

**PENGARUH METODE DAN WAKTU EKSTRAKSI TERHADAP β -KAROTEN
MIKROALGA (*Spirulina* sp.)**

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

**Oleh:
MOHAMMAD FATHUR ROHMAN
NIM. 115080300111031**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

**PENGARUH METODE DAN WAKTU EKSTRAKSI TERHADAP β -KAROTEN
MIKROALGA (*Spirulina* sp.)**

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

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

**Oleh:
MOHAMMAD FATHUR ROHMAN
NIM. 115080300111031**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

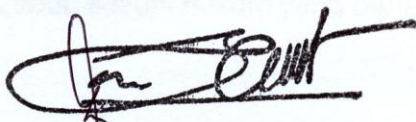
repository.ub.ac.id

SKRIPSI
PENGARUH METODE DAN WAKTU EKSTRAKSI TERHADAP β -KAROTEN
MIKROALGA (*Spirulina* sp.)

Oleh:
MOHAMMAD FATHUR ROHMAN
NIM. 115080300111031

telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 22 Februari 2016
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Penguji 1,



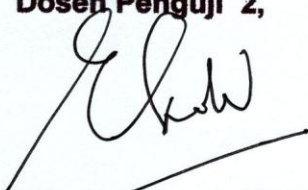
(**Dr. Ir. Bambang Budi Sasmito, M.S.**)
NIP. 19570119 198601 1 001
Tanggal: 23 MAR 2016

Menyetujui,
Dosen Pembimbing 1,



(**Dr. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes.**)
NIP. 19611022 198802 2 001
Tanggal: 23 MAR 2016

Dosen Penguji 2,



(**Eko Waluyo, S.Pi., M.Sc.**)
NIP. 19800424 200501 1 001
Tanggal: 23 MAR 2016

Dosen Pembimbing 2,



(**Dr. Ir. M. Firdaus, M.P.**)
NIP. 19680919 200501 1 001
Tanggal: 23 MAR 2016

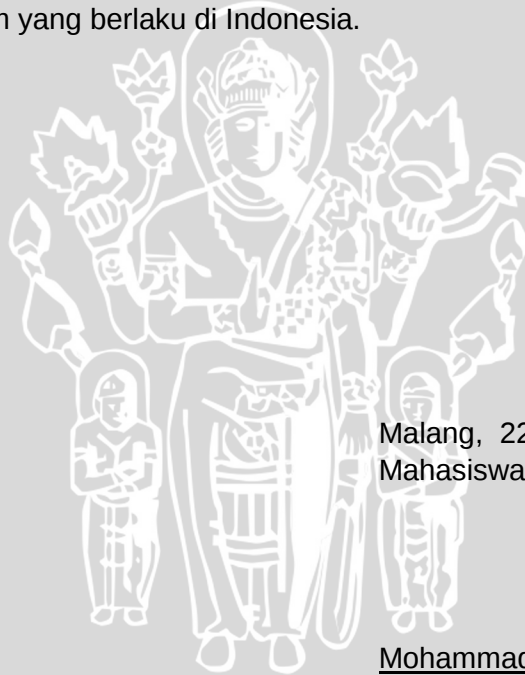


Mengetahui,
Ketua Jurusan
(**Dr. Ir. Arning Wiljeng Ekawati, M.S.**)
NIP. 19620805 198603 2 001
Tanggal: 23 MAR 2016

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan 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, 22 Februari 2016
Mahasiswa

Mohammad Fathur Rohman
NIM. 115080300111031

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warrahmatullahi Wabarokatuh,

Segala puji dan syukur ke hadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat, taufik serta hidayah-Nya. Shalawat dan salam semoga tetap tercurah pada Nabi Muhammad SAW sehingga penulis bisa menyelesaikan penelitian skripsi beserta penyusunan laporan kegiatan yang berjudul "Pengaruh Metode dan Waktu Ekstraksi terhadap β -Karoten Mikroalga (*Spirulina* sp.)". Penelitian skripsi dilaksanakan sebagai syarat untuk memperoleh gelar sarjana perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Penulis menyampaikan maaf yang sebesar-besarnya apabila masih terdapat kesalahan dan kekurangan dalam laporan ini. Penulis berharap semoga laporan ini dapat bermanfaat dan berguna bagi penulis pribadi dan pembaca.

Wassalam'alaikum Warrahmatullahi Wabarokatuh

Malang, 22 Februari 2016

Penyusun

UCAPAN TERIMA KASIH

Penyusunan laporan skripsi ini tidak lepas dari bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, karena itu penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes dan Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP selaku dosen pembimbing 1 dan dosen pembimbing 2 yang telah banyak memberikan bimbingan dan pengarahan mulai dari persiapan sampai terselesaikannya penyusunan laporan ini.
2. Bapak Setiaji dan Ibu Hayuni sebagai orang tua yang senantiasa memberikan dukungan moril dan materi, serta doa dan bimbingan yang tak pernah putus kepada penulis.
3. Kakak Lia dan Adik Sasa serta seluruh keluarga besar di rumah yang telah memberikan semangat dan doa.
4. Maria Dewi Octavia Purba yang bersedia meminjamkan laptop dan membantu penulis dalam menyelesaikan penulisan laporan ini.
5. Teman-teman penelitian satu tim. Terima kasih sebesar-besarnya buat Silvia Yulian Sah, dan Dewi Faiqotul L.
6. A// Fistech terutama angkatan 2011 semoga tetap kompak sampai kapan pun.

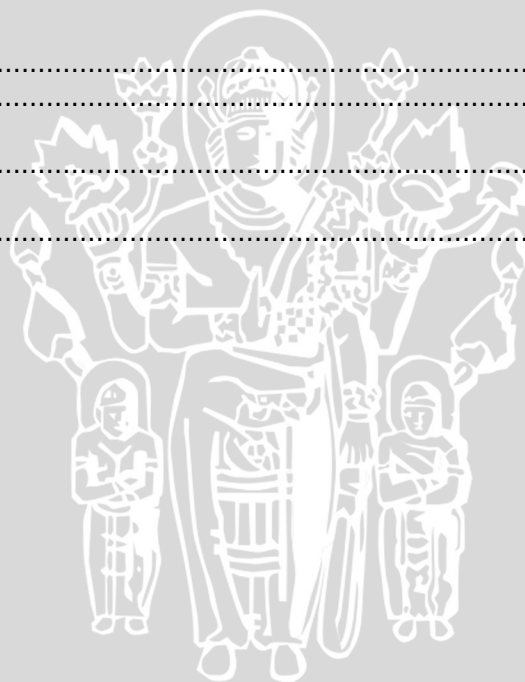
Malang, 22 Februari 2016

Penyusun

DAFTAR ISI

	Halaman
PERNYATAAN ORISINILITAS	i
KATA PENGANTAR	ii
UCAPAN TERIMA KASIH	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penulisan	3
1.4 Hipotesis	3
1.5 Kegunaan Penelitian	3
1.6 Waktu dan Tempat Penelitian	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Mikroalga	5
2.2 <i>Spirulina</i> sp.	6
2.2.1 Kultivasi Mikroalga <i>Spirulina</i> sp.	8
2.2.1.1 Kultur Laboratorium	8
2.2.1.2 Kultur Intermediete	10
2.2.2 Pemanenan Mikroalga	10
2.3 Karotenoid	11
2.4 β -karoten	12
2.5 Ekstraksi	13
2.5.1 Maserasi	14
2.5.2 Ultrasonik	15
3. METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian	18
3.1.1 Bahan Penelitian	18
3.1.2 Peralatan Penelitian	18
3.1.3 Metode Penelitian	19
3.2 Perlakuan dan Rancangan Percobaan	20
3.2.1 Penelitian Pendahuluan	20
3.2.2 Penelitian Utama	20
3.3 Prosedur Penelitian	22
3.3.1 Pengujian Kadar Air	22
3.3.2 Saturasi Garam	23
3.3.3 Ekstraksi Pigmen	23
3.3.3.1 Ekstraksi Metode Ultrasonik.	23
3.3.3.2 Ekstraksi Metode Maserasi	24
3.3.4 Isolasi Senyawa β -Karoten Ekstrak <i>Spirulina</i> sp.	26
3.3.5 Parameter yang Diamati	28
3.3.5.1 Ekstrak Kasar <i>Spirulina</i> sp.	28

3.3.5.2 Analisa <i>Yield</i> Ekstrak <i>Spirulina</i> sp.	28
3.3.5.3 Analisa Total Karotenoid	29
3.3.5.4 Analisa <i>Yield</i> β -Karoten.....	30
3.3.5.5 Pengukuran Spektra Visibel Senyawa β -Karoten dengan Spektrofotometer UV-Vis.....	30
3.3.5.6 <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM)	31
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Penelitian Pendahuluan	32
4.2 Penelitian Utama.....	33
4.2.1 Ekstrak Kasar <i>Spirulina</i> sp.	34
4.2.2 <i>Yield</i> Ekstrak <i>Spirulina</i> sp.	35
4.2.3 Isolasi Senyawa β -Karoten.....	36
4.2.4 Total Karotenoid <i>Spirulina</i> sp.	37
4.2.5 Total <i>Yield</i> β -Karoten <i>Spirulina</i> sp.	39
4.2.6 Pola Spektra Visibel Senyawa β -Karoten.....	40
4.2.7 Perubahan Dinding Sel <i>Spirulina</i> sp. dilihat dengan <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM)	41
5. PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	42
5.2 Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	47



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kandungan Karotenoid <i>Spirulina</i> sp. (mg/10g) biomasa.	8
2. Model Rancangan Percobaan Penelitian Utama.....	25
3. Hasil Penelitian Pendahuluan	33
4. Hasil Isolasi senyawa β -Karoten	36

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

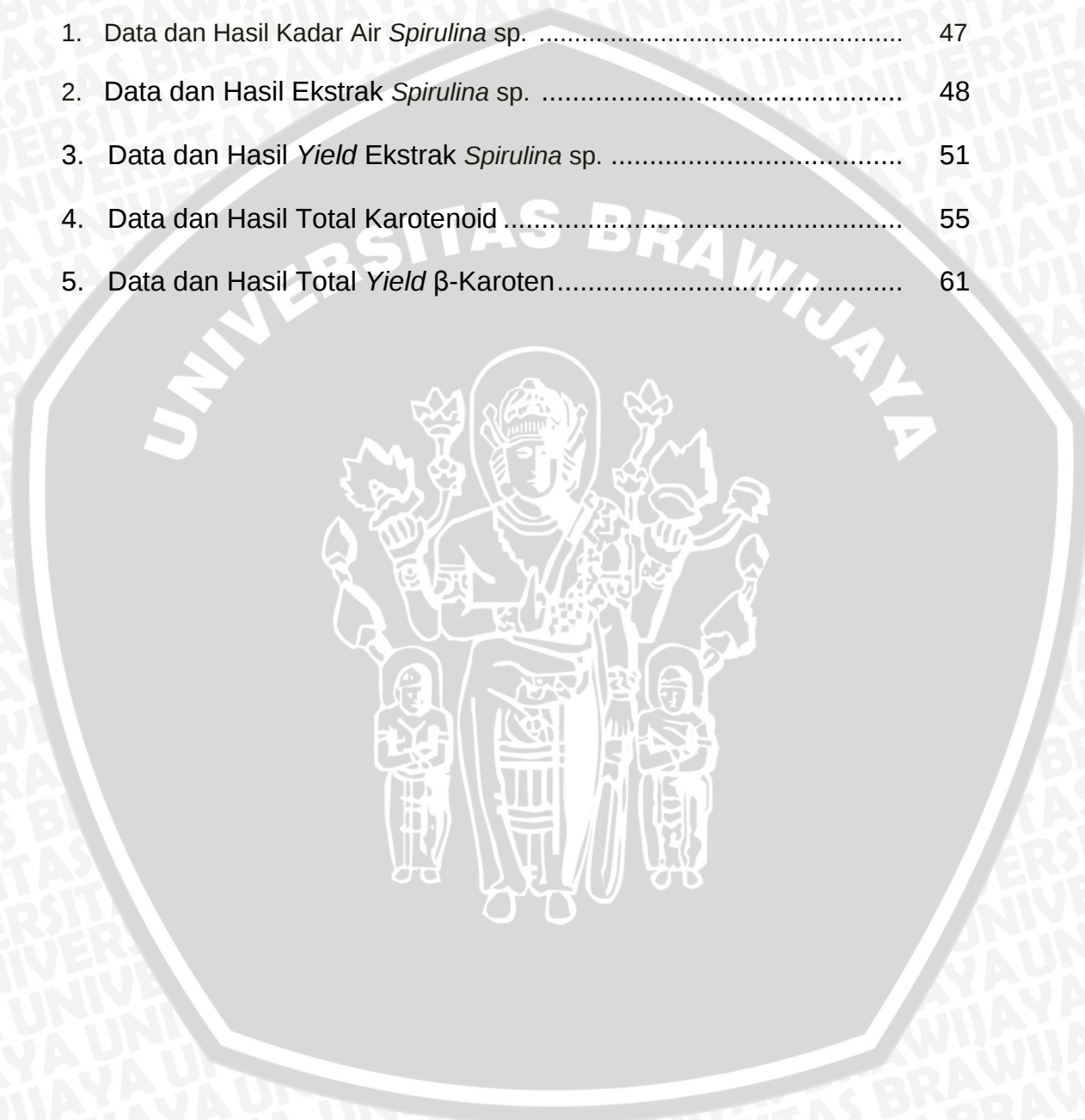


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Spirulina</i> sp.	6
2. Struktur Molekul β -Karoten	12
3. Kavitasi Ultrasonik	16
4. <i>Cavitation bubble</i> Merusak dan Membebaskan Senyawa Aktif Sel	17
5. Diagram alir ekstraksi <i>Spirulina</i> sp.	25
6. Ekstrak Kasar <i>Spirulina</i> sp. dengan Perbedaan Metode dan Waktu Ekstraksi	34
7. <i>Yield</i> Ekstrak <i>Spirulina</i> sp. dengan Perbedaan Metode dan Waktu Ekstraksi	35
8. Hasil Isolasi Senyawa β -Karoten	37
9. Total Karotenoid dengan Perbedaan Metode dan Waktu Ekstraksi.....	38
10. <i>Yield</i> Total β -Karoten dengan Perbedaan Metode dan Waktu Ekstraksi .	39
11. Pola Spektra Visibel Senyawa β -Karoten.....	40
12. Dinding Sel <i>Spirulina</i> sp. Sebelum dan Sesudah diekstraksi.....	41

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data dan Hasil Kadar Air <i>Spirulina</i> sp.	47
2. Data dan Hasil Ekstrak <i>Spirulina</i> sp.	48
3. Data dan Hasil <i>Yield</i> Ekstrak <i>Spirulina</i> sp.	51
4. Data dan Hasil Total Karotenoid	55
5. Data dan Hasil Total <i>Yield</i> β -Karoten.....	61



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Mikroalga sebagai salah satu komoditi hasil perairan telah menjadi alternatif untuk dikembangkan karena memiliki potensi yang besar untuk dimanfaatkan sebagai pakan maupun pangan. Kebanyakan spesies mikroalga menghasilkan produk yang khas seperti karotenoid, antioksidan, dan asam lemak (Hossain *et al.*, 2008 dalam Darsi *et al.*, 2012). *Spirulina* sp. merupakan contoh mikroalga yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai sumber karotenoid terutama kandungan β -karoten. Menurut Dey dan Rathod (2013), pada *Spirulina* sp. kandungan β -karoten menunjukkan 67-79% dari total karotenoid yang setara dengan 53% lebih retinol dari jumlah yang terdapat dalam wortel. Meskipun mempunyai keuntungan, literatur yang berhubungan dengan *Spirulina* dan β -karoten masih sedikit dan sebagian besar mempelajari tentang kandungan dan ekstraksi β -karoten yang telah dilakukan pada mikroalga *Dunaliella salina*.

