

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI β -Carotene DENGAN
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) PADA
ALGA COKELAT (*Sargassum filipendula*)**

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

Oleh:
**DEFI KRISNAWATI
NIM. 0610830029**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2010**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI β -Carotene DENGAN
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) PADA
ALGA COKELAT (*Sargassum filipendula*)**

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan di
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

Oleh:
DEFI KRISNAWATI
NIM. 0610830029



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2010**

SKRIPSI

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI β -Carotene DENGAN
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) PADA
ALGA COKELAT (*Sargassum filipendula*)

Oleh:
DEFI KRISNAWATI
NIM. 0610830029

telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 4 Oktober 2010
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Penguji I

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I

Ir. Bambang Budi Sasmito, MS
Tanggal :

Ir. Kartini Zaelanie, MP
Tanggal :

Dosen Penguji II

Dosen Pembimbing II

Ir. Darius, M.Biotech
Tanggal :

Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS
Tanggal :

Mengetahui
Ketua Jurusan MSP

Dr. Ir. Happy Nursyam, MS
Tanggal :

RINGKASAN

DEFI KRISNAWATI. Laporan Skripsi dengan judul Isolasi dan Identifikasi β -Carotene Dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Pada Alga Cokelat (*Sargassum filipendula*) (di bawah bimbingan **Ir. Kartini Zaelanie, MP** dan **Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS**)

Pigmen merupakan molekul khusus yang dapat memunculkan warna dan mampu menyerap cahaya matahari dan memantulkannya pada panjang gelombang tertentu. Alga coklat mengandung pigmen karotenoid (terutama β -karoten). β -karoten mempunyai sistem nama lain β, β -karoten mempunyai panjang gelombang 400-560 nm, serta berfungsi sebagai provitamin A.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang dan Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Juni-Juli 2010.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif. Ekstraksi pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Pangestuti, *et al.*, (2008) yang telah dimodifikasi oleh Muamar (2009). Fraksinasi pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Pangestuti, *et al.*, (2008) yang telah dimodifikasi oleh Muamar (2009). Isolasi pigmen dilakukan dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam *silica gel* fase gerak heksan : etil asetat.

Hasil isolasi β -karoten dari jenis *Sargassum filipendula* yang di isolasi menggunakan kromatografi kolom berwarna kuning, dengan standart deviasi rendemen sebesar $0,002\% \pm 0,000004$. Nilai R_f β -karoten 0,94. Hasil identifikasi pola spektra dan panjang gelombang (λ_{max}) pigmen β -karoten dengan pelarut n-heksan dan aseton memiliki pola dan serapan yang mirip dengan penelitian (Jeffrey, *et al.*, (1997)).

Isolasi pigmen β -karoten sebaiknya menggunakan alat yang lebih sederhana dan tidak membutuhkan waktu lama dalam prosesnya, sebab isolasi pigmen dengan kromatografi kolom harus mempunyai keterampilan dalam proses pelaksanaannya.

KATA PENGANTAR

Atas berkat rahmat dan karunia Allah SWT, akhirnya penulis dapat menyelesaikan Laporan Skripsi dengan judul Isolasi dan Identifikasi β -Carotene dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Pada Alga Cokelat (*Sargassum filipendula*). Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Perikanan pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.

Ucapan terimakasih sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada:

1. Allah S.W.T atas segala kemudahan yang diberikan.
2. Ir. Kartinie Zaelanie, MP, selaku dosen pembimbing I dan Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS selaku dosen pembimbing II yang telah dengan sabar membimbing.
3. Bapak, Mama, mbak Yuli yang senantiasa selalu mendoakanku tanpa henti serta memberikan dukungan moral dan materi. Serta seluruh keluarga besarku yang selalu senantiasa mendoakan.
4. Yusuf yang selalu setia mengantar dan menemani.
5. Mas Hamim yang selalu membantu penelitian kami dari awal sampai akhir dan teman-teman tim pigmen yang selalu bersama-sama dari pagi sampai malam. Carda, Ima, Shanti, Lisa.
6. Teman dan sahabat, yang sudah membantu, menemani, memberikan dorongan sehingga laporan ini bisa terselesaikan.

Penulis menyadari bahwa laporan ini masih jauh dari sempurna. Akhirnya penulis berharap semoga Laporan Skripsi ini bermanfaat sebagai salah satu informasi bagi semua pihak yang memerlukan dan bagi yang membacanya.

Malang, Oktober 2010

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Permasalahan.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Kegunaan Penelitian	4
1.5 Waktu dan Tempat.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Alga Coklat.....	5
2.2 Komposisi Kimia.....	7
2.3 Pigmen Alga Coklat.....	8
2.4 Beta Karoten	9
2.5 Ekstraksi	14
2.5.1 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Ekstraksi.....	16
2.5.1.1 Ukuran Bahan	16
2.5.1.2 Lama dan Suhu Ekstraksi.....	16
2.5.1.3 Jenis Pelarut.....	16
2.6 Pelarut.....	17
2.6.1 Metanol	18
2.6.2 Aseton.....	19
2.6.3 n-Heksana.....	20
2.6.4 Etil Asetat.....	20
2.6.5 Dietil Eter.....	21
2.6.5 Petroleum Eter	21
2.7 Partisi	22
2.8 Kromatografi Kolom.....	22
2.9 Kromatografi Lapis Tipis.....	23
2.10 Spektrofotometer UV-Vis.....	25
3. METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian	28
3.1.1 Bahan Penelitian	28
3.1.2 Alat Penelitian	28
3.2 Metode Penelitian	29
3.3 Prosedur Penelitian.....	29
3.3.1 Persiapan Sampel.....	29
3.3.2 Ekstraksi Pigmen Alga Coklat.....	29
3.3.3 Fraksinasi Alga Coklat.....	30
3.3.4 Isolasi β -Carotene	32
3.3.5 Identifikasi Pigmen β -Carotene.....	35

3.3.5.1 Kromatografi Lapis Tipis	35
3.3.5.2 Spektrofotometer UV-Vis	37
3.3.5.3 Pengukuran Rendemen	37

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Pengamatan	38
4.1.1 Ekstraksi β -Carotene	38
4.1.2 Fraksinasi β -Carotene	40
4.1.3 Isolasi Pigmen β -Carotene Dengan Kromatografi Kolom	42
4.1.4 Identifikasi β -Carotene	44
4.1.4.1 Identifikasi Pigmen β -Carotene dengan KLT	44
4.1.4.2 Identifikasi Pola Spektra dan Panjang Gelombang	45
4.1.5 Rendemen β -Carotene	48
4.2 Pembahasan	48
4.2.1 Kromatografi Kolom	48
4.2.2 Kromatografi Lapis Tipis	49
4.2.3 Pola Spektra dan Panjang Gelombang β -Karoten	49
4.2.4 Rendemen β -Karoten	50

5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan	51
5.2 Saran	51

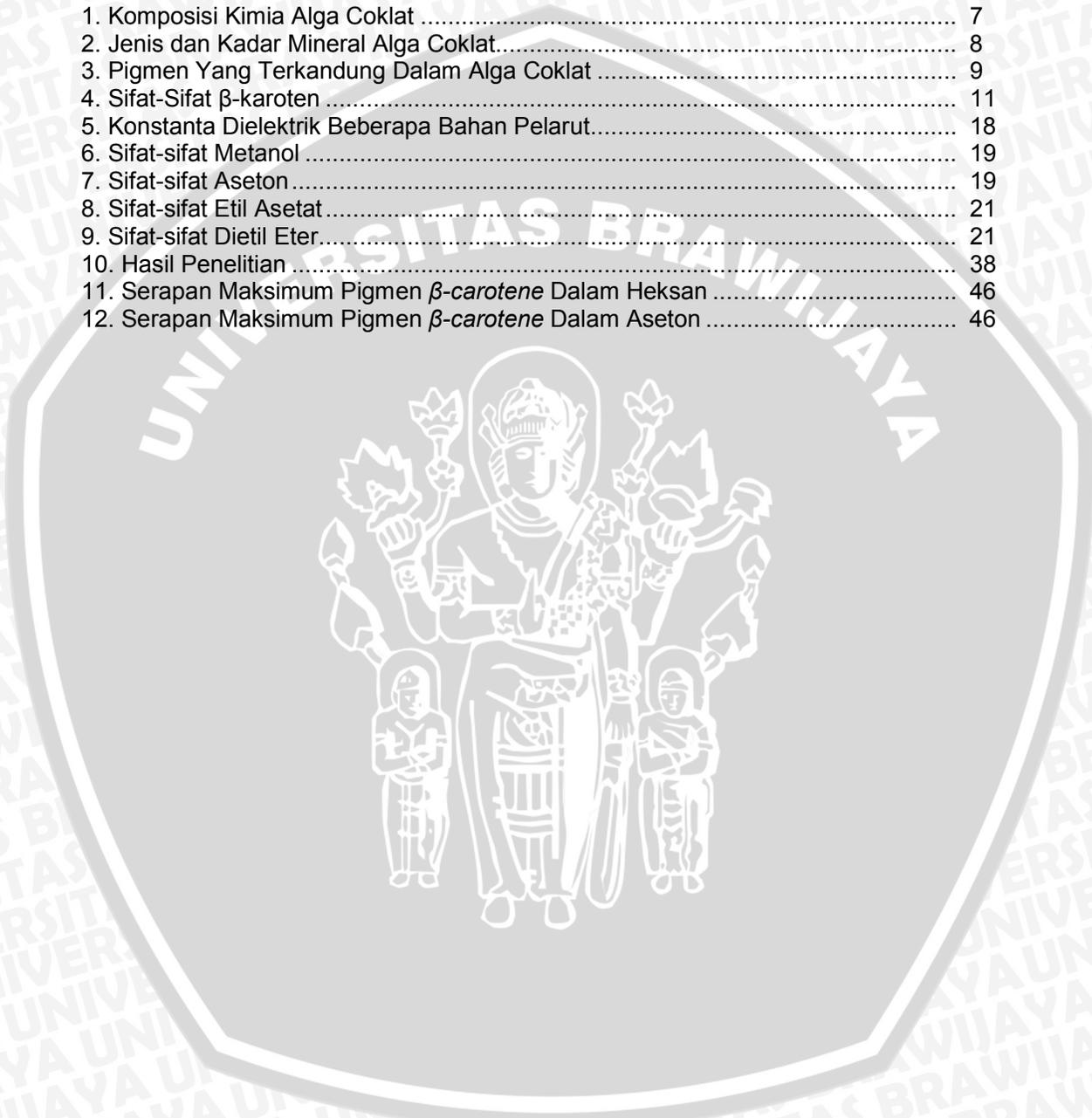
DAFTAR PUSTAKA	52
----------------------	----

LAMPIRAN	57
----------------	----



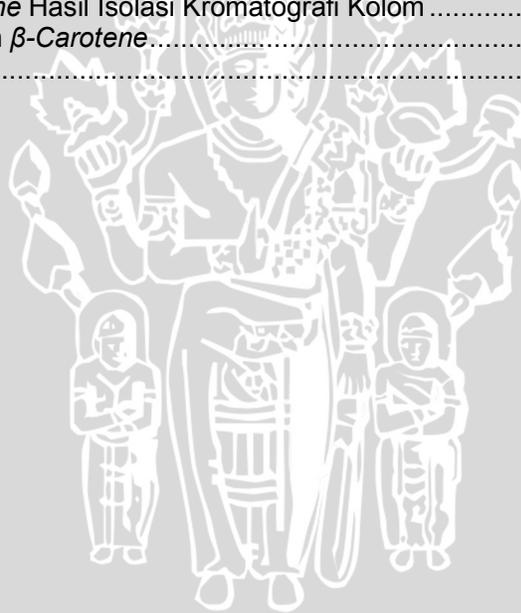
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi Kimia Alga Coklat	7
2. Jenis dan Kadar Mineral Alga Coklat.....	8
3. Pigmen Yang Terkandung Dalam Alga Coklat	9
4. Sifat-Sifat β -karoten	11
5. Konstanta Dielektrik Beberapa Bahan Pelarut.....	18
6. Sifat-sifat Metanol	19
7. Sifat-sifat Aseton	19
8. Sifat-sifat Etil Asetat.....	21
9. Sifat-sifat Dietil Eter.....	21
10. Hasil Penelitian	38
11. Serapan Maksimum Pigmen β -carotene Dalam Heksan	46
12. Serapan Maksimum Pigmen β -carotene Dalam Aseton	46



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Sargassum filipendula</i>	7
2. Struktur Kimia β -karoten	11
3. Proses Kromatografi Kolom	23
4. Kromatografi Lapis Tipis.....	25
5. Spektrofotometer UV-Vis.....	27
6. Diagram Ekstraksi dan Fraksinasi Pigmen Alga Coklat	32
7. Diagram Kromatografi Kolom	35
8. Diagram Alir Kromatografi Lapis Tipis	36
9. Proses Maserasi	39
10. Proses Penyaringan Filtrat	40
11. Proses Partisi	41
12. Proses Evaporasi	42
13. Proses Pengeringan Sampel Dengan Gas Nitrogen.....	42
14. Isolasi Pigmen β -Carotene dengan Kromatografi Kolom	43
15. Pigmen β -Carotene Hasil Isolasi Kromatografi Kolom	44
16. Hasil KLT Pigmen β -Carotene.....	45
17. Pola Spektra	46



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan Larutan.....	57
2. Data	59
3. Perhitungan Kadar β -Karoten.....	60
4. Perhitungan Kadar Rendemen.....	62
5. Perhitungan Rf.....	63
6. Hasil Kromatografi Kolom.....	64
7. Foto Hasil Kromatografi Kolom.....	68



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rumput laut disebut juga dengan *seaweed* merupakan tanaman fotosintetik tingkat rendah yang tidak memiliki perbedaan susunan kerangka seperti akar, batang dan daun. Wujudnya tampak seperti ada perbedaan, tetapi sesungguhnya merupakan bentuk *thallus* saja (Winarno, 1990). Ditambahkan oleh (Susanto, 2008), rumput laut banyak dijumpai hampir di seluruh perairan Indonesia terutama di pantai yang mempunyai terumbu karang. Rumput laut mempunyai banyak jenis berdasarkan warna atau pigmennya ke dalam beberapa kelas, yaitu alga hijau (*Chlorophyceae*), alga merah (*Rhodophyceae*), alga hijau-biru (*Cyanophyceae*), dan alga coklat (*Phaeophyceae*) (Haryanto, 2008).

Rumput laut merupakan andalan usaha nelayan di Kabupaten Sumenep, dengan jumlah yang terus meningkat dari tahun ke tahun. Produksinya mencapai 32,4 juta ton. Namun, rumput laut yang banyak dibudidayakan di Kabupaten Sumenep adalah jenis *Euchema cottoni*. Rumput laut coklat di Kabupaten Sumenep belum banyak dibudidayakan, padahal rumput laut coklat banyak mengandung pigmen warna alami. Walaupun tidak dibudidayakan, alga coklat dapat tumbuh dengan baik di perairan Kabupaten Sumenep, salah satunya adalah jenis *Sargassum* (Bisnis, 2008). *Sargassum* banyak tumbuh menempel di sepanjang pantai berbatu di daerah tropika. Tumbuhan tersebut berkembangbiak dengan cara aseksual, satu-satunya cara reproduksi yang diketahui. Akan tetapi, kebanyakan spesies diketahui bereproduksi secara seksual. Salah satu jenisnya adalah *Sargassum filipendula*, panjangnya hampir setengah meter, bercabang-cabang, dan tangkainya kecil-kecil. Pigmen yang terkandung dalam alga coklat adalah klorofil A, klorofil C, beta karoten, fikosantin, flaposantin, neosantin, fukosantin, neufukasantin A dan neufukasantin B (Zaifbio, 2009).

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 menghasilkan algin, laminaran, fukoidan, selulosa dan manitol (Kadi, 1989 dalam Yunizal, 1999). Disamping itu juga mengandung pigmen klorofil jenis a dan c, β -carotene, violasantin, fukosantin, pirenoid dan filakoid (Indriani dan Sumiarsih, 1992).

Karotenoid merupakan pigmen kuning dan merah yang terdistribusi secara luas di alam, karotenoid adalah komponen-komponen yang penting dan ada pada semua jaringan-jaringan fotosintetik dalam tumbuhan, alga, dan sianobakteri dimana dalam kloroplas, karotenoid berfungsi sebagai agen perlindungan perlengkapan fotosintesis terhadap kerusakan fotooksidatif dengan melepaskan atau menghilangkan energi dan berpartisipasi dalam proses pemanenan cahaya (Pekey dan Karwur, 2008).

Pada mulanya nama karotenoid diperoleh dari salah satu tipenya yang terkenal yaitu beta karoten. Pigmen tersebut merupakan pigmen kuning pertama yang berhasil diisolasi dari wortel (*Daucus carota*) oleh Wackenroder pada tahun 1831 (Gross, 1991). Karotenoid mampu bekerja sebagai antioksidan, yakni menangkap radikal bebas, terutama radikal peroksil dan hidroksil maupun oksigen singlet (oksigen tunggal) (Silalahi, 2006).

