

Bab VI. Hasil Dan Pembahasan

VI.1 Penyiapan Kultur Mikroalga *Thalassiosira* sp

Kultur mikroalga yang digunakan dalam penelitian ini merupakan kultur mikroalga dari kelas Bacillariophyceae (diatom), jenis *Thalassiosira* sp yang diperoleh dari Laboratorium Oseanografi Koleksi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Ancol.

Sebelum melakukan kultivasi atau penanaman terlebih dahulu dilakukan pengecekan terhadap kultur mikroalga menggunakan alat mikroskop optis. Tujuannya adalah untuk memastikan tidak adanya kontaminan didalam kultur seperti jamur, bakteri atau protozoa.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa kultur dalam keadaan *axenic* atau tanpa adanya kontaminan lain karena hanya terdapat 1 jenis mikroalga yaitu *Thalassiosira* sp. dengan karakteristik sel berbentuk persegi berwarna kuning keemasan



Gambar VI.1 Bentuk sel mikroalga *Thalassiosira* sp

VI.2 Aktivasi Mikroalga *Thalassiosira* sp

Tujuan dari tahapan aktivasi adalah untuk mengadaptasikan mikroalga dengan medium nutrien yang baru dan untuk meremajakan sel mikroalga yang sudah tua. Aktivasi dilakukan selama 2-3 hari karena diperkirakan selama waktu tersebut

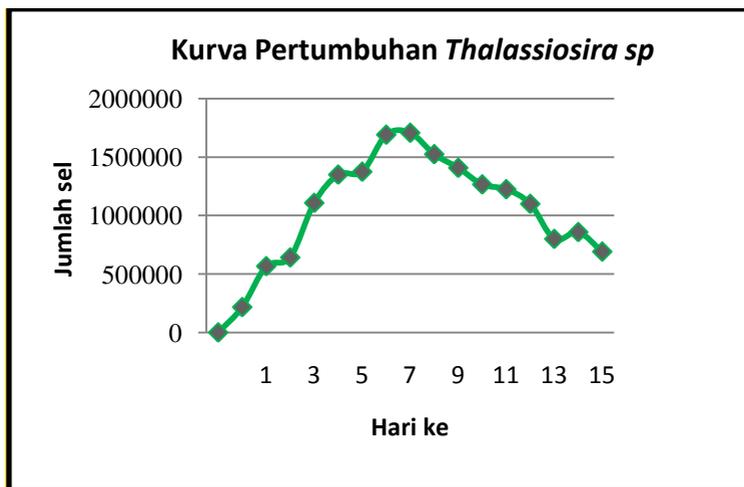
mikroalga sudah terbiasa dengan medium dan nutrisi yang baru. Hal tersebut dapat dilihat dari intensitas warna dan jumlah kepadatan sel *Thalassiosira* sp. Selama proses aktivasi yang harus diperhatikan adalah kondisi lingkungan tempat tumbuh mikroalga karena dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Pada penelitian ini medium air laut diukur pada salinitas 25 ppt, aerasi 24 jam, suhu ruang ($\pm 25-27^{\circ}\text{C}$), fotoperiode 12:12 (gelap:terang) dengan intensitas cahaya 10.000 lux (Brataningtyas). Perubahan pada kondisi tumbuh dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan mikroalga seperti perlambatan pertumbuhan sel, kontaminasi bahkan kematian pada sel akibat kondisi lingkungan yang tidak sesuai. Pada regulasi pertumbuhan diatom, diperlukan tambahan nutrisi berupa silikat yang merupakan komponen esensial dari dinding sel diatom.

Aktivasi dilakukan dengan menggunakan medium walne. Medium walne di pilih karena merupakan medium yang sangat kaya karena mengandung komposisi yang sangat lengkap untuk kebutuhan nutrisi mikroalga, dengan terpenuhinya nutrisi akan meningkatkan pertumbuhan mikroalga. Aktivasi dilakukan dalam 1 botol yang berisi air laut sebanyak 810 ml kemudian di tambahkan sejumlah bibit mikroalga *Thalassiosira* sp sebanyak (± 90 mL).

