

Total Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol *Gracilaria* Sp. Hasil Pemisahan Kromatografi Kolom

Anindita Rizky Nittya* dan Hafiludin

Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Pertanian Universitas Trunojoyo Madura
Jl. Raya Telang, Kamal Bangkalan, Jawa Timur 69162 Indonesia
Corresponding author, e-mail: hafiludin@trunojoyo.ac.id

ABSTRAK: Rumput laut *Gracilaria* sp. merupakan jenis rumput laut yang memiliki kandungan senyawa bioaktif seperti alkaloid, steroid, saponin, flavonoid, dan tanin. Sumber senyawa antioksidan pada *Gracilaria* sp. berasal dari senyawa yang bersifat fenolik. Aktivitas antioksidan pada ekstrak kasar *Gracilaria* sp. didapatkan nilai IC_{50} masih tergolong rendah dan memerlukan pemurnian. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa bioaktif dan total flavonoid pada ekstrak metanol rumput laut *Gracilaria* sp. serta aktivitas antioksidan hasil pemisahan menggunakan kromatografi kolom. Penelitian ini dilakukan beberapa tahapan, yaitu analisis fitokimia, pemilihan eluen terbaik menggunakan metode kromatografi lapis tipis, pemisahan ekstrak metanol *Gracilaria* sp. dengan menggunakan kromatografi kolom, analisis total flavonoid, dan analisis aktivitas antioksidan hasil pemisahan kromatografi kolom. Senyawa bioaktif hasil analisis fitokimia pada ekstrak metanol *Gracilaria* sp. didapatkan senyawa flavonoid dan saponin. Pemilihan eluen terbaik menggunakan kromatografi lapis tipis dengan perbandingan eluen n-heksan : etil asetat (7:3), (16:4), (17:3), dan (18:2). Hasil pemilihan eluen terbaik dan identifikasi senyawa menggunakan kromatografi lapis tipis didapatkan nilai R_f terbaik dihasilkan oleh perbandingan eluen n-heksan : etil asetat (7:3) sebesar 0,963 cm dengan warna noda jingga. Pemisahan ekstrak metanol *Gracilaria* sp. dengan kromatografi kolom didapatkan total 9 fraksi. Analisis total flavonoid hasil pemisahan kromatografi kolom dilakukan pada fraksi dengan nilai absorbansi tertinggi didapatkan sebesar 12,456 mg QE/g. Aktivitas antioksidan pada fraksi dengan nilai absorbansi tertinggi didapatkan nilai IC_{50} sebesar 219,17 ppm. Aktivitas antioksidan yang didapatkan lebih baik dari hasil aktivitas antioksidan ekstrak kasar rumput laut *Gracilaria* sp.

Kata Kunci: antioksidan; *Gracilaria* sp.; kromatografi kolom; kromatografi lapis tipis; flavonoid

Total Flavonoids and Antioxidant Activity of Methanol Extract *Gracilaria* Sp. Column Chromatography Separation Results

ABSTRACT: Seaweed *Gracilaria* sp. is a type of seaweed that contains bioactive compounds such as alkaloids, steroids, saponins, flavonoids, and tannins. Source of antioxidant compounds in *Gracilaria* sp. derived from compounds of a phenolic nature. Antioxidant activity in crude extract of *Gracilaria* sp. the IC_{50} value is still relatively low and requires purification. This research was carried out in several stages, namely sample preparation, extraction, phytochemical analysis, selection of the best eluent using the thin-layer chromatography method, separation of methanol extract *Gracilaria* sp. by using column chromatography, total flavonoid analysis, and antioxidant activity analysis of column chromatography separation results. Bioactive compounds from phytochemical analysis on methanol extract *Gracilaria* sp. obtained flavonoid compounds and saponins. The results of selecting the best eluent and identifying compounds using thin-layer chromatography obtained the best R_f value produced by the ratio of n-hexane eluent: ethyl acetate (7: 3) of 0.963 cm with orange stain color. Separation of methanol extract *Gracilaria* sp. by column chromatography a total of 9 fractions were obtained. Analysis of total flavonoids from column chromatography separation was carried out in the first fraction obtained at 12,456 mg QE/g. Antioxidant activity in the first fraction obtained an IC_{50} value of 219.17 ppm. The antioxidant

activity obtained is better than the results of the antioxidant activity of crude seaweed extract *Gracilaria* sp.

Keywords: *antioxidant; Gracilaria* sp.; *column chromatography; thin layer chromatography; flavonoids*

PENDAHULUAN

Rumput laut menjadi salah satu potensi sumberdaya laut di Indonesia. Rumput laut termasuk dalam kelompok divisi *thallophyta*. Rumput laut diklasifikasikan menjadi empat kelas berdasarkan kandungan pigmennya, yaitu rumput laut hijau (*Chlorophyta*), rumput laut merah (*Rhodophyta*), rumput laut coklat (*Phaeophyta*) dan rumput laut biru hijau (*Chrysophyta*). *Gracilaria* sp. merupakan jenis rumput laut yang banyak dimanfaatkan, kandungan senyawa bioaktif yang dimiliki *Gracilaria* sp. yaitu flavonoid, steroid, saponin, alkaloid, dan tanin (Soamole *et al.*, 2018). Harahap *et al.* (2022) menyatakan kandungan senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas antioksidan adalah saponin, steroid, tanin, fenol hidrokuinon, dan flavonoid. *Gracilaria* sp. memiliki sumber senyawa aktivitas antioksidan berasal dari senyawa yang bersifat fenolik. Senyawa fenolik menjadi kandungan tertinggi yang terdapat pada rumput laut dan merupakan metabolit dengan variasi struktur terbanyak. Flavonoid termasuk dalam subkelompok senyawa fenolik yang berperan sebagai antioksidan, antiinflamasi, antikanker, dan antibakteri (Wakhidah & Anggarani, 2021).

Lantah *et al.* (2017) menyatakan aktivitas antioksidan pada sampel dapat dipengaruhi oleh jenis spesies, metode ekstraksi, lokasi, dan musim. Konsentrasi pelarut yang digunakan ketika proses ekstraksi juga dapat mempengaruhi kandungan metabolit sekunder yang terikat. Hasil penelitian terdahulu yang dilakukan Insani *et al.* (2022) pada ekstrak rumput laut *Gracilaria* sp. asal Madura sebagai sumber antioksidan nilai IC₅₀ yang didapatkan masih tergolong rendah. Lemahnya aktivitas antioksidan tersebut disebabkan oleh ekstrak yang digunakan masih berupa ekstrak kasar sehingga perlu dilakukannya pemurnian (Maghfuroh & Hafiludin, 2024; Syafitri *et al.*, 2022; Tania & Hafiludin, 2023). Metode pemisahan senyawa pada ekstrak kasar salah satunya, yaitu metode kromatografi. Metode kromatografi yang biasa digunakan adalah kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom.

