

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sumber daya alam laut merupakan sumber pangan yang sangat melimpah karena didukung oleh kondisi perairan Indonesia (Handayani, *et al.*, 2004). Salah satu sumber daya tersebut adalah alga. Berdasarkan kandungan pigmen yang terdapat dalam daun dan *thallus*, alga dapat digolongkan menjadi alga hijau (*Chlorophyceae*), alga merah (*Rhodophyceae*) dan alga coklat (*Phaeophyceae*) (Susanto, 2008). Alga coklat mempunyai kelimpahan dan sebaran yang sangat tinggi, terdapat hampir di seluruh wilayah laut Indonesia (Handayani, *et al.*, 2004) yakni antara lain di Kepulauan Seribu, Pulau Komodo, Pulau Lombok dan Pulau Ternate (Indriani dan Sumarsih, 1992). Pada umumnya, alga coklat telah dimanfaatkan sebagai sumber alginat namun pigmen yang terdapat pada alga coklat hingga saat ini belum dimanfaatkan secara optimal (Bachtiar, 2007). Secara taksonomi alga coklat diklasifikasikan dalam divisi *Phaeophyta* dengan ciri khas warna coklat pada seluruh bagian *thallus*. Warna ini disebabkan oleh adanya pigmen fukosantin yang dikandungnya (Nurdiana dan Limantara, 2008).

Pigmen yang terdapat pada alga coklat hingga saat ini belum banyak dimanfaatkan. Pigmen merupakan molekul khusus yang dapat memunculkan warna dan mampu menyerap cahaya matahari dengan menyerap dan memantulkannya pada panjang gelombang tertentu (Prangdimurti, 2007). Alga coklat mengandung pigmen klorofil (klorofil a dan klorofil c) dan kaya akan pigmen karotenoid (fukosantin, β -karoten) (Goodwin, 1974 dalam Atmadja *et al.*, 1996). Ditambahkan oleh Pangestuti *et al.*, (2007), fukosantin merupakan pigmen dominan yang dimiliki alga coklat yang memberikan warna coklat pada seluruh bagian *thallus*. Pigmen klorofil terdapat

dalam kloroplas bersama-sama dengan karotenoid dan santofil (Anis, 2008). Ditambahkan oleh Rahayu dan Limantara (2005), sebagian besar pigmen terdapat dalam daun dan terdapat dalam jumlah terbatas dan dapat diperoleh dengan cara ekstraksi bahan-bahan alami seperti akar, batang, dan daun.

Fukosantin merupakan karotenoid yang utama pada alga coklat dimana produksi terbesar terjadi di seluruh jaringan fotosintesis alga (Syahputra dan Limantara, 2007). Ditambahkan oleh Chen (2008), fotosintesis ini terjadi di dalam kloroplas. Fukosantin berperan sebagai pigmen pelengkap pada reaksi fotosintesis dan menyebabkan *phaeophyta* berwarna coklat. Fukosantin dapat menyerap warna biru-hijau dan melewatkannya ke klorofil untuk proses fotosintesis (Pangestuti, *et al.*, 2007). Ditambahkan oleh Nurcahyanti dan Timotius (2007), fukosantin berwarna oranye dan termasuk kelompok santofil dari karotenoid.

Sifat fukosantin adalah labil terhadap basa, sehingga apabila mengekstraksi pigmen tersebut, lingkungan basa harus dihindari (Nurcahyanti dan Timotius, 2007). Hal ini sesuai dengan pendapat Lydia dkk, 2001, pada penelitian pigmen antosianin, kondisi pH (3,4,5) sangat mempengaruhi intensitas warna, seperti pada zat warna kulit rambutan. Semakin rendah nilai pH maka warna konsentrat makin merah dan stabil atau jika pH semakin mendekati satu maka warna semakin stabil (Shamsudin dan Khoirudin, 2008). Ditambahkan oleh Shi *et al.*, (1992), menyatakan bahwa di dalam larutan dengan pH rendah (asam) pigmen akan berwarna merah tua dan pada pH tinggi akan mulai terjadi perubahan warna menjadi tidak berwarna.

Pemanfaatan pigmen di bidang pangan perlu diketahui berbagai kondisi lingkungan yang dapat menjaga stabilitas pigmen, baik warna maupun sifat kimianya, kestabilan pigmen salah satunya dipengaruhi oleh suhu (Pratiwi *et al.*, 2007). Ditambahkan oleh (Tranggono dan Sutardi, 1990), sebagian besar pigmen

dalam jaringan tanaman mengalami perubahan selama penyimpanan dan pengolahan. Pigmen tidak stabil dalam larutan netral, basa bahkan dalam larutan asam warnanya dapat memudar perlahan-lahan akibat terkena cahaya sehingga larutannya harus disimpan di tempat gelap serta didinginkan (Harbone,1996).

Oleh karena itu pada penelitian ini diharapkan akan mengetahui karakteristik fukosantin pada alga coklat dilihat dari tingkat degradasi dan intensitas warna yang terbentuk. Pada penambahan variasi pH (3,4,5 dan 7) serta pada kondisi simpan yang berbeda (suhu freezer, suhu dingin dan suhu kamar) selama 6 hari yang dapat memberi informasi dan membantu pengembangan serta pemanfaatannya ke depan.

1.2 Rumusan Masalah

Alga yang dapat dimanfaatkan adalah alga coklat (*phaeophyta*). Alga ini mempunyai kelimpahan yang sangat tinggi, namun pigmen yang terkandung didalamnya belum dimanfaatkan secara optimal (Handayani, *et al.*, 2004). Pigmen merupakan molekul khusus yang dapat memunculkan warna dan mampu menyerap cahaya matahari dan memantulkannya pada panjang gelombang tertentu. Stabilitas warna dari zat warna dipengaruhi oleh cahaya, pH, suhu dan lain-lain (Prangdimurti *et al.*, 2007). Ditambahkan oleh Pratiwi *et al.*, (2007), pada pemanfaatan pigmen di bidang pangan perlu diketahui berbagai kondisi lingkungan yang dapat menjaga stabilitas pigmen, baik warna maupun sifat kimianya, kestabilan pigmen salah satunya dipengaruhi oleh suhu.

Salah satu komponen penting yang mempengaruhi kestabilan fukosantin dan dalam aplikasinya adalah tingkat (kondisi) keasaman (pH) dan kondisi simpan yang berbeda. Dengan demikian karakterisasi fukosantin *Sargassum filipendula* terhadap tingkat (kondisi) keasaman (pH) dan kondisi simpan yang berbeda sangat penting untuk dipahami. Namun sejauh ini penelitian mengenai

kestabilan fukosantin *Sargassum filipendula* terhadap tingkat (kondisi) keasaman (pH) dan kondisi simpan yang berbeda belum banyak dilakukan. Penelitian sebelumnya untuk penambahan variasi pH 3,4 dan 5 hanya dilakukan pada pigmen antosianin serta untuk penelitian kondisi simpan pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan (Eva, 2009), pada suhu 4°C, 25°C dan 50°C hanya dilakukan pada pigmen *crude* fukosantin (pigmen fukosantin belum mengalami pemurnian).

