

**IDENTIFIKASI KOMPONEN PIGMEN PADA RUMPUT LAUT COKLAT**  
***Sargassum cinereum* DENGAN HIGH PERFORMANCE LIQUID**  
**CHROMATOGRAPHY**

**SKRIPSI**  
**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN**  
**JURUSAN MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN**

Oleh :  
**DANANG ADI NUGROHO**  
**NIM. 115080307111003**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN**  
**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**  
**MALANG**  
**2015**

**IDENTIFIKASI KOMPONEN PIGMEN PADA RUMPUT LAUT COKLAT**  
*Sargassum cinereum* DENGAN **HIGH PERFORMANCE LIQUID**  
**CHROMATOGRAPHY(HPLC)**

**SKRIPSI**

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN**  
**JURUSAN MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN**

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan  
Di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
UniversitasBrawijaya

Oleh:

DANANG ADI NUGROHO

NIM. 115080307111003



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN**  
**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**  
**MALANG**  
**2015**

IDENTIFIKASI KOMPONEN PIGMEN PADA RUMPUT LAUT COKLAT *Sargassum cinereum* DENGAN HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Oleh :

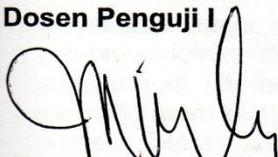
DANANG ADI NUGROHO

NIM. 115080307111003

Telah dipertahankan di depan penguji  
pada tanggal 26 November 2015  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

Dosen Penguji I



(Dr. Ir. M. Firdaus, MP)  
NIP. 19680919 200501 1 001

Tanggal : \_\_\_\_\_

06 JAN 2016

Dosen Pembimbing I



(Dr. Ir. Kartini Zaelanie, MS)  
NIP. 19550503 198503 2 001

Tanggal : \_\_\_\_\_

06 JAN 2016

Dosen Penguji II

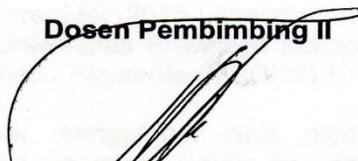


(Eko Waluyo, S. Pi, M. Sc)  
NIP. 19800424 200501 1 001

Tanggal : \_\_\_\_\_

06 JAN 2016

Dosen Pembimbing II



(Prof. Ir. Sukoso, M. Sc, Ph. D)  
NIP. 19640919 198903 1 003

Tanggal : \_\_\_\_\_

06 JAN 2016



Mengetahui,  
Ketua Jurusan



(Dr. Ir. Arning Wikijeng Ekawati, MS)  
NIP. 19620805 198603 2 001

Tanggal : \_\_\_\_\_

06 JAN 2016

**DANANG ADI NUGROHO (NIM 115080307111003).** Skripsi tentang Identifikasi Komponen Pigmen Pada Rumput Laut Coklat *Sargassum Cinereum* Dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (di bawah bimbingan **Dr. Ir. Kartini Zaelanie, MS** dan **Prof. Ir. Sukoso, M.Sc. Ph.D**)

---

Alga coklat pada umumnya berbentuk lembaran, bahkan ada yang menyerupai tumbuhan tinggi dengan bagian-bagian berupa akar, batang, dan daun. Di perairan Indonesia terdapat sekitar 28 spesies rumput laut coklat yang berasal dari enam genus diantaranya yaitu *Dyctyota*, *Padine*, *Hormophysa*, *Sargassum*, *Turbinaria* dan *Hydroclathrus*. Spesies rumput laut yang telah diidentifikasi yaitu *Sargassum sp.* sebanyak 14 spesies, *Turbinaria* sebanyak 4 spesies, *Hormophysa* baru teridentifikasi 1 spesies, *Padina* 4 spesies, *Dyctyota* 5 spesies dan *Hydroclathrus* 1 spesies.

Pigmen merupakan senyawa aktif pembentuk warna pada alga coklat. Sumber pigmen alami selain klorofil adalah karotenoid yang memiliki potensi yang besar sebagai sumber pigmen alami terbarukan dan berkelanjutan. Alga coklat memiliki kandungan berupa golongan pigmen karotenoid yang teroksidasi dalam strukturnya yaitu fukosantin. Alga coklat khususnya jenis *Sargassum cinereum* juga mengandung komponen pigmen berupa senyawa violaksantin, flavosantin serta neosantin a dan b, sedangkan kelompok karotenoid yang umum ditemukan dalam alga coklat adalah  $\beta$ -karoten, yakni karotenoid yang tidak memiliki atom oksigen dalam strukturnya, senyawa ini berperan penting dalam membantu proses fotosintesis serta dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan dan industri makanan.

*Sargassum cinereum* termasuk tumbuhan kosmopolitan yang hidup pada rata-rata terumbu karang sampai daerah tubir, pada karang alga jenis ini tumbuh baik dengan cara melekat pada substrat keras. Ciri-ciri umum dari *Sargassum* ini adalah bentuk thallus umumnya silindris atau gepeng, cabangnya rimbun menyerupai pohon, bentuk daun melebar, oval, atau seperti pedang, mempunyai gelembung udara (*bladder*) yang umumnya soliter, ukuran panjang umumnya mencapai 3-7 meter, warna thallus umumnya coklat.

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret-Mei 2015 di Laboratorium Instrumen Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium *Ma Chung Research Centre for Photosynthetic Pigments* (MRCPP) Universitas Ma Chung Malang.

Tujuan dari penelitian adalah untuk mengetahui jenis pigmen dominan yang terkandung di dalam alga coklat *Sargassum cinereum*. Selain itu untuk mengetahui jenis pigmen yang paling banyak terdapat pada alga coklat *Sargassum cinereum* dengan pengujian menggunakan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Untuk mengetahui berapa kandungan isolate pigmen yang terdapat pada alga coklat *Sargassum cinereum*.

Metode yang digunakan dalam penelitian Identifikasi Komponen Pigmen Pada Alga Coklat *Sargassum cinereum* dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) adalah metode eksploratif. Metode penelitian eksploratif bertujuan untuk mendapatkan data dasar yang diperlukan sebagai dasar penelitian lebih lanjut atau dasar membuat suatu keputusan. Dalam kedudukannya sebagai pendahulu bagi penelitian sebenarnya, penelitian eksploratif member arah pada perumusan masalah dan hipotesis walaupun penelitian eksploratif itu sendiri tidak menggunakan hipotesis penelitian. Penelitian eksploratif dilakukan apabila penelitian sebelumnya masih arang. Tujuannya adalah melihat pola, gagasan atau merumuskan hipotesis bukan untuk menguji hipotesis lainnya.

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas rahmat dan karunia Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian serta penulisan laporan skripsi ini dengan judul Identifikasi Komponen Pigmen Pada Rumput Laut Coklat *Sargassum Cinereum* Dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki dalam menyelesaikan laporan ini. Dengan adanya kritik dan saran dari pembaca nantinya diharapkan dapat menambah kesempurnaan laporan ini agar menjadi lebih bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 26 September 2015

Penulis

## UCAPAN TERIMAKASIH

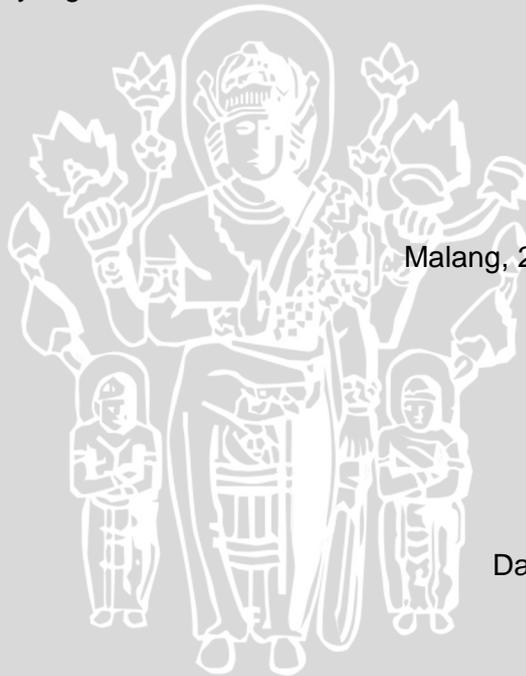
Penulis menyadari sepenuhnya bahwa laporan ini tidak akan tersusun tanpa bantuan dari berbagai pihak, rasa hormat dan terimakasih penulis sampaikan kepada :

1. Allah SWT telah memberikan kemudahan dalam segala urusan untuk menyelesaikan tugas akhir kuliah ini.
2. Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang, Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS yang telah memberikan kesempatan untuk menempuh pendidikan hingga akhir di sini.
3. Dr. Ir. Kartini Zaelanie, MS selaku dosen pembimbing I dan Prof. Ir. Sukoso, M. Sc, Ph. D selaku dosen pembimbing II dan Dosen PA yang telah banyak memberikan bimbingan, arahan, nasehat dan motivasi hingga laporan ini selesai.
4. Kedua orang tuasaya, bapak Basuki dan ibu Sri Yayuk atas doa dan dukungan yang diberikan serta kakak saya Septiana Primasari dan adik saya AnggunTria Kusuma yang selalu memberikan semangat.
5. Theresia Ardiana Ayu Safitri yang telah menemani dan memberi semangat
6. Sahabat-sahabatsaya, Indra, Fikri, Huda, Fajar, Dzaki, Rohmad, Halim, Jhon, Dhani, Nasir yang selalu menemani saat suka dan duka.
7. Teman-teman Team Pigmen, Lulus, nila, Rofi, dan Rita sertateman-temankontrakan, Candra, Dyantara, restudan Lucky.
8. Teman-teman THP 2011 yang tidak bisa saya sebutkan namanya satu persatu, yang telah memberikan masukan, semangat, persahabatan, sumbangan pemikiran, serta pengalaman yang takakan pernah terlupakan selamanya.

## PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang sepengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.



Malang, 26 September 2015

Mahasiswa

Danang Adi Nugroho

## DAFTAR ISI

## HALAMAN

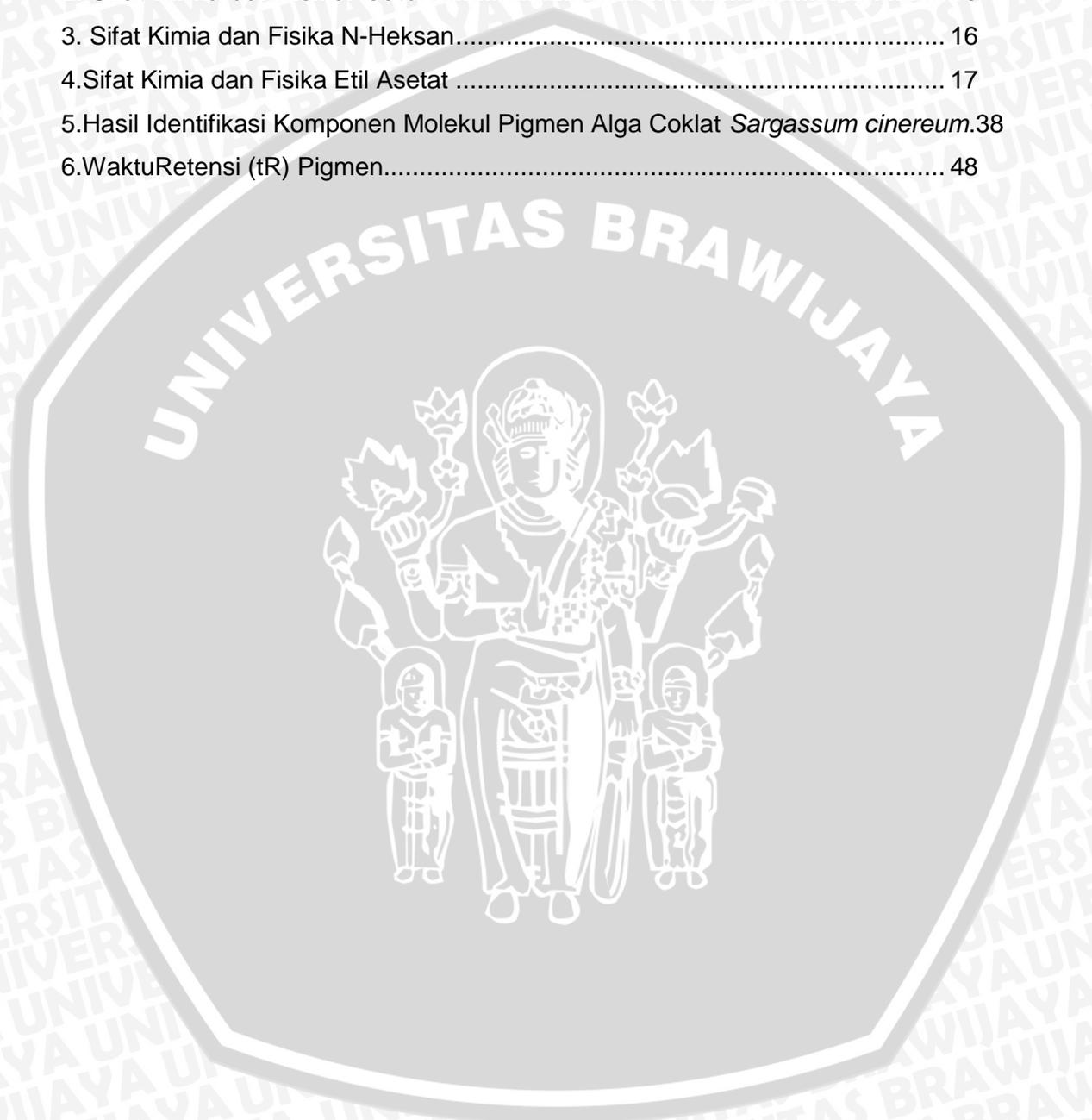
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>i</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>ii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>iii</b>
<b>1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	2
1.4 Kegunaan Penelitian.....	3
1.5 Waktu dan Tempat Penelitian.....	3
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Pigmen Rumput Laut.....	4
2.2 Rumput Laut Cokelat.....	4
2.3 <i>Sargassum cinereum</i> .....	5
2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	5
2.3.2 Struktur Dinding Sel.....	6
2.4 Komponen Pigmen <i>Sargassum cinereum</i> .....	7
2.4.1 Pigmen $\beta$ -Karoten.....	8
2.4.2 Pigmen Klorofil.....	8
2.4.3 Pigmen Fukosantin.....	9
2.5 Ekstraksi Pigmen.....	10
2.5.1 Maserasi.....	11
2.5.2 Fraksinasi (Partisi).....	11
2.5.3 Evaporasi.....	12
2.5.4 Gas Nitrogen.....	13
2.6 Pelarut Untuk Proses Ekstraksi.....	13
2.6.1 Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ).....	14
2.6.2 Aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ).....	15
2.6.3 N-Heksan ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ).....	16
2.6.4 Etil Asetat.....	17
2.7 Isolasi Komponen Pigmen <i>Sargassum cinereum</i> .....	17
2.7.1 Kromatografi.....	17
2.7.1.1 Kromatografi Kolom.....	18
2.7.1.1.1 Silica Gel ( $\text{SiO}_2$ ).....	18
2.8 Identifikasi Pigmen.....	19
2.8.1 Kromatografi Lapis Tipis.....	19
2.8.2 Spektrofotometer UV-Vis.....	20
2.8.3 <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC).....	22
<b>3. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>23</b>
3.1 Bahan Penelitian.....	23
3.2 Alat Penelitian.....	23
3.3 Metode Penelitian.....	24
3.4 Persiapan Penelitian.....	24
3.4.1 Preparasi Sampel ( <i>Sargassum cinereum</i> ).....	24
3.4.2 Ekstraksi Pigmen.....	25

3.4.3	Fraksinasi dan Evaporasi .....	26
3.5	Identifikasi Pigmen.....	32
3.5.1	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC) .....	32
3.5.2	Kromatografi Lapis Tipis.....	33
3.5.3	Spketrofotometri UV-Vis .....	35
3.6	Pengukuran rendemen .....	37
<b>4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>38</b>
4.1	Hasil Pengamatan .....	38
4.2	Pembahasan .....	39
4.2.1	Identifikas Pigmen dengan <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC).....	39
4.2.2	Isolasi Pigmen dengan Kromatografi Kolom .....	42
4.2.3	Identifikasi pigmen dengan Kromatografi Lapis Tipis .....	45
4.2.4	Identifikasi Pigmen dengan Spektrofometri UV-Vis.....	48
4.2.5	Rendemen Pigmen.....	51
<b>5.</b>	<b>Penutup .....</b>	<b>52</b>
5.1	Kesimpulan.....	52
5.2	Saran .....	52
	<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>53</b>
	<b>LAMPIRAN.....</b>	



## DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Sifat Kimia dan Fisika Metanol.....	15
2. Sifat Kimia dan Fisika Aseton .....	16
3. Sifat Kimia dan Fisika N-Heksan.....	16
4. Sifat Kimia dan Fisika Etil Asetat .....	17
5. Hasil Identifikasi Komponen Molekul Pigmen Alga Coklat <i>Sargassum cinereum</i> .	38
6. Waktu Retensi (tR) Pigmen.....	48



## DAFTAR GAMBAR

Halaman	
1. <i>Sargassum cinereum</i> .....	6
2. Penampang Sel Alga .....	7
3. Struktur Molekul $\beta$ -Karoten .....	8
4. Struktur Molekul Klorofil.....	9
5. Struktur Molekul Fukosantin.....	10
6. Bagian-Bagian Evaporator.....	13
7. Rumus Molekul Aseton.....	15
8. Bagian-bagian dari Kromatografi Kolom.....	18
9. Struktur Bangun Silika Gel .....	19
10. Proses Kromatografi Lapis Tipis.....	20
11. Kerja Spektrofotometer UV-Vis.....	21
12. Prinsip Kerja HPLC .....	22
13. Diagram Alir dan Fraksinasi <i>Sargassum cinereum</i> .....	28
14. Diagram Alir Isolasi Pigmen dengan Kromatografi Kolom.....	31
15. Diagram Alir High Performance Liquid Chromatography.....	33
16. Diagram Alir Identifikasi Pigmen dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	35
17. Diagram Alir Pigmen dengan Spektrofotometri UV-Vis. ....	36
18. Kromatogram Ekstrak kasar <i>Sargassum cinereum</i> .....	39
19. Isolasi Pigmen dengan Kromatografi Kolom (a) fase antara; (b) betakaroten (c) Klorofil (d) Fokosantin .....	44
20. Hasil Isolat Pigmen. ....	45
21. Pola Pemisahan Ekstrak kasar <i>Sargassumcinereum</i> .....	46
22. Hasil Isolasi Pigmen <i>Sargassum cinereum</i> (1) $\beta$ -karoten; (2) Klorofil a; (3) Klorofil b; (4) Fukosantin. ....	47
23. Pola Spekta Pigmen Isolasi dalam Pelarut Hasil Aseton (1) Fukosantin; (2) Betakaroten; (3) Klorofil a; (4) Klorofil b.....	49
31. Hasil Uji Pola Spekta pada Serapan ( $\lambda_{max}$ ).....	63
32. Spektrum Absorbansi Klorofil adan Klorofil <i>b</i> . ....	65

## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Alga coklat pada umumnya berbentuk lembaran, bahkan ada yang menyerupai tumbuhan tinggi dengan bagian-bagian berupa akar, batang, dan daun. Di perairan Indonesia terdapat sekitar 28 spesies rumput laut coklat yang berasal dari enam genus diantaranya yaitu *Dyctyota*, *Padine*, *Hormophysa*, *Sargassum*, *Turbinaria* dan *Hydroclathrus*. Spesies rumput laut yang telah diidentifikasi yaitu *Sargassum sp.* sebanyak 14 spesies, *Turbinaria* sebanyak 4 spesies, *Hormophysa* baru teridentifikasi 1 spesies, *Padina* 4 spesies, *Dyctyota* 5 spesies dan *Hydroclathrus* 1 spesies (Maharani dan Widyayanti, 2010).

*Sargassum cinereum* merupakan salah satu jenis ganggang coklat yang tumbuh subur di perairan tropis pada kedalaman 0.5–10 meter. Alga coklat jenis ini hidup di daerah perairan yang jernih dengan substrat dasar batu karang (Khotimah *et al.*, 2013). Ciri-ciri umum dari *Sargassum* ini adalah bentuk thallus umumnya silindris atau gepeng, cabangnya rimbun menyerupai pohon, bentuk daun melebar, oval, atau seperti pedang, mempunyai gelembung udara (*bladder*) yang umumnya soliter, ukuran panjang umumnya mencapai 3-7 meter, warna thallus umumnya coklat.

Pigmen merupakan senyawa aktif pembentuk warna pada alga coklat. Arlita, *et al.* (2013), menyatakan bahwa sumber pigmen alami selain klorofil adalah karotenoid yang memiliki potensi yang besar sebagai sumber pigmen alami terbarukan dan berkelanjutan. Menurut Biranti, *et al.* (2009), alga coklat memiliki kandungan berupa golongan pigmen karotenoid yang teroksidasi dalam strukturnya yaitu fucosantin. Alga coklat khususnya jenis *Sargassum cinereum* juga mengandung komponen pigmen berupa senyawa violaksantin, flavosantin serta neosantin a dan b, sedangkan kelompok karotenoid yang umum

ditemukan dalam alga coklat adalah  $\beta$ -karoten, yakni karotenoid yang tidak memiliki atom oksigen dalam strukturnya, senyawa ini berperan penting dalam membantu proses fotosintesis serta dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan dan industri makanan (Nursid *et al.*, 2013).

Beberapa metode telah dilakukan dalam identifikasi dan determinasi kandungan komponen pigmen pada *Sargassum cinereum*. Metode *spectrophotometry* telah digunakan dalam penentuan total karotenoid pada beberapa spesies alga (Dere *et al.*, 2000). Hingga saat ini identifikasi komponen pigmen *Sargassum cinereum* menggunakan HPLC belum banyak dilakukan. Oleh karena itu data dan informasi baru sangat diperlukan sebagai penguat dan pembanding dari penelitian terdahulu.

## 1.2 Perumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

- Apa saja jenis pigmen dominan yang terkandung di dalam alga coklat *Sargassum cinereum* ?
- Jenis pigmen apa yang paling banyak terdapat pada alga coklat *Sargassum cinereum* dengan pengujian menggunakan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)?
- Berapa kandungan isolat pigmen yang terdapat pada alga coklat *Sargassum cinereum* ?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

- Untuk mengetahui jenis pigmen dominan yang terkandung di dalam alga coklat *Sargassum cinereum*.

- Untuk mengetahui jenis pigmen yang paling banyak terdapat pada alga coklat *Sargassum cinereum* dengan pengujian menggunakan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).
- Untuk mengetahui berapa kandungan isolat pigmen yang terdapat pada alga coklat *Sargassum cinereum*.

#### 1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan data dan informasi ilmiah terbaru kepada masyarakat, lembaga dan institusi lain mengenai jenis pigmen dominan yang terkandung di dalam alga coklat *Sargassum cinereum* dengan uji *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), sehingga dapat dijadikan sebagai pembandingan dari penelitian terdahulu dan acuan untuk penelitian terkait di masa mendatang.

#### 1.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai Mei 2015 di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan dan Laboratorium Penanganan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Instrumen Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium *Ma Chung Research Centre for Photosynthetic Pigments* (MRCPP) Universitas Ma Chung Malang.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Pigmen Rumput Laut

Pigmen merupakan senyawa aktif pembentuk warna pada alga coklat. Arlita, *et al.* (2013), menyatakan bahwa sumber pigmen alami selain klorofil adalah karotenoid yang memiliki potensi yang besar sebagai sumber pigmen alami terbarukan dan berkelanjutan. Menurut Biranti, *et al.* (2009), alga coklat memiliki kandungan berupa golongan pigmen karotenoid yang teroksidasi dalam strukturnya yaitu fucosantin. Alga coklat khususnya jenis *Sargassum cinereum* juga mengandung komponen pigmen berupa senyawa violaksantin, flavosantin serta neosantin a dan b, sedangkan kelompok karotenoid yang umum ditemukan dalam alga coklat adalah  $\beta$ -karoten, yakni karotenoid yang tidak memiliki atom oksigen dalam strukturnya, senyawa ini berperan penting dalam membantu proses fotosintesis serta dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan dan industri makanan (Nursid *et al.*, 2013).

### 2.2 Rumput Laut Coklat

Rumput laut adalah ganggang berukuran besar atau macro algae yang merupakan tanaman tingkat rendah. Rumput laut tergolong tanaman berderajat rendah. Umumnya rumput laut melekat pada substrat tertentu. Ciri-ciri rumput laut adalah tidak mempunyai akar, batang maupun daun sejati tetapi hanya menyerupai batang yang disebut thallus. Rumput laut tumbuh di alam dengan melekatkan dirinya pada karang, lumpur, pasir, batu, dan benda keras lainnya. Selain benda mati, rumput laut pun dapat melekat pada tumbuhan lain secara epifitik (Prasetyowati, 2008).

