



Purifikasi Ekstrak *Gracilaria* sp. Asal Pamekasan sebagai Kandidat Senyawa Antioksidan

Purification of *Gracilaria* sp. Extract from Pamekasan as A Prospective Antioxidant Agent

AB. Chandra^{1✉}, Hafiludin¹, Hanifah FA¹, Yanti PFD¹

¹ Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Trunojoyo Madura, Bangkalan, Indonesia 69162

✉ Info Artikel:

Diterima: 22 November 2024

Revisi: 16 Desember 2024

Disetujui: 21 Desember 2024

Dipublikasi: 31 Desember 2024

📖 Kata Kunci:

Gracilaria sp., Purifikasi, Antioksidan, Kromatografi Kolom

✉ Penulis Korespondensi:

AB. Chandra

Manajemen Sumberdaya Perairan,
Fakultas Pertanian, Universitas
Trunojoyo Madura, Bangkalan,
Indonesia 69162

Email:

a.bobbychandra@trunojoyo.ac.id



This is an open access article under the [CC-BY-NC-SA](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/) license.

Copyright © 2024 by Authors.

Published by Program Studi

Manajemen Sumberdaya Perairan
Universitas Maritim Raja Ali Haji.

📄 How to cite this article:

Chandra, AB., Hafiludin, FA, H., & PFD, Y. (2024). Purifikasi Ekstrak *Gracilaria* sp. Asal Pamekasan sebagai Kandidat Senyawa Antioksidan. Jurnal Akuatiklestari, 8(1): 128-134. DOI: <https://doi.org/10.31629/akuatiklestari.v8i1.7380>

ABSTRAK. Rumput laut *Gracilaria* sp. tergolong dalam divisi thallophyta memiliki kandungan senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, saponin, steroid, dan tanin. Hasil riset terdahulu menunjukkan ekstrak kasar metanol *Gracilaria* sp. asal Pamekasan mempunyai aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 308,19 ppm. Penelitian lain menyebutkan bahwa purifikasi ekstrak kasar *Gracilaria* sp. mempengaruhi aktivitas antioksidan dan keberadaan senyawa bioaktif hasil pemurnian. Adapun tujuan utama dari penelitian ini adalah mengetahui aktivitas antioksidan fraksi hasil purifikasi kromatografi kolom ekstrak kasar *Gracilaria* sp. asal Pamekasan. Jumlah fraksi hasil purifikasi ekstrak metanol *Gracilaria* sp. asal Pamekasan dengan pelarut aseton:eter:n-heksana (3:2:6 v/v) dan pelarut n-heksana : etil asetat (7:3 v/v) berturut-turut diperoleh 22 fraksi dan 16 fraksi hasil kolom kromatografi. Dua fraksi terbaik hasil purifikasi dengan fase gerak aseton:eter:n-heksana yaitu fraksi 4 dan fraksi 6 dengan aktivitas antioksidan berturut-turut sebesar 223,14 ppm dan 231,64 ppm. Sedangkan dua fraksi terbaik hasil purifikasi dengan fase gerak n-heksana: etil asetat yaitu fraksi 2 dan fraksi 3 dengan aktivitas antioksidan berturut-turut sebesar 156,23 ppm dan 99,26 ppm. Hasil uji fitokimia pada fraksi aktif hasil purifikasi ekstrak *Gracilaria* sp. asal Pamekasan mempunyai kandungan senyawa bioaktif golongan fenol, alkaloid, saponin, triterpenoid, dan steroid. Aktivitas antioksidan pada fraksi aktif *Gracilaria* sp. asal Pamekasan menunjukkan aktivitas yang sangat lemah.

ABSTRACT. Seaweed *Gracilaria* sp. belonging to the thallophyta division contains bioactive compounds such as flavonoids, alkaloids, saponins, steroids and tannins. Previous research results showed that crude methanol extract of *Gracilaria* sp. from Pamekasan has antioxidant activity with an IC₅₀ value of 308.19 ppm. Other research states that purification of crude extract of *Gracilaria* sp. affects antioxidant activity and the presence of bioactive compounds resulting from purification. The aim of this research is to determine the antioxidant activity of the fraction resulting from column chromatography purification of crude extract of *Gracilaria* sp. from Pamekasan. The number of fractions resulting from the purification of the methanol extract of *Gracilaria* sp. from Pamekasan with the solvent acetone:ether:n-hexane (3:2:6 v/v/v) and the solvent n-hexane:ethyl acetate (7:3 v/v), respectively, 22 fractions and 16 fractions were obtained from column chromatography. The two best fractions resulting from purification with the mobile phase acetone:ether:n-hexane are fraction 4 and fraction 6 with antioxidant activity of 223.14 ppm and 231.64 ppm respectively. Meanwhile, the two best fractions were purified using the n-hexane mobile phase: ethyl acetate, namely fraction 2 and fraction 3 with antioxidant activity of 156.23 ppm and 99.26 ppm respectively. Phytochemical test results on the active fraction resulting from purification of *Gracilaria* sp. extract. from Pamekasan contains bioactive compounds in the phenol, alkaloid, saponin, triterpenoid and steroid groups. Antioxidant activity in the active fraction of *Gracilaria* sp. from Pamekasan showed very weak activity.