Oleh karena itu pada penelitian ini akan dilakukan karakterisasi fukosantin *Sargassum filipendula* terhadap tingkat (kondisi) keasaman (pH) dan kondisi simpan yang berbeda. Pada kondisi pengujian untuk pH yaitu pada penambahan buffer pH 3, 4, 5 diasumsikan pada tingkat keasaman yang berbeda, sedangkan buffer 7 (netral) diasumsikan mendekati basa. Kondisi pengujian untuk kondisi simpan yang berbeda yaitu pada suhu freezer $\pm (-5^{\circ}\text{C})$, suhu dingin $\pm (5^{\circ}\text{C})$ dan suhu kamar $\pm (25^{\circ}\text{C})$ diasumsikan sama dengan kondisi penyimpanan sebelum pengolahan pigmen sebagai fungsional food, pengolahan menjadi obat maupun suplemen makanan.

Berdasarkan uraian diatas maka perlu diketahui karakterisasi fukosantin dari *Sargassum filipendula* terhadap tingkat (kondisi) keasaman (pH) dan kondisi simpan yang berbeda sehingga diketahui apakah terjadi kerusakan (degradasi) pada pigmen tersebut.

Berdasarkan uraian diatas maka didapatkan permasalahan :

- Bagaimanakah penambahan variasi pH (3 ,4, 5, 7) terhadap stabilitas pigmen fukosantin *Sargassum filipendula*
- Bagaimanakah kondisi penyimpanan pada suhu freezer, dingin dan suhu ruang selama 6 hari terhadap stabilitas pigmen fukosantin *Sargassum filipendula*

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

- Untuk mengetahui stabilitas pigmen fukosantin *Sargassum filipendula* pada penambahan variasi pH.
- Untuk mengetahui stabilitas pigmen fukosantin *Sargassum filipendula* pada kondisi simpan yang berbeda.

1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat, lembaga maupun institusi lain mengenai tingkat keasaman (pH) dan kondisi simpan pigmen fukosantin *Sargassum filipendula* yang terbaik sehingga dapat dimanfaatkan lebih lanjut.

1.5 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Universitas Muhamadiyah Malang (UMM) dan Laboratorium Kimia Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Mei sampai Juli 2010.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga Coklat

Rumput laut atau alga atau seaweed termasuk tumbuhan berthallus yang banyak dijumpai hampir di seluruh perairan Indonesia. Rumput laut dibagi menjadi 3 kelas berdasarkan pigmen pembawanya, yaitu : *Rhodophyta* (alga merah), *Phaeophyta* (alga coklat), dan *Chlorophyta* (alga hijau). Rumput laut umumnya tumbuh melekat pada suatu substrat. Rumput laut ada yang berbentuk bola kecil, lembaran, rumpun atau tegakan yang beraneka ragam warna seperti coklat, merah, hijau, dan warna lainnya. Rumput laut termasuk kelompok alga yang berukuran besar, dapat terlihat dengan mata biasa tanpa alat pembesar dan tumbuh atau menempel pada substrat di perairan laut. Pengelompokan rumput laut didasarkan pada perbedaan kandungan pigmennya (Susanto, 2008).

Alga coklat hidup melekat pada batu atau bongkahan karang dan dapat terlepas dari substratnya karena ombak besar dan hanyut ke permukaan laut atau terdampar di atas permukaan pantai (Yunizal, 1999). Alga coklat memiliki pigmen dominan fukosantin yang dapat memberikan warna coklat. Alga coklat berbentuk benang atau lembaran, bahkan ada yang menyerupai tumbuhan tingkat tinggi dengan bagian-bagian serupa akar, batang, dan daun. *Phaeophyta* mempunyai peranan penting bagi kehidupan manusia diantaranya : sebagai bahan makanan, penghasil alginat, pewarna alami, bahan kosmetik, dan farmasi. Habitat alga coklat tumbuh di perairan pada kedalaman 0,5 – 10 m ada arus dan ombak. Alga coklat hidup di daerah perairan yang jernih yang mempunyai substrat dasar batu karang dan dapat tumbuh subur pada daerah tropis, suhu perairan 27,25°C – 29,30°C dan salinitas 32 – 33,5% (Atmadja, 2007).

Sargassum filipendula memiliki thallus yang berbentuk silinder atau gepeng, tumbuh dan berkembang pada substrat dasar yang kuat, berukuran relatif besar, cabangnya rimbun menyerupai pohon, bentuk daun melebar, lonjong seperti pedang, mempunyai gelembung udara yang umumnya soliter, panjangnya mencapai 7 meter (di Indonesia terdapat spesies yang penjangnya 3 meter), dan warna thallus umumnya coklat. *Sargassum filipendula* melekat pada batu karang dan dapat terlepas dari substratnya apabila terkena ombak besar dan hanyut di permukaan laut (Anonymous, 2008). *Sargassum filipendula* dapat dilihat pada Gambar 1 dan klasifikasi *Sargassum filipendula* adalah sebagai berikut Anonymous^a (2009):

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Phaeophyta
Class	: Phaeophyceae
Ordo	: Fucales
Family	: Sargassaceae
Genus	: Sargassum
Spesies	: <i>Sargassum filipendula</i>



Gambar 1. *Sargassum filipendula*

2.2 Komposisi Alga Coklat

Alga coklat memiliki dinding sel yang terdiri atas selulosa dan polisakarida (Ensiklopedia, 2009). Menurut Eva (2008), alga coklat mengandung cadangan makanan berupa laminarin, selulosa, alginat dan banyak mengandung iodium. Alga coklat juga menghasilkan algin, laminaria, fukoidan, selulosa dan manitol (Kadi, 1989). Selain itu, alga coklat mengandung pigmen fotosintesis seperti klorofil a, c, dan kaya akan karotenoid khususnya fukosantin, beta karoten dan violasantin (Nurchayanti dan Limantara, 2007). Komposisi kimia alga coklat dan kandungan mineral alga coklat dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Komposisi Kimia Alga Coklat

Komposisi Kimia	Jumlah (%)
Karbohidrat	19,06
Protein	5,53
Lemak	0,74
Air	11,71
Abu	34,57
Serat kasar	28,39

Sumber : Yunizal (1999)

Tabel 2. Jenis dan Kandungan Mineral Pada Alga Coklat

Unsur	Kisaran Kandungan (%) Berat Kering Alga Coklat
Chlor	9,8-15,0
Kalium	6,4-7,8
Natrium	2,6-3,8
Magnesium	1,0-1,9
Belerang	0,7-2,1
Silikon	0,5-0,6
Fosfor	0,3-0,6
Kalsium	0,2-0,3
Besi	0,1-0,2
Iod	0,1-0,8
Brom	0,03-0,14

Sumber : Winarno (1990)

2.3 Pigmen Alga Coklat

Pigmen merupakan molekul khusus yang dapat memunculkan warna dan mampu menyerap cahaya matahari dengan menyerap dan memantulkannya

pada panjang gelombang tertentu (Prangdimurti, 2007). Alga coklat memiliki pigmen yang khas yang tidak dimiliki tumbuhan darat, yaitu klorofil c dan fukosantin (Pangestuti, *et al.*, 2007).

Karotenoid dibedakan menjadi 2 kelas utama, yaitu karoten dan santofil. Karoten seperti α , β , γ karoten dan xantofil seperti fukosantin, zeaxanthin, lutein. Santofil lebih polar dibandingkan karoten. Karotenoid mempunyai fungsi utama dalam fotosintesis, yaitu sebagai pigmen asesoris yang berperan dalam menangkap cahaya (Gross, 1991). Jenis pigmen yang terdapat pada alga coklat dapat dilihat pada Tabel 3 di bawah ini.

