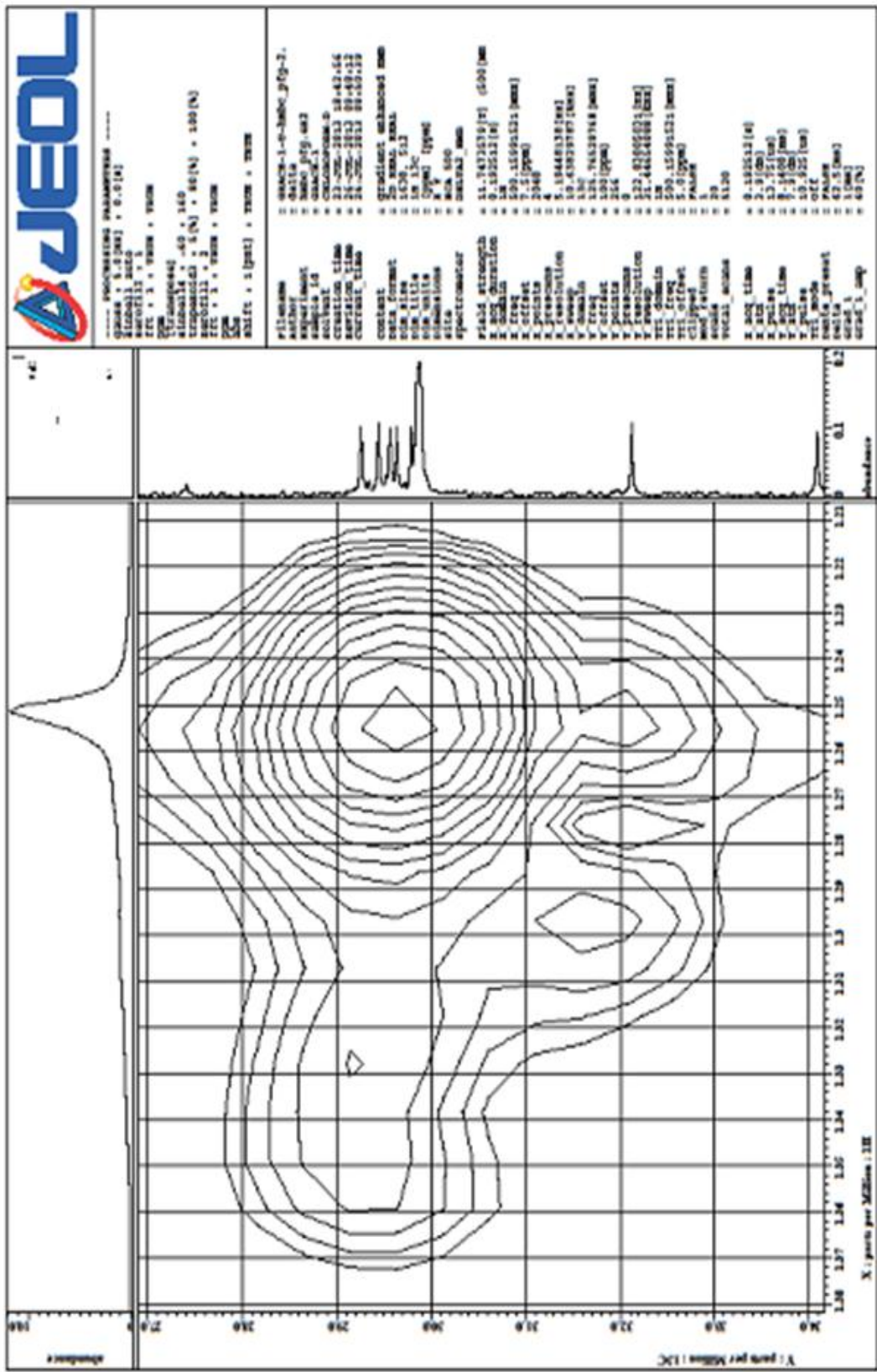
Lampiran 17. Spektrum NMR-1-HMBC-3 Isolat Fraksi Heksana







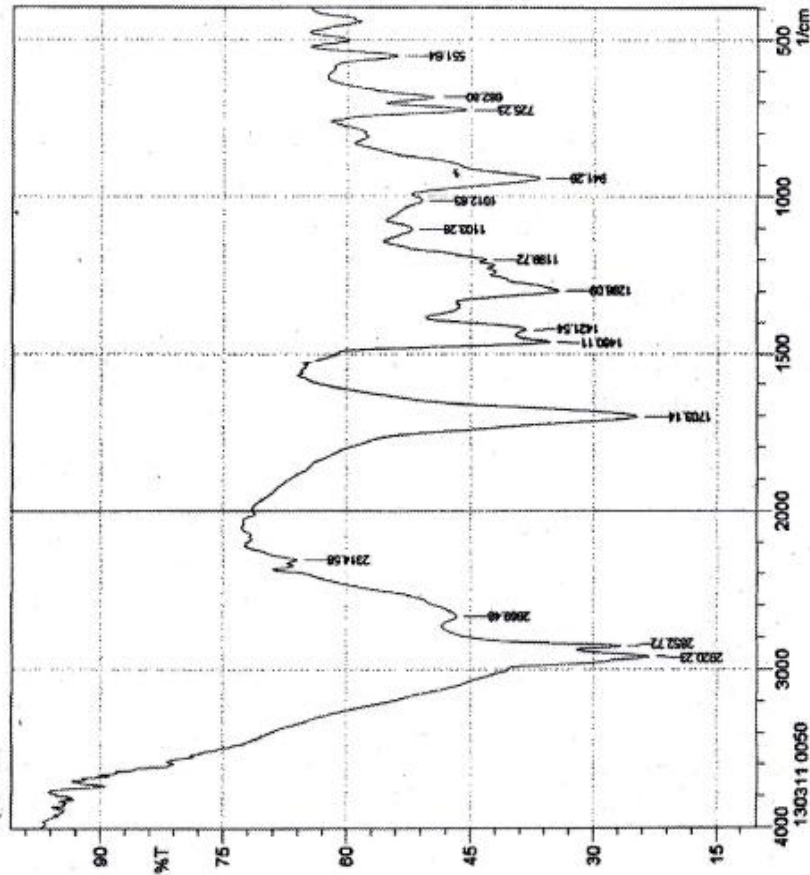
Lampiran 19. Spektrum NMR-1-HMBC-5 Isolat Fraksi Heksana



Lampiran 20. Spektrum NMR-1-HMBC-6 Isolat Fraksi Heksana



Peak	Intensity	Corr. Inte	Base (H)	Base (L)	Area	Corr. Ate	
1	53.977	9.254	586.36	522.71	14.634	1.915	
2	682.8	49.492	702.09	621.06	20.348	1.706	
3	725.23	45.6	761.86	704.02	16.021	2.511	
4	941.28	36.72	991.41	831.32	52.244	11.366	
5	1012.63	50.862	1074.35	993.34	22.512	0.593	
6	1103.28	52.164	1139.93	1076.28	17.288	0.964	
7	1199.72	43.28	1205.51	1141.96	19.467	0.282	
8	1298.09	34.347	1334.74	1247.94	35.12	4.706	
9	1421.54	36.27	1433.11	1384.89	17.879	1.073	
10	1460.11	35.361	11227	1484.83	1442.75	18.59	2.397
11	1703.14	24.648	43.044	1982.47	1573.91	108.86	40.553
12	2314.58	66.118	1.902	2331.94	2214.28	18.709	0.415
13	2699.48	46.677	5.236	2727.35	2372.44	95.372	11.324
14	2852.72	26.732	7.918	2875.85	2729.27	57.781	2.511
15	2920.23	23.209	11.923	2991.59	2877.79	60.34	9.7



Date/Time: 03/15/2013 02:06:46 PM  
 No. of Scans:  
 Resolution:  
 Apodization:  
 User: master