I. PENDAHULUAN

Gracilaria sp. merupakan jenis rumput laut merah dan termasuk dalam divisi thallophyta serta memiliki kandungan senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid, saponin, steroid, dan tanin (Soamole et al., 2018; Arbit et al., 2019). Menurut Putri et al. (2022) kandungan senyawa bioaktif pada rumput laut merah berpotensi memberikan perlindungan terhadap sinar ultraviolet (UV). *Gracilaria* sp. juga memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan jenis rumput laut lainnya dalam hal kandungan antioksidan (Rosemary et al., 2019). Penelitian lainnya menyebutkan bahwa senyawa aktif dari

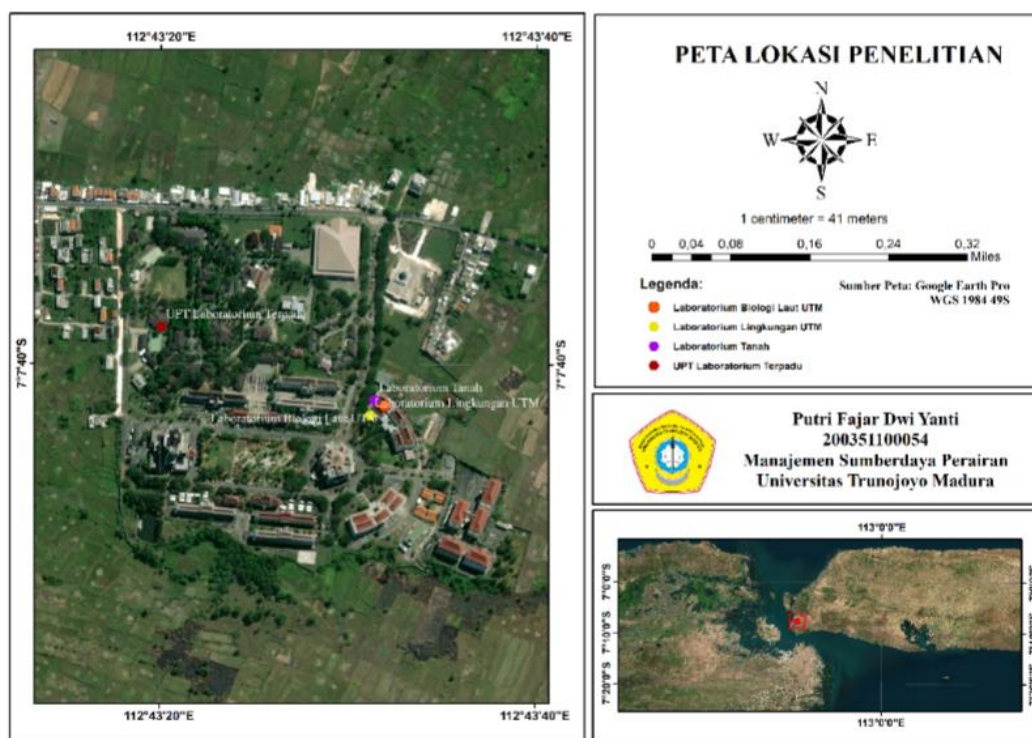
Gracilaria sp. dapat berfungsi sebagai antimikroba (Julyasih, 2022), antioksidan dengan nilai IC_{50} yang baik (Febrianto *et al.*, 2019; Mahendran *et al.*, 2021; Purwaningsih & Deskawati, 2020), antikanker (Miranda-Delgado *et al.*, 2018), dan beragam aktivitas lainnya baik sebagai kandidat senyawa obat maupun pangan fungsional (Purwaningsih, 2022; Sahidu *et al.*, 2019; Salido *et al.*, 2024).

Aktivitas antioksidan pada *Gracilaria sp.* dapat ditunjukkan dengan nilai IC_{50} . Nilai ini digunakan untuk menganalisis konsentrasi sampel yang dibutuhkan dalam menghambat radikal bebas sebesar 50% (Phuyal *et al.*, 2020). Hasil riset sebelumnya menunjukkan ekstrak kasar pelarut metanol *Gracilaria sp.* asal Pamekasan mempunyai aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 308,19 ppm (Insani *et al.*, 2022). Adapun kandungan senyawa bioaktif dari ekstrak kasar pelarut metanol *Gracilaria sp.* asal Pamekasan yang teridentifikasi adalah jenis saponin, steroid, dan fenol hidrokuinon (Insani *et al.*, 2022). Rendahnya nilai IC_{50} dan aktivitas antioksidan ekstrak *Gracilaria sp.* asal Pamekasan diduga karena masih banyaknya pengotor dan senyawa lainnya dalam ekstrak kasar. Penelitian lainnya menyebutkan bahwa purifikasi sampel dengan kolom kromatografi dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan dan keberadaan senyawa bioaktif hasil pemurnian (Hinterberger *et al.*, 2019). Oleh karena itu, penelitian ini menjadi relevan untuk dilakukan guna mengetahui aktivitas antioksidan hasil purifikasi kolom kromatografi ekstrak kasar *Gracilaria sp.* asal Pamekasan. Adapun tujuan utama dari penelitian ini adalah mengetahui aktivitas antioksidan fraksi hasil purifikasi kromatografi kolom ekstrak kasar *Gracilaria sp.* asal Pamekasan.