Identifikasi suatu kandungan dan komposisi pigmen dapat dilakukan dengan kromatografi dan spektrofotometri. Penyerapan cahaya dari pigmen dengan menggunakan kromatografi selanjutnya dapat dibandingkan dengan pustaka yang ada (Gross, 1991). Identifikasi pigmen yang berasal dari rumput laut diharapkan bisa membantu pengembangan serta pemanfaatannya ke depan (Christiana, *et al.*, 2008).

Penelitian kromatografi kolom dan pola spektra pigmen β -karoten sebelumnya telah dilakukan oleh Jeffrey, *et al.*, (1997), dihasilkan pigmen β -karoten berwarna kuning dengan panjang gelombang pigmen β -karoten dalam pelarut heksan 422 nm, 449,9 nm, dan 477,7 nm. Soviani *et al.*, (2004) dan Pratikno *et al.*, (2004) menyatakan bahwa nilai Rf β -karoten memiliki kisaran Rf 0,91 – 0,94.

1.2 Permasalahan

Pada umumnya rumput laut yang banyak dimanfaatkan hanya dari jenis alga merah yang dapat menghasilkan agar-agar dan karaginan, akan tetapi rumput laut jenis alga coklat atau *Phaeophyceae* yang mampu menghasilkan alginat dan memiliki pigmen atau zat warna alami belum dimanfaatkan secara optimal, salah satu pigmen yang terkandung yaitu karotenoid yang dapat memberikan warna kuning hingga merah (Anis, 2008).

Pada dasarnya alga coklat mengandung pigmen klorofil dan kaya akan pigmen karotenoid (fukosantin dan β -karoten). Karotenoid terdapat dalam jaringan fotosintesis tumbuhan tinggi, ganggang, dan bakteri berfotosintesis, karotenoid didapatkan pada kloroplas khususnya di dalam grana, tersebar dalam bagian-bagian tanaman seperti bunga, buah dan akar yang berwarna coklat, walaupun demikian jumlah dan persebaran karotenoid tidak teratur (Goodwin, 1974; Atmadja, *et al.*, 1996). Namun, penelitian mengenai isolasi pigmen β -karoten pada alga coklat dengan spesies *Sargassum filipendula* belum banyak dilakukan. Oleh karena itu dilakukan penelitian mengenai isolasi β -karoten pada alga coklat jenis *Sargassum filipendula*, maka didapatkan permasalahan:

- Berapakah kandungan pigmen β -karoten pada alga coklat jenis *Sargassum filipendula* dengan cara mengisolasi menggunakan kromatografi kolom?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui komposisi pigmen alga cokelat dan berapakah kandungan pigmen β -karoten yang terdapat pada *Sargassum filipendula*.

1.4 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada pihak yang berkepentingan tentang jumlah kadar β -karoten yang terkandung pada alga coklat (*Sargassum filipendula*) yang diisolasi dengan menggunakan kromatografi kolom sehingga dapat dimanfaatkan lebih lanjut.

1.5 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang dan Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Juni-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 4 kelas berdasarkan pigmen pembawanya, yaitu : *Rhodophyta* (alga merah), *Phaeophyta* (alga coklat), *Cyanophyceae* (alga biru hijau) dan *Chlorophyta* (alga hijau). Rumput laut umumnya tumbuh melekat pada suatu substrat (Susanto, 2008).

Kelompok alga coklat memiliki bentuk yang bervariasi sebagian besar jenisnya berwarna coklat atau pirang dan memiliki ukuran thalli yang lebih tinggi dari jenis alga merah dan hijau. *Thallus* berbentuk lembaran, bulat atau batangan yang bersifat lunak atau keras, mengandung pigmen fotosintetik yaitu karoten, fukosantin, klorofil a dan c, dalam dinding selnya terdapat selulosa dan asam alginik. Produk fotosintesisnya adalah polisakarida berupa mannitol dan laminaran (Atmadja, *et al.*, 1996).

Kebanyakan spesies mempunyai kantong udara dan pembiakannya secara seksual (oogami dan isogami) atau aseksual (zoospora berflagella dan fragmentasi). Contoh alga coklat adalah *Fucus sp*, *Turbinaria sp*, *Padina*, *Dictyota*, *Laminaria*, dan *Sargassum sp* (Bachtiar, 2007).

Alga *Sargassum* tumbuh berumpun dengan untaian cabang-cabang. Panjang thalli utama mencapai 1-3 m dan tiap-tiap percabangan terdapat gelembung udara berbentuk bulat yang disebut "*bladder*", berguna untuk menopang cabang-cabang thalli terapung ke arah permukaan air untuk mendapatkan intensitas cahaya matahari. *Thallus* berbentuk silindris atau gepeng, daun melebar, lonjong atau seperti pedang, umumnya hidup soliter dan panjangnya dapat mencapai 7 meter. Alga coklat jenis *Padina* memiliki daun

yang berbentuk seperti kipas dan hidupnya melekat pada batu karang seperti halnya jenis *Sargassum*. *Turbinaria* memiliki thalli yang tegak, keras dan percabangan berputar sekeliling batang utama (Kadi, 2008). Ditambahkan oleh Smith (1950) *thallus* pada alga coklat strukturnya berbeda dengan alga yang lain yaitu pada sel reproduktif, sistem penyimpanan makanan dan pigmen kromatopornya. Xantophyl mempunyai peranan yang tersebar daripada klorofil dan karoten yaitu terdapat enam xantophyl sehingga kromatopornya berwarna pirang.

Salah satu jenis *Sargassum* adalah *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 panjangnya 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 (2009^a):

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



Gambar 1. *Sargassum filipendula*

2.2 Komposisi Kimia

Alga coklat memiliki dinding sel yang terdiri atas selulosa dan polisakarida (Ensiklopedia, 2009). Rumput laut juga mengandung protein, lemak, serat kasar, vitamin, dan zat anti bakteri serta mineral. Komposisi kimia alga coklat dan kadar mineral 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 Kadar Mineral Alga Coklat

Unsur	Kadar
Chlor	9,8 – 15,00
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
Yodium	0,1 – 0,8
Brom	0,003 – 0,14

Sumber : Winarno (1990) dalam Yunizal (1999)

2.3 Pigmen Alga Coklat

Zat warna alami dapat diperoleh dari tanaman atau hewan, dan warna alami ini meliputi pigmen yang terdapat dalam bahan atau terbentuk pada proses pemanasan, penyimpanan atau pemrosesan. Aman dan tidak mempunyai efek samping jika dikonsumsi, seperti klorofil, karotenoid, antosianin, tanin dan lain-lain. Pigmen merupakan molekul khusus yang dapat memunculkan warna dan mampu menyerap cahaya matahari 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).

Pigmen adalah zat warna alami yang diperoleh dari ekstraksi bahan alam, yang berasal dari tanaman maupun hewan. Alga coklat mengandung pigmen karotenoid (terutama β -karoten) (Anis, 2008). Jenis karotenoid yang terkandung pada rumput laut coklat selain fukosantin adalah flavoxanthin, diatoxanthin, dan zeaxanthin (Hegazi, *et al.*, 1998).

Karotenoid merupakan kelompok pigmen yang berwarna kuning, oranye, merah oranye serta bersifat larut dalam minyak (lemak). Karotenoid seringkali

terdapat dalam kloroplas (0,5%) bersama-sama dengan klorofil (9,3%), terutama pada bagian permukaan atas daun, dekat dinding-dinding sel palisade. Di dalam karotenoid terdapat β -karoten, dimana β -karoten umumnya mempunyai konsentrasi yang lebih rendah daripada α -karoten. Mempunyai sistem nama lain β,β -karoten mempunyai panjang gelombang 400-560 nm, serta berfungsi sebagai provitamin A, sedangkan flavonoid merupakan kelompok terbesar dari senyawa fitokimia yang banyak terdapat pada jaringan tumbuhan (Anis, 2008). Jenis, warna dan serapan 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	λ_{max} dalam Pelarut Etanol
Klorofil c	Hijau terang	
Neofukosantin A	Oranye	447
Neofukosantin B	Oranye kekuningan	446
Fukosantin	Oranye	453
Diadinosantin	Kuning	448, 478
Diatosantin	Kuning	453, 481
Klorofil a	Hijau	
Xanthofil	Sedikit kuning	
Klorofil a'	Hijau	
Phaeopitin	Hijau dan abu-abu	
Karoten	Kuning	

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

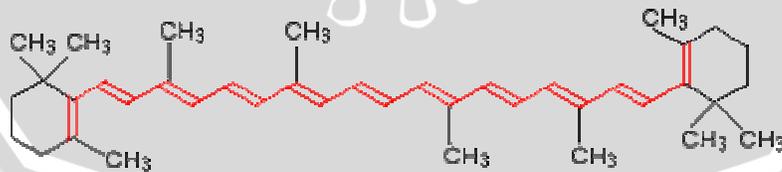
2.4 Beta Karoten

Beta karoten merupakan senyawa organik dan diklasifikasikan sebagai terpenoid. Berwarna merah-oranye yang sangat berlimpah pada tanaman dan buah-buahan. Bentuk paling umum karoten adalah beta-cincin di kedua ujungnya, ini adalah prekursor (bentuk aktif) dari vitamin A (Wikipedia, 2010^a). Pada mulanya nama karotenoid diperoleh dari salah satu tipenya yang terkenal yaitu beta karoten. Pigmen tersebut merupakan pigmen kuning pertama yang berhasil diisolasi dari wortel (*Daucus carota*) oleh Wackenroder pada tahun 1831.

Karotenoid dibagi menjadi 2, yaitu karotenoid ($C_{40}H_{56}$) dan Xantofil yaitu karotenoid yang mengandung gugus oksigen (Gross,1991).

Karotenoid, yaitu tetraterpenoid C_{40} , merupakan golongan pigmen yang larut lipid dan tersebar luas, terdapat dalam semua jenis tumbuh-tumbuhan, mulai dari bakteri sederhana sampai ke *Compositae* yang berbunga kuning. Pada hewan, suatu karotenoid khusus, yaitu β -karotena, merupakan makanan yang diperlukan karena ia merupakan sumber vitamin A, yaitu suatu isoprenoid alkohol C_{20} . Vitamin A ini diperoleh setelah β -karotena tadi mengalami hidrasi dan molekulnya terpecah dua (Harborne, 2006).

Karotenoid terdiri dari 40 atom C, termasuk dalam golongan tetrapenoids dengan 8 C_5 isoprenoid tergabung sehingga barisnya terbalik ditengah. Kerangka dan garis utama dapat berputar pada 1 atau ujung keduanya, memiliki sisi dari gugus methil yang dipisahkan oleh 6 atom C pada pusat atau tengah dan 5 atom C dilain tempat (Rodriguez, 2001). Beta karoten menyerap sinar pada daerah ultra violet sampai violet tetapi lebih kuat pada daerah tampak antara 400 dan 500 nm dengan puncak 470 nm. Gambar berikut menunjukkan struktur beta karoten dengan ikatan rangkap dua dan ikatan tunggal yang berselang-seling yang ditunjukkan dengan warna merah (Clark, 2007). Struktur Kimia β -karoten dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur Kimia β -karoten (Clark, 2007)

Tabel 4. Sifat-Sifat β -karoten

No.	Karakteristik	β -karoten
1.	Nama kimia	β -karoten
2.	Sinonim	Provitamin A dan kuning alami
3.	Rumus bangun	$C_{40}H_{56}$
4.	Berat molekul	536,87
5.	Densitas	1,0 kg/l
6.	Titik lebur	180°C–182°C
7.	Kelarutan	Larut dalam lemak dan Tidak larut dalam air
8.	Kenampakan	Butiran kristal merah gelap (cokelat)

Sumber: Hui dan Yaws (2008)

Berdasarkan strukturnya karotenoid dibedakan menjadi 2 kelas utama yaitu karoten dan xantofil. Karoten seperti α , β , γ karoten dan likopen merupakan hidrokarbon tak jenuh, tidak mengandung oksigen dan biasanya berwarna oranye. Xantofil seperti lutein, zeaxantin, bixin, rhodoxantin dan lain-lain merupakan turunan karoten yang teroksidasi. Xantofil lebih polar dibandingkan karoten, karenanya karoten larut dalam pelarut non polar seperti, petroleum eter dan heksana, sedangkan xantofil akan larut dalam pelarut polar misalnya alkohol. Karotenoid adalah warna dari kuning, oranye dan merah yang tersebar luas dan penting bagi pewarna alami. Karoten ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi, alga, fungi dan bakteri baik pada jaringan non-fotosintesis maupun jaringan fotosintesis, bersama dengan klorofil. Tidak seperti klorofil maupun antosianin, karoten ditemukan juga pada hewan, seperti pada burung, ikan, serangga dan beberapa invertebrata lainnya (Gross, 1991).

Karotenoid dikenal sebagai pigmen pada tumbuhan, disamping itu karotenoid juga diketahui terdapat pada hewan dan mikroorganisme. Selain menjadi bagian dari aparatus fotosintesis pada bakteri fototropik, karotenoid juga bertanggung jawab memberi warna merah, oranye, dan kuning pada bakteri non-fototropik, jamur dan khamir. Peran penting karotenoid pada mikroorganisme terutama menjadi pelindung terhadap cahaya dan oksigen (Britton *et. al.*, 1995).

Fungsi biologis karotenoid dapat dilihat dari peranannya dalam nutrisi pada manusia dan hewan sebagai prekursor vitamin A, dimana vitamin A ini secara nyata merupakan zat yang dapat menambah daya tahan tubuh, anti tumor dan anti infeksi virus, jamur, dan parasit lain. Karotenoid juga penting untuk penglihatan, pertumbuhan dan reproduksi (Silalahi, 2006). Hampir semua jenis spesies hewan dapat mengubah secara enzimatis karotenoid dari tanaman menjadi vitamin A. Karotenoid sebagai pro-vitamin A terdistribusi secara luas di alam sebagai β -karoten. β -karoten secara luas merupakan pro-vitamin A. Satu molekul β -karoten akan diubah menjadi 2 molekul vitamin A (Gross, 1991).

Vitamin A mempunyai provitamin yaitu karoten. Pada sayuran, vitamin A terdapat sebagai provitamin dalam bentuk pigmen berwarna kuning β -karoten, yang terdiri atas dua molekul retinal yang dihubungkan pada ujung aldehyd rantai karbonnya, tetapi karena β -karoten tidak mengalami metabolisme yang efisien, maka β -karoten mempunyai efektifitas sebagai sumber vitamin A hanya sepersepuluh retinal. Ester retinal yang terlarut dalam lemak makanan akan terdispersi di dalam getah empedu dan dihidrolisis di dalam lumen intestinum diikuti oleh penyerapan langsung ke dalam epitel intestinal. β -Karoten yang dikonsumsi dipecah lewat reaksi oksidasi oleh enzim β -karoten dioksigenase. Pemecahan ini menggunakan oksigen molekuler, dengan adanya garam-garam empedu dan menghasilkan 2 molekul retinaldehyd (retinal). Demikian pula, di dalam mukosa intestinal, retinal direduksi menjadi retinal oleh enzim spesifik retinaldehyd reduktase dengan menggunakan NADPH. Retinal dalam fraksi yang kecil teroksidasi menjadi asam retinoat. Sebagian besar retinal mengalami esterifikasi dengan asam-asam lemak dan menyatu ke dalam kilomikron limfe yang masuk ke dalam aliran darah. Bentuk ini kemudian diubah menjadi fragmen kilomikron yang diambil oleh hati bersama-sama dengan kandungan retinolnya. Di dalam hati, vitamin A disimpan dalam bentuk ester di dalam liposit, sebagai

suatu kompleks lipoglikoprotein. Untuk pengangkutan ke jaringan, vitamin A dihidrolisis dan retinal yang terbentuk terikat dengan protein pengikat aporetinol (RBP). RBP yang dihasilkan diproses dalam apparatus golgi dan disekresikan ke dalam plasma. Asam retinoat diangkut ke dalam plasma dalam keadaan terikat dengan albumin. Begitu di dalam sel-sel ekstrahepatik, retinal terikat dengan protein pengikat retinol seluler (CRBP). Retinal mengalami interkonversi dengan adanya enzim-enzim dehidrogenase atau reduktase yang memerlukan NAD atau NADP di dalam banyak jaringan. Namun demikian, begitu terbentuk dari retinal, asam retinoat tidak dapat diubah kembali menjadi retinal. Asam retinoat dapat mendukung pertumbuhan dan differensiasi, tetapi tidak dapat menggantikan retinal dalam peranannya pada penglihatan atau pun retinal dalam dukungannya pada sistem reproduksi. Retinol setelah diambil oleh CRBP diangkut ke dalam sel dan terikat dengan protein nukleus, di dalam nukleus inilah retinal terlibat dalam pengendalian ekspresi gen-gen tertentu, sehingga retinal bekerja menyerupai hormon steroid. Retinal merupakan komponen pigmen visual rodopsin, yang mana rodopsin terdapat dalam sel-sel batang retina yang bertanggung jawab atas penglihatan pada saat cahaya kurang terang. 11-sis-Retinal yaitu *isomer all-transretinal*, terikat secara spesifik pada protein visual opsin hingga terbentuk rodopsin. Ketika terkena cahaya, rodopsin akan terurai serta mambentuk *all-trans retinal* dan opsin. Reaksi ini disertai dengan perubahan bentuk yang menimbulkan saluran ion kalsium dalam membran sel batang. Aliran masuk ion-ion kalsium yang cepat akan memicu impuls syaraf sehingga memungkinkan cahaya masuk ke otak (Rusdiana, 2004).