Hasil pemisahan senyawa dengan kromatografi kolom dipengaruhi oleh eluen, laju alir, adsorben, dan diameter kolom Fasya *et al.* (2018). Eluen yang digunakan pada kromatografi kolom berupa pelarut murni atau campuran beberapa jenis pelarut yang bersesuaian dengan perbandingan tertentu. Proses pemisahan senyawa dalam kolom membentuk pita serapan, mengalir keluar kolom dengan eluen sesuai dengan polaritas senyawa. Pemaksimalan pelarut dilakukan menggunakan plat kromatografi lapis tipis dengan pelarut yang sama namun volume yang diperkecil (Emilda & Delfira, 2023). Ambarwati dan Nasution (2023) menyatakan optimasi berbagai eluen dilakukan dengan cara elusi, eluen yang memiliki kemampuan memisahkan senyawa yang paling baik menjadi eluen terpilih. Eluen n-heksan dan etil asetat dapat memisahkan senyawa polar, semi polar, maupun non polar. N-heksan memiliki sifat non polar sedangkan etil asetat bersifat polar (Forestryana & Arnida, 2020). Metode pemisahan atau pemurnian menggunakan kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom pada rumput laut yang telah dilakukan salah satunya yaitu pada penelitian Sanger *et al.* (2022), pada penelitian tersebut dilakukan isolasi asam lemak dan kadar pigmen pada rumput laut *Sargassum crassifolium* yang digunakan sebagai sumber antioksidan. Metode kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom telah berkembang dan banyak digunakan untuk pemisahan, isolasi, pemurnian, dan identifikasi senyawa (Leandro *et al.*, 2020). Penggunaan metode kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom dalam memisahkan senyawa bioaktif pada rumput laut *Gracilaria* sp. asal Madura belum banyak dilakukan. Penggunaan metode kromatografi terbukti dapat memurnikan ekstrak kasar pada rumput laut *Gracilaria* sp. dengan hasil yang lebih baik. Tujuan dari penelitian ini, yaitu untuk menganalisis jenis kandungan senyawa bioaktif pada ekstrak metanol *Gracilaria* sp., menganalisis total flavonoid, dan aktivitas antioksidan pada ekstrak metanol *Gracilaria* sp. hasil pemisahan kromatografi kolom.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan pada bulan September-Desember 2022. Sampel diperoleh dari perairan Sembilangan Desa Sembilangan Kecamatan Bangkalan Kabupaten Bangkalan. Sampel yang digunakan pada penelitian ini, yaitu ekstrak kasar metanol *Gracilaria* sp. yang didapatkan dari penelitian sebelumnya. Analisis sampel dilakukan di Laboratorium Tanah dan Laboratorium Dasar, Jurusan Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Trunojoyo Madura. Lokasi pengambilan sampel dapat dilihat pada Gambar 1.

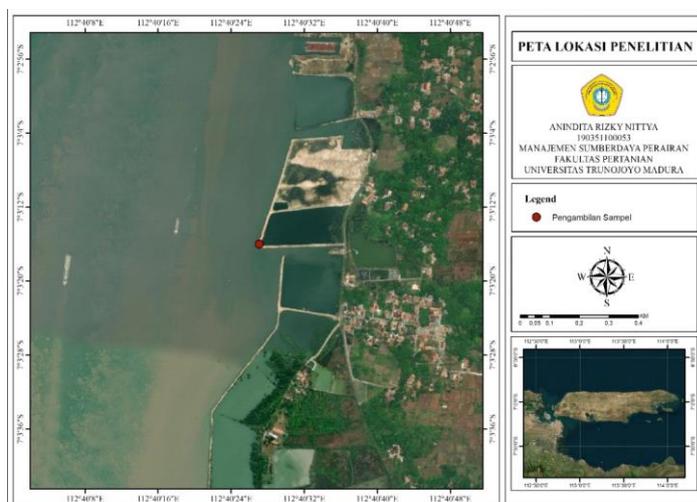
Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu, ekstrak kasar metanol *Gracilaria* sp., n-heksana, etil asetat, silika gel G60. Proses penelitian dilakukan dengan analisis senyawa bioaktif, penentuan eluen terbaik dengan kromatografi lapis tipis, pemisahan senyawa flavonoid dengan kromatografi kolom, uji kandungan flavonoid, aktivitas antioksidan dan analisis data dilakukan dengan microsoft excel.

Analisis senyawa bioaktif yang dilakukan terdiri dari analisis senyawa alkaloid, flavonoid, fenol hidrokuinon, tanin, steroid, triterpenoid, dan saponin. Analisis senyawa alkaloid dan flavonoid dilakukan berdasarkan (Nurjannah *et al.*, 2020). Analisis senyawa fenol hidrokuinon, tanin, steroid, dan triterpenoid dilakukan berdasarkan (Purwaningsih & Deskawati, 2021). Analisis senyawa saponin dilakukan berdasarkan (Sari *et al.*, 2022).

Metode kromatografi lapis tipis berfungsi untuk menentukan eluen terbaik yang kemudian digunakan pada fase gerak kromatografi kolom. Hasil ekstraksi yang diperoleh kemudian dikarakterisasi dengan metode kromatografi lapis tipis dengan plat silika G60 F₂₅₄ sebagai fase diam dan campuran pelarut organik sebagai fase gerak (eluen). Penentuan eluen terbaik dilakukan berdasarkan metode (Anggraini & Swantara, 2021).