β -karoten merupakan senyawa biologis penting yang didistribusikan secara luas dalam buah-buahan dan sayuran. Hal ini dikonversi dalam tubuh manusia pada retinol (vitamin A) yang sangat penting untuk fungsi yang bagus untuk retina, kulit dan selaput lendir. Studi biologi menjelaskan bahwa asupan makanan β -karoten dapat mengurangi risiko kanker dan penyakit menular. β -karoten melindungi sel-sel tumbuhan, manusia dan hewan (sebagian besar selaput lendir dan kulit) dari sifat merusak akibat efek radiasi UV. β -karoten sebagai antioksidan juga dapat menonaktifkan bahaya radikal bebas sehingga memperlambat proses penuaan (Brabcová *et al.*, 2013).

Beberapa metode telah dilakukan untuk mengekstrak dan mengidentifikasi kandungan β -karoten. Metode ekstraksi yang umum digunakan

adalah metode maserasi. Maserasi adalah proses penyaringan dengan cara perendaman serbuk dalam air atau pelarut organik sehingga zat yang terkandung di dalamnya akan larut (Daud *et al.*, 2011). Menurut Wahyuni dan Simon (2015), ekstraksi konvensional memiliki kelemahan yaitu membutuhkan waktu yang lama dan suhu ekstraksi yang tinggi dengan hasil ekstrak rendah namun konsumsi energi tinggi sehingga diperlukan metode alternatif untuk mengekstrak karotenoid. Salah satu metode ekstraksi yang dapat digunakan untuk mengekstrak karotenoid adalah metode gelombang ultrasonik.

Hasil penelitian dari Wahyuni dan Widjanarko (2015), menyatakan bahwa waktu ekstraksi selama 25 menit memberikan hasil rendemen tertinggi. Hal ini dikarenakan ekstraksi selama 25 menit memberikan waktu yang cukup banyak bagi pelarut untuk menembus dinding sel dan menarik keluar senyawa-senyawa yang terkandung dalam bahan, sehingga dihasilkan rendemen dengan hasil yang tinggi. Ultrasonik memiliki kemampuan yang lebih cepat dan lebih sempurna dalam proses ekstraksi dibandingkan dengan metode maserasi dan soxhlet. Efek mekanis yang ditimbulkan oleh gelombang ultrasonik dapat meningkatkan kemampuan penetrasi pelarut ke dalam sel bahan sehingga meningkatkan jumlah komponen sel yang berdifusi ke dalam pelarut.

Berdasarkan informasi tentang studi kandungan β -karoten pada *Spirulina* sp. serta aktivitasnya yang belum banyak ditemukan. Maka dari itu perlu dilakukannya penelitian ini untuk mengoptimalkan hasil ekstraksi β -karoten dari mikroalga *Spirulina* sp. dengan menggunakan metode maserasi dan ultrasonik selama 24, 28, dan 32 menit.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstraksi dengan menggunakan metode dan waktu ekstraksi yang berbeda dapat memberikan pengaruh terhadap kandungan β -karoten dari mikroalga *Spirulina* sp.?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh penggunaan metode dan waktu ekstraksi yang berbeda terhadap ekstrak kasar *Spirulina* sp., *yield* ekstrak *Spirulina* sp., kandungan total karotenoid, kandungan total *yield* β -karoten, dan menentukan pola spektra senyawa β -karoten yang dihasilkan dari mikroalga *Spirulina* sp.

1.4 Hipotesis

H₀: Diduga waktu dan metode ekstraksi yang berbeda tidak memberikan pengaruh nyata terhadap kandungan β -karoten.

H₁: Diduga waktu dan metode ekstraksi yang berbeda memberikan pengaruh nyata terhadap kandungan β -karoten.

1.5 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan nilai tambah pada mikroalga *Spirulina* sp. serta mendapatkan ekstrak β -karoten dari waktu ekstraksi yang cepat dengan menggunakan metode maserasi dan ultrasonik.

1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dan analisis dilakukan di Laboratorium Penanganan Hasil Perikanan, Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang,

Laboratorium Fakultas MIPA Universitas Islam Negeri Malang, Laboratorium Bersama Universitas Negeri Malang dan Laboratorium Pakan Alami Balai Perikanan Budidaya Air Payau Situbondo. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April – Oktober 2015.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga

Mikroalga menawarkan berbagai kemungkinan yang besar pada isolasi zat alami untuk kepentingan komersial dalam industri seperti farmasi, pencernaan atau produk kosmetik. Fakta ini menjadikan bahan baku mikroalga mempunyai banyak nilai tambah. Dalam berbagai jenis mikroalga khususnya spesies laut mampu menghasilkan berbagai zat dengan berbagai sifat. Saat ini, permintaan masyarakat terhadap produk yang dibuat dengan bahan tambahan yang alami dimana sangat dimungkinkan sebagai manfaat yang penting untuk kesehatan manusia. Banyak dari produk ini dirancang untuk konsumsi langsung manusia dan teknik ekstraksi sangat penting dalam menerapkan teknologi yang tepat (Shánchez et al., 2009).

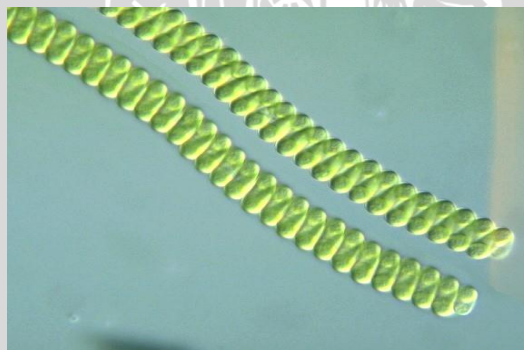
Mikroalga merupakan tumbuhan bersel tunggal yang berkembang biak sangat cepat dengan daur hidup relatif pendek. Selain memiliki laju pertumbuhan yang sangat cepat, mikroalga juga memiliki senyawa metabolit yang dapat dijadikan sebagai alternatif pangan yang dapat bersaing dengan produk pertanian dalam mengatasi lahan yang semakin terbatas (Panggabean, 1998). Mikroalga dapat tumbuh jauh lebih cepat dengan hanya membutuhkan media tumbuh yang lebih sedikit (Widjaja, 2009). Mikroalga biasanya menggandakan dirinya sekitar 24 jam sekali, namun pada fase eksponensial biasanya lebih singkat yaitu hanya 3,5 jam sekali (Chisti, 2007 *dalam* Darsi et al., 2012).

Mikroalga sebagai salah satu komoditi hasil perairan telah menjadi alternatif untuk dikembangkan karena memiliki potensi yang besar untuk dimanfaatkan sebagai pakan maupun pangan. Kebanyakan spesies mikroalga menghasilkan produk yang khas seperti karotenoid, antioksidan, dan asam lemak

(Hossain *et al.*, 2008 dalam Darsi *et al.*, 2012). *Spirulina* sp. merupakan contoh mikroalga yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai sumber karotenoid terutama kandungan β -karoten.

2.2 *Spirulina* sp.

Spirulina sp. adalah mikroalga bersel tunggal yang termasuk dalam golongan cyanobacterium mikroskopik berfilamen. *Spirulina* sp. merupakan biomassa yang dikeringkan dari *Arthrospira platensis*, yaitu suatu bakteri yang dapat berfotosintesis dan dapat ditemukan di seluruh dunia baik pada air tawar maupun air laut. *Spirulina* sp. dapat hidup berkoloni pada lingkungan yang ekstrim yang tidak cocok untuk organisme lain. *Spirulina* sp. memiliki lebar spiral antara 26-36 μm dan panjang spiralnya antara 43-57 μm (Yudiati *et al.*, 2011). Bentuk tubuh *Spirulina* sp. yang menyerupai benang merupakan rangkaian sel yang berbentuk silindris dengan dinding sel yang tipis dengan berdiameter 1 – 12 μm (Hariyati, 2009). Bentuk morfologi dari *Spirulina* sp. dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. *Spirulina* sp.

Spirulina sp. adalah mikroalga yang termasuk dalam kelas cyanobacterium yang dapat dikonsumsi oleh manusia dan hewan lainnya. *Spirulina* sp. digunakan sebagai suplemen makanan dan juga digunakan sebagai suplemen pakan dalam budidaya dan peternak unggas (Pulz dan Gross, 2004).

Spirulina sp. menonjol sebagai sumber penting dari pigmen yang mempunyai nilai komersial yang besar. Pigmen utama saat ini adalah β -karoten. β -karoten adalah prekursor vitamin A dan memiliki banyak manfaat kesehatan. Selain itu, β -karoten adalah antioksidan yang kuat dan pelindung sel yang dapat membantu tubuh manusia dalam banyak cara (Shao *et al.*, 2015).

Menurut Bold dan Wyne (1978), *Spirulina* sp. secara taksonomi diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Protista
Divisi : Cyanophyta
Kelas : Cyanophytaeae
Ordo : Nostocales
Famili : Pseudanabaenaceae
Genus : *Spirulina*
Spesies : *Spirulina* sp.

Spirulina sp. secara alami hidup di perairan tawar hingga salinitas tinggi (salinitas 15–30 ppt). Mikroalga jenis ini termasuk mikroalga yang mudah untuk dibudidayakan karena budidayanya dapat dilakukan di dalam maupun di luar ruangan dan pemanenannya mudah dilakukan (Babadzhanov *et al.*, 2004). *Spirulina* sp. termasuk salah satu jenis mikroalga yang banyak dikultur dan dijual secara komersial dalam bentuk kering sebagai makanan suplemen. Mikroalga ini mempunyai kandungan nutrisi yang tinggi, yaitu: kadar protein 55-70%, karbohidrat 15-25%, asam lemak esensial 18%, dan sisanya adalah vitamin, mineral serta pigmen, yaitu: klorofil, karoten, xantofil dan fikosianin (Sanchez *et al.*, 2003 dalam Sedjati *et al.*, 2012).

Menurut Kanibawa (2006), kandungan karotenoid *Spirulina* sp. dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel1. Kandungan Karotenoid *Spirulina* sp. (mg/10g) biomasa

Jenis Pigmen	Persentase (%)
B-Karoten	15
Echinenone	11-13
B-Cryptoxanthin	6-8
Zeaxanthin	25
Diatoxanthin	5
Canthaxanthin	5
Myxoxanthophyll	13-17
Ocillaxanthin	3-5

Sumber: Kabinawa (2006).

2.2.1 Kultivasi Mikroalga *Spirulina* sp.

Kultur mikroalga adalah suatu proses penumbuhan mikroalga dengan berbagai skala dan dengan pengkodisian yang terkontrol dan aseptik. Beberapa pengkondisian perlu dilakukan tergantung skala yang akan digunakan. Misalnya pemilihan media yang sesuai untuk laju pertumbuhan mikroalga, nutrisi yang diperlukan mikroalga untuk tumbuh dan juga faktor biaya yang perlu diperhatikan dalam penumbuhan mikroalga (Mulyanto, 2010).

Terdapat faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga seperti faktor abiotik yang meliputi cahaya matahari, temperatur, nutrisi, O₂, CO₂, pH, dan salinitas. Faktor biotik seperti bakteri, jamur, virus, dan kompetisi dengan mikroalga lain. Selain itu pertumbuhan mikroalga dipengaruhi faktor yang meliputi cara pengkulturan dan cara pemanenan (Harun *et al.*, 2010).

Menurut Balai Perikanan dan Budidaya Air Payau Situbondo (2015), kultur *Spirulina* sp. dapat dilakukan dengan mudah dan dengan menggunakan alat yang sederhana. Kultur *Spirulina* sp. dilakukan dengan beberapa tahapan diantaranya adalah tahapan kultur laboratorium, kultur intermediete, dan kultur masal.

2.2.1.1 Kultur Laboratorium

Kultur agar atau kultur di *plate/petridish* dilakukan tanpa aerasi. Kultur agar diawali dengan sterilisasi alat dan pembuatan media agar yang sudah diberi

pupuk PA (*Pro Analis*) kemudian disterilisasi menggunakan *Autoclave* kemudian dituang ke *petridish* steril $\frac{3}{4}$ bagian. Setelah media agar membeku dilakukan inokulasi menggunakan metode gores. *Spirulina* sp. yang ditanam akan tumbuh setelah satu minggu. Selanjutnya dilakukan kultur *test tube* tanpa menggunakan aerasi.

Kultur *test tube* tanpa menggunakan aerasi dilakukan dengan memindahkan koloni mikroalga yang telah tumbuh ke kulturan *test tube*, yaitu dengan memupuk media steril dengan dosis 1ml/liter. Pupuk yang digunakan adalah pupuk PA. *Spirulina* sp. menggunakan pupuk walne. Sebelum melakukan kultur terlebih dahulu diambil satu koloni dari media agar dan diberi air laut steril kemudian dicek di bawah mikroskop, apabila steril tidak ada kontaminasi maka dikultur di *test tube*. Sebuah *test tube* diberi media air laut steril yang sudah dipupuk $\frac{3}{4}$ bagian kemudian ditambahkan dengan bibit satu koloni. Mikroalga akan tumbuh minimal 7 hari. Hasil kulturan *test tube* selanjutnya dapat dijadikan bibit (*starter*) pada kultur erlenmeyer tanpa aerasi yaitu dengan menyiapkan media air laut yang sudah dipupuk dengan dosis 1 mL/liter kemudian ditambahkan bibit *Spirulina* sp. dengan lama kulturan 6 – 7 hari. Selanjutnya dilakukan kultur erlenmeyer dengan menggunakan aerasi.

Kultur erlenmeyer skala 1 – 2 liter dengan menggunakan toples dilakukan dengan menggunakan aerasi. Kultur ini dilakukan dengan sterilisasi media pertumbuhan mikroalga dengan cara direbus hingga mendidih kemudian dituang ke dalam wadah dan ditutup rapat. Setelah media air laut dingin, kemudian dilengkapi dengan peralatan aerasi dan dipupuk dengan dosis 1 mL/liter (PA), perbandingan bibit dan media adalah 3 : 7. Suhu media pertumbuhan mikroalga dipertahankan pada suhu 25⁰ C dan penyinaran menggunakan lampu TL 40 Watt sebanyak dua buah serta diikubasi selama 5 – 7 hari. Selanjutnya dilakukan kultur carboy dengan menggunakan aerasi.

Kultur carboy/stoples 10 liter menggunakan aerasi dilakukan dengan sterilisasi media pertumbuhan mikroalga dengan menggunakan kaporit 10 ppm dan dinetralkan dengan thiosulfat ≤ 5 ppm. Setelah media pertumbuhan netral, kemudian media dipupuk dengan dosis 1 mL/liter (PA), perbandingan bibit dan media adalah 3 : 7. Suhu media pertumbuhan mikroalga dipertahankan pada suhu 25° C dan penyinaran menggunakan lampu TL 40 Watt sebanyak dua buah serta diinkubasi selama 5 – 7 hari. Selanjutnya hasil dari kultur carboy digunakan untuk starter pada kultur intermediet.

2.2.1.2 Kultur Intermediet

Kultur intermediet adalah kultur dengan aquarium 100 liter dan kultur conicel 500 liter – 1 ton dilakukan dengan sterilisasi air laut menggunakan kaporit 10 ppm selama 24 jam dan dinetralkan dengan thiosulfat 5ppm. Sebelum dilakukan pemberian bibit terlebih dahulu diberi pupuk walne TG (*Tehnicall Growth*) dengan dosis 1 ml/l. Perbandingan penggunaan bibit dan media adalah 3 : 7. Kultur dilakukan pada ruangan *outdoor* dengan atap fiber tembus cahaya matahari dan lama inkubasi 5 – 7 hari. Hasil dari kultur intermediet ini kemudian dapat dikeringkan dan dibuat untuk tepung mikroalga.