Tabel 3. Pigmen Yang Terkandung Dalam Alga Coklat

Jenis Pigmen	Warna
Klorofil c	Hijau terang
Fukosantin	Oranye
Klorofil a	Hijau
Santhofil	Sedikit kuning
Karoten	Kuning

Sumber : (Strain *et al.*, 1943)

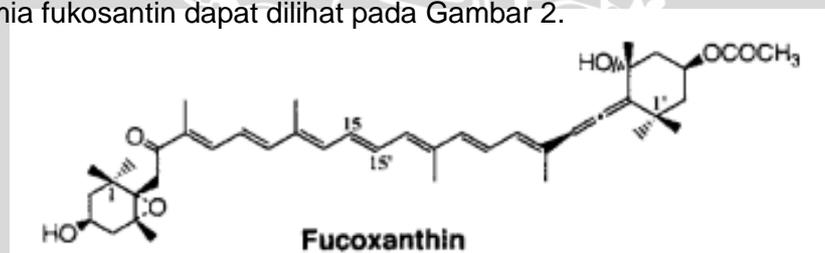
Menurut Harbone (1987), macam-macam pigmen utama terdiri dari klorofil dan karotenoid. Klorofil adalah katalisator fotosintesis yang penting dan terdapat pada alam semesta sebagai pigmen hijau dalam semua jaringan tumbuhan yang berfotosintesis. Zat ini terdapat pada kloroplas dalam jumlah nisbi banyak, sering terikat longgar dengan protein. Macam-macam pigmen klorofil antara lain: feofitin a, Feofitin b, klorofil a, klorofil b, feoforbida a, feoforbida b, klorofilida a dan klorofilida b. Karotenoid yaitu tetraterpenoid C_{40} , merupakan golongan pigmen yang larut dalam lipid dan tersebar luas pada semua tumbuhan, mulai dari bakteri sederhana sampai kompositae yang berbunga kuning. Pada hewan karotenoid khusus yaitu β -karotena merupakan makanan yang diperlukan karena merupakan sumber vitamin A, yaitu suatu isoprenoid alcohol C_{20} . Vitamin A ini diperoleh setelah β -karotena mengalami

hidrasi dan molekulnya terpecah dua. Yang termasuk pigmen karotenoid antara lain : karoten (α -karotena, β -karotena, γ -karotena), xantofil (lutein, rubixantin, zeaxantin, violaxantin, neoxantin dan fukosantin)

2.4 Fukosantin

Fukosantin memiliki rumus $C_{42}H_{58}O_6$. Pigmen ini ditemukan dalam kloroplas pada alga coklat yang memberikan warna coklat (Anonymous, 2009)^a. Fukosantin yang terdapat pada alga coklat berupa trans-fukosantin. Dalam alga coklat, fukosantin merupakan karotenoid utama karena kandungan fukosantin dapat mencapai lebih dari 50% dari total karotenoid. Fukosantin berwarna oranye termasuk kelompok santofil dari karotenoid (Nurchayanti dan Timotius, 2008).

Fukosantin memiliki struktur kimia yang unik karena memiliki sebuah ikatan alenat dan 5,6 monoepoksida di dalam molekulnya (Maeda, *et al.*, 2008). Fukosantin juga memiliki 2 gugus hidroksil (Pangestuti, *et al.*, 2007). Selain itu, fukosantin juga mempunyai gugus keto pada posisi C-8 (Britton, *et al.*, 1995)^a. Struktur kimia fukosantin dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur kimia fukosantin (Britton, *et al.*, 1995)

Fukosantin yang merupakan golongan karotenoid berfungsi sebagai pigmen pelengkap pada proses fotosintesis. Selain itu juga berfungsi sebagai agen proteksi terhadap kelebihan cahaya. Aktivitas fukosantin tersebut ditunjukkan oleh sifat absorpsi pada panjang gelombang 400-540 nm. Fukosantin mampu mengabsorpsi energi warna biru hijau dan melewatkannya ke klorofil untuk proses fotosintesis (Pangestuti, *et al.*, 2007).

Sifat-sifat fukosantin antara lain fukosantin labil pada suasana basa, sehingga pada saat mengekstraksi pigmen tersebut, lingkungan basa harus dihindari (Nurchayati dan Timotius, 2008). Pigmen ini tidak stabil pada oksigen (udara) sinar maupun panas, stabil pada pemanasan sampai suhu sedang, disimpan di tempat tertutup, tidak tembus cahaya tetapi labil bila ada oksigen atau bila terkena sinar ultra violet (Rastian *et al.*, 2007).

2.4.1 Manfaat fukosantin

Fukosantin hanya terkandung dalam alga coklat dengan jumlah sedikit. Fukosantin adalah tipe karetenoid non Vitamin A mempunyai hubungan dengan Xantofil. Studi fungsional pada fukosantin melaporkan bahwa fukosantin memiliki aktivitas untuk mencegah obesitas dan diabetes, mencegah dan memerangi kanker(kanker usus besar, kanker usus halus, kanker darah, kanker prostat dan kanker hati) pencegah oksidasi pada tubuh, mencegah penyumbatan pembuluh darah dan memerangi implamasi (Oryza oil and Fat chemical, 2010). Ditambahkan dalam Pangastuti *et al.*, (2008), fukosantin memiliki efek farmotologi yang sangat penting. Pigmen ini sangat potensial sebagai obat dan suplemen karena dapat berperan sebagai antioksidan.

2.5 Karakterisasi Pigmen Fukosantin Terhadap Variasi pH dan Kondisi Simpan

2.5.1 pH

Nilai pH suatu zat sangat ditentukan oleh konsentrasi dari ion H^+ nya, $pH = -\log [H^+]$, dimana istilah pH diusulkan oleh Sorensen yang berarti *Potential of hydrogen* (Sukardjo, 1997). Definisi pH adalah derajat yang digunakan untuk menyatakan tingkat keasaman atau kebasaan yang dimiliki oleh suatu larutan. PH juga didefinisikan sebagai kologaritma aktivitas ion hidrogen (H^+) yang terlarut. Koefisien aktivitas ion hidrogen tidak dapat diukur secara eksperimental,

sehingga nilainya didasarkan pada perhitungan teoritis. Skala pH bukanlah skala absolute, pH bersifat relatif terhadap sekumpulan larutan standar yang pH-nya ditentukan berdasarkan persetujuan internasional. Teori Arrhenius asam merupakan senyawa yang jika dilarutkan dalam air menghasilkan ion H^+ , basa merupakan senyawa yang jika dilarutkan dalam air menghasilkan ion OH^- . (Anonymous, 2010^c).