Karotenoid mampu bekerja sebagai antioksidan, yakni menangkap radikal bebas, terutama radikal peroksil dan hidroksil maupun oksigen singlet (oksigen tunggal). Dalam fungsinya sebagai antioksidan, β -karoten lebih efektif secara biologis terutama pada bagian yang memiliki tekanan parsial oksigen rendah.

Selain itu, β -karoten juga bekerja sinergis dengan vitamin C dan vitamin E, dengan sifat-sifat tersebut β -karoten dapat melindungi tubuh dan mencegah berbagai penyakit, menghambat pertumbuhan sel kanker, mencegah serangan jantung, mencegah katarak, meningkatkan fungsi sistem kekebalan tubuh, mencegah dan mengobati penyakit kulit dan lain-lain (Silalahi, 2006). Senyawa karotenoid memiliki aktivitas antioksidan, beberapa diantaranya adalah sebagai prekursor vitamin A. Sejumlah karoten yang penting yaitu berupa α -karoten, β -karoten, likopen, lutein, zeaxanthin dan β -Cryptoxanthin (Langseth, 1995).

Beberapa sumber senyawa karoten yaitu: α -karoten pada wortel; β -karoten pada sayur dan buah-buahan berwarna kuning-oranye, sayuran hijau; likopen pada tomat dan sayuran hijau; lutein dan zeaxanthin pada jagung dan sayuran berwarna hijau gelap, misalnya brokoli, bayam; β -Cryptoxanthin pada buah jeruk. Lebih dari 400 jenis senyawa karoten telah ditemukan dalam tumbuhan tingkat tinggi, alga dan juga bakteri (Rodriguez, 2001).

2.5 Ekstraksi

Ekstraksi dapat didefinisikan sebagai suatu proses penarikan keluar atau proses pemisahan suatu bahan dari campurannya, biasanya dengan menggunakan pelarut. 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). Ekstraksi adalah pemisahan satu atau beberapa zat dari suatu bahan padatan atau cairan. Pada proses ini akan terjadi kontak antara pelarut dengan bahan sehingga pada bidang antar muka dari keduanya akan terjadi pengendapan massa secara difusi sampai tercapai keseimbangan konsentrasi larutan di dalam dan di luar bahan ekstraksi (Bernasconi, *et al.*, 1995). Pemisahan yang diinginkan dapat terjadi karena

adanya perbedaan dalam sifat yaitu dapat larutnya antara bagian-bagian campuran zat pada bahan pelarut (Wanto dan Romli, 1977).

Fase 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, sehingga komponen sel yang terdapat dalam sel lebih mudah diambil, sedangkan pada fase ekstraksi, yaitu suatu peristiwa yang memungkinkan terjadinya perlintasan bahan pelarut ke bagian dalam sel, yang memungkinkan bahan ekstraksi mencapai ke dalam ruang dalam sel. Dengan mengalirnya bahan pelarut ke dalam sel akan menyebabkan protoplasma membengkak, dan bahan kandungan sel akan terlarut sesuai kelarutannya (Voight, 1994).

Berdasarkan bentuk campuran yang diekstrak, ekstraksi dibedakan menjadi dua macam yaitu ekstraksi padat-cair yaitu campuran yang diekstrak berbentuk padat, dan ekstraksi cair-cair yaitu cairan yang diekstrak berbentuk cair (Sax and Lewis, 1987 dalam Wijaya 2001). Ekstraksi bentuk padat-cair paling sering digunakan untuk mengisolasi zat yang terkandung dalam bahan alami. Sifat-sifat seperti kepolaran, kelarutan bahan alami yang diisolasi berperan penting terhadap sempurnanya proses ekstraksi, disamping pemilihan pelarut dan pengaturan suhu (Vogel, 1987).

Faktor yang menentukan hasil ekstraksi adalah jangka waktu dimana sampel kontak dengan cairan pengekstraksi (waktu ekstraksi) dan perbandingan antara sampel terhadap cairan pengekstraksi (jumlah bahan pengekstraksi) (Voight, 1994). Menurut Vogel (1987), ekstraksi dengan pelarut cukup dilakukan sampai semua zat terlarut yang terkandung dalam padatan tersebut larut. Keseimbangan dicapai ketika semua zat terlarut tersebut terlarut. Tidak mungkin semua cairan dapat dipisahkan dari padatan sehingga ampas selalu

mengandung cairan yang didalamnya terlarut zat terlarut (solut). Ditambahkan Warsito (2007), mengekstraksi suatu zat dapat dilakukan dengan beberapa metode, yaitu dengan menggunakan metode maserasi atau metode perendaman, metode perkolasi, destilasi uap dan sokletasi. Menurut Widodo (2007), maserasi merupakan metode perendaman sampel dengan pelarut organik yang memiliki molekul relatif kecil dan diperlakukan pada temperatur ruang. Pada umumnya maserasi bertingkat digunakan karena lebih efisien bila dilakukan berulang kali dengan jumlah pelarut lebih kecil dari pada bila jumlah pelarutnya banyak tetapi mengekstraknya hanya sekali.

2.5.1 Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Ekstraksi

2.5.1.1 Ukuran Bahan

Bahan yang akan diekstrak sebaiknya memiliki luas permukaan yang kecil untuk mempermudah kontak antara bahan dengan pelarut, sehingga ekstraksi berlangsung dengan baik (Purseglove, *et al.*, 1981).

2.5.1.2 Lama dan Suhu Ekstraksi

Ekstraksi akan lebih cepat dilakukan pada suhu tinggi, tetapi hal ini dapat mengakibatkan beberapa komponen akan mengalami kerusakan (Moestofa, 1981). Sedangkan semakin lama waktu ekstraksi, kesempatan untuk bersentuhan antara bahan dengan pelarut makin besar sehingga hasilnya juga bertambah sampai titik jenuh larutan (Suryandari, 1981).

2.5.1.3 Jenis Pelarut

Menurut Somaatmadja (1981), ada dua pertimbangan utama dalam memilih jenis pelarut, yaitu pelarut mempunyai daya larut tinggi dan pelarut tidak berbahaya, atau tidak beracun. Pelarut yang sering digunakan dalam proses ekstraksi adalah aseton, etilen diklorida, etanol, heksana, isopropil alkohol dan metanol (Perry, 1984). Ditambahkan Dewi, *et al.*, (2007), penggunaan pelarut

harus memiliki kepolaran sesuai dengan kepolaran senyawa yang akan diekstrak.

2.6 Pelarut

Larutan adalah campuran homogen antara dua komponen/zat atau lebih. Dua komponen tersebut adalah pelarut (*solvent*) dan zat terlarut (*solute*). Pelarut merupakan komponen zat dalam jumlah lebih besar dalam suatu larutan (Rivai, 1995). 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 (Guenther, 1987).

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. Ditambahkan Komara (1991), banyaknya pelarut yang akan digunakan mempengaruhi konsentrasi jenuh larutan selama ekstraksi, makin banyak pelarut yang digunakan makin banyak zat terlarut yang terekstrak. 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 5.

Tabel 5. 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)

Sifat penting pelarut lainnya adalah kecenderungan membentuk ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen adalah harga tetapan dielektriknya dalam hubungan dengan momen dwi kutubnya. Terbentuknya sejumlah besar ikatan hidrogen menyebabkan tetapan dielektrika yang sangat tinggi (Day and Underwood, 1999).

2.6.1 Metanol

Metanol dahulu dibuat dari kayu melalui penyulingan dan kadang dinamakan alkohol kayu. Kata metil berasal 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, juga dikenal sebagai metil alkohol, *wood alcohol* atau spiritus, adalah senyawa kimia dengan rumus kimia CH₃OH. Ia merupakan bentuk alkohol paling sederhana. Pada "keadaan atmosfer" ia berbentuk cairan yang ringan, mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar, dan beracun dengan bau yang khas (berbau lebih ringan daripada etanol) (Wikipedia, 2009).

Tabel 6. 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
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: Wikipedia (2009)

2.6.2 Aseton

Aseton mempunyai nama lain dimetil asetat, dimetil keton, ketopropan, metilasetil, propanon, piroasetat eter dan piroasetis spirit. Rumus molekul dari aseton adalah CH₃COCH₃. 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). Sifat-sifat aseton dapat dilihat pada Tabel 7 di bawah ini:

Tabel 7. Sifat-sifat Aseton

No.	Karakteristik	Aseton
1.	Nama lain	β-ketopropana, dimetil keton, dimetilformaldehida, DMK
2.	Rumus bangun	CH ₃ COCH 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)

2.6.3 n-Heksana

Heksana adalah sebuah senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia C_6H_{14} (isomer utama *n*-heksana memiliki rumus $CH_3(CH_2)_4CH_3$). 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. Heksana juga umum terdapat pada bensin dan lem sepatu, kulit dan tekstil. Dalam keadaan standar senyawa ini merupakan cairan tak berwarna yang tidak larut dalam air (Wikipedia, 2010^b).

2.6.4 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. Senyawa ini sering disingkat EtOAc, dengan Et mewakili gugus etil dan OAc mewakili asetat. Etil asetat diproduksi dalam skala besar sebagai pelarut. Etil asetat adalah pelarut polar menengah yang volatil (mudah menguap), tidak beracun, dan tidak higroskopis. Etil asetat merupakan penerima ikatan hidrogen yang lemah, dan bukan suatu donor ikatan hidrogen karena tidak adanya proton yang bersifat asam (yaitu hidrogen yang terikat pada atom elektronegatif seperti fluor, oksigen, dan nitrogen. Etil asetat dapat melarutkan air hingga 3%, dan larut dalam air hingga kelarutan 8% pada suhu kamar. Kelarutannya meningkat pada suhu yang lebih tinggi. Namun demikian, senyawa ini tidak stabil dalam air yang mengandung basa atau asam (Wikipedia, 2010^c). Sifat-sifat etil asetat dapat dilihat pada Tabel 8 di bawah ini:

Tabel 8. Sifat-sifat Etil Asetat

No.	Karakteristik	Etil Asetat
1.	Nama lain	Etil ester, Ester asetat, Ester etanol
2.	Rumus Molekul	$C_4H_8O_2$
3.	Massa molar	88.12 g/mol
4.	Densitas dan Fase	0.897 g/cm ³ , <u>cairan</u> pada 30°C
5.	Titik Lebur	-83.6°C (189.55 K)
6.	Titik didih	77.1°C (350.25 K)
7.	Penampilan	Cairan tak berwarna

Sumber: Wikipedia (2010^o)

2.6.5 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. Berformula $CH_3-CH_2-O-CH_2-CH_3$, dietil eter digunakan sebagai pelarut biasa dan telah digunakan sebagai anestesi umum. Eter dapat dilarutkan dengan menghemat di dalam air (6.9 g/100 mL) (Wikipedia, 2010^d). Sifat-sifat dietil eter dapat dilihat pada Tabel 9 di bawah ini:

Tabel 9. Sifat-sifat Dietil Eter

No.	Karakteristik	Dietil Eter
1.	Nama IUPAC	Ethoxyethane 3-oxapentane
2.	Rumus Molekul	$C_4H_{10}O$ $C_2H_5OC_2H_5$
3.	Massa molar	74.12 g/mol
4.	Densitas dan Fase	0.7134 g/cm ³ , cair
5.	Titik Leleh	-116.3°C (156.85 K)
6.	Titik didih	34.6°C (307.75 K)
7.	Penampilan	Jernih, cairan tak berwarna
8.	Viskositas	0.224 cP at 25°C

Sumber: Wikipedia (2010^d)

2.6.6 Petroleum Eter

Petroleum eter, juga dikenal sebagai bensin, VM & P Naphtha, Petroleum Naphtha, Naphtha ASTM, Petroleum Spirits, X4 atau Ligroin, adalah berbagai

kelompok volatile, sangat mudah terbakar, cairan hidrokarbon campuran yang digunakan terutama sebagai nonpolar pelarut. Petroleum eter memiliki berat jenis antara 0,6 dan 0,8 tergantung pada komposisinya. Fraksi distilasi petroleum eter yaitu 30-40°C, 40-60°C, 60-80°C, 80-100°C, 80-120°C dan 100-120°C. Fraksi 60-80°C sering digunakan sebagai pengganti heksana. Petroleum eter mempunyai rumus molekul C_6H_6 (Wikipedia, 2010^e).

2.7 Partisi (Fraksinasi)

Metode partisi 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 penyarian cair-cair, yaitu proses pemisahan di mana suatu zat terbagi dalam dua pelarut yang tidak bercampur (Sholihah, 2010).

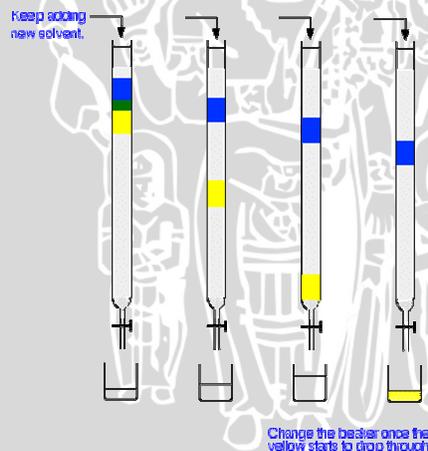
Istilah partisi/fraksinasi (pemisahan) atau distribusi (penyebaran) sering dipakai untuk menggambarkan bagaimana suatu senyawa memisah diantara dua medium yang tak saling melarutkan (Sudarmadji, 1996).

2.8 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan metode pemisahan yang terdiri atas kolom gelas dengan kran pada salah satu ujungnya diisi oleh fase diam berupa silika atau alumina. Ukuran diameter partikel fase diam berkisar 100 μm . Prinsip kerja kromatografi kolom adalah sebagai berikut kolom gelas dengan kran pada salah satu ujungnya diisi oleh fase diam berupa silika atau alumina. Campuran yang akan dipisahkan dituangkan pada bagian atas kolom yang berisi fase diam. Begitu pula fase gerak berupa pelarut organik dialirkan dari bagian atas kolom. Jumlah komponen penyusun campuran dapat terlihat sebagai cincin-cincin berwarna sepanjang kolom gelas dan ditampung pada tempat yang berbeda.

Metode pemisahan kromatografi kolom ini memerlukan bahan kimia yang banyak sebagai fase diam dan fase gerak, bergantung pada ukuran kolom gelas (Hendayana, 2006).

Pada kromatografi kolom, padatan fase diam dimasukkan kedalam tabung kolom dan campuran sampel dipisahkan dengan mengalirkan pelarut (fase gerak) melewati kolom tersebut. Alumina dan *silica gel* cocok untuk pemisahan semua jenis campuran golongan karotenoid dan ksantofil (Britton, *et al.*, 1995). Ditambahkan oleh Lenny (2006), pemilihan eluen sebaiknya dimulai dari pelarut yang tidak polar seperti heksan dan selanjutnya dilakukan peningkatan kepolaran dengan etil asetat atau pelarut yang lebih polar lainnya. Hal ini dimaksudkan agar komponen dapat terpisahkan dengan baik. Gambar kolom kromatografi dapat dilihat pada Gambar 3 di bawah ini.



Gambar 3. Proses Kromatografi Kolom (Chemistry,2007)

2.9 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi digunakan untuk memisahkan substansi campuran menjadi komponen-komponennya. Semua kromatografi memiliki fase diam (dapat berupa padatan, atau kombinasi cairan-padatan) dan fase gerak (berupa cairan atau

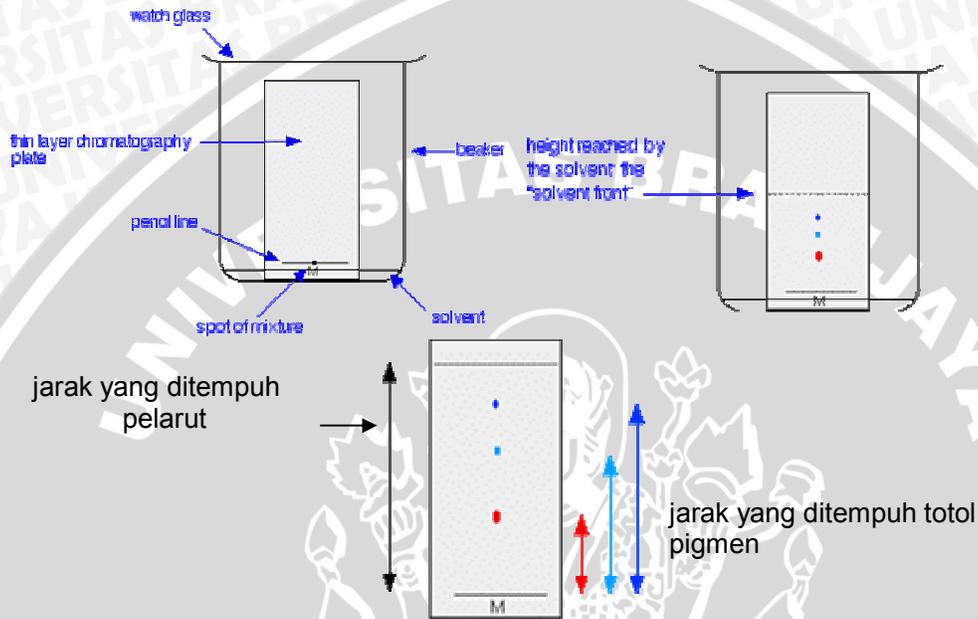
gas). Fase gerak mengalir melalui fase diam dan membawa komponen-komponen yang terdapat dalam campuran. Komponen-komponen yang berbeda bergerak pada laju yang berbeda. Pada kromatografi lapis tipis menggunakan sebuah lapis tipis silika atau alumina yang seragam pada sebuah lempeng gelas atau logam atau plastik yang keras. Untuk pengukuran jumlah perbedaan warna yang terbentuk dari campuran, dapat dilakukan berdasarkan pada jarak yang ditempuh oleh pelarut dan jarak yang ditempuh oleh bercak warna masing-masing (Clark, 2007). Nilai R_f untuk setiap warna dapat dihitung dengan rumus:

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

Pemisahan sistem pelarut dan komposisi lapisan tipis ditentukan oleh prinsip kromatografi yang akan digunakan. Untuk meneteskan sampel yang akan dipisahkan digunakan suatu *microsyringe* (penyutik berukuran mikro). Sampel diteteskan pada salah satu bagian tepi plat kromatografi (sebanyak 0,01-10 g zat). Pelarut harus nonpolar dan mudah menguap (Prima, 2009).