2. BAHAN DAN METODE

2.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus-November 2023/2024. Sampel ekstrak *Gracilaria sp.* diperoleh langsung dari Pamekasan, Madura dan seluruh aktivitas penelitian dilakukan di Laboratorium Kelautan Perikanan, Universitas Trunojoyo Madura sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Laboratorium Kelautan Perikanan, Universitas Trunojoyo Madura

2.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya kolom kromatografi (Pyrex) untuk purifikasi sampel, botol vial 5 ml sebagai tempat penampung fraksi, oven sebagai pemanas, chamber Kromatografi Lapis Tipis untuk optimasi pelarut, pipa kapiler untuk penotol sampel, rotary evaporator (Rotavapor R-215) sebagai alat pemekatan hasil ekstraksi sampel, spektrofotometer UV-Vis sebagai alat pengukur aktivitas antioksidan, dan peralatan gelas (Pyrex).

Sampel dalam penelitian ini adalah rumput laut *Gracilaria sp.* yang berasal dari Kecamatan Pademawu Kabupaten Pamekasan, Madura. Bahan lain yang digunakan seperti kapas steril, silika gel-60, akuades, pelarut n-heksana (Merck), aseton (Merck), eter (Merck), pereaksi Dragendroff, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, metanol 30% (Merck), kertas saring, NaOH 10%, $FeCl_3$ 1%, Asam asetat anhidrida, H_2SO_4 (Merck), DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), Asam askorbat, Reagen Folin-Ciocalteu 50%, Na_2CO_3 5%, dan etanol 99,9% (Merck).

2.3. Prosedur Penelitian

2.3.1 Proses Ekstraksi

Sampel *Gracilaria sp.* ditimbang sebanyak 85 g lalu dihaluskan dan direndam dengan metanol selama 24 jam. Perbandingan sampel dan pelarut yang digunakan adalah 1:4. Rendaman *Gracilaria sp.* dipisahkan dengan kain penyaring dan diulangi proses ekstraksi hingga pelarut metanol berwarna bening. Selanjutnya filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan rotary evaporator hingga berbentuk pasta.

2.3.2 Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi Kolom

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan dengan alat *chamber*-KLT yang berisi eluen dan plat KLT yang telah diberi ekstrak *Gracilaria sp.* asal Pamekasan. Proses optimasi pelarut dilakukan dengan melihat pergerakan eluen pada plat KLT, lalu dihitung nilai R_f dari tiap noda yang terdeteksi. **Kromatografi Kolom** dilakukan untuk purifikasi senyawa bioaktif dari *Gracilaria sp.* asal Pamekasan yang berpotensi sebagai antioksidan. Purifikasi ini mengacu pada [Abdullah et al., \(2021\)](#) yang dimodifikasi dengan eluen aseton:eter:n-heksana (3:2:6 v/v) dan pelarut n-heksana:etil asetat (7:3 v/v). Adapun fase diam yang digunakan adalah silika gel-60. Fraksi aktif hasil kolom kromatografi ditampung dalam botol gelap dan disimpan pada suhu 4-10°C.

2.2.3 Uji Fitokimia ([Abdullah et al., 2021](#); [Harborne, 1987](#) dimodifikasi)

Uji alkaloid dilakukan dengan mencampurkan pereaksi Wagner, Mayer, Dragendorf pada sampel. Hasil positif alkaloid untuk pereaksi Wagner dan Mayer berturut-turut apabila pada sampel terdapat endapan berwarna cokelat dan endapan warna putih kekuningan. Sedangkan hasil positif alkaloid untuk pereaksi Dragendorf ditandai dengan endapan jingga atau kemerahan pada sampel. Uji flavonoid menunjukkan hasil positif apabila muncul buih hingga perubahan warna menjadi jingga atau kemerahan setelah pengocokan kuat pada sampel yang ditambahkan HCl dan Mg. Uji saponin menunjukkan hasil positif apabila muncul buih pada sampel setelah dilakukan pengocokan dan penambahan air panas serta HCl 2N. Uji hidrokuinon menunjukkan hasil positif apabila muncul warna biru atau hijau kehitaman pada sampel setelah ditambahkan FeCl₃ 5%. Uji tanin menunjukkan hasil positif apabila muncul warna biru atau jingga kehitaman pada sampel setelah ditambahkan akuades dan FeCl₃ 1%. Uji triterpenoid dan steroid dilakukan dengan penambahan H₂SO₄ 2N, kloroform, dan asam asetat pada sampel. Hasil uji menunjukkan hasil positif triterpenoid apabila muncul merah atau cokelat pada sampel. Sedangkan hasil uji positif steroid apabila muncul warna biru, ungu atau hijau pada sampel.