Skala pH (power of hydrogen) berkisar dari 1 sampai 14. Nilai 7 menunjukkan suatu zat bersifat netral (tidak asam-tidak basa). Suatu asam memiliki nilai pH yang lebih kecil dari 7. Semakin nilai pH mendekati angka 0, maka tingkat keasamannya semakin kuat, sedangkan jika nilai pH suatu zat mendekati 7, maka tingkat keasamannya semakin lemah (berkurang). Senyawa basa memiliki nilai pH yang lebih besar dari 7. Semakin nilai pH mendekati nilai 14, tingkat kebasaannya semakin kuat. Asam kuat adalah asam yang banyak menghasilkan ion dalam larutannya (asam yang terionisasi sempurna dalam larutannya), sedangkan asam lemah adalah asam yang sedikit menghasilkan ion dalam larutannya (terionisasi sebagian dalam larutan). Sedangkan basa sebagai senyawa yang menghasilkan ion hidroksida (OH^-) ketika larut dalam pelarut air. Kekuatan basa sangat bergantung pada kemampuan basa tersebut melepaskan ion OH^- dalam larutan dan konsentrasi larutan basa tersebut. Apabila basa direaksikan dengan asam, maka akan membentuk garam dan air. Reaksi itu disebut dengan reaksi penetralan (netralisasi). Sebagai contohnya adalah kalsium hidroksida direaksikan dengan asam sulfat akan membentuk kalsium sulfat dan air (Dennifa, 2008).

Larutan penyangga atau *buffer* adalah larutan yang digunakan untuk mempertahankan nilai pH tertentu agar tidak banyak berubah selama reaksi kimia berlangsung. Sifat yang khas dari larutan penyangga ini adalah pH-nya hanya berubah sedikit dengan pemberian sedikit asam kuat atau basa kuat.

Larutan penyangga tersusun dari asam lemah dengan basa konjugatnya atau oleh basa lemah dengan asam konjugatnya. Reaksi di antara kedua komponen penyusun ini disebut sebagai reaksi asam-basa konjugasi. (Anonymous, 2010^a).

Buffer dapat digunakan dalam setiap eksperimen yang memberikan manfaat pada pengontrolan kondisi reaksi dan hasil dalam sintesis organik. Fungsi buffer adalah untuk menciptakan lingkungan bagi biomolekul sehingga dalam bentuk stabil dan asli serta lebih aktif (Anonymous, 2009^b).

Larutan penyangga yang bersifat asam adalah sesuatu yang memiliki pH kurang dari 7, larutan penyangga yang bersifat asam biasanya dari asam lemah dan garamnya biasanya garam natrium. Larutan penyangga yang bersifat basa memiliki pH diatas 7. Larutan penyangga yang bersifat basa biasanya terbuat dari basa lemah dan garamnya (Clark, 2007). Asam sitrat sangat baik digunakan dalam larutan penyangga untuk mengendalikan pH larutan. (Anonymous, 2010^a).

Pigmen tidak stabil dalam larutan netral, basa dan bahkan dalam larutan asam warnanya dapat memudar perlahan-lahan akibat kena cahaya sehingga larutannya harus disimpan di tempat gelap serta didinginkan (Harbone, 1996). Stabilitas maksimum pigmen dicapai pada pH rendah dan pH asam 1-6 (Hulme, 1971). Pigmen dapat larut dalam asam dan tidak stabil dalam larutan netral/basa (Nargas and Lopez, 2003). Menurut Shi *et al.*, (1992), menyatakan bahwa warna pigmen dengan pH rendah (asam) warnanya tidak berubah dan pada pH yang tinggi akan mulai terjadi perubahan warna menjadi tidak berwarna.

2.5.2 Kondisi Penyimpanan

Pada pemanfaatan pigmen di bidang pangan perlu diketahui berbagai kondisi lingkungan yang dapat menjaga stabilitas pigmen, baik warna maupun sifat kimiawinya. Kestabilan pigmen salah satunya di

pengaruhi oleh suhu (Pratiwi *et al.*, 2007). Kondisi penyimpanan sangat berpengaruh terhadap stabilitas pigmen dan faktor yang mempengaruhi yaitu tinggi rendahnya suhu (Francis, 1985). Salah satu cara menjaga kestabilan pigmen akibat pengaruh suhu dapat dilakukan dengan penyimpanan pada suhu yang rendah (Canjura *et al.*, 1991)

Menurut Francis (1985), penyimpanan pada suhu 1°C pigmen tidak berubah selama 6 bulan. Tetapi bila disimpan pada suhu 21°C warna akan cepat berubah dan perubahan semakin cepat bila disimpan pada suhu 38°C. Menurut Budiarto (1991), kondisi penyimpanan sangat berpengaruh terhadap stabilitas pigmen dan faktor yang mempengaruhi antara lain: tinggi rendahnya suhu dan tidak adanya cahaya.

Suhu freezer adalah suhu yang biasanya digunakan untuk pembekuan yaitu pada suhu 0°C sampai jauh dibawah 0°C sedangkan suhu dingin adalah suhu mendekati 0°C biasanya pada refrigerator (1-5°C) (Ilyas, 1983). Sedangkan suhu kamar (Bahasa Inggris : *room temperature*) atau suhu ruangan, dalam penggunaan ilmiah, dianggap kurang lebih antara 20 sampai 25 derajat Celsius (°C) (Wikipedia, 2010).

2.6 Ekstraksi

Proses ekstraksi adalah proses pengeluaran atau proses pemisahan suatu zat dari campuran zat dengan jalan menambahkan pelarut (*solvent*) tepat pada waktunya (Wanto dan Romli, 1997). Proses ekstraksi pada dasarnya dibedakan menjadi dua fase yaitu fase pencucian dan fase ekstraksi. Pada fase pencucian terjadi penyatuan cairan ekstraksi melalui rusaknya sel-sel zat yang diekstrak atau terusakkan dengan operasi penghalusan langsung kontak dengan bahan pelarut. Diharapkan komponen sel yang terdapat dalam sel lebih mudah diambil atau dicuci, sedangkan fase ekstraksi yaitu suatu peristiwa yang

memungkinkan terjadinya pelintasan bahan pelarut ke dalam bagian dalam sel. Dengan mengalirnya bahan pelarut ke dalam sel secara difusi akan menyebabkan protoplasma membengkak dan bahan kandungan sel akan terlarut sesuai dengan kelarutannya (Voight, 1994).

Berdasarkan bentuk campuran yang diekstrak, ekstraksi dibedakan menjadi dua macam yaitu ekstraksi padat-cair : campuran yang diekstrak berbentuk padat, dan serta ekstraksi cair-cair : cairan yang diekstrak berbentuk cair. Ekstraksi bentuk padat-cair paling sering digunakan untuk mengisolasi zat yang terkandung dalam bahan alami. Mengekstraksi suatu zat dapat dilakukan dengan berbagai cara, ada yang menggunakan cara maserasi (*macerare* = mengairi, melunakkan) biasa dan maserasi kocok (Anis, 2008).

Ekstraksi secara maserasi merupakan cara penyarian yang paling sederhana yang dilakukan dengan cara merendam sampel dalam cairan penyaring. Ditambahkan oleh Widodo (2007) maserasi merupakan metode perendaman sampel dengan pelarut organik, umumnya digunakan pelarut organik dengan molekul relatif kecil dan perlakuan temperatur ruang. Proses ini menguntungkan karena pengaruh suhu dapat dihindari karena suhu yang tinggi kemungkinan akan mengakibatkan terdegradasinya senyawa-senyawa metabolit sekunder.