Comment:  
 130311 0050

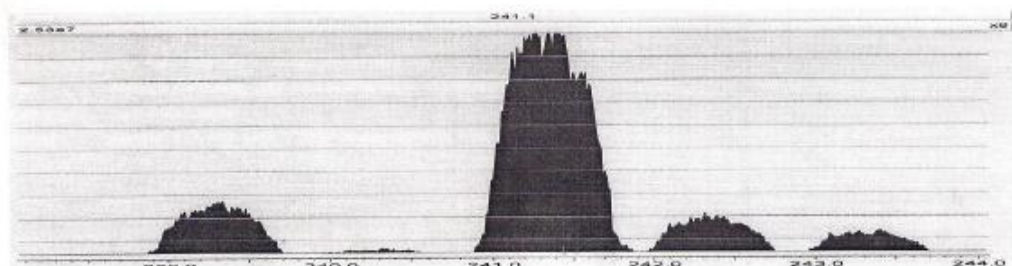
Lampiran 1. Spektrum FTIR Isolat Fraksi Heksana

## Lampiran 1. Spesifikasi alat ESMS

### Waters TQ Detector Tune Parameters - MassLynx 4.1 SCN 714

Page 1 of 2

File: C:\MassLynxBackUp\_1\MS Analysis.PRO\ACQUODB\Analysis MS.IPR  
 Instrument: ACQ-TQD#NotSet  
 Printed: Monday, August 26, 2013 11:00:07 SE Asia Standard Time



Type	Start Mass	End Mass	Set Mass
MS Scan	238.07	244.07	
<b>Source (ES-)</b>	<b>Settings</b>	<b>Readbacks</b>	
Capillary (kV)	3.00	3.06	
Cone (V)	45.00	-49.08	
Extractor (V)	3.00	-4.15	
RF (V)	0.00		
Source Temperature (°C)	120	118	
Desolvation Temperature (°C)	320	315	
Cone Gas Flow (L/Hr)	25	28	
Desolvation Gas Flow (L/Hr)	800	800	
Collision Gas Flow (mL/Min)	0.25	0.00	
<b>Analyser</b>	<b>Settings</b>	<b>Readbacks</b>	
LM 1 Resolution	15.00		
HM 1 Resolution	15.00		
Ion Energy 1	0.00		
MS Mode Entrance	50.00		
MS Mode Collision Energy	2.00		
MS Mode Exit	50.00		
MSMS Mode Entrance	2.00		
MSMS Mode Collision Energy	32.00		

### Waters TQ Detector Tune Parameters - MassLynx 4.1 SCN 714

Page 2 of 2

File: C:\MassLynxBackUp\_1\MS Analysis.PRO\ACQUODB\Analysis MS.IPR  
 Instrument: ACQ-TQD#NotSet  
 Printed: Monday, August 26, 2013 11:00:07 SE Asia Standard Time

MSMS Mode Exit	0.50
LM 2 Resolution	15.00
HM 2 Resolution	15.00
Ion Energy 2	3.00
Gain	1.00
Multiplier	-549.53
Active Reservoir	B