2.2.4 Uji Aktivitas Antioksidan ([Purwaningsih & Deskawati, 2020](#); [Molyneux, 2004](#) dimodifikasi)

Tahap pertama adalah pembuatan larutan induk DPPH 100 ppm dalam pelarut metanol. Larutan induk DPPH yang terbungkus aluminium foil diinkubasi selama 30 menit. Tahap kedua adalah penyiapan sampel fraksi hasil kolom kromatografi. Sampel fraksi hasil kolom kromatografi yang telah siap ditambahkan DPPH, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 515 nm dengan spektrofotometer UV-Vis.

2.4. Analisis Data

Aktivitas antioksidan sampel diukur dengan menghitung persen inhibisi melalui persamaan:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{[\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi sampel}]}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100\%$$

Keterangan:

Absorbansi blanko : nilai pengukuran absorbansi DPPH 50 µM

Absorbansi sampel : nilai pengukuran absorbansi sampel dalam radikal DPPH 50 µM

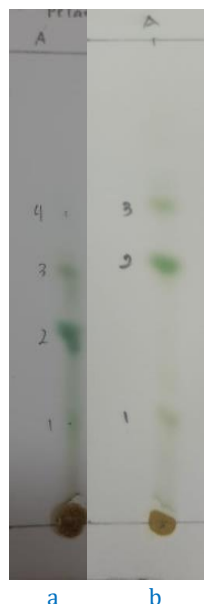
Nilai IC₅₀ diperoleh dari persamaan regresi linier: $y = a + bX$. Besarnya nilai IC₅₀ dihitung dengan rumus: $IC_{50} = \frac{[50-a]}{b}$

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemurnian ekstrak kasar *Gracilaria sp.* pada penelitian ini menggunakan metode kolom kromatografi dengan fase diam silika gel-60. Purifikasi dilakukan dengan menggunakan fase gerak aseton:eter:n-heksana perbandingan 3:2:6 (v/v/v) dan n-heksana:etil asetat perbandingan 7:3 (v/v). Penentuan fase gerak yang digunakan pada kolom kromatografi dioptimasi dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Berdasarkan hasil KLT yang ditunjukkan pada **Gambar 2**, spot senyawa bioaktif dari ekstrak kasar metanol *Gracilaria sp.* dapat dipisahkan dengan baik dengan menggunakan pelarut aseton:eter:n-heksana (**Gambar 2a**) dan pelarut n-heksana:etil asetat (**Gambar 2b**). **Gambar 2a** menunjukkan adanya empat spot yang terpisah dengan baik, sementara **Gambar 2b** menunjukkan tiga spot yang terpisah hasil dari KLT menggunakan pelarut yang berbeda.

Spot noda yang terpisah dari KLT sampel ekstrak metanol *Gracilaria sp.* asal Pamekasan dihitung nilai R_f-nya. Berdasarkan **Gambar 2a** terdapat 4 spot noda yang terdeteksi hasil pemisahan dengan pelarut aseton:eter:n-heksana

perbandingan 3:2:6 (v/v/v). Nilai Rf yang dihasilkan dari keempat noda tersebut adalah 0,21; 0,43; 0,55; dan 0,65 (Tabel 1). Hasil pemisahan ekstrak kasar metanol *Gracilaria* sp. asal Pamekasan dengan pelarut n-heksana:etil asetat perbandingan 7:3 (v/v) mendeteksi tiga spot noda (Gambar 2b). Adapun nilai Rf yang ditunjukkan pada Tabel 1 untuk pelarut n-heksana:etil asetat adalah 0,21, 0,55, dan 0,66.



Gambar 2. Hasil Pemisahan Senyawa Bioaktif pada Ekstrak Kasar Metanol *Gracilaria* sp. Asal Pamekasan dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis

Tabel 1. Perhitungan Nilai RF Hasil Kromatografi Lapis Tipis pada Ekstrak Kasar Metanol *Gracilaria* sp. Asal Pamekasan dengan Pelarut yang Berbeda

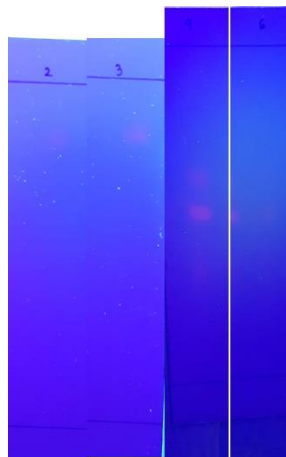
No	Perbandingan Pelarut	Jumlah Spot	Jarak Pelarut (cm)	Jarak Sampel (cm)	Rf
1	Aseton:eter:n-heksana (3:2:6 v/v/v)	4	8,0	1,7	0,21
				3,4	0,43
				4,4	0,55
				5,2	0,65
2	n-heksana:etil asetat (7:3 v/v)	3	7,8	1,7	0,21
				4,3	0,55
				5,2	0,66

Tabel 1 menunjukkan rentang nilai Rf dari hasil pemurnian dengan dua pelarut yang mempunyai kemiripan. Kondororik *et al.*, (2012) menyatakan bahwa nilai Rf dapat dianalisis untuk mengetahui jenis pigmen dari ekstrak sampel yang diteliti. Namun demikian, jenis pigmen dari penelitian ini dianalisis dan menjadi bagian lain dari artikel yang akan diterbitkan kemudian.