2.2.2 Pemanenan Mikroalga

Teknik yang dapat digunakan untuk proses pemanenan mikroalga meliputi flokulasi, sentrifugasi, dan filtrasi. Flokulasi merupakan proses partikel zat terlarut dalam larutan membentuk agregat yang disebut flok. Sel mikroalga umumnya berukuran 5 – 50 μm . Sel mikroalga dapat membentuk suspensi cukup stabil dengan bahan kimia yang memiliki muatan negatif pada permukaannya. Sentrifugasi merupakan proses pemisahan yang menggunakan gaya sentrifugal sebagai driving force untuk memisahkan padatan dan cairan. Proses pemisahan tersebut didasarkan pada ukuran partikel dan perbedaan densitas dari komponen yang akan dipisahkan.

Filtrasi merupakan proses pemanenan mikroalga dengan ukuran sel yang besar. Proses ini tidak cocok digunakan untuk pemanenan mikroalga yang memiliki ukuran sel yang kecil. Untuk proses pemanenan *Spirulina* sp. sendiri dilakukan dengan menggunakan kain saring dan dengan mengurangi asupan CO₂. Proses ini dilakukan karena lebih murah untuk digunakan dalam skala besar (Handayani dan Dessy, 2012). Selanjutnya hasil dari pemanenan mikroalga tersebut dikeringkan dan dibuat tepung mikroalga.

Pembuatan *Spirulina* sp. powder dilakukan dengan cara memanen mikroalga dengan cara penyaringan. Setelah disaring diletakkan ke nampan untuk dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40^o C atau diangin-anginkan dengan tidak boleh terkena matahari langsung. Setelah dikeringkan diblender dan diayak 60 mesh partikel powder mikroalga.

2.3 Karotenoid

Karotenoid merupakan pigmen alami tumbuhan yang menghasilkan warna merah, kuning, orange, dan hijau tua pada buah dan sayuran. Warna-warna terlihat pada buah dan sayuran disebabkan oleh adanya ikatan rangkap dua terkonjugasi dari karotenoid yang menyerap cahaya (Hock-Eng *et al.*, 2011). Semakin banyak ikatan ganda terkonjugasi, maka makin pekat warna pada karotenoid tersebut yang mengarah ke warna merah (Heriyanto, 2009 *dalam* Tungriani *et al.*, 2012).

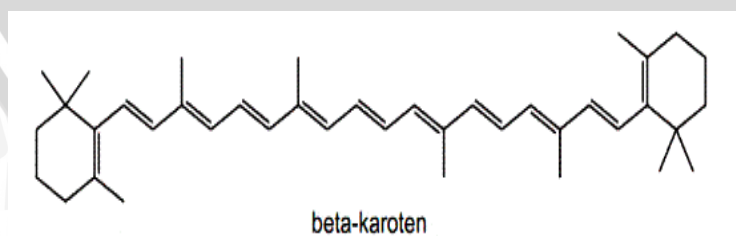
Karotenoid secara alami ditemukan di berbagai buah-buahan, sayuran, tanaman, alga dan bakteri. Karotenoid tidak hanya penting untuk kesehatan manusia tetapi juga efektif mencegah kanker, memperpanjang usia, penghambat maag, mencegah serangan jantung dan penyakit arteri koroner. Karotenoid bertindak sebagai antioksidan melalui mekanisme radikal bebas dengan menghambat oksigen tunggal dan oksidasi pada spesies dalam pencegahan

kerusakan sel. Karotenoid tertentu adalah kepentingan akademis dan praktis tidak hanya cukup karena kelimpahannya di alam tetapi juga nilai ekonomi tinggi sebagai pigmen dalam pakan ikan (Sivathanua dan Palaniswamy, 2012).

Karotenoid adalah pigmen alami yang dikenal dengan sifat antioksidannya serta untuk efek protektif yang lain pada tubuh manusia. Karotenoid dilaporkan dapat menunjukkan aktivitas *scavenging* oksigen, sehingga melindungi sel terhadap bahaya yang disebabkan oleh radikal bebas. β -karoten, zeaxanthin, astaxanthin, dan canthaxanthin adalah contoh penting dari karotenoid yang semuanya didokumentasikan dengan baik karena sebagai kebutuhan komersial (Roberts *et al.*, 2009 dalam Singh *et al.*, 2015).

2.4 β -karoten

β -karoten merupakan salah satu bentuk sederhana dari karotenoid yang memiliki rumus molekul $C_{40}H_{56}$. β -karoten memiliki 1 ikatan rangkap yang merupakan pigmen warna orange dan dapat ditemukan dalam buah-buahan serta sayuran. β -karoten bisa berikatan dengan klorofil maupun xantofil pada buah dan sayuran yang akan menyerap cahaya dalam spektrum cahaya orange atau merah dan akan menimbulkan warna hijau, ungu atau biru (Hock-Eng, *et al.*, 2011 dalam Tungriani *et al.*, 2012). Struktur molekul β -karoten dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur Molekul β -karoten

β -karoten banyak digunakan dalam makanan, industri farmasi dan kosmetik sebagai pewarna, antioksidan dan zat anti-inflamasi. Kisaran spektrum dari β -karoten meliputi warna kuning, oranye serta merah. Oleh karena itu, pewarna alami ini dapat menggantikan pewarna sintetis berbahaya seperti Tartrazine (E102), Sunset Yellow (E110), Erythrosine (E127) Allura Red dan (E129) (Mortensen, 2006). Selain itu, aktivitas antioksidan yang signifikan oleh β -karoten dapat menggantikan antioksidan sintetis seperti BHA dan BHT. (Ribeiro *et al.*, 2011 dalam Kyriakopoulou *et al.*, 2014).

β -karoten merupakan senyawa biologis penting yang didistribusikan secara luas dalam buah-buahan dan sayuran. Hal ini dikonversi dalam tubuh manusia pada retinol (vitamin A) yang sangat penting untuk fungsi yang tepat dari retina, kulit dan selaput lendir. Studi biologi telah menunjukkan bahwa asupan makanan β -karoten dapat mengurangi resiko kanker dan penyakit menular. β -karoten melindungi sel-sel tumbuhan, manusia dan hewan (sebagian besar selaput lendir dan kulit) dari sifat merusak efek dari radiasi UV. Sebagai antioksidan menonaktifkan radikal bebas berbahaya, sehingga memperlambat proses penuaan (Brabcová *et al.*, 2013).

2.5 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan dengan pelarut yang melibatkan perpindahan zat terlarut ke dalam pelarut untuk memperoleh ekstrak. Ekstraksi dapat dilakukan ekstraksi secara bertingkat dimulai dari pelarut non polar, lalu dengan pelarut semipolar dan polar sehingga diperoleh ekstrak yang mengandung senyawa nonpolar, semipolar, dan polar (Siregar *et al.*, 2013). Prinsip kerja ekstraksi pelarut adalah nilai kelarutan suatu komponen terhadap pelarutnya. Sedangkan prinsip ekstraksi mekanis adalah berdasarkan pada perbedaan tekanan (Putri *et al.*, 2014).

Metode yang dipilih dalam ekstraksi dapat berpengaruh terhadap sifat fisikokimia dari ekstrak yang dihasilkan. Ekstraksi dengan pelarut organik yaitu maserasi, *digestion*, dan perkolasi. Proses maserasi meliputi proses penghancuran sampel, perendaman dengan pelarut dalam waktu tertentu, dan penyaringan atau pengepresan hingga diperoleh cairan. Proses *digestion* meliputi pemanasan pada suhu dan waktu tertentu. Proses perkolasi merupakan teknik ekstraksi dengan menggunakan aliran pelarut dengan pemanasan atau tanpa pemanasan (Septiana dan Asnani, 2012).

Secara tradisional, ekstraksi berbagai senyawa bioaktif dari produk alami telah dilakukan di banyak industri menggunakan pelarut yang berbeda. Metode ekstraksi konvensional seperti maserasi dan ekstraksi soxhlet memiliki banyak kelemahan seperti penggunaan pelarut dalam jumlah besar, waktu ekstraksi yang lama dan hasil ekstraksi yang lebih rendah. Namun di antara semua teknik baru ekstraksi, ultrasonik adalah pengganti teknik ekstraksi tradisional yang murah dan sederhana. Aplikasi dari ekstraksi menggunakan ultrasonik adalah untuk ekstraksi lipid, protein, flavonoid, karotenoid, hemiselulosa, triterpenoid dan senyawa aromatik (Dey dan Rathod, 2013).

2.5.1 Maserasi

Metode maserasi merupakan cara ekstraksi sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk sampel dalam pelarut organik selama satu hari pada temperatur kamar dan terlindungi dari cahaya. Maserasi dapat menggunakan metanol secara langsung, kemudian partisi dilakukan dengan pelarut yang ditingkatkan kepolarannya (Harborne, 1987).

Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara

larutan zat aktif didalam sel dengan yang diluar sel, maka larutan pekat didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan diluar sel dan didalam sel (Octaviani *et al.*, 2015).

Pada proses ekstraksi terjadi dua fase yaitu fase pembilasan dan fase ekstraksi. Fase pembilasan merupakan fase dimana sel-sel yang rusak atau tidak utuh lagi dari simplisia bersentuhan langsung dengan pelarut sehingga komponen di dalam sel semakin mudah untuk berpindah ke dalam pelarut. Semakin halus serbuk simplisia semakin optimal proses pembilasannya. Fase ekstraksi merupakan fase dimana cairan pelarut menembus membran sel yang masih utuh sehingga terjadi pembengkakan pada sel dan disolusi komponen sel ke cairan pelarut yang berhasil masuk, dengan adanya perbedaan konsentrasi antara pelarut di dalam sel dan di luar sel maka akan terjadi difusi (Voigt, 1995).

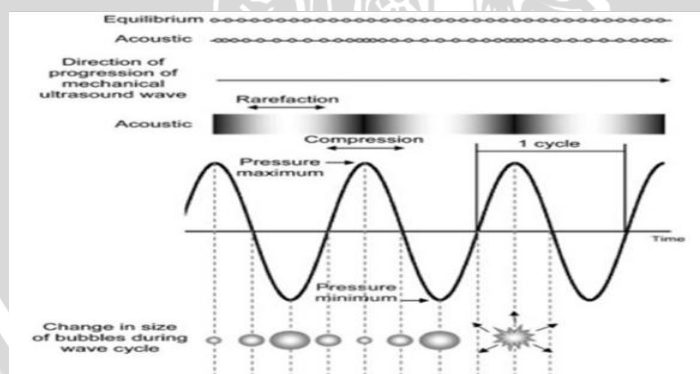
2.5.2 Ultrasonik

Ultrasonik merupakan salah satu metode ekstraksi menggunakan gelombang suara untuk merusak dinding dan menghasilkan rongga pada material tumbuhan sehingga mempermudah masuknya komponen. Masuknya komponen pelarut menyebabkan terjadinya kontak antara pelarut dan senyawa bioaktif sehingga terjadi transfer massa. Sehingga ekstraksi dengan menggunakan metode ultrasonik dapat meningkatkan *yield* ekstraksi, meningkatkan kecepatan ekstraksi, menurunkan waktu dan menurunkan suhu maupun volume pelarut yang dapat membantu dalam ekstraksi senyawa yang labil terhadap panas (Dey dan Rathod, 2013).

Ekstraksi menggunakan ultrasonik telah terbukti secara signifikan mengurangi waktu ekstraksi dan meningkatkan hasil ekstraksi dalam banyak bahan sayuran (Ma *et al.*, 2008). Penerapan ultrasonik dalam industri makanan dapat dibagi menjadi dua kategori yang berbedadari intensitas rendah frekuensi tinggi ($f > 100\text{kHz}$) dan intensitas tinggi frekuensi rendah ($20\text{ kHz} \leq f < 100\text{kHz}$).

Ultrasonik dengan intensitas rendah tidak mengubah sifat fisik dan kimia dari bahan di mana gelombang ultrasonik merambat. Gelombang dengan intensitas getaran tinggi menghasilkan tekanan, perpindahan dan peningkatan suhu yang kuat karena gelembung kavitasi merangsang sebagian besar efek ultrasonik dalam material yang dapat menghasilkan pengaruh pada fisik, kimia dan mekanis (Plaza *et al.*, 2012).

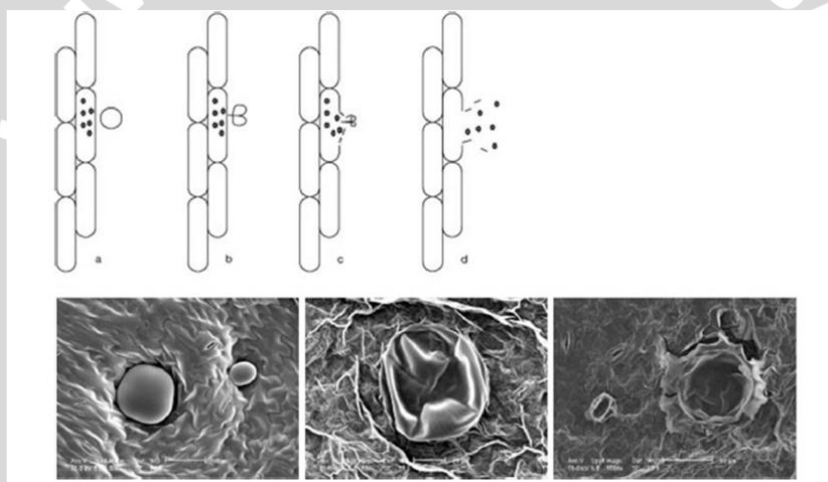
Ekstraksi ultrasonik telah banyak digunakan untuk ekstraksi bahan gizi, seperti lemak, protein, flavoring, minyak esensial, dan senyawa bioaktif seperti, flavonoids, karotenoid, dan polisakarida. Kavitasi merupakan faktor utama yang menyebabkan peningkatan ekstraksi. Kavitasi merupakan pembentukan gelembung uap kecil dan pecahnya gelembung tersebut didalam sebuah cairan yang teradiasi oleh gelombang ultrasonik. Jika energi gelombang melalui jaringan maka akan melepaskan energi kalor. Kavitasi ini yang dapat menyebabkan suhu tinggi lokal, tekanan lokal tinggi, dan radikal bebas, yang dapat mempercepat atau memicu reaksi kimia senyawa yang diekstrak (Sun *et al.*, 2011). Kavitasi ultrasonik ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Kavitasi Ultrasonik (Pivo, 2013)

Ultrasonik memiliki cara kerja dengan mentransmisikan suara melalui cairan sebagai suatu gelombang yang terdiri dari penekanan (*alternating compression*) dan siklus pemecahan (*rarefaction cycles*). Sumber gelombang (*transducer*) sebagai piston direndam dalam cairan dan dioperasikan dengan

sangat kecil tetapi keras. Tekanan gelombang dapat dianalogikan sebagai pukulan ke medium yang ditransmisikan oleh interaksi molekular melalui cairan. Reaksi ini merupakan pukulan yang dapat menghasilkan pemecahan gelombang. Ketika piston telah dioperasikan pada 20.000 pukulan per detik maka *ultrasound* dihasilkan dalam media. Jika pemecahan gelombang cukup kuat, kekuatan ini dapat meningkatkan tekanan negatif yang cukup besar untuk melewati kekuatan intermolekular mengikat cairan. Molekul tersebut akan membentuk bagian satu dengan yang lain menjadi gelembung-gelembung kecil melalui medium (Mason, 1990).