Pressure Gauges	
Collision Cell Pressure (mbar)	1.041010e-004

#### Instrument Configuration

##### Automatic Mode

##### MS 1 Delay Table:

R delay

<= 0.500 0.005

<= 1.200 0.010

<= 2.400 0.015

<= 6.000 0.020

<= 15.000 0.025

<= 25.000 0.028

> 25.000 0.030

##### MS 2 Delay Table:

R delay

<= 2.000 0.005

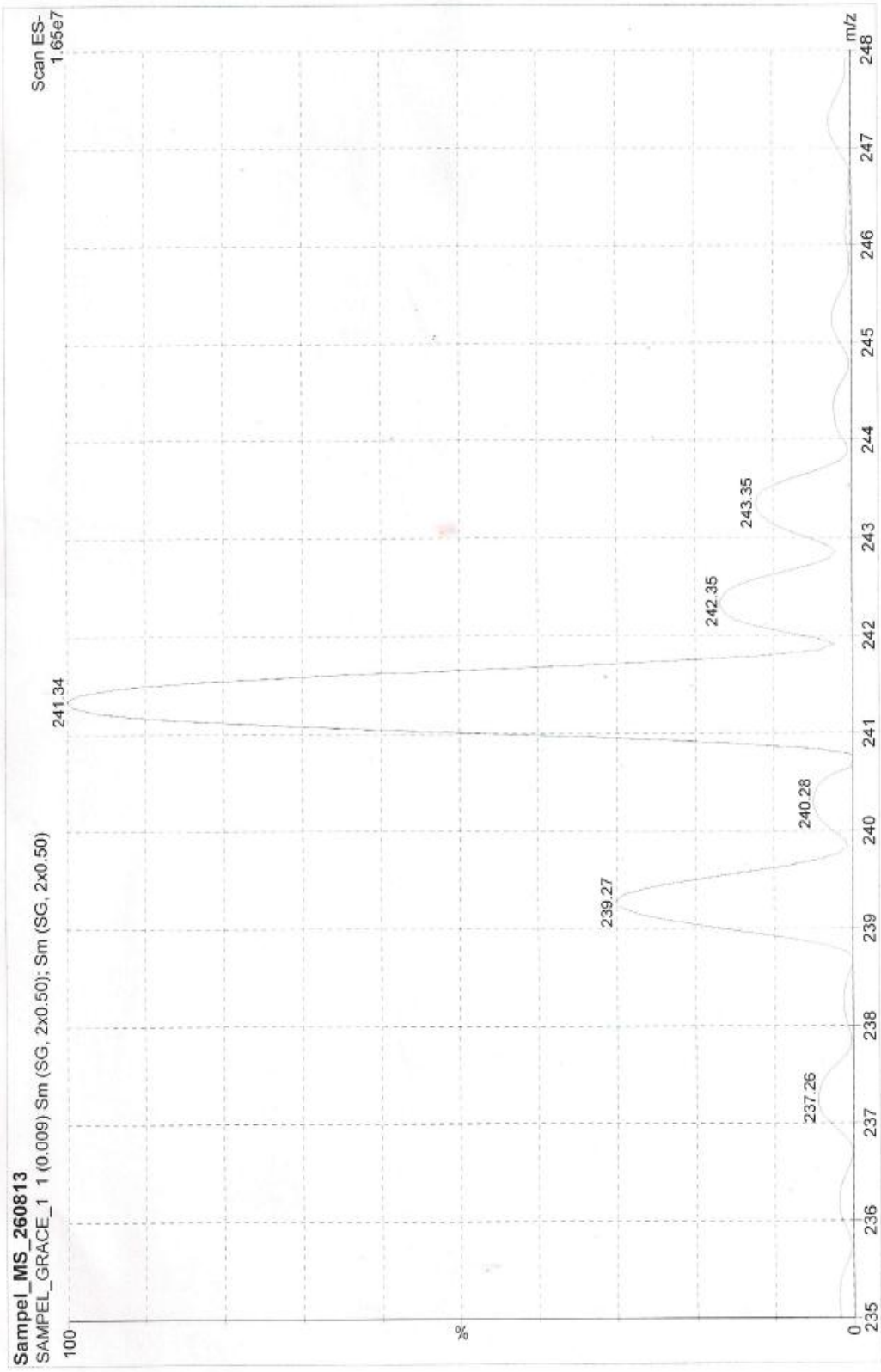
<= 4.000 0.008

<= 7.000 0.010

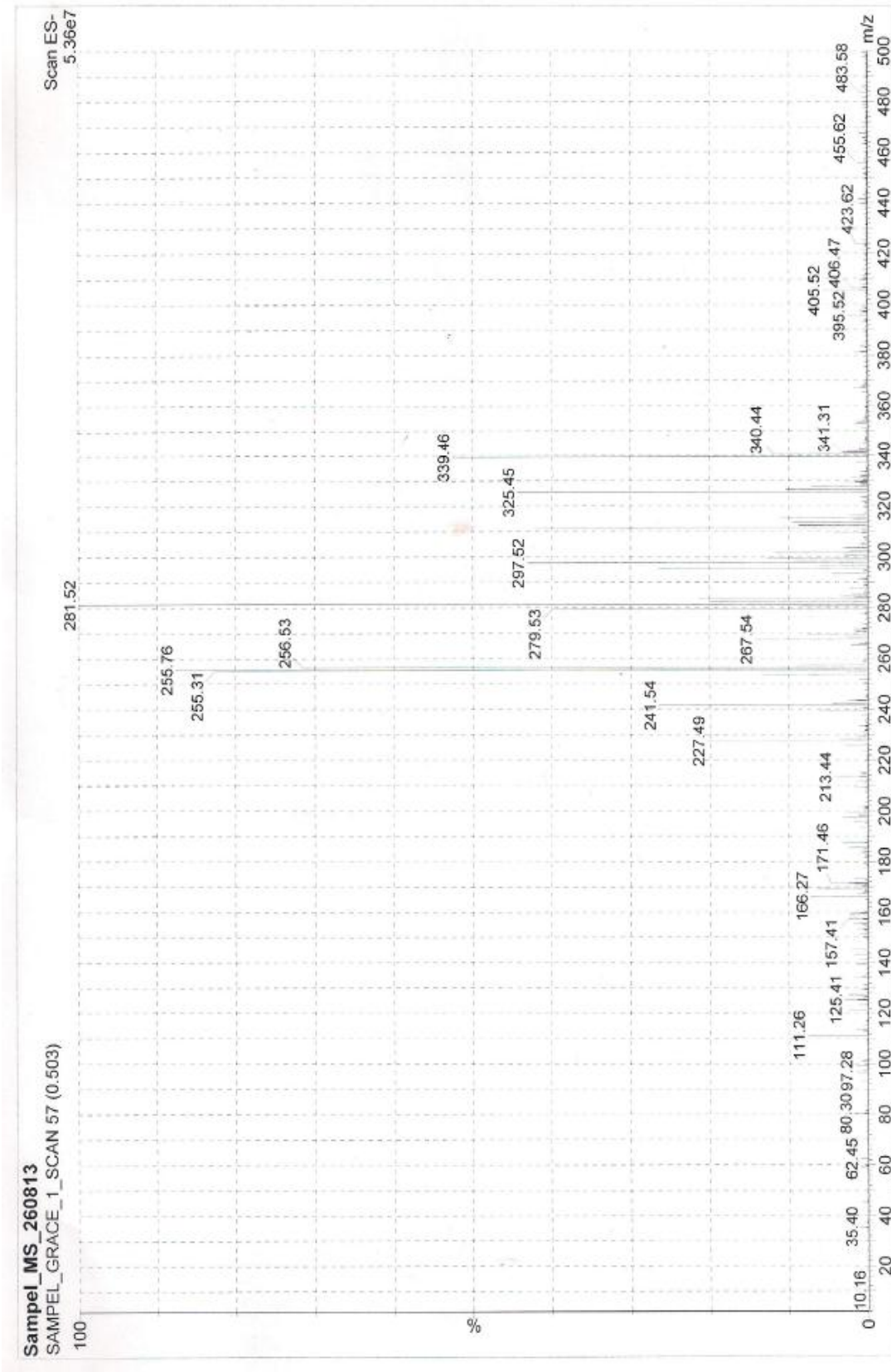
<= 10.000 0.012

<= 20.000 0.014

> 20.000 0.016

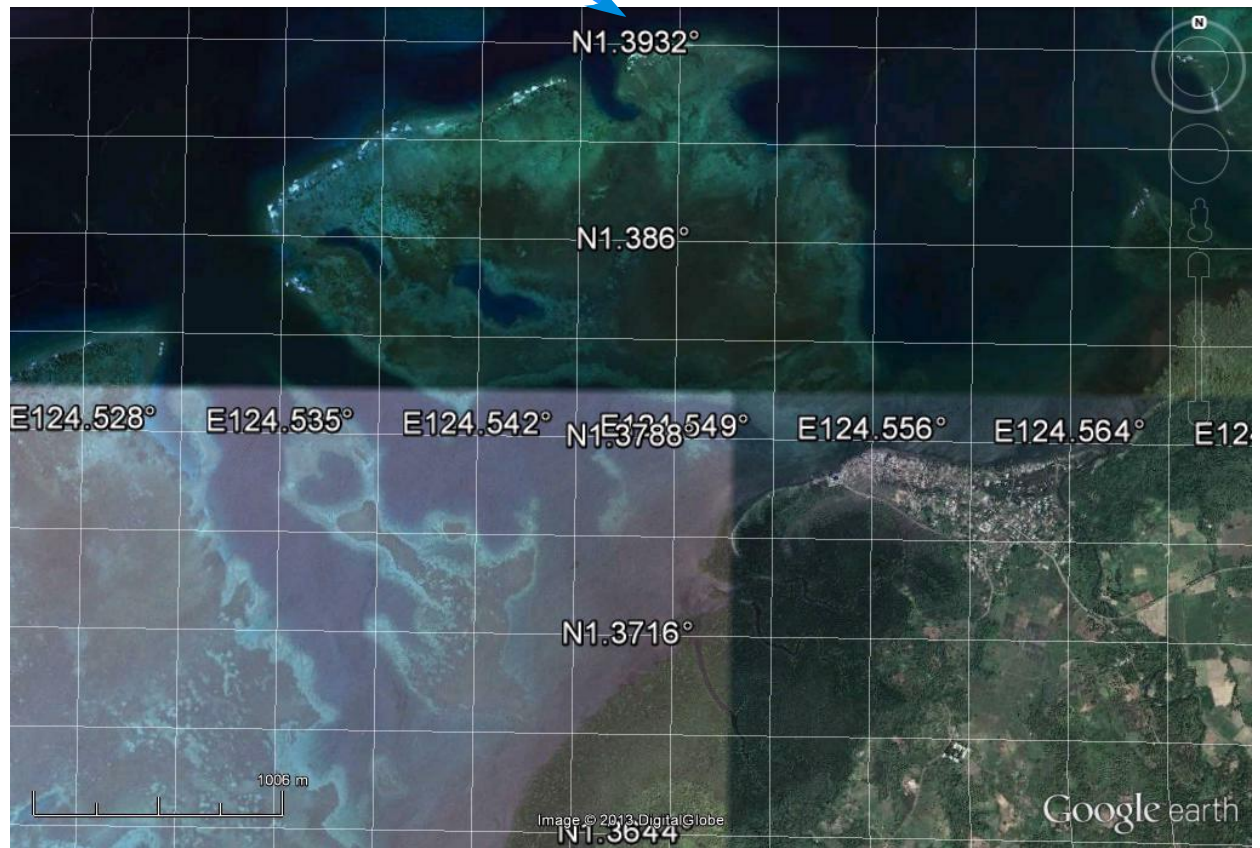
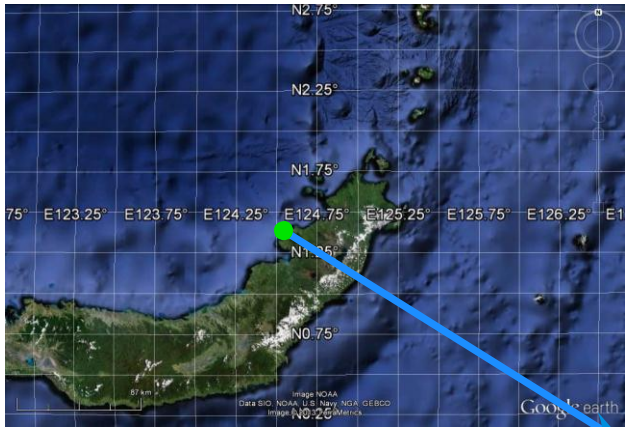


Lampiran 2 Spektrum ESMS 1. Isolat Fraksi Heksana



Lampiran 3. Spektrum ESMS 2 Isolat Fraksi Heksana

# ARAKAN





# Food Science and Quality Management

ISSN 2224-6088 (Paper)

ISSN 2225-0557 (Online)

Vol. 19, 2013

P.O. Box 5934, NEW YORK,



**International Institute for Science, Technology & Education**  
Accelerating Global Knowledge Creation and Sharing

## Antioxidant Activity of Methanol Extract of Seaweeds Obtained from North Sulawesi

Grace Sanger 1\* S.B.Widjanarko2, J.Kusnadi2, S.Berhimpon 3

1\*Ph.D Student, Graduate School Department of Food Technology, Brawijaya University, Malang  
6545,Indonesia

1\*Lecturer, Faculty of Fisheries, Sam Ratulangi University, Manado 95115, Indonesia

2Faculty of Agricultural Technology, Brawijaya University Malang 6545, Indonesia

3 Faculty of Fisheries, Sam Ratulangi University, Manado 95115, Indonesia

\* E-mail of the corresponding author: sanger.grace@yahoo.co.id

### Abstract

In Vitro antioxidant activity of five seaweeds from North Sulawesi –viz., *Gracillaria salicornia*, *Sargasum olygocystum*, *Turbinaria decurens*, *Halimeda macroloba* and *H. durvilae* were evaluated. Total phenol content (TPC) and activity antioxidant of 30,50, 70% aqueous methanol of seaweeds were studied. TPC using Folin Ciocalteu method, while 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, Ferric reducing Antioxidant Power (FRAP) and ferrous ion Chelating (FIC) assay were used to study their Antioxidant Capacity (AOC). TPC of different methanol concentration of seaweeds varied from  $2.07 \pm 0.33$  to  $18.83 \pm 0.77$  g gallic acid equivalent (GAE) per 100 gr dried sample. All seaweeds were determined to have highest TPC, DPPH and FRAP in 70 % aqueous methanol. *H. durvilae* displayed highest in TPC and DPPH. *G. salicornia* showed highest in FRAP ( $42.95 \pm 2.24$  g GAE/100 g ekstrak). Brown alga *T. decurens* and *S. olygocystum* had FIC higher than another seaweeds in 30% methanol concentration.