Identifikasi pigmen secara kualitatif dilakukan dengan cara menghitung nilai *Retardation factor* (R_f). Penentuan sistem KLT tergantung pada jenis pigmen yang akan diisolasi. Sistem KLT fase normal, fase diam yang digunakan lebih polar daripada fase geraknya sehingga pigmen nonpolar lebih cepat merambat. Sistem KLT fase terbalik, fase diam yang digunakan lebih nonpolar daripada fase geraknya sehingga pigmen polar lebih cepat merambat. Identifikasi secara manual dapat dilakukan dengan melihat warna total pada pelat KLT. Ketebalan warna total menunjukkan kuantitas pigmen sedangkan banyaknya noda menunjukkan jumlah pigmen yang terdapat dalam ekstrak (Jeffry, *et al.*, 1997). Ditambahkan oleh Warsito (2007), Selain dapat dimanfaatkan untuk metode pemisahan 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. Gambar Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dapat dilihat pada Gambar 4 di bawah ini.



Gambar 4. Kromatografi Lapis Tipis

2.10 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 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 sampel berwarna juga untuk sampel tak berwarna.

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. Konsentrasi unsur atau senyawa dapat dihitung dengan menggunakan kurva standar yang diukur pada panjang gelombang absorban tersebut, yaitu panjang gelombang yang diperoleh dari hasil nilai absorbansi yang tertinggi. 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).

Menurut Apriyantono, *et al.*, (1989), pada spektrofotometri panjang gelombang sinar yang digunakan harus dipilih terlebih dahulu agar komponen yang dianalisa menyerap sinar-sinar tersebut semaksimal mungkin. Dengan demikian penyerapan sedapat mungkin tidak dipengaruhi oleh komponen pengganggu maupun variasi yang mungkin terjadi dianalisa. Jika bahan yang dianalisa mempunyai warna tertentu, maka warna komplementernya merupakan bagian panjang gelombang yang sesuai untuk analisa tersebut. Panjang gelombang maksimum di dalam spektrofotometer dapat ditentukan dengan membuat kurva hubungan antara absorbans dan panjang gelombang. Panjang gelombang yang menghasilkan absorbans tertinggi merupakan panjang gelombang maksimumnya. Pada panjang gelombang maksimum ini absorptifitas molar (ϵ) dapat ditentukan dengan menggunakan hukum "*Lambert-Beer*" sebagai berikut:

$$A = \epsilon bc$$

Keterangan: A = absorbans

ϵ = absorptifitas molar

b = lebar bagian dalam kuvet

c = konsentrasi (molar)

Spektrum serapan kandungan tumbuhan dapat diukur dalam larutan yang sangat encer dengan pembanding blanko pelarut serta menggunakan spektrofotometer yang merekam otomatis. Senyawa berwarna diukur pada jangka 200 sampai 700 nm. Panjang gelombang serapan maksimum dan minimum pada spektrum serapan yang diperoleh, direkam (dalam nm), demikian juga kekuatan absorbansi (keterserapan) pada maksima dan minima yang khas (Harborne, 2006).



Gambar 5. Spektrofotometer UV-Vis 1601

Sumber : Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan adalah alga coklat *Sargassum filipendula* yang diperoleh dari perairan Pulau Talango, Sumenep, Madura. Bahan kimia yang digunakan adalah aseton, metanol, n-heksan, petroleum eter, etil asetat, dietil eter. Bahan kimia yang digunakan memiliki *grade* pro analis (PA) dengan merk Merck. Selain itu juga digunakan bahan lainnya yaitu CaCO_3 , air ledeng, garam grosok, *silica gel* F-254, alumunium foil, *cling wrap*, kertas saring kasar, kertas saring halus, tisu, gas nitrogen, pasir laut (*sea sand*), kapas, aquadest, kertas label.

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari peralatan untuk ekstraksi dan peralatan untuk analisa. Peralatan yang digunakan untuk ekstraksi antara lain timbangan digital, gunting, mortar, beaker glass 1000 ml, erlenmeyer 250 ml, gelas ukur 50 ml dan 100 ml, corong kaca, *hot plate*, *magnetic stirrer*, *rotary vacuum evaporator*, spatula, botol sampel, pipet volume 1 ml dan 10 ml, pipet tetes, statif, dan corong pisah. Peralatan yang digunakan untuk analisa adalah spektrofotometer UV-Vis 1601 merk Shimadzu, kolom kromatografi, statif, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipa kapiler, KLT (Kromatografi Lapis Tipis), penggaris, beaker glass 100 ml, pinset dan cawan petri.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksploratif. Penelitian eksploratif bersifat menjelajah, artinya penelitian yang dilakukan apabila pengetahuan tentang gejala yang diteliti masih sangat kurang atau tidak ada sama sekali. Penelitian eksploratif seringkali berupa studi kasus dari suatu kelompok atau golongan tertentu, yang masih kurang diketahui orang. (Yumei dan Yulia, 2009). Ditambahkan oleh Singarimbun dan Effendi (1989), metode eksploratif bertujuan untuk memperoleh pengetahuan tentang suatu gejala, sehingga setelah melalui tahap observasi, masalah serta hipotesisnya dapat dirumuskan. Dalam penelitian eksploratif, pengetahuan tentang gejala yang hendak diteliti masih sangat terbatas dan merupakan langkah pertama bagi penelitian yang lebih mendalam.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Sampel

Sampel dicuci dengan air laut untuk menghilangkan kotoran, kemudian dibilas dengan air tawar untuk menghilangkan pengaruh garam, selanjutnya sampel dikeringkan dengan kain dan dimasukkan ke dalam kantong *polyback* hitam dan disimpan ke dalam *freezer*.

3.3.2 Ekstraksi Pigmen Alga Coklat

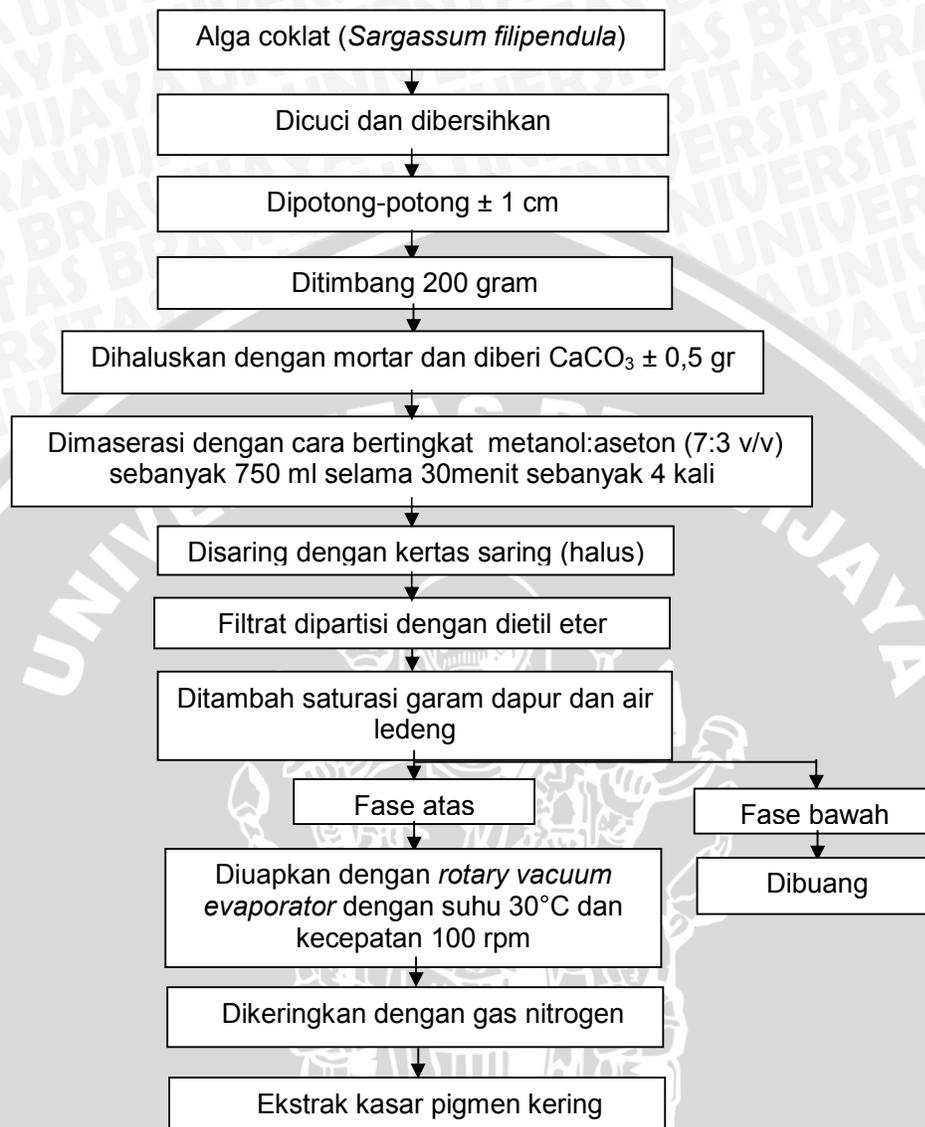
Ekstraksi pigmen dilakukan dengan menggunakan metode Pangastuti (2008) yang dimodifikasi oleh Muamar (2009). Alga coklat jenis *Sargassum filipendula* pertama-tama dicuci dan dibersihkan untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Alga coklat selanjutnya dipotong-potong sekitar 1 cm, ditimbang sebanyak 200 gram dengan timbangan digital, dihaluskan dengan mortar dan ditambahkan $\text{CaCO}_3 \pm 0,5$ gram. Fungsi penambahan CaCO_3 adalah sebagai

agen penetral. Proses pemotongan bertujuan untuk memperluas permukaan bidang alga coklat sehingga mempermudah proses ekstraksi (Yunizal, 1999). Alga coklat yang telah ditimbang kemudian diekstraksi, ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi bertingkat yaitu dengan cara perendaman menggunakan bahan kimia metanol:aseton dengan perbandingan (7:3, v/v) sebanyak 750 ml selama 60 menit pada suhu kamar. Adapun tujuan dari pemberian metanol yaitu karena pelarut metanol dapat melarutkan semua senyawa organik dalam bahan, sedangkan pelarut aseton berfungsi untuk mengangkat pigmen yang bersifat polar. Menurut Lenny (2006), maserasi adalah proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dalam perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara didalam sel dan diluar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan.

3.3.3 Fraksinasi Alga Coklat

Tahapan setelah ekstraksi dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring halus hingga diperoleh filtrat. Proses penyaringan ini bertujuan untuk mengambil zat-zat yang mengandung pigmen dan sisa-sisa rumput laut dibuang. Filtrat selanjutnya di partisi (fraksinasi) dengan menggunakan corong pisah. Fraksinasi adalah proses pemisahan suatu kuantitas tertentu dari campuran yang dibagi dalam beberapa jumlah kecil (fraksi), dimana komposisi perubahan sesuai dengan gradien tertentu (Wikipedia, 2010^f). Tujuan dari partisi ini adalah agar terbentuk 2 lapisan berdasarkan berat jenis (berat jenis yang tinggi berada dibawah dan berat jenis yang rendah berada di atas). Larutan yang diambil

adalah larutan yang terdapat pigmen di lapisan atas. Perbandingan yang digunakan antara filtrat:dietil eter:saturasi garam:air ledeng dalam proses partisi ini adalah 50ml:25ml:60ml:5ml. Proses partisi ini dilakukan dengan menggunakan larutan dietil eter sampai semua pigmen terangkut ke fase atas dan fase bawah. Menurut Shriener, *et al.*, (1980), pelarut polar akan melarutkan zat terlarut yang polar dan pelarut non polar akan melarutkan zat terlarut yang non polar juga atau disebut "*like dissolves like*". Langkah selanjutnya kemudian ditambahkan saturasi garam dan air ledeng (jika terjadi saturasi). Tujuan penambahan saturasi garam adalah untuk mengikat senyawa yang bersifat polar. Fase yang diambil adalah fase atas karena mengandung banyak pigmen. Hasil dari fase bawah tidak digunakan karena merupakan campuran dari metanol dan aseton. Hasil dari fase atas ditampung kedalam erlenmeyer kemudian di *rotary vacuum evaporator* dengan suhu 35°C dengan kecepatan 100 rpm untuk menguapkan pelarut sampai volume berkurang. Filtrat kemudian dipindahkan kedalam botol sampel dan pelarut diuapkan dengan gas nitrogen yang bertujuan agar pigmen tidak rusak sehingga pigmen kering sempurna. Ekstrak pigmen kering ditutup dengan *aluminium foil* dan disimpan dalam *freezer*. Prosedur ekstraksi untuk isolasi dapat dilihat pada Gambar 6 dibawah ini.



Gambar 6. Diagram Alir Ekstraksi dan Fraksinasi Pigmen Alga Coklat (Pangestuti, *et al.*, 2008) yang dimodifikasi oleh Muamar (2009)

3.3.4 Isolasi β -Caroten

Isolasi pigmen dari alga coklat dilakukan dengan kromatografi kolom dengan menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak heksan:etil asetat (8:2, v/v) \pm 150 ml. Fase diam (*Silica gel*) sebagai fase penyerap akan menahan komponen campuran sedangkan fase gerak akan melarutkan zat komponen

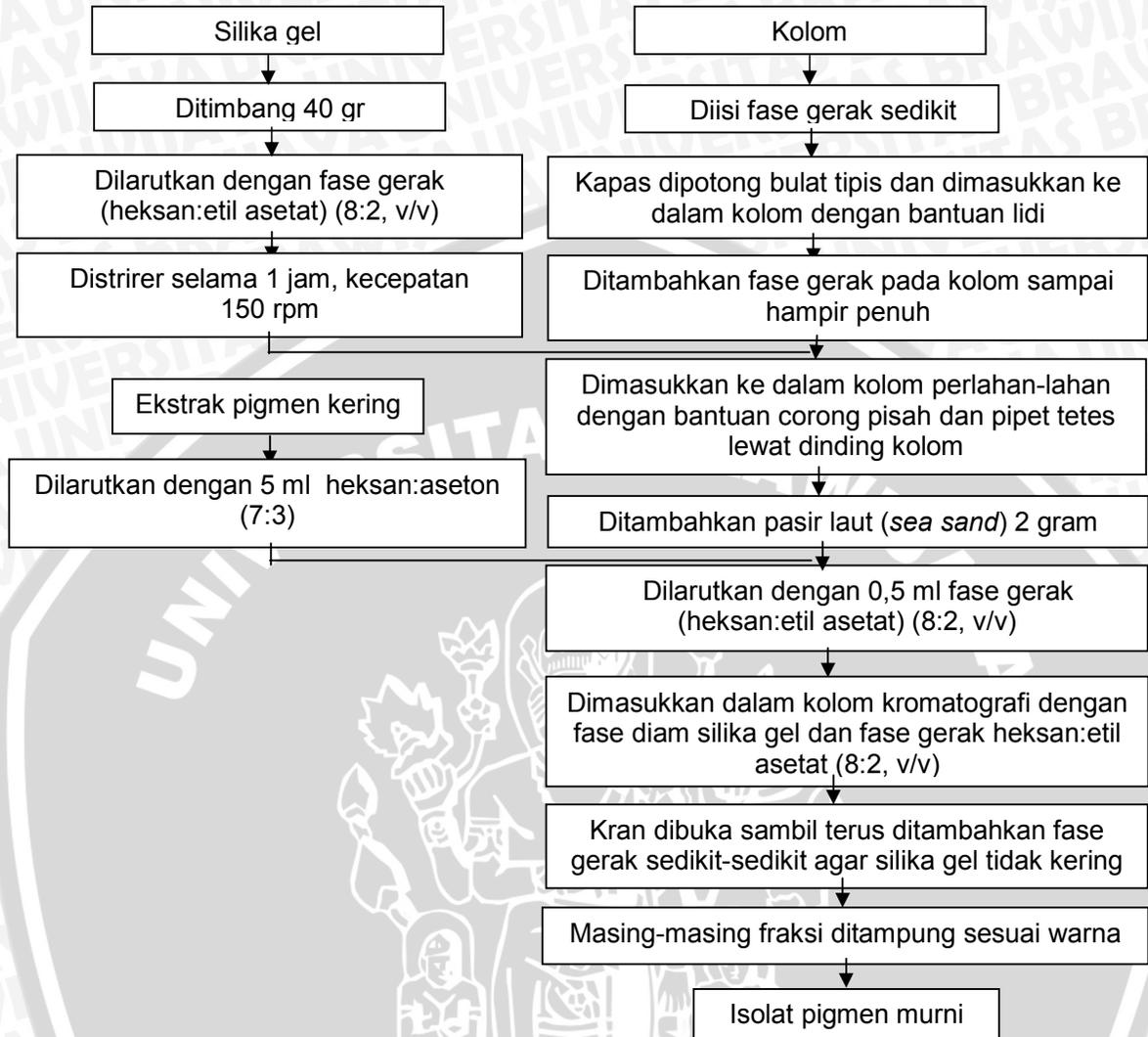
campuran. Komponen yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat. Silika gel ditimbang sebanyak 40 gram dan dilarutkan dengan fase gerak heksan:etil asetat (8:2, v/v) ± 50 ml dan di stirer selama 1 jam dengan kecepatan 150 rpm, agar tidak terdapat gelembung udara dan agar pada saat silika gel dimasukkan ke dalam kolom tidak retak atau pecah.

