

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Luas lautan Indonesia sebesar 6.400.000 km², dengan 110.000 km garis pantai, dan iklim tropisnya yang ideal untuk pertumbuhan rumput laut (Lestari et al., 2020). Rumput laut adalah salah satu sumber daya alam laut Indonesia yang sangat berpotensi untuk memenuhi kebutuhan domestik dan ekspor (Masduqi et al., 2014). Produksi rumput laut meningkat 20,9% pada tahun 2013 menjadi 7,5 juta ton, dengan target 10 juta ton pada tahun 2014 (Hidayat et al., 2018). Pada tahun 2016–2017, produksi rumput laut Indonesia meningkat rata-rata sebesar 22,25%. Pada tahun 2016, produksi mencapai 11,69 juta ton, sedangkan pada tahun 2017 naik sebesar 13,35 juta ton. Indonesia memiliki 782 jenis, diantaranya 196 alga hijau, 452 alga merah, dan 134 alga cokelat (Putri et al., 2023). Perhatian global semakin meningkat pada bahan alam sebagai sumber senyawa fungsional, rumput laut diperlakukan sebagai sumber metabolit bioaktif yang bernilai untuk pengembangan produk kesehatan dan farmasi (Ferdouse et al., 2018). Dalam rumput laut, senyawa bioaktif memiliki sifat hipokolesterolemik, antiviral, antiinflamatori, antitrombin, antikoagulasi, antipelmik, stimulan, dan antibiotik (Putri et al., 2023). Penggunaan potensi aktivitas alga laut, termasuk rumput laut mulai dikembangkan untuk mengobati berbagai penyakit degeneratif (Lomartire and Gonçalves, 2023).

Kasus penyakit degeneratif seperti kanker, aterosklerosis, diabetes, dan penuaan dini membuat kebutuhan global terhadap sumber antioksidan yang aman dan efektif meningkat. Penyakit degeneratif berhubungan dengan kondisi stress oksidatif, yaitu kondisi produksi radikal bebas di dalam tubuh tidak seimbang dengan kemampuan sistem pertahanan antioksidan endogen (Liguori et al., 2018). Senyawa antioksidan sintetik seperti *Butylated Hydroxyanisole* (BHA) dan *Butylated Hydroxytoluene* (BHT) menjadi produk hasil pengembangan pada pertengahan abad ke-20 untuk menangkal radikal bebas, akan tetapi penggunaan BHA dan BHT seiring waktu semakin dipertanyakan karena laporan adanya efek samping dan potensi toksisitas pada dosis tertentu (Patel and Preedy, 2020). Ozben (2007) melaporkan bahwa BHA dapat bertindak sebagai agen karsinogenik pada dosis tinggi, sedangkan pemberian BHT pada dosis tinggi pada tikus yang menyebabkan pembesaran hati (hepatomegali) dan perubahan pada enzim mikrosomal hati. Studi terhadap efek samping dari antioksidan sintesis kemudian mendorong fokus penelitian menuju antioksidan alami yang lebih aman secara biologis serta bekerja melalui berbagai mekanisme proteksi seluler (Pizzino et al., 2017). Selain berperan sebagai penangkal radikal bebas antioksidan alami juga mampu bertindak sebagai modulator jalur sinyal seluler yang terlibat dalam inflamasi, apoptosis, dan homeostatis redoks (Sies, 2015). Keanekaragaman spesies dari makroalga kemudian berpotensi sebagai bahan alam untuk antioksidan alami.