**Keywords:** Antioxidant Activity, Methanol Extract, Seaweeds

### 1. Introduction

Marine algae, like other photosynthesizing plants are exposed to a combination of light and oxygen that lead to the formation of free radical and other strong oxidizing agents. However, the absence of oxidative damage in the structural components of macroalgae (i.e., polyunsaturated fatty acids) and their stability to oxidation during storage suggest that their cells have protective antioxidative defence systems. In fact algae have protective enzymes (superoxide dismutase, peroxidase, glutathione reductase, catalase) and oxidative molecular (phlorotannins, ascorbic acid, tocopherols, carotenoids, phospholipids, chlorophyll related compounds, bromophenol, catechins, mycosporine-like amino acids, polysaccharides, etc) which are not similar to those of vascular plants (Burtin, 2003).

Reactive species (ROS) (e.g., superoxide anion ( $O_2^-$ ), hydroxyl radical (OH $\cdot$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and singlet oxygen ( $^1O_2$ ) are formed as a result of normal metabolic activity and exogenous sources. In pathologic condition, the antioxidant mechanism are often inadequate, therefore excessive quantities of ROS can be generated. The ROS formed may cause cellular and subcellular damage by peroxidation of membrane lipids, denaturing cellular protein, breaking DNA strands and disrupting cellular function. In vivo, cells have their own inherited antioxidative among enzymatic pathway, including  $O_2^-$  are dismutated by superoxide dismutase (SOD) to  $H_2O_2$ , catalase (CAT) reduces  $H_2O_2$  to water and molecular oxygen. Glutathione peroxidase (GPX) catalyzes the reduction of  $H_2O_2$  to water and organic peroxide to alcohols at the expense of reduced glutathione (GSH), while glutathione-S-transferase (GST) conjugates xenobiotics with GSH for excretion. Among the nonenzymatic substances, consist of  $\beta$ -carotene, GSH, Vitamin A, vitamin E and vitamin C have function to scavenge free radical (Patra. *et al.*, 2008).

Reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress have been associated with the onset of chronic disease states in humans, including coronary heart disease (CHD), certain cancer, rheumatoid arthritis, diabetes,

retinopathy of prematurity, chronic inflammatory disease of the gastrointestinal tract, as well as diseases associated with cartilage, Alzheimer's disease, other neurology disorder and the aging process (Matanjun. *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 1999). According to Shahidi (2009). Seaweed is potential as a source of natural antioxidants, contains no contamination of other compounds and has various functions that are safe to use as medication,

Food Science and Quality Management  
ISSN 2224-6088 (Paper) ISSN 2225-0557 (Online)  
Vol.19, 2013

[www.iiste.org](http://www.iiste.org)



supplement, nutraceutical and cosmetics that aim to improve health, reduce the influence of a dangerous disease, and aspects the function of the immune system.

Seaweeds have protective effect against liver injury caused by carbon tetrachloride antiproliferative activity toward HeLa cells, antimicrobial activity and antiviral properties (Chew *et al.* 2008; Yuan *et al.*, 2005; Kuda and Ikemori, 2009). Furthermore, antioxidants from natural sources increase shelf-life of food. Therefore, consumption of antioxidant and or addition of antioxidant in food materials protect the body as well as foods against the oxidative stress. The traditional Japanese diet, seaweeds are commonly used as sushi wrappings, seasonings, condiments, and vegetables and can thus continue between 10% and 25% of food intake by most Japanese (Skibola, 2004). Antioxidant activity have been attributed to various reactions and mechanism, including prevention of chain initiation, binding of transition metal ion catalysts, reductive capacity, radical Scavenging, etc. (Zubia. *et al.*, 2006). However, there is little data elucidating the antioxidant activities from north Sulawesi. Hence the present study are aimed to investigate the comparison antioxidant activity of five seaweeds.

## 2. Materials and methods

### Sample

*Gracillaria salicornia*, *Sargasum olygocystum*, *Turbinaria decurens* and *Halimeda macroloba* and *H. durvillae* were collected from Arakan, Manado, Indonesia in the period February 2012 respectively. The sample was thoroughly washed with seawater and fresh water to remove epiphytes and dirt particles. They were delivered to laboratory and were stored at -20°C. Until further use. This sample was used for determination of TPC as well as for antioxidant activity studies. The determination each assay was carried out in triplicate.

### Preparation of sample extract

Two-hundred-and-fifty grams sample extracted using 500 ml of 30, 50 and 70% w/v methanol overnight for 3 times at room temperature, filtered with filter paper Whatman No. 1 and concentrated down to 30 ml at 40°C by rotary evaporator (Eyela, Buchi water Bath B-480, Aspirator 13 Iwaki) and storage at -20°C for further analysis.

### Chemicals and reagents

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) were purchased from Sigma Aldrich, Ferrozin iron reagent, Follin Ciocalteu's phenol, Sodium carbonate, BHT, methanol, potassium dihydrogen phosphate, iron (III) chloride-6-hydrate, Trichloroacetic acid and Potassium ferricyanide purchased from Merk. All other solvent and chemicals were of analytical grade.

### Total phenolic content (TPC)

The TPC of the extracts in 30, 50, 70% methanol was measured using Follin Ciocalteu method as described by Ganesan. *et al.*, (2008). 50% Follin Ciocalteu's phenol reagent (1 ml) were added to sample extract (0,1 ml) and vortexed, Furthermore added with 7% w/v Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 ml) and the reaction mixture was then measured at 750 nm. TPC was expressed in terms of g gallic equivalents (g GAE)/100 g dried samples. The calibration equation for gallic acid was  $y = 0,005x + 0,057$  ( $R_2 = 0,9998$ ).

### Antioxidant activity (DPPH)

DPPH-scavenging potential of different concentration of methanol was measured based on to test the scavenging ability of stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals by the sea weeds antioxidants. DPPH assay was measured using the method describe by Chew. *et al.*, 2008. Briefly, 2ml of 93 µM DPPH were added to 0.5 ml extract solution (containing 10 mg/ml concentration). The mixture was then vortexed vigorously and left for 20 min at room temperature in dark. The absorbance was measured at 517 nm and activity was expressed as percentage DPPH scavenging activity relative to the control, using that following equation:

$$\% \text{ Inhibition} = \left[ \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100\%$$

### Ferric-reducing antioxidant Power (FRAP)

Reducing power of crude metanol extract of seaweeds was determined by the method prescribed by Chandini. *et al.* 2008 . Briefly, 1.0 ml of metanol extract (containing 10mg/ml concentration) was mixed with 1ml of phosphate buffer (0,2 M, pH 6,6) and 1 ml potassium ferricyanide (1%). Reaction mixture was incubated at 50°C for 20 min. After incubation, 1 ml of trichloroacetic acid (10%) was added and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. From the upper layer, 1 ml solution was mixed with 1 ml sterile water and 0,5 ml FeCl<sub>3</sub> (0,1%). Absorbance of all solution was measured at 700 nm. The FRAP Value was expressed in terms of g gallic equivalents (GAE)/100 g dried samples. The calibration equation for gallic acid was  $y = 0.023 x + 0.373$  ( $R_2 = 0.9998$ ).

### Ferrous Ion Chelating (FIC)

Ferrous Ion chelating of the seaweeds were used for the present investigation. The chelating of ferrous ions by the extracts was investigated by the method Kumar. *et al.*, (2008). 0,1 mM FeSO<sub>4</sub>, extract of seaweeds (containing 10mg/ml concentration) and 0,25 mM ferrozine were mixed vigorously. The reaction mixtures left standing for 20 minutes. After the mixture had reached equilibrium, the absorbance of solution was measured at 562 nm. The percentage inhibition of ferrozine-Fe<sup>2+</sup> complex formation was determined using the following formula: % Inhibition =  $[(A_{control} - A_{sample}) / A_{control}] \times 100\%$ .