Sementara itu disiapkan kolom yang telah dipasang pada statif dan diisi fase gerak sedikit untuk membasahi kapas. Kapas tipis yang telah dicelupkan pada fase gerak dimasukkan ke dalam kolom dengan bantuan lidi kemudian ditambahkan fase gerak. Tahapan selanjutnya, bubuk *silica gel* dimasukkan ke dalam kolom dengan pipet tetes. *Silica gel* yang akan dimasukkan diaduk terus menerus agar tidak terdapat rongga udara di dalam kolom. Sisa *silica gel* yang menempel pada ujung kolom dielus dengan pelarut (fase gerak). Timbunan bubuk *silica gel* akan mencapai tiga perempat tinggi kolom. Pada proses tersebut kolom yang telah berisi fase diam dibiarkan selama 12 jam yang bertujuan untuk mengetahui apakah *silica gel* (fase diam) pecah atau tidak, jika pecah atau retak sebaiknya diulang lagi dari proses awal guna memperoleh hasil yang terbaik yaitu proses penjerapan oleh *silica gel* terhadap senyawa dengan sempurna, jika retak fase diam tidak melakukan proses penjerapan dengan baik. Tahap selanjutnya ditambahkan *sea sand* (pasir laut) yang bertujuan sebagai penyaring kotoran yang terdapat dalam sampel.

Tahap selanjutnya adalah memasukkan ekstrak pigmen kering yang telah dilarutkan dengan 10 ml fase gerak, kemudian dimasukkan ke dalam kolom kromatografi secara perlahan-lahan dengan menggunakan pipet volume 10 ml, setelah ekstrak pigmen meresap pada *silica gel* dalam kolom hingga batas atas *silica gel*, kemudian dimasukkan fase gerak heksan:etil asetat, sambil kran pada kolom dibuka. Fase gerak akan mengalir secara terus menerus sehingga

diperlukan penambahan fase gerak baru pada bagian atas kolom agar kolom tidak kering dan pecah. Fase gerak yang ditambahkan kedalam kolom ditingkatkan terus menerus kepolarannya dengan menaikkan konsentrasi heksan:etil asetat secara bertingkat dimana komposisi yang digunakan untuk heksan:etil asetat 8:2 v/v, 7:3 v/v, 6:4 v/v, dan 5:5 v/v, tujuannya untuk mengeluarkan pigmen yang bersifat non polar yaitu β -karoten ke yang lebih bersifat semi polar yaitu fukosantin. Kran pada kolom dibuka dan fraksi-fraksi yang terbentuk ditampung pada tabung reaksi sesuai warna masing-masing sambil terus menambahkan fase gerak sedikit demi sedikit agar silika gel tidak kering. Prosedur isolasi pigmen alga coklat dengan kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 7 dibawah ini.





Gambar 7. Diagram Alir Kromatografi Kolom (Pangestuti, *et al.*, 2008) yang dimodifikasi oleh Muamar (2009)

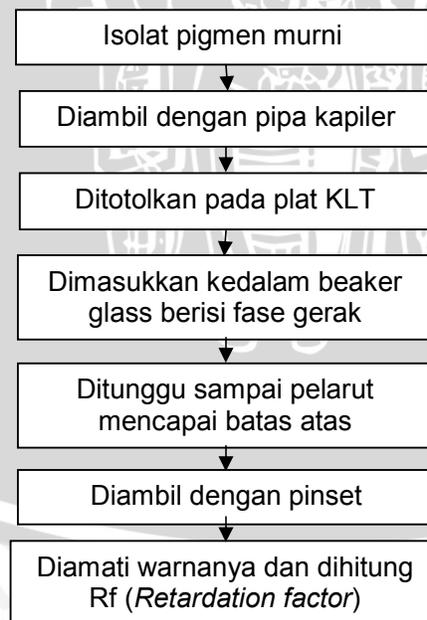
3.3.5 Identifikasi Pigmen β -carotene

3.3.5.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pada identifikasi pigmen β -karoten menggunakan KLT digunakan metode Pangestuti, *et al.*, (2008) dimana menggunakan fase diam *silica gel* F-254 dan fase gerak petroleum eter:aseton dengan perbandingan 7:3 v/v. Tahapan pertama dalam KLT adalah membuat garis pada pelat dengan menggunakan pensil 2B pada kedua ujung pelat, bagian bawah pelat berukuran 1 cm yang

bertujuan untuk menunjukkan posisi awal fraksi ketika ditolkan sedangkan bagian atas pelat berukuran 0,5 cm sebagai batas yang ditempuh pelarut.

Tahap selanjutnya setiap fraksi hasil kromatografi kolom ditolkan pada garis bagian bawah pelat dengan menggunakan pipa kapiler sambil ditiup-tiup. Tujuannya adalah agar fraksi yang ditolkan cepat mengering membentuk bercak. Setelah bercak tersebut mengering, pelat ditempatkan dalam *beakerglass* berisi fase gerak dalam jumlah yang tidak terlalu banyak ± 1 ml dan kertas saring yang dipotong memanjang, tujuan dari pemberian kertas saring adalah untuk mengetahui kehomogenan larutan. *Beakerglass* ditutup dengan cawan petri dan dibiarkan sampai pelarut bergerak mendekati garis atas, kemudian diambil dengan penjepit tanpa menyentuh garis atas pelat. Tahap selanjutnya, warna dari tiap pigmen pada pelat diamati dan dihitung nilai R_f -nya. Prosedur kromatografi lapis tipis (KLT) untuk identifikasi β -karoten dapat dilihat pada Gambar 8 dibawah ini.



Gambar 8. Diagram Alir Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (Pangestuti, *et al.*, 2008)

3.3.5.2 Spektrofotometer UV-Vis

Metode spektrofotometri dilakukan untuk mengetahui pola spektra pigmen yang digunakan dalam proses identifikasi pigmen. Fraksi hasil kromatografi kolom dan KLT yang diyakini sebagai β -karoten berdasarkan warna dan nilai R_f (*Retardation factor*) diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* dan dikeringkan dengan gas nitrogen. Pigmen yang sudah dikeringkan kemudian ditambah n-heksan PA 100% hingga pengenceran 10^3 , larutan pigmen dituang ke dalam kuvet ± 3 ml, selanjutnya kuvet dimasukkan ke dalam spektrofotometer UV-Vis 1601 merk Shimadzu dan dilakukan pengujian. Serapan maksimum yang dibentuk pada pola spektranya dibandingkan dengan serapan maksimum spektra β -karoten menurut Jeffrey, *et al.*, (1997).

3.3.5.3 Pengukuran Rendemen

Untuk mengetahui kandungan β -karoten yang dapat digunakan maka dilakukan penghitungan rendemen. Rendemen adalah perhitungan efektivitas prosedur, dihitung dengan membagi jumlah produk yang didapatkan dibagi dengan jumlah produk semula (Wikipedia, 2010⁹). Pigmen yang telah diketahui nilai absorbansinya dikonversi menggunakan hukum "*Lambert-Beer*" yaitu $A = \epsilon bc$ dan dihasilkan kadar β -karoten. Hasil kadar β -karoten kemudian dibagi jumlah total alga yang digunakan dikali seratus persen.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Pengamatan

Hasil penelitian isolasi β -carotene dari alga coklat (*Sargassum filipendula*) dengan parameter hasil kolom, uji identifikasi β -carotene, dan perhitungan rendemen dapat dilihat pada Tabel 10 dibawah ini:

Uji Identifikasi	Alat	Hasil	Literatur		
Rendemen		0,002%±0,000004			
Kolom	Kromatografi Kolom	135 isolat pigmen dalam tabung reaksi. Diperoleh 1-6 adalah β -carotene berwarna kuning	Menurut Jeffrey, <i>et al.</i> , (1997) menyatakan bahwa β -carotene berwarna kuning		
KLT	KLT	Rf : 0,94	Menurut Jeffrey dan Hymphrey (1975), nilai Rf pigmen β -karoten adalah 0,94		
Pola Spektra	Spektrofotometer UV-Vis	Pelarut		Menurut Jeffrey, <i>et al.</i> , (1997) dalam pelarut:	
		Heksan	Aseton	Heksan	Aseton
		320; 449,5; 476	344,5; 455; 480	422; 449,9; 477,7	426; 453,5; 479,9

4.1.1 Ekstraksi β -Carotene

Ekstraksi pigmen dilakukan dengan menggunakan metode Pangastuti (2008) yang dimodifikasi oleh Muamar (2009). Alga coklat jenis *Sargassum filipendula* pertama-tama dicuci dan dibersihkan untuk menghilangkan kotoran yang menempel. Alga coklat selanjutnya dipotong-potong sekitar 1 cm, ditimbang sebanyak 200 gram, dihaluskan dengan mortar dan ditambahkan $\text{CaCO}_3 \pm 0,5$ gram sebagai agen penetral. Menurut Lenny (2006), maserasi adalah proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Pada penelitian ini digunakan ekstraksi dengan maserasi bertingkat karena lebih efisien. Alga coklat yang telah ditimbang kemudian diekstraksi,

ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi bertingkat yaitu dengan cara perendaman menggunakan bahan kimia metanol:aseton dengan perbandingan (7:3, v/v) sebanyak 750 ml selama 60 menit pada suhu kamar. Hasil dari proses ekstraksi berupa filtrat yang mengandung metanol:aseton yang berwarna hijau kecoklatan. Hasil ekstraksi 200 gram alga coklat dengan pelarut metanol:aseton (7:3, v/v) diperoleh filtrat sebanyak \pm 700 ml filtrat.



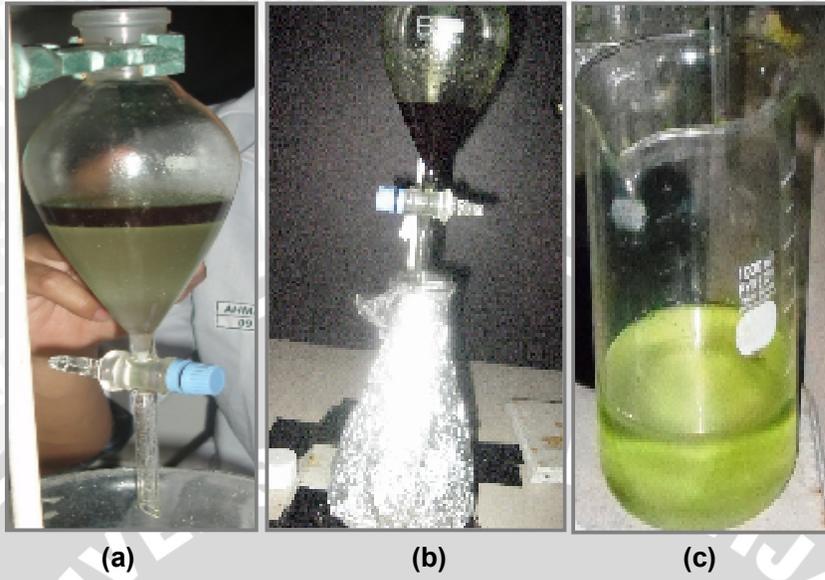
Gambar 9. Proses Maserasi
(a) Pencucian alga coklat
(b) Pemotongan alga coklat
(c) Penambahan CaCO_3
(d) Penambahan pelarut
(e) Perendaman (proses ekstraksi)

4.1.2 Fraksinasi β -carotene

Filtrat dari hasil ekstraksi yang telah disaring menggunakan kertas saring halus kemudian dipartisi (difraksinasi), partisi yaitu proses pemisahan di mana suatu zat terbagi dalam dua pelarut yang tidak bercampur (Sholihah, 2010). Filtrat dipartisi dengan menggunakan dietil eter, saturasi garam dan air ledeng dengan perbandingan yang digunakan adalah 50ml:25ml:60ml:5ml. Pada proses partisi akan terbentuk 2 fase (lapisan) yakni fase atas dan fase bawah. Fase-fase ini terbentuk karena adanya perbedaan kepolaran antara filtrat hasil ekstraksi, dietil eter, saturasi garam dan air ledeng, dimana senyawa yang bersifat polar akan tertarik bersama pelarut yang sifatnya juga polar dan senyawa yang bersifat non polar akan tertarik kepada pelarut yang sifatnya juga non polar. Metanol, aseton, saturasi garam, air ledeng dan sedikit pigmen berada pada bagian bawah corong pisah sehingga campuran tersebut disebut fase bawah, sedangkan sebagian besar pigmen yang terikat pada dietil eter berada dibagian atas dan disebut fase atas. Fase bawah dari partisi ini tidak digunakan karena pada fase ini kandungan pigmen yang terdapat didalamnya hanya sedikit, sedangkan fase atas ditampung pada erlenmeyer yang telah terlebih dahulu dibungkus *aluminium foil*. Fase atas yang dihasilkan \pm 25 ml. Berdasarkan hasil yang didapatkan dapat diasumsikan bahwa hampir seluruh dietil eter yang digunakan dalam proses partisi ini mampu mengikat pigmen.



Gambar 10. Proses Penyaringan Filtrat



Gambar 11. Proses Partisi

- (a) Dua fase yang terbentuk
- (b) Fase atas yang digunakan
- (c) Fase bawah yang tidak digunakan

Filtrat (fase atas) yang telah ditampung dalam erlenmeyer pada proses partisi kemudian di *rotary vacuum evaporator* dengan suhu 35°C dengan kecepatan 100 rpm untuk menguapkan pelarut sampai volume berkurang. Isolat ekstrak kasar pigmen yang telah kering ditampung pada botol sampel, namun karena isolat ekstrak kasar pigmen kering tidak dapat diambil, kemudian isolat tersebut dilarutkan dengan dietil eter hingga tidak ada lagi isolat yang menempel pada labu *rotary vacuum evaporator*. Dietil eter digunakan sebagai pelarut karena dapat melarutkan berbagai senyawa organik, selain itu dietil eter mudah menguap pada tekanan atmosferik pada 38°C. Pelarut dalam isolat ekstrak kasar pigmen diuapkan dengan gas nitrogen, sehingga didapatkan isolat ekstrak kasar pigmen kering.



Gambar 12. Proses Evaporasi



Gambar 13. Proses Pengeringan Sampel Dengan Gas Nitrogen

4.1.3 Isolasi Pigmen β -Carotene Dengan Kromatografi Kolom

Pemurnian pigmen β -karoten dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam *silica gel* dan fase gerak heksan:etil asetat (8:2, 7:3, 6:4, 5:5 v/v), yang bertujuan untuk mengeluarkan pigmen yang bersifat non polar ke yang lebih bersifat semi polar atau polar. Pemisahan pigmen hasil kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 14 di bawah ini.

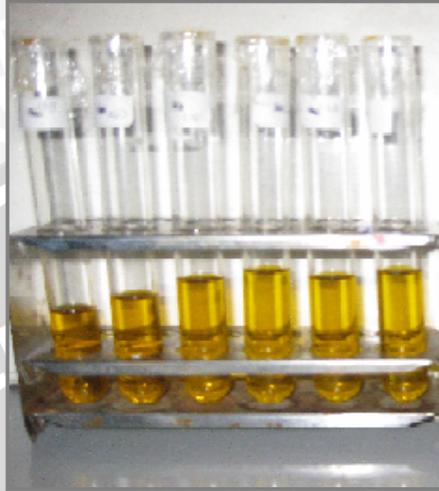


Gambar 14. Isolasi Pigmen β -karoten Dengan Kromatografi Kolom

Dari gambar diatas dapat dilihat terbentuknya pita-pita pigmen berdasarkan warna dan tingkat kepolarannya masing-masing. Warna yang terbentuk antara lain: kuning, hijau kebiruan, hijau kekuningan, oranye pekat.