Keanekaragaman spesies yang tinggi menjadikan makroalga berperan penting sebagai suatu organisme utama diperairan yang bertanggung jawab untuk asimilasi nitrat dan fotosintesis. Makroalga dalam rantai makanan menjadi penentu kualitas makanan yang dipindahkan ke tingkat rantai makanan lainnya (Torres et al., 2014). Beberapa dari spesies makroalga telah lama dimanfaatkan sebagai sumber nutrisi tambahan yang berkhasiat untuk kesehatan. Makroalga menghasilkan beragam metabolit primer dan sekunder yang dapat dikelompokkan sebagai senyawa heterosiklikogen, aromatik sederhana, polifenol, poliketida, terpenoid, steroid, alkaloid, karbohidrat, asam amino, dan peptida yang berpotensi sebagai obat dari penyakit degeneratif (Carpena et al., 2024). Kandungan metabolit yang terdapat pada makroalga didominasi terpenoid dan fenolik kemudian aromatik sederhana, poliketida, alifatik, alkaloid, karbohidrat, dan kelompok senyawa lainnya (Leal et al., 2013; Salama et al., 2021; dan Carpena et al., 2024). Biosintesis dan bioaktivitas dari kelompok senyawa dalam makroalga dipengaruhi oleh interaksi makroalga dengan perubahan lingkungan laut, intensitas cahaya, tekanan air, dan salinitas (Monroy-Garcia et al., 2025). Salah satu kelompok makroalga yang kemudian banyak diteliti terutama ekstraknya adalah makroalga hijau.

Alga hijau merupakan salah satu kelompok makroalga yang diketahui memiliki kandungan senyawa bioaktif bernilai tinggi dan berpotensi besar dalam bidang kesehatan maupun industri farmasi. Alga hijau sebagai organisme fotosintetik yang hidup di lingkungan perairan mampu menyintesis beragam metabolit primer dan sekunder yang memberikan fungsi biologis penting, termasuk aktivitas antioksidan, antimikroba, antiradang, dan antitumor (Inoubli et al., 2025). Makroalga hijau umumnya ditemukan di perairan dekat pantai dan laut dangkal dan telah diidentifikasi lebih dari 1.500 spesies (Gutiérrez-Rodríguez et al., 2018). Hidup dengan menyerap sejumlah besar cahaya matahari dan mengandung klorofil a dan b, pigmen *lutein*, *vioalaxanthin*, dan *neoxanthin* (Abad et al., 2011). Makroalga hijau juga mengandung mineral seperti kalsium, magnesium, kalium, dan fosfor yang menunjukkan peran penting dalam menunjang kebutuhan gizi dan potensi aplikasinya sebagai bahan baku suplemen nutrisi. Oleh sebab itu sangat umum dilakukan ekstraksi terhadap alga hijau. (Nova et al., 2023).

Halimeda adalah tumbuhan kecil yang banyak ditemukan di dasar laut dangkal dengan menempel pada bebatuan berpasir (Arianti et al., 2024). Semua spesies dari *Halimeda* menyimpan kalsium karbonat dalam bentuk *aragonite* dengan kadar yang tinggi (Daveza et al., 2025). Lingkungan tempat tumbuh *Halimeda* didominasi oleh pasir berbatu, kondisi tersebut memberi pengaruh terhadap pertumbuhannya karena *Halimeda* memiliki adaptasi yang besar terhadap lingkungan tempat tumbuhnya (Arfah, 2015). Kandungan senyawa kimia makroalga genus *Halimeda* dilaporkan dari beberapa hasil penelitian menunjukkan adanya senyawa dari golongan alkaloid, steroid, dan terpenoid (Nome et al., 2019). *Halimeda* tumbuh pada kondisi lingkungan yang ekstrim seperti salinitas yang tinggi, ancaman dari berbagai predator, bakteri dan organisme lainnya. *Halimeda* menghasilkan senyawa kimia yang bersifat toksik untuk bertahan hidup pada lingkungannya. Makroalga *Halimeda* diketahui mengetahui menghasilkan zat *antifouling* yang toksik

dan beracun terhadap ikan predator (Sundoko, 2025). Studi dari Catarino et al., (2017) menunjukkan metabolit sekunder makroalga hijau memiliki keragaman struktur kimia yang dipengaruhi oleh kondisi lingkungan dan tekanan ekologis. Kondisi ini menjadikan makroalga hijau seperti *Halimeda* sebagai sumber senyawa bioaktif yang potensial untuk diekstraksi.