Fase diam yang digunakan adalah plat silika G60 F₂₅₄ dan campuran pelarut organik sebagai fase gerak (eluen). Pelarut yang digunakan sebagai fase gerak adalah n-heksana : etil asetat dengan perbandingan (7:3) Anggraeni *et al.* (2014). Perbandingan n-heksan : etil asetat (16:4), (17:3), dan (18:2) (Anggraini & Swantara, 2021). Analisis kromatografi lapis tipis dimulai dari persiapan plat silika G60 F₂₅₄ hingga identifikasi noda pada plat G60 F₂₅₄ dan menghitung nilai R_f. Plat silika G60 F₂₅₄ akan menghasilkan noda yang kemudian diamati dengan sinar UV. Noda pada plat silika G60 F₂₅₄ kemudian dilakukan penghitungan nilai R_f dengan menghitung jarak tempuh tiap-tiap noda dan identifikasi warna noda pada plat KLT. Hasil nilai R_f terbaik kemudian dipilih sebagai eluen yang akan digunakan pada kromatografi kolom.

$$R_f \text{ (faktor retensi)} = \frac{\text{jarak yang ditempuh sampel}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$



Gambar 1. Peta Lokasi Titik Sampling

Pemisahan dengan kromatografi kolom dilakukan berdasarkan metode (Madjid *et al.*, 2020). Pemisahan ekstrak kasar metanol *Gracilaria sp.* dilakukan dengan memasukkan kapas steril pada bagian dasar untuk menyumbat corong pemisah yang kemudian ditambahkan silika gel. Silika gel dibuat dengan mengoven 10 g silika gel selama 1 jam pada suhu 105°C. Silika gel kemudian ditambahkan pelarut n-heksana : etil asetat (7:3) sebanyak 20 mL. Pengadukan menggunakan magnetic stirer selama 1 jam dilakukan terhadap silika gel yang telah ditambahkan pelarut. Silika gel lalu dimasukkan ke dalam corong pemisah dengan bagian atas dan bawah telah ditutup dengan plastik wrap selama 24 jam. Sampel sebanyak 0,0732 g dilarutkan dengan 1 mL eluen n-heksana : etil asetat (7:3). Hasil dari kromatografi kolom kemudian ditampung dengan botol vial ukuran 20 mL dan proses ini dilakukan hingga silika gel berwarna bening. Proses kromatografi kolom akan menghasilkan fraksi yang kemudian diukur dengan spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang 420 nm.

Analisis Total Flavonoid

Analisis total flavonoid dilakukan berdasarkan prosedur penelitian Putu dan Husni (2021) yang dimodifikasi yaitu dengan fraksi hasil kolom yang digunakan sebanyak 0,1 mL ditambahkan 3 mL metanol, 0,2 mL kalium asetat, 0,2 mL AlCl₃ 10%, kemudian ditambahkan akuades hingga 10 mL lalu vortex. Larutan kemudian disimpan dalam ruang gelap selama 30 menit. Standar yang digunakan untuk flavonoid adalah kuersetin, pembuatan larutan kuersetin dilakukan dengan menimbang kuersetin sebanyak 10 mg lalu ditambahkan metanol sebanyak 10 mL yang kemudian menjadi larutan 1000 ppm. Larutan 100 ppm dibuat dengan mengambil larutan 1000 ppm sebanyak 1 mL yang kemudian diencerkan dengan metanol sebanyak 10 mL. Pembuatan konsentrasi 10, 20, 30 ppm dilakukan dengan menggunakan larutan 100 ppm, setiap seri konsentrasi kemudian ditambahkan 3 mL metanol, 0,2 mL kalium asetat 1 M, 0,2 mL AlCl₃ 10%, dan akuades hingga volume menjadi 10 mL. Pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 420 nm. Perhitungan total flavonoid dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Total flavonoid QE} = \frac{\text{c.v.faktor pengenceran}}{m}$$

Keterangan: c = kadar flavonoid dari kurva standar (mg/L), v = isi ekstrak (L), m = berat ekstrak (g).

Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH berdasarkan prosedur penelitian Hidayati *et al.* (2020) yang dimodifikasi. Pembuatan larutan DPPH dilakukan dengan menimbang 5 mg kristal DPPH kemudian dilarutkan menggunakan pelarut metanol p.a (50 ppm) sebanyak 100 mL. Pembuatan larutan blanko dilakukan dengan 3,5 mL larutan DPPH ditambahkan dengan 0,5 mL metanol p.a lalu divortex. Larutan blanko kemudian diinkubasi selama 30 menit dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 515 nm. Pembuatan larutan sampel dilakukan dengan membuat larutan stok 1000 ppm dengan memipet 10 mg fraksi hasil kolom, kemudian dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 20, 40, 60, dan 80 ppm yang dicukupkan dengan 5 mL metanol p.a. Pembuatan larutan stok 1000 ppm dilakukan dengan cara menimbang asam askorbat sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dengan metanol p.a dan dihomogenkan yang dicukupkan volumenya hingga 10 mL. Pengenceran dilakukan dengan membuat konsentrasi 20, 40, 60, dan 80 ppm yang dicukupkan dengan 5 mL metanol p.a. Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan memipet larutan sampel sebanyak 0,5 mL dari berbagai konsentrasi kemudian setiap konsentrasi ditambahkan 3,5 mL DPPH lalu di vortex. Larutan campuran dilakukan inkubasi selama 30 menit dalam keadaan gelap. Pengukuran serapan dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 515 nm, hal tersebut dilakukan juga pada larutan pembanding yaitu asam askorbat. Penentuan nilai IC₅₀ dilakukan dengan membuat kurva linear antara konsentrasi larutan uji (sumbu x) dengan persentase peredaman (sumbu y) dari persamaan $y = ax + b$. Rumus perhitungan nilai IC₅₀ yaitu:

$$IC_{50} = \frac{(50 - b)}{a}$$

Keterangan: y = % inhibisi (50), a = intercept (perpotongan garis di sumbu y), b = slope (kemiringan), x = konsentrasi.

Rumus perhitungan persentase inhibisi radikal DPPH adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(A_0 - A_s)}{A_0} \times 100\%$$

Keterangan: A₀ = Absorbansi blanko, A_s = Absorbansi mengandung sampel dan DPPH.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis senyawa biokatif pada penelitian ini dilakukan secara kualitatif, dengan uji yang dilakukan terdiri dari analisis senyawa flavonoid, fenol hidrokuinon, saponin, alkaloid, tanin, steroid, dan triterpenoid. Hasil analisis senyawa bioaktif ekstrak metanol *Gracilaria* sp. dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 menunjukkan hasil analisis kandungan senyawa bioaktif pada ekstrak metanol *Gracilaria* sp. didapatkan terdeteksi senyawa flavonoid dan saponin. Kondisi sampel *Gracilaria* sp. yang digunakan oleh peneliti sebelumnya dalam kondisi basah menjadi salah satu penyebab senyawa bioaktif yang lain tidak terdeteksi. Rohmah *et al.* (2019) menyatakan bentuk dari sampel dapat mempengaruhi hasil kandungan senyawa bioaktif, sampel yang memiliki bentuk serbuk akan lebih mudah larut ketika proses maserasi. Kandungan air yang tinggi pada sampel mempengaruhi keterikatan pelarut dengan senyawa yang di ekstrak. Konsentrasi dari pelarut dan suhu maserasi akan mempengaruhi kandungan senyawa bioaktif suatu sampel.