Gambar 4. *Cavitation bubble* Merusak dan Membebaskan Senyawa Aktif Sel (Pico, 2013)

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi mikroalga *Spirulina* sp. yang mana bibit dan proses kultur dilakukan di Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo, n-heksan PA (*Pro Analysis*), metanol PA, dietil eter PA, silica gel F-254, pasir laut, plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT), petroleum eter PA, aseton PA, dan Na_2SO_4 . Bahan-bahan lain yang digunakan kertas saring kasar dan halus, kapas, air, aluminium foil, *cling wrap*, dan kertas Whatman No. 42.

3.1.2 Peralatan Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah ultrasonik (Restsch Ultrasonic Baths), timbangan digital, botol timbang, sendok bahan, timbangan analitik, oven, desikator, sendok bahan, gelas ukur (ukuran 250 mL dan 100 mL), beaker glass (ukuran 1000 mL, 250 mL, 100 mL, dan 50 mL), spatula, erlenmeyer (ukuran 500 mL dan 250 mL), corong kaca, labu pemisah (corong pisah), *rotary vacuum evaporator*, *freezer*, statif, kromatografi kolom, *magnetic stirrer*, *hot plate*, tabung gas Nitrogen (N_2), pipet tetes, pipet volume (ukuran 1 mL dan 10 mL), bola hisap, pipa kapiler, cuvet, botol sampel (ukuran 100 mL dan 15 mL), tabung reaksi, rak tabung reaksi, mikro pipet (ukuran 0,1 mL), sentrifuse, spektrofotometer UV-Vis merk pharo 300, dan scanning electron microscope (SEM) merk FCI tipe inspect S25.

3.1.3 Metode Penelitian

Metode penelitian ini menggunakan metode eksperimen. Metode eksperimen digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap perlakuan yang lain dengan kondisi terkontrol. Metode eksperimen merupakan metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap faktor lain dalam kondisi yang dikendalikan. Metode eksperimen biasanya diterapkan didalam laboratorium dan terdapat perlakuan (*treatment*) tertentu (Sugiyono, 2014). Metode eksperimen dilakukan untuk mengetahui sebab dan akibat dua variabel atau lebih dengan mengendalikan pengaruh dari variabel lain. Metode ini dilakukan dengan memberikan variabel bebas secara sengaja kepada objek penelitian secara sengaja pada objek penelitian untuk diketahui akibatnya dalam variabel terikat

Penelitian ini dilakukan dengan memberi variabel bebas secara sengaja dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh penggunaan metode dan waktu ekstraksi *Spirulina* sp. pada variabel terikat. Adapun variabel-variabel dalam penelitian ini sebagai berikut:

- Variabel bebas: penggunaan metode ekstraksi dan waktu ekstraksi.
- Variable terikat: kandungan β -karoten meliputi ekstrak *Spirulina* sp., *yield* ekstrak *Spirulina* sp., total karotenoid, dan total *yield* β -karoten.

Penelitian ini dilakukan dengan melalui beberapa tahap. Tahap pertama adalah dilakukan proses kultur mikroalga *Spirulina* sp. hingga proses pemanenan, pengeringan, dan pembuatan tepung mikroalga. Kemudian *Spirulina* sp. kering diisolasi dengan kromatografi kolom untuk memperoleh isolat β -karoten dan menggunakan KLT untuk mengetahui senyawa β -karoten serta menentukan pola spektra menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui panjang gelombang optimum. Selanjutnya uji *Scanning Electron*

Microscoe (SEM) untuk mengetahui perubahan permukaan sel *Spirulina* sp. ketika ekstraksi.

3.2 Perlakuan dan Rancangan Percobaan

3.2.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian tahap pertama atau penelitian pendahuluan dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan ekstrak terbaik dari mikroalga *Spirulina* sp. dengan waktu ekstraksi dengan metode ultrasonik yang digunakan. Penelitian tahap pertama dilakukan terhadap mikroalga *Spirulina* sp. kering sebagai sampel bahan baku dimana menggunakan pelarut n-heksan PA dengan metode dan waktu ekstraksi yang berbeda untuk mendapatkan hasil ekstrak *Spirulina* sp. terbaik berdasarkan rendemen tertinggi dan dilanjutkan pada penelitian utama.

Perlakuan percobaan yang diterapkan dalam penelitian pedahuluan ini adalah massa mikroalga *Spirulina* sp. sebesar 10 g. Penggunaan massa sampel berdasarkan penelitian Wahyuni dan Widjanarko (2015) yang menggunakan sampel sebanyak 10 g untuk mendapatkan total karatenoid sebesar 15,01%. Sedangkan waktu yang digunakan adalah 24 menit dan 28 menit. Penggunaan waktu pada penelitian pendahuluan ini berdasarkan pada penelitian Dey dan Rathod (2013) yang menyatakan bahwa pada waktu ekstraksi 8 menit hingga 22 menit *yield* yang dihasilkan tidak mengalami perbedaan yang signifikan, serta didasarkan pada penelitian Wahyuni dan Widjanarko (2015) dengan menggunakan waktu ekstraksi 25 menit adalah perlakuan terbaik untuk mendapatkan total karatenoid sebesar 15,01%.

3.2.2 Penelitian Utama

Penelitian tahap kedua ini merupakan tahap penelitian utama yang dilakukan berdasarkan hasil yang terbaik dari penelitian tahap pertama. Pada penelitian utama bertujuan untuk mengetahui waktu yang terbaik dalam ekstraksi ultrasonik dari hasil yang dilakukan pada penelitian pendahuan. Berdasarkan

perlakuan percobaan yang diterapkan maka penelitian ini dirancang dengan model Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial. Faktor atau variabel yang digunakan adalah metode dan waktu ekstraksi. Metode ekstraksi menggunakan ultrasonik dan maserasi sedangkan waktu ekstraksi selama 24 menit, 28 menit, dan 32 menit. Faktor tersebut dilakukan dengan tiga kali ulangan. Penentuan ulangan ini dapat diketahui melalui persamaan :

$$(R \times T - 1) - (t - 1)$$

Dimana : t = Perlakuan
r = Ulangan

Menurut Sastrosupadi (1999) bentuk umum rancangan acak lengkap adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + T_j + \epsilon_{ij}$$

Dimana :

Y_{ij} = respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-I pada ulangan ke-j

μ = nilai tengah umum

T_j = pengaruh perlakuan ke-i

ϵ_{ij} = pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-I pada ulangan ke-j

Model rancangan percobaan pada tahap penelitian utama dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Model Rancangan Percobaan Penelitian Utama

Perlakuan		Ulangan			Total	Rerata
Metode Ekstraksi	Waktu Ekstraksi	1	2	3		
U	24	U24 (1)	U24 (2)	U24 (3)		
	28	U28 (1)	U28 (2)	U28 (3)		
	32	U32 (1)	U32 (2)	U32 (3)		
M	24	M24 (1)	M24 (2)	M24 (3)		
	28	M28 (1)	M28 (2)	M28 (3)		
	32	M32 (1)	M32 (2)	M32 (3)		

Keterangan:

U = Metode ekstraksi ultrasonik

M = Metode ekstraksi maserasi

24 = Waktu ekstraksi 24 menit

28 = Waktu ekstraksi 28 menit

32 = Waktu ekstraksi 32 menit

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini kemudian dilakukan analisis sidik ragam (ANOVA) untuk mengetahui besarnya nilai F menggunakan Ms. Office Excel 2013. Jika hasil analisis keragaman menunjukkan adanya perbedaan pada taraf 5% maka dilanjutkan dengan uji BNT 5% dan uji Duncan menggunakan Ms. Office Excel 2013.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pengujian Kadar Air (Sudarmadji *et al.*, 2003)

Pengujian kadar air yang dilakukan berdasarkan metode *Thermogravimetri* (Sudarmadji *et al.*, 2003). Prinsip pengujian kadar air dengan *Thermogravimetri* adalah dengan menguapkan air yang ada dalam bahan dengan pemanasan kemudian ditimbang bahan tersebut hingga memiliki berat konstan. Pengujian kadar air dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

- Mengoven botol timbang dengan suhu 105⁰ C selama 24 jam.
- Menimbang botol timbang dengan timbangan sartorius dan catat sebagai berat A.
- Menimbangan sampel ekstrak *Spirulina* sp. sebanyak ± 2 g dan catat sebagai berat B.
- Memasukkan sampel ke dalam botol timbang dan dioven selama 2 jam.
- Menimbang sampel dan botol timbang dengan timbangan sartorius dan catat sebagai berat C.
- Setelah mengetahui nilainya, lakukan perhitungan persentase kadar air dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{(A+B)-(C)}{B} \times 100\%$$

Keterangan:

A = berat botol timbang (g)

B = berat sampel (g)

C = berat akhir (botol timbang+sampel) (g)

3.3.2 Saturasi garam

Saturasi garam dilakukan dengan menghomogenkan kristal garam kedalam air hingga garam jenuh. Kejenuhan larutan garam ditandai dengan sudah tidak larutnya lagi kristal garam dalam larutan garam. Larutan garam disaring hingga dua kali dengan menggunakan lapisan kertas saring kasar, halus, dan kapas untuk menyaring kotoran pada larutan garam dan menjernihkannya. Saturasi garam ini digunakan untuk bahan saat partisi (fraksinasi) ekstrak pada *Spirulina* sp.

3.3.3 Ekstraksi Mikroalga

3.3.3.1 Ekstraksi Metode Ultrasonik (Da Costa *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013 dan Luengo *et al.*, 2014 termodifikasi)

Prinsip ekstraksi dengan metode ultrasonik adalah dengan perambatan energi melalui gelombang ultrasonik dengan menggunakan cairan sebagai media perambatan yang dapat meningkatkan intensitas perpindahan energi. Ekstraksi *Spirulina* sp. dengan metode ultrasonik dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

- Menimbang *Spirulina* sp. serbuk sebanyak 12 g dan teteskan larutan metanol secukupnya.
- Melarutkan sampel dengan pelarut n-heksan sebanyak 120 mL.
- Mengekstraksi sampel dengan alat ultrasonik pada frekuensi 40 kHz dan amplitudo 54 μ m selama 24, 28, dan 32 menit.
- Mensentrifuse ekstrak *Spirulina* sp. dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit dan saring dengan menggunakan kertas whatman No. 42.
- Mempartisi filtrat dengan menggunakan dietil eter : saturasi garam : air (100 mL : 50 mL : 120 mL : 10 mL).

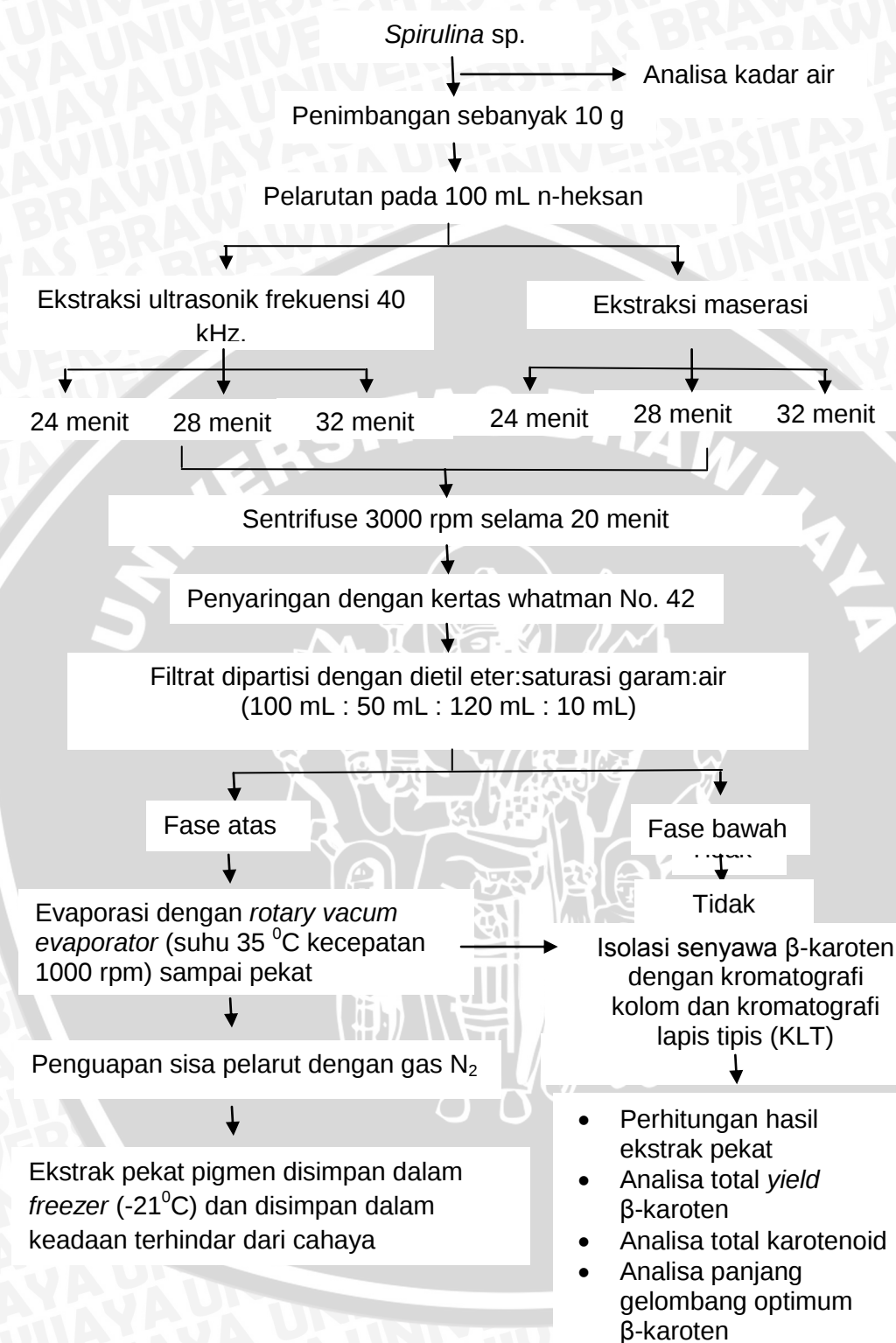
- Mengevaporasi fase atas hasil partisi dengan *vacum evaporator* dengan pada suhu 35° C dengan kecepatan 1000 rpm sampai pekat.
- Menguapkan sisa pelarut dengan gas nitrogen.
- Penyimpanan ekstrak pekat pigmen pada *freezer* (-21° C) dan dalam keadaan terhindar dari cahaya.

3.3.3.2 Ekstraksi Metode Maserasi

Prinsip ekstraksi dengan metode maserasi adalah pengikatan atau pelarutan zat aktif berdasarkan sifat kelarutannya dalam suatu pelarut (*like dissolved like*), dimana penyarian zat aktif yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut yang sesuai. Ekstraksi *Spirulina* sp. dengan metode maserasi dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

- Menimbang *Spirulina* sp. serbuk sebanyak 12 g dan teteskan larutan metanol secukupnya.
- Melarutkan sampel dengan pelarut n-heksan sebanyak 120 mL.
- Mengekstraksi sampel dengan *magnetic stirer* selama 24, 28, dan 32 menit.
- Mensentrifuse ekstrak *Spirulina* sp. dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit dan disaring dengan menggunakan kertas whatman No. 42.
- Mempartisi filtrat dengan menggunakan dietil eter : saturasi garam : air (100 mL : 50 mL : 120 mL : 10 mL).
- Mengevaporasi fase atas hasil partisi dengan *vacum evaporator* dengan pada suhu 35° C dengan kecepatan 1000 rpm sampai pekat.
- Menguapkan sisa pelarut dengan gas nitrogen.
- Penyimpanan ekstrak pekat pigmen pada *freezer* (-21° C) dan dalam keadaan terhindar dari cahaya.

Diagram alir ekstraksi *Spirulina* sp. dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Diagram alir ekstraksi *Spirulina* sp.