Alga coklat merupakan alga yang berukuran besar, bahkan ada yang membentuk padang alga di laut lepas. Diantara daun serta tangkainya didalam

dan di permukaan laut, hidup beribu-ribu ikan neritik yang memanfaatkannya sebagai sumber pangan dan tempat perlindungan. Beberapa spesies dari alga coklat bereproduksi secara generatif serta ada beberapa spesies yang menunjukkan alih generasi yang isomorfik (Kordi, 2010). Menurut Wehr (2002), menyebutkan bahwa warna coklat pada rumput laut makroskopis berasal dari pigmen karotenoid, fukosantin, dan pada beberapa spesies berasal dari berbagai macam tanin yang terdapat dalam rumput laut coklat (*phaeophycian tannin*).

### 2.3 *Sargassum cinereum*

*Sargassum* adalah salah satu rumput laut yang banyak terdapat di perairan Indonesia. Rumput laut cokelat jenis ini kaya akan kandungan zat gizi dan bioaktif. Ada 11 jenis *Sargassum* yang ditemukan di perairan Indonesia, yaitu: *Sargassum binderi*, *S. crassifolium*, *S. plagyophyllum*, *S. mollerii*, *S. siliquosum*, *S. hystrix*, *S. gracilimum*, *S. duplicatum*, *S. cinereum*, *S. polycystum* dan *S. Echinocarpum* (Firdaus et al., 2012).

#### 2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi

*Sargassum cinereum* termasuk tumbuhan kosmopolitan yang hidup pada rata-rata terumbu karang sampai daerah tubir, pada karang alga jenis ini tumbuh baik dengan cara melekat pada substrat keras (Kordi, 2010). Menurut Putranti (2013), Ciri-ciri umum dari *Sargassum* ini adalah bentuk thallus umumnya silindris atau gepeng, cabangnya rimbun menyerupai pohon, bentuk daun melebar, oval, atau seperti pedang, mempunyai gelembung udara (*bladder*) yang umumnya soliter, ukuran panjang umumnya mencapai 3-7 meter, warna thallus umumnya coklat. Spesies dari genus ganggang ini dapat tumbuh dengan panjang mencapai beberapa meter, mereka umumnya mengandung pigmen berwarna coklat atau gelap warna hijau dan terdiri dari holdfast, sebuah stipe,

dan frond. Sampel *Sargassum cinereum* disajikan pada Gambar 1. Berikut ini taxonomy *Sargassum cinereum* menurut Atmadja, *et al.* (1996), yaitu:

Domain	: Eukaryota
Kingdom	: Chromista
Subkingdom	: Chromobiota
Filum	: Ochrophyta
Subfilum	: Phaeista
Divisi	: Thallophyta
Kelas	: Phaeophyceae
Ordo	: Fucales
Famili	: Sargassaceae
Genus	: Sargassum
Spesies	: <i>Sargassum cinereum</i> J. Agardh



**Gambar 1.** *Sargassum cinereum* (Dokumentasi Penelitian, 2015)

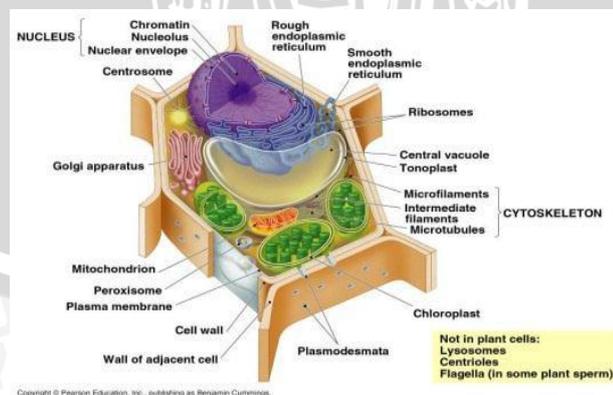
### 2.3.2 Struktur Dinding Sel

Dinding sel rumput laut coklat mengandung senyawa polisakarida seperti laminaran dan fukoidan yang tergolong dalam serat larut. Laminaran adalah salah satu jenis polisakarida alga coklat tergolong sebagai cadangan makanan yang merupakan (1,3);(1,6)- $\beta$ -D-glukan yaitu ikatan (1-3) di *back bone* dan percabangan pada titik (1-6), merupakan karakteristik khas dari alga coklat. (Chamidah *et al.*, (2013). Fukoidan adalah golongan polisakarida dengan asam glukuronik dan gugus polisakarida yang tersusun atas fukosa homopolimer sulfat atau fukans (Anastyuk *et al.*, 2009).

Menurut Zailanie, *et al.* (2001), Alginat sebenarnya merupakan komponen utama dari ganggang coklat dan merupakan senyawa penting dalam dinding sel. Secara kimia alginat merupakan polimer murni dari asam uronat yang tersusun dalam bentuk rantai linier yang panjang. Alginat dalam rumput laut coklat umumnya bersenyawa dengan garam natrium, kalium, kalsium, dan magnesium.

#### 2.4 Komponen Pigmen *Sargassum cinereum*

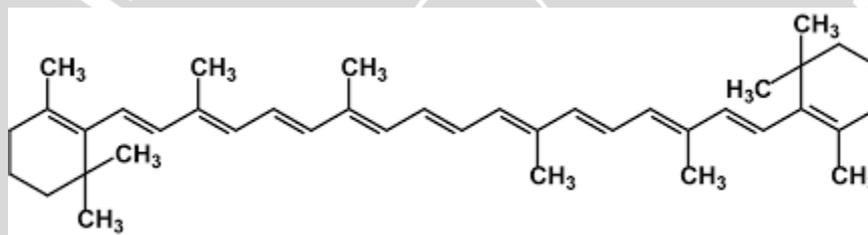
Paransa, *et al.* (2014), menyatakan bahwa pada umumnya alga mengandung tiga jenis pigmen utama yaitu klorofil, karotenoid, dan fikobilin. Pigmen yang paling melimpah dan khas dari rumput laut coklat adalah fukosantin, fukoxantol, flavoxantin, diatoxantin dan zeaxantin, sedangkan klorofil *c1* dan klorofil *c2* merupakan klorofil khas dari phaeophyta. Klorofil *a* merupakan golongan klorofil yang dominan pada rumput laut coklat, sedangkan fukosantin merupakan karotenoid utamanya. Ciri khas rumput laut dari genus *Sargassum* adalah keberadaan pigmen klorofil *b*, klorofil *b* dan neoxantin (Limantara dan Heriyanto, 2010). Winarno, *et al.* (1980), melaporkan bahwa sebagian besar pigmen tanaman terkumpul di dalam sel-sel tenunan, misalnya klorofil yang terdapat dalam kloroplast. Penampang sel alga disajikan di Gambar 3.



**Gambar 2.** Penampang Sel Alga (Wikipedia, 2014)

### 2.4.1 Pigmen $\beta$ -Karoten

Karotenoida merupakan kelompok pigmen yang berwarna kuning, jingga, merah jingga, dan bersifat larut dalam minyak. Struktur dasar karotenoida terdiri dari ikatan hidrokarbon tidak jenuh yang dibentuk oleh 40 atom C atau 8 unit isoprena dan memiliki dua buah gugus cincin. Karotenoida dibagi menjadi empat golongan, yaitu karotenoida hidrokarbon  $C_{40}H_{56}$  seperti alfa, beta, gamma karoten dan likopen. Karotenoida juga dikenal sebagai poliena yang dibentuk oleh unit-unit isoprena. Senyawa hidrokarbon karotenoida juga banyak ditemukan mengandung gugus hidroksil, karbonil, oxiran dan gugus epoksi (Panjaitan *et al.*, (2011).



**Gambar 3.** Struktur Molekul  $\beta$ -Karoten (Winarno, 2004)

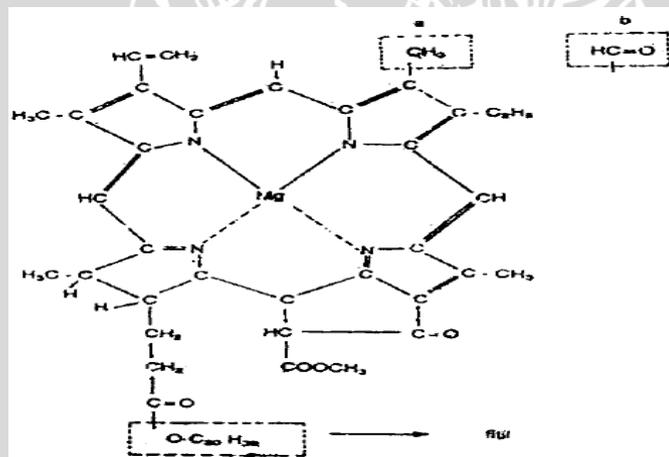
Menurut Fajar, *et al.* (2014), Karotenoida terdapat dalam kloroplas (0.5%) bersama-sama dengan klorofil (9.3%) terutama pada bagian permukaan atas daun, dekat dengan dinding sel palisade. Sifat fisika dan kimia beta karoten adalah larut dalam minyak dan tidak larut dalam air, larut dalam kloroform, benzena, karbon disulfida dan petroleum eter, tidak larut dalam dalam etanol dan metanol dingin, tahan terhadap panas apabila dalam keadaan vakum, peka terhadap oksidasi, autooksidasi dan cahaya, dan mempunyai ciri khas absorpsi cahaya.

### 2.4.2 Pigmen Klorofil

Klorofil adalah pigmen berwarna hijau yang terdapat dalam kloroplas bersama sama dengan karoten dan xantofil. Klorofil merupakan suatu porfirin yang mengandung cincin dasar tetrapirrol. Keempat cincinnya berikatan dengan

ion  $Mg^{2+}$ . Cincin isosiklik yang kelima berada dekat dengan cincin pirol ketiga. Substituen asam propionat diesterifikasi oleh diterpen alkohol fitol ( $C_{20}H_{39}OH$ ) yang bersifat hidrofobik dalam cincin ke empat. Seperti pigmen alami lainnya, klorofil juga mudah terdegradasi akibat paparan panas, cahaya, oksidator dan kondisi pH lingkungan (Suyitno, 2008).

Menurut Fajar, *et al.* (2014), terdapat dua jenis klorofil yang berbeda pada sebagian besar tanaman dan cyanobakteria, yaitu klorofil a dan klorofil b. Klorofil a memiliki rumus empiris  $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$  bersifat polar, pigmen ini memiliki kemampuan sebagai *photosensitizer* membuat molekul ini cenderung dipengaruhi oleh cahaya, dan suhu sehingga mudah mengalami degradasi. Klorofil b memiliki rumus empiris  $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$  bersifat polar dan mempunyai warna kuning-hijau. Klorofil b lebih tahan panas dibandingkan dengan klorofil a. Struktur molekul klorofil dapat dilihat pada Gambar 4.

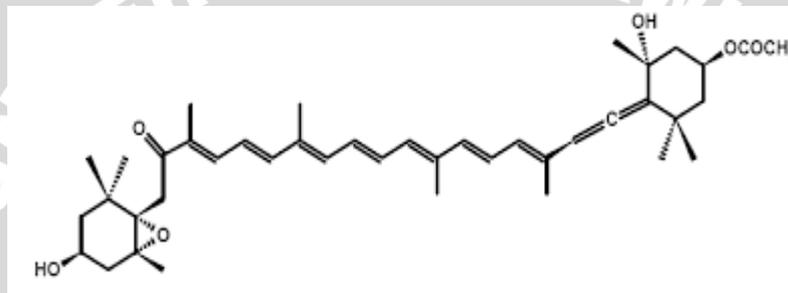


Gambar 4. Struktur Molekul Klorofil (Suyitno, 2008)

### 2.4.3 Pigmen Fukosantin

Menurut Zaelani dan Kartikaningsih (2011), Fukosantin merupakan karotenoid utama pada alga coklat yang memiliki rumus molekul  $C_{42}H_{58}O_6$ . Fukosantin memiliki struktur kimia yang unik karena memiliki sebuah ikatan alenat dan 5,6 monoepoksida didalam molekulnya. Fukosantin juga memiliki 2 gugus hidroksil. Berdasarkan hasil penelitian dari Nursid, *et al.* (2013), fukosantin

dari alga coklat berpotensi untuk dikembangkan sebagai bahan nutraseutikal terutama sebagai antioksidan dan agen kemopreventif karena kemampuannya dalam meredam radikal bebas. Kelemahan pigmen fukosantin adalah kesetabilannya pada pH, cahaya, oksigen dan suhu. Pigmen secara umum tidak stabil dalam larutan netral, basa bahkan dalam larutan asam, warnanya dapat memudar sehingga perlu disimpan dalam tempat gelap dan suhu rendah (Kartikaningsih dan Kartini, 2010). Struktur molekul fukosantin dapat dilihat pada Gambar 5.



**Gambar 5.** Struktur Molekul Fukosantin (Murti *et al.*,2010)

## 2.5 Ekstraksi

Ekstraksi ialah proses penarikan suatu zat terlarut dari larutannya di dalam air oleh suatu pelarut lain yang tidak dapat bercampur dengan air (fasa air). Tujuan ekstraksi ialah memisahkan suatu komponen dari campurannya dengan menggunakan pelarut (Purwani *et al.*,2008). Menurut Septiana dan Asnani (2012), pandangan bioaktif dari *Sargassum cinereum* dapat diperoleh dengan cara ekstraksi pelarut. Prinsip dari ekstraksi ini adalah memisahkan komponen yang ada dalam bahan yang di ekstraksi dengan menggunakan pelarut tertentu. Ekstraksi dengan pelarut dilakukan dengan mempertemukan bahan yang akan diekstrak dengan pelarut selama waktu tertentu, diikuti pemisahan filtrat terhadap residu bahan yang di ekstrak. Pemilihan pelarut yang akan di pakai dalam proses ekstraksi harus memperhatikan sifat kandungan senyawa yang akan di isolasi.

Sifat yang penting adalah polaritas dan gugus polar dari suatu senyawa. Pada prinsipnya suatu bahan akan mudah larut dalam pelarut yang sama polaritasnya.

### 2.5.1 Maserasi

Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi sederhana yang paling banyak digunakan khususnya untuk mengekstraksi senyawa yang lebih polar. Maserasi dilakukan dengan cara merendam simplisia dalam cairan pelarut. Cairan ini akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif dan zat aktif akan larut (Lestari, 2011). Hijaz (2009), menambahkan yang melaporkan bahwa dalam proses maserasi dengan perendaman pelarut dalam suhu ruang dapat mengekstrak senyawa alami bahan akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel yang menyebabkan dinding sel serta membran sel terpecah. Setelah dinding sel dan membran sel pecah kemudian senyawa metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan ikut terlarut dalam pelarut organik yang digunakan.

Winarno, *et al.* (1980), yang menyatakan bahwa jika sel-sel mengalami pukulan mekanik kemudian pecah, maka pigmen akan keluar dan sebagian dapat mengalami kerusakan akibat teroksidasi saat kontak dengan udara. Ditambahkan oleh Lutfiana (2013), keuntungan dari maserasi adalah lebih praktis, pelarut yang digunakan lebih sedikit dibandingkan dengan perkolasi dan tidak memerlukan pemanasan, sedangkan kekurangannya adalah waktu yang dibutuhkan lebih lama.

### 2.5.2 Fraksinasi (Partisi)

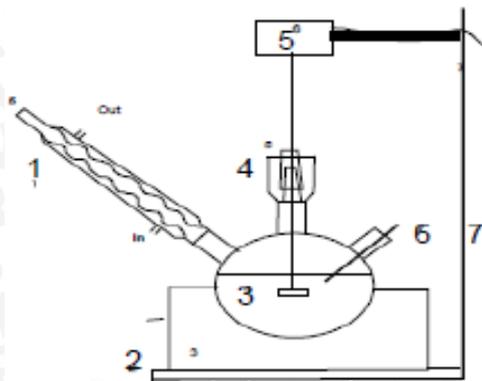
Fraksinasi merupakan proses pemisahan fraksi yang terkandung dalam suatu larutan atau suspensi. yang mempunyai karakteristik berbeda. Pemisahan kedua fraksi dalam proses fraksinasi dilakukan dengan memanfaatkan perbedaan sifat yang terkandung dalam fraksi. Jenis pelarut dan senyawa kompleks yang digunakan sangat berpengaruh terhadap proses pemisahan

fraksi (Yuliasih, 2012). Menurut Lutfiana (2013), fraksinasi merupakan prosedur pemisahan yang bertujuan untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari kandungan yang lain. Senyawa yang bersifat polar akan masuk kedalam pelarut polar dan senyawa nonpolar akan masuk ke pelarut non polar.

### 2.5.3 Evaporasi

Evaporator merupakan salah satu alat yang banyak digunakan di industri kimia untuk memekatkan suatu larutan. *Evaporator* adalah sebuah alat yang berfungsi mengubah sebagian atau keseluruhan sebuah pelarut dari sebuah larutan dari bentuk cair menjadi uap. Evaporator mempunyai dua prinsip dasar, untuk menukar panas dan untuk memisahkan uap yang terbentuk dari cairan (Sutrisno *et al.*, 2012). Menurut Frayekti (2013), evaporasi merupakan suatu proses penguapan sebagian dari pelarut sehingga didapatkan larutan zat cair pekat yang konsentrasinya lebih tinggi. Tujuan dari evaporasi itu sendiri yaitu untuk memekatkan larutan yang terdiri dari zat terlarut yang tak mudah menguap dan pelarut yang mudah menguap.

Pemekatan dengan *rotary vacuum evaporator* merupakan teknik pemekatan ekstrak tanpa merusak senyawa yang diisolasi dari ekstrak karena rangkaian alat ini menggunakan pompa vakum sehingga di dalam evaporator terjadi pengurangan tekanan yang menyebabkan pelarut dapat menguap di bawah titik didihnya (Siadi, 2012). Ditambahkan oleh Lutfiana (2013), filtrasi yang diperoleh dari proses maserasi diuapkan dengan alat penguap putar vakum (*vakum rotary evaporator*) hingga menghasilkan ekstrak pekat. Bagian-bagian dari evaporator dapat dilihat pada Gambar 6.



Keterangan:

1. Pendingin balik
2. Waterbath
3. Labu leher tiga
4. Pengaduk merkuri
5. Motor pengaduk
6. Alat pengambil sampel
7. Statif

**Gambar 6.** Bagian-Bagian Evaporator (Distantina *et al.*, 2006)

#### 2.5.4 Gas Nitrogen

Nitrogen merupakan komponen terbesar pertama pada atmosfer bumi dengan jumlah mencapai 70%, dalam sistem periodik nitrogen disimbolkan "N" dengan 7 unsur atom. Nitrogen bersifat independen dan tidak mudah bereaksi dengan senyawa atau unsur lain, berbentuk gas, tidak berwarna, tidak berbau, dan tidak berasa (Distantina *et al.*, 2006). Menurut Romiyanto (2014), Prinsip penguapan pelarut dengan menggunakan gas nitrogen ialah molekul  $N_2$  berikatan kovalen rangkap tiga dengan energi ikatan tinggi bereaksi dengan molekul pelarut, selain itu nitrogen bereaksi dengan hidrogen atau oksigen pada suhu tinggi. Ditambahkan oleh Setianingsih (2010), metode penguapan pelarut dengan menggunakan gas nitrogen ialah penyemprotan gas  $N_2$  pada tekanan tertentu, sehingga molekul  $N_2$  berikatan dengan molekul pelarut dan diuapkan melalui reaksi dengan oksigen diudara.

#### 2.6 Pelarut Untuk Proses Ekstraksi

Pelarut merupakan salah satu faktor yang sangat menentukan dalam proses ekstraksi. Pemilihan pelarut didasarkan pada kemampuan dan kelarutannya dalam mengekstrak senyawa yang diinginkan (Sudarmadji *et al.*, 2007). Menurut Raiz (2014), Metode serta pelarut yang digunakan untuk memperoleh ekstrak menjadi faktor penting dalam optimasi proses ekstraksi

komponen bioaktif dari alam. Interaksi antara solute dengan padatan, solute dengan pelarut dan pelarut dengan padatan sangat berpengaruh pada proses ekstraksi. Adanya penambahan pelarut menyebabkan pori-pori padatan mengembang dan pelarut yang masuk kemudian melarutkan solute dilanjutkan dengan berdifusi keluar permukaan partikel padatan dan bergerak ke lapisan film sekitar padatan, untuk selanjutnya ke badan cairan.

Menurut Sudarmadji *et al.*, (2007), pemilihan pelarut dalam proses ekstraksi harus memperhatikan sifat komponen senyawa yang akan diisolasi, terutama sifat polaritas dan gugus polar dari senyawa tersebut. Senyawa yang bersifat polar dapat larut dalam pelarut polar dan senyawa nonpolar dapat larut dalam senyawa nonpolar. Polaritas bahan saat proses ekstraksi dapat berubah karena terjadinya perubahan kimia. Tingkat polaritas bahan ditunjukkan melalui pengukuran konstanta dielektrik bahan pelarut, dimana semakin besar konstanta dielektrik maka tingkat kepolaran akan semakin besar.

### 2.6.1 Metanol (CH<sub>3</sub>OH)

Metanol adalah senyawa alkohol dengan rumus kimia CH<sub>3</sub>OH. Metanol merupakan bentuk paling sederhana dari senyawa alkohol. Metanol termasuk golongan monohidrat dimana tiap molekulnya mengandung satu gugus hidroksil. Pada keadaan atmosfer berbentuk cairan yang mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar, dan beracun dengan bau yang khas (Nabila, 2011). Menurut Astarina, *et al.*, (2013), metanol merupakan pelarut yang bersifat universal sehingga dapat melarutkan analit yang bersifat polar dan nonpolar.

Metanol digunakan sebagai pelarut dalam ekstraksi maserasi karena metanol bersifat sebagai pelarut polar yang memiliki indek polaritas 5,1 sehingga mampu melarutkan unsur-unsur bioaktif yang bersifat polar pada tanaman. Ekstraksi dengan senyawa ini mampu menghasilkan jumlah filtrat yang optimal (Sumiheet *al.*,2014). Ditambahkan oleh Fajarullah, *et al.*, (2012), bahwa

rendemen ekstrak hasil maserasi dengan pelarut yang berbeda akan menghasilkan rendemen yang berbeda dan nilai rendemen yang dihasilkan dari ekstrak metanol diduga dipengaruhi sifat larutan tersebut yang dapat melarutkan hampir semua komponen bahan aktif. Sifat kimia dan fisika metanol dapat dilihat pada Tabel 1.

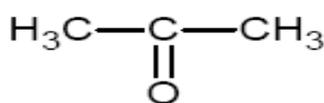
**Tabel 1.** Sifat Kimia dan Fisika Metanol

No	Karakteristik	Metanol
1	Nama Lain	Hidroksi metana, metil alkohol, metil hidrat, alkohol kayu dan karbinol
2	Rumus Bangun	$\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\   \\ \text{H} \end{array}$
3	Sifat	Mudah terbakar, tidak berwarna
4	Titik Leleh	-97 °C
5	Titik Didih	64.7 °C
6	Konstanta Dielektrik	33

Sumber: MSDS (2006)

### 2.6.2 Aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ )

Aseton atau propanon ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) merupakan suku pertama dari alkanon yang berwujud cair pada suhu kamar. Aseton dapat larut dalam air, tetapi keton yang lebih tinggi tidak dapat larut dalam air (Suyitno, 2008). Ditambahkan Palupi (2009), Aseton dikenal juga dengan dimetil keton atau 2 propanon merupakan senyawa penting dari alipatic keton. Aseton pertama kali dihasilkan dengan cara distilasi kering dari kalsium asetat. Reaksi pembentukan aseton dapat dilihat pada Gambar 6.