Ukuran simplisia, metode ekstraksi, polaritas pelarut, perbedaan suhu, kelembapan, intensitas cahaya, dan habitat dapat mempengaruhi kandungan senyawa bioaktif pada rumput laut. Kandungan senyawa bioaktif dan aktivitas antioksidan pada rumput laut juga dapat dipengaruhi oleh proses preparasi sampel (Kurniawan *et al.*, 2019). Arifin dan Ibrahim (2018) menyatakan aktivitas antioksidan pada senyawa flavonoid lebih kuat jika dibandingkan dengan vitamin C dan E sedangkan senyawa saponin berfungsi dalam menghambat radikal bebas. Senyawa golongan fenolik atau polifenol merupakan komponen kimia yang berperan sebagai antioksidan (Gumolung, 2018).

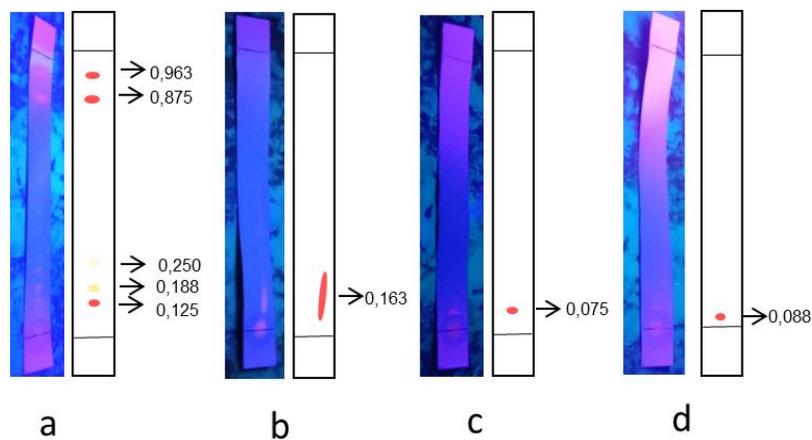
Hasil analisis menggunakan kromatografi lapis tipis pada ekstrak metanol *Gracilaria* sp. didapatkan hasil nilai R_f dan warna noda pada lempeng plat kromatografi lapis tipis. Hasil analisis pemisahan dengan kromatografi lapis tipis dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 2.

Tabel 1. Hasil Analisis Senyawa Bioaktif Ekstrak Metanol *Gracilaria* sp.

Senyawa Bioaktif	Hasil Uji
Alkaloid (pereaksi Dragendrof)	-
Alkaloid (pereaksi Meyer)	-
Alkaloid (pereaksi Wagner)	-
Flavonoid	+
Fenol Hidrokuinon	-
Saponin	+
Steroid	-
Triterpenoid	-
Tanin	-

Tabel 2. Nilai Rf pada Ekstrak Metanol *Gracilaria* sp.

No.	Perbandingan Eluen	Jumlah Spot	Jarak Pelarut (cm)	Jarak Sampel (cm)	Rf (cm)
1.	7:3	5	8	1	0,125
				1,5	0,1875
				2	0,25
				7	0,875
				7,7	0,9625
2.	16:4	1	8	1,3	0,1625
3.	17:3	1	8	0,6	0,075
4.	18:2	1	8	0,7	0,0875

**Gambar 2.** Kromatogram dengan fase gerak n-heksan : etil asetat. Keterangan a= (7:3); b= 16:4; c= 17:3; d = 18:2

Tabel 2 menunjukkan hasil pemisahan ekstrak metanol rumput laut *Gracilaria* sp. dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan eluen n-heksan : etil asetat perbandingan (7:3), (16:4), (17:3), dan (18:2). Hasil pemisahan senyawa terbanyak pada ekstrak metanol rumput laut *Gracilaria* sp. terdapat pada perbandingan (7:3) dengan total terdapat 5 noda pada lempeng plat kromatografi lapis tipis. Perbandingan eluen n-heksana : etil asetat (16:4), (17:3), (18:2) masing-masing hanya didapatkan 1 noda pada lempeng plat kromatografi lapis tipis. Pemisahan yang terjadi disebabkan oleh fase diam dan fase gerak yang mengikat komponen yang ada pada campuran yang akan dipisahkan. Hasil pemisahan dengan kromatografi lapis tipis kemudian digunakan untuk menentukan eluen terbaik yang akan digunakan pada kromatografi kolom. Nilai Rf dan warna noda digunakan untuk mengidentifikasi senyawa yang terkandung (Forestryana & Arnida, 2020). Putri *et al.* (2019) menyatakan prinsip dari pemisahan komponen kimia dengan kromatografi lapis tipis didasarkan oleh fase gerak (pelarut) dan fase diam (lempeng KLT).

Noda yang dihasilkan pada plat kromatografi lapis tipis memiliki jarak yang berbeda, hal tersebut disebabkan oleh komponen kimia pada eluen yang digunakan memiliki daya serap yang berbeda-beda. Kepolaran dari eluen mempengaruhi nilai Rf. Nilai Rf yang meningkat secara signifikan dikarenakan fase diam pada kromatografi lapis tipis memiliki sifat polar dan fase gerak (eluen) yang bersifat non polar atau semi polar (Kapondo *et al.*, 2020). Poncowati *et al.* (2022) menyatakan jika nilai Rf dan warna noda pada plat kromatografi lapis tipis menghasilkan hasil yang sama maka senyawa yang terkandung memiliki karakteristik yang sama atau mirip. Senyawa

polar akan terbawa oleh pelarut polar, senyawa semi polar akan terbawa oleh pelarut semi polar, dan senyawa non polar akan terbawa oleh pelarut non polar. Nilai Rf dapat dipengaruhi oleh jenis eluen, struktur kimia dari senyawa-senyawa yang sedang dipisahkan, jumlah cuplikan, dan sifat dari penyerap.

Pemisahan Ekstrak Metanol *Gracilaria* sp. dengan Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan senyawa dalam jumlah yang lebih banyak dibandingkan dengan penggunaan kromatografi lapis tipis. Hasil pemisahan ekstrak metanol *Gracilaria* sp. dengan kromatografi kolom dapat dilihat pada Tabel 3.