3.3.4 Isolasi Senyawa β -Karoten Ekstrak *Spirulina* sp. (Wahyuni dan Widjanarko, 2015 termodifikasi)

Prinsip dari kromatografi kolom adalah suatu teknik pemisahan molekul berdasarkan perbedaan pola pergerakan antara fase gerak dan fase diam untuk memisahkan komponen yang berada pada larutan. Isolasi β -karoten menggunakan kromatografi kolom dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

1. Preparasi Kromatografi Kolom

- Menimbangan silica gel F-254 sebagai fase diam sebanyak 20 g dan fase gerak petroleum eter (PE) sebanyak 100 mL.
- Menstirer silica gel selama satu jam dengan 45 menit pertama menggunakan kecepatan 1300 rpm, 1100 rpm, 900 rpm. Kecepatan tersebut diubah setiap 15 menit sekali dan 15 menit terakhir kecepatan diubah sari 700 rpm, 500 rpm, 300 rpm, dan 250 rpm setiap 5 menit.
- Menyumbat bagian bawah kolom dengan kapas yang telah dibasahi dengan fase gerak $\pm 1,5$ cm.
- Mengisikan kolom dengan silica gel yang telah dipreparasi sebanyak $\frac{3}{4}$ bagian kolom dengan sendok secara terus menerus dan ratakan dengan cara diketuk-ketuk perlahan agar silica gel tidak mengalami keretakan dan tidak bergelembung.
- Menutup ujung atas dan bawah kolom dengan plastik wrap dan ikat dengan tali untuk menghindari penguapan pelarut.
- Silica gel dalam kolom biarkan selama 12 jam agar dapat memadat.

2. Proses Isolasi Kromatografi Kolom

- Setelah 12 jam, tambahkan pasir laut sebagai fase diam sebanyak ± 3 g untuk memisahkan senyawa yang berukuran besar.
- Melarutkan ekstrak pekat *Spirulina* sp. $\pm 0,2$ g ke dalam ± 10 mL fase gerak PE : aseton (10:1) dan masukkan ke dalam kolom hingga melewati

fase diam campuran silica gel dan pasir laut dengan menggunakan pipet tetes.

- Menambahkan fase gerak dengan PE : aseton (10 : 1) sampai seluruh tabung kolom terisi penuh secara terus menerus hingga muncul fraksi warna.
- Penampungan fraksi warna yang muncul dalam botol fial dan bungkus dengan aluminium foil untuk mencegah isolat dari degradasi pengaruh cahaya.
- Penguapan pada isolat yang dihasilkan dengan gas N_2 agar pelarut hilang.
- Mengencerkan isolat pada labu ukur dengan PE : aseton (10 : 1) lalu diidentifikasi menggunakan teknik kromatografi lapis tipis.

3. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

- Mentotolkan standart β -karoten pada plat KLT F-254 dengan jarak 1,5 cm dari bawah plat KLT dengan pipet kapiler.
- Kemudian mentotolkan isolat β -karoten *Spirulina* sp pada plat KLT yang sama dengan pipet kapiler.
- Selanjutnya masukkan plat KLT ke dalam *beaker glass* yang berisi fase gerak PE : aseton (10 : 1) dan tunggu sampai fase gerak bergerak hingga garis batas.
- Angkat plat KLT dan keringkan pada suhu ruang.
- Kerik pada titik atau spot β -karoten yang memiliki panjang R_f sama dengan standart β -karoten dengan menggunakan silet.
- Lalu masukkan ke dalam botol fial dan larutkan dengan pelarut sebanyak 3 mL.
- Kemudian saring menggunakan kertas whatman untuk membersihkan pigmen β -karoten dari pelat KLT kemudian keringkan.

3.3.5 Parameter yang Diamati

Parameter pengamatan yang diamati pada penelitian pendahuluan adalah rendemen ekstrak kasar dan rendemen β -karoten. Sedangkan parameter pengamatan yang diamati pada penelitian utama adalah waktu ekstraksi terbaik berdasarkan hasil ekstrak *Spirulina* sp., total karotenoid, dan total *yield* β -karoten. Kemudian dilakukan uji spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui panjang gelombang optimum β -karoten dan uji *Scanning Electron Microscope* (SEM) untuk mengetahui karakteristik dinding sel *Spirulina* sp. sebelum dan setelah ekstraksi.

3.3.5.1 Ekstrak Kasar

Ekstrak kasar hasil ekstraksi *Spirulina* sp. dapat dihitung dengan prosedur sebagai berikut:

- Penguapan ekstrak pekat *Spirulina* sp. hasil evaporasi dengan gas nitrogen sampai pekat.
- Menimbang ekstrak pekat menggunakan timbangan digital dalam wadah yang telah diketahui beratnya.
- Membandingkan berat ekstrak pekat dengan wadah yang telah diketahui beratnya.

3.3.5.2 Analisa *Yield* Ekstrak (Manasika dan Widjanarko, 2015)

Prinsip menghitung *yield* ekstrak adalah dengan menghitung hasil berat akhir yang dihasilkan dari suatu proses dengan berat awal bahan. Cara menghitung rendemen dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

- Penguapan ekstrak pekat *Spirulina* sp. hasil evaporasi dengan gas nitrogen sampai pekat.
- Menimbang ekstrak pekat dalam wadah yang telah diketahui beratnya.
- Membandingkan berat ekstrak pekat dengan berat awal *Spirulina* sp. serbuk kemudian hitung menggunakan rumus.

Rumus perhitungan *yield* ekstrak pekat mikroalga menurut Manasika dan Widjanarko (2015) sebagai berikut:

$$\text{Yield Ekstrak} = \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat bubuk mikroalga}} \times 100\%$$

3.3.5.3 Analisa Total Karotenoid (Wahyuni dan Widjanarko, 2015)

Analisa total karotenoid dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Metode spektrofotometer UV-Vis adalah suatu metode analisa kimia secara kualitatif maupun kuantitatif. Prinsip dasar analisis kualitatif maupun kuantitatif dengan spektrofotometer UV-Vis yaitu menggunakan sumber cahaya dari sinar UV dan sinar tampak dengan pengaturan berkas cahaya menggunakan monokromator. Analisa total karotenoid dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

- Melarutkan ekstrak pekat *Spirulina* sp. seberat 0,2 g dalam 5 mL pelarut aseton dan 1 mL petroleum eter dalam tube sentrifuse.
- Mensentrifuse selama 5 menit dengan menggunakan kecepatan 3000 rpm. Proses sentrifugasi tersebut menghasilkan bagian bening dan endapan.
- Lakukan pembilasan pada bagian endapan hasil sentrifuse sebanyak 3 kali sehingga diperoleh bagian bening dan bagian endapan.
- Ambil bagian bening menggunakan pipet tetes dan tampung dengan menggunakan tabung reaksi.
- Masukkan bagian bening yang telah ditampung dalam labu ukur 25 mL dan tambahkan PE : aseton (1 : 1) hingga mencapai tanda batas 25 mL.
- Masukkan dalam erlenmeyer dan tambahkan 25 mL aquades.
- Campuran tersebut menghasilkan lapisan air – aseton – lapisan eter.
- Kemudian membuang lapisan air – aseton. Lapisan eter dibuang dan dicuci sebanyak 25 mL akuades serta tambahkan dengan 1,25 g setiap 25 mL Na_2SO_4 untuk mengikat air pada sampel.

- Kemudian melakukan sentrifuse selama lima menit dengan kecepatan 3000 rpm.
- Ambil bagian bening hasil sentrifuse dan masukkan dalam labu ukur 25 mL
- Menambahkan dengan PE : aseton sampai tanda batas.
- Mengukur sampel dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 450 nm.

3.3.5.3 Analisa *Yield* β -Karoten (Wahyuni dan widjanarko, 2015)

Penentuan kadar β -karoten dilakukan dengan menggunakan prinsip Wahyuni dan Widjanarko (2015) dengan cara membuat kurva standart larutan β -karoten (5 mg/mL). Pembuatan kurva standart larutan β -karoten (5 mg/mL) dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

- Melarutkan 10 mg β -karoten standar dalam 2 mL PE dan aseton (1 : 1).
- Mengencerkan larutan tersebut sampai 25 mL dengan menambahkan PE : aseton (10 : 1)
- Ambil masing-masing 0; 0,2; 0,4; 0,6; 1,0 mL dan masukkan ke dalam labu ukur 25 mL kosong.
- Mengencerkan masing-masing dengan PE : aseton aseton (10 : 1) sampai tanda batas labu ukur.
- Mengukur absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm.
- Membuat kurva regresi antara konsentrasi β -karoten dan absorbansi.

3.3.5.4 Pengukuran Spektra Visibel Senyawa β -Karoten dengan Spektrofotometer UV-Vis (Dey dan Rathod, 2013 termodifikasi)

Metode spektrofotometer UV-Vis adalah suatu metode analisa kimia secara kualitatif maupun kuantitatif. Prinsip kerja analisis kualitatif maupun kuantitatif dengan spektrofotometer UV-Vis yaitu menggunakan sumber cahaya dari sinar UV dan sinar tampak dengan pengaturan berkas cahaya

menggunakan monokromator. Identifikasi β -Karoten dengan Spektrofotometer UV-Vis dilakukan dengan prosedur sebagai berikut:

- Menambahkan isolat β -karoten *Spirulina* sp. dengan PE : aseton (10 : 1) sebanyak $\pm$ 10 mL dan masukkan dalam cuvet.
- Menyiapkan blanko berupa PE : aseton (10 : 1) sebanyak 10 mL.
- Memasukkan cuvet dalam spektrofotometer UV-Vis dan ukur panjang gelombang optimum (*peak*) dan absorbansi dengan panjang gelombang sampel.

3.3.5.6 Scanning Electron Microscope (SEM) (Nasution et al., 2013)

Prinsip kerja dari SEM adalah menghasilkan berbagai gambar dari proses tumbukan elektron dengan energi yang tinggi terhadap permukaan suatu sampel dan kemudian mengidentifikasi sinyal-sinyal hamburan elektron dari permukaan. Perubahan dinding sampel pada *Spirulina* sp. dapat dilihat melalui SEM dengan prosedur kerja sebagai berikut:

- Menyiapkan sampel.
- Menyiapkan sampel holder atau kotak sampel yang terbuat dari logam.
- Melekatkan sampel dengan menggunakan selotip karbon untuk sampel berupa serbuk.
- Setelah menempelkan selotip karbon maka serbuk, tebarkan pada permukaan selotip dan sisa serbuk yang tidak dapat menempel harus dibersihkan sehingga tidak mengganggu alat vakum dalam SEM ketika analisa.
- Meletakkan sampel beserta tempatnya kedalam alat SEM.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penelitian Pendahuluan

Pada penelitian pendahuluan dilakukan ekstraksi mikroalga *Spirulina* sp. dengan menggunakan metode ultrasonik dan waktu ekstraksi selama 28 menit. Pada penelitian pendahuluan juga mengamati karakteristik bahan baku berupa kadar air dari *Spirulina* sp. kering yang dapat dilihat pada Lampiran 1. Hasil dari penelitian pendahuluan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Penelitian Pendahuluan

Parameter	Jumlah
Berat <i>Spirulina</i> sp. kering (g)	10
Kadar Air (%)	13,71
Berat ekstrak kasar <i>Spirulina</i> sp. (g)	0,49
Total karotenoid ($\mu\text{g/g}$)	4,03
Total yield β -karoten ($\mu\text{g/g}$)	58,54

Tabel 4 menunjukkan bahwa hasil ekstraksi pada bahan baku 10 g *Spirulina* sp. kering memberikan hasil ekstrak kasar sebanyak $4,09 \pm 1,78$ g, kadar air sebesar 13,71 %, kandungan total karotenoid sebesar $4,03 \pm 0,72$ ($\mu\text{g/g}$), dan kandungan total yield β -karoten sebesar $58,54 \pm 0,72$ ($\mu\text{g/g}$). Hasil dari penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa total yield β -karoten yang dihasilkan pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan pernyataan Fretes *et al.*, (2012) yang mengatakan bahwa total β -karoten pada *Spirulina* sp. sebesar 39,12 $\mu\text{g/g}$.

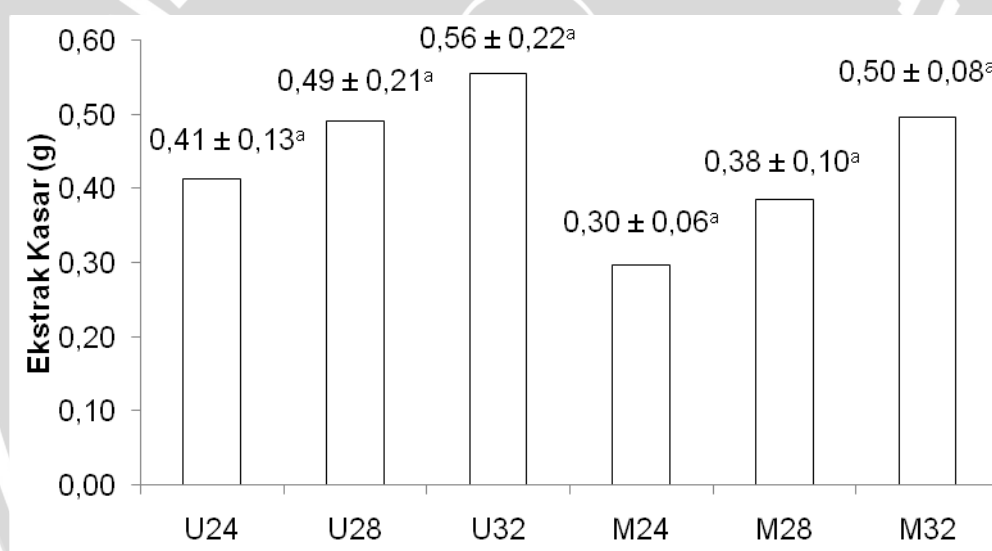
4.2 Penelitian Utama

Pada penelitian utama telah dilakukan beberapa tahapan penelitian seperti ekstraksi mikroalga *Spirulina* sp. dan isolasi senyawa β -karoten dari ekstrak *Spirulina* sp. sehingga diperoleh data dan hasil yang meliputi ekstrak kasar *Spirulina* sp., yield ekstrak *Spirulina* sp., isolasi senyawa β -karoten, total

karotenoid, total *yield* β -karoten, pola spektra β -karoten dengan spektrofotometer UV-Vis, dan perubahan dinding sel *Spirulina* sp.

4.2.1 Ekstrak Kasar *Spirulina* sp.

Ekstrak kasar *Spirulina* sp. diperoleh melalui ekstraksi menggunakan metode ultrasonik dan maserasi dengan waktu ekstraksi selama 24, 28, dan 32 menit. Data hasil dan analisis ragam hasil ekstrak kasar *Spirulina* sp. dapat dilihat pada Lampiran 2. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa antar perlakuan tidak memberikan pengaruh yang nyata ($p>0,05$) terhadap hasil ekstrak kasar *Spirulina* sp. yang dihasilkan. Berikut rata-rata hasil ekstrak kasar *Spirulina* sp. yang dapat dilihat pada Gambar 6.