**Gambar 7.** Rumus Molekul Aseton (Suyitno, 2008)

Pelarut alkohol yaitu aseton merupakan pelarut organik yang bersifat polar yang memiliki kemampuan untuk memisahkan fraksi gula larut air dan lemak tanpa melarutkan proteinnya serta senyawa aktifnya (Karnila *et al.*, 2011). Audi dan Vanda (2011), menyatakan bahwa sifat aseton pada suhu kamar

adalah larutan jernih, tidak berwarna, bersifat volatil dengan bau aromatik menyerupai benzena dan mudah terbakar, sehingga aseton merupakan zat pembakar berbahaya yang signifikan pada suhu kamar. Aseton dapat mengiritasi kulit, mata, dan saluran pernafasan. Sifat kimia dan fisika aseton dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Sifat Kimia dan Fisika Aseton

Karakteristik	Aseton
Rumus Molekul	(CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub> )
Rumus Bangun	$  \begin{array}{c}  \text{H} \\    \\  \text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\    \\  \text{H}  \end{array}  $
Berat Molekul	58,08
Titik Leleh	-137.2 °F
Titik Didih	56.2°C
Batas Ledak Atas	12,8% v/v
Batas Ledak Bawah	2,6% v/v
pH	7

Sumber: MSDS (2006)

### 2.6.3 N-Heksan / Heksana (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>)

Heksana (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) merupakan senyawa hidrokarbon alkana yang memiliki rumus isomer utama CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>. Heksana merupakan salah satu jenis pelarut non polar (Maulida dan Zulkarnaen, 2010). Ditambahkan oleh Abdullah dan Widiwati (2010), yang melaporkan bahwa sifat fisik dari n- heksana ialah berbentuk cair, jernih atau tidak berwarna, berbau seperti gasoline, bersifat kelarutan tidak larut dalam air dan lebih mudah terlarut dalam alkohol.

**Tabel 3.** Sifat Kimia dan Fisika N-Heksan

Sifat fisis	Keterangan
Rumus molekul	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>
Rumus kimia	C-H <sub>3</sub> -(C-H <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -C-H <sub>3</sub>
Berat molekul	86,18 g/mol
Bentuk, Warna	Cairan, Bening
Densitas	0,6548 g/ml
Titik Beku	-95°C (-139 F)
Titik didih	69 °C (156 F)
Kelarutan dalam air	Tidak larut
Viskositas	.32 cP @ 25 C
Solvent Soluble	alkohol, eter, kloroform, aseton

Sumber: MSDS (1999)

#### 2.6.4 Etil Asetat (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>)

Etil asetat merupakan pelarut dari jenis semi polar dengan titik didid relatif rendah yaitu 77°C. Dalam proses destilasi etil asetat berfungsi untuk memudahkan pemisahan minyak dan pelarutnya (Susanti *et al.*, 2012). Menurut Romiyanto (2014), etil asetat merupakan senyawa hasil ester dari etanol dan asam asetat. Etil asetat berupa zat cair dan tidak berwarna serta beraroma khas. Etil asetat merupakan pelarut semi polar yang mudah menguap, tidak beracun dan tidak higroskopis.

**Tabel 4.** Sifat Kimia dan Fisika Etil Asetat

Spesifikasi	Keterangan
Bentuk	Cairan tidak berwarna
Rumus molekul	CH <sub>3</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Berat molekul	88,106 g/mol
Titik didih (1 atm)	77,1 °C
Temperatur kritis	250°C
Tekanan kritis	37,8 atm
Densitas	1,85 g/mol
Kemurnian	>99,5 %
Nama Lain	Ethyl Ester, Acetic Ether, Acetic Ester, Acetoxyethane
Kelarutan	Dalam Air
Flash Point	-4°C

Sumber: MSDS (2009)

### 2.7 Isolasi Komponen Pigmen *Sargassum cinereum*

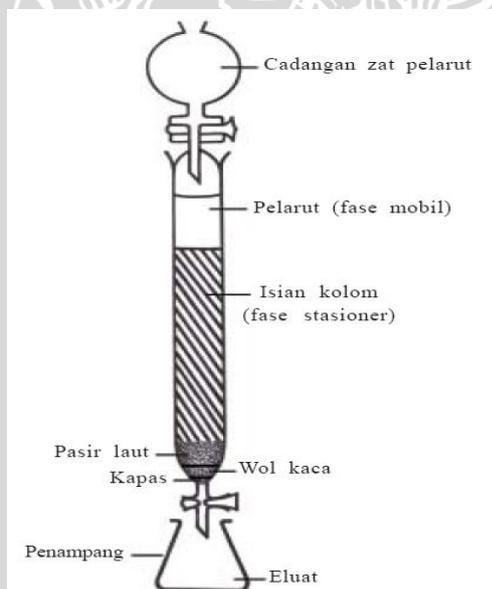
#### 2.7.1 Kromatografi

Kromatografi merupakan metode pemisahan berdasarkan perbedaan distribusi komponen-komponen dalam campuran pada fase gerak dan fase diamnya. Kromatografi adsorpsi merupakan salah satu tipe kromatografi biasanya fase geraknya berupa cairan dan fase diamnya berupa solid adsorben. Pemisahannya tergantung pada selektifitas penyerapan komponen dari suatu campuran pada permukaan padatan. Persyaratan fase gerak dan fase diam dalam kromatografi ialah fase gerak dan fase tidak boleh bereaksi, sampel ekstrak harus larut dalam fase gerak dan berinteraksi dengan fase diam, fase

gerak harus dapat mengalir dalam fase diam, serta fase diam harus tetap dalam posisinya.(Lestari, 2009).

### 2.7.1.1 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan teknik untuk memisahkan suatu komponen dari campuran komponen lainnya berdasarkan perbedaan interaksinya selama pergerakan melalui fase diam (*stationer*) oleh fase (*mobile*) yang dapat berupa gas atau zat cair (Santi, 2006). Menurut Romiyanto (2014), pigmen-pigmen akan bergerak turun melewati kolom dengan kecepatan berbeda tergantung dari kuat atau tidaknya adsorpsi pigmen. Pigmen yang teradsorpsi lemah akan melewati kolom lebih cepat dari pada pigmen yang teradsorpsi kuat. Ditambahkan Sudarmadji, *et al.*, (2007), bahwa kromatografi juga dapat digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang tidak berwarna. Bagian-bagian dari kromatografi kolom disajikan pada Gambar 9.

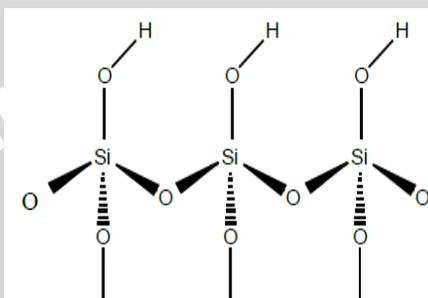


**Gambar 8.** Bagian-bagian dari Kromatografi Kolom (Sudarmadji *et al.*, 2007)

#### 2.7.1.1.1 Silica Gel ( $\text{SiO}_2$ )

Silika gel mempunyai gugus polar yaitu ikatan Si-O dan O-H yang dapat berinteraksi dengan dipol senyawa yang dipisahkan. Silika gel juga dapat membentuk ikatan hidrogen terutama dengan donor H seperti alkohol, fenol,

amina, amida dan asam karboksilat (Lestari, 2009). Menurut Markham (1988), yang menyatakan bahwa jenis fase diam yang sering digunakan dalam kromatografi ialah jenis GF<sub>254</sub> dengan G adalah gypsum (CaSO<sub>4</sub>), F adalah floroscene, dan 254 melambangkan panjang gelombang 254 nm dan untuk pemisahan senyawa yang kurang polar fase diam yang terbaik digunakan ialah Silika gel jenis Kisel gel 60, 70-230 mesh (Merck). Struktur bangun silika gel dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 9. Struktur Bangun Silika Gel (Lestari, 2009)

## 2.8 Identifikasi Pigmen

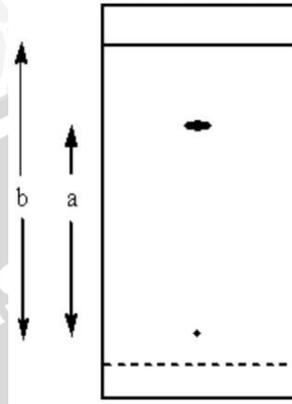
### 2.8.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan zat terlarut oleh suatu proses migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase atau lebih. Cara pemisahan dengan absorpsi lapisan tipis yang sekarang dikenal dengan kromatografi lapis tipis (KLT) sebenarnya telah dipakai oleh Ismailov dan Shraiber sejak tahun 1938 (Paransa *et al.*, 2014).

Dalam analisa senyawa dengan metode KLT dilakukan dengan pengukuran jarak tempuh suatu senyawa dalam fase diam yang di bawa oleh fase gerak pada jarak tertentu yang sering disebut dengan bilangan R<sub>f</sub> (Markham, 1988). Menurut Hijaz (2009), bilangan R<sub>f</sub> didefinisikan sebagai jarak tempuh suatu senyawa yang dibagi dengan jarak yang ditempuh dari garis awal hingga batas atas pelat KLT, sehingga bilangan R<sub>f</sub> selalu kurang dari 1,0. Proses

kromatografi lapis tipis disajikan pada Gambar 11. Adapun rumus untuk menentukan nilai  $R_f$  menurut Hijaz (2009) ialah :

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}}$$



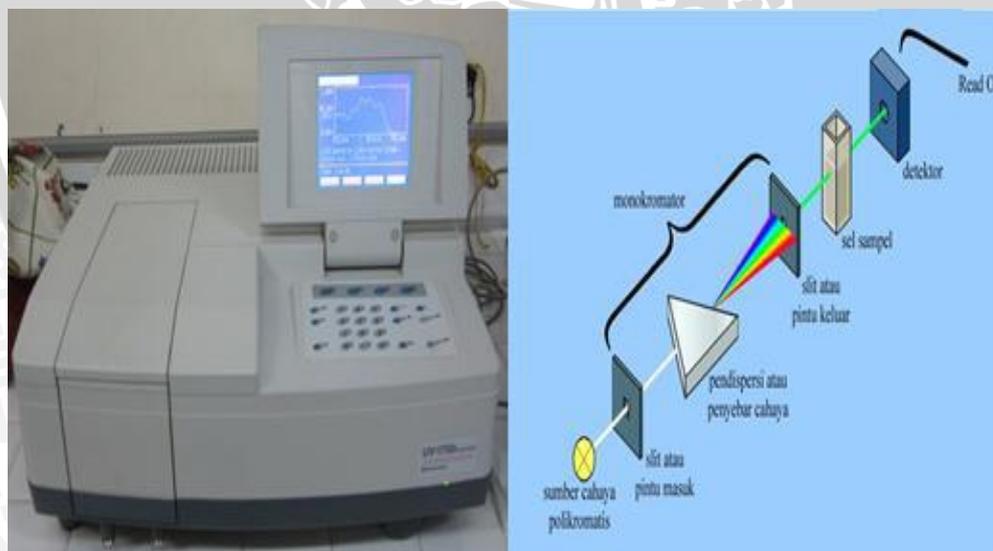
**Gambar 10.** Proses Kromatografi Lapis Tipis Hijaz (2009)

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan kromatografi cair yang paling sederhana serta relatif lebih mudah dan murah dibanding metode kromatografi lainnya. Pemisahan senyawa menggunakan teknik KLT dapat dilakukan hanya dalam beberapa menit dengan alat yang tidak terlalu mahal. Kelebihan lain adalah pemakaian pelarut dan cuplikan yang jumlahnya sedikit dan kemungkinan hasilnya dapat langsung dibandingkan (Lestari, 2009).

### 2.8.2 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometer merupakan instrumen yang digunakan untuk analisa kimia berdasarkan sifat-sifat dari interaksi antara energi radiasi elektromagnetik dengan zat kimia. Hasil dari interaksi ini dapat menimbulkan beberapa peristiwa seperti pemantulan, pembiasan, interferensi, difraksi, absorbansi (penyerapan), fluoresensi, fosforiensi, dan ionisasi. Dasar dari analisa kimia dengan spektroskopi adalah absorbansi, karena secara kualitatif proses absorbansi pada setiap zat kimia bersifat spesifik atau unik dan secara kuantitatif absorbansi juga berbanding lurus dengan banyaknya zat kimia (Sudarmadji, *et al.* 2007).

Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis adalah berdasarkan penyerapan cahaya atau energi radiasi oleh suatu larutan yang diuji. Setiap kromofor (zat warna) mempunyai panjang gelombang maksimum yang berbeda. Dalam prosesnya, cahaya yang bersifat polikromatis (mempunyai banyak warna) dari sumber cahaya dipancarkan menuju monokromator yang akan menguraikan sinar tersebut menjadi cahaya monokromatis (tunggal) dengan pita-pita panjang gelombang yang dapat digunakan untuk pengukuran suatu zat tertentu. Cahaya atau energi radiasi dari monokromator dipancarkan pada suatu larutan sampel dengan konsentrasi tertentu di dalam kuvet, sehingga ada cahaya yang diserap dan ada pula yang diteruskan. Cahaya yang diserap sebanding dengan konsentrasi larutan sampel, sehingga akan diketahui konsentrasi zat di dalam sampel secara kuantitatif. Jumlah cahaya yang diserap oleh larutan akan menghasilkan sinyal elektrik pada detektor dan diterjemahkan ke dalam bentuk angka-angka oleh pencatat (*reader*) (Triyati, 1985). Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis disajikan pada Gambar 11.

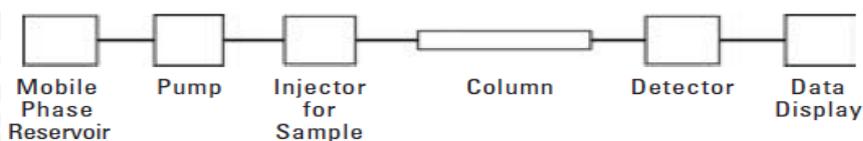


**Gambar 11.** Prinsip kerja Spektrofotometer UV-Vis (Sudarmadji, *et al.*, 2007)

### 2.8.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas). Bila fase diam berupa zat padat yang aktif, maka dikenal istilah kromatografi penyerapan (adsorption chromatography). Bila fase diam berupa zat cair, maka teknik ini disebut kromatografi pembagian (*partition chromatography*). Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) merupakan salah satu metode kimia dan fisikokimia (Putra, 2004).

*High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) adalah bentuk spesifik kromatografi kolom yang umumnya digunakan dalam proses biokimia dan analisis untuk memisahkan, mengidentifikasi dan mengukur senyawa aktif. HPLC terdiri dari kolom ( fase diam ) , pompa yang bergerak fase gerak melalui kolom dan detektor yang menunjukkan waktu retensi dari molekul. Waktu retensi bervariasi tergantung pada interaksi antara fase diam, molekul yang dianalisis, dan pelarut (s) yang digunakan. Sampel yang akan dianalisis dicoba dalam volume kecil untuk aliran fase gerak dan serta kimia tertentu atau interaksi fisik dengan fase diam. Jumlah retardasi tergantung pada sifat dari analit dan komposisi dari kedua fase stasioner dan mobile. Waktu di mana suatu analit tertentu terelusi (keluar dari ujung kolom) disebut waktu retensi. Pelarut yang umum digunakan mencakup kombinasi larut air atau cairan organik seperti metanol dan asetonitril (Malviya *et al.*, 2009). Prinsip kerja HPLC disajikan pada Gambar 13.



**Gambar 12.** Prinsip kerja HPLC (Kupiec, 2004)

### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Bahan Penelitian

Dalam penelitian Identifikasi Komponen Pigmen Pada Alga Coklat *Sargassum cinereum* Dengan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) bahan baku yang digunakan adalah rumput laut coklat jenis *Sargassum cinereum* yang diambil pada malam hari dalam kondisi segar yang diperoleh dari perairan Desa Cabiye, Pulau Talango, Kabupaten Sumenep, Madura. Bahan kimia yang digunakan antara lain  $\text{CaCO}_3$ , aseton PA(*pro analysis*), methanol PA, dietil eter PA, aquadest pH 7, saturasi garam, gas nitrogen, n-heksan PA, etil asetat PA, aseton teknis, *silica gel* F-254 (60 mesh), pasir laut (*sea sand*), pelat KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Bahan-bahan lain yang digunakan kertas koran, garam grosok, kertas saring kasar dan halus, kapas, air, alumunium foil, *cling wrap*, kertas Whatman No. 42, dan kertas label.

#### 3.2 Alat Penelitian

Dalam penelitian Identifikasi Komponen Pigmen Pada Alga Coklat *Sargassum cinereum* Dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) alat-alat yang digunakan antara lain cold box, lidi, keranjang plastik, kain bersih, baskom, gunting, kipas, cooper (blender), sendok, timbangan digital, botol plastik (1,5 liter), sendok bahan, tumbukan batu, sendok bahan, gelas ukur (ukuran 250 mL dan 100 mL), beaker glass (ukuran 1000 mL 250 mL, 100 mL, dan 50 mL), spatula, erlen meyer (ukuran 500 mL dan 250 mL), corong kaca, labu pemisah (corong pisah), *freezer*, kulkas, statif, kromatografi kolom, *magnetic stirrer*, *hot plate*, tabung gas Nitrogen ( $\text{N}_2$ ), pipet tetes, pipet volume (ukuran 1 mL dan 10 mL), bola hisap, pipa kapiler, penggaris, *cutter*, pensil 2B, pinset, spidol marker, cuvet, botol sampel (ukuran 100 mL dan 15 mL), tabung reaksi, inkubator, rak

tabung reaksi, mikro pipet (ukuran 0,1 mL), *rotary vacuum evaporator* merk Buchi-R-210 spektrofotometer UV-Vis merk pharo 300 dan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) dengan merk shimadzu.

### 3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian Identifikasi Komponen Pigmen Pada Alga Coklat *Sargassum cinereum* dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) adalah metode eksploratif. Menurut Ritonga (2000), metode penelitian eksploratif bertujuan untuk mendapatkan data dasar yang diperlukan sebagai dasar penelitian lebih lanjut atau dasar membuat suatu keputusan. Dalam kedudukannya sebagai pendahulu bagi penelitian sebenarnya, penelitian eksploratif memberi arah pada perumusan masalah dan hipotesis walaupun penelitian eksploratif itu sendiri tidak menggunakan hipotesis penelitian. Ditambahkan oleh Hermawan (2005), penelitian eksploratif dilakukan apabila penelitian sebelumnya masih jarang. Tujuannya adalah melihat pola, gagasan atau merumuskan hipotesis bukan untuk menguji hipotesis.

### 3.4 Persiapan Penelitian

#### 3.4.1 Persiapan Sampel *Sargassum Cinereum*

Sampel rumput laut coklat *sargassum cinereum* yang baru diambil dari laut segera dicuci dengan air laut untuk menghilangkan kotoran, lalu dimasukkan dalam *cool box* berisi es. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Kurniastuti dan lia (2009), pada umumnya pigmen mempunyai sifat tidak cukup stabil terhadap panas, cahaya, dan pH tertentu.

Setelah sampai di laboratorium, sampel rumput laut coklat *Sargassum cinereum* dibawa ke dalam ruang gelap lalu sampel disortir agar tidak tercampur dengan spesies rumput laut lain dan diambil bagian yang menyerupai daun

(thalus daun) dipisahkan dengan bagian lain. Kemudian dicuci dengan air mengalir untuk membersihkan sampel dari sisa kotoran dan garam yang berasal dari air laut yang masih menempel. Selanjutnya sampel diangin anginkan dengan cara dihamparkan di atas kertas koran untuk mengurangi air pada permukaan sampel.

#### 3.4.2 Ekstrak Pigmen *Sargassum cinereum*

Setelah proses preparasi sampel selesai dilakukan, dilanjutkan dengan proses ekstraksi pigmen sampel segar *Sargassum cinereum*. Proses ekstraksi senyawa pigmen dari sampel segar *Sargassum cinereum* mengacu pada metode Costa *et al.*, (2009) yang telah dimodifikasi beberapa prosesnya tujuan memaksimalkan hasil ekstraksi. Ekstraksi sampel dilakukan dengan metode maserasi.

Pertama, sampel rumput laut cokelat *Sargassum cinereum* dipotong-potong dengan ukuran  $\pm 1 \text{ cm}^2$  untuk memperluas permukaannya, sehingga memaksimalkan proses ekstraksi, kemudian ditimbang sebanyak 100 gram dan dihaluskan menggunakan mortar dan alu sambil ditambahkan  $\pm 0,5$  gram  $\text{CaCO}_3$  sebagai agen penetral. Menurut Romiyanto (2014), semakin kecil ukuran maka luas permukaan akan semakin tinggi, hal ini dikarenakan jarak difusi zat terlarut semakin kecil.

Sampel yang telah halus dimasukkan dalam *beakerglass* 1000 ml yang telah dibungkus dengan *aluminium foil* dan ditambah pelarut metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) dan aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) dengan perbandingan 7:3 (v/v) sebanyak 300 ml kemudian ditutup rapat menggunakan *plastic wrap*, dan dilapisi lagi dengan *aluminium foil*. Menurut Hasanah (2014), jenis pelarut yang baik digunakan untuk ekstraksi senyawa karotenoid yaitu senyawa polar contohnya metanol, aseton, dan etanol. Sesuai penelitian Indah *et al.*, (2010), pelarut metanol merupakan pelarut yang mampu mengekstrak paling banyak zat warna

dibandingkan dengan pelarut lain. Hal ini dikarenakan metanol bersifat dapat bercampur dengan air dan dapat melarutkan semua senyawa organik yang terkandung pada bahan dengan cara merusak sel yang ada di dalam jaringan sehingga pigmen dapat larut dalam bahan hingga bahan berwarna pucat, sedangkan peran aseton adalah mengangkat pigmen yang bersifat semi polar.

Selanjutnya sampel didiamkan selama 24 jam di dalam ruang gelap, kemudian disaring menggunakan kertas whatman no. 42 untuk memisahkan filtrat dan residu sampel. Sesuai prinsip maserasi menurut Miryanti *et al.*, (2011), yaitu pengekstraksian komponen yang terkandung dengan cara yang sama dengan lama waktu 24 jam untuk memaksimalkan ekstraksi pigmen. Menurut Istiqomah (2013), selesainya waktu maserasi menandakan keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan masuk ke dalam cairan, telah tercapai maka proses difusi segera berakhir.

#### **3.4.3 Fraksinasi dan Evaporasi**

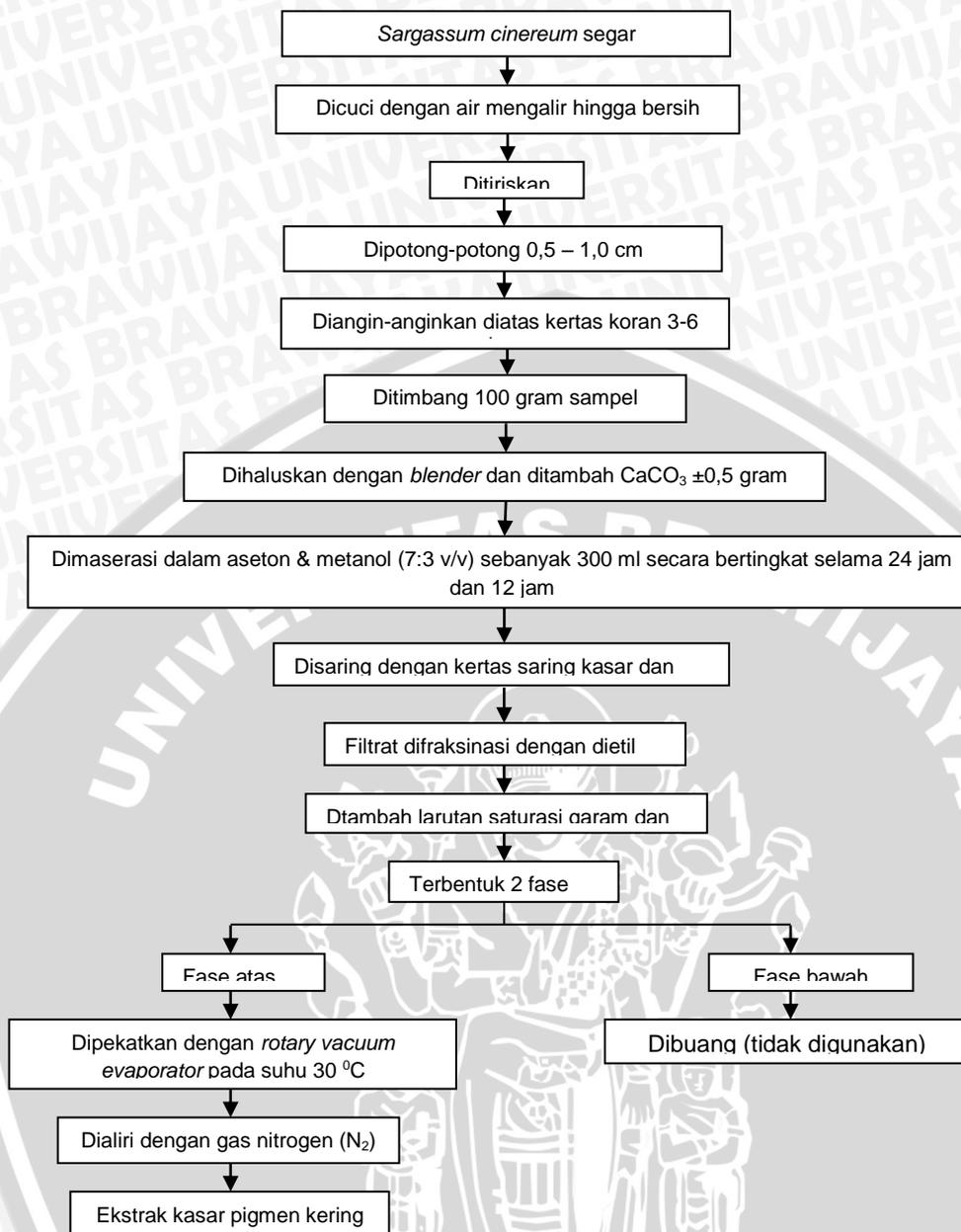
Proses selanjutnya adalah fraksinasi yang bertujuan untuk memisahkan fraksi pigmen yang terkandung dalam filtrat. Fraksinasi dilakukan penambahan dietil eter ( $C_4H_{10}O$ ), saturasi garam, dan air secara berurutan dengan perbandingan (100 mL : 50 mL : 120 mL : 10 mL) pada filtrat hasil ekstraksi di dalam corong pisah, sehingga ekstrak kasar pigmen yang non polar terangkat ke atas oleh dietil eter dan terbentuk dua fase, yaitu fase atas dan fase bawah. Fase atas (non polar) adalah fraksi yang mengandung ekstrak kasar pigmen yang terlarut dalam dietil eter, sedangkan fase bawah (polar) adalah fraksi yang terdiri dari campuran saturasi garam, air dan pelarut yang digunakan dalam proses maserasi yang dilakukan sebelumnya.