Hasil pemisahan ekstrak metanol rumput laut *Gracilaria* sp. didapatkan total 9 fraksi. Hasil dari fraksi pemisahan ekstrak metanol rumput laut *Gracilaria* sp. kemudian dilakukan penentuan serapan maksimal dengan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 420 nm. Hasil yang didapat dari total 9 fraksi, nilai absorbansi pada fraksi 1 memiliki nilai tertinggi yaitu 0,2919. Mukharomah *et al.* (2018) menyatakan nilai absorbansi pada sampel bergantung oleh kandungan senyawa pada sampel. Nilai absorbansi akan berbanding lurus dengan konsentrasi senyawa yang terdapat pada sampel. Purnamasari *et al.* (2022) menjelaskan bahwa senyawa bioaktif dapat menunjukkan pita serapan kuat pada daerah UV-Vis dan memiliki sistem aromatis yang berikatan. Nilai absorbansi akan berbanding lurus dengan senyawa yang terkandung, semakin tinggi kadar senyawa yang terkandung maka penyerapan molekul-molekul oleh cahaya panjang gelombang semakin banyak sehingga nilai absorbansi akan semakin besar. Hasil kromatografi kolom dipengaruhi oleh dimensi kolom, kekentalan cairan dan tekanan yang digunakan ketika mengalirkan zat pelarut, dan partikel gel silika.

Pelarut yang digunakan didasarkan pada hasil uji pendahuluan menggunakan metode kromatografi lapis tipis dengan penggunaan variasi pelarut tingkat kepolaran yang berbeda yaitu, etil asetat dan n-heksana. Pemilihan pelarut dilakukan agar senyawa yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda akan terekstrak pada pelarut yang sesuai. Keumala *et al.* (2021) menyatakan tingkat pemisahan senyawa pada proses kromatografi kolom dipengaruhi oleh polaritas pelarut. Pelarut dengan sifat polar akan mengekstrak komponen gula sedangkan pelarut semi polar dan non polar akan mengekstrak metabolit sekunder.

Total Flavonoid

Analisis total flavonoid dilakukan untuk mengkorelasikan dengan hasil aktivitas antioksidan. Analisis total flavonoid dilakukan dengan mencari persamaan regresi dari standar kuarsetin. Persamaan standar kuarsetin kemudian digunakan untuk mencari konsentrasi dari sampel. Hasil analisis total flavonoid dapat dilihat pada tabel 4 dengan pembanding kuarsetin. Total flavonoid yang didapatkan dari ekstrak methanol *Gracilaria* sp. yang sudah dipisahkan menggunakan kromatografi kolom yaitu sebesar 12,456 mg QE/g.

Tabel 3. Hasil Pengukuran Fraksi Kromatografi Kolom

Fraksi	Absorbansi
1	0,2919
2	0,1617
3	0,0953
4	0,0701
5	0,0560
6	0,0491
7	0,0508
8	0,0507
9	0,0442

Tabel 4 menunjukkan hasil absorbansi dari kuersetin masing-masing konsentrasi. Nilai konsentrasi dan absorbansi tersebut kemudian dibuat kurva grafik standar kuersetin dengan persamaan $y = ax + b$. Persamaan regresi $y = 0,0004x + 0,0083$ didapatkan dari kurva grafik standar kuersetin dengan nilai R^2 atau koefisien korelasi yang didapatkan sebesar 0,9876. Nilai linearitas tersebut menunjukkan adanya korelasi antara konsentrasi dengan absorbansi yang dihasilkan, dikarenakan nilai R^2 mendekati angka 1. Grafik standar kuersetin dapat dilihat pada gambar 3.

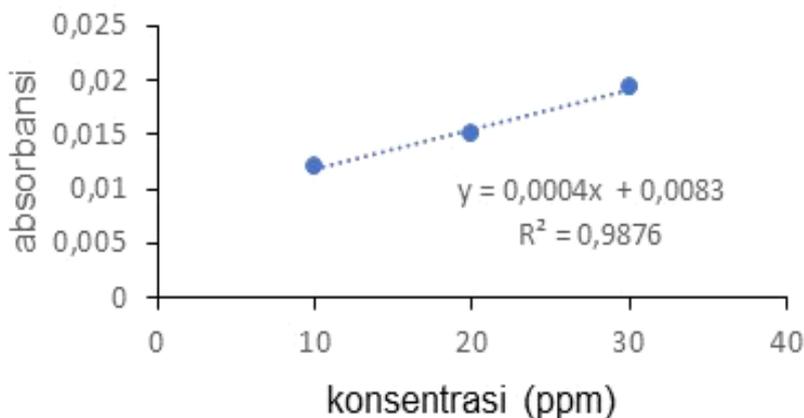
Tabel 5 menunjukkan hasil kandungan total flavonoid hasil kromatografi kolom. Hasil analisis total flavonoid didapatkan persamaan regresi linier, berasal dari standar kuersetin yaitu $y = ax + b$ yang digunakan untuk mengukur total Flavonoid. Kandungan total flavonoid akan mempengaruhi kemampuan antioksidan sampel. Diachanty *et al.* (2017) menjelaskan bahwa senyawa flavonoid berperan sebagai senyawa pendukung aktivitas antioksidan, korelasi tersebut dapat dilihat pada nilai IC_{50} . Kemampuan antioksidan diperoleh dari gugus hidroksil pada senyawa fenolik dan flavonoid, senyawa lain yang berpotensi sebagai antioksidan pada *Gracilaria* sp. adalah kandungan pigmen. Nur *et al.* (2019) mengemukakan bahwa tingginya total fenol dan flavonoid maka kemampuan aktivitas antioksidan yang dimiliki juga semakin tinggi. Jumlah dan lokasi gugus -OH yang berperan dalam menetralkan radikal bebas dapat mempengaruhi aktivitas flavonoid. Kemampuannya dalam mendonorkan elektron berhubungan dengan total flavonoid. Senyawa flavonoid merupakan salah satu sumber senyawa antioksidan, senyawa flavonoid tergolong dalam golongan senyawa fenolik yaitu senyawa yang bersifat antioksidan kuat.