2.7 Fraksinasi

Fraksinasi adalah proses pemisahan suatu kuantitas tertentu dari campuran yang dibagi dalam beberapa jumlah kecil (fraksi) dimana komposisi perubahan sesuai dengan gradien (Anonymous, 2010^e). Metode fraksinasi pelarut biasanya menggunakan dua pelarut yang tidak campur didalam corong pisah. Pada metode ini komponen terdistribusi dalam dua pelarut berdasarkan perbedaan koefisien partisi. Metode partisi juga disebut penyaringan cair-cair,

yaitu proses pemisahan di mana suatu zat terbagi dalam dua pelarut yang tidak bercampur (Sholihah, 2010). Partisi/fraksinasi adalah proses pemisahan suatu kuantitas tertentu dari campuran (padat, cair, terlarut, suspensi atau isotop) dibagi dalam beberapa jumlah kecil (fraksi) komposisi perubahan menurut kelandaian. Pembagian atau pemisahan ini didasarkan pada bobot dari tiap fraksi, fraksi yang lebih berat akan berada paling dasar sedang fraksi yang lebih ringan akan berada diatas. Fraksinasi dilakukan dengan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya di dalam corong pisah. (Wulandari, 2010).

Corong pemisah atau corong pisah adalah peralatan laboratorium yang digunakan dalam ekstraksi cair-cair untuk memisahkan komponen-komponen dalam suatu campuran antara dua fase pelarut dengan densitas berbeda yang tidak tercampur. Untuk memakai corong ini, campuran dan dua fase pelarut dimasukkan ke dalam corong dari atas dengan corong keran ditutup. Corong ini kemudian ditutup dan digoyang dengan kuat untuk membuat dua fase larutan tercampur. Corong ini kemudian didiamkan agar pemisahan antara dua fase berlangsung. Penyumbat dan keran corong kemudian dibuka dan dua fase larutan ini dipisahkan dengan mengontrol keran corong ((Anonymous, 2010^b).

2.8 Pelarut

Pelarut merupakan salah satu faktor yang menentukan dalam proses ekstraksi sehingga banyak faktor yang harus diperhatikan. Dalam pemilihan pelarut, pelarut harus melarutkan ekstrak yang diinginkan saja, mempunyai kelarutan yang besar, dan titik didih antara zat yang diekstrak dan pelarutnya tidak boleh terlalu dekat (Guenther, 1987). Pemilihan pelarut pada umumnya dipengaruhi oleh faktor-faktor antara lain adalah mudah dipisahkan dari produk akhir, stabil pada temperature destilasi, tidak menimbulkan korosif dan harganya murah dan mudah didapat (Cheresources, 2002).

Suyitno, *et al.*, (1989) menambahkan pentingnya pemilihan pelarut yang selektif, yaitu pelarut yang hanya dapat melarutkan komponen yang akan diambil atau dipisahkan. Pelarut yang dipilih harus mempunyai kekentalan yang cukup rendah (*encer*) sehingga mudah disirkulasi. Dalam praktek pelarut yang murni digunakan pada awal ekstraksi, sehingga setelah proses berlangsung makin lama konsentrasi komponen yang terlarut dalam pelarut makin besar, akibatnya kecepatan ekstraksi makin menurun. Menurut Sudarmaji *et al.*, (1996), pemilihan pelarut yang sesuai untuk ekstraksi lipida adalah dengan menentukan tingkatan polaritasnya. Pada dasarnya suatu bahan akan mudah larut dalam pelarut yang sama polaritasnya. Pelarut polar hanya akan melarutkan solut yang polar dan pelarut non polar akan melarutkan solut non polar juga atau disebut "*like dissolves like*" (Shriner, *et al.*, 1980).

Menurut Susanto (1999), jumlah pelarut berpengaruh terhadap efisiensi ekstraksi, tetapi jumlah yang berlebihan tidak akan mengekstrak lebih banyak, dalam jumlah tertentu pelarut dapat bekerja optimal. Salah satu ciri penting pelarut yang akan digunakan untuk mengekstraksi suatu zat atau senyawa adalah tetapan dielektriknya. Tetapan dielektrik pelarut adalah nisbah gaya yang bekerja pada dua muatan/kutub dalam ruangan hampa dengan gaya yang bekerja pada dua muatan tersebut dalam pelarut (Rivai, 1995). Beberapa nilai konstanta atau tetapan dielektrik bahan-bahan pelarut dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Konstanta Dielektrik Beberapa Bahan Pelarut

Pelarut	Konstanta Dielektrik (D)	Tingkat Kelarutan Dalam Air
Kloroform	4,806	Sedikit
Etil asetat	6,02	Sedikit
n-butanol	17,80	Sedikit
2-propanol	18,30	Misibel
1-propanol	20,10	Sedikit
Aseton	20,70	Misibel
Etanol	24,30	Misibel
Metanol	33,60	Misibel
Air	80,40	Misibel

Keterangan : Misibel = dapat bercampur dengan air dalam berbagai proporsi

Sumber : Sudarmadji, *et al.*, (1997).

Dalam Joshua (2010), pelarut harus memenuhi beberapa fungsi dalam reaksi kimia, dimana pelarut melarutkan reaktan dan reagen agar keduanya bercampur, sehingga hal ini akan memudahkan penggabungan antara reaktan dan reagen yang seharusnya terjadi agar dapat merubah reaktan menjadi produk. Sehingga pada umumnya pelarut yang baik mempunyai kriteria pelarut harus tidak reaktif (inert) terhadap kondisi reaksi, pelarut harus dapat melarutkan reaktan dan reagen, pelarut harus memiliki titik didih yang tepat, pelarut harus mudah dihilangkan pada saat akhir dari reaksi.

Pelarut yang baik untuk ekstraksi adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi terhadap zat yang diekstraksi. Daya melarutkan yang tinggi tersebut berhubungan dengan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang diekstraksi (Vogel, 1987). Penggunaan pelarut harus memiliki kepolaran sesuai dengan kepolaran senyawa yang akan diekstrak (Dewi, *et al.*, 2007). Beberapa sifat-sifat umum bahan-bahan pelarut dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Sifat-Sifat Pelarut Umum

Solvent	Rumus Kimia	Titik Didih	K. Dielektrik	Massa Jenis
Pelarut Non-Polar				
Heksana	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	69 °C	2.0	0.655 g/ml
Benzena	C ₆ H ₆	80 °C	2.3	0.879 g/ml
Toluena	C ₆ H ₅ -CH ₃	111 °C	2.4	0.867 g/ml
Dietil Eter	CH ₃ CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₃	35 °C	4.3	0.713 g/ml
Kloroform	CHCl ₃	61 °C	4.8	1.498 g/ml
Etil Asetat	CH ₃ -C(=O)-O-CH ₂ -CH ₃	77 °C	6.0	0.894 g/ml
Pelarut Polar Aprotic				
1,4-Dioksona	/-CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -O-\	101 °C	2.3	1.033 g/ml
Tetrahidrofuran (THF)	/-CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -\	66 °C	7.5	0.886 g/ml
Diklorometana	CH ₂ Cl ₂	40 °C	9.1	1.326 g/ml
Asetona	CH ₃ -C(=O)-CH ₃	56 °C	21	0.786 g/ml
Asetonitril (MeCN)	CH ₃ -C≡N	82 °C	37	0.786 g/ml
Dimetilformamida (DMF)	H-C(=O)N(CH ₃) ₂	153 °C	38	0.944 g/ml
Dimetil Sulfoksida (DMSO)	CH ₃ -S(=O)-CH ₃	189 °C	47	1.092 g/ml
Pelarut Polar Protic				
Asam asetat	CH ₃ -C(=O)OH	118 °C	6.2	1.049 g/ml
n-Butanol	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH	118 °C	18	0.810 g/ml
Isopropanol (IPA)	CH ₃ -CH(-OH)-CH ₃	82 °C	18	0.785 g/ml
n-Propanol	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -OH	97 °C	20	0.803 g/ml
Étanol	CH ₃ -CH ₂ -OH	79 °C	30	0.789 g/ml
Metanol	CH ₃ -OH	65 °C	33	0.791 g/ml
Asam Format	H-C(=O)OH	100 °C	58	1.21 g/ml
Air	H-O-H	100 °C	80	1.000 g/ml