Pendekatan ekstraksi bertingkat memungkinkan pemisahan awal senyawa nonpolar hingga polar. Senyawa nonpolar seperti lipid dan pigmen klorofil pada fraksi n-heksana, diikuti oleh senyawa semi-polar seperti fenolik dan terpenoid teroksidasi pada fraksi etil asetat, serta senyawa polar pada fraksi metanol. Hasil ekstraksi dapat di analisis lebih selektif dari fraksi pelarut (Hoang et al., 2019). Etil asetat merupakan pelarut semipolar yang banyak digunakan dalam proses ekstraksi metabolit sekunder dari bahan alam. Etil asetat mampu melarutkan senyawa yang memiliki sifat semi-polar seperti flavonoid, terpenoid, steroid, dan alkaloid. Sifat semi-polar etil asetat disebabkan oleh keberadaan gugus karbonil yang bersifat polar dan gugus etil yang bersifat nonpolar pada struktur. Struktur etil asetat menjadikannya pelarut ekstraksi yang baik untuk senyawa organik lipofilik (Priyadi et al., 2021). Gugus ester pada etil asetat mampu berinteraksi dengan senyawa hidrofobik melalui ikatan hidrogen lemah dan *disperse* van der Waals. Etil asetat juga memiliki sifat aprotik aprotik sehingga mampu mencegah terjadinya degradasi senyawa sensitif (Harborne, 2017). Penelitian yang dilakukan oleh Edison et al., (2020) melaporkan bahwa pelarut etil asetat yang digunakan untuk ekstraksi pada sampel rumput laut berhasil mengekstraksi senyawa fenolik dan flavonoid yang berperan dalam menangkal radikal bebas. Aktivitas antioksidan fraksi etil asetat tidak selalu memberikan nilai yang lebih baik dibandingkan dengan fraksi pelarut yang lebih polar misalnya metanol, akan tetapi fraksi etil asetat menunjukkan kemampuan menangkal radikal bebas. Selain itu Lubis and Hendri, (2020) melakukan penelitian pada *H. micronesia* hasilnya ekstrak etil asetat mendapatkan nilai IC_{50} 52,81 ppm sedangkan ekstrak metanol mendapatkan nilai IC_{50} 214,24 ppm untuk uji antioksidan dengan metode DPPH. Perbedaan aktivitas antara pelarut mencerminkan bahwa etil asetat mampu mengekstrak senyawa yang memiliki aktivitas baik terhadap radikal bebas.

Antioksidan merupakan sebutan sifat untuk senyawa yang berperan penting dalam melindungi sel dan jaringan tubuh dari kerusakan yang terjadi akibat stres oksidatif (Sies, 2015). Stres oksidatif disebabkan radikal bebas yang terbentuk secara endogen melalui proses metabolisme alami atau secara eksogen akibat terpapar polusi, radiasi, asap rokok, dan bahan kimia. Kondisi ini jika terus terjadi secara akumulatif akan menyebabkan ketidakseimbangan antara kadar radikal bebas dan kapasitas pertahanan alami tubuh terhadap radikal bebas yang kemudian dapat berujung pada penyakit degeneratif, seperti kardiovaskular, diabetes, kanker, dan gangguan neurodegeneratif (Nurkhasanah, 2023). Salah satu tujuan penggunaan senyawa antioksidan adalah menetralkan radikal bebas untuk menghambat reaksi oksidasi berantai dan melindungi tubuh dari kerusakan akibat stres oksidatif berlebih. Antioksidan yang berasal dari bahan alam, khususnya yang

berasal dari organisme laut, menjadi pilihan yang banyak dikembangkan. Kandungan senyawa bioaktif yang banyak khususnya yang memiliki aktivitas antioksidan serta efek protektif terhadap penyakit yang berhubungan dengan stres oksidatif berlebih (Shahidi and Zhong, 2015). Dengan demikian, penelitian untuk sumber antioksidan alami menjadi penting sebagai opsi yang lebih aman.

Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilakukan secara *in vitro* maupun *in vivo*, namun pengujian secara *in vitro* umumnya dilakukan sebagai tahap awal skrining untuk menilai potensi kemampuan suatu senyawa atau ekstrak dalam menangkalkan radikal bebas sebelum dilakukan pengujian lanjutan pada makhluk hidup yang memiliki mekanisme biologis yang lebih kompleks (Tyagi et al., 2024). Metode *in vitro* yang paling umum digunakan dalam penentuan aktivitas antioksidan salah satunya adalah metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), karena prosedur pengerjaannya tergolong sederhana, cepat, sensitif, serta kebutuhan akan sampel yang relatif sedikit. Metode DPPH banyak diaplikasikan dalam penelitian bahan alam seperti ekstrak tumbuhan dan alga untuk mengetahui kemampuan senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak dalam menangkalkan radikal bebas (Mutlu et al., 2025). Pada penelitian ini pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dipilih karena dapat memberikan gambaran awal kapasitas penangkalkan radikal bebas (*radical scavenging*) dari ekstrak yang berkaitan langsung dengan kandungan senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antioksidan. Prinsip pengujian DPPH didasarkan pada kemampuan senyawa antioksidan dalam mendonorkan atom hidrogen atau elektron pada radikal bebas dalam DPPH yang bersifat stabil dan secara fisik berwarna ungu, sehingga DPPH akan tereduksi menjadi bentuk non-radikal yang ditandai dengan perubahan warna menjadi kuning pucat (Apak et al., 2018). Penurunan intensitas warna diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang sekitar 517 nm (Baliyan et al., 2022). Hasil tersebut kemudian dinyatakan sebagai persentase inhibisi atau nilai IC₅₀ yang menggambarkan konsentrasi ekstrak minimum untuk meredam 50% radikal dari DPPH. Semakin kecil nilai IC₅₀ yang didapatkan maka semakin tinggi aktivitas antioksidan suatu sampel (Gulcin and Alwasel, 2023). Metode DPPH dapat dianggap efektif sebagai pendekatan awal untuk mengetahui potensi aktivitas antioksidan dari suatu ekstrak bahan alam, sehingga metode DPPH dapat dianggap efektif sebagai pendekatan awal untuk mengetahui potensi aktivitas antioksidan dari suatu ekstrak bahan alam (Sies, 2015).

Penelitian terkait bioaktivitas dari alga hijau *Halimeda* telah dilakukan, aktivitas antioksidan adalah salah satu uji yang telah dilakukan terhadap beberapa spesies dari alga hijau *Halimeda* (Gazali et al., 2019). Dukungan empiris dari penelitian terdahulu terhadap genus *Halimeda* untuk pengujian antioksidan menunjukkan hasil yang meyakinkan, seperti penelitian yang dilakukan oleh Muzaki et al., (2018) terhadap ekstrak etil asetat *H. macroalba* dengan metode DPPH memberikan hasil IC₅₀ 38,57 µg/mL. Hemamalini et al., (2025) melakukan uji antioksidan terhadap ekstrak metanol *H. gracialis* dengan metode DPPH, menghasilkan ekstrak metanol