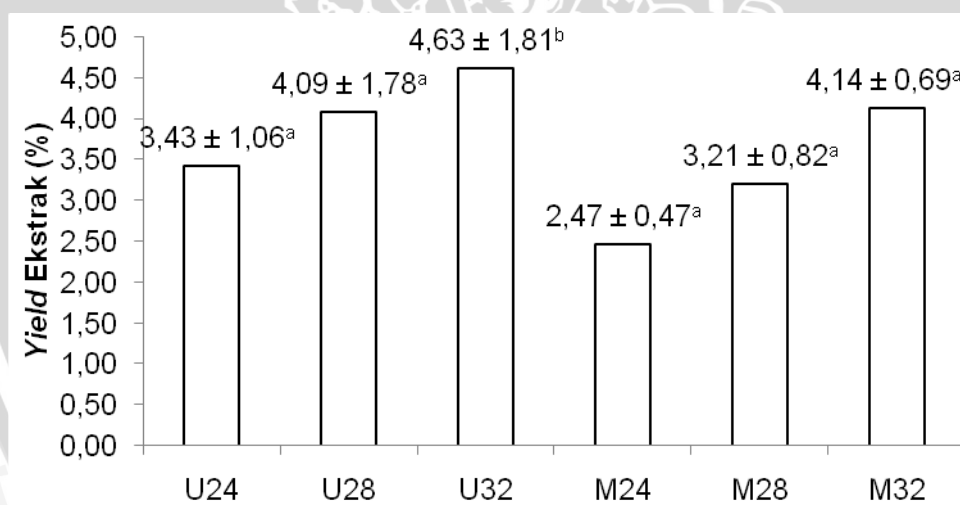
Gambar 6. Ekstrak Kasar *Spirulina* sp. dengan Perbedaan Metode dan Waktu Ekstraksi

Gambar 6 menunjukkan bahwa hasil ekstrak kasar *Spirulina* sp. perlakuan U32 dengan ekstraksi ultrasonik selama 32 menit menghasilkan ekstrak kasar paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain yakni sebesar $0,56 \pm 0,22^a$ g. Hal ini disebabkan metode ultrasonik mampu meningkatkan hasil ekstraksi dibandingkan dengan metode maserasi dikarenakan gelombang ultrasonik mampu merusak dinding sel dari mikroalga *Spirulina* sp. sehingga mempermudah pelarut masuk ke dalam sel. Ekstraksi

dengan ultrasonik selama 32 menit dapat membuat dinding sel berongga sehingga memberikan ruang pada pelarut untuk menarik keluar senyawa-senyawa yang terkandung di dalam sel. Menurut Wahyuni dan Widjanarko (2015), efek mekanis yang ditimbulkan oleh gelombang ultrasonik dapat meningkatkan kemampuan penetrasi pelarut ke dalam sel bahan sehingga meningkatkan jumlah komponen sel yang berdifusi ke dalam pelarut.

4.2.2 Yield Ekstrak *Spirulina* sp.

Data hasil dan analisis ragam hasil *yield* ekstrak *Spirulina* sp. dapat dilihat pada Lampiran 3. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa antar perlakuan memberikan pengaruh yang nyata ($p < 0,05$) terhadap hasil *yield* ekstrak *Spirulina* sp. yang dihasilkan. Berikut rata-rata hasil *yield* ekstrak *Spirulina* sp. yang dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Yield Ekstrak *Spirulina* sp. dengan Perbedaan Metode dan Waktu Ekstraksi

Gambar 7 menunjukkan bahwa hasil dari ekstraksi *Spirulina* sp. mendapatkan *yield* ekstrak *Spirulina* sp. perlakuan U32 dengan ekstraksi ultrasonik selama 32 menit menghasilkan *yield* ekstrak *Spirulina* sp. paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain yakni sebesar $4,63 \pm 1,81^b$ %. Ekstraksi menggunakan metode ultrasonik dan maserasi dalam waktu yang sama menghasilkan rendemen ekstrak yang berbeda. Metode ultrasonik tidak

memerlukan waktu yang lama untuk dapat mengekstrak senyawa yang diinginkan dibandingkan dengan metode maserasi. Ekstraksi konvensional dengan menggunakan maserasi memakan waktu yang sangat lama. Menurut Ma *et al.*, (2008), ekstraksi menggunakan ultrasonik telah terbukti secara signifikan mengurangi waktu ekstraksi dan meningkatkan hasil ekstraksi dalam banyak bahan. Adanya komponen lain selain karotenoid yang ikut terlarut dalam pelarut serta residu pelarut yang masih tersisa juga bisa mempengaruhi tingginya rendemen (Manasika dan Widjanarko, 2015).

4.2.3 Isolasi Senyawa β -karoten

Isolasi senyawa β -karoten *Spirulina* sp. dilakukan dengan mengacu pada metode isolasi menurut Wahyuni dan Widjarnako (2015). Dari proses isolasi 0,3 g ekstrak pekat *Spirulina* sp. dengan menggunakan metode ekstraksi dan waktu ekstraksi yang berbeda diperoleh hasil isolat yang dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Isolasi Senyawa β -karoten

Perlakuan	Total Botol Isolat β -Karoten
U24	3
U28	3
U32	4
M24	2
M28	3
M32	3

Tabel 5 menunjukkan bahwa isolasi β -karoten dengan penggunaan metode ekstraksi dan waktu ekstraksi yang berbeda menghasilkan beberapa isolat β -karoten yang ditandai dengan hasil isolat berwarna kuning hingga oranye. Hasil isolasi β -karoten *Spirulina* sp. dapat dilihat pada Gambar 8.

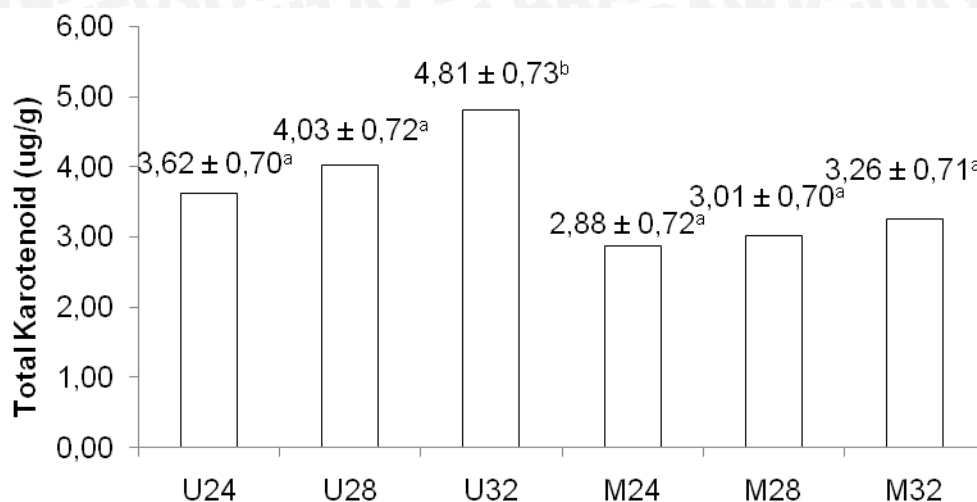


Gambar 8. Hasil Isolasi Senyawa β -Karoten *Spirulina* sp.

Gambar 8 menunjukkan isolasi senyawa hasil kromatografi kolom menghasilkan fraksi warna hijau, kuning dan orange. Isolat yang diduga sebagai β -karoten memiliki warna kuning hingga orange. Senyawa β -karoten merupakan karotenoid berwarna kuning dan merah yang terdapat pada tumbuhan maupun buah-buahan (Winarno, 2004). Pada *Spirulina* sp. pita β -karoten adalah berwarna kuning (Yudiati *et al.*, 2011).

4.2.4 Total Karotenoid *Spirulina* sp.

Data hasil dan analisis ragam kandungan total karotenoid dapat dilihat pada Lampiran 4. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa antar perlakuan memberikan pengaruh yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kandungan total karotenoid yang dihasilkan. Berikut rata-rata kandungan total karotenoid *Spirulina* sp. yang dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9 . Total Karotenoid *Spirulina* sp. dengan Perbedaan Metode dan Waktu Ekstraksi

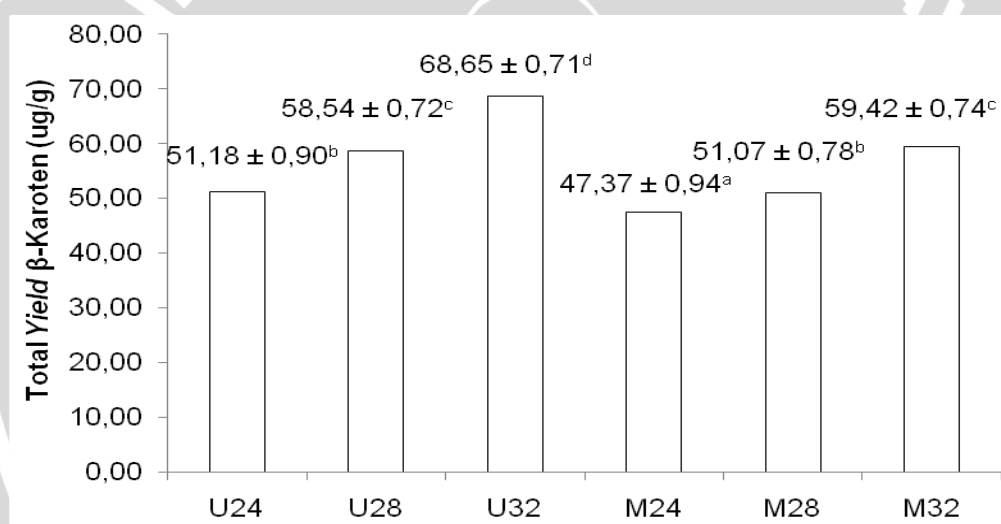
Gambar 9 menunjukkan bahwa kandungan total karotenoid ekstrak *Spirulina* sp. perlakuan U32 dengan metode ekstraksi ultrasonik selama 32 menit menghasilkan kandungan total karotenoid paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain yakni sebesar $4,81 \pm 0,73^b$ ($\mu\text{g/g}$). Hal ini menunjukkan bahwa ekstraksi dengan metode ultrasonik mampu menghasilkan kandungan senyawa karotenoid lebih banyak dibandingkan dengan ekstraksi menggunakan metode maserasi. Hal ini membuktikan bahwa teknik ekstraksi ultrasonik dapat digunakan sebagai alternatif yang lebih efisien dan cepat dalam mengekstrak kasar karotenoid dari bahan alami (Manasika dan Widjanarko, 2015).

Ekstraksi ultrasonik tidak membutuhkan banyak waktu untuk memperoleh kandungan karotenoid dibandingkan dengan ekstraksi dengan metode maserasi. Dalam waktu yang sama, hasil ekstraksi ultrasonik dan maserasi menghasilkan kandungan karotenoid yang berbeda. Hal ini disebabkan ekstraksi ultrasonik dengan bantuan gelombang dapat menghasilkan suatu getaran yang mampu merusak dinding sel dengan cepat sehingga komponen-komponen yang terdapat pada sel dapat tertarik keluar oleh pelarut termasuk karotenoid. Menurut Wahyuni dan Widjanarko (2015), pengaruh waktu dalam ekstraksi adalah

semakin lamanya waktu ekstraksi maka terjadinya kontak antara pelarut dengan bahan akan semakin lama sehingga dari keduanya akan terjadi pengendapan massa secara difusi sampai terjadi keseimbangan konsentrasi larutan di dalam dan diluar bahan ekstraksi.

4.2.5 Total Yield β -Karoten *Spirulina* sp.

Data hasil dan analisis ragam kandungan total β -karoten dapat dilihat pada Lampiran 4. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa antar perlakuan memberikan pengaruh yang nyata ($p < 0,05$) terhadap kandungan total *yield* β -karoten yang dihasilkan. Berikut rata-rata kandungan total *yield* β -karoten ekstrak *Spirulina* sp. yang dapat dilihat pada Gambar 10.



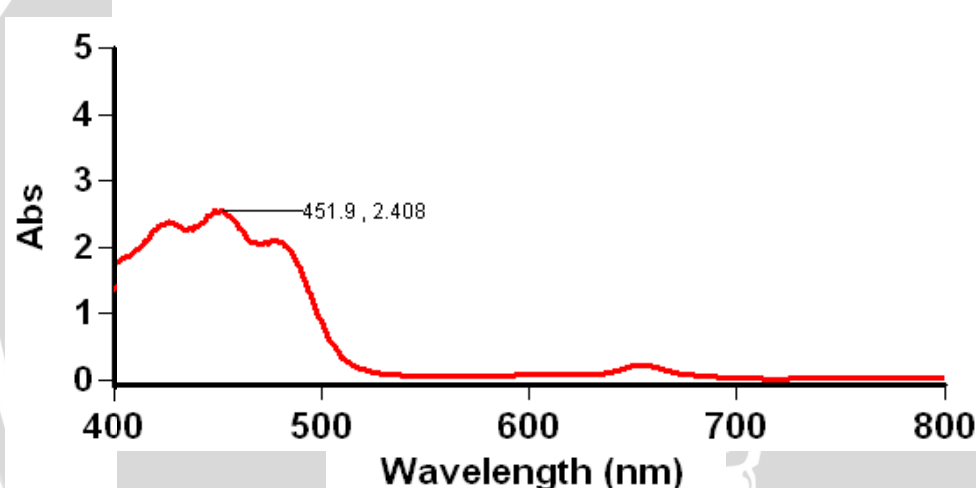
Gambar 10. Total Yield β -karoten *Spirulina* sp. dengan Perbedaan Metode dan Waktu Ekstraksi

Gambar 10 menunjukkan bahwa kandungan total β -karoten ekstrak *Spirulina* sp. perlakuan U32 dengan metode ekstraksi ultrasonik selama 32 menit menghasilkan kandungan total β -karoten paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain yakni sebesar 68,65 $\pm$ 0,71^d (ug/g). Ekstraksi dengan metode ultrasonik mampu menghasilkan kandungan senyawa β -karoten lebih banyak dibandingkan dengan ekstraksi menggunakan metode maserasi. Hal ini dikarenakan hasil ekstraksi dari *Spirulina* sp. memperoleh komponen karotenoid

yang banyak sehingga kemungkinan kandungan β -karoten pada karotenoid tersebut juga semakin meningkat.

4.2.6 Spektra Visibel Senyawa β -karoten *Spirulina* sp.

Hasil isolat karotenoid yang mengandung senyawa β -karoten digunakan untuk identifikasi selanjutnya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang mengacu pada metode yang digunakan Dey dan Rathod (2013) dengan rentang panjang gelombang sekitar 450-500 nm. Hasil dari pengukuran spektra visibel senyawa β -karoten dengan spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Lampiran 5. Panjang gelombang optimum pada pola spektra senyawa β -karoten dengan dapat dilihat pada Gambar 11.



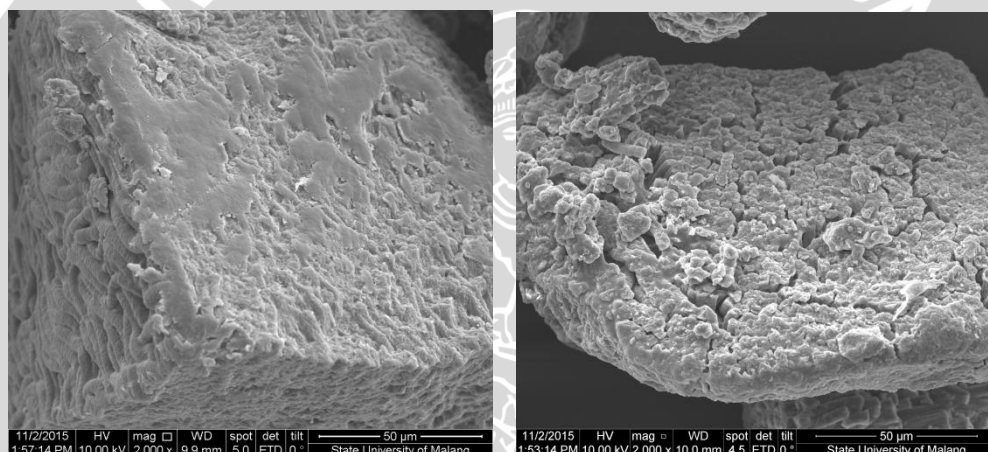
Gambar 11 . Pola Spektra Senyawa β -karoten *Spirulina* sp.