VI.3 Kurva Pertumbuhan Mikroalga *Thalassiosira* sp

Kurva pertumbuhan digunakan untuk mengetahui pola pertumbuhan mikroalga, sehingga dapat diketahui fase-fase pertumbuhan mikroalga tersebut. Selain itu melalui kurva tumbuh juga dapat diketahui waktu optimum pemanenan sesuai kebutuhan senyawa yang diperlukan. Kurva pertumbuhan ditentukan dengan menghitung

jumlah sel menggunakan *Haemocytometer* dibawah mikroskop. Perhitungan sel dilakukan selama 15 hari karena setelah hari ke-15 sel mikroalga diperkirakan sudah memasuki fase kematian. Kurva pertumbuhan dari mikroalga *Thalassiosira sp* yang ditumbuhkan dalam medium walne dapat dilihat dari gambar berikut :



Gambar VI.2 Kurva Pertumbuhan *Thalassiosira sp*

Berdasarkan data kurva pertumbuhan diatas dapat diketahui bahwa pada hari pertama hingga hari ke-6 kepadatan sel mikroalga mengalami peningkatan. Pada tahapan ini mikroalga berada pada fase eksponensial. Hal ini ditandai dengan penambahan jumlah sel yang sangat cepat melalui pembelahan sel. Pada fase ini mikroalga sudah dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan pertumbuhan barunya. Struktur sel masih normal dan terjadi kesetimbangan antara nutrisi dalam medium pertumbuhan dengan kandungan nutrisi mikroalga. Setelah fase eksponensial, mikroalga akan memasuki fase

stasioner yaitu pada hari ketujuh hingga hari ke-12. Pada fase ini kepadatan sel cenderung tetap, walaupun mengalami kenaikan atau penurunan, namun perubahan yang terjadi tidak signifikan. Pertumbuhan dianggap konstan pada fase stasioner disebabkan karena terjadi kesetimbangan antara katabolisme dan anabolisme sel. Fase ini ditandai dengan rendahnya tingkat nutrisi dalam sel. Pada hari ke-13 mikroalga mengalami fase kematian. Hal ini terjadi karena perubahan kualitas air, penurunan nutrisi dalam media kultur serta penurunan kemampuan sel yang sudah tua untuk melakukan metabolisme.

VI.4 Kultivasi Mikroalga *Thalassiosira sp*

Kultivasi dilakukan dengan tujuan mendapatkan biomassa mikroalga yang lebih banyak karena penelitian ini bertujuan untuk menguji kandungan senyawa aktif dari mikroalga yang berdaya sebagai antioksidan sehingga biomassa yang dibutuhkan harus dalam jumlah cukup banyak. Keberhasilan kultivasi ini didukung pula oleh beberapa faktor seperti cahaya, salinitas dan aerasi. Pencahayaan diperoleh dari lampu sebagai pengganti sinar matahari, dengan intensitas 10.000 lux yang disesuaikan dengan keadaan optimum mikroalga agar *Thalassiosira sp* dapat tumbuh dengan baik. Salinitas air laut yang digunakan sebesar 25 ppt berada pada rentang toleransi untuk menunjang pertumbuhan mikroalga. Bila salinitas air laut tidak berada pada rentang toleransi akan mengakibatkan terjadinya osmosis sel, sehingga dapat merusak dan mematikan sel mikroalga. Aerasi yang diberikan ke dalam fotobioreaktor digunakan sebagai sumber CO₂ bagi mikroalga untuk melakukan fotosintesis.

Selain itu, adanya aerasi juga berfungsi sebagai homogenasi nutrisi dan cahaya di dalam fotobioreaktor, serta mencegah terjadinya sedimentasi sel (Brataningtyas, 2011). Proses kultivasi mikroalga *Thalassiosira sp.* dilakukan selama 6 hari. Hasil penelitian dari hari ke-0 hingga hari ke-6 menunjukkan terjadi perubahan warna pada inokulum. Warna inokulum pada hari ke-0 yaitu kuning pucat atau hamper tidak berwarna, setelah beberapa hari hingga hari ke-6 menjadi kuning pekat dan terbentuk endapan coklat tua. Hal ini menunjukkan bahwa mikroalga *Thalassiosira sp.* dapat tumbuh dengan baik dalam medium walne dan jumlah kepadatan sel *Thalassiosira sp.* mengalami perubahan. Berikut hasil pengamatan perubahan warna mikroalga *Thalassiosira sp.* selama proses kultivasi.



Gambar VI.3 Kultur mikroalga pada hari ke (0) dan hari ke (6)

VI.5 Pemanenan Dan Pengeringan Biomassa Mikroalga *Thalassiosira sp.*

Proses pemanenan dilakukan pada hari ke 6 yaitu pada puncak fase logaritmik karena pada fase ini terjadi pertumbuhan sel yang konstan dengan metabolik yang masih baik karena sel belum mengalami kerusakan atau perubahan. Sebelum dilakukan pemanenan jumlah sel mikroalga diamati terlebih dahulu menggunakan mikroskop optis untuk mengetahui kepadatan sel mikroalga. Pemanenan dilakukan dengan teknik sentrifugasi karena Teknik sentrifugasi merupakan teknik pemanenan yang paling baik karena prosesnya singkat, efisiensi pemanenannya tinggi, serta tidak merusak sifat fisik dan kimia dari mikroalga. Hasil yang diperoleh berupa biomassa dengan tekstur seperti pasta berwarna coklat kehitaman dan masih mengandung sedikit air.