H. gracialis pada konsentrasi 50 ppm mendapatkan nilai adsorbansi hingga 78,43% inhibisi, sebagai pembanding BHT pada konsentrasi yang sama nilai adsorbansi sebesar 88,13%. Batista-Gonzalez et al., (2012) melakukan uji antioksidan ekstrak *H. Monile* L. yang di ekstraksi dengan tetrahidrofuran, uji *in vitro* dilakukan dengan metode *Inhibition of Lipid Peroxidation* (LP), ekstrak yang diuji terbukti memiliki aktivitas antioksidan yang tergolong kuat (IC_{50} 0,078 μ g polifenol). Uji *in vivo* selanjutnya dilakukan terhadap tikus wistar dengan menginduksi kerusakan hati menggunakan CCl_4 . Hasilnya kadar *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS) serum menurun (dari $52,2 \pm 8,6$ nmol/mg menjadi $38,27 \pm 5,15$ nmol/mg), kadar TBARS hepatic menurun ($59,51 \pm 19,11$ nmol/mg menjadi $45,29 \pm 11,96$ nmol/mg), kadar *Glutathione* (GSH) hepatic meningkat ($33,36 \pm 10,44$ mmol/mg menjadi $58,45 \pm 6,63$ mmol/mg) bahkan lebih tinggi dari kondisi normal, dan aktivitas enzim katalase juga kembali secara optimal ($283,2 \pm 82,1$ U/mg menjadi $396,5 \pm 61,3$ U/mg).

Salah satu spesies dari alga hijau genus *Halimeda* adalah *H. cylindracea*, Dini et al., (2021) mengisolasi senyawa alkaloid caulerpin dan β -sitosterol dari *H. cylindracea*, Caulerpin yang diisolasi memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker paru-paru NCL-H460 dengan $IC_{50} = 20,05$ μ g/mL. Penelitian terhadap ekstrak *H. cylindracea* terkait profil fitokimia dan secara spesifik masih sangat terbatas, oleh karena itu dengan pembuktian oleh penelitian terdahulu terkait bioaktivitas dari genus *Halimeda* khususnya antioksidan maka penelitian untuk aktivitas antioksidan terhadap spesies *H. cylindracea* menjadi penting tidak hanya untuk memperkaya data ilmiah terkait genus *Halimeda*, tetapi juga sebagai dasar pengembangan sumber antioksidan alami dari makroalga di Indonesia.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etil asetat *H. cylindracea* yang diperoleh melalui proses ekstraksi bertingkat serta menganalisis aktivitas antioksidannya. Pemilihan metode ekstraksi bertingkat dengan pelarut etil asetat diharapkan mampu mengekstraksi senyawa semi-polar yang berpotensi berperan sebagai antioksidan. Ekstrak *H. cylindracea* hasil ekstraksi bertingkat ini diharapkan menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat. Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengisi kekosongan data ilmiah terkait profil metabolit sekunder dan aktivitas antioksidan *H. cylindracea* yang masih terbatas. Dengan demikian, penelitian ini dapat menjadi landasan awal bagi pengembangan penelitian lanjutan pemanfaatan *H. cylindracea* sebagai antioksidan alami.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. apa saja golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etil asetat alga hijau *H. cylindracea*?
2. bagaimana aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat alga hijau *H. cylindracea*?
3. bagaimana karakteristik metabolit sekunder yang di isolasi dari etil asetat alga hijau *H. cylindracea*?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etil asetat *H. cylindracea*, mengetahui aktivitas antioksidan dengan metode DPPH ekstrak etil asetat *H. cylindracea* dan mengetahui bagaimana karakter metabolit sekunder yang di isolasi dari etil asetat alga hijau *H. cylindracea*.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. mengidentifikasi golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak alga hijau *H. cylindracea*
2. menganalisis aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat alga hijau *H. cylindracea*
3. melakukan karakterisasi metabolit sekunder yang diisolasi dari etil asetat alga hijau *H. cylindracea*