Aktivitas Antiosidan

Aktivitas antioksidan pada fraksi 1 hasil kromatografi kolom dilakukan pengukuran dengan metode DPPH. Tabel 7 menunjukkan hasil aktivitas antioksidan IC_{50} dari asam askorbat didapatkan sebesar 19,85 ppm sedangkan pada fraksi 1 hasil kromatografi kolom didapatkan nilai IC_{50} sebesar 219,17 ppm. Nilai IC_{50} yang didapat masih tergolong lemah jika dibandingkan dengan asam askorbat, lemahnya nilai tersebut dapat disebabkan beberapa faktor. Sianipar *et al.* (2022) menyatakan faktor lemahnya nilai IC_{50} dapat dipengaruhi oleh ukuran sampel, usia sampel,

Tabel 4. Nilai Absorbansi Larutan Baku Kuersetin

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Persamaan Regresi
10	0,0121	$y = 0,004x + 0,0083$
20	0,0150	
30	0,0193	



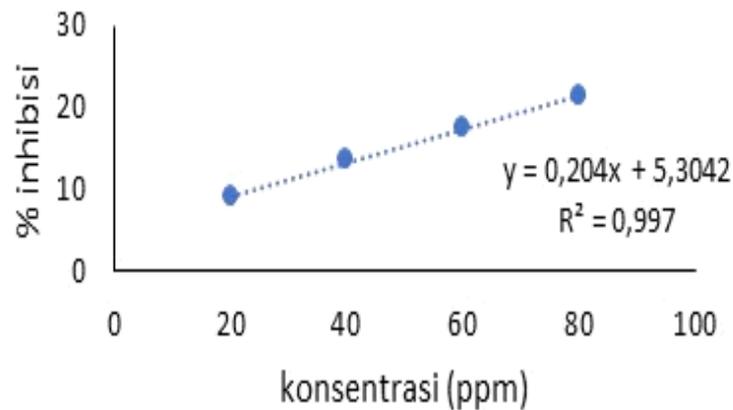
Gambar 3. Grafik Standar Kuersetin

Tabel 5. Total Flavonoid Fraksi 1 Hasil Kromatografi Kolom

Ulangan	Absorbansi	Konsentrasi Sampel (ppm)	Kandungan Flavonoid (mg QE/g)	Rata rata Kandungan Flavonoid (mg QE/g)
1	0,2518	608,75	16,632	12,456
2	0,1577	373,50	10,204	
3	0,1625	385,50	10,532	

Tabel 6. Persen inhibisi fraksi 1 hasil kromatografi kolom dan asam askorbat

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi		% inhibisi
		Blanko	Sampel	
Asam askorbat	2	1,989	1,7344	12,8004
	4		1,6779	15,6410
	6		1,5709	21,0206
	8		1,4901	25,0829
Fraksi 1 (I)	20	1,989	1,8489	7,0437
	40		1,7863	10,1910
	60		1,7119	13,9316
	80		1,6167	18,7179
Fraksi 1 (II)	20	2,0049	1,9995	0,2693
	40		1,8564	7,4068
	60		1,7550	12,4644
	80		1,6581	17,2976
Fraksi 1 (III)	20	1,989	1,8077	9,1151
	40		1,7147	13,7908
	60		1,6368	17,7073
	80		1,5631	21,4127



Gambar 4. Grafik hubungan % inhibisi dan konsentrasi fraksi 1 kromatografi kolom

metode ekstraksi, dan pelarut yang digunakan. Nilai IC₅₀ pada sampel ekstrak tanaman didapatkan hasil yang lebih rendah dibandingkan pada bentuk isolat murni, disebabkan ekstrak memiliki

senyawa lain yang dapat ikut bereaksi dan mempengaruhi aktivitas antioksidannya. Rompas dan Gasah (2022) menyatakan suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat jika memiliki nilai $IC_{50} < 50$ ppm, IC_{50} kuat bernilai 50 - 100 ppm, IC_{50} sedang bernilai 100 - 150 ppm, IC_{50} lemah bernilai 151 - 200 ppm, dan nilai $IC_{50} > 200$ ppm sangat lemah. Meskipun tergolong lemah rumput laut *Gracilaria* sp. memiliki potensi sebagai antioksidan.

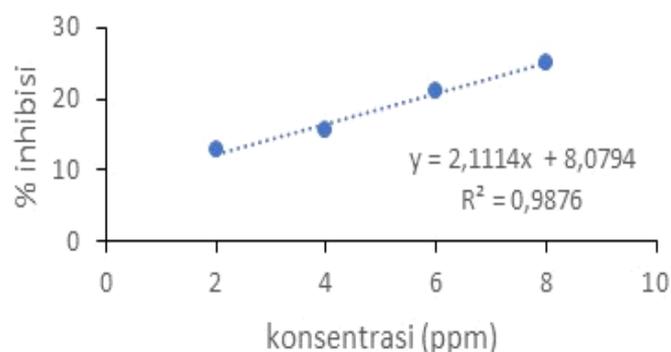
Nilai IC_{50} yang didapatkan lebih baik dari penelitian sebelumnya, pada penelitian Insani *et al.* (2022) nilai IC_{50} ekstrak metanol *Gracilaria* sp. sebesar 308,19 ppm. Sudarwati (2021) menyatakan kromatografi kolom merupakan metode yang digunakan untuk memurnikan bahan kimia tunggal dari campurannya. Kromatografi kolom dapat memisahkan senyawa menjadi senyawa tunggal. Proses pemisahan senyawa terjadi ketika sampel yang dimasukkan dalam kolom akan dibawa oleh fase gerak kemudian terjadi interaksi antara sampel dengan fase diam.

Aktivitas antioksidan dapat dipengaruhi oleh lama penyimpanan sampel, Khotimah *et al.* (2018) menyatakan penurunan aktivitas antioksidan terjadi pada hari ke-14 penyimpanan hal tersebut disebabkan oleh senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada ekstrak yang berperan sebagai antioksidan mulai tidak stabil. Aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh kandungan fitokimia yang terdapat pada sampel. Penelitian yang dilakukan Afgatiani *et al.* (2020) pada rumput laut *Sargassum hystrix* didapatkan hasil aktivitas antioksidan mengalami penurunan setelah penyimpanan pada minggu ke-8, penurunan tersebut disebabkan oleh ketidakstabilan dalam senyawa yang berfungsi sebagai senyawa antioksidan. Julyasih (2022) menyebutkan bahwa kandungan senyawa fitokimia dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti spesies rumput laut, proses penyimpanan dan pengolahan, suhu, dan iklim.