Gambar 11 menunjukkan analisis spektra absorbansi ekstrak *Spirulina* sp. dengan spektrofotometer UV-Vis pada perlakuan U32 dengan metode ekstraksi ultrasonik selama 32 menit menghasilkan puncak yang muncul pada panjang gelombang 451,9 nm. Ekstrak *Spirulina* sp. pada serapan dengan panjang gelombang 451,9 nm mengandung karotenoid sehingga tampak berwarna kuning dan orange. Pada panjang gelombang 451,9 nm menyerap cahaya berwarna kuning hingga orange yang diduga sebagai senyawa β -karoten. Pada penelitian Lichtenthaler dan Buschmann (2001), menyatakan

bahwa serapan maksimum pada cahaya dengan panjang gelombang 450 nm dan 470 nm mencirikan adanya senyawa β -karoten.

4.2.7 Perubahan Dinding Sel *Spirulina* sp. dilihat dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM)

Sampel *Spirulina* sp. sebelum dan sesudah diekstraksi dengan metode ultrasonik diamati permukaan dinding selnya dengan menggunakan alat *Scanning Electron Microscope* untuk mengetahui perubahan dinding sel yang mengalami kerusakan akibat dampak dari proses ekstraksi. Dinding sel *Spirulina* sp. sebelum dan sesudah diekstraksi dengan ultrasonik dapat dilihat pada Gambar 12.



(a)

(b)

Gambar 12. (a) Dinding Sel *Spirulina* sp. Sebelum diekstraksi
(b) Dinding Sel *Spirulina* sp. Sesudah diekstraksi

Gambar 12 (a) menunjukkan bahwa dari pengamatan dengan SEM dinding sel dari *Spirulina* sp. sebelum dilakukan ekstraksi masih utuh yang menunjukkan belum adanya reaksi yang terjadi. Pada gambar 12 (b) menunjukkan bahwa dinding sel dari *Spirulina* sp. setelah dilakukan ekstraksi mengalami kerusakan ditandai dengan adanya keretakan pada permukaan dinding sel. Hal ini dikarenakan efek dari gelombang suara ultrasonik mampu menembus dan merusak dinding sel sehingga menghasilkan rongga yang mempermudah masuknya komponen yang berupa pelarut.

5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Pada penelitian tentang pengaruh metode dan waktu ekstraksi mikroalga *Spirulina* sp. terhadap β -karoten dapat disimpulkan bahwa metode dan waktu ekstraksi yang berbeda tidak memberikan pengaruh terhadap kandungan β -karoten pada mikroalga *Spirulina* sp. Hasil terbaik terdapat pada perlakuan U32 dengan metode ultrasonik pada waktu 32 menit dengan hasil ekstrak kasar *Spirulina* sp. sebesar $0,56 \pm 0,22^a$ g, *yield* ekstrak *Spirulina* sp. sebesar $4,63 \pm 1,81^b$ %, total karotenoid *Spirulina* sp. sebesar $4,81 \pm 0,73^b$ $\mu\text{g/g}$, total *yield* β -karoten *Spirulina* sp. sebesar $68,65 \pm 0,71^d$ $\mu\text{g/g}$, dan pola spektra visibel tertinggi senyawa β -karoten *Spirulina* sp. pada panjang gelombang 451,9 nm.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan terhadap pemanfaatan senyawa β -karoten dari ekstrak mikroalga *Spirulina* sp. untuk mengetahui aktivitasnya yang lain, sehingga ke depan diharapkan potensi dari mikroalga *Spirulina* sp. khususnya senyawa β -karoten dapat dikembangkan dan dimanfaatkan lebih lanjut dalam berbagai bidang.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahamad, M. N, M. Saleemullah, H. U. Shah, I. A. Khalil dan A. Saljoqi. 2007. Determination Of Beta Carotene Content In Fresh Vegetables Using High Performance Liquid Chromatography. *Sarhad Jurnal Agricultur*. **23** (3): 13 – 15.
- Arham M. Y., I. Raya., dan H. Usman. 2014. Sintesis dan Karakterisasi Senyawa Kompleks La (III) dengan 2,9-Dimetil Fenatrolin dan Heptilmetilditiokarbamat serta potensinya sebagai Anti Tuberkolosis. Universitas Hasanudin. Makasar: hlm 1 – 8.
- Babadzhanov, A.S. 2004. Chemical Composotion of *Spirulina platensis* Cultivated in Uzbekistan. *Chemistry of Natural Compounds*. **43**: 21–27.
- Balai Perikanan dan Budidaya Air Payau, 2015. Tahapan Kultur Pakan Alami (Phytoplanton). Situbondo.
- Brabcová, I., M. Hlavácková, D. Šatínský, dan P. Solich. 2013. A Rapid HPLC Column Switching Method for Sample Preparation and Determination of b-carotene in Food Supplements. *Journal Food Chemistry*. **141**: 1433–1437.
- Cahyadi, W. 2006. Analisis dan Aspek Kesehatan Bahan Tambahan Pangan. PT Bumi Aksara. Jakarta.
- Chen, J. R., J. J. Wu, J. C. T. Lin, Y. C. Wang, C. C. Young, C. J. Shieh, S. L. Hsu, dan C. M. J. Chan. 2013. Low Density Supercritical Fluids Precipitation of 9-Cis and AllmTrans β -Carotenes Enriched Particulates from *Dunaliella salina*. *Journal of Chromatography A*. **1299**: 1–9.
- Da costa, J. F., F.F Karwur., L. Limantara. 2009. Efek Beta Karoten dan Agregasi Klorofil Pada Fotostabilitas Klorofil a dalam Pelarut Aseton. *Jurnal Natur Indonesia*. **11** (2): 115–123.
- Darsi, R., A. Supriadi, dan A. D. Sasanti. 2012. Karakteristik Kimiawi dan Potensi Pemanfaatan *Dunaliella salina* dan *Nannochloropsis* sp. *Jurnal Teknologi Hasil Perikanan*. Vol. **1** (1) 14–25.
- Dey, S., dan V. K. Rathod. 2013. Ultrasound Assisted Extraction of β -Carotene from *Spirulina platensis*. *Journal Ultrasonics Sonochemistry*. **20**: 271–276.
- Fahleny R., W. Trilaksani, dan I. Setyaningsih. 2014. Aktivitas Antioksidan pada Formula Terpilih Tablet Hisap *Spirulina platensis* Berdasarkan Karakteristik Fisik. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. Vol. **6** (2) 427–444.

- Frete, H. D., A. B. Susanto, B. Prasetyo, dan L. Limantara. 2012. Karotenoid dari Makroalgae dan Mikroalgae: Potensi Kesehatan dan Bioteknologi. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. Vol. XXIII No. 2.
- Harun, R., Sinh, M., Forde, G.M., & Danquah, M.K. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 1037-1047.
- Hu, Q. 2004. Industrial Production of Microalga Cell-mass and Secondary Product-Major Industrial Species: *Arthrospira (Spirulina) platensis* dalam Richmond A. 2004. Handbook of Microalga Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publishing.
- Kusmiati, N. W. S. Agustin, S. R. Tamat, dan M. Irawati. 2010. Ekstraksi dan Purifikasi Senyawa Lutein dari Mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* Galur Lokal Ink. *Jurnal Kimia Indonesia*. 5: 30–34.
- Kyriakopoulou, K., S. Papadaki, dan M. Krokida. 2015. Life Cycle Analysis of β -Carotene Extraction Techniques. *Journal of Food Engineering*. ISSN 0260–8774.
- Lichtenthaler, H.K. dan C. Buschmann. 2001. Chlorophyll and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-Vis Spectroscopy in: R.E. Wrolstad (Ed). Current Protocol in Food Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Inc., New York. hlm. 431 – 438.
- Luengo, E., S. C. Abanto, S. Condón, I. Álvarez, dan J. Raso. 2014. Improving The Extraction of Carotenoids from Tomato Waste by Application of Ultrasound Under Pressure. *Journal Separation and Purification Technology*. 136: 130–136.
- Ma, Y., X. Ye, Y. Hao, G. Xu, dan D. Liu. 2008. Ultrasound-Assisted Extraction of Hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) Peel. *Journal Ultrasonics Sonochemistry*. Vol 15 (3) 227–232.
- Manasika, A. dan S. B. Widjanarko. 2015. Ekstraksi Pigmen Karotenoid Labu Kabocha Menggunakan Metode Ultrasonik (Kajian Rasio Bahan : Pelarut Dan Lama Ekstraksi). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol 3 (3): 928–938.
- Mortensen, A. 2006. Carotenoids and Other Pigments as Natural Colorants. Pure Application. Chemical. 10: 13–51.
- Noviarty dan D. Angraini. 2013. Analisis Neodimium Menggunakan Metoda Spektrofotometri Uv-Vis. Nomor 11. ISSN 1979-2409.
- Paransa, D. S. J., K. Kemer., A. P. Rumengan., D. M. H Mantiri. 2014. Analisis Jenis Pigmen dan Uji Toksisitas Antibakteri Ekstrak Pigmen Xantofil pada Alga Coklat *Sargassum polycystum* (C. Agardh). *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi*. 1 (1): 90–96.

- Plaza, M., S. Santoyo, L. Jaime, B. Avalo, A. Cifuentes, G. Reglero, G. G. Reina, F. J. Señoráns, dan E. Ibáñez. 2012. Comprehensive Characterization of the Functional Activities of Pressurized Liquid and Ultrasound-Assisted Extracts from *Chlorella vulgaris*. *Journal Food Science and Technology*. **46**: 245–253.
- Rachmawati, S. dan P. M. Widiyanti. 2013. Kadar Melamin pada Produk Berbahan Susu dan Susu Bubuk yang Dianalisis secara Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS). *JITV*. **18** (1): 63–69.
- Rita, W. S., I. G. A. G Bawa., N. L. P. L. Wirastiningsih. 2012. Skrining Awal Antitumor melalui Pendekatan Uji Toksisitas Kandungan Senyawa dalam Ekstrak n-Heksan Rimpang Temu Putih (*Curcuma zedoroa* (Berg.) Roscoe). **6** (1): 55–61.
- Sedjati, S., E. Yudiati, dan Suryono. 2012. Profil Pigmen Polar dan Non Polar Mikroalga Laut *Spirulina* sp. dan Potensinya sebagai Pewarna Alami. *Jurnal Ilmu Kelautan*. ISSN 0853–7291 Vol. **17** (3) 176–181.
- Seo, Y. C., W. S. Choi, J. H. Park, J. H. Park, dan Jung, K. 2013. Stable Isolation of Phycocyanin from *Spirulina platensis* Associated with High-Pressure Extraction Process. *International Journal of Molecular Sciences*. **14**: 1778–1787.
- Singh, D., C. J. Barrow, A. S. Mathur, D. K. Tuli, dan M. Puri. 2015. Optimization of Zeaxanthin and β -carotene Extraction from *Chlorella saccharophila* Isolated from New Zealand Marine Waters. *Journal Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.
- Sudarmadji, S., Bambang H., Suhardi. 2003. Analisa Bahan Makanan dan Pertanian. Liberty. Yogyakarta: hlm. 172.
- Sugiyono. 2014. Metode Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif R & D. *Alfabeta*: hlm 36–76.
- Sun, Y., D. Liu, J. Chen, X. Ye, dan D. Yu. 2011. Effects of Different Factors of Ultrasound Treatment on The Extraction Yield of the All-Trans- β -Carotene From Citrus Peels. *Journal Ultrasonics Sonochemistry* **18**: 243–249.
- Toyo'oka, T. 2012. LC–MS determination of bioactive molecules based upon stable isotope-coded derivatization method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **69** (1): 174 – 184.
- Tungriani, D. A., A. Karim, Asmawati, dan Seniwati. Analisis Kandungan β -Karoten dan Vitamin C pada Berbagai Varietas Talas (*Colocasia esculenta*). *Indonesia Chimica Acta*: hlm. 1–10. (tidak diterbitkan).
- Wahyuni, D. T. dan S. B. Widjanarko. 2015. Pengaruh Jenis Pelarut dan Lama Ekstraksi terhadap Ekstrak Karotenoid Labu Kuning dengan Metode Gelombang Ultrasonik. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. Vol. **3** (2) 390–401.
- Winarsi, H. 2007. Antioksidan Alami dan Radikal Bebas: Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan. Kanisius. Yogyakarta.

Yudiati, E., S. Sedjati, dan R. Agustian. 2011. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Metanol dan Pigmen Kasar *Spirulina* sp . ISSN 0853–7291 Vol. 16 (4) 187–192.



Lampiran 1. Data dan Hasil Kadar Air *Spirulina* sp.

	U1	U2	U3	Rerata
Berat sampel (g)	2,0810	2,1080	2,0780	
Berat botol timbang (g)	22,7645	22,9899	22,7364	13,71
Berat sampel+botol timbang (g)	24,576	24,7828	24,5392	
Kadar Air (%)	12,95	14,95	13,24	

Perhitungan:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{(A + B) - (C)}{B} \times 100\%$$

Keterangan:

A = Berat botol timbang

B = Berat sampel

C = Berat sampel + botol timbang

$$\text{Kadar air U1} = \frac{(22,7645+2,0810) - (24,5760)}{2,0810} \times 100\% = 12,95\%$$

$$\text{Kadar air U2} = \frac{(22,9899+2,1080) - (24,7828)}{2,1080} \times 100\% = 14,95\%$$

$$\text{Kadar air U3} = \frac{(22,7364+2,0780) - (24,5392)}{2,0780} \times 100\% = 13,24\%$$

Lampiran 2. Data dan Hasil Ekstrak *Spirulina* sp.

Perlakuan	Sampel (g)	Ekstrak Kasar 0,3 g			Ekstrak Kasar (g)			Total Ekstrak Kasar (g)			SD	Rerata
		U1	U2	U3	U1	U2	U3	U1	U2	U3		
U24	12	0,28	0,18	0,23	0,58	0,48	0,53	0,54	0,29	0,41	0,13	0,41
U28	12	0,17	0,27	0,33	0,47	0,57	0,63	0,27	0,51	0,69	0,21	0,49
U32	12	0,31	0,19	0,34	0,61	0,49	0,64	0,63	0,31	0,73	0,22	0,56
M24	12	0,21	0,16	0,18	0,51	0,46	0,48	0,36	0,25	0,29	0,06	0,30
M28	12	0,26	0,22	0,18	0,56	0,52	0,48	0,49	0,38	0,29	0,10	0,38
M32	12	0,29	0,23	0,27	0,59	0,53	0,57	0,57	0,41	0,51	0,08	0,50

Perlakuan	Total Ekstrak Kasar (g)			Total	Rerata
	U1	U2	U3		
U24	0,54	0,29	0,41	1,24	0,41
U28	0,27	0,51	0,69	1,47	0,49
U32	0,63	0,31	0,73	1,67	0,56
M24	0,36	0,25	0,29	0,89	0,30
M28	0,49	0,38	0,29	1,15	0,38
M32	0,57	0,41	0,51	1,49	0,50
Total	2,85	2,14	2,91	7,91	

Npar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Metode	Waktu	Ekstrak Pigmen
N		18	18	18
Normal Parameters ^a	Mean	1,5000	2,0000	0,4406
	Std. Deviation	0,51450	0,84017	0,15012
Most Extreme Differences	Absolute	0,334	0,216	0,141
	Positive	0,334	0,216	0,141
	Negative	-0,334	-0,216	-0,102
Kolmogorov-Smirnov Z		1,419	0,918	0,599
Asymp. Sig. (2-tailed)		0,036	0,368	0,866

a. Test distribution is Normal.