Menurut Sari (2012), prinsip dari fraksinasi adalah proses penarikan senyawa pada suatu ekstrak dengan menggunakan dua macam pelarut yang saling tidak bercampur. Ditambahkan menurut Ardy (2013), menyatakan suatu

senyawa akan mengikuti prinsip *like dissolves like* yaitu pelarut polar akan melarutkan zat yang terlarut yang bersifat polar dan pelarut non polar akan melarutkan zat yang terlarut yang bersifat non polar.

Dari dua fase yang terbentuk dari hasil fraksinasi, fase bawah tidak digunakan sedangkan fase atas diukur dan ditampung di dalam labu erlenmeyer 250 ml. kemudian hasil fraksinasi dipekatkan menggunakan *rotary vacum evaporator* pada suhu 35 °C dengan kecepatan 100 rpm selama 90 menit. Menurut Tenggo (2013), maserat yang diperoleh disatukan dan dievaporasi pada suhu 30-40 °C dengan menggunakan alat penguap vakum dan diperoleh ekstrak kental metanol. Evaporasi ini bertujuan untuk menguapkan pelarut (dietil eter) sehingga didapatkan ekstrak kasar (*crude*) yang ditampung di dalam botol sampel.

Setelah didapatkan ekstrak kasar yang pekat, kemudian ekstrak dikeringkan dengan menguapkan sisa pelarut yang masih tertinggal menggunakan aliran gas nitrogen (N<sub>2</sub>). Botol sampel ditutup dengan *plastic wrap* dan dibungkus dengan *aluminium foil* kemudian disimpan dalam *freezer*. Diagram alir ekstraksi dan fraksinasi *Sargassum cinereum* dapat dilihat pada gambar 13.



**Gambar 13.** Diagram Alir dan Fraksinasi *Sargassum cinereum* (Costa *et al.*, 2009)

#### 3.4.4 Isolasi Pigmen dengan Kromatografi Kolom

Isolasi senyawa pigmen yang terkandung dalam *Sargassum cinereum* dilakukan dengan metode kromatografi kolom berdasarkan modifikasi metode isolasi menurut Markham (1998). Menurut Ningsih (2006), pemisahan terbaik dari hasil fraksinasi asalah menggunakan Kromatografi Kolom. Ditambahkan Noviyanti (2010), kromatografi kolom adalah proses pemisahan fraksi berdasarkan perbedaan distribusi campuran komponen antara fase gerak dan

fase diam. Fase diam adalah pengisi kolom dimana fase gerak akan mengalir. Setiap senyawa memiliki koefisien yang berbeda terhadap fase gerak dan fase diam. Senyawa yang berinteraksi lemah dengan fase diam akan bergerak lebih cepat melalui fase diam, sedangkan senyawa dengan interaksi yang kuat dengan fase diam akan bergerak sangat lambat.

Dalam penelitian ini digunakan *normal phase*, yaitu penggunaan fase diam yang bersifat polar dan fase gerak yang bersifat non polar dengan fase diam *silica gel* (SiO<sub>2</sub>) F-255 yang bersifat polar dan fase gerak campuran antara n-heksan (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) dan etil asetat (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) yang cenderung bersifat non polar. Tahap awal dalam isolasi pigmen menggunakan metode kromatografi kolom adalah preparasi kolom kromatografi. *Silica gel* F-254 ditimbang sebanyak 40 gram kemudian dilarutkan dalam 200 mL fase gerak dari campuran n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 8:2 (v/v) di dalam *beakerglass* kemudian ditutup dengan *plastic wrap* untuk meminimalkan penguapan fase gerak. Selanjutnya *silica gel* dan fase gerak dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam dengan kecepatan 150 rpm. Tujuan adalah untuk ekualibrasi antara fase gerak dan fase diam sehingga tidak terbentuk gelembung udara di dalam kolom kromatografi yang dapat menyebabkan pecahnya *silica gel* (fase diam).

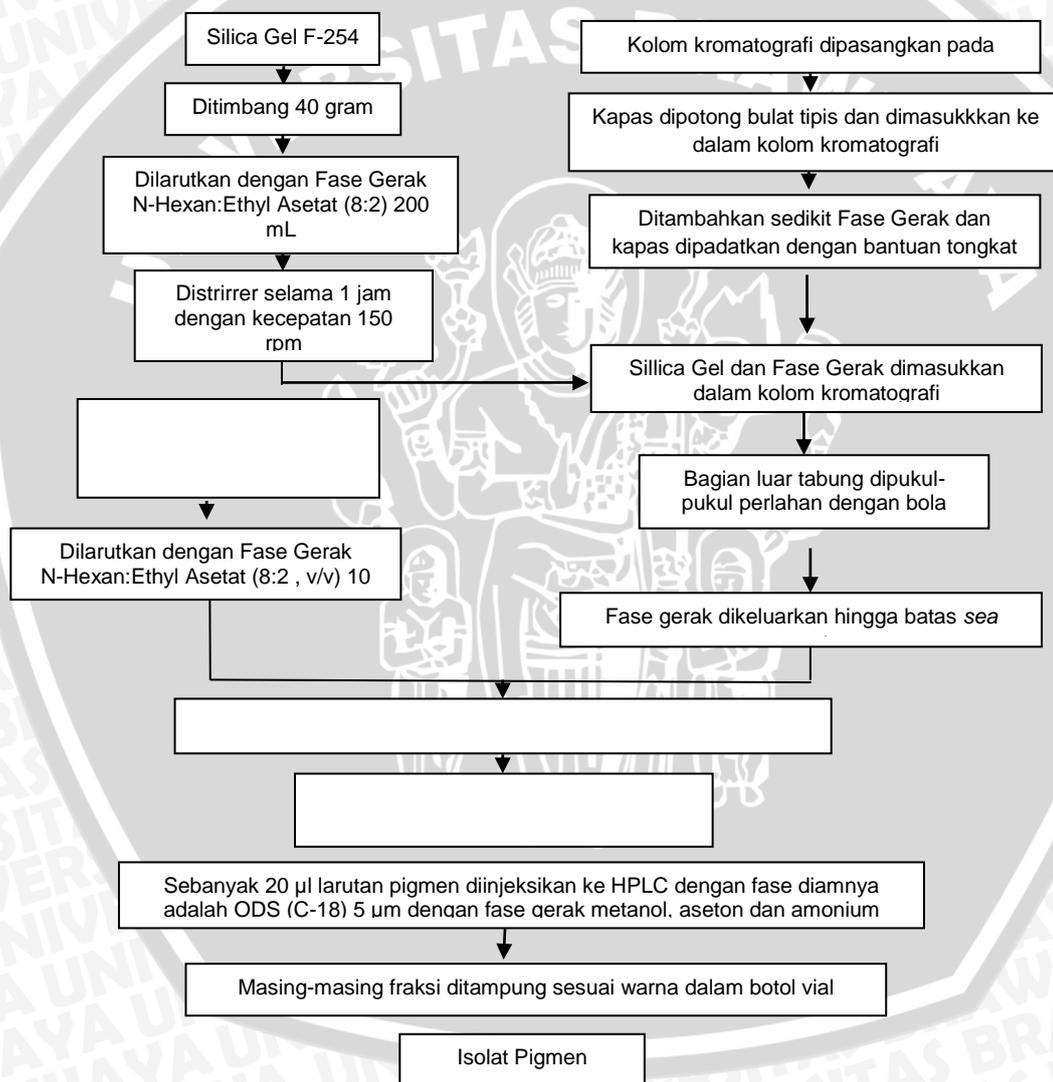
Tahap berikutnya, kolom kromatografi dipasang pada statif dan diisi dengan gulungan kapas yang telah dibasahi dengan fase gerak kemudian dipadatkan di dasar kolom kromatografi dengan bantuan lidi. Pemberian kapas bertujuan untuk menahan fase diam agar tidak keluar melalui kran kolom kromatografi. Selanjutnya kolom kromatografi diisi dengan fase gerak n-heksan dan etil asetat (8:2 v/v) sampai setengah panjang kolom kromatografi untuk membasahi bagian dalam kolom kromatografi. Bubur *silica gel* dimasukkan ke dalam kolom kromatografi sedikit demi sedikit dengan bantuan sendok dalam posisi kran kromatografi terbuka, sambil terus diaduk agar tidak terdapat

gelembung udara. Setelah seluruh bubuk *silica gel* dimasukkan, kran kromatografi ditutup kembali. Kemudian kolom kromatografi dipukul-pukul perlahan menggunakan bola hisap atau alat pemukul lainnya agar fase diam benar-benar padat dan permukaannya rata.

Selanjutnya kolom kromatografi dibiarkan selama semalam ( $\pm 12$  jam) untuk memastikan *silica gel* benar benar padat. Pada saat didiamkan, mulut kolom dan ujung kran kolom kromatografi ditutup menggunakan *plastic wrap* untuk meminimalkan penguapan fase gerak. Batas atas fase diam ditandai dengan kertas label untuk mengetahui padat atau tidaknya fase diam di dalam kolom. Fase diam yang belum padat diketahui dengan turunnya permukaan fase diam, terdapat gelembung udara, terbentuk retakan atau lapisan-lapisan dalam *silica gel*. Apabila fase diam belum padat, maka preparasi kolom kromatografi harus diulangi mulai dari awal. Setelah kolom kromatografi didiamkan selama semalam, dimasukkan pasir laut ke dalam kolom kromatografi sebanyak  $\pm 2,5$  gram, kemudian diketuk-ketuk untuk meratakan permukaannya.

Selanjutnya fase gerak di dalam kolom dikurangi volumenya sampai permukaan fase gerak mendekati permukaan pasir laut. Ekstrak kasar pigmen kering dilarutkan dengan  $\pm 10$  ml fase gerak n-heksan dan etil asetat (8:2 v/v). Selanjutnya seluruh fase gerak dikeluarkan terlebih dahulu dari kolom kromatografi hingga batas *sea sand*. Kemudian larutan ekstrak pigmen dimasukkan secara perlahan dengan pipet tetes. Lalu kran kromatografi dibuka dan ditunggu sampai seluruh ekstrak pigmen melewati batass *sea sand* dan masuk ke dalam fase diam silika gel-60. Kemudian ditambahkan dengan fase gerak n-heksan dan etil asetat (8:2 v/v) perlahan sampai kolom terisi hampir penuh. Selanjutnya seluruh fraksi warna muncul dan ditampung ke dalam botol sampel. Botol sampel dibungkus alumunium foil untuk melindungi isolat dari degradasi karena pengaruh cahaya.

Fase gerak yang digunakan terus ditingkatkan kepolarannya dengan rata-rata volume 200-300 mL yaitu dari perbandingan n-heksan dan etil asetat (8:2 v/v), n-heksan dan etil asetat (7:3 v/v), n-heksan dan etil asetat (6:4 v/v), hingga perbandingan n-heksan dan etil asetat (5:5 v/v). Seluruh fraksi warna yang tertampung diberi tanda penomoran dengan keterangan warna dan waktu ditampung. Diagram alir isolasi pigmen menggunakan kromatografi kolom dapat dilihat pada gambar 14.



**Gambar 14.** Diagram Alir Isolasi Pigmen dengan Kromatografi Kolom (Pangastuti *et al.*, (2007)

### 3.5 Identifikasi Pigmen

#### 3.5.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Ekstrak kasar pigmen hasil evaporasi selanjutnya diidentifikasi menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* dengan metode Hegezi et.al., (1998). Instrumen yang digunakan adalah *High Performance Liquid Chromatography* merk Shimadzu LC20-A. Pada tahapan ini terjadi proses pemisahan antara jenis pigmen yang lainnya yang terdapat pada *Sargassum cinereum* dengan melihat serapan maksimum panjang gelombang dari masing-masing puncak yang terbentuk. Menurut sabrina et al., (2013), HPLC memiliki prinsip kromatografi, yang didalamnya terdapat proses pemisahan dan sekaligus pengukuran.

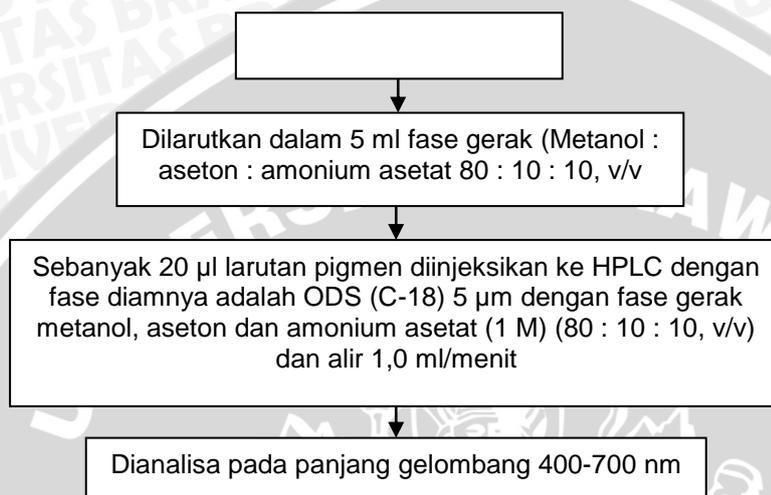
Tahapan awal pada proses HPLC ini yaitu ekstrak kasar pigmen yang kering dilarutkan dalam 5 ml fase gerak. Fase gerak yang digunakan adalah metanol : aseton : amonium asetat dengan perbandingan 80 : 10 :10 v/v. Dalam HPLC, fase gerak selain berfungsi sebagai pembawa komponen-komponen campuran menuju detektor, fase gerak merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan proses analisis (Puspitaningtyas et al., 2013).

Selanjutnya, larutan pigmen sebanyak 20 µl diinjeksikan ke instrumen HPLC dengan fase diamnya adalah ODS (C-18) 5µm dengan sistem elusi *gradient* metanol, aseton, dan amonium asetat (1M) dan laju alir sebesar 1,0 mL/menit. Menurut Komariah (2013), syarat fase diam adalah tidak boleh berinteraksi dengan fase gerak. Putra (2004) menyatakan elusi gradien didefinisikan sebagai penambahan kekuatan fase gerak selama analisis kromatografi berlangsung. Efek dari elusi gradien adalah mempersingkat waktu retensi dari senyawa-senyawa yang tertahan kuat pada kolom.

Analisis dilakukan pada panjang gelombang 430 nm. Selanjutnya komponen yang dihasilkan direkam dalam bentuk kromatogram. Suatu detektor

dibutuhkan untuk mendeteksi adanya komponen sampel di dalam (analisis kualitatif) dan menghitung kadarnya (analisis kuantitatif). Detektor yang baik memiliki sensitifitas yang tinggi, gangguan (*noise*) yang rendah, kisar respon *linier* yang luas, dan memberi respon untuk semua tipe senyawa (Putra, 2004).

Diagram alir analisa HPLC dapat dilihat pada gambar 15.



**Gambar 15.** Diagram Alir High Performance Liquid Chromatography (Hegezi *et al.*, 1998)

### 3.5.2 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ini untuk mengidentifikasi ekstrak kasar pigmen dan isolat hasil kromatografi kolom masing-masing pigmen *Sargassum cinereum*. Identifikasi ini dilakukan berdasarkan metode yang digunakan oleh Pengestuti *et.al.*, (2007) yang telah dimodifikasi oleh Hasanah (2004). Dalam penelitian ini, identifikasi Kromatografi Lapis tipis (KLT) menggunakan fae diam yaitu plat KLT *silica gel* F-254, sedangkan fase gerak yang digunakan adalah pelarut n-heksan dan aseton (7 : 3 v/v). Menurut Puspita (2009), pemilihan eluen atau fase gerak sangat penting. Eluen yang digunakan dikelompokkan ke dalam dua kelompok yaitu untuk pemisahan senyawa hidrofil dan lipofil. Eluen untuk pemisahan senyawa hidrofil meliputi air, metanol, asam asetat, etanol, isopropanol, aseton, n-propanol, *tert*-butanol sedangkan untuk pemisahan

senyawa lipofil meliputi etil asetat, eter, kloroform, benzena, toluena, sikloheksana, dan petroleum eter.

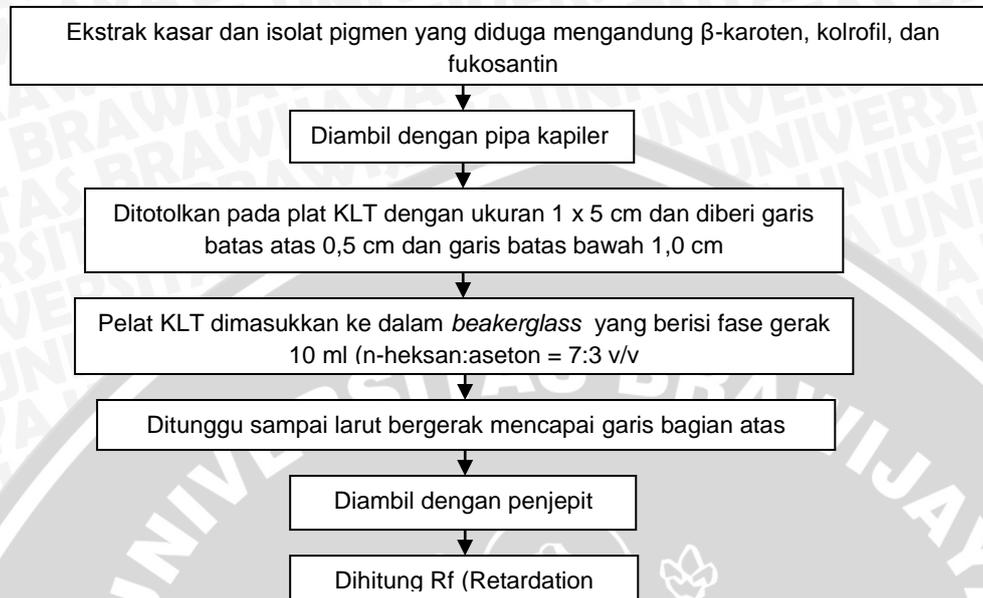
Langkah awal adalah palt KLT dipotong dengan ukuran 1 x 5 cm kemudian dibuat garis melintang di kedua ujung plat pada permukaan *silica gel*. Garis pertama dibuat pada jarak 1 cm dari tepi plat KLT untuk menunjukkan batas bawah atau posisi awal fraksi warna ketika ditotolkan, dan garis kedua dibuat pada ujung lainnya dengan jarak 0,5 cm dari tepi plat KLT untuk menunjukkan batas atas jarak yang ditempuh oleh fase gerak. Sehingga terbentuk jarak tempuh senyawa sepanjang 3,5 cm.

Tahap selanjutnya, disiapkan 10 ml fase gerak dengan menghomogenkan n-heksan : aseton : dengan perbandingan 7 : 3 v/v. Kemudian ekstrak kasar dan isolat pigmen dari hasil kromatografi kolom yang diduga mengandung  $\beta$ -karoten, klorofil, dan fukosantindiambil secukupnya menggunakan pipa kapiler kemudian ditotolkan tepat pada garis batas bawah pada masing-masing plat KLT secara bergantian. Menurut Puspita (2009), untuk mendapatkan resolusi optimum maka penotolan sampel baik berupa bercak ataupun pita harus sekecil mungkin. Selanjutnya plat KLT dimasukkan ke dalam  $\pm 5$  ml fase gerak di dalam *beakerglass* 50 ml dan ditutup menggunakan plastik *cling wrap* untuk menghindari penguapan pelarut dan memaksimalkan proses kapilaritas dari fase gerak ke fase diam.

Proses kapilaritas ditunggu hingga fase gerak mencapai garis batas atas. Plat KLT diambil menggunakan pinset, kemudian bercak warna yang muncul pada plat KLT diamati dan dihitung nilai  $R_f$  nya. Sari (2012) menyatakan bahwa derajat retensi dinyatakan dengan  $R_f$  yang digunakan untuk menyatakan posisi dari zat setelah pengembangan, dapat dihitung dengan rumus:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}}$$

Diagram alir identifikasi pigmen dengan Kromatografi Lapis Tipis dapat dilihat pada gambar 16.



**Gambar 16.** Diagram Alir Identifikasi Pigmen dengan Kromatografi Lapis Tipis (Pangestuti *et.al.*, (2009) dimodifikasi oleh Hasanah (2014))

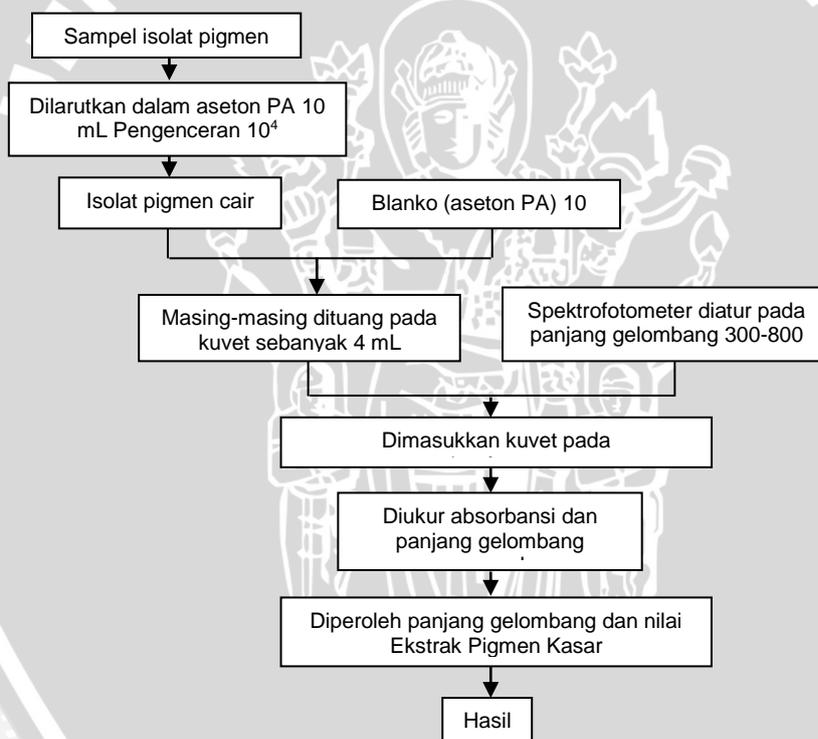
### 3.5.3 Spektrofotometri UV-Vis

Identifikasi pigmen Spektrofotometri UV-Vis pada penelitian ini menggunakan metode Fretes *et.al.*, (2012). Spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk mengidentifikasi pigmen berdasarkan panjang gelombang dan nilai absorbansinya. Menurut Triyat (1985), prinsip kerja spektrofotometri UV-Vis berdasarkan penyerapan cahaya atau energi radiasi yang diserap memungkinkan pengukuran jumlah zat penyerap dalam larutan secara kuantitatif.

Isolasi warna hasil kromatografi kolom yang diketahui  $\beta$ -karoten, klorofil, dan fukosantin berdasarkan warna dan nilai Rf yang dari proses KLT terlebih dahulu dikeringkan dengan dialiri menggunakan gas nitrogen ( $N_2$ ). Isolat warna yang telah kering diencerkan menggunakan aseton ( $CH_3COCH_3$ ) PA sampai pengenceran  $10^4$  dan larutan dituangkan ke dalam cuvet  $\pm 3$  ml. selanjutnya dimasukkan ke dalam instrumen spektrofotometri UV-Vis Shimadzu 1601 dan

diuji pada kisaran panjang gelombang 300-800 nm, sehingga diketahui spektra dan nilai absorbansi maksimal dari isolat pigmen yang diuji.