### Statistical analysis

All experiments were conducted in triplicate (n=3). The means of parameters phenol and antioxidant activity were examined for significant by analysis of variance (ANOVA). Significant differences between the means of parameters were determined by using the LSD test ( $P < 0.05$ ) using statistical software Centurion XVI.

## 3. Result

### 3.1. Extract yield

Yield of total methanolic extract of *G. salicornia*, *S. olygocystum*, *T. decurens* and *H. microloba* and *H. durvillae* are given in Table 1. *H. durvillae* extracts showed the highest yield followed with *G. salicornia*, *T. decurens*, *H. microloba* and *S. olygocystum* respectively. The extraction yield of the methanolic extracts range from 0.26±0.04 - 2.96±0.08%.

Table 1. Yield of Total extracts of various dilutions of methanol in water on *G. salicornia*, *S. olygocystum*, *T. decurens*, *H. microloba* and *H. durvillae* samples.

Jenis rumput Laut	Yield of extracts (%(w/w))		
	Concentration of Methanol		
	30%	50%	70%
<i>G. salicornia</i>	1.28±0.06	0.97±0.03	1.13±0.02
<i>S. olygocystum</i>	0.27±0.02	0.26±0.04	0.27±0.03
<i>T. decurens</i>	0.82±0.05	0.05±0.003	0.38±0.02
<i>H. macroloba</i>	0.48±0.03	0.48±0.03	0.68±0.07
<i>H. durvillae</i>	2.96±0.08	2.88±0.07	1.14±0.06

All the value are means ±SD (n=3)

### 3.2. Total Phenolic Content

Phenolic compound are commonly found in plants and have been reported to have several biological activity including antioxidant properties. Early reports revealed that marine sea weeds extracts, especially their polyphenols, have antioxidant activity. The major active compound in different sea weed extracts, have been reported to be phlorotannins and fucocoxanthin (Ganesan, 2008). Total phenolic content (TPC) of seaweed of various dilutions of methanol in water on *G. salicornia*, *S. olygocystum*, *T. decurens* and *H. microloba*, *H. durvillae*

samples (Table 2) showed that the phenolic content in methanolic extracts between species and methanol concentration were significant different ( $P < 0.05$ ). The Total phenolic content of the extracts show that there was an increase in yield with increase the concentration of methanol. The highest content of phenol in 70% methanolic

Table 2. Total phenolic content (TPC) of various dilutions of methanol in water on *G. salicornia*, *S. olygocystum*, *T. decurens* and *H. microloba*, *H. durvilae* samples.

Seaweeds	Total Phenol Content (g GAE/100g extract)		
	Concentration of methanol		
	30%	50%	70%
<i>G. salicornia</i>	3.02±0.68 <sup>ax</sup>	2.95±0.61 <sup>ax</sup>	6.33±0.51 <sup>ay</sup>
<i>S. olygocystum</i>	3.16±0.81 <sup>ax</sup>	5.86±0.66 <sup>by</sup>	14.32±0.32 <sup>bz</sup>
<i>T. decurens</i>	3.86±0.37 <sup>bx</sup>	5.26±0.28 <sup>by</sup>	13.71±0.98 <sup>cz</sup>
<i>H. macroloba</i>	9.6±0.32 <sup>cx</sup>	11.11±1.12 <sup>cx</sup>	18.42±0.65 <sup>dz</sup>
<i>H. durvilae</i>	2.07±0.33 <sup>dx</sup>	2.95±0.43 <sup>ay</sup>	18.83±0.77 <sup>dz</sup>

All the value are means ±SD (n=3)

a,b,c,d,e Colom wise value with same superscripts of these type indicate no significant ( $P > 0.05$ )

x,y,z Row wise values with different superscripts of these type indicate significant difference ( $P < 0.05$ )

### 3.3. DPPH

DPPH has been used extensively as a free radical to evaluate reducing substance and is useful reagent for investigating the free radical scavenging activities of compounds (Candini. *et al.*, 2008; Duan. *et al.*, 2006). Theradical scavenging activity of *G. salicornia*, *S. olygocystum*, *T. decurens* and *H. microloba* and *H. durvilae* extracts are shown in fig.1 and expressed as presentage reduction of DPPH absorption the tested compound. Respectively, the highest antioxidant activity was in 70% methanol extract. Antioxidant activity between concentration of methanol are significant different ( $P < 0.05$ ). The best radical scavenging activity obtained in the 70% methanol extract of *H. durvilae* (64.63±2.28 %) followed by *H. microloba* (57.73±3.13%) *T. decurens* (48.46±3.89%). These value were lower than those obtained using BHT (85.55±4.56% in 200 ppm). All Species chloropyta and phaeophyta relatively exhibit high DPPH radical scavenging activity i.e *H. Tuna*, *Caulerpa supressides* and *Caulerpa paspaloides* (Zubia. *et al.*, 2007) *S. marginatum* and *T. conoides* from India have radical scavenging activity (Chandini. *et al.*, 2008). Matanjun (2008) showed, there was a significant correlation between antioxidant activity and phenolic content of seaweeds. Many algae species contain polyphenol glucinolic phenolic (phlorotannins) and these study the activity antioxidant of alga could be due to these compound.

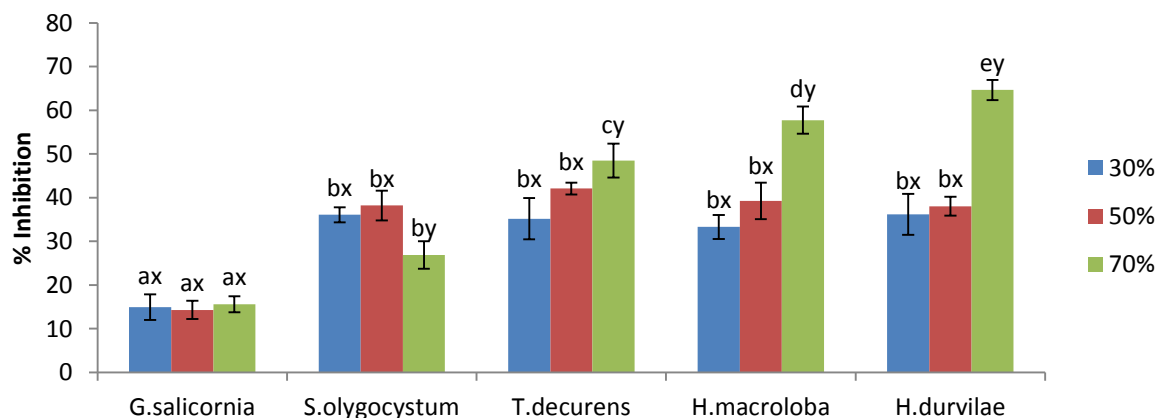


Figure 1. Free radical scavenging activity of methanolic extract on sea weeds (10 mg/ml extract)

Result are mean  $\pm$  SD (n=3).

a,b,c,d,e Indicates significant different ( $P < 0.05$ ) between concentration of extract for individual seaweeds  
x,y,z indicates a significant ( $P < 0.05$ ) between seaweeds species at each concentration of extract

### 3.3. Ferric Reducing antioxidant Power (FRAP)

The antioxidant power was measured by FRAP method at  $\lambda$  700 nm which was based on comparison of the total of antioxidant with the reducing capacity of the samples. In FRAP, the AOC was determined based on the ability of the antioxidant components in the samples to reduce ferric (III) to ferrous (II) in a redox-linked colourimetric reaction (Limet *et al.*, 2006) that involves single electron. The reducing power of *G. salicornia*, *T. decurens*, *H. microloba* and *H. durvilae* extracts increased when the concentration of methanol increase. The FRAP value of *S. olygocystum* not significant ( $p > 0.05$ ) in all concentration of methanol. Figure 2. Illustrates the total antioxidant power of the seaweed extracts (10 mg/ml). The result show that *G. salicornia* have the highest activity ( $42.95 \pm 2.24$  g GAE/100 g extract). When comparing with BHT ( $80.37 \pm 3.14$  gr/100 gr extract) that antioxidant power of seaweeds were significantly less. The AOC among *S. olygocystum*, *H. durvilae* and *T. decurens* are non-significant different ( $P > 0.05$ ). Reducing ability of a compound greatly depends on the presence of reductones, which are exhibit oxidative potential by breaking the free radical chain with donating a hydrogen atom.