Tabel VI.1 Data pemanenan mikroalga

Pemanenan ke	Kepadatan sel (10^6 sel/ml)	Volume kultur (L)	Bobot biomassa basah (g)	Bobot biomassa kering (g)
1	1075	4,23	7,2	0,9
2	1375	7,79	14,9	1,89
3	1875	10,15	15,9	2,50
4	1675	13,0	21,1	2,05
5	1750	12,88	32,3	4,61

6	2000	9,40	38,2	3,44
7	1925	15,29	53,9	4,52
8	2050	13,40	58,8	6,09
9	1900	15,68	54,2	4,96
Total			296,5	30,96

Biomassa basah yang diperoleh dari hasil pemanenan, selanjutnya dikeringkan terlebih dahulu dengan alat freez dry. Pengeringan ini bertujuan untuk menghilangkan kandungan air. Keberadaan air ini dapat menyebabkan biomassa mikroalga mudah rusak dan berjamur, sehingga harus dihilangkan. Selain itu kadar air yang terlalu tinggi ini akan mengganggu proses ekstraksi dan mengurangi kestabilan zat aktif yang diperoleh dari hasil ekstraksi. Proses pengeringan tidak dilakukan dibawah sinar matahari karena dapat merusak komposisi senyawa aktif yang terkandung dalam mikroalga.

VI.6 Karakterisasi Simplisia

Tujuan dilakukan karakterisasi simplisia ialah untuk mengetahui kualitas dan mutu simplisia yang digunakan. Karakterisasi simplisia yang dilakukan meliputi penetapan kadar abu total, kadar abu tak larut asam, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol dan susut pengeringan. Berikut hasil karekterisasi adalah :

Tabel VI.2 Hasil Karakterisasi Simplisia

Uji Karakterisasi	Hasil Pengamatan % (b/b)
Kadar Abu Total	41,92 %
Kadar Abu Tidak Larut Asam	12,83 %
Kadar Sari Larut Etanol	35,56 %
Kadar Sari Larut Air	52,45 %
Susut Pengeringan	6,76 %

Penetapan kadar abu total dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa anorganik yang terdapat didalam simplisia, baik yang berasal dari internal maupun eksteranal. Pada pengujian kadar abu total dilakukan dengan pemanasan pada suhu 600⁰C menggunakan alat tanur sampai simplisia didalam krus mengabu yang ditandai dengan perubahan warna menjadi putih abu. Diperoleh hasil karakterisasi penetapan kadar abu total sebesar 41,92 %, dan penetapan kadar abu tidak larut asam sebesar 12,83 %. Penetapan kadar abu dilakukan untuk menghancurkan serta menguapkan senyawa organik dan turunannya sehingga yang tersisa senyawa anorganik, misalnya logam K, Ca, Na, Pb dan silika sedangkan kadar abu tidak larut asam untuk mengetahui kadar senyawa anorganik yang tidak larut dalam asam misalnya silika. Dari data yang dihasilkan dapat dilihat bahwa kadar abu pada biomassa kering mikroalga *Thalassiosira sp* sangat tinggi. Kandungan abu yang sangat tinggi dikarenakan sebagian besar komposisi medium walne yang menjadi sumber makanan untuk pertumbuhan mikroalga *Thalassiosira sp*

terdiri atas silikat, oksida dan garam yang mengandung anion seperti fosfat, klorida, sulfat dan juga mengandung kation seperti mangan dan besi. Penetapan kadar sari ada dua yaitu, penetapan kadar sari larut dalam etanol dan penetapan kadar sari larut dalam air. Hasil karakterisasi kadar sari larut dalam etanol ialah 35,56 % dan kadar sari larut dalam air adalah 52,45 %. Penetapan kadar sari yang larut dalam air dilakukan untuk mengetahui zat-zat yang tersari dalam pelarut air misalnya glikosida, gula, gom, enzim, zat warna dan asam organik. Penetapan kadar sari yang larut dalam etanol menyatakan zat-zat yang tersari dalam pelarut etanol antara lain yaitu glikosida, antrakinon glikosida, triterpenoid / steroid, flavonoid, klorofil dalam jumlah sedikit lemak dan saponin. Hasil karakterisasi penetapan susut pengeringan diperoleh 6,76 %. Susut pengeringan dilakukan untuk melihat senyawa-senyawa yang mudah menguap pada suhu penetapan (105°C).