Menurut Utami *et.al.*, (2010), setiap pengukuran harus dilakukan pada panjang gelombang maksimum. Pada panjang gelombang maksimum, kepekaan juga maksimum karena pada panjang gelombang maksimum tersebut, perubahan serapan untuk satuan konsentrasi adalah yang paling besar. Ditambahkan oleh Indriani (2010), hasil pengujian yang berupa serapan maksimum yang terbentuk kemudian dibandingkan dengan serapan spektra maksimum. Diagram alir analisa pigmen dengan spektrofotometri UV-Vis dapat dilihat pada gambar 17.



**Gambar 17.** Diagram Alir Pigmen dengan Spektrofotometri UV-Vis (Fretes 2012)

### 3.6 Pengukuran Rendemen

Untuk mengetahui kandungan masing-masing jenis pigmen yang dapat digunakan maka dilakukan perhitungan rendemen. Menurut Maulidy *et.al.*, (2014), rendemen merupakan parameter yang penting untuk mengetahui nilai ekonomis dan efektifitas suatu produk. Semakin tinggi rendemen maka hasil produksi akhir yang dihasilkan semakin banyak. Analisa rendemen merupakan suatu presentase produk yang didapat dari perbandingan berat awal bahan dengan berat akhir bahan. Sehingga dapat diketahui kehilangan beratnya ketika mengalami proses pengolahan.

Pigmen yang telah diketahui nilai absorbansinya dikonversi menggunakan hukum "lambert-Beer". Menurut Markham (1998), rumusnya hukum 'Lambert-beer' adalah  $A = \epsilon bc$

Keterangan:

A = Absorbansi

$\epsilon$  = Absorptivitas Molar (*Molar extinction coefficient*)

b = Tebal Tempat Komponen

c = Konsentrasi Komponen

Dari rumus diatas, didapatkan hasil kadar masing-masing pigmen. Selanjutnya dihitung nilai rendemen dengan rumus menurut Khotimah (2013) yaitu:

$$\frac{\text{nilai kadar yang didapatkan}}{\text{jumlah awal sampel yang digunakan}} \times 100\%$$

#### 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

##### 4.1 Hasil Pengamatan

Hasil identifikasi komponen pigmen alga coklat *Sargassum cinereum* dengan High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Spektrofotometri UV-Vis, Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dapat dilihat pada tabel berikut

**Tabel 5. Hasil Identifikasi Komponen Molekul Pigmen Alga Coklat *Sargassum cinereum***

Uji Identifikasi	Alat	Hasil	Literatur																								
<b>Kromatografi Kolom</b>	Kromatografi kolom	Hasil isolasi kromatografi Kolom menghasilkan 102 isolat dalam botol sampel berukuran ±10 ml. Isolat berwarna kuning pekat pada nomor 3-6. Isolat berwarna hijau pekat pada nomor 18-21. Isolat berwarna hijau biru pekat pada nomor	- Arrohmah (2007) identifikasi klorofil a berwarna hijau biru sedangkan klorofil b berwarna hijau kuning - Menurut Sarungallo <i>et. al.</i> (2014), betakaroten berwarna kuning - Menurut mufti <i>et. al.</i> (2013), fukosantin berwarna oranye																								
<b>Kromatografi Lapis Tipis</b>	Pelat KLT	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="3">β-Karoten</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0,97</td> <td>0,97</td> <td>0,94</td> </tr> <tr> <th colspan="3">Klorofil a</th> </tr> <tr> <td>0,62</td> <td>0,60</td> <td>0,60</td> </tr> <tr> <th colspan="3">Klorofil b</th> </tr> <tr> <td>0,48</td> <td>0,51</td> <td>0,54</td> </tr> <tr> <th colspan="3">Fukosantin</th> </tr> <tr> <td>0,26</td> <td>0,28</td> <td>0,28</td> </tr> </tbody> </table>	β-Karoten			0,97	0,97	0,94	Klorofil a			0,62	0,60	0,60	Klorofil b			0,48	0,51	0,54	Fukosantin			0,26	0,28	0,28	- Menurut Natalina <i>et. al.</i> (2009), nilai Rf 0,8-1,0 adalah β-karoten - Menurut Pramesti (2013), nilai Rf 0,57-0,64 adalah Klorofil a - Menurut Pramesti (2013), Rf 0,42-0,56 adalah Klorofil b - Menurut Zaelani dan Hartati (2014), 0,25-0,28 adalah Fukosantin
β-Karoten																											
0,97	0,97	0,94																									
Klorofil a																											
0,62	0,60	0,60																									
Klorofil b																											
0,48	0,51	0,54																									
Fukosantin																											
0,26	0,28	0,28																									
<b>Spektrofotometri UV-Vis</b>	Spektrofotometer UV-Vis Tipe-1601	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="3">β-Karoten (nm)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>47,5</td> <td>452</td> <td>462</td> </tr> </tbody> </table>	β-Karoten (nm)			47,5	452	462	Serapan terbesar β-karoten dihasilkan pada panjang gelombang 453,3 nm (Yudiati <i>et al.</i> , 2011)																		
β-Karoten (nm)																											
47,5	452	462																									
		<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="3">Klorofil a</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>615,5</td> <td>575,5</td> <td>532</td> </tr> </tbody> </table>	Klorofil a			615,5	575,5	532	serapan terbesar klorofil a dihasilkan																		
Klorofil a																											
615,5	575,5	532																									

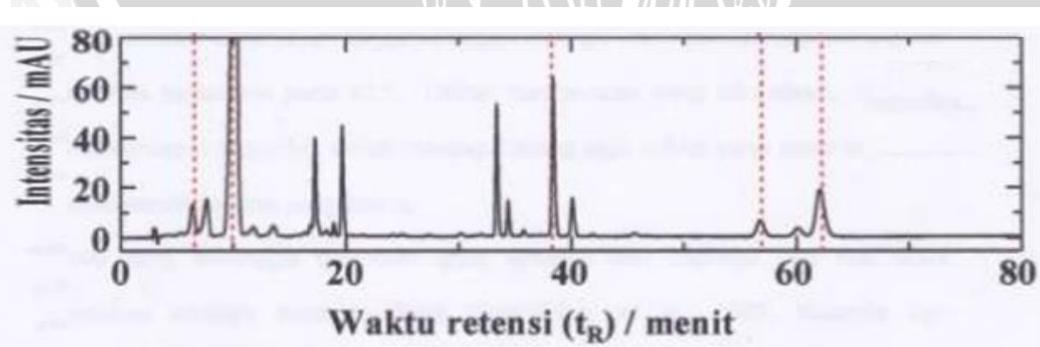


			pada panjang gelombang 425-450 nm dan 665-680 nm (Prasasti <i>et al.</i> ,2005)
Klorofil b	614,5	574	530,5
			Serapan cahaya untuk klorofil <i>b</i> kisaran antara 620 nm - 680 nm (Sumaryanti <i>et al.</i> , 2011)
Fukosantin	461,5	448	318,5
			Fukosantin stabil pada panjang gelombang 446,3 nm dan 468,3 nm (kartiningsih <i>et al.</i> , 2011)

## 4.2 Pembahasan

### 4.2.1 Identifikasi Pigmen dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

Analisis kualitatif pigmen menggunakan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) yang didasarkan pada waktu retensi dan untuk tujuan identifikasi. Prinsipnya adalah pemisahan setiap komponen dalam sampel didasarkan pada tingkat kepolarannya, dan pada metode HPLC digunakan tekanan tinggi untuk mendorong fase gerak yang diatur oleh gradien elusinya. Hasil analisa komponen pigmen dengan HPLC pada *Sargassum cinereum* dapat dilihat pada gambar 18.



. Dari penelitian ini pustaka acuan yang digunakan untuk membandingkan hasil puncak yaitu penelitian dari Limintara dan Herianto (2010) yang menggunakan komposisi pelarut dan fase diam yang hampir sama. Setiap puncak pada kromatogram HPLC menandakan keberadaan pigmen yang terkandung dalam ekstrak kasar pigmen *Sargassum cinereum*. Nomer setiap puncak pigmen sesuai dengan urutan elusinya yaitu dari pigmen yang memiliki kepolaran tinggi sampai pada pigmen yang memiliki kepolaran rendah, karena pada penelitian ini menggunakan sistem elusi fase terbalik.

Menurut Permata (2012), kromatografi fase terbalik digunakan untuk analisis, fase diam umumnya mengandung senyawa non polar yang mempunyai rantai karbon panjang sehingga senyawa polar akan terdeteksi lebih cepat. Pemisahan setiap komponen dalam sampel didasarkan kepolarannya, dan pada metode HPLC digunakan tekanan tinggi untuk mendorong fase gerak yang diatur oleh gradient elusinya (Romianto, 2014).

Dari hasil HPLC di atas, dapat dilihat jumlah pita yang terbentuk pada kromatogram ekstrak kasar *Sargassum cinereum* berkisar 11 puncak dengan intensitas yang berbeda. Hasil HPLC di atas menunjukkan hasil identifikasi yang lebih banyak dibandingkan dengan jumlah total pada plat KLT. Hal ini menunjukkan HPLC dapat memisahkan pigmen-pigmen yang tidak teridentifikasi oleh KLT. Menurut Satria, *et al.* (2014) menyatakan bahwa alat HPLC dapat memisahkan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis, analisis ketidakmurnian, dan analisis senyawa nonvolatil. Kelebihan HPLC antara lain mudah dalam pelaksanaan, kemampuan resolusi yang baik, kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi dan tidak menimbulkan kerusakan bahan yang dianalisis.

Dilihat dari puncak yang dihasilkan, diketahui bahwa terdapat 4 puncak yang pada KLT memiliki warna yang pekat. Berdasarkan waktu retensi ( $t_R$ ), 4

puncak hasil kromatogram di atas diidentifikasi sebagai berikut dan dapat dilihat pada tabel 9.

**Tabel 9. Waktu Retensi (tR) Pigmen**

No	Jenis Pigmen	Waktu Retensi (tR)	
		Hasil Penelitian	Limantara dan Harianto (2010)
1	Golongan Klorofil	4,20	4,16
2	Klorofil c	6,45	6,42
3	Fukosantin	10,14	10,11
4	Golongan karatenoid	18,07	18,04
5	Zaexantin	19,72	19,68
6	Klorofil b	33,63	33,40
7	Klorofil b'	34,91	33,40
8	Klorofil a	38,41	38,39
9	Klorofil a'	40,13	40,10
10	Feofitin a	56,84	56,79
11	$\beta$ -karoten	62,10	62,08

Menurut Hendayana (2006), retensi time (tR) adalah ukuran waktu mulai injeksi cuplikan hingga suatu komponen campuran keluar kolom, dengan kata lain adalah waktu yang diperlukan oleh suatu komponen campuran untuk keluar dari kolom. Waktu retensi diukur dari waktu dimana sampel diinjeksikan sampai titik di mana layar menunjukkan ketinggian puncak maksimum untuk senyawa itu. Waktu retensi dalam HPLC sangat sensitif terhadap perubahan fase diam, suhu, nilai pH, komposisi fase gerak dan laju alir. Ditambahkan oleh Idroes (2009), pada HPLC terjadi mekanisme interaksi antara zat terlarut, fase diam dengan fase gerak sehingga data retensi pada HPLC akan sangat bergantung pada fase geraknya. Maka dari itu waktu retensi dari hasil penelitian ini dan penelitian dari Hegazi, *et al.* (1998), terlihat sedikit berbeda karena fase diam yang digunakan juga memiliki merk yang berbeda.

Dari sebelas peak yang dihasilkan, terdapat 4 peak dominan yang merupakan pigmen  $\beta$ -karoten, klorofil a, klorofil b dan fukosantin berdasarkan waktu retensinya. Hal ini menunjukkan kesesuaian dengan data hasil pengujian lanjut terhadap ekstrak *Sargassum cinereum* yaitu proses isolasi kromatografi

kolom, uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan spektrofotometer UV-Vis bahwa dalam penelitian ini sampel yang digunakan mengandung pigmen  $\beta$ -karoten, klorofil *a*, klorofil *b* dan fukosantin. Uji HPLC juga menunjukkan bahwa dari keempat pigmen yang diambil, jenis pigmen yang paling polar yaitu fukosantin karena memiliki waktu retensi yang lebih singkat dibandingkan dengan tiga pigmen lainnya. Selain itu hasil uji HPLC juga menunjukkan bahwa pigmen fukosantin memiliki peak tertinggi, uji KLT juga menunjukkan bahwa pigmen ini merupakan pigmen dominan pada alga coklat *Sargassum cinereum*.

#### 4.2.2 Isolasi Pigmen dengan Kromatografi Kolom

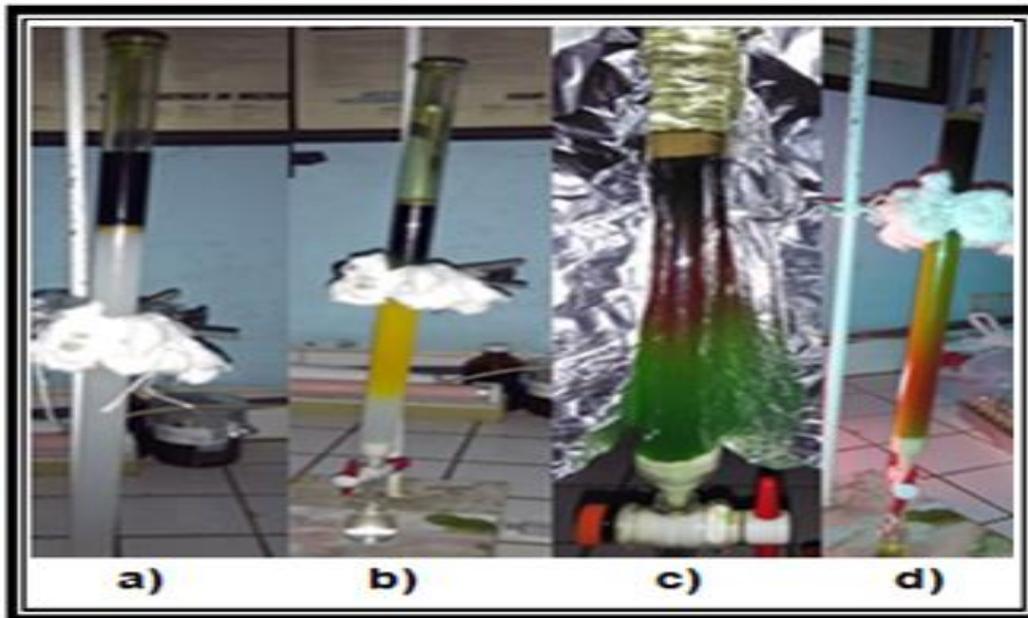
Isolasi senyawa komponen pigmen *Sargassum cinereum* dilakukan dengan mengacu pada metode isolasi pigmen menurut Pangestuti, *et al.* (2007) hasil modifikasi Wijayanti (2010), yang menggunakan metode kromatografi kolom. Kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan dan mengisolasi isolat pigmen (fraksi warna) dari komponen pigmen yang terdapat pada rumput laut coklat *Sargassum cinereum*.

Dalam penelitian ini teknik kromatografi kolom menggunakan metode *normal phase*. *Normal phase* merupakan metode dimana fase diam bersifat polar dan fase gerak yang bersifat non polar. Fase diam (*stationer*) yang digunakan adalah silica gel ( $\text{SiO}_3$ ) F-254 dengan ukuran 60 mesh serta fase gerak (*mobile*) yang digunakan yaitu campuran n-heksan ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ) yang bersifat non polar dan etil asetat ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ) yang bersifat semi polar dengan perbandingan 8:2, 7:3, 6:4 dan 5:5 (v/v). Prinsip elusi pigmen dengan fase gerak adalah semakin tinggi perbandingan pelarut n-heksan didalam campuran fase gerak maka fase gerak akan semakin bersifat non polar, hal ini akan mengelusi pigmen yang bersifat non polar dan sebaliknya.

Menurut Permata (2012), pada kromatografi fase normal, fase diam bersifat polar sedangkan fase gerak bersifat non polar. Campuran senyawa polar akan

tertahan lebih lama didalam kolom dibandingkan senyawa non polar dan sebaliknya. Fase diam dapat mengandung gugus siano, diol atau amino. Ditambahkan oleh Astuti (2005), pada proses kromatografi terdapat fase tetap (diam) dan fase bergerak. Fase tetap biasanya berupa padatan atau cairan, sedangkan pada fase bergerak biasanya berupa cairan atau gas. Fase diam akan menahan komponen campuran sedangkan fase gerak akan melarutkan zat komponen campuran. Komponen yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal, sedangkan yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat.

Hasil uraian diatas dapat disimpulkan bahwa senyawa pigmen yang bersifat non polar dari ekstrak kasar *Sargassum cinereum* akan keluar terlebih dahulu karena memiliki interaksi yang lemah dengan fase diam yang bersifat polar. Sedangkan senyawa pigmen yang lebih polar akan keluar berikutnya secara berurutan sesuai dengan tingkat polaritasnya karena memiliki interaksi yang lebih kuat dengan fase diam, sebanding dengan penambahan perbandingan etil acetat pada campuran fase geraknya. Hal ini sesuai dengan pernyataan Noviyanti (2010), bahwa senyawa yang berinteraksi lemah dengan fase diam akan bergerak lebih cepat melalui fase diam, sedangkan senyawa dengan interaksi yang kuat dengan fase diam akan bergerak sangat lambat. Proses isolasi komponen pigmen rumput laut coklat *Sargassum cinereum* disajikan pada Gambar 19



Gambar diatas menunjukkan terbentuknya pita pita warna saat proses isolasi dengan kromatografi kolom. Penurunan fraksi warna yang berbeda terjadi berdasarkan perbedaan tingkat polaritas warna dan fase gerak yang digunakan. Adapun fraksi yang berwarna bening dan terdapat diantara fraksi fraksi warna diatas, disebut sebagai fase antara. Fase antara hanya mengandung fraksi warna dalam jumlah kecil atau campuran dari dua buah fraksi warna dan bukan merupakan fraksi warna spesifik dari jenis pigmen tertentu, sehingga tidak digunakan.

Zat warna yang keluar saat proses isolasi pigmen *Sargassum cinereum* ditampung pada botol sampel yang berukuran  $\pm 10$ ml. setiap botol sampel dibedakan berdasarkan warna yang keluar dan masing-masing diberi nomor sesuai urutan. Dari hasil proses isolasi didapatkan 105 botol sampel isolat pigmen dengan isolat yang berwarna kuning pekat 4 botol, isolat yang berwarna hijau pekat 4 botol, isolat yang berwarna biru pekat 3 botol, isolat yang berwarna

orange sebanyak 8 botol. Hasil isolasi pigmen ditampung dalam botol sampel dapat dilihat pada gambar 20.



**Gambar 20.** Hasil Isolat Pigmen

Menurut Yudiati (2011), saat elusi berlangsung, pita warna kuning ( $\beta$ -karoten) dan hijau kebiruan (Klorofil a) yang muncul ditampung di botol vial. Dan menurut Mufti *et. al.*, (2014), fukosantin merupakan salah satu jenis dari karotenoid yang memiliki rumus  $C_{42}H_{58}O_6$  merupakan pigmen warna orange. Hal ini sesuai dengan pernyataan Khotimah (2013) bahwa *sargassum cinereum* mempunyai pigmen klorofil a dan b, betakaroten dan fukosantin.

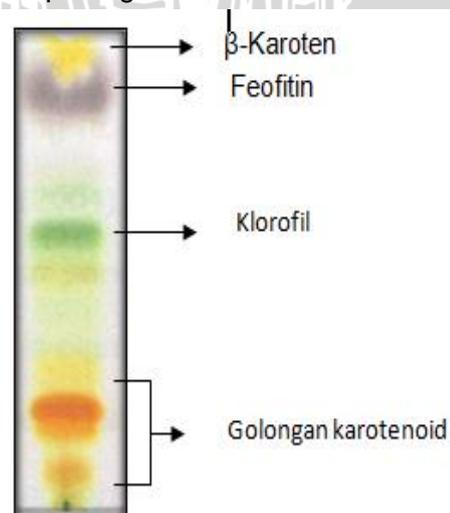
#### 4.2.3 Identifikasi Pigmen dengan Kromatografi Lapis Tipis

Analisa menggunakan Kromatografi Lapis tipis (KLT) berdasarkan warna total, nilai  $R_f$ , dan sifat-sifat kepolaran tiap-tiap pigmen. Uji total warna pada Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ini bertujuan untuk menentukan kemurnian masing masing isolat pigmen pada *Sargassum cinereum* hasil dari Kromatografi Kolom. Fase diam yang digunakan dalam penelitian ini adalah plat KLT *silica gel* F-254. Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penyerap berukuran kecil dengan diameter 10-30  $\mu\text{m}$ . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam, maka semakin baik pula efisiensi dan resolusinya. Dalam fase normal, fase diam yang digunakan adalah silica gel, merupakan silika yang dibebaskan dari air dan mempunyai sifat asam (Sari, 2010). Sedangkan fase gerak yang digunakan adalah n-heksan dan aseton (7:3 v/v). Tujuan penggunaan fase gerak

ini untuk melarutkan senyawa yang diidentifikasi akan larut dan tertarik ke atas sesuai kepolarannya.

Dalam uji kromatografi lapis tipis digunakan metode *normal phase* yaitu plat KLT silica gel F-254 (F adalah fluorescense dan 254 adalah panjang gelombang 254 nm) sebagai fase diam yang bersifat polar dan campuran n-heksan : aseton 7:3 (v/v) sebagai fase gerak. Penggunaan fase gerak cenderung bersifat non polar dengan campuran n-heksan yang lebih banyak jika dibandingkan aseton, hal ini dikarenakan isolat pigmen yang dihasilkan saat proses isolasi cenderung bersifat non polar.

Prinsip metode *normal phase* adalah semakin rendah polaritas suatu senyawa (bersifat non polar) maka akan semakin jauh jarak yang ditempuh pada plat KLT, hal ini terjadi karena senyawa mengikuti aliran fase gerak. Sebaliknya jika semakin tinggi polaritas suatu senyawa (bersifat polar) maka akan semakin terhambat pada fase diam. Hal ini sesuai dengan penelitian Noviyanti (2010), bahwa senyawa yang berinteraksi lemah dengan fase diam akan bergerak lebih cepat melalui fase diam, sedangkan senyawa dengan interaksi yang kuat dengan fase diam akan bergerak sangat lambat. Hasil KLT untuk pigmen kasar *Sargassum cinereum* dapat dilihat pada gambar 21.

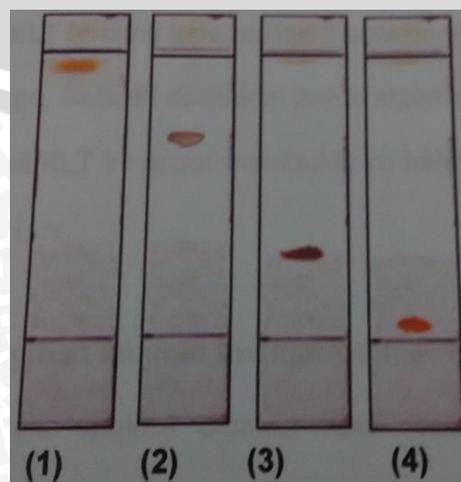


**Gambar 21.** Pola Pemisahan Ekstrak kasar *Sargassum cinereum*

Gambar diatas menunjukkan hasil identifikasi ekstrak kasar *Sargassum cinereum* dengan uji KLT. Jika dilihat dari warna dan jumlah total, pigmen penyusun *Sargassum cinereum* terdiri dari warna Spot 1 (warna kuning) sebagai  $\beta$ -karoten, spot 2 (warna abu-abu) merupakan feofitin, spot 3 (hijau biru) merupakan klorofil, spot 4 (kuning orange), spot 5 (orange pekat), spot 6 (orange), spot 7 (orange) merupakan karatenoid golongan santofil. Dasar penentuan komponen pigmen dengan membandingkan waktu retensi dari masing-masing komponen pigmen dengan literatur. Hal ini didukung oleh Heriyanto dan Limintara (2006), yang mengidentifikasi karoten berwarna orange, feofitin a berwarna abu-abu, klorofil a berwarna hijau biru dan karatenoid berwarna kuning, orange merah. Karatenoid dibedakan menjadi dua golonganyaitu: karatenoid polar (santofil) dan karatenoid non polar (karoten).