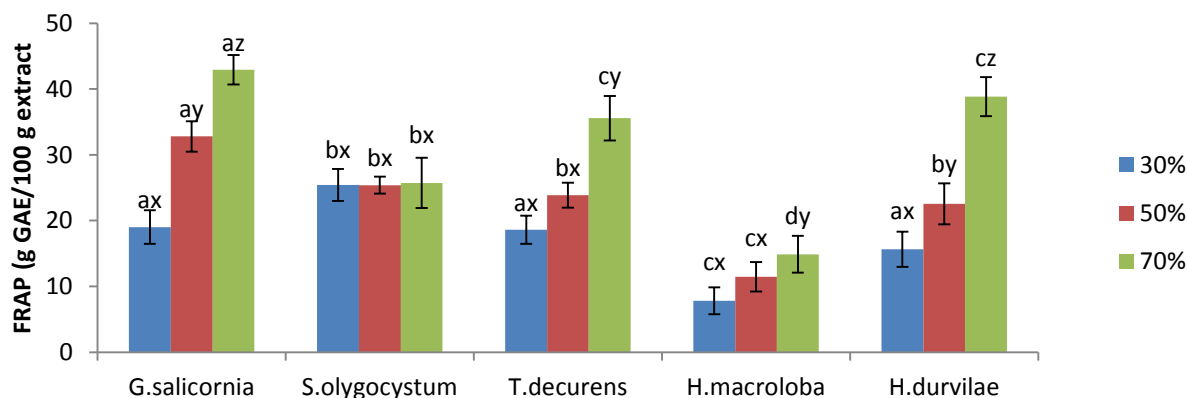


Figure 2. Comparison Reducing power activity of methanolic extract of seaweeds (g GAE/100 g extract Concentration of sample 10 mg/g). Result are mean  $\pm$  SD (n=3).

a,b,c,d,e indicates significant different ( $P < 0.05$ ) between concentration of extract for an individual seaweeds. x,y,z indicates a significant ( $P < 0.05$ ) between seaweeds species at each concentration of extract.

### 3.4. Ferrous ion chelating (FIC).

All the seaweed extracts had metal ion chelating activity in concentration methanol and species significantly ( $p < 0.05$ ). The ability of *G. salicornia* increased with increasing the concentration of methanol. The highest chelating ability in 70% methanol was *G. salicornia*, ( $54.07 \pm 3.01\%$ ), Otherwise *S. olygocystum* ( $76.14 \pm 3.36\%$ ), *T. decurens* ( $86.18\%$ ) and *H. macroloba*  $72.24 \pm 0.50\%$  have highest activity in methanol 30%. These values were still lower than those obtained using BHT ( $40.59 \pm 5.16\%$  in 200 ppm). Prolotannins which are usually present in brown sea weeds are strong chelators of heavy metals. Iron is known to generate free radicals through the Fenton & Haber-weiss reaction. Metal ion chelating activity of an antioxidant molecule prevents oxyradical generation and the consequent oxidative damage. Metal ion chelating capacity plays a significant role in the antioxidant mechanism since it reduces the concentration of the catalyzing transition metal. It is reported that chelating agents that form  $\sigma$  bonds with a metal, are effective secondary antioxidants since they reduce the redox potential, thereby stabilizing the oxidized form of the metal ion. Metal binding capacities of dietary fibers are well known, e.g. the inhibitory effects on ferrous absorption of alga dietary fibers such as carrageenan might have caused the decrease of ferrous ion in the assay system. (Kumar. *et al.*, 2008 and chew. *et al.*, 2008).

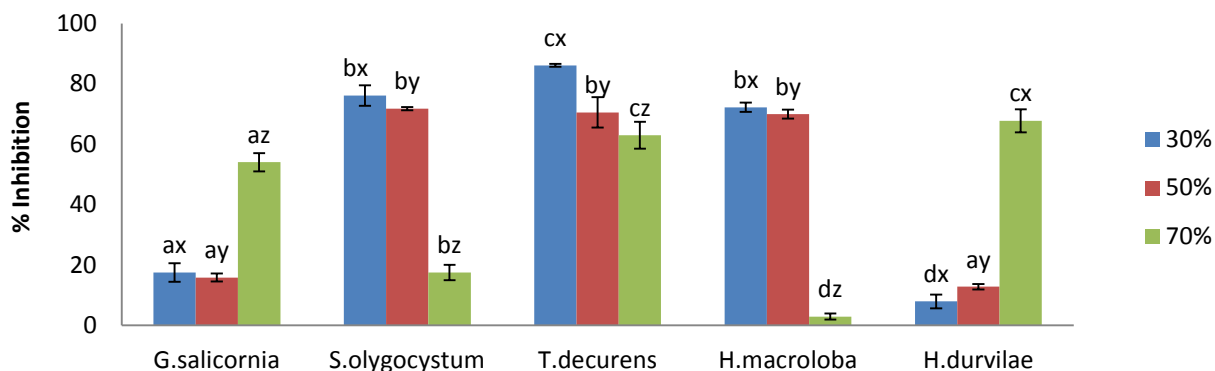


Figure 3. Comparison of percent of Ferrous Ion Chelating activity of methanolic extract of sea weeds (10 mg/ml) Result are mean  $\pm$  SD (n=3).

a, b, c, d, e Indicates significant different ( $P < 0.05$ ) between concentration of extract for individual seaweed species. x, y, z indicates a significant ( $P < 0.05$ ) between seaweed species at each concentration of extract

### Discussion

The results of this study showed that the concentration of 30, 50 and 70% methanol gave significant effect ( $P < 0.05$ ) on total phenolic content and antioxidant activity. TPC, DPPH and FRAP antioxidant activity increased with increasing concentrations of methanol. Phenol is a very important component in seaweed because its ability to reduce free radicals, since hydroxyl groups of phenolic compounds is linked with antioxidant activity and plays an important role in stabilizing lipid peroxidation (Vinayak and Shiyamala, 2012). The important product of Lipid peroxidation is malonaldehyde that reflects the level of lipid peroxidation in clinical diagnosis (Fukunakz. *et al.*, 1995). Algae contains phenolphloroglucinol (phlorotannin) which serves as a reducer of reactive oxygen species, chelating metals, enzyme modulators and prevent lipid peroxidation. (Matanjune *et al.*, 2007), antioxidant activity of the sample has a strong correlation to the FRAP Value. Reducing power characteristic indicate that antioxidant compound is the electron donor and can reduce intermediate oxidation of lipid peroxidation process, so it can function as primary and secondary antioxidant. There is also a strong relationship between the total phenol content and antioxidant activity.

In concentration of 70% methanol *H. macroloba* had TPC, DPPH and FRAP values are quite high. Boonchumi. *et al.*, (2011), found that *H. macroloba* have antioxidant activity DPPH, reducing power, superoxide radicals and anti-lipid peroxidation. Yoshie. *et al.*, (2002) reported that composition of phenolic compounds and other phenolic compounds will differ even between the same species, as in *Halimeda spp.* A very large number on *H. macroloba* is epigallocatechin for 20.000  $\mu\text{g} / \text{g}$  dry weight, catechol and hesperidin is only on *H. macroloba*. Catechol on *H. macroloba* 5 times from *H. opuntia*. myricetin and morin on *H. macroloba* average 2 times larger than *H. opuntia*.

Antioxidant activity DPPH, FRAP and FIC value were lower than positive control BHT, but there are many compounds of seaweed have biological function although non-enzymatic antioxidant is low. It means that antioxidant activity influenced by enzymatic antioxidant. All living organisms contain a complex system of enzymes antioxidant, such as thioredoxin system required for life. Antioxidants in biological systems have multiple functions, including defense against the damage of oxidative and play as major signaling pathway in the cell. The main role of antioxidants in cells is to prevent damage by reactive oxygen species (Devi. *et al.*, 2011). Hydroxyl, superoxide and peroxyl radical formed in human cells cause the damage of oxidative intensive which lead to geriatric degenerative conditions of human carotenoid disease. Carotenoids are natural pigments from plants to react quickly with free radicals and slow down and reduce the progression of oxidative damage (Shou. *et*

al., 2003). *G. salicornia* showed the highest reducing power (FRAP). According to Nazir. *et al.*, (2011), the results of compound structure elucidation on ethyl acetate fraction of *G. salicornia* was identified as 22-dehydrocholesterol, cholesterol, oleic acid and stigmaterol. Red algae contain mainly cholesterol, demosterol and 22-dehydrocholesterol. Oleic acid degrades the risk of coronary heart disease. Oleic acid also has a protective effect

against cardiovascular complications of diabetes because the levels of glutathione, total lipids and triglycerides are profitably affected and lowering the activity of tissue factor in diabetes-hyperglycemia that can protect the tissue from the risk of thrombosis.