VI.7 Ekstrak Mikroalga *Thalassiosira* sp

Hasil yang diperoleh dari ekstraksi mikroalga *Thalassiosira* sp dengan berat sampel 20,01 g disajikan dalam Tabel VI.3

Hasil Rendemen Ekstrak		
Simplisia	Ekstrak Kental (g)	Rendemen (%)
Ekstrak n-heksana	1,7267	8,6291
Ekstrak etilasetat	3,9585	19,7826
Ekstrak etanol	4,8458	24,2168

Ekstraksi sampel dilakukan dengan menggunakan 3 pelarut yang memiliki tingkat kepolaran berbeda yaitu n-heksana sebagai pelarut non polar, etil asetat sebagai pelarut semipolar dan etanol sebagai pelarut polar. Setiap tahapan ekstraksi yang dilakukan diharapkan dapat mengekstrak senyawa yang mempunyai kepolaran sesuai dengan kepolaran pelarut. Penggunaan ketiga pelarut dipilih karena untuk mendapatkan target senyawa yang tepat sebagai antioksidan, selain itu mampu menarik senyawa berdasarkan tingkat kepolaran dari non polar, semi polar, hingga polar dalam ekstrak yang dikehendaki. Etanol yang bersifat polar akan menarik senyawa yang bersifat polar sampai non polar, begitu juga dengan etil asetat akan menarik senyawa semi polar hingga non polar sedangkan n heksana khusus menarik senyawa non polar.. Sarastani dkk (2002) menyatakan bahwa pelarut dapat melarutkan ekstrak yang mempunyai sifat kepolaran yang sama. Sari (2011) juga menyatakan bahwa pemilihan berbagai pelarut yang digunakan untuk ekstraksi harus tepat agar dapat menarik senyawa yang dikehendaki. Proses ekstraksi dengan tiga pelarut menghasilkan rendemen yang berbeda untuk setiap pelarut yang digunakan. Rendemen dari pelarut etanol lebih besar dibanding dengan rendemen dari pelarut etil asetat dan n-heksan. Pelarut memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam mengambil senyawa bioaktif suatu sampel. Sari (2011) menyatakan bahwa rendemen terbesar diperoleh dari ekstrak polar karena senyawa polar memiliki kemampuan mengekstrak senyawa dari kisaran senyawa polar hingga semi polar.

Ekstraksi menggunakan pelarut etilasetat yang merupakan pelarut dengan kepolaran sedang, maka diharapkan yang terekstrak senyawa-senyawa dengan kepolaran yang sedang, pelarut etanol diharapkan dapat mengekstrak senyawa-senyawa polar begitu pula pelarut n-heksan diharapkan dapat mengekstrak senyawa-senyawa non polar. Ketiga pelarut memiliki tingkat kepolaran yang berbeda, sehingga dapat melarutkan senyawa polar, semi polar dan dapat pula melarutkan senyawa yang bersifat non polar.

VI.8 Pemantauan Ekstrak *Thalassiosira sp*

Pemantauan ekstrak dilakukan untuk mengetahui secara kualitatif adanya senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dari ekstrak mikroalga *Thalassiosira sp*. Pemantauan menggunakan KLT (kromatografi lapis tipis) dengan fase gerak non polar, semi polar, dan polar. Pada pengembang non polar menggunakan eluen N-heksan-Etil asetat (7:3), semi polar menggunakan N-heksan-Etil asetat (5:5), sedangkan untuk polar menggunakan Etil asetat-asam format-aquades (8:1,5:0,5) dan menggunakan berbagai macam penampak bercak untuk melihat senyawa yang terkandung dalam ekstrak.

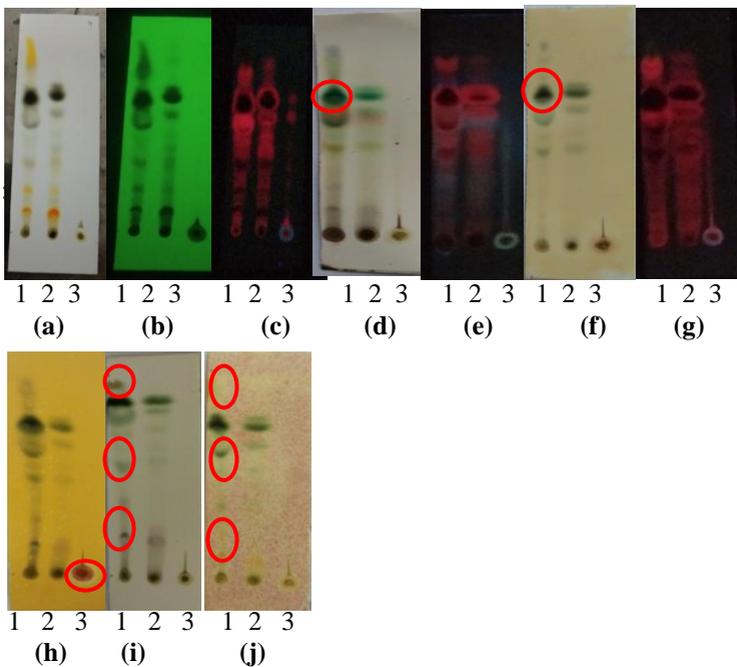
Adapun penampak bercak yang digunakan diantaranya adalah H_2SO_4 10% untuk penampak bercak universal, $FeCl_3$ 10% untuk mengetahui senyawa fenol, $AlCl_3$ untuk mengetahui senyawa flavonoid, Dragendroff untuk mengetahui senyawa alkaloid, Liebermen-burcard untuk mengetahui senyawa steroid/triterpenoid sedangkan DPPH 0,2% untuk mengetahui senyawa senyawa yang berperan sebagai antioksidan yang terkandung didalam sampel.