Dilihat dari total diatas, warna orange memiliki warna yang lebih pekat dibandingkan dengan total warna lain. Hal ini sesuai dengan pernyataan menurut Limintara dan Heriyanto (2011), pigmen pada alga cokelat yang dominan yaitu fukosantin. Perbedaan kepekatan warna total pigmen yang nampak pada pemisahan pigmen tersebut berkaitan dengan konsentrasi pigmen yang terkandung didalamnya.

Hasil KLT ekstrak kasar selanjutnya dibandingkan dengan hasil KLT untuk masing-masing isolat pigmen hasil Kromatografi Kolom dapat dilihat pada gambar 22,



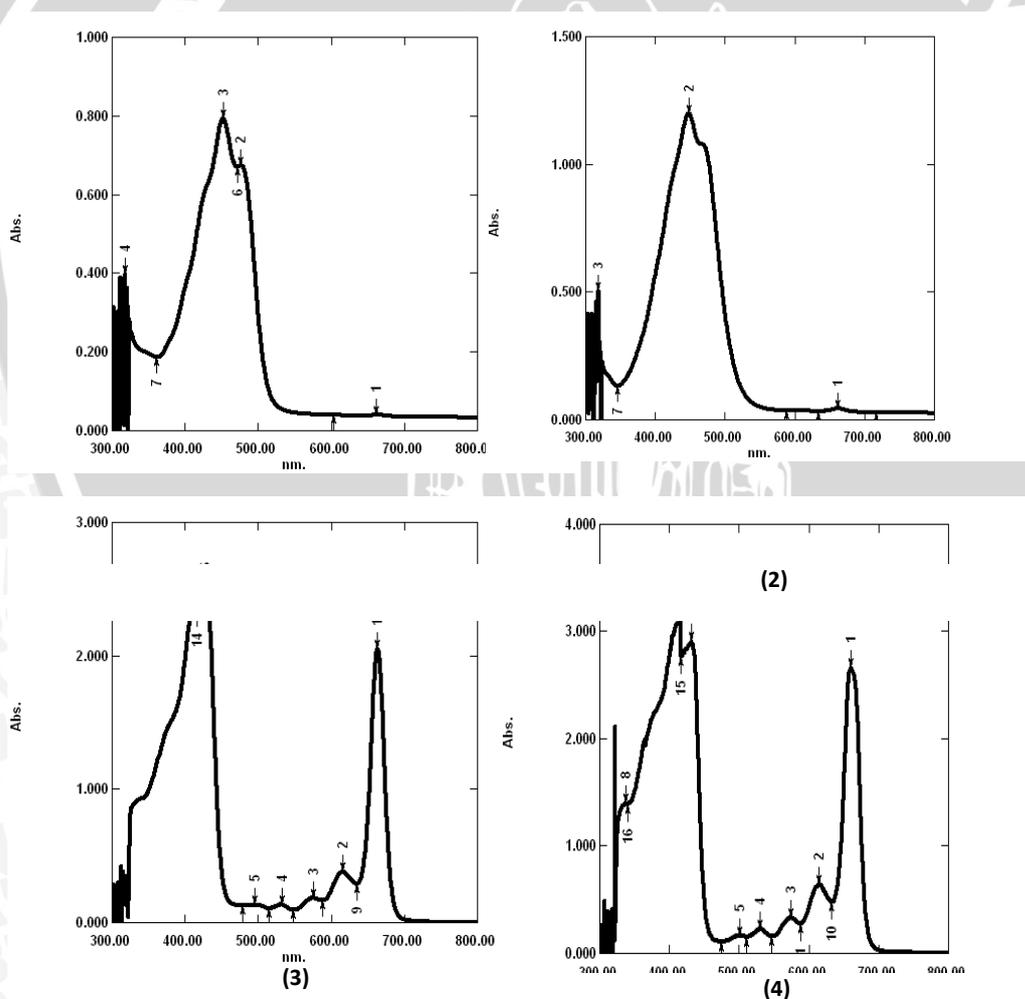
Jumlah total warna dari masing-masing plat KLT memberikan informasi kemurnian suatu ekstrak. Apabila pada plat KLT yang terbentuk lebih dari 1 spot hal ini menandakan ekstrak yang dihasilkan belum murni dan begitu pula sebaliknya. Dari gambar diatas diketahui total warna yang terbentuk pada plat KLT  $\beta$ -karoten hanya satu spot berwarna kuning dan setelah dihitung rf diperoleh hasil 0,97; 0,97; 0,94. Hasil ini sesuai apabila dilihat dari literatur menurut Yudiati *et. al.*, (2011) yang menyatakan bahwa hasil total tunggal berwarna kuning merah dan nilai rf (0,8-1,0) yang dihasilkan dari fase gerak non polar adalah  $\beta$ -karoten

Pada plat KLT Klorofil a terlihat satu spot warna hijau biru dan dari perhitungan nilai rf diperoleh hasil 0,62; 0,6; dan 0,6. Untuk plat KLT yang termasuk dalam range Klorofil b terlihat satu spot dengan warna hijau pekat dan nilai rf yang dihasilkan adalah 0,48; 0,51; dan 0,54. Pernyataan ini sesuai dengan literatur menurut Pramesti (2013), jika dihasilkan warna spot hijau biru dengan rf 0,57-0,64 termasuk pigmen klorofil a. Sedangkan dengan spot hijau pada nilai rf 0,42-0,56 termasuk golongan klorofil b.

Menurut Zaelani dan Hartati (2014), pigmen fukosantin mempunyai total warna orange (kuning tua) dengan nilai rf berkisar antara 0,25-0,28. Hal ini sama dengan plat KLT terakhir juga terlihat 1 spot dengan warna yang dihasilkan dalah kunin orange. Setelah dilakukan perhitungan rf diperoleh nilai 0,26; 0,28; dan 0,28. Hasil KLT ini dapat membuktikan bahwa pigmen yang dihasilkan adalah fukosantin murni.

#### 4.2.4 Identifikasi Pigmen dengan Spektrofotometri UV-Vis

Untuk membuktikan hasil isolasi yang didapatkan merupakan komponen pigmen yang terdiri dari  $\beta$ -karoten, klorofil *a*, klorofil *b* dan fukosantin maka harus dilakukan identifikasi pola spektra dan serapan maksimumnya. Hasil isolasi yang diyakini sebagai isolat pigmen dan telah dianalisis kualitatif dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis), selanjutnya dianalisis kualitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode dari Fretes (2012) pada kisaran panjang gelombang 300-800 nm, yang bertujuan untuk mengetahui pola spektra dan serapan maksimumnya. Hasil uji pola spektra pada serapan panjang gelombang maksimum dari isolat pigmen *Sargassum cinereum* disajikan pada Gambar 23.



**Gambar 23.** Pola Spektra Pigmen Hasil Isolasi dalam Pelarut Aseton (1) Fukosantin; (2) Betakaroten; (3) Klorofil a; (4) Klorofil b

Gambar diatas menunjukkan pola spektra isolat pigmen ( $\beta$ -karoten, klorofil *a*, klorofil *b* dan fukosantin) dengan pelarut aseton pengenceran  $10^4$  secara berturut-turut. Hasil uji spektrofotometer UV-Vis menunjukkan isolat pigmen  $\beta$ -karoten rumput laut coklat *Sargassum cinereum* pada serapan absorbansi maksimum ( $\lambda_{max}$ ) terjadi pada panjang gelombang 476,50 nm, 452,00 nm dan 462,00 nm. Isolat ini memiliki serapan panjang gelombang maksimum yang mirip dengan hasil penelitian dari Limantara dan Heriyanto (2010) yang melaporkan bahwa absorbansi maximal pada senyawa  $\beta$ -karoten ialah 426 nm, 452 nm, dan 478 nm. Ditambahkan oleh Jeffrey (1961) yang menyatakan bahwa absorbansi maximal  $\beta$ -karoten yang terkandung dalam alga laut ialah 429 nm, 450 nm, dan 478 nm. Menurut Salamah dan Nurusholimah (2014), Panjang gelombang maksimum beta karoten secara teoritis adaiah sebesar 470 nm.

Hasil uji spektrofotometer UV-Vis menunjukkan isolat pigmen klorofil *a* memiliki serapan absorbansi maksimum ( $\lambda_{max}$ ) terjadi pada panjang gelombang 615,50 nm, 615,50nm dan 532,00nm. Isolat ini memiliki kemiripan serapan absorbansi maksimum dengan hasil penelitian dari Limantara dan Heriyanto (2010) yang melaporkan bahwa absorbansi maximal pada senyawa klorofil *a* ialah 432 nm, 666 nm dan 665 nm. Isolat pigmen klorofil *b* memiliki serapan absorbansi maksimum ( $\lambda_{max}$ ) terjadi pada panjang gelombang 614,50 nm, 574,00 nm dan 530,50 nm. Isolat ini memiliki kemiripan serapan absorbansi maksimum dengan hasil penelitian dari Limantara dan Heriyanto (2010) yang melaporkan bahwa absorbansi maximal pada senyawa klorofil *b* ialah 467 nm, 453 nm dan 652 nm.

Hasil uji spektrofotometer UV-Vis menunjukkan isolat pigmen fukosantin memiliki serapan absorbansi maksimum ( $\lambda_{max}$ ) terjadi pada panjang gelombang 461,50 nm, 448,00 nm dan 448,00 nm. Isolat ini memiliki kemiripan serapan

absorbansi maksimum dengan hasil penelitian dari Limantara dan Heriyanto (2010) yang melaporkan bahwa absorbansi maximal pada senyawa fukosantin ialah 450 nm, 443 nm dan 445 nm.

Absorbansi adalah perbandingan intensitas cahaya yang diserap dengan intensitas cahaya yang datang. Nilai absorbansi ini akan bergantung pada kadar zat yang terkandung di dalamnya, semakin banyak kadar zat yang terkandung dalam suatu sampel maka semakin banyak pula molekul yang menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu sehingga nilai absorbansi semakin besar atau dengan kata lain nilai absorbansi akan berbanding lurus dengan konsentrasi zat yang terkandung di dalam suatu sampel (Neldawati *et. al.*, 2013)

#### 4.2.5 Rendemen Pigmen

Perhitungan rendemen ini dilakukan untuk mengetahui berapa besar efektivitas dari penelitian yang dilakukan. Semakin tinggi rendemen yang didapatkan, maka semakin efektif karena semakin banyak ekstrak yang didapatkan. Nilai rendemen  $\beta$ -karoten yang didapatkan yaitu  $0,025 \% \pm 0,0000074$  nilai rendemen klorofil a  $0,034 \% \pm 0,0000073$ , nilai rendemen Klorofil b sebesar  $0,134 \% \pm 0,0000592$ , dan untuk nilai rendemen fukosantin  $0,1261 \% \pm 0,000025$ . Hasil nilai rendemen masing-masing pigmen yang diperoleh hampir sama. Nilai rendemen yang tertinggi terdapat pada Klorofil b dan yang paling rendah pada  $\beta$ -karoten.

Dalam Khotimah *et. al.*, (2013), rendemen mengalami pengurangan akibat dari proses atau prosedur yang dilakukan. Adanya perbedaan rendemen yang didapatkan karena adanya perbedaan kuantitas yang didapatkan pada saat kromatografi kolom. Ditambahkan dalam penelitian Simanjuntak *et. al.*, (2014) menyatakan berdasarkan analisa diketahui bahwa terdapat interaksi sangat nyata antara lama ekstraksi dan rasio pelarut (volume pelarut) terhadap nilai

rendemen pigmen. Pengukuran % berat rendemen pigmen ini dilakukan dengan membandingkan antara berat ekstrak pekat dan berat sampel dikali 100%.



## 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian mengenai Identifikasi komponen Pigmen pada rumput laut Cokelat *Sargassum cinereum* dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) diperoleh hasil analisa pigmen yang terdiri dari feofitin, klorofil a, klorofil b, karoten, dan karatenoid golongan santofil. Sehingga didapatkan kesimpulan sebagai berikut:

- Hasil penelitian ini didapatkan komponen pigmen dominan yang terdapat pada *sargassum cinereum* terdiri dari  $\beta$ -karoten, Klorofil a, Klorofil b, dan Fukosantin.
- Hasil isolasi dari *Sargassum cinereum* menghasilkan kandungan pigmen untuk  $\beta$ -karoten sebesar 0,025%, Klorofil a sebesar 0,034%, Klorofil b sebesar 0,134%, dan fukosantin sebesar 0,1261%.
- *High Performance Liquid Cromatograghy* (HPLC) mengidentifikasi pigmen yang paling banyak pada *sargassum cinereum* adalah Fukosantin yang ditandai dengan retensi waktu (tR) yang lebih singkat dari retensi waktu pigmen lain. Retensi waktu yang dihasilkan fukosantin adalah 10,14.

### 5.2 Saran

Dari hasil penelitian yang dilakukan ini, perlu adanya penelitian lebih lanjut yang membahas tentang berapa besar jumlah antioksidan masing-masing jenis pigmen sehingga diharapkan dapat diaplikasikan langsung pada dunia kesehatan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, V. Dan A. Widiawati. 2010. **Pabrik Minyak Ikan dari Ikan Tuna (*Tuna Fish Oil*) dengan Proses Ekstraksi N-Hexane**. Skripsi. Institut Teknologi Sepuluh Nopember: Surabaya. 14 hlm.
- Abfa, I. K., Budhi, P, dan Susanto, B. 2012. **Karakteristik Fikoeritrin Sebagai Pigmen Asesoris Pada Rumput Laut Merah, Serta Manfaatnya**. 10(2): 14-20.
- Ahmad, R., K. Guclu, B. Demirata, M. Ozyurek, S. E. Celik, B. Bektasoglu, K. I. Berker, dan D. Ozyurt. 2007. **Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compound with the CUPRAC Assay**. *Molecules*. 12(1): 1496-1547.
- Anastyuk, N. C., M. N. O'Grady, J. V. O'Doherty, J. P. Kerry. 2009. **Effect of a Brown Seaweed (*Laminaria digitata*) Extract Containing Laminarin and Fucooidan on The Quality and Shelf-Life of Fresh and Cooked Minced Pork Patties**. *Meat Science*. (94): 304-311.
- Ardianingsih, R. 2010. **Penggunaan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) dalam Proses Analisa Deteksi Ion**. *Berita Dirgantara*. 10(4): 101-104.
- Arikunto, Suharsimi. 2002. **Metodologi Penelitian**. Penerbit PT. Rineka Cipta: Jakarta.
- Arlita, N.R., Ocky, K.R., Adi, S. 2013. **Identifikasi Pigmen Karotenoid Pada Bakteri Symbion Rumput Laut *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh**. 3(2): 68-77.
- Astarina, N. W. G., Astuti, K. W dan Warditiani, N. K. 2013. **Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb)**. Udayana Bali. 5(3): 1-7.
- Atmadja, W.S. Kadi, A., Sulistijo & Satari, R. (Eds).1996. **Pengenalan Jenis-Jenis Rumput Laut Indonesia**. Puslitbang Oseanologi LIPI: Jakarta.
- Audi, M dan Vanda.2011. **Kandungan Total Fenol dalam Rumput Laut *Caulerpa racemosa* yang Berpotensi sebagai Antioksidan**. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Unsrat. 5 hlm.
- Bachtiar, S. Y., Wahyu, T dan Nanik, S. 2012. **Pengaruh Ekstrak Alga Cokelat (*Sargassum Sp.*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia Coli***. *Journal of Marine and Coastal Science*, 1(1): 53 – 60.
- Balboa, E. M., E. Conde, A. Moure, E. Falqué, and H. Domínguez. 2012. **In Vitro Antioxidant Properties of Crude Extracts and Compounds from Brown Algae**. *Food Chemistry Review*. (138): 1764-1785.

- Biranti, F., Muhammad, N dan Bambang, C. 2009. **Analisis Kualitatif B-Karoten Dai (Uji Aktivitas Karotenoid) dalam Alga Coklat *Turbinaria decurrens***. Jurnal Sains & Matematika. 2(17): 90-96. ISSN 0854-0675.
- Brief, M. 2013. **Potensi Ekspor Produk Rumput Laut Dipasar Thailand**. Office Commercial Attache: Bangkok. 5 hlm.
- Chamidah, A., Marsono, Y., Eni, H dan Haryadi. 2013. **Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Karakteristik *Crude* Laminaran dari *Sargassum duplicatum***. AGRITECH. 3(33): 251-257.
- Costa, J. F. da, F. F. Karwur, dan L. Limantara. 2009. **Efek Beta karoten dan Agregasi Klorofil pada Fotostabilitas Klorofil a dalam Pelarut Aseton**. 11(2): 115-123.
- Dere, S., T. Gunes, and R. Sivaci. 1998. **Spectrophotometric Determination of Chlorophyll – A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents**. *J. of Botany*. 1 (22): 13-17.
- Distantina, S., O. Rusman dan S. Hartati. 2006. **Pengaruh Konsentrasi Asam Asetat pada Perendaman Terhadap Kecepatan Ekstraksi Agar-Agar**. *Ekulibrium*. 5(1): 34-39.
- Faizal, H. M., Huda, Kharimatul, H dan Septian, A. 2010. **Pengaruh Rasio (Ethanol/Mengkudu) dan Jumlah Siklus Ekstraksi Terhadap Yield Minyak Biji Mengkudu**. *Jurnal Teknik Kimia*. 3(17): 59-68.
- Fajar, A., Ratna, I dan Eko, N. D. 2014. **Stabilitas Ekstrak Kasar Pigmen Klorofil, Beta Karoten, Dan Caulerpin Alga Hijau (*Caulerpa racemosa*) Pada Suhu Penyimpanan Yang Berbeda**. Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan. 1(3): 1-10.
- Fajarullah, A. 2012. **Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder Lamun (*Thalassodendron ciliatum*) Pada Pelarut**. Universitas Jendral Sudirman: Purwokerto. 7 hal.
- Firdaus, M., Made, A., Deddy, M., Tutik, W., Sarwono, W dan Setyawati, K. 2012. **Toksitas Akut Ekstrak Metanol Rumput Laut Cokelat *Sargassum cinereum***. PHP. 2(15): 148-155.
- Frayekti, M. C. 2013. **Evaporator System**. PT Badak LNG: Jakarta. 1 hal.
- Fretes, H. D., Susanto., Budhi, P., Heriyanto., Tatas, B dan Leenawaty, L. 2012. **Estimasi Produk Degradasi Ekstrak Kasar Pigmen Alga Merah *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty Varian Merah, Coklat dan Hijau: Telaah Perbedaan Spektrum Serapan**. Jurnal Ilmu Kelautan. 17(1): 31-38. ISSN: 0853-7291.
- Handayani, T., Sutarno dan Ahmad, D. S. 2004. **Analisis Komposisi Nutrisi Rumput Laut *Sargassum crassifolium* J. Agardh**. Biofarmasi. 2(2): 45-52. ISSN: 1693-2242.

- Hijaz, M. N. 2009. Uji **Aktivitas Antioksidan Karagenan dalam Alga Merah Jenis *Euचेuma cottonii* dan *Gracillaria verrucosa***. Universitas Islam Negeri (UIN) Malang: Malang. 116 hlm.
- Hijaz, M.N. 2009. **Uji Aktivitas Antioksidan Karagenan dalam Alga Merah Jenis *Euचेuma spinosum* dan *Gracillaria verrucosa***. Universitas Islam Negeri (Uin) Malang: Malang. 34 hal.
- Jeffrey, S. W. 1961. ***Paper-Chromatographic Separation of Chlorophylls and Carotenoids from Marine Algae***. *Biocham.* **80**(3): 336-342.
- Kadi, A. 2004. **Potensi Rumput Laut Dibeberapa Perairan Pantai Indonesia. Oseana.** 4(12): 25-36. ISSN 0216-1877.
- Karlina, R., Made, A., Sukarno dan Tutik, W. 2011. **Karakteristik Konsentrat Protein Teripang Pasir (*Holothuria scabra* J.) Dengan Bahan Pengekstrak Aseton.** *Jurnal Perikanan dan Kelautan.* 16(2): 90-102.
- Kartikaningsih, H., Kartini, Z dan Sri, D. 2010. **Stabilitas Fukosantin dari Rumput Laut coklat (*Padina australis*) Terhadap Perubahan Suhu.** *Green Teknologi.* 10(4): 20-28.
- Kartini, Z., Tri, S dan Simon, BW. 2001. **Ekstraksi Dan Pemurnian Alginat Dari *Sargassum filipendula* Kajian Dari Bagian Tanaman, Lama Ekstraksi Dan Konsentrasi Isopropanol.** *Jurnal Teknologi Pertanian.* 2(1): 10-27.
- Khotimah, K., Darius dan Bambang, B.S. 2013. **Uji Aktivitas Senyawa Aktif Alga Coklat (*Sargassum fillipendulla*) Sebagai Antioksidan Pada Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*).** *Jurnal Teknologi Pangan* 1(1): 10-20.
- Kordi, M. J. 2010. **Forensic and Clinical Applications of Solid Phase Extraction.** Humana Press, Inc. Totowa, NJ XII: 370 pp.
- Kupiec, T. 2004. **Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography.** *International Journal of Pharmaceutical Compounding.* 8(3): 223-227.
- Lestari, P. 2011. **Isolasi dan Identifikasi Komponen kimia Ekstrak Etanol Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.).** Universitas Sebelas Maret: Surakarta. 72 hlm.
- Limantara, L dan Heriyanto. 2010. **Studi Komposisi Pigmen dan Kandungan Fukosantin Rumput Laut Cokelat dari Perairan Madura dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.** *Jurnal Ilmu Kelautan.* 15(1): 23-32.
- Lutviana. 2013. **Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam) dengan Metode Stabilisasi Membran Sel Darah Merah Secara In Vitro.** Uin Syarif Hidayatullah Jakarta: Jakarta. 56 hal.

- Lyman. 1982. **Acetone: Chemical and Physical Information**. Department of Transportation: North America. 4 pp.
- Maharani, M, A dan Rizki, W. 2010. **Pembuatan Alginat Dari Rumput Laut Untuk Menghasilkan Produk Dengan Rendemen Dan Viskositas Tinggi**. Universitas Diponegoro: Semarang. 1(3): 32-40.
- Mahbub, A.M. 2012. **Studi Ekstraksi Alginat dari Biomassa Rumput Laut Coklat (*Sargassum cristaefolium*) Sebagai Adsorben dalam Biosorpsi Ion Logam Cadmium (II)**. Universitas Indonesia: Jakarta. 54 hal.
- Malviya, D., Striegel, M. F. and J. Hill. 2009. **Thin-Layer Chromatography for Binding Media Analysis. Scientific Tools for Conservation. The Getty Conservation Institute. Los Angeles. United States of America: 174 pp.**
- Markham, K. R. 1988. **Cara Identifikasi Flavonoid**. Institut Teknologi Bandung: Bandung. 110 hlm.
- Maulida, D., dan N. Zulkarnaen. 2010. **Ekstraksi Antioksidan (Likopen) dari Buah Tomat dengan Menggunakan Solven Campuran N-Heksana, Aseton dan Etanol**. Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro Semarang. 25 hal.
- MSDS, 1999. **Material Safety Data Sheet N-Heksane**. MEGS: Canada. 10 hal.
- MSDS, 2006. **Material Safety Data Sheet Acetone**. Midsun Grup: Southington. 1 hal.
- MSDS, 2006. **Material Safety Data Sheet Methanol**. BDH: Jamaica. 1 hal.
- MSDS, 2009. **Material Safety Data Sheet Ethyl Acetate**. Phillippe Property Chemical: USA. 2 hal.
- Murti, P., Ferdy, S. R., Ocky, R dan Susanto. 2010. **Potensi Fukosantin Dari Rumput Laut Coklat Dalam Dunia Kesehatan**. Universitas Diponegoro: Semarang. 21 hal.
- Nabila, S. 2011. **Pembuatan Etanol Generasi Kedua dengan Memanfaatkan Limbah Rumput Laut *Eucheuma cottonii* sebagai Bahan Baku**. *Jurnal Ilmiah Teknik Mesin CakraM*. 5(1): 75-84.
- Natalia, E., Puji, R, Sulistyowati dan Limantara, L. 2008. **Fotoproteksi Kurkumin terhadap  $\beta$ -Karoten pada Berbagai Nisbah Molar serta Aktivitas Antioksidannya**. *Jurnal Natur Indonesia*. 12(1): 1-8.
- Nursid, M., Thamrin, W dan Rini, S. 2013. **Aktivitas Antioksidan, Sitotoksisitas Dan Kandungan Fukosantin Ekstrak Rumput Laut Coklat Dari Pantai Binuangun, Banten**. *Balai Perikanan*. 2 (3): 73-84.