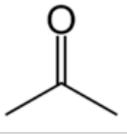
Sumber: Anonymous (2010)¹

2.8.1 Aseton

Aseton mempunyai nama lain dimetil asetat, dimetil keton, ketopropan, metilasetil, propanon, piroasetat eter dan piroasetis spirit. Rumus molekul dari aseton adalah CH_3COCH_3 . Aseton biasa digunakan sebagai pelarut karena mempunyai sifat higroskopis, sangat volatil, tidak beresidu dan mudah terbakar. Kegunaan aseton antara lain adalah sebagai pelarut senyawa asetilen, campuran adesif, parfum, pembersih, bahan campuran resin dan lain sebagainya (Schelfan, *et al.*, 1983).

Aseton adalah senyawa berbentuk cairan yang tidak berwarna dan mudah terbakar. Aseton digunakan sebagai pelarut aprotik polar dalam kebanyakan reaksi organik. Oleh karena polaritas aseton yang menengah, ia melarutkan berbagai macam senyawa atau larut dalam berbagai perbandingan dengan air, etanol, dietil eter. Oleh karena polaritas aseton yang menengah, ia melarutkan berbagai macam senyawa. (Anonymous, 2010⁹). Sifat-sifat aseton dapat dilihat pada Tabel 6:

Tabel 6. Sifat-sifat Aseton

No.	Karakteristik	Aseton
1.	Nama lain	β -ketopropana, dimetil keton, dimetilformaldehida, DMK
2.	Rumus bangun	CH_3COCH_3 
3.	Sifat	Mudah terbakar, sangat volatil, tidak beresidu
4.	Berat molekul	58.1
5.	Titik leleh	-94.6 °C
6.	Titik didih	56.1 – 56.5 °C
7.	Massa molar	58,08 g/mol
8.	Kelarutan	larut dalam berbagai perbandingan dengan air, etanol, dietil eter
9.	Densitas	0,79 g/cm ³ , cair

Sumber : Schelfan, *et al.*, (1983)

2.8.2 Metanol

Metanol dahulu dibuat dari kayu melalui penyulingan dan kadang dinamakan alkohol kayu. Kata metil bersal dari bahasa Latin (*methy* = anggur, *yle* = kayu). Tetapi sekarang metanol dibuat dari karbon monoksida dan oksigen. Metanol memiliki titik didih 65°C dan larut sempurna dalam air pada suhu 20°C (Hart, 1983).

Metanol dikenal dengan nama metil alkohol atau alkohol kayu, merupakan senyawa kimia dengan rumus kimia CH₃OH. Metanol adalah alkohol yang paling sederhana, ringan, volatil, tidak berwarna, mudah terbakar, cairan yang beracun dengan bau yang sangat tajam. Metanol banyak digunakan untuk anti pembekuan, pelarut, dan bahan bakar (Anonymous, 2010^h). Sifat-sifat metanol dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Sifat-sifat Metanol

No.	Karakteristik	Metanol
1.	Nama lain	Hidroksi metana, metil alkohol, metil hidrat, alkohol kayu dan karbinol
2.	Rumus molekul	CH ₃ OH $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$
3.	Sifat	mudah terbakar, tidak berwarna
4.	Titik leleh	-97 °C
5.	Titik didih	64.7 °C
6.	Massa molar	32.04 g/mol
7.	Densitas	0,7918 g/cm ³ , cair
8.	Titik nyala	11 °C
9.	Konstanta dielektrik	33

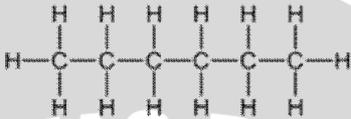
Sumber : Anonymous (2010^h)

2.8.3 Heksan

Heksana adalah sebuah senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia C₆H₁₄ (isomer utama *n*-heksana memiliki rumus CH₃(CH₂)₄CH₃). Awalan *heks-* merujuk pada enam karbon atom yang terdapat pada heksana dan akhiran *-ana* berasal dari *alkana*, yang merujuk pada ikatan tunggal yang

menghubungkan atom-atom karbon tersebut. Seluruh isomer heksana amat tidak reaktif, dan sering digunakan sebagai pelarut organik yang inert (Anonymous, 2010¹). Sifat-sifat heksan dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Sifat-sifat Heksan

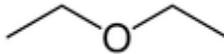
No.	Karakteristik	Metanol
1.	Nama lain	-
2.	Rumus molekul	C_6H_{14} 
3.	Sifat	mudah terbakar, tidak berwarna
4.	Titik leleh	$-95\text{ }^{\circ}\text{C}(178^{\circ}\text{k})$
5.	Titik didih	$69\text{ }^{\circ}\text{C}(324^{\circ}\text{k})$
6.	Massa molar	86.18g/mol
7.	Densitas	$0,6548\text{ g/cm}^3$, cair
8.	Visikositas	0.294 pada $25\text{ }^{\circ}\text{C}$
9.	Konstanta dielektrik	4.3

Sumber : Anonymous (2010¹).

2.8.4 Dietil Eter

Dietil eter, yang juga dikenal sebagai eter dan etoksi etana, adalah cairan mudah terbakar yang jernih, tak berwarna, dan bertitik didih rendah serta berbau khas. Anggota paling umum dari kelompok campuran kimiawi yang secara umum dikenal sebagai eter ini merupakan sebuah isomernya butanol (Anonymous, 2010¹). Dietil eter digunakan sebagai pelarut karena pelarut ini memiliki kelarutan yang tinggi terhadap minyak, lemak, resin selain itu dietil eter mudah menguap pada kondisi atmosferik yakni suhu 38°C (Savitri dan Veronica, 2007). Sifat-sifat dietil eter dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Sifat-sifat Dietil Eter

No.	Karakteristik	Metanol
1.	Nama lain	Eter dan etoksi etana,
2.	Rumus molekul	$C_4H_{10}O$, $C_2H_5OC_2H_5$ 
3.	Sifat	Mudah menguap, tidak berwarna
4.	Titik leleh	$-116.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (156.85 K)
5.	Titik didih	$34.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ (307.75 K)
6.	Titik nyalah	$-45\text{ }^{\circ}\text{C}$
7.	Massa molar	74.12 g/mol
8.	Densitas	6.9 g/100 ml ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$)
9.	Viskositas	0.224 pada $25\text{ }^{\circ}\text{C}$
10.	Konstanta dielektrik	4.3

Sumber : Anonymous (2010¹)