Gambar 4 menunjukkan grafik hubungan antara persen inhibisi dengan konsentrasi fraksi hasil kromatografi kolom. Grafik hubungan tersebut didapatkan persamaan $y = 0,204x + 5,3042$ dengan nilai R^2 sebesar 0,997. Nilai R^2 menunjukkan hubungan korelasi yang baik dikarenakan nilai mendekati 1, sedangkan x menunjukkan nilai IC_{50} dengan nilai y adalah 50. Grafik tersebut menunjukkan nilai konsentrasi berbanding lurus dengan persentase inhibisi. Gambar 5 menunjukkan grafik hubungan antara persen inhibisi dengan konsentrasi asam askorbat didapatkan persamaan $y = 0,2111x + 8,0794$ dengan nilai R^2 sebesar 0,9876. Nilai R^2 menunjukkan hubungan korelasi yang baik dikarenakan nilai mendekati 1, sedangkan x menunjukkan nilai IC_{50} dengan nilai y adalah 50. Grafik tersebut menunjukkan nilai konsentrasi berbanding lurus dengan persentase inhibisi.

Tabel 7. Aktivitas antioksidan pada asam askorbat dan fraksi 1 kromatografi kolom

Sampel	Aktivitas Antioksidan IC_{50} (ppm)
Asam askorbat	19,85
Fraksi 1	219,17



Gambar 5. Grafik hubungan % inhibisi dan konsentrasi asam askorbat

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa hasil analisis secara kualitatif senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak metanol *Gracilaria* sp. adalah flavonoid dan saponin. Eluen terbaik pemisahan senyawa menggunakan n-heksan:etil asetat dengan perbandingan 7:3 dan didapatkan total flavonoid pada fraksi 1 hasil kromatografi kolom pada ekstrak metanol *Gracilaria* sp. yaitu 12,456 mg QE/g. Aktivitas antioksidan pada fraksi 1 didapatkan nilai IC₅₀ sebesar 219,17 ppm dan lebih lemah jika dibandingkan dengan asam askorbat sebesar 19,85 ppm. Rumput laut *Gracilaria* sp. dari perairan Madura berpotensi dikembangkan sebagai kandidat antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Afgatiani, P.M., Husni, A., & Budhiyanti, S.A. 2020. Aktivitas antioksidan bubuk *Sargassum hystrix* selama penyimpanan pada suhu berbeda. *AgriTECH*, 40(3): p.175. DOI: 10.22146/agritech.18134
- Ambarwati, N., & Nasution, N.E. 2023. Pemurnian fraksi ekstrak etil asetat jamur endofit *Aspergillus salwaensis*. *Farmasis: Jurnal Sains Farmasi*, 4(1): 7-12.
- Anggraeni, O.N., Fasya, A.G., & Hanapi, A. 2014. Uji aktivitas antioksidan fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter, dan n-heksana hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp. *Alchemy*, 3(1): 173-188. DOI:10.18860/al.v0i1.2911
- Anggraini, M., & Swantara, I.M.D. 2021. Toksisitas ekstrak dan isolat rumput laut *Euचेuma spinosum*. *Cakra Kimia*, 9(1):35–41.
- Arifin, B., & Ibrahim, S. 2018. Struktur, bioaktivitas dan antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*, 6(1): 21–29. DOI:10.31629/zarah.v6i1.313
- Diachanty, S., Nurjanah, N., & Abdullah, A. 2017. Antioxidant activities of various brown seaweeds from Seribu Islands. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 20(2): p.305. DOI: 10.17844/jphpi.v20i2.18013
- Emilda, E., & Delfira, N. 2023. Pemanfaatan silika gel 70-230 mesh bekas sebagai pengganti fase diam kromatografi kolom pada praktikum kimia organik. *Indonesian Journal of Laboratory*, 1(1) 45-51. DOI:10.22146/ijl.v1i1.82006
- Fasya, A.G., Tyas, A.P., Mubarakah, F.A., Ningsih, R., & Madjid, A.D.R. 2018. Variasi diameter kolom dan rasio sampel-silika pada isolasi steroid dan triterpenoid alga merah *Euचेuma cottonii* dengan kromatografi kolom basah. *Alchemy*, 6(2): 57-64. DOI:10.18860/al.v6i2.7015
- Forestryana, D., & Arnida, A. 2020. Skrining fitokimia dan analisis kromatografi lapis tipis ekstrak etanol daun jeruju (*Hydrolea ppinosa* L.). *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*, 11(2): 113-124. DOI:10.52434/jfb.v11i2.859
- Gumolung, D. 2018. Analisis kandungan total fenolik pada jonjot buah labu kuning (*Cucurbita moschata*). *Fullerene Journal of Chemistry*, 3(1): 1-4. DOI:10.37033/fjc.v3i1.25
- Harahap, A., Pramesti, R., & Ridlo, A. 2022. Pertumbuhan rumput laut *Gracilaria* sp. terhadap variasi dosis media walne. *Journal of Marine Research*, 11(3): 557–566.
- Hidayati, J., Yudiati, E., Pringgenies, D., Oktaviyanti, D.T., & Kusuma, A.P. 2020. Comparative study on antioxidant activities, total phenolic compound and pigment contents of tropical *Spirulina platensis*, *Gracilaria arcuata* and *Ulva lactuca* extracted in different solvents polarity. *E3S Web of Conferences*, 147: p.03012. DOI:10.1051/e3sconf/202014703012
- Insani, A.Y., Hafiludin, & Chandra, A.B. 2022. Pemanfaatan ekstrak *Gracilaria* sp. dari perairan Pamekasan sebagai antioksidan. *Jurnal Kelautan*, 3(1): 16–25.
- 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. DOI:10.29303/jp.v12i3.363
- Kapondo, G.L., Fatimawali, & Jayanti, M. 2020. Isolasi identifikasi senyawa alkaloid dan uji efektivitas penghambatan dari ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *Jurnal E-Biomedik*, 8(2):180–186. DOI:10.35790/ebm.v8i2.28999