Kromatografi kolom pada penelitian ini menggunakan *normal phase* dimana fase diam adalah *silica gel* bersifat lebih polar sedangkan fase geraknya bersifat cenderung non polar. Komponen yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat (Lenny, 2006). Pemisahan pigmen dengan kromatografi kolom menghasilkan 135 isolat yang ditampung pada tabung reaksi sesuai warnanya masing-masing. Isolat yang diyakini sebagai β -karoten terdapat pada tabung 1 sampai tabung ke-6 dengan ciri-ciri berwarna kuning. Jeffry, *et al.*, (1997), menyatakan pigmen β -karoten berwarna kuning-oranye. Berdasarkan hasil tersebut juga diketahui mengenai tingkat kepolaran pigmen β -karoten, yaitu bersifat non polar. Menurut Kumala, *et al.*, (2006), pelarut n-heksan merupakan pelarut non polar sehingga cenderung melarutkan komponen yang bersifat non polar, hal ini ditandai dengan keluarnya pigmen β -karoten pertama kali pada saat

isolasi alga coklat menggunakan kromatografi kolom. Pigmen β -karoten hasil isolasi dapat dilihat pada Gambar 15 di bawah ini.



Gambar 15. Pigmen β -Carotene Hasil Isolasi Kromatografi Kolom

4.1.4 Identifikasi β -Carotene

4.1.4.1 Identifikasi Pigmen β -Carotene dengan Kromatografi Lapis Tipis

Untuk membuktikan hasil isolasi yang didapatkan adalah pigmen β -karoten, maka harus dilakukan identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mengetahui nilai Rf-nya (*Retardation factor*). Identifikasi pigmen β -karoten hasil kromatografi kolom dilakukan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam silika gel dan fase gerak petroleum eter:aseton (7:3, v/v), dengan ukuran plat KLT 1×5 cm. Hasil KLT pigmen β -karoten dapat dilihat pada Gambar 16 di bawah ini.



Gambar 16. Hasil KLT Pigmen β -Carotene

Hasil KLT di atas menunjukkan total warna yang terbentuk hanya satu, yaitu warna kuning, hal ini menunjukkan bahwa isolat yang dihasilkan adalah pigmen β -karoten murni. Tahap selanjutnya dilakukan perhitungan nilai Rf dari hasil identifikasi β -karoten dengan KLT, didapatkan nilai Rf yaitu 0,94. Menurut Jeffrey dan Hymphrey (1975), nilai Rf pigmen β -karoten adalah 0,94. Senyawa hasil isolasi tersebut diasumsikan merupakan pigmen β -karoten murni karena keidentikan ciri-ciri hasil analisa KLT.

4.1.4.2 Identifikasi Pola Spektra dan Panjang Gelombang Maksimum (λ_{\max}) Pigmen β -Carotene

Untuk membuktikan hasil isolasi yang didapatkan adalah pigmen β -karoten, maka harus dilakukan identifikasi pola spektra dan serapan maksimumnya. Hasil isolasi yang diyakini sebagai β -karoten dan telah dianalisis kualitatif dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis) selanjutnya dianalisis kualitatif menggunakan spektrofotometer yang bertujuan untuk mengetahui pola spektra dan serapan maksimumnya. Menurut Harborne (1987), identifikasi karotena yang meyakinkan didasarkan pada pembandingan spektrum tampak paling sedikit dalam dua pelarut. Pola spektra dan serapan maksimum hasil penelitian selanjutnya

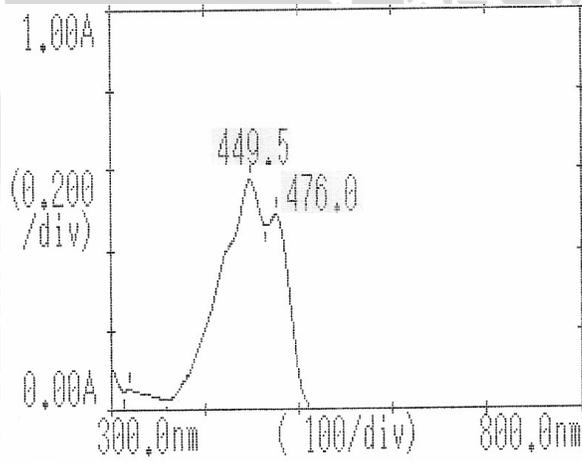
dibandingkan dengan penelitian Jeffrey, *et al.*, (1997) dengan pelarut yang sama. Serapan maksimum pigmen β -karoten hasil isolasi dalam pelarut heksan dan aseton dapat dilihat pada Tabel 11 dan Tabel 12, sedangkan pola spektra β -karoten dalam pelarut heksan dan aseton dapat dilihat pada Gambar 17 di bawah ini di bawah ini.

Tabel 11. Serapan Maksimum Pigmen β -carotene

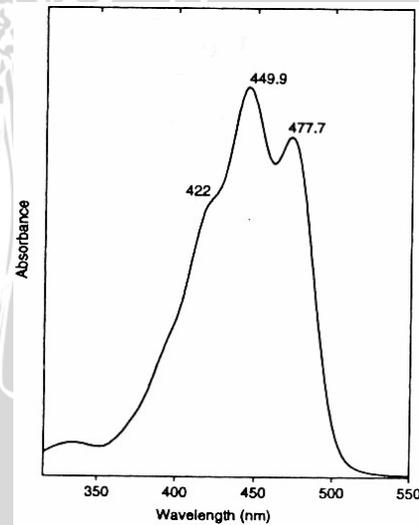
No	Jenis pigmen	Serapan maksimum (nm) dalam heksan	
		hasil isolasi	Jeffrey, <i>et al.</i> ,(1997)
1	β -carotene	320; 449,5; 476	422; 449,9; 477,7

Tabel 12. Serapan Maksimum Pigmen β -carotene

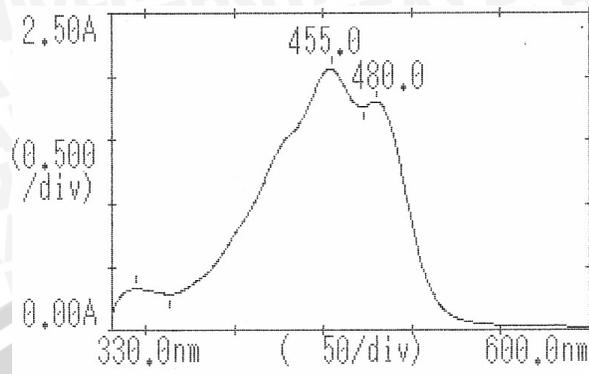
No	Jenis pigmen	Serapan maksimum (nm) dalam aseton	
		hasil isolasi	Jeffrey, <i>et al.</i> ,(1997)
1	β -carotene	344,5; 455; 480	426; 453,5; 479,9



(a)



(b)



(c)

- Gambar 17.** (a) Pola spektra pigmen β -carotene hasil isolasi dalam pelarut heksan
 (b) Pola spektra β -carotene (Jeffrey, *et al.*, 1997)
 (c) Pola spektra pigmen β -carotene hasil isolasi dalam pelarut aseton

Gambar diatas menunjukkan bahwa pola spektra β -karoten dengan pelarut heksan dan aseton (Gambar 17 a dan c) apabila dibandingkan dengan pola spektra β -karoten yang ditunjukkan pada gambar 17 b (pola spektra β -karoten dalam penelitian Jeffrey, *et al.*, (1997)), memiliki pola yang sama. Untuk serapan maksimumnya (λ_{\max}) dalam pelarut heksan pada Tabel 11 diatas, terlihat serapan maksimum β -karoten berada pada panjang gelombang 320 nm, 449,5 nm dan 476 nm. Hasil ini mempunyai kemiripan dengan serapan maksimum β -karoten dalam penelitian Jeffrey, *et al.*, (1997) dengan pelarut yang sama, yaitu 422 nm, 449,9 nm, dan 477,7 nm. Begitu juga dengan serapan maksimum (λ_{\max}) dalam pelarut aseton pada tabel 12 diatas, terlihat serapan maksimum β -karoten berada pada panjang gelombang 344,5 nm, 455 nm, dan 480 nm tidak berbeda jauh dengan serapan maksimum β -karoten dalam penelitian Jeffrey, *et al.*, (1997) dengan pelarut yang sama, yaitu 426 nm, 453,5 nm, dan 479,9 nm. Pergeseran yang terjadi diduga karena adanya interaksi antara zat terlarut (pigmen) dan

pelarut yang sangat ditentukan oleh kualitas pelarut atau kemurnian pelarut yang digunakan untuk analisa (Toto, *et al.*, 2006).

4.1.5 Rendemen β -carotene

Kandungan pigmen β -karoten pada alga coklat (*Sargassum filipendula*) dapat dihitung dengan cara hasil kadar β -karoten (gram) kemudian dibagi jumlah total alga coklat yang digunakan (gram) dikali seratus persen dengan 2 kali ulangan. Hasil rendemen β -karoten yang didapatkan yaitu $0,002\% \pm 0,000004$.

4.2 Pembahasan

4.2.1 Kromatografi Kolom

Pigmen β -karoten hasil isolasi kromatografi kolom berwarna kuning dan terlarut pertama oleh fase gerak heksan:etil asetat (8:2, v/v) dan fase diam silika gel. Penelitian Jeffrey, *et al.*, (1997) memperlihatkan pigmen β -karoten berwarna kuning-oranye. Penelitian tersebut diperkuat oleh Kumala, *et al.*, (2006), pelarut n-heksan merupakan pelarut non polar sehingga cenderung akan melarutkan komponen yang bersifat non polar.

Pigmen warna yang dihasilkan pada penelitian ini sebanyak 135 isolat yang ditampung pada tabung reaksi sesuai warnanya masing-masing. Penelitian sebelumnya oleh Wijayanti (2009) menyatakan pemisahan pigmen dihasilkan 71 isolat. Perbedaan hasil isolat pigmen diduga karena perbandingan pelarut yang digunakan berbeda, panjang dan diameter kolom yang digunakan berbeda. Panjang dan diameter kolom yang digunakan adalah 40 cm dan 2,5 cm, selain itu perbedaan penampungan pada tabung reaksi.

4.2.2 Kromatografi Lapis Tipis

Nilai Rf digunakan untuk memperkuat identifikasi berdasarkan warna. Nilai Rf β -karoten 0,94. Penelitian Jeffrey dan Hymphrey (1975) memperlihatkan pigmen kuning memiliki kisaran Rf 0,91-0,94 menggunakan fase gerak yang sama dengan penelitian ini, yaitu petroleum eter:aseton (7:3, v/v). Britton *et al.*, (1995), mendukung pernyataan tersebut bahwa nilai Rf β -karoten antara 0,8-1,0 dengan fase gerak yang lebih bersifat nonpolar. Pernyataan Jeffrey, *et al.*, (1997) yang didukung oleh pernyataan Ati, *et al.*, (2006), sistem KLT ini menggunakan “normal phase”, dimana fase diam bersifat lebih polar daripada fase geraknya, sehingga menyebabkan pigmen karotenoid bergerak mengikuti fase gerak dan memiliki nilai Rf lebih tinggi.

4.2.3 Pola Spektra dan Panjang Gelombang β -Karoten

Penelitian ini memperlihatkan pola spektra dan panjang gelombang β -karoten dalam pelarut heksan 320 nm, 449,5 nm dan 476 nm. Penelitian oleh Jeffrey, *et al.*, (1997) menunjukkan panjang gelombang β -karoten dengan pelarut yang sama yaitu 422 nm, 449,9 nm, dan 477,7 nm, sedangkan penelitian Hirota dan Kumugai (1990), menunjukkan panjang gelombang β -karoten dengan pelarut yang sama pula yaitu 425 nm, 450 nm, dan 480 nm. Penelitian panjang gelombang β -karoten diidentifikasi dengan pelarut aseton dihasilkan 344,5 nm, 455 nm, dan 480 nm. Penelitian oleh Jeffrey, *et al.*, (1997) memperlihatkan panjang gelombang β -karoten dengan pelarut yang sama yaitu 426 nm, 453,5 nm, dan 479,9 nm. Panjang gelombang β -karoten yang terbentuk tidak berbeda jauh dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya. Terjadinya sedikit pergeseran panjang gelombang diduga karena perbedaan alat dan kemurnian pelarut yang digunakan. Toto, *et al.*, (2006) menyatakan pergeseran yang terjadi

diduga disebabkan oleh kualitas pelarut atau kemurnian pelarut yang digunakan untuk analisa.

4.2.4 Rendemen β -Karoten

Hasil rendemen β -karoten yang didapatkan yaitu $0,002\% \pm 0,000004$. Menurut Kusumawati dan Tazwir (2009), rendemen β -karoten pada *Sargassum* sp. adalah 0,06%. Rendemen β -karoten sangat rendah diduga karena perbedaan habitat dan kedalamannya. Penelitian Nurdiana, et al., (2008) menunjukkan keberadaan klorofil dan karotenoid pada rumput laut sangat dipengaruhi tempat tumbuhnya, salah satu faktor yang berperan adalah kedalaman tempat tumbuh.



5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian mengenai studi isolasi β -carotene dari alga coklat (*Sargassum filipendula*) dengan menggunakan kromatografi kolom diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

- Pigmen β -karoten dari jenis *Sargassum filipendula* yang di isolasi menggunakan kromatografi kolom berwarna kuning, dengan rendemen β -karoten yang didapatkan yaitu $0,002\% \pm 0,000004$.
- Nilai Rf pigmen β -karoten hasil identifikasi KLT (Kromatografi Lapis Tipis) adalah 0,94.
- Identifikasi pola spektra dan panjang gelombang (λ_{max}) pigmen β -karoten dengan pelarut n-heksan dan aseton memiliki pola dan panjang gelombang yang mirip dengan penelitian Jeffrey, *et al.*, (1997).

5.2 Saran

Isolasi pigmen β -karoten sebaiknya menggunakan alat yang lebih sederhana dan tidak membutuhkan waktu lama dalam prosesnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Anis, E. 2008. **Pigmen Sebagai Zat Pewarna dan Antioksidan Alami**. UMM Press. Malang.
- Anonymous. 2008. **Sargassum filipendula**. www.diaryroomblog.blogspot.com. Diakses Tanggal 26 Juni 2010.
- _____. 2009. **Sargassum filipendula**. www.itis.gov. Diakses Tanggal 26 Juni 2010.
- Apriyantono, A., D. Fardiaz., N. L Puspitasari., Sedarnawati., dan S. Budiyanto. 1989. **Analisis Pangan**. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Ati, N. H; P. Rahayu; S. Notoedarmo; dan L. Limantara. 2006. **Komposisi dan Kandungan Pigmen Tumbuhan Pewarna Alami Tenun Ikat di Kabupaten Timor Tengah Selatan, Propinsi Nusa Tenggara Timur**. Indo. J. Chem Vol 6 (3), 325 – 331.
- Atmadja, W.S., A. Kadi, Sulistijo, dan Rachmaniar. 1996. **Pengenalan Jenis-jenis Rumput Laut Indonesia**. Puslitbang Oseanologi LIPI. Jakarta.
- Bachtiar, E. 2007. **Penelusuran Sumber Daya Hayati Laut (Alga) Sebagai Biotarget Industri, Makalah**. Universitas Padjadjaran Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Jatinangor. Bandung.
- Bernasconi, G. H. 1995. **Teknologi Kimia 2**. PT. Pradya Paramita. Jakarta. Diterjemahkan oleh L. Handoyo.
- Bisnis. 2008. **Sumenep Andalkan Budidaya Rumput Laut**. wartagiligenting.com. Diakses Tanggal 02 Juni 2010.
- Britton, G., S. Liaen-Jansen and H. Pfander. 1995. **Carotenoids**. Vol. 1 A. Isolation and Analysis. Birkhaver Verlag Basel. Switzerland.
- Chemistry. 2007 . **Kromatografi Kolom**. <http://www.chem-is-try.org>. diakses tanggal 13 April 2009.
- Christiana, R; A. B Susanto; dan L. Limantara. 2008. **Analisis Pigmen Ekstrak Aseton Rumput Laut *Udotea sp*, *Amphiora rigida*, dan *Turbinaria conoides***. Prosiding Sains dan Teknologi Pigmen Alami. Hal.194-210.
- Clark, J. 2007. **Kromatografi Lapis Tipis**. http://www.chem-is-try.org/materi_kimia/instrumen_analisis/kromatografi1/kromatografi_lapis_tipis/. Diakses Tanggal 02 Juni 2010.
- Day, R. A dan Underwood. 1999. **Analisis Kimia Kuantitatif**. Penerbit Erlangga. Jakarta. Diterjemahkan Pudjaatmaka.