2.8.5 Etil Asetat

Etil asetat adalah senyawa organik dengan rumus $CH_3CH_2OC(O)CH_3$. Senyawa ini merupakan ester dari etanol dan asam asetat. Senyawa ini berwujud cairan tak berwarna, memiliki aroma khas (Anonymous, 2010¹). Penamaan ester hampir menyerupai dengan penamaan basa, walaupun tidak benar-benar mempunyai kation dan anion, namun memiliki kemiripan dalam sifat lebih elektropositif dan keelektronegatifan. Suatu ester dapat dibuat sebagai produk dari suatu reaksi pemadatan pada suatu asam (pada umumnya suatu asam organik) dan suatu alkohol (atau campuran zat asam karbol), walaupun ada cara lain untuk membentuk ester. Pemadatan adalah suatu jenis reaksi kimia di mana dua molekul bekerja sama dan menghapuskan suatu molekul yang kecil, dalam hal ini dua gugus OH yang merupakan hasil eliminasi suatu molekul air (Clark, 2002). Sifat-sifat etil asetat dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Sifat-sifat Etil asetat

No.	Karakteristik	Metanol
1.	Nama lain	Ester asetat, ester etanol, etil ester
2.	Rumus molekul	$C_4H_8O_2$ 
3.	Sifat	Cairan tidak berwarna
4.	Titik lebur	$-83.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ (189.55 K)
5.	Titik didih	$77.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (350.25 K)
6.	Massa molar	88.12 g/mol
7.	Densitas	0.897 g/cm ³ pada 30C
8.	Konstanta dielektrik	6.0

Sumber : (Anonymous,2010¹)

2.8.6 Etanol

Etanol termasuk golongan alkohol yang merupakan senyawa organik yang mengandung gugus hidroksil dengan rumus umum : R-OH atau $C_nH_{2n+1}OH$. Alkohol dapat dianggap sebagai turunan alkana, dimana atom H diganti oleh gugus hidroksil. Penamaan jenis alkohol tergantung dari jumlah n pada alkilnya, jika $n = 1$ diberi nama metanol dan bila $n = 2$ dikenal dengan nama etanol yang merupakan kependekan dari etil alkohol. Etanol dengan formula C_2H_5OH merupakan larutan jernih, tidak berwarna, volatil dengan bau khas, mendidih pada suhu $78,5^{\circ}\text{C}$, larut dalam air, eter, kloroform dan aseton (Basri, 1996). Ditambahkan Buckingham (1982), etanol merupakan pelarut organik yang dapat diproduksi melalui fermentasi gula, karbohidrat, dan pati.

Etanol biasanya digunakan untuk mengekstraksi senyawa-senyawa aktif yang bersifat antioksidan dan antibakteri pada suatu bahan. Beberapa hasil penelitian melaporkan bahwa pelarut etanol lebih baik daripada air, metanol maupun pelarut lainya dalam mengekstraksi senyawa antioksidan maupun antibakteri (Hirasawa, *et al.*, 1999). Sifat-sifat etanol dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Sifat-sifat Etanol

No.	Karakteristik	Etanol
1.	Nama lain	Etanol, metil karbinol, etil alkohol, ansol
2.	Rumus bangun	C_2H_5OH $\begin{array}{c} H & H \\ & \\ H-C & -C-O-H \\ & \\ H & H \end{array}$
3.	Sifat	Mudah menguap, berbau khas, tidak beresidu
4.	Berat molekul	46.7
5.	Titik leleh	-117.3 sampai -112 ^o C
6.	Titik didih	78.4 ^o C
7.	Berat jenis	6.6 lbs/gal pada 20 ^o C
8.	Kelarutan	Dalam air, eter, kloroform dan metil alkohol
9.	Densitas	1.59

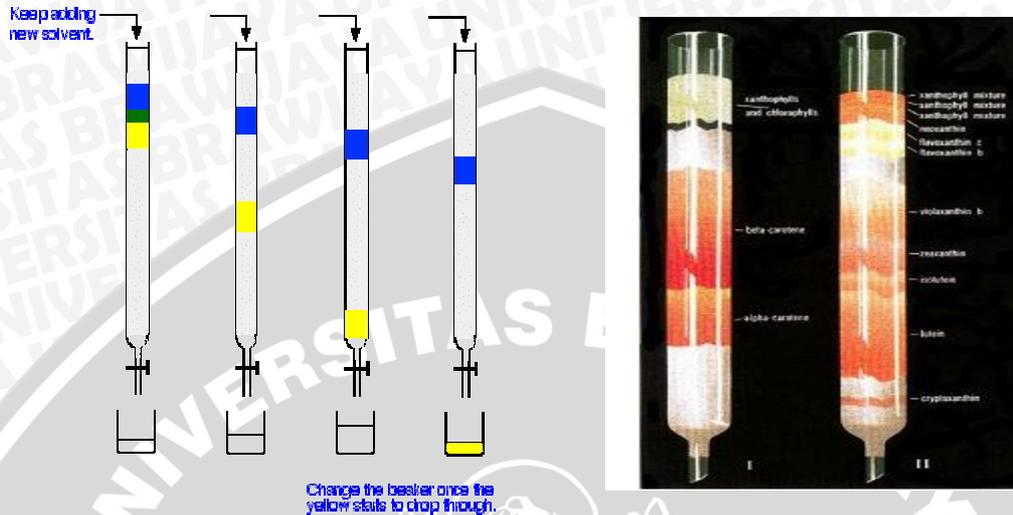
Sumber : Schelfan, *et al.*, (1983)

2.9 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom adalah suatu teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kecepatan perambatan komponen dalam medium tertentu. Pada kromatografi kolom, komponen-komponennya akan dibedakan, antara dua buah fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam akan menahan komponen campuran sedangkan fase gerak akan melarutkan zat komponen campuran. Komponen yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat. Kromatografi kolom ini bertujuan untuk purifikasi dan isolasi komponen dari suatu campurannya (Lenny, 2006).

Prinsip kerja kromatografi kolom adalah sebagai berikut : kolom gelas dengan kran pada salah satu ujungnya diisi oleh fase diam berupa *silica* atau alumina. Campuran yang akan dipisahkan dituangkan pada bagian atas kolom yang berisi fase diam. Begitu pula fase gerak berupa pelarut organik seperti heksan atau eter dialirkan dari bagian atas kolom. Komponen yang telah terpisah dari campurannya bergerak terbawa fase gerak ke bawah kolom. Jumlah komponen penyusun campuran dapat terlihat sebagai cincin-cincin berwarna

sepanjang kolom gelas (Hendayana, 2006). Gambar 3 menunjukkan perubahan yang mungkin terjadi sejalan dengan perubahan waktu.



Gambar 3. Proses kromatografi kolom (Chemistry,2009)