Pada penampak bercak H_2SO_4 10% akan menghasilkan bercak hitam secara visual yang diamati setelah pemanasan agar bercak yang timbul semakin tampak. H_2SO_4 10% bersifat reduktor yang dapat memutuskan ikatan rangkap sehingga panjang gelombangnya bertambah. Konsentrasi H_2SO_4 yang digunakan adalah 10% karena jika konsentrasinya terlalu pekat maka dapat merusak lempeng namun jika konsentrasinya terlalu rendah maka kemampuan pemutusan ikatan tidak maksimal. Hasil yang diperoleh dari penyemprotan penampak bercak FeCl_3 10% adalah warna biru kehitaman yang menunjukkan adanya gugus fenolik. Dimana bercak kehitaman yang timbul terjadi karena adanya ikatan antara gugus hidroksil pada fenol dengan Fe (Harbone, 1987). Pada penampak bercak AlCl_3 berfungsi untuk melihat senyawa flavonoid yang ditandai dengan bercak berwarna kuning, hijau, biru/ungu pada plat saat dilihat dibawah lampu UV pada panjang gelombang 365 nm.

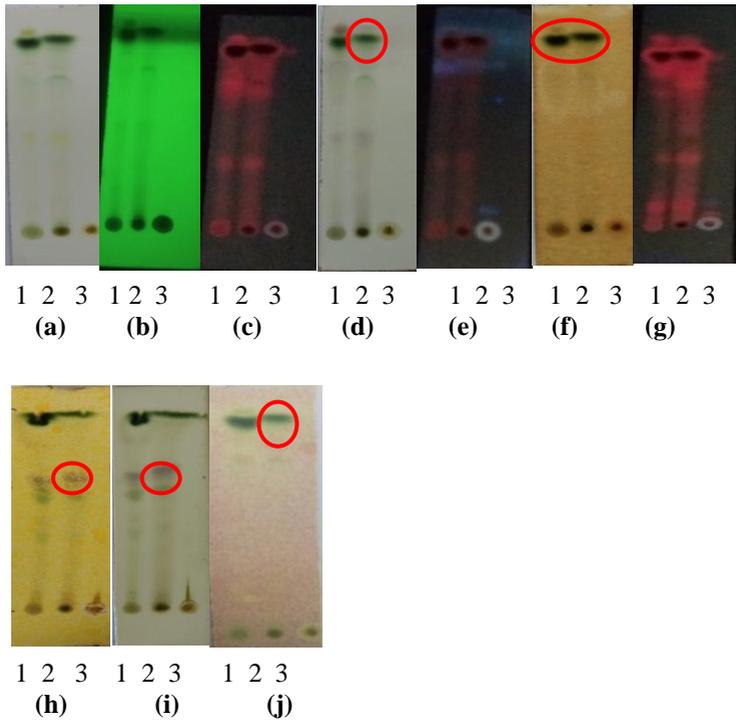
Pada penampak bercak Liebermann-Burcard akan menghasilkan warna hijau biru atau merah ungu disebabkan karena adanya reaksi oksidasi pada golongan triterpenoid/steroid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi. Pada penampak bercak dragendorf menghasilkan warna jingga. Diperkirakan warna jingga timbul karena nitrogen pada alkaloid akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodobismut membentuk kompleks kalium alkaloid. Penampak bercak DPPH 0,2 % dalam metanol digunakan sebagai analisis kualitatif untuk menentukan golongan senyawa yang diduga aktif antioksidan dengan ditandai bercak berwarna kuning dengan latar belakang berwarna ungu. Terbentuknya bercak berwarna kuning disebabkan

oleh adanya senyawa didalam sampel yang dapat mendonorkan atom hidrogen didalam ekstrak sehingga dapat menyebabkan molekul DPPH teroksidasi yang diikuti dengan menghilangnya warna ungu dalam larutan. Hasil pemantauan dapat dilihat pada gambar dibawah ini.