- Dewi, J. R., T. Estiasih dan E. S. Murtini. 2007. **Aktivitas Antioksidan Dedak Sorgum Lokal Varietas Coklat (*Sorghum bicolor*) Hasil Ekstraksi Berbagai Pelarut.** Jurnal Teknologi Pertanian, Vol. 8 No. 3. Desember 2007.
- Ensiklopedia. 2009. **Algae-algae and Their Characteristic, Types of Algae, Ecological Relationship, Factors Limiting The Productivity of Algae.** www.science.jrank.org. Diakses Tanggal 28 Juni 2010.
- Gross, J. 1991. **Pigments In Vegetables Chlorophylls and Carotenoids.** An Avi Book. New York.
- Guenther, E. Diterjemahkan oleh S. Ketaren. 1987. **Minyak Atsiri I.** Penerbit UI. Jakarta.
- Harborne, J.B. 2006. **Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan.** Penerbit ITB. Bandung.
- Hart, H. 1983. **Kimia Organik.** Houghton Mifflin Co. Michigan State University. USA. Alih Bahasa Dr. Suminar Achmadi Ph. D. Erlangga. Jakarta.
- Haryanto, R. 2008. **Agar-agar Kaya Serat Penuh Manfaat.** Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Hegazi, M. M; A. P Ruzafa; L. Almela; dan M. E Candela. 1998. **Separation and Identification of Chlorophylls and Carotenoids From *Caulerpa prolifera*, *Jania rubens*, and *Padina pavonica* by Reversedphase High-Performance Liquid Chromatography.** Journal of Chromatography A, 829. P. 153-159.
- Hendayana, S. 2006. **Kimia Pemisahan.** PT. Remaja Rosdakarya. Bandung.
- Huda, N. 2001. **Pemeriksaan Kinerja Spektrofotometer UV-Vis. GBC911A Menggunakan Pewarna Tartrazine CL 19140.** Bidang Evaluasi dan Pengembangan Keselamatan Instalasi. Sigma Epsilon.
- Hui dan Yaws. 2008. **Sifat-Sifat Beta Karoten.** <http://www.ch.ic.ac.uk/2005>. Diakses tanggal 2 Juni 2010.
- Indriani, H dan Sumarsih. 1992. **Budidaya, Pengolahan dan Pemasaran Rumput Laut.** Penebar Swadaya. Jakarta.
- Jeffrey, S. W, R. F. C Mantoura, and S. W Wright. 1997. **Phytoplankton Pigments in Oceanography.** (Dalam Pangestuti R, L. Limantara, dan A. Susanto. 2007. **Kandungan dan Aktivitas Antioksidan Fukosantin *Sargassum polycystum* C. A Agardh.** Prosiding Back to Nature dengan Pigmen Alami Hal. 201-209.
- Jeffrey, S. A and G. Hymphrey. 1975. **Biochem. Physiol. Pflanzen.** 197:191-194.
- Kadi, A. 2008. **Beberapa Catatan Kehadiran Marga *Sargassum* di Perairan Indonesia.** Pusat Penelitian Oseanografi-LIPI. Jakarta.

- Komara, A. 1991. **Mempelajari Ekstraksi Oleoresin dan Karakteristik Mutu Oleoresin dari Bagian Cabe Rawit (*Capsicum frutescens*, L)** dalam Anam, C. (2000). **Ekstraksi Oleoresin Jahe (*Zingiber officinale*) Kajian Dari Ukuran Bahan, Pelarut, Waktu dan Suhu**. Tesis. Universitas Brawijaya. Malang.
- Kumala, S., Kusmardi dan D. D. Indriatmoko. 2006. **Pengaruh Ekstrak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam) Terhadap Pertumbuhan *In Vitro* Limfosit Dan Sel Tumor**. Fakultas Farmasi Universitas Pancasila. Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Langseth, L. 1995. **Oxidant, Antioxidant, And Diseases Prevention**. International Life. Science Institute Press. Belgium.
- Lenny, S. 2006. **Isolasi dan Uji Bioaktivitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metode Uji Brine Shrimp**. USU repository.
- Moestofa, A. 1981. **Isolasi Oleoresin Dari Lada Hitam**. Prosiding Minyak Atsiri II. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Industri Hasil Pertanian. Bogor.
- Nurdiana, D. N dan L. Limantara. 2008. **Ragam Pigmen Rumput Laut Coklat: Potensi dan Aplikasi**. Departemen Biologi, Universitas Airlangga. Surabaya.
- Pangestuti, R, L. Limantara, dan A. Susanto. 2007. **Kandungan dan Aktivitas Antioksidan Fukosantin *Sargassum polycystum* C. A Agardh**. Prosiding Back to Nature dengan Pigmen Alami Hal. 201- 209.
- Pekey Otniel dan Karwur. 2008. **Biosintesis Karotenoid Pada alga hijau (*Haematococcus pluvialis*)** . Jurnal Prosiding Sains dan Teknologi Pigmen Alami. Seminar Nasional Pigmen 2008.
- Perry. 1984. dalam Syaflan dan Hastuti. 2002. **Ekstraksi Oleoresin Suatu Alternatif Untuk Memberikan Nilai Tambah Bagi Vanili**. Seminar PATPI. Malang.
- Prangdimurti, E. 2007. **Pigmen Alami**. Laporan Praktikum Kimia dan Biokimia Pangan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Pratikno, M. K, S. P. Hastuti, dan L. Limantara. 2004. **Pengaruh Penyimpanan Daun Terhadap Komposisi Pigmen Daun dan Gelatin Cincu Perdu (*Melastoma polyanthum* B)**. Prosiding Seminar Nasional Kimia VI Hal : 127-133.
- Purseglove, J. W., E. G Brown., C. L Green and S. R. J Robbin. 1981. **Spices**. Longman Singapore Publ. Singapore.
- Rusdiana. 2004. **Vitamin**. Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatra Utara. Digitized By USU Digital Library.
- Rivai, H. 1995. **Azas Pemeriksaan Kimia**. UI Press. Jakarta.

- Riyadi, W. 2009. **Macam Spektrofotometri dan Perbedaannya (Vis, UV, dan IR)**. www.blogspot.com. Diakses tanggal 03 Juli 2010.
- Rodriguez, D.B. 2001. **A Guide to Carotenoid Analysis in Food**. ILSI Press. International Life Science Institute. Washington.
- Scheflan., Leopold dan Morns B. Jacobs. 1983. **Bioactive Properties of Wild Blueberry Fruits**. Journal Food Sciences.
- Sholihah, H. M. 2010. **Uji Afrodisiaka Fraksi Larut Air Ekstrak Etanol 70% Kuncup Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr.& Perry) Terhadap Libido Tikus Jantan**. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Shriner, R. L., R. C. Fuson., D. Y Curtin., C. K. F Herman and T. C Morili. 1980. **The Systematic Identificatin of Organic Compounds**. 6nd Edition. John Willey and Sons Inc. Singapore.
- Silalahi, J. 2006. **Makanan fungsional**. Kanisius. Yogyakarta.
- Smith, G.M. 1950. **The Fresh Water Algae of The United States**. 2nd Edition. Volume I. Mc Graw-Hill Book Company. New York.
- Somaatmadja, D. 1981. **Prospek Pengembangan Industri Oleoresin di Indonesia**. Komunikasi No. 201. BBIHP. Bogor.
- Soviani, H. Soetjipto, dan L. Limantara. 2004. **Komposisi Pigmen Tomat Buah (*Lycopersicum esculentum* Mill) Varietas Arthaloka Selama Pematangan**. Prosiding Seminar Nasional Kima VI Hal : 197-203.
- Singarimbun, M. dan Effendi, S. 1989. **Metode Penelitian Survai**. Edisi Revisi. LP3ES. Jakarta.
- Strain, H. H., Winston, M. M., and G. Hardins. 1943. **Xanthophylls and Carotenes of Diatoms, Brown Algae, Dinoflagellates, and Sea-Anemones**. Carnegie institution of Washington. Division of Plant Biology. Stanford University. California.
- Sudarmadji, S., B. Haryono dan Suhardi. 1997. **Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian**. Liberty. Yogyakarta.
- Suryandari, S. 1981. **Pengambilan Oleoresin Jahe Dengan Cara Solvent Extraction**. Buletin IHP I. BBIHP. Bogor.
- Susanto, A. B. 2008. **Penelitian Rumput Laut Di Indonesia dan Potensi Pemanfaatan Klorofil**. Prosiding Sains dan Teknologi Pigmen Alami. Hal: 43-50.
- Susanto, W. H. 1999. **Teknologi Lemak dan Minyak Makan**. Jurusan THP Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.

- Toto, Z. A. D, P. Rahayu, F. F. Karwur, dan L. Limantara. 2006. **Identifikasi dan Isolasi Pigmen Karotenoid Berbagai Jenis Kuning Telur Unggas**. *Organsime*, Vol I (2) : 100-110.
- Vogel, A. I. 1987. **Textbook of Practical Organic Chemistry**, Revised by Furnies, B.S. Fourth Edition. New York.
- Voight, R. 1994. **Lehrbuch Der Pharmazeutischen Technologie 5th Edition**. (Terjemahan S. Noerono). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Wanto dan M. Ramli. 1977. **Alat-Alat Industri Kimia I**. Departemen Pendidikan Dan Kebudayaan. Jakarta.
- Warsito. 2007. **Metode Isolasi dan Pemurnian Senyawa Metabolit Sekunder Dari Tanaman**. Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Malang.
- Wijaya, L. S. 2001. **Ekstraksi dan Karakterisasi Pigmen Serupa Dengan Antosianin dari Kulit Buah Rambutan Binjai**. Tesis. Program Studi THP Pasca Sarjana Universitas Brawijaya. Malang.
- Wijayanti, L. 2009. **Studi Komposisi Pigmen Dan Kandungan Fukosantin Pada Alga Coklat (*Sargassum duplicatum*, *Sargassum polycystum*, *Sargassum filipendula*, *Padina australis*, Dan *Turbinaria conoides*)**. Skripsi. Program Studi THP Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang.
- Wikipedia. 2009. **Metanol**. www.wikipedia.com. Diakses tanggal 30 Juni 2010.
- _____. 2010^a. **Beta Carotene**. www.wikipedia.com. Diakses tanggal 30 Juni 2010.
- _____. 2010^b. **Heksana**. www.wikipedia.com. Diakses tanggal 30 Juni 2010.
- _____. 2010^c. **Etil Asetat**. www.wikipedia.com. Diakses tanggal 30 Juni 2010.
- _____. 2010^d. **Dietil Eter**. www.wikipedia.com. Diakses tanggal 30 Juni 2010.
- _____. 2010^e. **Petroleum Eter**. www.wikipedia.com. Diakses tanggal 30 Juni 2010.
- Warsito. 2007. **Metode Isolasi dan Pemurnian Senyawa Metabolit Sekunder Dari Tanaman**. Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Malang.
- Winarno. 1990. **Teknologi Pengolahan Rumput Laut**. Pustaka Sinar Harapan. Jakarta.
- Yunizal. 1999. **Teknologi Pengolahan Alginat**. Badan Riset Kelautan dan Perikanan. Jakarta.
- Zaifbio. 2009. **Modul Algae**. Wordpress.com. Diakses tanggal 30 Juni 2010.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pembuatan Larutan

Larutan Ekstraksi

Metanol : aseton (7 : 3, v/v) → membuat 750 ml

$$\text{Metanol} = \frac{7}{10} \times 750 \text{ ml} = 525 \text{ ml}$$

$$\text{Aseton} = \frac{3}{10} \times 750 \text{ ml} = 225 \text{ ml}$$

Larutan Kolom

Heksan : etil asetat (8 : 2, v/v) → membuat 50 ml

$$\text{Heksan} = \frac{8}{10} \times 50 \text{ ml} = 40 \text{ ml}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{2}{10} \times 50 \text{ ml} = 10 \text{ ml}$$

Heksan : etil asetat (7 : 3, v/v) → membuat 50 ml

$$\text{Heksan} = \frac{7}{10} \times 50 \text{ ml} = 35 \text{ ml}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{3}{10} \times 50 \text{ ml} = 15 \text{ ml}$$

Heksan : etil asetat (6 : 4, v/v) → membuat 50 ml

$$\text{Heksan} = \frac{6}{10} \times 50 \text{ ml} = 30 \text{ ml}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{4}{10} \times 50 \text{ ml} = 20 \text{ ml}$$

Heksan : etil asetat (5 : 5, v/v) → membuat 50 ml

$$\text{Heksan} = \frac{5}{10} \times 50 \text{ ml} = 25 \text{ ml}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{5}{10} \times 50 \text{ ml} = 25 \text{ ml}$$

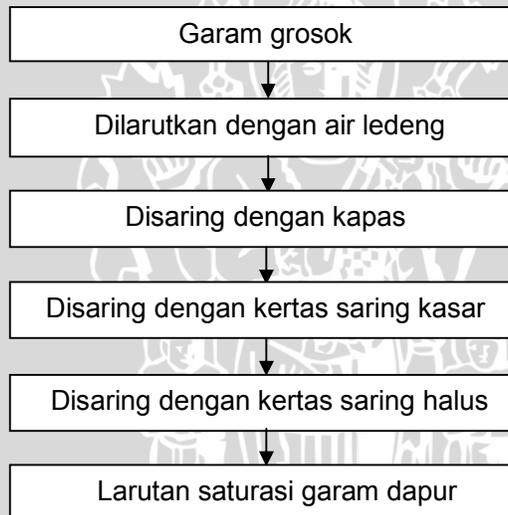
Larutan KLT

Petroleum eter : aseton (7 : 3, v/v) → membuat 1 ml

$$\text{Petroleum eter} = \frac{7}{10} \times 1 \text{ ml} = 0,7 \text{ ml}$$

$$\text{Aseton} = \frac{3}{10} \times 1 \text{ ml} = 0,3 \text{ ml}$$

Pembuatan Saturasi Garam Dapur



Lampiran 2. Data

Data absorbansi

Alga Coklat	Ulangan	Pengenceran	Absorbansi
<i>Sargassum filipendula</i>	1	10^3	1,200
	2	10^3	1,203

Data Kadar β -karoten

Alga Coklat	Ulangan	Jumlah β -karoten
<i>Sargassum filipendula</i>	1	0,004634885 gram
	2	0,004646522 gram

Data Rendemen

Alga Coklat	Ulangan	Gram sampel	Kandungan β -karoten (g)	Rendemen (%)	Rata-rata Rendemen (%)
<i>Sargassum filipendula</i>	1	200 g	0,004634885	0,0023174425	0,00232035175
	2	200 g	0,004646522	0,002323261	

Lampiran 3. Perhitungan Kadar β -Karoten

$$A = \epsilon bc$$

Ket: A = absorbansi

ϵ = absorptifitas molar

b = lebar bagian dalam kuvet

c = konsentrasi (molar)

Ulangan 1:

Absorbansi 1,200 pengenceran 10^3

$$A = \epsilon bc$$

$$1,200 = 139 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$1,200 = 139 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1}) \times c$$

$$\frac{1,200}{139 \times 10^3 (1 \text{ mol})} = c$$

$$8,633 \times 10^{-6} \text{ mol} = c$$

$$c = 8,633 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

Mencari massa:

$$\text{Mol} = \frac{\text{gr}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{V (\text{ml})}$$

$$8,633 \times 10^{-6} = \frac{X}{536,88} \times \frac{1000}{1000}$$

$$8,633 \times 10^{-6} = \frac{X}{536,88}$$

$$0,004634885 = X$$

$$X = 0,004634885 \text{ gram}$$

$$\text{Kadar } \beta\text{-karoten} = 0,004634885 \text{ gram}$$



Ulangan 2:Absorbansi 1,203 pengenceran 10^3

$$A = \epsilon bc$$

$$1,203 = 139 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$1,203 = 139 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1}) \times c$$

$$\frac{1,203}{139 \times 10^3 (1 \text{ mol})} = c$$

$$8,654 \times 10^{-6} \text{ mol} = c$$

$$c = 8,654 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

Mencari massa:

$$\text{Mol} = \frac{\text{gr}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{V (\text{ml})}$$

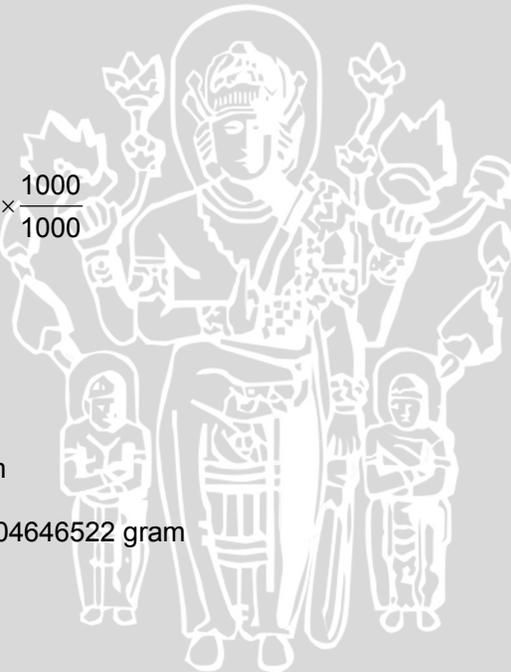
$$8,654 \times 10^{-6} = \frac{X}{536,88} \times \frac{1000}{1000}$$

$$8,654 \times 10^{-6} = \frac{X}{536,88}$$

$$0,004646522 = X$$

$$X = 0,004646522 \text{ gram}$$

$$\text{Kadar } \beta\text{-karoten} = 0,004646522 \text{ gram}$$



Lampiran 4. Perhitungan Kadar Rendemen

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat akhir}}{\text{Berat awal}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned}\text{Ulangan 1} &= \frac{0,004634885 \text{ gram}}{200 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 0,0023174425\%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Ulangan 2} &= \frac{0,004646522 \text{ gram}}{200 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 0,002323261\%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Rata-rata Rendemen } (\bar{x}) &= \frac{0,0023174425 + 0,002323261}{2} \\ &= 0,00232035175\%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}S^2 &= \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \\ &= \frac{(0,0023174425 - 0,00232035175)^2 + (0,002323261 - 0,00232035175)^2}{2-1} \\ &= \frac{8,46 \times 10^{-12} + 8,46 \times 10^{-11}}{1}\end{aligned}$$