- Palupi, R. 2009. **Prarancangan Pabrik Aseton Proses Dehidrogenasi Isopropil Alkohol Kapasitas 21.000 Ton/Tahun**. Universitas Muhammadiyah Surakarta: Solo. 35 hal.
- Pangestuti, R., L. Limantara, dan A. Susanto. 2007. **Kandungan dan Aktivitas Antioksidan Fukosantin *Sargassum polycistum* C. A. Agardh**. 9(2): 201-208.
- Panjaitan, T. D, Budhi, P dan Limantara. 2011. **Peranan Karotenoid Alami Dalam Menangkal Radikal Bebas Di Dalam Tubuh**. Universitas Kristen Satya Wacana. 3(4): 76-83.
- Paransa, D. S., Kurnia, K., Antonius, P. R dan Desy, M. 2014. **Analisis Jenis Pigmen Dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Pigmen Xantofil Pada Alga Coklat *Sargassum polycistum* (C.Agardh)**. *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi*. 1(1). 90-96.
- Pramesti, P. 2013. **Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rumput Laut *Caulerpa serrulata* Dengan Metode DPPH (1,1 difenil 2 pikrilhidrazil)**. *Buletin Oseanografi Marina*. 7(2): 7-15.
- Prangdimurti, E. 2007. **Pigmen Alami**. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Prasetyowati, M., Corroni, J dan Devy, A. 2008. **Pembuatan Tepung Karaginan Dari Rumput Laut (*Eucheuma cottonii*) Berdasarkan Perbedaan Metode Pengendapan**. *Jurnal Teknik Kimia*. 2(15): 27-36.
- Purwani, M., Suryanti dan Muhadi, A. 2008. **Ekstraksi Konsentrat Neodimium Memakai Asam Di- 2 - Etil Heksil Fosfat**. *Batan*. 3(6): 439-448.
- Putra, E. D. 2004. **Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Dalam Bidang Farmasi**. Universitas Sumatra Utara: Sumatra. 3 hal.
- Putranti, R. I. 2013. **Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rumput Laut *Sargassum duplicatum* dan *Turbinaria ornata* dari Jepara**. Universitas Diponegoro Semarang: Semarang. 10 Hal.
- Raiz, I. R. 2014. **Ekstraksi Andrografolid Dari *Andrographis paniculata* (Burm.F.) Nees Menggunakan Ekstraktor Soxhlet**. *Pharmaciana*. 4(1):85-92.
- Ramadhan, A. E dan Haries, A. P. 2010. **Pengaruh Konsentrasi Etanol, Suhu dan Jumlah Stage Pada Ekstraksi Oleoresin Jahe (*Zingiber officinale* Rosc) Secara Batch**. *Jurnal Teknik Kimia*. 2(4): 35-45.
- Rasyid, A. 2010. **Ekstraksi Natrium Alginat Dari Alga Coklat *Sargassum echinocarpum***. *Oseanologi dan Limnologi di Indonesia*. 36(3): 393-400.
- Rohmah, S. 2013. **Pengaruh Penambahan Natrium Hidroksida (NaOH) Terhadap Kandungan Protein dan Abu Pada Karagenan Rumput Laut (*Eucheuma cottoni*) Pasca Panen**. IKIP PGRI Semarang: Semarang. 40 hal.

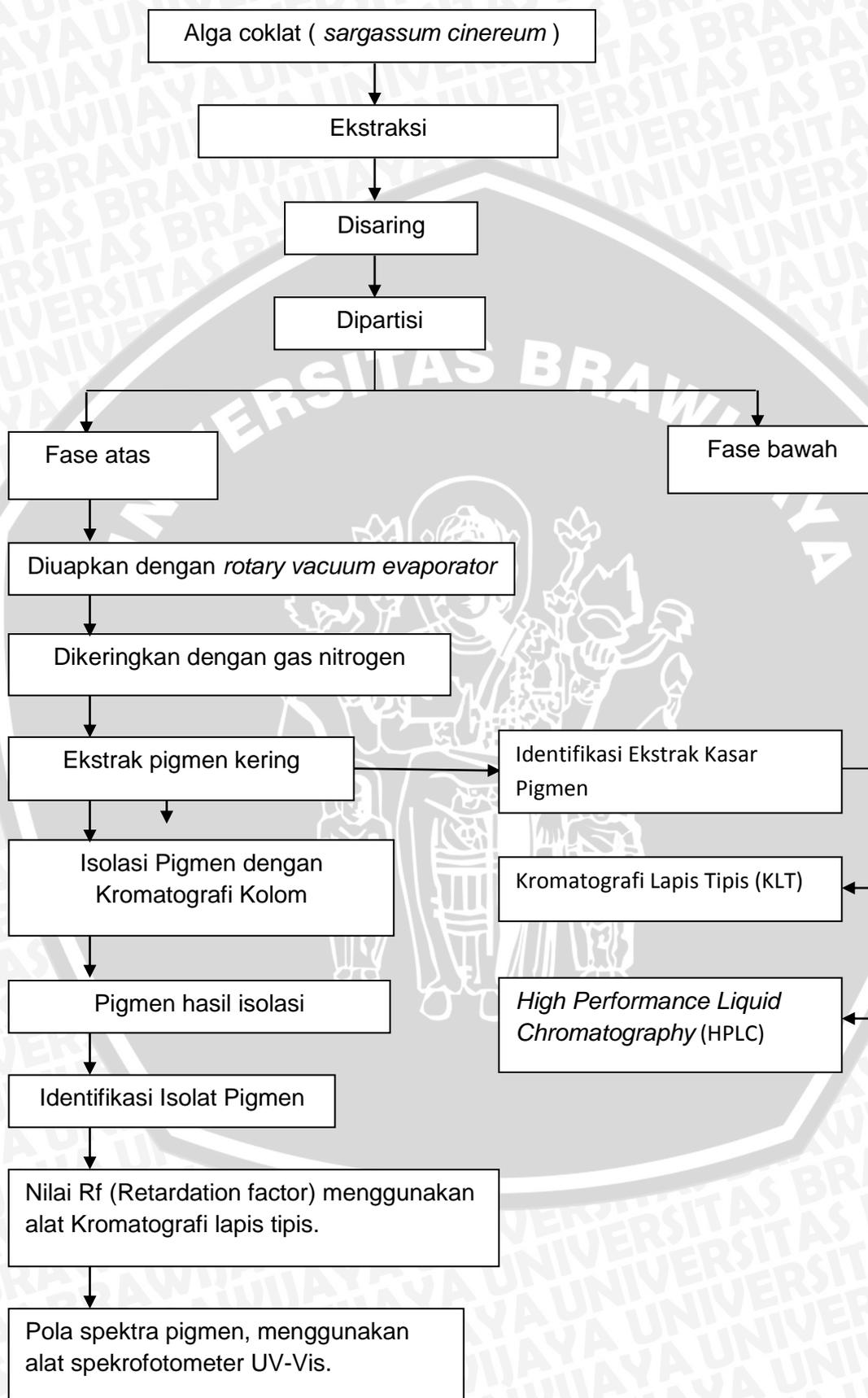
- Romiyanto, A. 2014. **Study Kandungan  $\beta$ -Karoten pada Rumput Laut Merah (*Eucheuma spinosum*) dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**. Universitas Brawijaya: Malang. 118 hlm.
- Saifullah dan Sakinah, H. 2014. **Identifikasi Jenis Rumput Laut Dari Perairan Pulo Merak Cilegon Banten**. Jurnal Ilmu Pertanian dan Perikanan. 3(1): 31-35.
- Santi. 2006. **Onggok Sagu Termodifikasi sebagai Fase Diam dalam Kromatografi Kolom**. Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor: Bogor. 9 hal.
- Savitri dan Veronica, M. 2010. **Ekstraksi Antioksidan (Likopen) dari Buah Tomat dengan Menggunakan Solven Campuran N-Heksana, Aseton dan Etanol**. Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro Semarang. 7 hal.
- Schoefs, Benoît. 2002. **Chlorophyll and Carotenoid Analysis in Food Products. Properties of the Pigments and Methods of Analysis**. *Trends in Food Science & Technology Review*. (13): 361–371.
- Septiana, A,T dan Ari, A. 2012. **Kajian Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat *Sargassum duplicatum* Menggunakan Berbagai Pelarut dan Metode Ekstraksi**. *Jurnal Ilmiah Sains*.6(1). 23-30.
- Setianingsih, T. 2010. **Golongan V A**. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya: Malang. 8 hlm.
- Siadi, K. 2012. **Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) sebagai Biopestisida yang Efektif dengan Penambahan Larutan NaCl**. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Semarang. *Jurnal MIPA*. 1 (35): 77-83.
- Simanjuntak, M. R. 2008. **Ekstraksi dan Fraksinasi Komponen Ekstrak Daun Tumbuhan Senduduk (*Melastoma malabathrium.L*) Serta Pengujian Efek Sediaan Krim Terhadap Penyembuhan Luka Bakar**. Universitas Sumatra Utara: Sumatra. 43 hal.
- Singarimbun, M. Dan S. Effendi. 1989. **Metode Penelitian Survei**: Edisi Revisi. LP3ES: Jakarta. 128 hlm.
- SNI. 06-2594. 1992. Dietil Eter Teknis. **Badan Standarisasi Nasional**. 8 hlm.
- Sudarmadji S., B. Haryono dan Suhardi. 2007. **Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian** Liberty: Yogyakarta. 172 hlm.
- Sudarman, A. 2012. **Uji Kinerja Spektrofotometer Ultraviolet-Tampak Berkas Ganda Terhadap Pengukuran Ambroksol HCL pada Tablet Ekspektoran**. Institut Pertanian Bogor: Bogor. 35 hlm.

- Sumihe, G., Max, R. R dan Johny,A. 2014. **Analisis Fitokimia Dan Penentuan Nilai Lc50 Ekstrak Metanol Daun Liwas**. *Jurnal Ilmiah Sains*. 14(2). 126-132.
- Supirman., Hartati, K dan Kartini, Z. 2013. **Pengaruh Perbedaan Ph Perendaman Asam Jeruk Nipis (*Citrus auratifolia*) Dengan Pengeringan Sinar Matahari Terhadap Kualitas Kimia Teh Alga Coklat (*Sargassum fillipendula*)**. *Jurnal teknologi Pangan*1(1): 45-52.
- Susanti, A. D., D. Ardiana, G. Gumelar P., dan Y. Bening G. 2012. **Polaritas Pelarut sebagai Pertimbangan dalam Pemilihan Pelarut untuk Ekstraksi Minyak Bekatul dari Bekatul Varietas Ketan (*Oriza sativa glatinosa*)**. *Simposium Nasional RAPI*. 9(6): 8-14.
- Sutrisno, M. 2012. **Modul Pengayaan Materi Proyek Pendampingan** Teknik Kimia. Universitas Negeri Malang: Malang. 12 hal.
- Suyitno, Al. MS. 2008. **Modul Pengayaan Materi Proyek Pendampingan**. Universitas Negeri Yogyakarta: DIY. 9 hal.
- Talakua, S., Fanny, F., Simatauw dan Marlina,N. 2011. **Analisis Kandungan Gizi Makroalga *Caulerpa racemosa* Dari Pantai Arowi, Kabupaten Manokwari**. *Unipa: Padang*. 7(3): 23-34.
- Triyati, E. 1985. **Spektrofotometer Ultra-Violet dan Sinar Tampak serta Aplikasinya dalam Oseanologi**. *Oseana*. 10 (1): 39-47.
- Wehr, J. D. 2002. **Brown Algae, in Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification**. Academic Press. San Diego. CA.
- Wikipedia. 2014. **Sel Alga (Rumput Laut)**. [http://id.wikipedia.org/wiki/Sel\\_alga](http://id.wikipedia.org/wiki/Sel_alga). Diakses tanggal 5 April 2014.
- Winarno, F. G., S. Fardiaz, dan D. Fardiaz. 1980. **Pengantar Teknologi Pangan**. PT. Gramedia: Jakarta. 90 hlm.
- Wuntu, D.A dan Vanda, S. **Adsorpsi Aseton Pada Arang Aktif Biji Asam Jawa**. Universitas Ratu Langin: Manado. 4 hal.
- Yudiati, E., Sri, S., Sunarsih dan Rani,A. 2011. **Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Metanol dan Pigmen Kasar *Spirulina* sp.** *jurnal Ilmu Kelautan*. 16(4): 187-192.
- Yuliasih, I., Tua, T. I., Illiah, S., Handing, P., Krisnani dan Titi, S. 2012. **Pengaruh Proses Fraksinasi Pati Sagu Terhadap Karakteristik Fraksi Amilosanya**. 17(1): 29-36.
- Yunizal. 1999. **Teknologi Pengolahan Alginat**. Badan Riset Kelautan dan Perikanan: Jakarta. 6 hal.

Zaelanie, K dan Hartati, K. 2010. **Studi Identifikasi Crude Fukosantin dan fukosantin Hasil Isolasi dari Alga Coklat (*Padina australis*) Dengan Pengujian Spektroskopi FTIR.** Green Teknologi. 2(3): 30-45.



Lampiran 1. Diagram Alir Prosedur Penelitian Pigmen



## Lampiran 2. Proses Ekstraksi dan Fraksinasi Pigmen (Costa *et al.*, 2009) yang telah dimodifikasi beberapa prosesnya

### ❖ **Prosedur Ekstraksi**

- Rumput laut coklat sargassum cinereum dicuci dan dibersihkan dengan air mengalir, kemudian dipotong kecil  $\pm 1$  cm
- Rumput laut coklat ditimbang sebanyak 100 gram dan ditambahkan  $\text{CaCO}_3$  sebanyak  $\pm 0,05$  gram kemudian ditumbuk dengan mortar dan alu
- Rumput laut coklat yang sudah dihaluskan kemudian ditambahkan dengan metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) : aseton ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ) dengan perbandingan (7 : 3 v/v) sebanyak 300 ml selama 24 jam (dilakukan sebanyak 2 kali).
- Hasil maserasi disaring dengan menggunakan kertas Whatman No. 42 sehingga didapatkan filtrat.

### ❖ **Prosedur Fraksinasi**

- Filtra : Dietil eter ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ) : saturasi garam : Air dengan perbandingan (100 ml : 50 ml : 120 ml : 10 ml) dimasukkan ke dalam corong pisah secara berurutan dilakukan pada ruang gelap
- Larutan dalam corong pisah dihomogenkan sampai terbentuk 2 fase
- Fase bawah yang berwarna bening dibuang dan fase atas berwarna lebih pekat ditampung dalam labu erlenmeyer
- Fase atas diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu  $35^\circ\text{C}$  dengan kecepatan 100 rpm sampai pelarut menguap dan berbentuk kerak atau pasta
- Kerak atau pasta ditampung dalam botol sampel kemudian untuk memaksimalkan penguapan dialiri dengan gas nitrogen ( $\text{N}_2$ ) sehingga didapatkan ekstrak kasar kering.
- Botol sampel ditutup *plastic wrap* dan dilapisi *aluminium foil* kemudian disimpan dalam *freezer*.

**Lampiran 3. Prosedur isolasi dengan kromatografi kolom Pangastuti *et al.*, (2007) yang telah dimodifikasi oleh Wijayanti (2010)**

❖ **Preparasi Kolom Kromatografi**

- Fase diam *silica gel* 60 mesh ditimbang  $\pm$  40 gram, kemudian dihomogenkan dengan 200 ml fase gerak berupa pelarut n-heksan dan etil asetat perbandingan (8 : 2 v/v) menggunakan *magnetik stirer* kecepatan 150 rpm selama  $\pm$  1 jam.
- Kapas direndam dengan larutan fase gerak, dimasukkan pada ujung kolom kromatografi dipasang pada statif.
- Setelah itu, bubuk *silica gel* 60 mesh dimasukkan ke dalam kolom kromatografi dan diratakan dengan cara diketuk-ketuk menggunakan bola hisap
- Ditutup pada bagian ujung dan pangkal kolom dan didiamkan selama  $\pm$  12 jam.
- Dimasukkan *sea sand* (pasir laut halus)  $\pm$  2,5 gram.

❖ **Isolasi Pigmen**

- Dilarutkan ekstrak kasar pigmen kering  $\pm$  0,3-0,5 gram ke dalam  $\pm$ 10 ml fase gerak n-heksan dan etil asetat (8 :2 v/v).
- Kran kolom kromatografi dibuka, dikeluarkan semua fase gerak dari kolom kromatografi sampai batas *sea sand*.
- Larutan ekstrak pigmen dimasukkan secara perlahan dengan menggunakan pipet tetes.
- Setelah ekstrak pigmen melewati *sea sand* dan masuk ke dalam *silica gel*-60 mesh, kemudian ditambahkan fase gerak ( N-heksan : etil asetat dengan perbandingan 8 :2 v/v) sedikit demi sedikit agar *silica gel* tidal pecah.
- Fraksi yang keluar ditampung pada botol sampel sesuai warna yang keluar dan diberi nomor pada setiap botolnya.
- Polarisasi fase gerak (n-heksan : etil asetat) dinaikan rata-rata volume 200-300 ml dari perbandingan (8 :2 v/v), (7 :3 v/v), (6 :4 v/v), (5 :5 v/v) sampai semua fraksi warna ekstrak terpisah dan keluar.

**Lampiran 4. Prosedur Identifikasi dengan Kromatografi Kolom Lapis Tipis (KLT) ( Pangestuti *et al.*, 2009 dimodifikasi oleh Hasanah 2014)**

- Disiapkan fase gerak dengan menghomogenkan n-heksan dan aseton dengan perbandingan (7 :3 v/v) sebanyak 10 ml.
- Fase diam (Plat KLT silica gel F-254) dipotong beberapa bagian dengan ukuran 1x5 cm.
- Disetiap potongan KLT diberi tanda bagian bawah berjarak 1,0 cm dan pada bagian atas berjarak 0,5 cm sehingga terbentuk jarak 3,5 cm
- Beberapa sampel warna yang diduga termasuk komponen pigmen diambil dengan pipa kapiler dan ditotolkan pada garis batas bawah plat KLT.
- Plat KLT dimasukkan ke dalam *beaker glass* 50 ml yang berisi fase gerak dan ditutup dengan plastik *clink wrap*
- Ditunggu hingga fase gerak mencapai batas atas plat KLT
- Lalu plat KLT diambil dengan pinset
- Kemurnian isolat diidentifikasi dengan cara dihitung Rf (*Retardation factor*) dengan membandingkan rasio jarak yang ditempuh oleh total warna dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut.

**Lampiran 5. Prosedur identifikasi dengan spektrofotometri UV-Vis (Freates *et al.*, 2012)**

- Sampel kering isolat pigmen yang teridentifikasi masuk ke dalam range Rf hasil identifikasi dari KLT dilarutkan ke dalam aseton PA dan dimasukkan pada kuvet sebanyak  $\pm$
- Panjang gelombang spektrofotometer diatur 300-800 nm
- Kuvet dimasukkan pada instrumen spektrofotometer UV-vis
- Diukur absorbansi dan panjang gelombang sampel

### Lampiran 6. Prosedur Identifikasi Dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (Hegezi *et al.*, 1998)

- Ekstrak pigmen kasar kering dilarutkan dalam 5 ml fase gerak (metanol : aseton : amonium asetat, 80 : 10 : 10 v/v)
- 20  $\mu$ l larutan pigmen diinjeksi ke KCKT dengan fase diam ODS (C-18) 5  $\mu$ m dengan sistem elusi gradient metanol, aseton, dan amonium asetat (1 M) (80 : 10 : 10, v/v) dan laju alir sebesar 1,0  $\text{ml}/\text{menit}$
- Dianalisis pada panjang gelombang 430 nm

### Lampiran 7. Pembuatan larutan

#### ➤ Pembuatan Saturasi Garam (Costa *et al.*, 2009)

- Ditimbang  $\pm$  1500 gram garam grosok
- Dimasukkan ke dalam botol dengan kapasitas 1,5 liter
- Ditambahkan air hingga jenuh
- Dikocok hingga garam jenuh tidak larut lagi
- Disaring dengan kertas saring dengan susunan berturut-turut dari bawah kertas saring kasar, kertas saring halus, dan kapas dilakukan 2 kali penyaringan
- Diperoleh saturasi garam dalam botol

#### ➤ Pembuatan Larutan Ekstraksi

Metanol : Aseton (7:3 v/v)  $\longrightarrow$  300 mL

$$\text{Metanol} = \frac{7}{10} \times 300 \text{ ml} = 210 \text{ mL}$$

$$\text{Aseton} = \frac{3}{10} \times 300 \text{ ml} = 90 \text{ mL}$$

#### ➤ Perhitungan Fase Gerak Pada Kromatografi Kolom

- Heksan : etil Asetat (8:2 v/v)  $\longrightarrow$  200 mL

$$\text{Heksan} = \frac{8}{10} \times 200 \text{ ml} = 160 \text{ mL}$$

$$\text{Etil Asetat} = \frac{2}{10} \times 200 \text{ ml} = 40 \text{ mL}$$

- Heksan : Etil Asetat (7:3 v/v)  $\longrightarrow$  200 mL

$$\text{Heksan} = \frac{7}{10} \times 200 \text{ mL} = 140 \text{ mL}$$

$$\text{Etil Asetat} = \frac{3}{10} \times 200 \text{ mL} = 60 \text{ mL}$$

- Heksan : Etil asetat (6 :4 v/v)  $\longrightarrow$  200 mL

$$\text{Heksan} = \frac{6}{10} \times 200 \text{ mL} = 120 \text{ mL}$$

$$\text{Etil Asetat} = \frac{4}{10} \times 200 \text{ mL} = 80 \text{ mL}$$

- Heksan : Etil Asetat (5 :5 v/v)  $\longrightarrow$  200 mL

$$\text{Heksan} = \frac{5}{10} \times 200 \text{ mL} = 100 \text{ mL}$$

$$\text{Etil Asetat} = \frac{5}{10} \times 200 \text{ mL} = 100 \text{ mL}$$

➤ **Pembuatab Fase Gerak Kromatografi Lapis Tipis**

- Heksan : Aseton (7:3 v/v)  $\longrightarrow$  10 mL

$$\text{Heksan} = \frac{7}{10} \times 10 \text{ mL} = 7 \text{ mL}$$

$$\text{Aseton} = \frac{3}{10} \times 10 \text{ mL} = 3 \text{ mL}$$

➤ **Pembuatan Fase Gerak KCKT**

$$\text{Metanol} = \frac{80}{100} \times 5 \text{ mL} = 4 \text{ mL}$$

$$\text{Aseton} = \frac{10}{100} \times 5 \text{ mL} = 0,5 \text{ mL}$$

$$\text{Amonium asetat} = \frac{10}{100} \times 5 \text{ mL} = 0,5 \text{ mL}$$

Lampiran 8. Dokumentasi Kegiatan Penelitian

Foto Kegiatan Penelitian

- Preparasi Sampel *Sargassum cinereum*



(a). Sampel segar *Sargassum cinereum*



(b). Pemilihan Daun



(c). Pencucian Sampel



(d). Dipotong dan Diangin - anginkan (e). Penimbangan

- Pembuatan Larutan Saturasi Garam



(a). Dimasukan Garam Grosok dan Air

(b.) Dikocok dan Didiamkan



(c). Proses Penyaringan 1

(d). Penyaringan 2

(e). Saturasi Garam

- Persiapan Kromatografi Kolom



(a). Penimbangan dan Magnetic Stirrer Silica Gel

(b). Kolom Kromatografi

- Proses Ekstraksi dan Filtrasi Ekstrak *Sargassum cinereum*



(a). Penimbangan Sampel 100 g (b). Ditimbang  $\text{CaCO}_3$  0,5 g



(c) Ditambah  $\text{CaCO}_3$  dan ditumbuk (d). Proses Maserasi



(e). Proses Filtrasi Ekstrak *Sargassum cinereum*

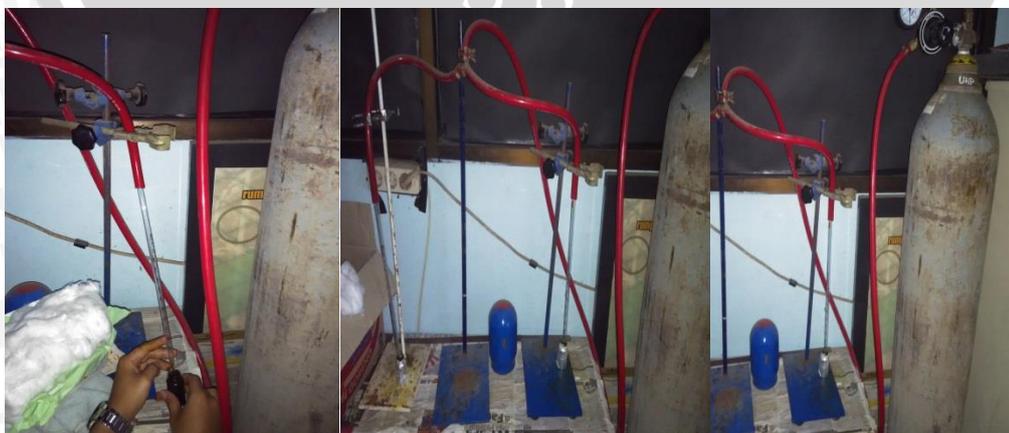
- Proses Fraksinasi, Evaporasi dan Pengeringan Ekstrak Kasar *Sargassum cinereum*