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terkait hubungan aktivitas antioksidan dengan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak *H. cylindracea*. Selain itu, diharapkan penelitian ini dapat menjadi landasan awal untuk penelitian lebih lanjut terkait pemanfaatan *H. cylindracea* sebagai alternatif sumber bahan baku antioksidan dari bahan alam.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu alga hijau *H. cylindracea* yang berasal dari pulau-pulau karang daerah teluk Bone Sulawesi Selatan, n-heksana teknis, etil asetat teknis, aseton teknis, metanol teknis, reagen Mayer (Nitra Kimia), reagen Wagner (Nitra Kimia), reagen Dragendorff (Nitra Kimia), FeCl_3 1%, serbuk magnesium (Merck), H_2SO_4 pekat (Merck), anhidrida asetat, pereaksi *Wagner*, kloroform (CHCl_3) p.a (Merck), larutan serum sulfat ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, plat kromatografi lapis tipis (KLT) (Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ 0,25 mm), aluminium foil, silika gel 60 (Merck, No. Katalog 7730), silika gel 60 (Merck, No. Katalog 7734) pipa kapiler, Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 96%, Vitamin C, 1,1-diphenil-2-picrylhydrazyl (DPPH), dan tisu.

2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini, yaitu peralatan gelas yang umum di laboratorium, blender, toples, timbangan, neraca analitik (Ohaus), pompa vakum, corong buchner, *rotary evaporator* (Hahnshin), seperangkat alat destilasi, mikropipet (*blue* dan *yellow tip*), *chamber* KLT, seperangkat alat kromatografi vakum, lampu UV 245 dan 365 nm, *hotplate*, alat *melting point*, ayakan 60 mesh, pipa kapiler, pinset, spektrofotometer UV-Vis (*Thermo scientific* Genesys 150) spektrofotometer FT_IR (Shimadzu 8501), oven, dan seperangkat alat kromatografi kolom gravitasi (KKG) dan kromatografi kolom vakum (KKV).

2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2025 – November 2025 di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin. Pengambilan sampel dilakukan di pulau-pulau karang daerah teluk Bone Sulawesi Selatan pada titik koordinat 4° 03' 19" S dan 120° 26' 51" E. Pengujian antioksidan dilakukan di Laboratorium Produktivitas dan Kualitas Perairan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin. Analisis FT-IR dilakukan di Laboratorium Kimia Terpadu Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

2.4 Prosedur Penelitian

2.4.1 Preparasi Sampel

Sampel alga hijau *H. cylindracea* sebanyak 20 kg dicuci dengan air mengalir hingga bersih yang selanjutnya disisihkan sedikit untuk pengiriman identifikasi sampel. Sampel yang tidak termasuk dalam pengiriman identifikasi spesimen dilanjutkan untuk dikering-anginkan, lalu dihaluskan menggunakan blender. Serbuk kasar yang

didapatkan diayak menggunakan ayakan 60 mesh hingga diperoleh serbuk yang lebih halus (Dini, 2022).

2.4.2 Ekstraksi

Serbuk sampel *H. cylindracea* diekstraksi dengan metode maserasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, aseton, dan etanol yang dilakukan beberapa kali hingga noda pada plat KLT memudar sambil sesekali diaduk, kemudian disaring menggunakan corong Buchner dengan bantuan pompa vakum, sehingga diperoleh filtrat dan residu. Penggantian pelarut atau penghentian proses ekstraksi dengan metode maserasi dilakukan dengan kontrol KLT, yaitu ketika filtrat hasil maserasi berulang (maserat) memiliki noda yang tak berarti atau membandingkan noda hasil KLT maserat pada hari pertama, kedua, dan seterusnya. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan alat *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga kering. Ekstrak kering yang diperoleh kemudian dianalisis dengan KLT untuk memilih ekstrak yang tepat yang akan digunakan pada tahap fraksinasi (Dini, 2022).

2.4.3 Uji Kandungan Metabolit Sekunder Ekstrak Etil Asetat

a. Uji Steroid dan Triterpenoid

Sejumlah sampel *H. cylindracea* dilarutkan dengan CHCl_3 dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 tetes H_2SO_4 pekat dan 10 tetes anhidrida asetat. Adanya senyawa triterpenoid ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi jingga dan ungu, kemudian berubah menjadi biru dan hijau yang menandakan adanya senyawa steroid (Rubianti et al., 2022).