Hasil optimasi pelarut dengan metode KLT dilanjutkan dengan purifikasi ekstrak kasar *Gracilaria* sp. asal Pamekasan dengan kromatografi kolom. Sebanyak 22 fraksi diperoleh dari hasil kolom kromatografi dengan fase gerak aseton:eter:n-heksana perbandingan 3:2:6 (v/v/v). Sementara dengan fase gerak n-heksana:etil asetat perbandingan 7:3 (v/v) diperoleh 16 fraksi hasil kolom kromatografi. Seluruh fraksi hasil kolom kromatografi dengan fase diam silika gel-60 ini diuji dengan KLT untuk mengetahui ada atau tidaknya senyawa bioaktif yang berhasil dipisahkan. Penelitian lain oleh Firdausy *et al.* (2017) dan Kurniasari *et al.* (2018) berhasil mengidentifikasi spot noda dari ekstrak *Gracilaria* sp. dengan kromatografi lapis tipis masing-masing dengan pelarut kloroform:metanol (9:1 v/v) dan kloroform:methanol (3:1 v/v). Gambar 3 menunjukkan deteksi spot hasil KLT dari fraksi aktif hasil kolom kromatografi dengan fase gerak yang berbeda. Ditunjukkan pada Gambar 3, Fraksi 2 dan fraksi 3 dari hasil kolom kromatografi dengan pelarut aseton:eter:n-heksana mempunyai kemiripan tampilan posisi spot pada lempeng KLT. Sementara fraksi 4 dan fraksi 6 hasil kolom kromatografi dengan pelarut n-heksana:etil asetat mempunyai tampilan spot pada lempeng KLT pada posisi yang berbeda. Deteksi spot yang muncul dengan metode KLT dari fraksi hasil kolom kromatografi dapat menentukan kemurnian senyawa bioaktif yang dipisahkan. Apabila hanya terdeteksi satu spot pada satu fraksi, maka secara kualitatif fraksi hasil kolom kromatografi tersebut sudah murni terpisah tanpa adanya banyak pengotor atau bahan campuran lainnya (Bajpai *et al.*, 2016 dan Coskun, 2016).

Pengujian fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada fraksi aktif hasil kolom kromatografi ekstrak *Gracilaria* sp. asal Pamekasan. Adanya senyawa bioaktif pada fraksi aktif biasanya linear dengan aktivitas antioksidan. Keberadaan senyawa bioaktif pada fraksi aktif *Gracilaria* sp. diindikasikan dengan adanya spot noda pada plat KLT (Gambar 3). Peneliti Firdausy *et al.*, (2017) mendeteksi senyawa bioaktif

golongan alkaloid, flavonoid, dan triterpenoid dari ekstrak *Gracilaria sp.* asal Sidoarjo. Sementara itu Kurniasari *et al.*, (2018) dalam hasil penelitiannya terhadap ekstrak *Gracilaria verrucosa* asal Lombok mengidentifikasi senyawa golongan saponin dan triterpenoid. Deteksi golongan senyawa yang berbeda dari ekstrak *Gracilaria sp.* dari beberapa penelitian karena pengaruh pelarut pada ekstraksi dan eluen pada saat purifikasi yang berbeda (Bajpai *et al.*, 2016; Harborne 1987; Firdausy *et al.*, 2017; Kurniasari *et al.*, 2018). Diketahui bahwa golongan senyawa alkaloid, flavonoid, dan fenolik memiliki potensi sebagai antioksidan dengan mekanisme penghambatan radikal bebas (Coura *et al.*, 2012; Damayanti *et al.*, 2024; Mahendran *et al.*, 2021; Phuyal *et al.*, 2020).



Gambar 3. Deteksi Spot Senyawa Bioaktif dengan KLT dari Fraksi 2, 3, 4, dan 6 Hasil Kolom Kromatografi

Tabel 2. Hasil Uji Fitokimia Fraksi Aktif *Gracilaria sp.* Hasil Kolom Kromatografi

Senyawa Bioaktif	Fraksi				Penelitian Kurniasari <i>et al.</i> , (2018) pada <i>Gracilaria verrucosa</i>
	2 ^a	3 ^a	4 ^b	6 ^b	
Alkaloid					
Dragendorff	-	-	-	-	-
Wagner	+	+	+	-	-
Mayer	-	-	-	-	-
Flavonoid	-	-	-	-	-
Fenol hidrokuinon	-	+	+	-	-
Saponin	+	+	+	-	+
Tanin	-	-	-	-	-
Triterpenoid	+	+	-	-	+
Steroid	+	-	+	-	-