*S. olygocystum*, *T. decurens* and *H. macroloba* in FIC had the highest activity at the concentration of 30% methanol. *T. decurens* has the highest ion chelating activity, it means that it has the highest ability to reduce  $Fe^{+3}$  ions. Brown algae contains phlorotannin which is a strong chelator of heavy metals (Nwosu. *et al.*, 2011). Phlorotannin can serve as antiproliferative, bactericidal, inhibiting  $H_2O_2$ , prevent DNA damage, and treat hypertension (Gornish & Garbary. 2010). *Turbinaria sp.* were found to have antioxidant and anti-inflammatory activity, have essential nutrients compounds, mineral salts (K, Ca and Fe), soluble fiber, protein can be digested and slightly PUFA (Chakraborty, 2013). Seaweeds are rich source of PUFA and fatty acids that can inhibit the growth of systemic spread of breast cancer through a mechanism independent of the host immune system, except through intracellular lipid peroxidation (Deveriet *et al.*, 2001). Seaweed is considered as the metabolic bioactive through a broad spectrum of biological activities, which *Gracilaria salicornia* and *Sargassum oligocystum* in vitro activity against Leishmania major promastigote evaluated by MTT assay. where treatment with pentavalent antimonial therapy showed failure (Fouladvand. *et al.*, 2011).

In this research found that the highest TPC and antioxidant activity DPPH present in *H. durvillae* at the concentration of 70% methanol extract. *H. durvillae* is a red algae that contains high pigment and has a high content of polysaccharide components such as low weight molecular pigment, protein or polypeptide which also affect antioxidant activity (Kumar. *et al.*, 2008). *G. salicornia* and *H. durvillae* at the concentration of 70% methanol based on this research has higher antioxidant activity DPPH, FRAP and FIC compared with another else. Bioactive compound contained in seaweed is beneficial to cure degenerative diseases. Polysaccharide sulfate can prevent the damage of oxidative living organism. The degree activities depending on the amount of sulfate, molecular weight, and position of sulfate on sugar glycosides. Phosphate and sulfate content in polysaccharide make different on their biology activity (Yuan. *et al.*, 2005). Based on this research we conclude that seaweed *Gracilaria salicornia*, *Sargassum oligocystum*, *Turbinaria decurens*, *Halimeda macroloba* and *H. durvillae* can be used as a source of natural antioxidant products for pharmacological purposes.

## Conclusion

In this study showed that *H. durvillae* and *G. salicornia* extract showed highest extraction efficiency respectively. In 70% methanol extracts have highest value in Total phenol content and antioxidant activity DPPH, FRAP. *H. durvillae* showed significantly higher TPC and DPPH than *G. salicornia*, *S. polycystum* and *T. macroloba*. FRAP ability of *G. salicornia* showed better than the other seaweeds. In concentration 30% methanol extract of *S. polycystum*, *T. decurens* and *H. macroloba* performed highest in chelating ability.

## References

- Boonchum, W., Y. Peerapornpisal, P. Vacharapiyasophon, J. Pekkoh, C. Pumas, U. Jamjai, D. Amornlerdpison, T. Noiraksar and D. Kanjanapothi, 2011. Antioxidant activity of some seaweed from the gulf of Thailand. *Int. J. Agric. Biol.*, 13: 95-99
- Burtin P., 2003. Nutritional Value of Seaweeds. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.*, 2:498-503.
- Chakraborty K, Lipton A, Paulraj R, Chakraborty R. Guaiane sesquiterpenes from seaweed *Ulva fasciata* Delile and their antibacterial properties. *Eur J Med Chem.* 2010;45:2237-2244. 55
- Chandini S.K, P Ganesan, N Baskhar (2008) In Vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. *Science Direct. Food Chemistry* 107;707-713.
- Chew Y.L, Y.Y Lin, M. Omar, K.S K.S Khoo (2008) Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *Science Direct LWT* 41;1067-1072.
- Cornish L.M., and Carbary D.J., 2010. Antioxidant from macro-algae: potential applications in human health and nutrition. *Algae* 2010, 25(4):1-17.



Devi K.P, N Suganthy, P Kesika, S.K Pandian (2008) Bioproperties of seaweeds: In vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity against food borne bacteria in relation to polyphenolic content. BMC Complementary and alternative medicine doi:10.1186/1472-6882-8-38.

Food Science and Quality Management  
ISSN 2224-6088 (Paper) ISSN 2225-0557 (Online)  
Vol.19, 2013

[www.iiste.org](http://www.iiste.org)  


- Duan X.J, W.W Zhang, X.M li, B.G Wang (2006) Evaluation of antioxidant property of extract and fraction obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. Food Chemistry 95:37-43
- Fouladvand M, Barazesh A, Farokhzad F, Malekizadeh H, Sartavi K. 2011. Evaluation of in vitro anti-Leishmanial activity of some brown, green and red algae from the Persian Gulf. Eur Rev Med Pharmacol Sci. Jun; 15(6):597-600.
- Ganesan P, C.S Kumar and N Baskar, 2008. Antioxidant Properties of Methanol Extract and Its Solvent Fraction Obtain From Selected Index Red Sea Weeds. Journal Science Direct. Bioresources Technology 99(2008) 2717-2723.
- Fukunaka K., K. Takama and T. Suzuki, 1995. High performance lipid chromatographic determination of Plasmalomaldehyde level without a solvent extraction of industrial Interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. J. Agric. Food Chem., 57: 1768-1774.
- Kuda T, T Ikemori (2009) Minerals, polysaccharides and antioxidant properties of aqueous solutions obtained from macroalgal beach-casts in the Noto Peninsula, Ishikawa, Japan. Elsevier Food Chemistry 112; 575-581.
- Kumar K.S, K Ganesan, P.V Suba Rao (2008). Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty-An edible seaweed. Science Direct Food Chemistry 107; 289-295.
- Lim S.M, P.C.K Cheung VEC Ooi, P.O Ang (2002) Evaluation of antioxidative activities of extract from a brown seaweed *Sargassum siliquastrum*. J agric Food Chem 50:3862-3866
- Matanjun P, S. Muhamed, N.M Mustapha, K. Muhammad (2008) Antioxidant activities and phenolic content of eight species of sea weeds from north Borneo. J Appl Phycol 20:367-373.
- Nasir M, Saeidnia S, Mashinchian-Moradi A and Gohari AR. Sterols from the red algae, *Gracilaria salicornia* and *Hypnea flagelliformis*, from Persian Gulf. Phcog. Mag. (2011) 7: 97.
- Nwosu F., J. Morris, V.A. Lund, Stewart, H.A. Ross, G.J. McDougall. 2011. Antiproliferative and potential antidiabetic effect of phenolic-rich extracts from edible marine alga. Food Chem. 2011, 23, 797-810.
- Patra J.K, S.K Rath, K Jena, V.J Rathod, H Thato (2008) Evaluation of antioxidant and antimicrobial activity of seaweed (*Sargassum* sp.) Extract: study on inhibition of Glutathione-S-transferase Activity. Turk J Biol 32:119-125.
- Shahidi F., 2009. Nutraceuticals and functional Food: whole versus processed. Trends Food Science Tech. 20:376-387.
- Shon MY, Kim TH, Sung NJ. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* (Phellius of Hymenochaetaceae) extracts. Food Chem 2003; 82: 593-597. 14
- Singh N. & P.S Rajini (2004) Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel. Food Chemistry, 85:611-616.
- Skibola C (2004) The effect of *Fucus vesiculosus*, an edible brown seaweed, upon menstrual cycle length and hormonal status in three pre-menopausal women: a case report. BMC complementary and alternative medicine 4:10-12
- Vinayak R.C., A.S. Sabu, A. Chatterji. 2010 Bio-Prospecting of a Few Brown Seaweeds for Their Cyooxic and Antioxidant Activity. Complementary and Alternative Medicine. Vol. 2011.1-9.
- Yan X, Y Chuda, M Suzuki, T Nagata (1999) Fucoxanthin as the Major Antioxidant in *Hijikia fisiformis*, Common edible seaweed. JSBA Biosci, Biotechnol, Biochem 63 (3) 605-607.
- Yoshie Y., W. Wand, Y.P Hsieh, Suzuki T. 2002. Compositional difference of phenolic compounds between two seaweeds, *Halimeda* spp. J. Tokyo Univ. Fish. 88:21-24.
- Yuan H, W. Zhang, X. Li, X. Lu, N. Li, and X. Gao. 2005. Preparation and in-vitro antioxidant activity of karageenan oligosaccharides and their oversulfated, acetylated, and phosphorylated derivatives. Carbohydrate research, 340, 685-692.