b. Uji Flavonoid

Sejumlah sampel *H. cylindracea* dicampur dengan air panas dan dididihkan selama lima menit sebelum disaring. Kemudian sebanyak 1 mL HCl pekat dan sedikit serbuk magnesium ditambahkan ke filtrat lalu dikocok dengan kuat. Terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga menunjukkan bahwa uji tersebut memiliki hasil yang positif (Kurnianto et al., 2021).

c. Uji Saponin

Sejumlah sampel *H. cylindracea* dicampur dengan air panas, dan beberapa tetes larutan HCl pekat. Terbentuknya busa permanen setelah dikocok kuat selama 2 menit atau lebih menunjukkan hasil uji positif (Faizah, 2021).

d. Uji Tanin

Sampel *H. cylindracea* dididihkan dengan 20 mL air, lalu disaring. Filtrat kemudian ditambahkan beberapa tetes FeCl_3 1%. Hasil uji positif ditandai dengan terbentuknya warna cokelat kehijauan atau biru kehitaman (Rubianti et al., 2022).

e. Uji Alkaloid

Sejumlah sampel *H. cylindracea* dimasukkan ke tabung A, B dan C. Tabung A ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendroff. Perubahan yang terjadi selama 30 detik, hasil uji dinyatakan positif apabila terbentuk warna jingga. Tabung B dan C ditambahkan 0,5 mL HCl 2 N pada tabung B dan dikocok hingga homogen. Kemudian ditambahkan 2-3 tetes reagen Mayer ke dalam tabung B dan 2-3 tetes reagen Wagner ke dalam tabung C, jika terbentuk endapan putih pada tabung B dan endapan cokelat pada tabung C maka sampel tersebut mengandung alkaloid (Hanifa et al., 2021).

2.4.4 Fraksinasi Dengan Metode Kromatografi Kolom

Komponen-komponen yang terdapat dalam campuran dapat dipisahkan dari satu sama lain dengan menggunakan metode yang dikenal sebagai Kromatografi Kolom Vakum (KKV) dan Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG). Kromatografi kolom menggunakan eluen yang diperoleh dari hasil orientasi dengan KLT terhadap ekstrak etil asetat *H. cylindracea*. Hasil elusi kemudian ditampung dalam bentuk fraksi-fraksi, Fraksi-fraksi yang diperoleh kemudian diuji KLT untuk mengetahui komponen dalam fraksi-fraksi tersebut. Fraksi dengan profil noda yang sama akan digabungkan menjadi satu fraksi yang sama.

2.4.5 Pemurnian

Pemurnian dilakukan melalui fraksinasi dengan kromatografi kolom gravitasi. Fraksi dengan satu noda setelah dianalisis KLT diuji kemurnian dengan KLT menggunakan 3 sistem eluen.

2.4.6 Karakterisasi Senyawa

a. Penentuan Titik Leleh

Penentuan titik leleh dilakukan dengan menggunakan alat *melting point*. Isolat dimasukkan kedalam pipa kapiler dengan salah satu ujungnya dibiarkan terbuka dan ujung lainnya tertutup, pipa kapiler dimasukan secara vertikal dengan pipa kaca di mana bagian ujung yang terbuka menghadap ke atas hingga isolat memadat pada ujung pipa kapiler yang tertutup. Pipa kapiler kemudian dimasukkan ke dalam alat melting point dinaikkan suhunya sebesar 1°C setiap menitnya. Rentang titik leleh dihitung saat kristal mulai meleleh sampai kristal meleleh sempurna. Isolat dinyatakan murni apabila memiliki titik leleh dengan rentang 1-2°C.

b. Identifikasi Gugus Fungsi

Identifikasi isolat yang diperoleh dilakukan dengan menggunakan alat FT-IR. Penentuan struktur isolat mula-mula dilakukan dengan mencampur isolat dengan KBr menggunakan alat *mixture vibrator*, lalu campuran dibentuk menjadi pelet dan

dimasukkan kedalam alat spektrofotometer FT-IR dan diukur pada gelombang bilangan 500-4000 cm^{-1} .

c. Analisis KLT dengan Referensi

Sejumlah caulerpin dan isolat dilarutkan dengan aseton. Kedua senyawa ditotol dan dielusi pada satu plat KLT untuk melihat perbandingan pola noda yang muncul.