Keterangan:

a : fraksi hasil purifikasi dengan kolom kromatografi dengan fase gerak n-heksana : etil asetat 7:3 (v/v)

b : fraksi hasil purifikasi dengan kolom kromatografi dengan fase gerak aseton:eter:n-heksana (3:2:6 v/v/v)

(+) terdeteksi

(-) tidak terdeteksi

Fraksi aktif *Gracilaria sp.* pada Tabel 2 menunjukkan deteksi beberapa senyawa bioaktif. Fraksi 2 memiliki kandungan senyawa alkaloid, saponin, triterpenoid, dan steroid. Fraksi 3 memiliki kandungan senyawa alkaloid pada pereaksi wagner, fenol hidrokuinon, saponin, dan triterpenoid. Fraksi 4 menunjukkan adanya senyawa bioaktif yaitu alkaloid, fenol hidrokuinon, saponin, dan steroid. Sementara fraksi 6 tidak terdeteksi untuk semua golongan senyawa bioaktif. Terdapat kesesuaian dengan penelitian Kurniasari *et al.*, (2018) yang menunjukkan jika ekstrak *Gracilaria verrucosa* asal Lombok mengandung senyawa golongan saponin dan triterpenoid. Adapun tidak terdeteksinya senyawa flavonoid dan tanin pada fraksi yang diuji ditandai dengan tidak terjadi perubahan warna pada sampel uji. Ada tidaknya golongan senyawa yang terdeteksi juga dipengaruhi oleh perbedaan penggunaan pelarut pada proses ekstraksi dan perbedaan fase gerak pada saat purifikasi dari *Gracilaria sp.* (Bajpai *et al.*, 2016; Coskun, 2016).

Fraksi aktif dikategorikan positif alkaloid diindikasikan dengan terbentuknya warna coklat setelah ditetesi dengan pereaksi wagner. Senyawa fenol positif ditandai dengan terbentuknya warna biru kehijauan, sedangkan saponin ditandai dengan larutan uji yang mengandung busa. Senyawa steroid pada fraksi diindikasikan dengan terbentuknya warna hijau pada lapisan atas cairan (Abdullah *et al.*, 2021; Harborne, 1987).

Tabel 3. Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi aktif *Gracilaria sp.* hasil kolom kromatografi

Sampel	Aktivitas antioksidan IC ₅₀ (ppm)	Peneliti Mahendran <i>et al.</i> , (2021) pada fraksi metanol <i>Gracilaria sp.</i>
Asam askorbat	2,75	82,93±0,48%

Sampel	Aktivitas antioksidan IC ₅₀ (ppm)	Peneliti Mahendran et al., (2021) pada fraksi metanol <i>Gracilaria</i> sp.
Fraksi 2a	156,23	
Fraksi 3a	99,26	
Fraksi 4b	223,14	
Fraksi 6b	231,64	

Keterangan

a : fraksi hasil purifikasi dengan kolom kromatografi dengan fase gerak n-heksana:etil asetat 7:3 (v/v)

b : fraksi hasil purifikasi dengan kolom kromatografi dengan fase gerak aseton:eter:n-heksana (3:2:6 v/v/v)

Nilai IC₅₀ merupakan kemampuan suatu sampel dalam meredam 50% pada radikal bebas DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl). Antioksidan menurut Molyneux (2004) akan bereaksi dengan DPPH sehingga menstabilkan radikal bebas dan mereduksi DPPH. Aktivitas antioksidan pada suatu sampel dapat ditunjukkan berdasarkan penggolongan nilai IC₅₀. Molyneux (2004) menyatakan bahwa aktivitas antioksidan dikatakan sangat kuat apabila nilai IC₅₀ dibawah 50 ppm, kategori kuat apabila berada pada kisaran 50-100 ppm, kategori sedang berada pada nilai 100-150 ppm, kategori lemah berada pada kisaran 150-200 ppm, dan sangat lemah apabila nilai IC₅₀ di atas 200 ppm. Berdasarkan Tabel 3 menunjukkan bahwa fraksi aktif kolom kromatografi *Gracilaria* sp. asal Pamekasan tidak termasuk dalam kategori sangat kuat dan kuat dalam menghambat radikal DPPH. Fraksi 2a dan fraksi 3a mempunyai nilai IC₅₀ dengan kategori sedang, sedangkan fraksi 4b dan 6b mempunyai nilai IC₅₀ dengan kategori sangat lemah. Sangat jauh apabila dibandingkan dengan asam askorbat sebagai kontrol positif yang mempunyai nilai IC₅₀ sebesar 2,75 ppm. Peneliti lain memperoleh nilai penghambatan radikal bebas yang lebih tinggi yaitu sebesar 82,93% (Mahendran et al., 2021). Sementara Febrianto et al. (2019) mendapatkan nilai IC₅₀ sebesar 188,53 ppm dan 168,76 ppm dari ekstrak *Gracilaria Verrucosa* dengan kategori lemah. Tingginya nilai IC₅₀ pada sampel diduga karena pelarut yang digunakan untuk kolom kromatografi tidak dapat memisahkan senyawa antioksidan secara maksimal.