- Keumala, T., Sukmiwati, M., & Diharmi, A. 2021. Fraksi aktif rumput laut coklat *Sargassum cinereum*. *Berkala Perikanan Terubuk*, 49(3): 1363–1369.
- Khotimah, H., Agustina, R., & Ardana, M. 2018. Pengaruh lama penyimpanan terhadap aktivitas antioksidan ekstrak daun miana (*Coleus atropurpureus L. Benth*). *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*, 8: 1–7. DOI:10.25026/mpc.v8i1.295
- Kurniawan, R., Nurjanah, Jacob, M.A., Abdullah, A., & Pertiwi, R.M. 2019. Karakteristik garam fungsional dari rumput laut hijau *Ulva lactuca*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 22(3): 573–580.
- Lantah, P.L., Montolalu, L.A., & Reo, A.R. 2017. Kandungan fitokimia dan aktivitas antioksidan ekstrak metanol rumput laut *Kappaphycus alvarezii*. *Media Teknologi Hasil Perikanan*, 5(3): 73-79. DOI:10.35800/mthp.5.3.2017.16785
- Leandro, A., Monteiro, P., Pacheco, D., Figueirinha, A., Gonçalves, A. M. M., Jorge, G., & Pereira, L. (2020). *Seaweed phenolics: from extraction to applications*. *Marine Drugs*, 18(8): 1–47.
- Madjid, A.D.R., Rahmawati, D.A., & Fasya, A.G. 2020. Variasi komposisi eluen pada isolasi steroid dan triterpenoid alga merah *Eucheuma cottonii* dengan kromatografi kolom basah. *Alchemy*, 8(1): 35–40. DOI:10.18860/al.v8i1.10040
- Maghfuroh, N., & Hafiludin, H. (2024). Potensi bubuk Rumput Laut (*Eucheuma cottonii*) sebagai body lotion anti radikal bebas sinar ultra violet. *Journal of Marine Research*, 13(4): 753–764.
- Mukharomah, A.H., Putri, U.S., & Sulistyningtyas, A.R. 2018. Pengaruh konsentrasi pelarut etanol terhadap absorbansi brazilin pada simplisia kayu secang (*Caesalpinia sappan L.*). *Prosiding Seminar Nasional Mahasiswa Unimus*, 1: 283–288.
- Nur, S., Sami, F.J., Awaluddin, A., & Afsari, M.I.A. 2019. Korelasi antara kadar total flavonoid dan fenolik dari ekstrak dan fraksi daun jati putih (*Gmelina Arborea Roxb.*) terhadap aktivitas antioksidan. *Jurnal Farmasi Galenika*, 5(1): 33–42. DOI:10.22487/j24428744.2019.v5.i1.12034
- Nurjannah, A, Mardiono, J., Enti, B., & Seulale, V. 2020. Karakteristik bubuk rumput laut *Gracilaria verrucosa* dan *Turbinaria conoides* sebagai bahan baku body lotion. *Jurnal Akuatek*, 1(2): 73–83.
- Poncowati, S., Soenardjo, N., Taufiq-spj, N., & Sibero, M.T. 2022. Profil senyawa metabolit sekunder ekstrak daun mangrove *Lumnitzera racemosa* asal perairan Teluk awur Jepara. *Journal of Marine Research*, 11(4): 794–804.
- Purnamasari, A., Zelviani, S., Sahara, S., & Fuadi, N. 2022. Analisis nilai absorbansi kadar flavonoid tanaman herbal menggunakan spektrofotometer uv-vis. *Teknosains: Media Informasi Sains Dan Teknologi*, 16(1): 57–64. DOI:10.24252/teknosains.v16i1.24185
- Purwaningsih, S., & Deskawati, E. 2021. Karakteristik dan aktivitas antioksidan rumput laut *Gracilaria* sp. asal Banten. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 23(3): 503–512. DOI:10.17844/jphpi.v23i3.32808
- Putri, A.H., Putriyana, R.S., & Silviani, N. 2019. Isolasi dan ekstraksi kelompok senyawa flavonoid dari ekstrak daun cocor bebek (*Kalanchoe pinnata*). *Fullerene Journal of Chemistry*, 4(2): 28. DOI:10.37033/fjc.v4i2.52
- Putu T.H.K., & Husni, A. 2021. Pengaruh suhu ekstraksi terhadap aktivitas antioksidan ekstrak metanolik *Eucheuma spinosum*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 24(1): 1–10. DOI:10.17844/jphpi.v24i1.34193
- Rohmah, J., Rini, C.S., & Wulandari, F.E. 2019. Aktivitas sitotoksik ekstrak selada merah (*Lactuca sativa var. Crispa*) pada berbagai pelarut ekstraksi. *Jurnal Kimia Riset*, 4(1): 18-23. DOI:10.20473/jkr.v4i1.13066
- Rompas, I.F., & Gasah, O. 2022. Efektifitas ekstrak rumput laut hijau (*Ulva Lactuca*) terhadap aktivitas antioksidan sebagai sumber pangan berkelanjutan. *Jurnal Pendidikan Biologi*, 7(3): 172–189.
- Sanger, G., Dotulong, V., & Damongilala, L.J. 2022. Isolasi asam lemak dan kadar pigmen rumput laut coklat *Sargassum crassifolium* sebagai sumber antioksidan alami. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 25(3): 475–493. DOI:10.17844/jphpi.v25i3.43033
- Sari, N.I., Diharmi, A., Sidauruk, S.W., & Sinurat, F.M. 2022. Identifikasi komponen bioaktif dan aktivitas ekstrak rumput laut merah (*Eucheuma spinosum*). *Jurnal Teknologi Dan Industri Pertanian Indonesia*, 14(1): 9–15. DOI:10.17969/jtipi.v14i1.18862

- Sianipar, E.A., Satriawan, N., Sumartono, J., & Kambira, P.F.A. 2022. Pengujian aktivitas antioksidan makro alga Sumbawa dalam hubungannya dengan kandungan senyawa bioaktif dan efek farmakologi. *Jurnal Riset Kesehatan Nasional*, 6(2): 151–157. DOI:10.37294/jrkn.v6i2.457
- 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): 287-291. DOI:10.35800/mthp.6.3.2018.21259
- Sudarwati, T.P.L. 2021. Uji antimikroba fraksi III daun kratom (*Mitragyna speciosa*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Komunitas Farmasi Nasional*, 2(2): 163–173.
- Syafitri, T., Hafiludin, H., & Chandra, B.A. 2022. Pemanfaatan ekstrak rumput laut (*Eucheuma cottonii*) dari perairan Sumenep sebagai antioksidan. *Jurnal Kelautan*, 15(2):160–168.
- Tania, I.D., & Hafiludin, H. 2023. Pengaruh media perendaman dan ukuran partikel terhadap karakteristik kimia rumput laut (*Eucheuma cottonii*) dari perairan Sumenep Madura. *Journal of Marine Research*, 12(4): 613–622. DOI:10.14710/jmr.v12i4.37072
- Wakhidah, L., & Anggarani, M.A. 2021. Analisis senyawa bioaktif dan aktivitas antioksidan ekstrak bawang putih (*Allium Sativum* L.) Probolinggo. *Unesa Journal of Chemistry*, 10(3): 356–366. DOI:10.26740/ujc.v10n3.p356-366