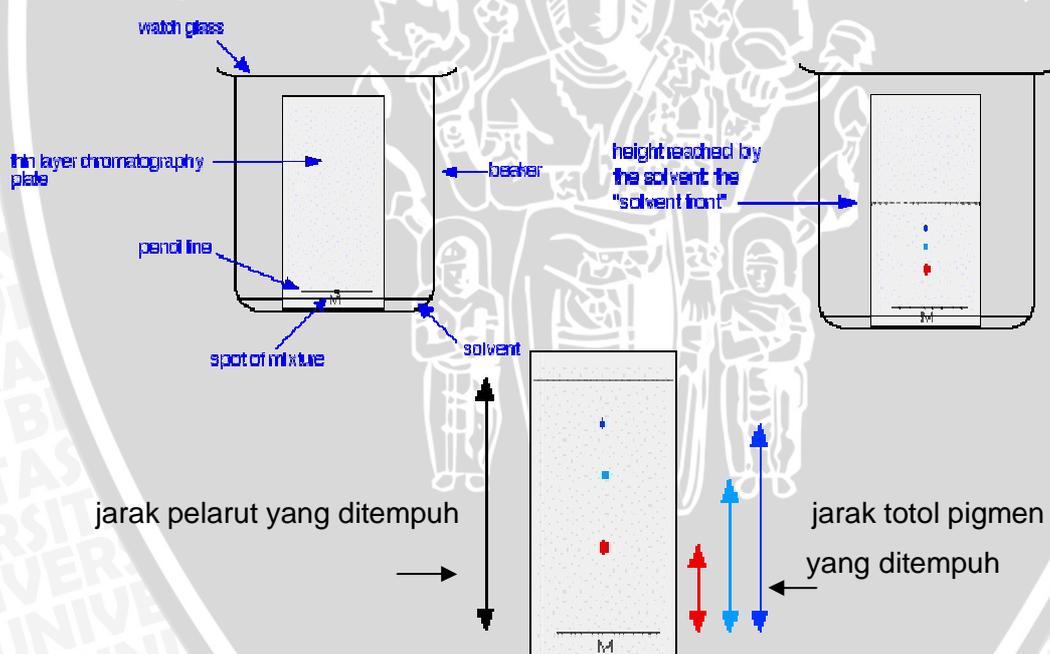
2.10 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi awal untuk mengetahui komponen pigmen adalah dengan menggunakan KLT. KLT merupakan salah satu contoh kromatografi serapan. Fase diam berbentuk lapis tipis yang melekat pada gelas kaca atau plastik, alumunium sedangkan fase gerak berupa campuran pelarut dengan perbandingan tertentu (Sastrohamidjoyo, 2002). Selain dapat dimanfaatkan untuk metode pemisahan KLT juga dapat digunakan untuk mengetahui tingkat kemurnian senyawa hasil isolasi. Jika dari hasil eluen (dua arah) dan telah divariasi jenis eluen diperoleh satu noda maka dapat diperkirakan senyawa hasil isolasi dalam keadaan murni (Warsito, 2007).

Identifikasi pigmen secara kualitatif dilakukan dengan cara menghitung nilai *retardation factor* (R_f) (Jeffrey, *et al.*, 1997). Pengukuran jumlah perbedaan warna yang terbentuk dari campuran dilakukan berdasarkan pada jarak yang ditempuh oleh pelarut dan jarak yang ditempuh oleh bercak warna. Nilai R_f untuk setiap warna dapat dihitung dengan rumus :

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

Identifikasi secara visual dapat dilakukan dengan melihat warna total pada pelat KLT. Ketebalan warna total menunjukkan kuantitas pigmen sedangkan banyak noda menunjukkan jumlah pigmen minimal yang terdapat dalam ekstrak. Proses identifikasi pigmen dengan metode KLT dapat dilihat pada Gambar 4. Clark (2007) menyatakan bahwa rangkaian alat pada KLT terdiri dari pelat KLT yang telah ditotol ekstrak pada garis awal pelat, lalu pelat dimasukkan dalam *beakerglass* berisi sedikit pelarut kemudian ditutup dengan cawan petri. Pelarut akan merambat melalui pelat dan terbentuk pemisahan warna pada total tersebut. Setelah pelarut mencapai garis akhir pelat maka jarak total dapat nilai R_f nya.



Gambar 4. Metode kromatografi lapis tipis (Clark, 2007)

2.10 Spektroskopi

Menurut Budi Jantau *et al.*, (1996), prinsip spektroskopi didasarkan adanya interaksi dari energi radiasi elektromagnetik dengan zat kimia.

Dengan mengetahui interaksi yang terjadi dikembangkan teknik-teknik analisis kimia yang memanfaatkan sifat-sifat dari interaksi tersebut.

Prinsip spektrofotometri adalah dengan mengukur tranmitansi atau absorbansi sampel sebagai fungsi panjang gelombang (Day and Underwood, 1999). Menurut Sudamradi *et al.*, (1980), bahwa prosedur dasar dalam analisis kuantitatif secara spektrofotometri adalah membandingkan absorbansi energi radiasi pada suatu panjang gelombang tertentu oleh larutan, contoh terhadap larutan dua standar. Hal ini sesuai dengan pendapat Kataren (2005), bahwa spektrofotometer dapat digunakan untuk menentukan warna dan kejernihannya. Kejernihan dan warna dapat dinyatakan persen transmittan dengan menggunakan alat spektrofotometer.

Lebih lanjut Budi Jantau *et al.*, (1996), menyatakan dalam analisis kimia, peristiwa absorpsi merupakan dasar dari cara spektroskopi karena proses absorpsi tersebut bersifat unik/spesifik untuk setiap zat kimia atau golongan zat kimia (aplikasi kualitatif). Disamping itu adalah kenyataan bahwa banyaknya absorpsi berbanding lurus dengan banyaknya zat kimia (aplikasi kuantitatif). Instrument yang digunakan disebut spektrometer atau spektrofotometer yang telah dibuat dalam berbagai merek, model, jenis dengan tingkat kepekaan maupun reproduisibilitas yang semakin tinggi dan canggih.

2.10.1 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Visible adalah alat yang umum digunakan di laboratorium kimia. Alat ini biasanya digunakan untuk analisa kimia kuantitatif, namun dapat juga digunakan untuk analisa kimia semi kualitatif. Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis. didasarkan pada fenomena penyerapan sinar oleh

spesi kimia/gugus fungsi tertentu di daerah ultra lembayung (ultra violet) dan sinar tampak (visible) (Huda, 2001). Ditambahkan oleh Riyadi (2009), spektrofotometri menggunakan dua buah sumber cahaya berbeda, sumber cahaya UV dan sumber cahaya visible. Meskipun untuk alat yang lebih canggih sudah menggunakan hanya satu sumber sinar sebagai sumber UV dan Vis, yaitu photodiode yang dilengkapi dengan monokromator. Untuk sistem spektrofotometri, UV-Vis paling banyak tersedia dan paling populer digunakan. Kemudahan metode ini adalah dapat digunakan baik untuk sample berwarna juga untuk sample tak berwarna. Spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 5.

Spektrofotometer sangat berhubungan dengan pengukuran jauhnya pengabsorbansian energi cahaya oleh suatu sistem kimia sebagai fungsi panjang gelombang dengan absorban maksimum dari suatu unsur atau senyawa. Spektrum absorban selain bergantung pada sifat dasar kimia, juga bergantung pada faktor-faktor lain. Perubahan pelarut sering menghasilkan pergeseran dari pita absorbansi. Larutan pembanding dalam spektrofotometri pada umumnya adalah pelarut murni atau suatu larutan blanko yang mengandung sedikit zat yang akan ditetapkan atau tidak sama sekali (Day dan Underwood, 1998).

Pergeseran panjang gelombang kearah lebih pendek/ke daerah merah (hipsokromik) maupun kearah yang lebih panjang/ke daerah merah (batokromik) menunjukkan terjadinya degradasi (Limantara, 2006). Ditambahkan Nurcahyanti dan Limantara (2007), penurunan absorbansi (pergeseran hypokromik) menunjukkan terjadinya pembentukan produk degradasi yang lebih kecil dari molekul awal sedangkan (pergeseran hyperkromik) adalah kenaikan absorbansi. Kenaikan absorbansi dapat disebabkan karena laju penguapan pelarut pada larutan fukusantin lebih cepat dibandingkan dengan laju degradasinya.



Gambar 5. Spektrofotometer UV-Vis