4. SIMPULAN

Jumlah fraksi hasil purifikasi ekstrak metanol *Gracilaria* sp. asal Pamekasan dengan pelarut aseton:eter:n-heksana (3:2:6 v/v) dan pelarut n-heksana : etil asetat (7:3 v/v) berturut-turut diperoleh 22 fraksi dan 16 fraksi hasil kolom kromatografi. Dua fraksi terbaik hasil purifikasi dengan fase gerak aseton:eter:n-heksana yaitu fraksi 4 dan fraksi 6 dengan aktivitas antioksidan berturut-turut sebesar 223,14 ppm dan 231,64 ppm. Sedangkan dua fraksi terbaik hasil purifikasi dengan fase gerak n-heksana : etil asetat yaitu fraksi 2 dan fraksi 3 dengan aktivitas antioksidan berturut-turut sebesar 156,23 ppm dan 99,26 ppm. Hasil uji fitokimia pada fraksi aktif hasil purifikasi ekstrak *Gracilaria* sp. asal Pamekasan mempunyai kandungan senyawa bioaktif golongan fenol, alkaloid, saponin, dan steroid. Aktivitas antioksidan pada fraksi aktif *Gracilaria* sp. asal Pamekasan menunjukkan aktivitas sedang dan sangat lemah.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat (LPPM) Universitas Trunojoyo Madura yang telah membiayai penelitian ini.

6. REFERENSI

- Abdullah, A., Nurjanah, N., & Nasution, A.I.S. (2021). Karakteristik Fraksi Aktif Biopigmen Fukosantin Rumput Laut Cokelat sebagai Antioksidan dan UV-Protector. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 24(1): 131-147. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v24i1.35-41>
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. (2005). *Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists*. Arlington, Virginia (US).
- Arbit, N.I.S., Omar, S.B.A., Soekendarsi, E., Yasir, I., Tresnati, J., Mutmainnah, & Tuwo, A. (2019). Morphological and genetic analysis of *Gracilaria* sp. cultured in ponds and coastal waters. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 370(1): 012018. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/370/1/012018>
- Bajpai, V.K., Majumder, R., & Park, J.G. (2016). Isolation and purification of plant secondary metabolites using column-chromatographic technique. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 11(4): 844-848. <https://doi.org/10.3329/bjp.v11i4.28185>
- Coskun, O. (2016). Separation techniques: chromatography. *Northern clinics of Istanbul*. 3(2): 156-160. <https://doi.org/10.14744/nci.2016.32757>
- Coura, C.O., Araujo, I.W.F.de, Vanderlei, E.S.O., Rodrigues, J.A.G., Quindere, A.L.G., Fontes, B.P., Queiroz, I.N.L.de., Menezes, D.B.de., et al. (2012). Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Sulphated Polysaccharides from the Red Seaweed *Gracilaria cornea*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 110(4): 335-341. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00811.x>
- Damayanti, E., Chandra, A.B., & Hafiludin, H. (2024). Aktivitas Antioksidan Anggur Laut (*Caulerpa* sp.) dari Pulau Sapudi dengan Metode Pengeringan Berbeda. *Juvenil: Jurnal Ilmiah Kelautan dan Perikanan*. 5(2): 162-171. <https://doi.org/10.21107/juvenil.v5i2.25639>
- Elalla, F.M.A., & Emad, A.S. (2009). Antioxidant Activity of Extract and Semi-Purified Fractions of Marine Red Macroalga, *Gracilaria verrucosa*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 3(4): 3179-3185.
- Febrianto, W., Djunaedi, A., Suryono, S., Santosa, G.W., & Sunaryo, S. (2019). Potensi Antioksidan Rumput Laut *Gracilaria verrucosa* Dari Pantai Gunung Kidul Yogyakarta. *Jurnal Kelautan Tropis*. 22(1): 81-86. <https://doi.org/10.14710/jkt.v22i1.4669>
- Firdausy, V.L., Sudarno, & Pramono, H. (2017). Activity test of crude extract *Gracilaria* sp. on *Propionibacterium acnes* growth inhibition in vitro. Universitas Indonesia, UI Press.
- Harborne JB. (1987). *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. ITB Press. Bandung.