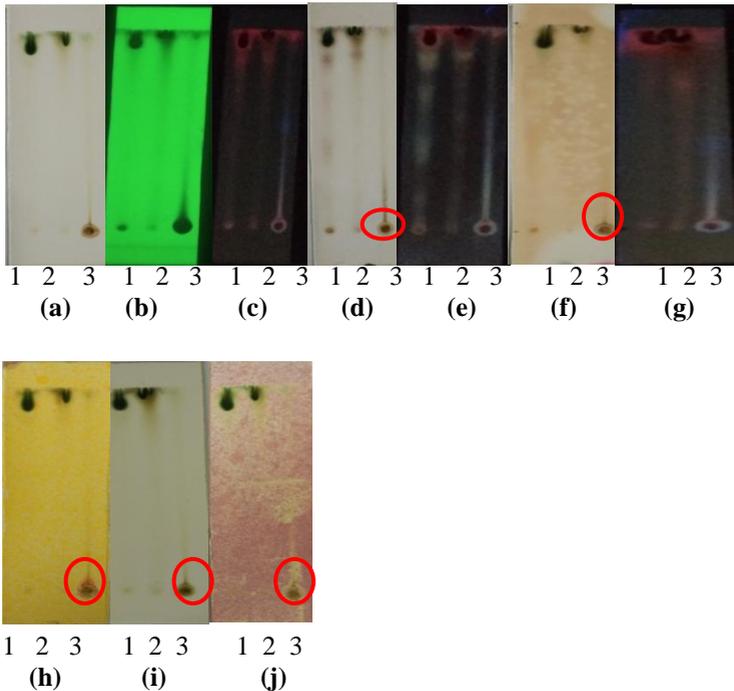
Gambar VI.4 Hasil KLT dengan pengembang non polar n-heksan: etil asetat (7:3)



Gambar VI.5 Hasil KLT dengan pengembang semi polar n-heksan: etil asetat (5:5)



Gambar VI.6 Hasil KLT dengan pengembang polar etil asetat :
asam format : air (8: 1,5 : 0.5)

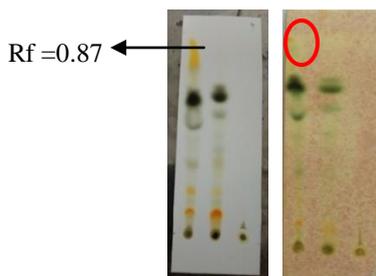


Keterangan : Kromatogram ekstrak n-heksana mikroalga *Thalassiosira sp* (1), ekstrak etil asetat mikroalga *Thalassiosira sp* (2), ekstrak etanol mikroalga *Thalassiosira sp* (3), fase gerak n-heksana : etil asetat (5 : 5), Visual (a), UV 254 nm (b), UV 365 nm (c), H₂SO₄ visual (d), H₂SO₄ pada UV 366 nm (e), FeCl₃ 10% (f), AlCl₃ pada UV 366 nm (g), dragendroff (h), liebermen-burcard (i), DPPH 0,2 % (j)

Dari hasil kromatogram, terlihat bahwa pelarut nonpolar lebih baik dalam memisahkan bercak dibandingkan pelarut polar dan semi polar. Pada pelat KLT dengan menggunakan pelarut polar dan semi polar bercak tidak terpisah dengan baik. Sedangkan pada pelat KLT yang dielusi dengan pelarut nonpolar, terlihat bahwa bercak terpisah dengan baik. Hal ini menandakan bahwa senyawa yang terdapat pada *Thalassiosira* sp bersifat nonpolar, karena menunjukkan pola pemisahan yang baik ketika dielusi dengan pelarut nonpolar. Penggunaan fasa diam silika gel yang bersifat relatif polar dan pelarut *n*-heksana: etil asetat (7:3) yang bersifat nonpolar, menyebabkan terjadinya pemisahan zat aktif berdasarkan kepolarannya. Zat aktif dengan sifat kepolaran lebih tinggi akan terikat kuat pada fasa diam, sehingga memiliki jarak R_f yang rendah, sedangkan senyawa dengan sifat kepolaran yang lebih rendah akan terelusi oleh pelarut nonpolar dan memiliki jarak R_f yang tinggi. Berdasarkan hasil yang diperoleh pada pengembang non polar, semi polar dan polar diduga terdapat senyawa aktif antioksidan yaitu fenol, alkaloid, dan triterpenoid dengan kelimpahan senyawa antioksidan terbanyak terdapat pada ekstrak *n*-heksan. Adanya senyawa fenol pada ekstrak yang ditandai dengan bercak warna hitam latar belakang kuning pada saat disemprot dengan penampak bercak FeCl_3 yang artinya adanya senyawa fenol, senyawa alkaloid ditandai dengan bercak berwarna coklat jingga berlatar belakang kuning yang artinya adanya senyawa alkaloid dan adanya senyawa triterpenoid yang ditandai dengan adanya bercak berwarna ungu.