(a). Proses Fraksinasi (Partisi)



(b). Proses Evaporasi (Pemekatan Sampel Ekstrak)



(c). Pengeringan dengan Gas Nitrogen

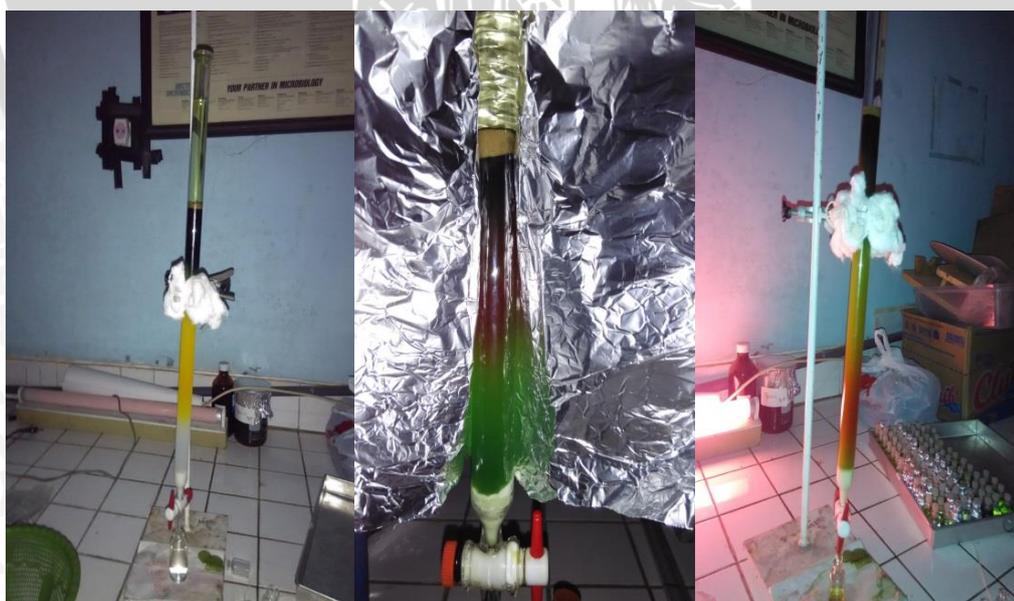
- Isolasi Komponen Pigmen



(a). Dimasukan Sea Sand (b). Pelarutan Ekstrak (fase gerak 8:2)



(c). Pemasukan Ekstrak *Sargassum cinereum*



(d). Pemisahan warna Komponen Pigmen



(e). Isolat pigmen ( $\beta$ -Karoten, Klorofil a, klorofil b dan Fucosantin)



(e). N<sub>2</sub> (komponen Pigmen)

- Identifikasi Komponen Pigmen

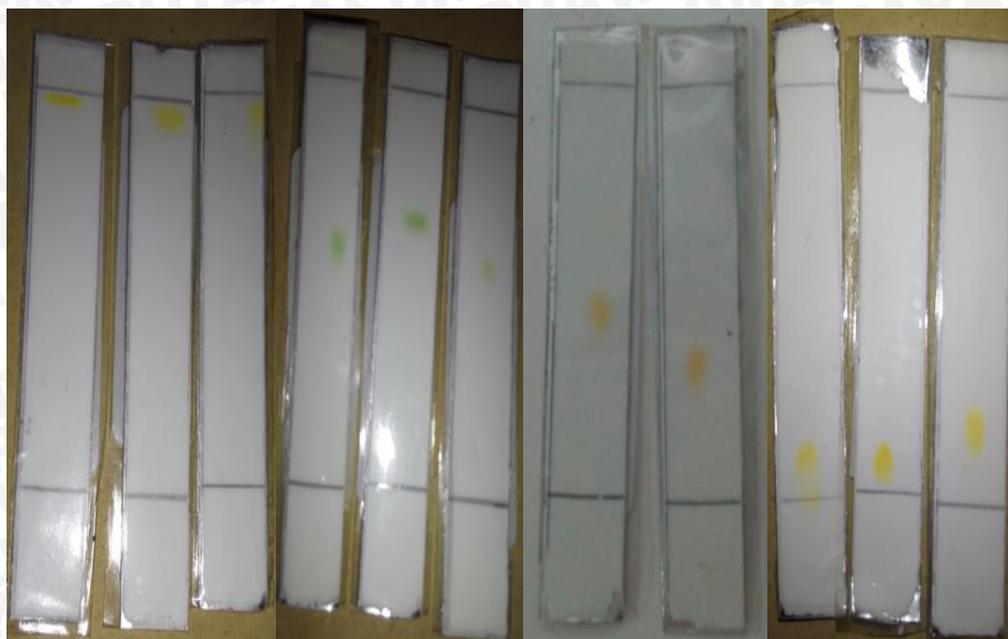
1. Uji Kromatografi Lapis Tipis



(a) Isolat pigmen *Sargassum cinereum*



(b) Fase gerak



(c). Hasil Uji KLT ( $\beta$ -Karoten, Klorofil a, klorofil b dan Fucosantin)

## 2. Uji Spektrofotometer UV-Vis



(a). Isolat Pigmen Kering (b). Larutan blangko



(c). Proses Uji Spektrofotometer UV-Vis

### Lampiran 9. Data Hasil Isolasi Komponen Pigmen Kromatografi Kolom

Panjang Kolom Kromatografi = 50 cm

Diameter Kolom Kromatografi = 2 cm

No. Botol	Waktu	Warna	Konsentrasi Fase Gerak
1.	10.00	Bening	8:2 (v/v) (N-Heksan:Etil Asetat)
2.	10.05	Bening	8:2
3.	10.10	Bening	8:2
4.	10.13	Putih Bening	8:2
5.	10.15	Kuning Bening	8:2
6.	10.18	Kuning Pekat( $\beta$ - Karoten)	8:2
7.	10.20	Kuning Pekat( $\beta$ - Karoten)	8:2
8.	10.23	Kuning Pekat( $\beta$ - Karoten)	8:2
9.	10.26	Bening	8:2
10.	10.29	Bening	8:2
11.	10.31	Hijau Bening	8:2
12.	10.34	Hijau kekuningan	8:2
13.	10.37	Hijau kekuningan	8:2
14.	10.39	Hijau Kekuningan (Klorofil b)	8:2
15.	10.42	Hijau Kekuningan (Klorofil b)	8:2
16.	10.44	Hijau Kekuningan (Klorofil b)	8:2
17.	10.47	Hijau Pekat (Klorofil b)	8:2
18.	10.50	Hijau Pekat	8:2
19.	10.55	Hijau	8:2
20.	10.57	Hijau	8:2
21.	10.59	Hijau Bening	8:2
22.	11.01	Hijau Bening	8:2
23.	11.03	Hijau Bening	8:2
24.	11.05	Hijau Bening Kebiruan	8:2
25.	11.07	Hijau Kebiruan (Klorofil a)	8:2
26.	11.09	Hijau Kebiruan (Klorofil a)	8:2
27.	11.11	Hijau Kebiruan (Klorofil a)	8:2
28.	11.14	Hijau Kebiruan (Klorofil a)	8:2
29.	11.18	Hijau Kebiruan(Klorofil a)	8:2
30.	11.20	Biru	7:3 (v/v) (N-Heksan:Etil Asetat)

31.	11.23	Biru	7:3
32.	11.27	Biru	7:3
33.	11.30	Biru Bening	7:3
34.	11.36	Biru Bening	7:3
35.	11.38	Biru Bening	7:3
36.	11.40	Hijau Bening	7:3
37.	11.43	Hijau Bening	7:3
38.	11.46	Hijau Bening	7:3
39.	11.48	Hijau Bening	7:3
40.	11.50	Hijau Bening	7:3
41.	11.52	Hijau Bening	7:3
42.	11.55	Hijau Bening	7:3
43.	11.57	Hijau Bening	7:3
44.	12.00	Hijau Bening	7:3
45.	12.03	Hijau Bening	7:3
46.	12.06	Hijau Bening	7:3
47.	12.08	Hijau Bening	7:3
48.	12.10	Hijau Bening	7:3
49.	12.13	Hijau Bening	7:3
50.	12.15	Hijau Bening	7:3
51.	12.18	Hijau Bening	7:3
52.	12.20	Hijau Bening	7:3
53.	12.23	Hijau Bening	7:3
54.	12.25	Hijau Bening	7:3
55.	12.28	Hijau Bening	7:3
56.	12.30	Hijau Bening	6:4 (N-Heksan:Etil Asetat)
57.	12.33	Hijau Bening	6:4
58.	12.35	Hijau Bening	6:4
59.	12.37	Hijau Bening	6:4
60.	12.38	Hijau Bening	6:4
61.	12.42	Hijau Bening	6:4
62.	12.46	Hijau Bening	6:4
63.	12.49	Hijau Bening	6:4
64.	12.52	Hijau Bening	6:4
65.	12.56	Hijau Bening	6:4
66.	13.00	Bening	6:4
67.	13.03	Bening	6:4
68.	13.06	Kuning Bening	6:4



69.	13.08	Kuning Bening		6:4
70.	13.12	Kuning Pekat		6:4
71.	13.15	Kuning Pekat		6:4
72.	13.16	Orange		6:4
73.	13.20	Orange		6:4
74.	13.23	Orange Pekat		6:4
75.	13.27	Orange (Fukosantin)	Pekat	6:4
76.	13.29	Orange (Fukosantin)	Pekat	6:4
77.	13.32	Orange (Fukosantin)	Pekat	6:4
78.	13.36	Orange (Fukosantin)	Pekat	6:4
79.	13.40	Orange (Fukosantin)	Pekat	6:4
80.	13.46	Orange (Fukosantin)	Pekat	5:5 (N-Heksan:Etil Asetat)
81.	13.51	Orange (Fukosantin)	Pekat	5:5
82.	13.54	Orange (Fukosantin)	Pekat	5:5
83.	13.56	Orange Pekat		5:5
84.	13.59	Orange Pekat		5:5
85.	14.02	Orange Pekat		5:5
86.	14.05	Kuning Orange		5:5
87.	14.10	Kuning		5:5
88.	14.14	Kuning Bening		5:5
89.	14.16	Kuning Bening		5:5
90.	14.20	Kuning Bening		5:5

Lampiran 10. Perhitungan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Isolat Pigmen Hijaz (2009)

No	Jenis Pigmen	$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}}$		
		Ulangan 1	Ulangan 1	Ulangan 3
1	$\beta$ -Karoten	$\text{Harga Rf} = \frac{3,4 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$ <p>= 0,97</p>	$\text{Harga Rf} = \frac{3,3 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$ <p>= 0,94</p>	$\text{Harga Rf} = \frac{3,4 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$ <p>= 0,97</p>
2	Klorofil a	$\text{Harga Rf} = \frac{2 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$ <p>= 0,57</p>	$\text{Harga Rf} = \frac{2,2 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$ <p>= 0,62</p>	$\text{Harga Rf} = \frac{2,1 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$ <p>= 0,60</p>
3	Klorofil b	$\text{Harga Rf} = \frac{1,5 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$ <p>= 0,42</p>	$\text{Harga Rf} = \frac{1,7 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$ <p>= 0,48</p>	$\text{Harga Rf} = \frac{1,9 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$ <p>= 0,54</p>
4	Fukosantin	$\text{Harga Rf} = \frac{0,9 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$ <p>= 0,257</p>	$\text{Harga Rf} = \frac{1,0 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$ <p>= 0,28</p>	$\text{Harga Rf} = \frac{0,9 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$ <p>= 0,257</p>



## Lampiran 11. Data Absorbansi, Data Kadar Pigmen, Data Rendemen

- Data Absorbansi

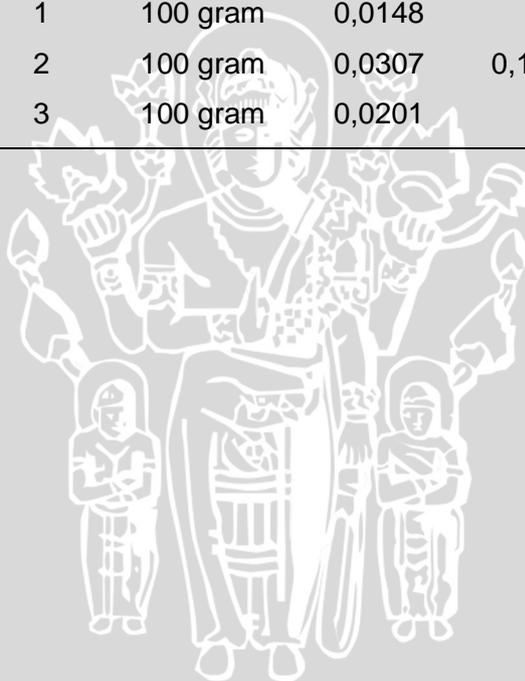
Jenis Pigmen	Ulangan	Pengenceran	Absorbansi
β-Karoten	1	10 <sup>4</sup>	0.793
	2	10 <sup>4</sup>	0.399
	3	10 <sup>4</sup>	0.671
Klorofil a	1	10 <sup>4</sup>	0.383
	2	10 <sup>4</sup>	0.236
	3	10 <sup>4</sup>	0.292
Klorofil b	1	10 <sup>4</sup>	0.641
	2	10 <sup>4</sup>	0.332
	3	10 <sup>4</sup>	0.226
Fukosantin	1	10 <sup>4</sup>	0.244
	2	10 <sup>4</sup>	0.507
	3	10 <sup>4</sup>	0.332

- Data Kadar Pigmen

Jenis Pigmen	Ulangan	Kadar Pigmen
β-Karoten	1	0,0318 gram
	2	0,0159 gram
	3	0,0269 gram
Klorofil a	1	0,0435 gram
	2	0,0267 gram
	3	0,0331 gram
Klorofil b	1	0,0727 gram
	2	0,0376 gram
	3	0,0256 gram
Fukosantin	1	0,0148 gram
	2	0,0307 gram
	3	0,0201 gram

- **Data Rendemen**

Jenis Pigmen	Ulangan	Gram Sampel	Rendemen (%)	Standart deviasi Nilai Rendemen
β-Karoten	1	100 gram	0,0318	0,025%±0,0000074
	2	100 gram	0,0159	
	3	100 gram	0,0269	
Klorofil a	1	100 gram	0,0435	0,034%± 0,0000073
	2	100 gram	0,0267	
	3	100 gram	0,0331	
Klorofil b	1	100 gram	0,0727	0,134 %± 0,0000592
	2	100 gram	0,0376	
	3	100 gram	0,0256	
Fukosantin	1	100 gram	0,0148	0,1261 %± 0,000025
	2	100 gram	0,0307	
	3	100 gram	0,0201	



### Lampiran 13. Perhitungan Kadar Pigmen

Hukum *Lambert-Beer*, yaitu:

$$A = \epsilon bc$$

Ket: A = absorbansi

$\epsilon$  = absorptifitas molar (*Molar extinction coefficient*)

b = lebar bagian dalam kuvet

c = konsentrasi (molar)

#### Kadar $\beta$ -karoten

##### Ulangan 1

$$A = \epsilon bc$$

$$0,793 = 134 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,793}{134 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 5,918 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari massa:

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

$$5,918 \times 10^{-6} = \frac{X}{536,87} \times \frac{1000}{10000}$$

$$5,918 \times 10^{-6} = \frac{X}{5368,7}$$

$$X = 5368,7 \times 5,918 \times 10^{-6}$$

$$X = 0,0318 \text{ gram}$$

##### Ulangan 2

$$A = \epsilon bc$$

$$1,490 = 134 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,399}{134 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 2,978 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari massa:

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

$$2,978 \times 10^{-6} = \frac{X}{536,87} \times \frac{1000}{10000}$$

$$2,978 \times 10^{-6} = \frac{X}{5368,7}$$

$$X = 5368,7 \times 2,978 \times 10^{-6}$$

$$X = 0,0159 \text{ gram}$$

**Ulangan 3**

$A = \epsilon bc$

$1,274 = 134 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$

$c = \frac{0.671}{134 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$

$c = 5,007 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$

Mencari massa:

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

$5,007 \times 10^{-6} = \frac{X}{536,87} \times \frac{1000}{10000}$

$5,007 \times 10^{-6} = \frac{X}{5368,7}$

$X = 5368,7 \times 5,007 \times 10^{-6}$

$X = 0,0269 \text{ gram}$

**Kadar Klorofil a**

**Ulangan 1**

$A = \epsilon bc$

$2,193 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$

$c = \frac{0.383}{78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$

$c = 4,863 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$

Mencari massa:

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

$4,863 \times 10^{-6} = \frac{X}{893,5} \times \frac{1000}{10000}$

$4,863 \times 10^{-6} = \frac{X}{8935}$

$X = 8935 \times 4,863 \times 10^{-6}$

$X = 0,0435 \text{ gram}$

**Ulangan 2**

$A = \epsilon bc$

$3,135 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$

$c = \frac{0.236}{78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$

$c = 2,996 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$

Mencari massa:

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

$2,996 \times 10^{-6} = \frac{X}{893,5} \times \frac{1000}{10000}$

$2,996 \times 10^{-6} = \frac{X}{8935}$

$X = 8935 \times 2,996 \times 10^{-6}$

$X = 0,0267 \text{ gram}$

**Ulangan 3**

$A = \epsilon bc$



$$3,135 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0.292}{78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 3,708 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari massa:

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

$$3,708 \times 10^{-6} = \frac{X}{893,5} \times \frac{1000}{10000}$$

$$3,708 \times 10^{-6} = \frac{X}{8935}$$

$$X = 8935 \times 3,708 \times 10^{-6}$$

$$X = 0,0331 \text{ gram}$$

### Kadar Klorofil b

#### Ulangan 1

$$A = \epsilon bc$$

$$0,862 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0.641}{78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 8,1396 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari massa:

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

$$8,1396 \times 10^{-6} = \frac{X}{893,5} \times \frac{1000}{10000}$$

$$8,1396 \times 10^{-6} = \frac{X}{8935}$$

$$X = 8935 \times 8,1396 \times 10^{-6}$$

$$X = 0,0727 \text{ gram}$$

#### Ulangan 2

$$A = \epsilon bc$$

$$0,231 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0.332}{78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 4,215 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari massa:

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

$$4,215 \times 10^{-6} = \frac{X}{893,5} \times \frac{1000}{10000}$$

$$4,215 \times 10^{-6} = \frac{X}{8935}$$

$$X = 8935 \times 4,215 \times 10^{-6}$$

$$X = 0,0376 \text{ gram}$$

**Ulangan 3**

$$A = \epsilon bc$$

$$2,451 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,226}{78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 2,869 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari massa:

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

$$2,869 \times 10^{-6} = \frac{X}{893,5} \times \frac{1000}{10000}$$

$$2,869 \times 10^{-6} = \frac{X}{8935}$$

$$X = 8935 \times 2,869 \times 10^{-6}$$

$$X = 0,0256 \text{ gram}$$

**Kadar Fukosantin****Ulangan 1**

$$A = \epsilon bc$$

$$2,030 = 109 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,244}{109 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 2,238 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari massa:

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

$$2,238 \times 10^{-6} = \frac{X}{658,92} \times \frac{1000}{10000}$$

$$2,238 \times 10^{-6} = \frac{X}{6589,2}$$

$$X = 6589,2 \times 2,238 \times 10^{-6}$$

$$X = 0,0148 \text{ gram}$$

**Ulangan 2**

$$A = \epsilon bc$$

$$2,205 = 109 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,507}{109 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 4,651 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$$

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

$$4,651 \times 10^{-6} = \frac{X}{658,92} \times \frac{1000}{10000}$$

$$4,651 \times 10^{-6} = \frac{X}{6589,2}$$

$$X = 6589,2 \times 4,651 \times 10^{-6}$$

$$X = 0,0307 \text{ gram}$$

**Ulangan 3**

$$A = \epsilon bc$$

$$2,027 = 109 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,332}{109 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 3,045 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari massa:

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

$$3,045 \times 10^{-6} = \frac{X}{658,92} \times \frac{1000}{10000}$$

$$3,045 \times 10^{-6} = \frac{X}{6589,2}$$

$$X = 6589,2 \times 3,045 \times 10^{-6}$$

$$X = 0,0201 \text{ gram}$$

**Lampiran 14. Perhitungan Kadar Rendemen Pigmen**

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

- B-Karoten**

Ulangan 1 =

$$\frac{0,0318}{100 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$= 0,0318 \%$$

Ulangan 2 =

$$\frac{0,0159}{100 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$= 0,0159 \%$$

Ulangan 3 =

$$\frac{0,0269}{100 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$= 0,0269 \%$$

$$\begin{aligned} \text{Rata-rata Rendemen } (\bar{x}) &= \frac{0,0318 + 0,0159 + 0,0269}{3} \\ &= 0,0249 \% \end{aligned}$$

**Standar deviasi :**

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

$$= \frac{(0,0318 - 0,0249)^2 + (0,0159 - 0,0249)^2 + (0,0269 - 0,0249)^2}{3-1}$$

$$= \frac{4,76 \times 10^{-5} + 8,1 \times 10^{-5} + 0,4 \times 10^{-5}}{2}$$

$$S = 0,7345 \times 10^{-5}$$

$$\text{Nilai rendemen } \beta\text{-karoten} = 0,0249\% \pm 0,7345 \times 10^{-5}$$

**Klorofil a**

Ulangan 1

$$\frac{0,0435}{100 \text{ gram}} \times 100\% \\ = 0,0435\%$$

Ulangan 2

$$\frac{0,0267}{100 \text{ gram}} \times 100\% \\ = 0,0267\%$$

Ulangan 3

$$\frac{0,0331}{100 \text{ gram}} \times 100\% \\ = 0,0331\%$$

$$\text{Rata-rata Rendemen } (\bar{x}) = \frac{0,0435 + 0,0267 + 0,0331}{3} \\ = 0,034\%$$

**Standar deviasi :**

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \\ = \frac{(0,0435 - 0,034)^2 + (0,0267 - 0,034)^2 + (0,0331 - 0,034)^2}{3-1} \\ = \frac{9,025 \times 10^{-5} + 5,329 \times 10^{-5} + 0,081 \times 10^{-5}}{2}$$

$$S = 7,2155 \times 10^{-5}$$

$$\text{Nilai rendemen} = 0,034\% \pm 7,2155 \times 10^{-5}$$

- Klorofil b**

Ulangan 1

$$\frac{0,0727}{100 \text{ gram}} \times 100\% \\ = 0,0727\%$$

Ulangan 2

$$\frac{0,0376}{100 \text{ gram}} \times 100\% \\ = 0,0376\%$$

Ulangan 3

$$\frac{0,256}{100 \text{ gram}} \times 100\% \\ = 0,256\%$$

$$\text{Rata-rata Rendemen } (\bar{x}) = \frac{0,0727 + 0,0376 + 0,256}{3} \\ = 0,045\%$$

Standar deviasi :

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

$$= \frac{(0,0727 - 0,045)^2 + (0,0376 - 0,045)^2 + (0,256 - 0,045)^2}{3-1}$$

$$= \frac{76,729 \times 10^{-5} + 5,476 \times 10^{-5} + 37,636 \times 10^{-5}}{2}$$

$$S = 59,92 \times 10^{-5}$$

Nilai rendemen Klorofil b = 0,134 % ± 0,0000592

- **Fukosantin**

Ulangan 1 =

$$\frac{0,0148}{100 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$= 0,0148\%$$

Ulangan 2 =

$$\frac{0,0307}{100 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$= 0,0307\%$$

Ulangan 3 =

$$\frac{0,1224}{100 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$= 0,0201\%$$



$$\begin{aligned} \text{Rata-rata Rendemen } (\bar{x}) &= \frac{0,0148 + 0,0307 + 0,0201}{3} \\ &= 0,022 \% \end{aligned}$$

**Standar deviasi :**

$$\begin{aligned} S^2 &= \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \\ &= \frac{(0,0148 - 0,022)^2 + (0,0307 - 0,022)^2 + (0,0201 - 0,022)^2}{3-1} \\ &= \frac{42,107 \times 10^{-5} + 7,569 \times 10^{-6} + 0,361 \times 10^{-5}}{2} \end{aligned}$$

$$S = 25,02 \times 10^{-5}$$

Nilai rendemen Fukosantin = 0,1261 %  $\pm$  0,000025