2.4.7 Uji Aktivitas Antioksidan Secara *In Vitro* dengan Metode DPPH

a. Pembuatan Larutan DPPH 400 ppm

Larutan DPPH dengan konsentrasi 400 ppm dibuat dengan menimbang 10 mg serbuk DPPH dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml, ditambahkan etanol 95% sampai tanda batas, dihomogenkan (Bhagawan et al., 2024).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Larutan DPPH

Larutan DPPH 400 ppm dipipet sebanyak 4 mL, dimasukan ke dalam kuvet dan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis, kemudian dicatat panjang gelombang pada absorbansi paling tinggi (Bhagawan et al, 2024).

c. Pembuatan Larutan Induk Ekstrak *H. cylindracea* 1000 ppm

Sebanyak 10 mg ekstrak *H. cylindracea* ditimbang dan dilarutkan dengan aseton, dimasukan ke dalam labu ukur 10 mL lalu di himpitkan hingga tanda batas (Damanis et al., 2020).

d. Pembuatan Deret Uji Ekstrak *H. cylindracea* Konsentrasi 5, 10, 20, 40, dan 80 ppm

Sebanyak 25, 50, 100, 200, dan 400 μL larutan induk 1000 ppm dipipet dan dimasukan ke dalam masing-masing labu ukur 5 mL dilarutkan dengan aseton lalu dihimpitkan hingga tanda batas (Damanis et al., 2020).

e. Pembuatan Larutan Induk Pembanding Vitamin C 1000 ppm

Ditimbang 10 mg vitamin C, dilarutkan dengan etanol 96%, dimasukan ke dalam labu ukur 10 mL lalu dihimpitkan hingga tanda batas (Damanis et al., 2020).

f. Pembuatan Deret Pembanding Konsentrasi 0,25, 0,5, 1, 2, dan 4 ppm

Sebanyak 1,25, 2,5, 5, 10, dan 20 μL larutan induk 1000 ppm dipipet dan dimasukan ke dalam masing-masing labu ukur 5 mL dilarutkan dengan etanol 96% lalu dihimpitkan hingga tanda batas (Damanis et al., 2020).

g. Pengujian Aktivitas Antioksidan Larutan Pembanding Vitamin C

Masing-masing konsentras larutan pembanding dipipet 2 mL ke dalam 5 tabung reaksi dan ditambahkan larutan DPPH 2 mL, divortex selama 5 detik,

dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C lalu diukur panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis. Diulangi sebanyak 3 kali (Damanis et al., 2020).

h. Pengujian Aktivitas Antioksidan Larutan Uji Ekstrak *H. cylindracea*

Masing-masing konsentrasi larutan uji dipipet 2 mL ke dalam 5 tabung reaksi dan ditambahkan larutan DPPH 2 mL, divortex selama 5 detik, dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C lalu diukur panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis. Diulangi sebanyak 3 kali (Damanis et al., 2020).

2.5 Analisis Data

Setelah di peroleh nilai absorbansi dari larutan uji dan larutan pembanding, aktivitas penangkal radikal bebas (% inhibisi) dihitung sebagai persentase berkurangnya warna DPPH. Nilai persentase inhibisi terhadap radikal bebas DPPH aktivitas antioksidan dihitung dengan menggunakan rumus

$$\% \text{inhibisi} = \left(\frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

Inhibiton Concentration (IC₅₀) ditentukan secara grafis menggunakan plot nilai hambatan dan konsentrasi ekstrak. Bentuk persamaan regresi linear yang diperoleh yaitu $y = bx + a$ dan persamaan garis yang diperoleh digunakan untuk menghitung IC₅₀ (Damanis et al., 2020).