VI.8 Uji Kualitatif Dan Kuantitatif Aktivitas Antioksidan

Sebelum melakukan uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif, terlebih dahulu dilakukan uji aktivitas antioksidan secara kualitatif untuk mengetahui adanya aktivitas antioksidan pada ekstrak. Dari hasil uji kualitatif menggunakan radikal bebas DPPH ditunjukkan adanya aktivitas antioksidan dari senyawa yang terkandung didalam ekstrak terhadap radikal bebas. Hal ini ditunjukkan adanya pendaran di sekitar spot pelat KLT. Pendaran ini terbentuk akibat adanya pergeseran panjang gelombang DPPH dalam bentuk radikal menjadi DPPH yang lebih stabil, yang menyebabkan perubahan warna ungu menjadi pendaran kuning.



Gambar VI.7 Hasil pemisahan bercak pelarut non polar n-heksan: etil asetat (7:3) (A) dan hasil adanya pendaran kuning setelah penyemprotan DPPH

Berdasarkan penelitian Utami (2014) mengatakan bahwa pigmen mikroalga yang terelusi paling atas adalah β -karoten yang mempunyai karakteristik berwarna kuning dan bersifat nonpolar. Dari gambar diatas terlihat bahwa bercak teratas memiliki pendaran kuning yang lebih baik jika dibandingkan dengan bercak lainnya.

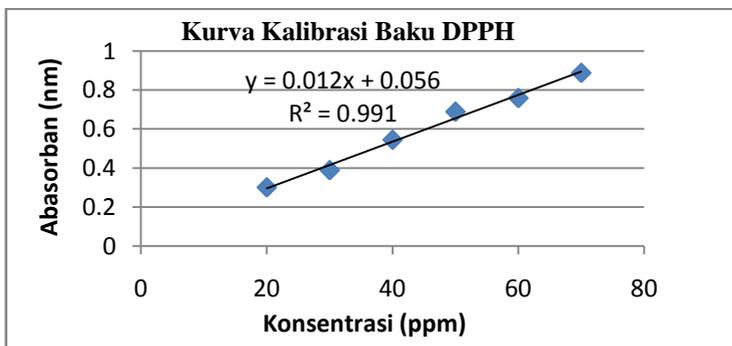
Nilai Rf bercak yang dihasilkan adalah 0.87 dimana memiliki nilai yang sama dengan nilai Rf standar β -karoten.

Oleh karena itu dari uji kualitatif dapat disimpulkan bahwa senyawa yang berperan sebagai pendonor atom H berasal dari golongan triterpenoid.

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrihidrazil) dengan alat uji spektrofotometri UV-Visible. Penangkap radikal bebas merupakan mekanisme utama antioksidan. Salah satu cara untuk menguji aktivitas suatu senyawa sebagai zat antioksidan adalah dengan mereaksikannya dengan reagen DPPH secara spektrofotometri. DPPH digunakan secara luas untuk menguji kemampuan senyawa yang berperan sebagai pendonor elektron atau hidrogen. Metode ini dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel.

Pemeriksaan aktivitas antioksidan ekstrak mikroalga *Thalassiosira sp.* dengan metode DPPH dilakukan menggunakan spektrofotometri UV- sinar tampak. Tahap awal yang dilakukan adalah mengukur panjang gelombang maksimal dari DPPH pada rentang panjang gelombang antara 400-800 nm. Tujuan dari pengukuran panjang gelombang maksimum adalah untuk mengetahui pada panjang gelombang berapa DPPH dapat memberikan serapan maksimum. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH diukur tanpa penambahan sampel. Panjang gelombang DPPH yang diperoleh untuk digunakan dalam pengujian adalah 516 nm dalam metanol.

Selanjutnya dilakukan pengukuran lineritas antara absorbansi dengan konsentrasi larutan DPPH. Penetapan kurva kalibrasi DPPH dibuat dari larutan induk 100 $\mu\text{g/mL}$ kemudian dibuat seri konsentrasi 20,30,40,50,60,70 $\mu\text{g/mL}$ dan diukur pada panjang gelombang 516 nm.