- Hinterberger, V., Damm, C., Haines, P., Guldi, D.M., & Peukert, W. (2019). Purification and Structural Elucidation Of Carbon Dots By Column Chromatography. *Nanoscale*. 11: 8464-8474. <https://doi.org/10.1039/C9NR01029G>
- Insani, A.Y., Hafiludin, H., & Chandra, A.B. (2022). Pemanfaatan Ekstrak *Gracilaria sp.* dari Perairan Pamekasan sebagai Antioksidan. *Juvenil: Jurnal Ilmiah Kelautan dan Perikanan*. 3(1): 16-25. <https://doi.org/10.21107/juvenil.v3i1.14783>
- Julyasih, S. (2022). Senyawa Bioaktif Beberapa Jenis Rumput Laut dan Aktivitas Penghambatan Terhadap Jamur *Aspergillus flavus* pada Tanaman Jagung (*Zea mays L.*). *Jurnal Perikanan Unram*. 12(3): 450-456. <https://doi.org/10.29303/jp.v12i3.363>
- Kondororik, F., Martosupono, M., & Susanto, A.B. (2016). Identifikasi Komposisi Pigmen, Isolasi, dan Aktivitas Antioksidan Beta Karoten pada Rumput Laut Merah *Gracilaria gigas* Hasil Budidaya. *Jurnal Biologi dan Pembelajarannya*. 3(1): 1-10. <https://doi.org/10.29407/jbp.v3i1.443>
- Kurniasari, K.D., Arsianti, A., Aziza, Y.A.N., Mandasari, B.K.D., Masita, R., Zulfa, F.R., Dewi, M.K., Zagleol, C.R.Z., Azizah, N.N., & Putrianingsih, R. (2018). Phytochemical analysis and anticancer activity of seaweed *Gracilaria verrucosa* against colorectal HCT-116 cells. *Oriental Journal of Chemistry*. 34(3): 1257. <http://dx.doi.org/10.13005/ojc/340308>
- Mahendran, S., Maheswari, P., Sasikala, V., Rubika, J.J., & Pandiarajan, J. (2021). In Vitro Antioxidant Study of Polyphenol from Red Seaweeds Dichotomously Branched gracilaria *Gracilaria edulis* And Robust Sea Moss *Hypnea valentiae*. *Toxicology Reports*. 8: 1404-1411. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.07.006>
- Miranda-Delgado, A., Montoya, M.J., Paz-Araos, M., Mellado, M., Villena, J., Arancibia, P., Madrid, A., & Jara-Gutiérrez, C. (2018). Antioxidant and Anti-Cancer Activities of Brown and Red Seaweed Extracts from Chilean Coasts. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 46(2): 301-313. <https://doi.org/10.3856/vol46-issue2-fulltext-6>
- Molyneux, P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J.Sci. Technol.* 26(2): 212-219.
- Phuyal, N., Jha, P.K., Raturi, P.P., & Rajbhandary, S. (2020). Total Phenolic, Flavonoid Contents, and Antioxidant Activities of Fruit, Seed, and Bark Extracts of *Zanthoxylum armatum* DC. *The Scientific World Journal*. 1: 8780704. <https://doi.org/10.1155/2020/8780704>
- Purwaningsih, S. (2022). Kajian Serat dan Komponen Aktif Beras Analog dari Rumput Laut *Gracilaria sp.* *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 25(3): 382-392. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v25i3.40138>
- Purwaningsih, S., & Deskawati, E. (2020). Karakteristik dan Aktivitas Antioksidan Rumput Laut *Gracilaria Sp.* Asal Banten. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 23(3): 503-512. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v23i3.32808>
- Putri, D.K., Idiawati, N., & Sofiana, M.S.J. (2022). Kandungan Fitokimia dan Nilai Sun Protection Factors (SPF) pada Ekstrak Metanol *Hypnea Pannosa*, *Turbinaria Decurrens*, dan *Caulerpa Serrulata*. *Indonesian Journal of Pure and Applied Chemistry*. 5(2): 65-72. <https://doi.org/10.26418/indonesian.v5i2.49170>
- Rosemary, T., Arulkumar, A., Paramasivam, S., Mondragon-Portocarrero, A., & Miranda, J.M. (2019). Biochemical, Micronutrient and Physicochemical Properties of The Dried Red Seaweeds *Gracilaria edulis* and *Gracilaria corticata*. *Molecules*. 24(12): 2225. <https://doi.org/10.3390/molecules24122225>
- Sahidu, A.M., Mukti, A.T., & Satyantini, W.H. (2019). PPPUD Produk Olahan Rumput Laut Khas Kabupaten Sumenep, Madura, Jawa Timur. *Journal of Marine and Coastal Science*. 8(1): 10-17.
- Salido, M., Soto, M., & Seoane, S. (2024). Seaweed: Nutritional And Gastronomic Perspective. A Review. *Algal Research*. 77: 103357. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103357>
- Soamole, H.H., Sanger, G., Harikedua, S.D., Dotulong, V., Mewengkang, H.W., & Montolalu, R.I. (2018). Kandungan fitokimia ekstrak etanol rumput laut segar (*Turbinaria sp.*, *Gracilaria sp.*, dan *Halimeda macroloba*). *Media Teknologi Hasil Perikanan*. 6(3): 94-98. <https://doi.org/10.35800/mthp.6.3.2018.21259>
- Yudiati, E., Ridlo, A., Nugroho, A.A., Sedjati, S., & Maslukah, L. (2020). Analisis Kandungan Agar, Pigmen dan Proksimat Rumput Laut *Gracilaria sp.* pada Reservoir dan Biofilter Tambak Udang *Litopenaeus vannamei*. *Buletin Oseanografi Marina*. 9(2): 133-140. <https://doi.org/10.14710/buloma.v9i2.29453>