- Zhou, H. Xin, W. Sheng, Y. Sun, Z. Li, and Z. Xu, "In vivo growth-inhibition of S180 tumor by mixture of 5-Fuand low molecular  $\lambda$ -carrageenan from *Chondrus ocellatus*," *Pharmacological Research*, vol. 51, no. 2, pp. 153–157, 2005. 141
- Zubia M, D Robledo, Y.F Pelegrin (2007) Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *J Appl. Phycol* 19;449-458.

# plagiarism detector

Cutting-edge class tool for plagiarism detection and prevention



## KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA PROGRAM PASCASARJANA



14 0082 D

Nomor : 355/UN10.14/PI/2014

Sertifikat ini diberikan kepada :

**Grace Sanger**

Dengan Judul Disertasi :

Aktifitas antioksidan alga laut *Grasilaria salicornia*, *Sargasum olygocystum*,  
*Turbinaria decurens*, *Halimeda macroloba*, *H.durvillae*, isolasi dan  
Elusidasi senyawa aktif fraksi n- Heksana *Halimena.durvillae*.  
Telah dideteksi tingkat plagiasinya dengan kriteria toleransi  $\leq 5\%$ , dan  
dinyatakan Bebas dari Plagiasi.

Direktur,

Prof. Dr/Drs. Abdul Hakim, M.Si

NIP. 19610202 198503 1 006

Malang, 14 April 2014  
Ketua Tim Pelayanan Penjaminan Mutu

Amin Setyo Leksono, S.Si., M.Sc., Ph.D  
NIP.19721117 200012 1 001

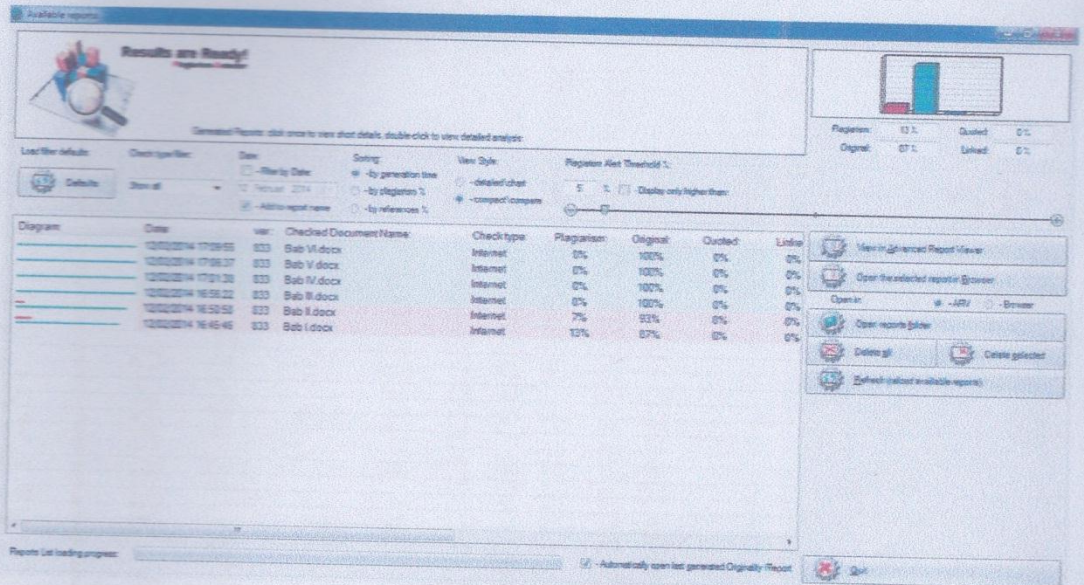
## Hasil Deteksi Plagiasi

Nama : Grace Sanger

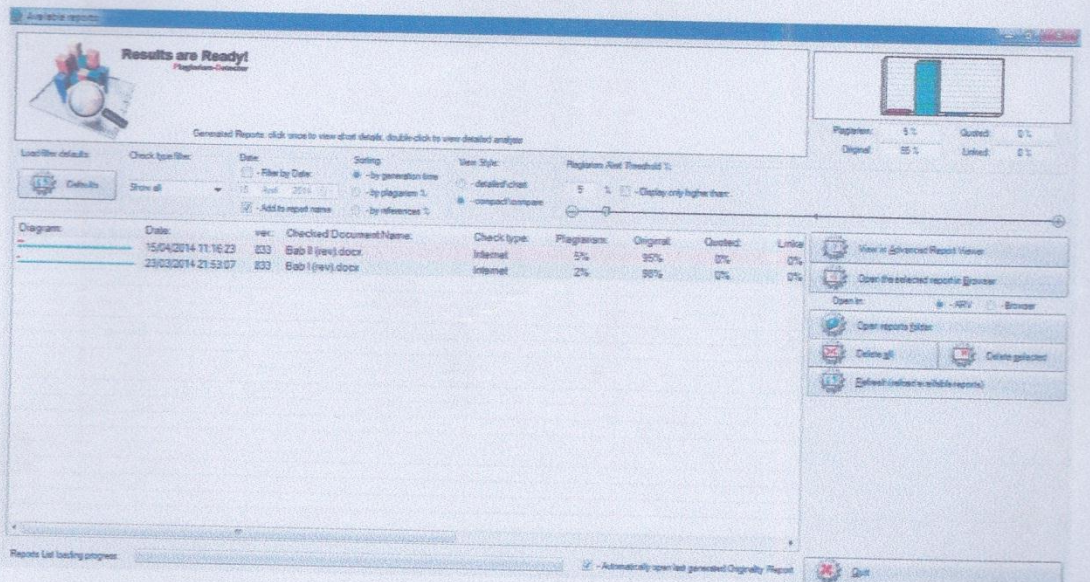
Jenis artikel : Disertasi

Program studi : Program Doktor Ilmu Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya

## Hasil Deteksi Plagiasi



## Hasil Deteksi Plagiasi ke-2





KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
**PROGRAM PASCASARJANA**

Jl. Mayor Jenderal Haryono 169, Malang 65145, Indonesia  
Telp.: (0341) 551611, 575777 ; Pes. 221, 222 Langsung: (0341) 571260 ; Fax: (0341) 580801  
Email: ppsub@ub.ac.id Website: http://ppsub.ub.ac.id

**SURAT KETERANGAN BEBAS PLAGIASI**

Nomor : 355/UN10.14/PI/2014

Direktur Program Pascasarjana Universitas Brawijaya menyatakan bahwa Disertasi:

Nama : Grace Sanger  
NIM : 107040100111078  
Judul : Aktifitas antioksidan alga laut *Grasilaria salicornia*, *Sargasum olygocystum*,  
*Turbinaria decurens*, *Halimeda macroloba*, *H.durvilae*, isolasi dan Elusidasi  
senyawa aktif fraksi n- Heksana *Halimena.durvilae*.  
Program studi : Program Doktor Ilmu Pertanian  
Fakultas : Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya

telah dideteksi tingkat plagiasinya dengan kriteria toleransi  $\leq 5\%$ , dan dinyatakan bebas dari plagiasi. (Rincian hasil plagiasi terlampir).

Demikian surat ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Malang, 14 April 2014

Direktur,

Prof.Dr.Drs. Abdul Hakim, M.Si  
NIP 19610202 198503 1 006

Tembusan:

1. Ketua Program Studi yang bersangkutan
2. Pembimbing/Promotor