Gambar VI.7 Grafik kurva kalibrasi DPPH

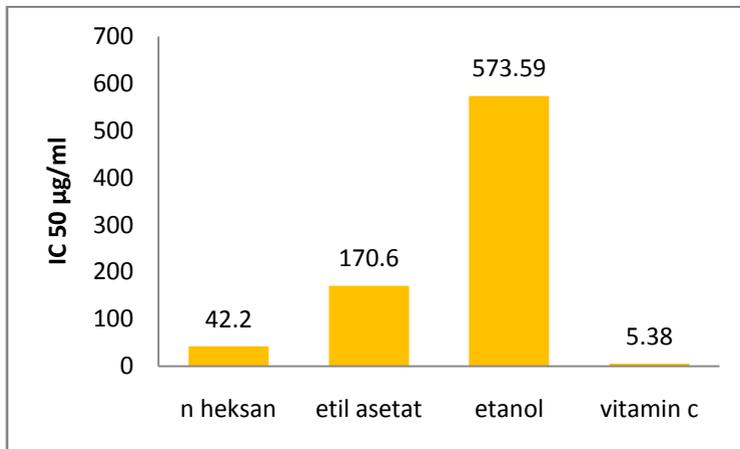
Dari hasil pengukuran diperoleh hasil yang linear dapat dilihat bahwa semakin meningkat konsentarsi DPPH akan semakin meningkat absorbansinya. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan terhadap sampel dan baku pembanding vitamin C yang dibuat dalam beberapa konsentarsi dan masing-masing ditambahkan dengan DPPH (1:1) lalu diinkubasi selama 30 menit. Pencampuran ekstrak dan reagen DPPH dilakukan diwadah yang gelap, hal ini dikarenakan DPPH mempunyai karakteristik sensitif pada cahaya sehingga dikhawatirkan kemampuannya dalam meredam radikal bebas kurang maksimal. Sampel yang telah ditambahkan DPPH diinkubasi selama 30 menit tujuannya adalah untuk memaksimalkan reaksi antara senyawa antioksidan yang terkandung didalam sampel dengan

radikal bebas. Setelah proses inkubasi sampel dan standar kemudian diukur dengan spektrofotometri UV-vis pada panjang gelombang 516 nm. Data absorbansi yang diperoleh dari sampel dan standar kemudian diukur % inhibisinya. Persen inhibisi dapat didefinisikan sebagai kemampuan bahan dalam menangkal radikal bebas yang berhubungan dengan konsentrasi bahan yang diuji. Aktivitas antioksidan dapat diketahui dari nilai persen inhibisi. Naiknya persen inhibisi dipengaruhi oleh menurunnya nilai absorbansi yang dihasilkan oleh sampel. Penurunan nilai absorbansi disebabkan oleh tingginya konsentrasi sampel. Hal ini menyebabkan persen inhibisi semakin tinggi. Nilai % inhibisi terhadap radikal bebas DPPH dihitung menggunakan rumus :

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

Dari hasil tersebut kemudian ditentukan persamaan regresi linear dari konsentrasi sampel terhadap % inhibisi sehingga dapat ditentukan nilai IC_{50} dari masing-masing sampel. IC_{50} didefinisikan sebagai kemampuan konsentrasi suatu bahan uji dalam menangkal radikal bebas sebanyak 50 %. IC_{50} digunakan sebagai parameter pada hasil pengujian dengan DPPH. Semakin kecil nilai IC_{50} pada suatu bahan maka semakin besar pula kemampuan bahan dalam menangkal radikal bebas. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi sampel uji maka semakin besar pula kemampuan sampel dalam menangkap radikal bebas yang ditandai dengan penurunan nilai absorbansi.

Hasil pengukuran aktivitas antioksidan pada ekstrak dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar VI.8 Grafik batang nilai IC₅₀ ekstrak mikroalga *Thalassiosira sp.*

Dari hasil pengujian dapat diketahui bahwa aktivitas antioksidan terbaik terdapat pada ekstrak n-heksana dengan nilai IC₅₀ paling kecil dibandingkan dengan ekstrak etil asetat dan etanol. Semakin kecil nilai IC₅₀ berarti semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Berdasarkan spesifikasi antioksidan dikatakan sangat kuat jika IC₅₀ <50 µg/ml, dikatakan aktif jika IC₅₀ 50-100 µg/ml, sedang 101-150 µg/ml, lemah 151-200 µg/ml dan tidak aktif jika konsentrasi ≥ 200 µg/ml. Pada ekstrak mikroalga *Thalassiosira sp* untuk ekstrak n-heksan termasuk dalam kategori antioksidan sangat kuat karena memiliki nilai IC₅₀ <50 µg/ml untuk ekstrak etil asetat termasuk kategori antioksidan aktif karena masuk dalam rentang IC₅₀ 101-150 µg/ml, sedangkan ekstrak etanol termasuk dalam kategori antioksidan tidak aktif karena memiliki nilai IC₅₀ 200 µg/ml.

Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak ekstrak n-heksan mengandung sejumlah senyawa yang cukup aktif dalam meredam radikal bebas DPPH.