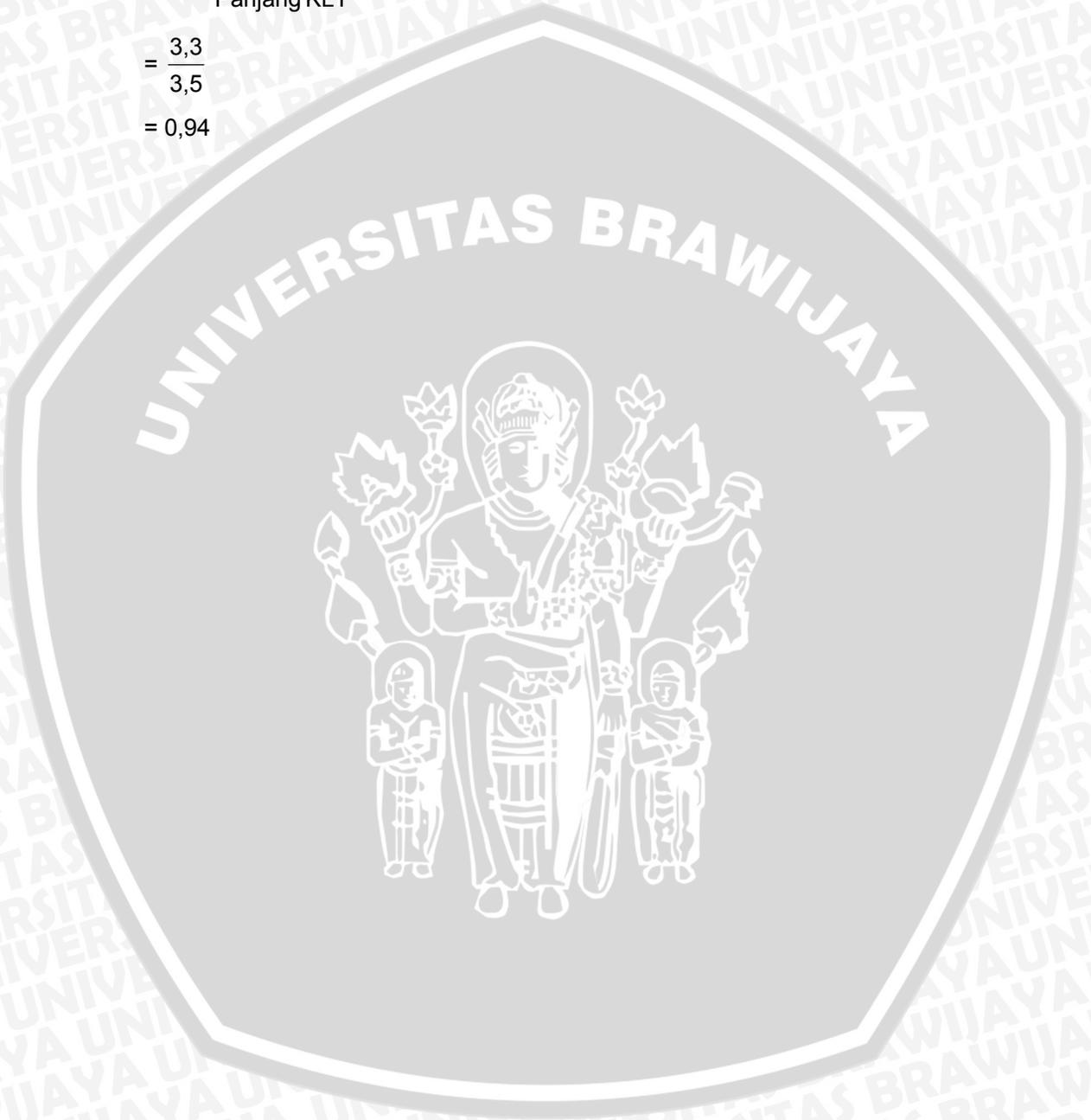
$$S = 4,113 \times 10^{-6}$$

$$\text{Nilai rendemen} = 0,002\% \pm 0,000004$$

Lampiran 5. Perhitungan Rf

Nilai Rf β -Karoten

$$\begin{aligned} R_f &= \frac{\text{Jarak yang ditempuh}}{\text{Panjang KLT}} \\ &= \frac{3,3}{3,5} \\ &= 0,94 \end{aligned}$$



Lampiran 6. Hasil Isolasi Kromatografi Kolom

Panjang kolom = 40 cm

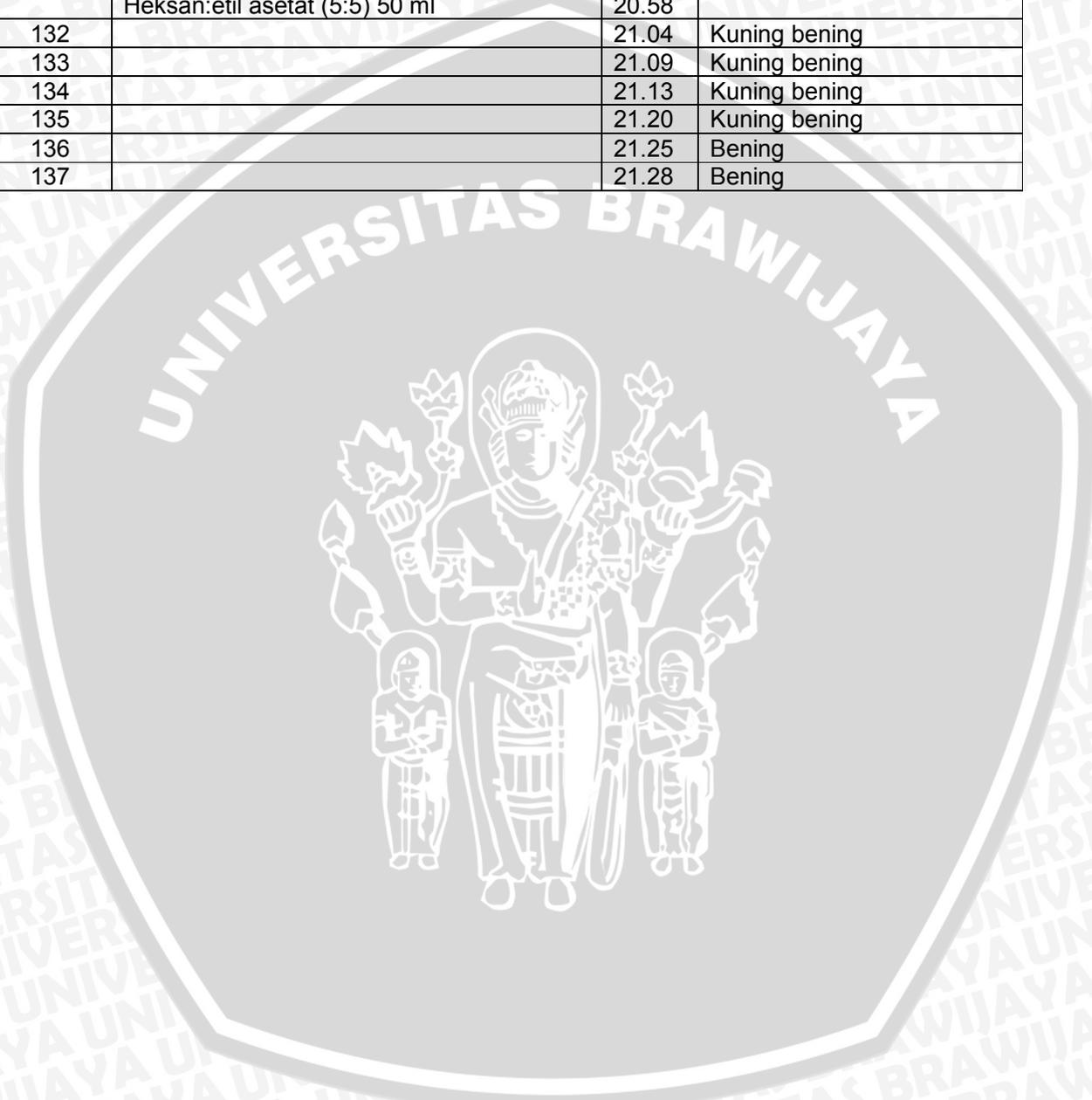
Diameter = 2,5 cm

No.	Tabung	Keterangan	Waktu	Perubahan Yang Terjadi
1		Larutan dalam kolom dikeluarkan		
2		Sampel (dalam 20 ml heksan:aseton 8:2) dimasukkan	11.55	
3		Pelarut ditampung dalam erlenmeyer	11.55	Larutan yang jatuh bening
4	1		13.08	Beta karoten
5	2		13.41	Beta karoten
6	3		13.47	Beta karoten
7		Heksan:etil asetat (8:2) 50 ml	13.53	Beta karoten
8	4		14.00	Beta karoten
9	5		14.03	Beta karoten
10	6		14.15	Beta karoten
11	7		14.39	
12	8		15.05	
13	9		15.11	
14	10		15.18	Warna hijau
15	11		15.35	Hijau
16	12		15.45	Hijau menuju pekat
17	13		16.09	Klorofil a pekat
18		Heksan:etil asetat (7:3) 50 ml	16.09	
19	14		16.09	Klorofil a pekat
20	15		16.26	Klorofil a pekat
21	16		16.31	Klorofil a pekat
22	17		16.40	Klorofil a pekat
23	18		16.45	Klorofil a pekat
24		Heksan:etil asetat (7:3) 50 ml	16.56	
25	19		16.57	Klorofil a pekat ke bening
26	20		16.59	Klorofil a pekat ke bening
27	21		17.03	Klorofil a pekat ke bening
28	22		17.10	Klorofil a pekat ke bening
29	23		17.27	Klorofil a pekat ke bening
30	24		17.32	Klorofil a pekat ke bening
31	25		17.40	Klorofil a pekat ke bening
32	26		17.50	Klorofil a pekat ke bening
33	27		18.00	Klorofil a pekat ke bening
34	28		18.18	Klorofil a pekat ke bening
35	29		18.25	Klorofil a pekat ke bening
36		Heksan:etil asetat (7:3) 50 ml	18.25	
37	30		18.32	Biru (klorofil a)
38	31		18.38	Biru (klorofil a)
39	32		18.45	Biru (klorofil a)
40	33		18.53	Biru (klorofil a)
41	34		18.58	Biru (klorofil a)
42	35		19.04	Biru (klorofil a)
43	36		19.06	Biru (klorofil a)
44	37		19.11	Biru (klorofil a)

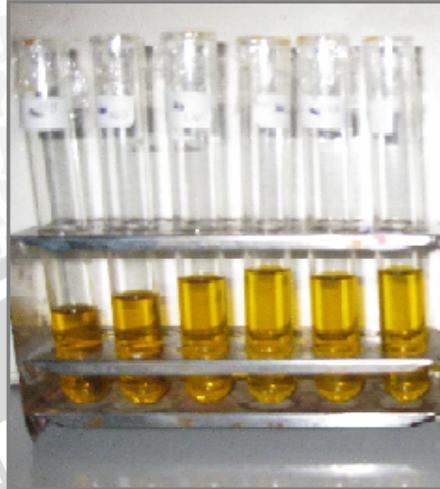
45		Heksan:etil asetat (7:3) 50 ml	19.11	
46	38		10.49	Biru (klorofil a)
47	39		10.51	Biru (klorofil a)
48	40		10.55	Biru (klorofil a)
49	41		11.00	Biru (klorofil a)
50	42		11.05	Sama pekat biru lebih bening
51	43		11.10	Biru (klorofil a)
52	44		11.14	Biru (klorofil a)
53	45		11.19	Biru (klorofil a)
54	46		11.25	Lebih bening hijau
55	47		11.30	Lebih bening hijau
56	48		11.35	Lebih bening
57	49		11.42	Hijau tua
58	50		11.50	Hijau kekuningan
59	51		11.58	Hijau kekuningan
60	52		12.05	Hijau kekuningan
61	53		12.20	Hijau kekuningan (klorofil b)
62		Heksan:etil asetat (7:3) 50 ml	12.20	
63	54		12.41	Hijau kekuningan (klorofil b)
64	55		13.05	Hijau kekuningan (klorofil b)
65		Heksan:etil asetat (7:3) 50 ml	13.25	
66	56		13.27	Hijau kekuningan (klorofil b)
67	57		13.40	Hijau kekuningan (klorofil b)
68	58		13.52	Hijau kekuningan (klorofil b)
69	59		14.15	Hijau kekuningan (klorofil b)
70		Heksan:etil asetat (7:3) 50 ml	14.15	
71	60		14.33	Hijau kekuningan (klorofil b)
72	61		14.54	Hijau kekuningan (klorofil b)
73	62		15.17	Hijau kekuningan (klorofil b)
74		Heksan:etil asetat (6:4) 50 ml	15.50	
75	63		15.54	Hijau kekuningan (klorofil b)
76	64		16.02	Hijau kekuningan (klorofil b)
77		Heksan:etil asetat (6:4) 50 ml	16.02	Hijau kekuningan (klorofil b)
78	65		16.12	Hijau kekuningan (klorofil b)
79	66		16.25	Hijau kekuningan (klorofil b)
80	67		16.39	Hijau kekuningan (klorofil b)
81	68		16.50	Hijau kekuningan (klorofil b)
82		Heksan:etil asetat (6:4) 50 ml	16.50	
83	69		17.07	Hijau kekuningan (klorofil b)
84	70		17.35	Hijau kekuningan (klorofil b)
85	71		11.30	Hijau kekuningan (klorofil b)
86	72		11.35	Hijau kekuningan (klorofil b)
87	73		11.52	Hijau kekuningan (klorofil b)
88	74		12.02	Hijau kekuningan (klorofil b)
89		Heksan:etil asetat (6:4) 50 ml	12.02	
90	75		12.19	Hijau kekuningan (klorofil b)
91	76		12.33	Hijau kekuningan (klorofil b)
92	77		12.40	Hijau kekuningan (klorofil b)
93	78		12.48	Hijau kekuningan (klorofil b)
94	79		12.55	Hijau kekuningan (klorofil b)

95	80		13.02	Hijau kekuningan (klorofil b)
96	81		13.10	Hijau kekuningan
97		Heksan:etil asetat (6:4) 50 ml	13.13	
98	82		13.16	Hijau kekuningan
99	83		13.23	Kuning hijau sedikit
100	84		13.30	Kuning hijau sedikit
101	85		13.36	Kuning hijau sedikit
102	86		13.43	Kuning agak hijau
103	87		13.57	Kuning agak hijau
104	88		14.04	Kuning lebih pekat
105	89		14.10	Kuning lebih pekat
106	90		14.15	Kuning
107	91		14.20	Kuning
108	92		14.26	Kuning
109	93		14.35	Kuning
110	94		14.40	Kuning
111	95		14.47	Kuning
112	96		15.02	Kuning (fukosantin)
113	97		15.17	Kuning (fukosantin)
114	98		15.48	Kuning (fukosantin)
115		Heksan:etil asetat (6:4) 50 ml	15.48	
116	99		16.11	Kuning (fukosantin)
117	100		16.30	Kuning (fukosantin)
118	101		17.22	Kuning (fukosantin)
119	102		17.30	Kuning (fukosantin)
120	103		17.40	Kuning (fukosantin)
121	104		18.25	Kuning (fukosantin)
122	105		18.30	Kuning (fukosantin)
123	106		18.35	Kuning (fukosantin)
124	107		18.40	Kuning (fukosantin)
125	108		18.46	Kuning (fukosantin)
126	109		18.51	Kuning (fukosantin)
127	110		18.57	Kuning (fukosantin)
128	111		19.04	Kuning (fukosantin)
129	112		19.08	Kuning (fukosantin)
130	113		19.13	Kuning
131	114		19.18	Kuning
132		Heksan:etil asetat (5:5) 50 ml	19.18	
133	115		19.25	Kuning bening
134	116		19.29	Kuning bening
135	117		19.33	Kuning bening
136	118		19.37	Kuning bening
137	119		19.40	Kuning bening
138	120		19.41	Kuning bening
139	121		19.42	Kuning bening
140	122		19.44	Kuning bening
141		Heksan:etil asetat (5:5) 30 ml	19.44	
142	123		20.26	Kuning bening
143	124		20.29	Kuning bening
144	125		20.33	Kuning bening
145	126		20.38	Kuning bening

146		Heksan:etil asetat (5:5) 50 ml	20.38	
147	127		20.41	Kuning bening
148	128		20.43	Kuning bening
149	129		20.48	Kuning bening
150	130		20.52	Kuning bening
151	131		20.58	Kuning bening
152		Heksan:etil asetat (5:5) 50 ml	20.58	
153	132		21.04	Kuning bening
154	133		21.09	Kuning bening
155	134		21.13	Kuning bening
156	135		21.20	Kuning bening
157	136		21.25	Bening
158	137		21.28	Bening



Lampiran 7. Foto Hasil Kromatografi Kolom



Pigmen Beta Karoten



Pigmen Klorofil



Pigmen Fukosantin