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Metode	1,00	Ultrasonik	9
	2,00	Maserasi	9
Waktu	1,00	24 Menit	6
	2,00	28 Menit	6
	3,00	32 Menit	6

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Ekstrak Pigmen

Metode	Waktu	Mean	Std. Deviation	N
Ultrasonik	24 Menit	0,4800	0,18735	3
	28 Menit	0,3700	0,12166	3
	32 Menit	0,6100	0,17436	3
	Total	0,4867	0,17578	9
Maserasi	24 Menit	0,4733	0,10599	3
	28 Menit	0,3467	0,08505	3
	32 Menit	0,3633	0,12702	3
	Total	0,3944	0,11047	9
Total	24 Menit	0,4767	0,13619	6
	28 Menit	0,3583	0,09475	6
	32 Menit	0,4867	0,19201	6
	Total	0,4406	0,15012	18

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Ekstrak Pigmen

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	0,153	5	0,031	1,601	0,021
Intercept	3,494	1	3,494	182,434	0,000
Metode	0,038	1	0,038	1,999	0,027
Waktu	0,061	2	0,031	1,596	0,013
Metode * Waktu	0,054	2	0,027	1,407	0,003
Error	0,230	12	0,019		
Total	3,877	18			
Corrected Total	0,383	17			

BNT Test

T tabel = 2,571

$$\text{BNT } 5\% = t_{0,05} \times \sqrt{\frac{2 \text{ KT Galat}}{\text{Ulangan}}} = 2,571 \times \sqrt{\frac{2 \times 0,019}{3}} = 0,289$$

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
M24	0,30	a
M28	0,38	a
U24	0,41	a
U28	0,49	a
M32	0,50	a
U32	0,56	a

Uji Duncan

Sx = 0,08

Perlakuan	Selangan	UJD 5%
2	0	3,635 x 0,08 = 0,29
3	1	3,749 x 0,08 = 0,30
4	2	3,796 x 0,08 = 0,30
5	3	3,814 x 0,08 = 0,30
6	4	3,814 x 0,08 = 0,30

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
M24	0,30	a
M28	0,38	a
U24	0,41	a
U28	0,49	a
M32	0,50	a
U32	0,56	a

Kesimpulan: Ekstrak kasar *Spirulina* sp. tertinggi terdapat pada perlakuan U32 yaitu dengan metode ultrasonik menggunakan waktu ekstraksi 32 menit sebesar 0,56 g.

Post Hoc Test Waktu

Multiple Comparisons

Ekstrak Pigmen LSD						
(I) Waktu	(J) Waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
24 Menit	28 Menit	0,1183	0,07990	0,164	-0,0557	0,2924
	32 Menit	-0,0100	0,07990	0,902	-0,1841	0,1641
28 Menit	24 Menit	-0,1183	0,07990	0,164	-0,2924	0,0557
	32 Menit	-0,1283	0,07990	0,134	-0,3024	0,0457
32 Menit	24 Menit	0,0100	0,07990	0,902	-0,1641	0,1841
	28 Menit	0,1283	0,07990	0,134	-0,0457	0,3024

Lampiran 3. Data dan Hasil Yield Ekstrak *Spirulina* sp.

Perlakuan	Sampel (g)	Berat Ekstrak Kasar (g)			Yield Ekstrak (%)			SD	Rerata
		U1	U2	U3	U1	U2	U3		
U24	12	0,54	0,29	0,41	4,51	2,40	3,39	1,06	3,43
U28	12	0,27	0,51	0,69	2,22	4,28	5,78	1,78	4,09
U32	12	0,63	0,31	0,73	5,25	2,59	6,04	1,81	4,63
M24	12	0,36	0,25	0,29	2,98	2,04	2,40	0,47	2,47
M28	12	0,49	0,38	0,29	4,04	3,18	2,40	0,82	3,21
M32	12	0,57	0,41	0,51	4,75	3,39	4,28	0,69	4,14

Perlakuan	Total Ekstrak β -Karoten (g)			SD	Rerata
	U1	U2	U3		
U24	4,51	2,40	3,39	1,06	3,43
U28	2,22	4,28	5,78	1,78	4,09
U32	5,25	2,59	6,04	1,81	4,63
M24	2,98	2,04	2,40	0,47	2,47
M28	4,04	3,18	2,40	0,82	3,21
M32	4,75	3,39	4,28	0,69	4,14

Perhitungan:

$$\text{Yield ekstrak} = \frac{\text{Berat sampel (g)}}{\text{Berat ekstrak (g)}} \times 100\%$$

$$\text{U24} \quad \text{U1} = \frac{0,54 \text{ (g)}}{12 \text{ (g)}} \times 100 \% = 4,51 \%$$

$$\text{U2} = \frac{0,29 \text{ (g)}}{12 \text{ (g)}} \times 100 \% = 2,40 \%$$

$$\text{U3} = \frac{0,41 \text{ (g)}}{12 \text{ (g)}} \times 100 \% = 3,39 \%$$

$$\text{U28} \quad \text{U1} = \frac{0,27 \text{ (g)}}{12 \text{ (g)}} \times 100 \% = 2,22 \%$$

$$\text{U2} = \frac{0,51 \text{ (g)}}{12 \text{ (g)}} \times 100 \% = 4,28 \%$$

$$\text{U3} = \frac{0,69 \text{ (g)}}{12 \text{ (g)}} \times 100 \% = 5,78 \%$$

$$\text{U32} \quad \text{U1} = \frac{0,63 \text{ (g)}}{12 \text{ (g)}} \times 100 \% = 5,25 \%$$

$$U2 = \frac{0,31 \text{ (g)}}{12 \text{ (g)}} \times 100 \% = 2,59 \%$$

$$U3 = \frac{0,73 \text{ (g)}}{12 \text{ (g)}} \times 100 \% = 6,04 \%$$

M24 $U1 = \frac{0,36 \text{ (g)}}{12 \text{ (g)}} \times 100 \% = 2,98 \%$

$$U2 = \frac{0,25 \text{ (g)}}{12 \text{ (g)}} \times 100 \% = 2,04 \%$$

$$U3 = \frac{0,29 \text{ (g)}}{12 \text{ (g)}} \times 100 \% = 2,40 \%$$

M28 $U1 = \frac{0,49 \text{ (g)}}{12 \text{ (g)}} \times 100 \% = 4,04 \%$

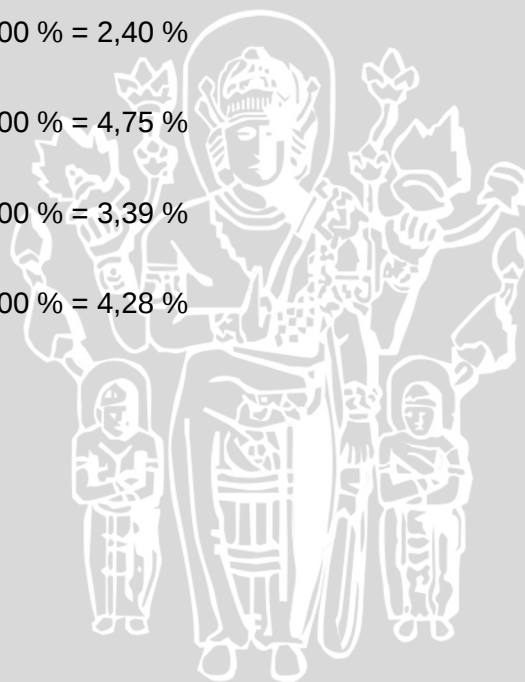
$$U2 = \frac{0,38 \text{ (g)}}{12 \text{ (g)}} \times 100 \% = 3,18 \%$$

$$U3 = \frac{0,29 \text{ (g)}}{12 \text{ (g)}} \times 100 \% = 2,40 \%$$

M32 $U1 = \frac{0,57 \text{ (g)}}{12 \text{ (g)}} \times 100 \% = 4,75 \%$

$$U2 = \frac{0,41 \text{ (g)}}{12 \text{ (g)}} \times 100 \% = 3,39 \%$$

$$U3 = \frac{0,51 \text{ (g)}}{12 \text{ (g)}} \times 100 \% = 4,28 \%$$



Npar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test				
		Metode	Waktu	Yield Ekstrak
	N	18	18	18
Normal Parameters ^a	Mean	15.000	20.000	36.622
	Std. Deviation	0.51450	0.84017	125.920
Most Extreme Differences	Absolute	0.334	0.216	0.141
	Positive	0.334	0.216	0.141
	Negative	- 0.334	- 0.216	- 0.099
Kolmogorov-Smirnov Z		1.419	0.918	0.599
Asymp. Sig. (2-tailed)		0.036	0.368	0.866

a. Test distribution is Normal.

Univariate Analysis of Variance Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Metode Ekstraksi	1	Ultrasonik	9
	2	Maserasi	9
Waktu Ekstraksi	1	24 menit	6
	2	28 menit	6
	3	32 menit	6

Estimated Marginal Means

1. Metode Ekstraksi

Dependent Variable: *Yield Ekstrak*

Metode Ekstraksi	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
Ultrasonik	4.051	0.407	3.164	4.938
Maserasi	3.273	0.407	2.386	4.160

2. Waktu Ekstraksi

Dependent Variable: *Yield Ekstrak*

Waktu Ekstraksi	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
24 menit	2.953	0.499	1.867	4.040
28 menit	3.650	0.499	2.564	4.736
32 menit	4.383	0.499	3.297	5.470

3. Metode Ekstraksi * Waktu Ekstraksi

Dependent Variable: Yield Ekstrak

Metode Ekstraksi	Waktu Ekstraksi	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Ultrasonik	24 menit	3.433	0.705	1.897	4.970
	28 menit	4.093	0.705	2.557	5.630
	32 menit	4.627	0.705	3.090	6.163
Maserasi	24 menit	2.473	0.705	0.937	4.010
	28 menit	3.207	0.705	1.670	4.743
	32 menit	4.140	0.705	2.604	5.676

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Yield Ekstrak

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	9.053	5	1.811	1.214	0.060
Intercept	241.414	1	241.414	161.824	0.000
Metode	2.722	1	2.722	1.825	0.002
Waktu	6.136	2	3.068	2.057	0.071
Metode*Waktu	0.195	2	0.097	0.065	0.037
Error	17.902	12	0.249		
Total	268.369	18			
Corrected Total	26.955	17			

BNT 5%

T tabel = 2,571

$$\text{BNT } 5\% = t_{0,05} \times \sqrt{\frac{2 \text{ KT Galat}}{\text{Ulangan}}} = 2,571 \times \sqrt{\frac{2 \times 0,249}{3}} = 1,05$$

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
M24	2,47	a
M28	3,21	a
U24	3,43	a
U28	4,09	a
M32	4,14	a
U32	4,63	a

Uji Duncan

$$S_x = 0,29$$

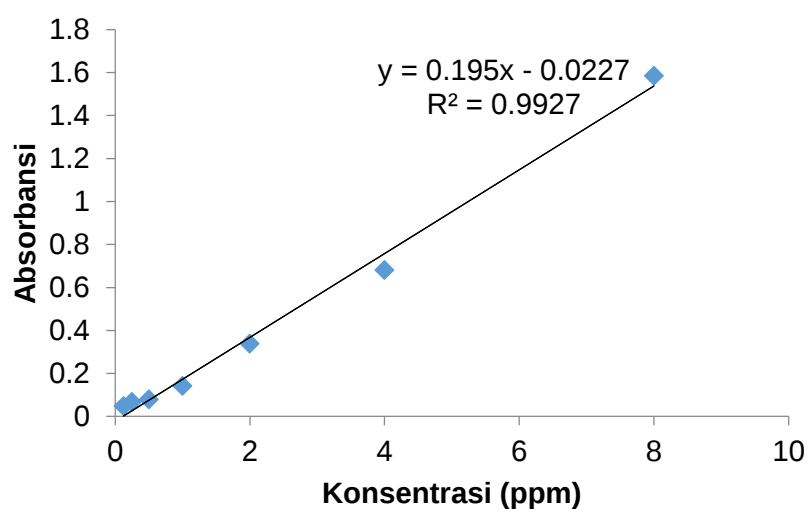
Perlakuan	Selangan	UJD 5%
2	0	$3,635 \times 0,29 = 1,05$
3	1	$3,749 \times 0,29 = 1,08$
4	2	$3,796 \times 0,29 = 1,09$
5	3	$3,814 \times 0,29 = 1,10$
6	4	$3,814 \times 0,29 = 1,10$

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
M24	2,47	a
M28	3,21	a
U24	3,43	a
U28	4,09	a
M32	4,14	a
U32	4,63	b

Kesimpulan: *Yield* ekstrak *Spirulina* sp. tertinggi terdapat pada perlakuan U32 yaitu dengan metode ultrasonik menggunakan waktu ekstraksi 32 menit sebesar 4,63%.

Lampiran 4. Data dan Hasil Total Karotenoid *Spirulina* sp.Kurva Regresi Linier Standard β -Karoten

X	Y
8	1,585
4	0,68
2	0,338
1	0,141
0,5	0,079
0,25	0,067
0,125	0,047



Perlakuan	Absorbansi			Berat Ekstrak (g)			Total Karotenoid (ug/g)			SD	Rerata
	U1	U2	U3	U1	U2	U3	U1	U2	U3		
U24	0,145	0,103	0,136	0,2057	0,2264	0,2091	4,1634	2,8314	3,8750	0,70	3,62
U28	0,117	0,136	0,168	0,2081	0,2108	0,2022	3,4254	3,8437	4,8188	0,72	4,03
U32	0,182	0,134	0,191	0,2006	0,2015	0,2078	5,2151	3,9702	5,2565	0,73	4,81
M24	0,073	0,081	0,128	0,2019	0,2104	0,2072	2,4130	2,5105	3,7125	0,72	2,88
M28	0,083	0,102	0,129	0,2276	0,2185	0,2063	2,3658	2,9103	3,7536	0,70	3,01
M32	0,135	0,09	0,106	0,2018	0,2231	0,2048	3,9897	2,5744	3,2051	0,71	3,26

Perlakuan	Total Karotenoid (ug/g)			Total	Rerata
	U1	U2	U3		
U24	4,1634	2,8314	3,8750	10,8698	3,6233
U28	3,4254	3,8437	4,8188	12,0879	4,0293
U32	5,2151	3,9702	5,2565	14,4419	4,8140
M24	2,4130	2,5105	3,7125	8,6360	2,8787
M28	2,3658	2,9103	3,7536	9,0297	3,0099
M32	3,9897	2,5744	3,2051	9,7693	3,2564
Total	21,5724	18,6405	24,6215	64,8344	

Perhitungan:

Total karotenoid : $y = ax + b$

absorbansi

$$= 0,195x - 0,022$$

$$x = \frac{\text{absorbansi} + 0,022}{0,1951} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right)$$

$$\text{U24} \quad \text{U1} = \frac{0,145 + 0,022}{0,195} = 0,8564 \left(\frac{\mu\text{g}}{0,2057 \text{ g}} \right) = 4,1634 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right)$$

$$\text{U2} = \frac{0,103 + 0,022}{0,195} = 0,6410 \left(\frac{\mu\text{g}}{0,2264 \text{ g}} \right) = 2,8314 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right)$$

$$\text{U3} = \frac{0,136 + 0,022}{0,195} = 0,8102 \left(\frac{\mu\text{g}}{0,2091 \text{ g}} \right) = 3,8750 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right)$$

$$\text{U28} \quad \text{U1} = \frac{0,117 + 0,022}{0,195} = 0,7128 \left(\frac{\mu\text{g}}{0,2081 \text{ g}} \right) = 3,4254 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right)$$

$$\text{U2} = \frac{0,136 + 0,022}{0,195} = 0,8102 \left(\frac{\mu\text{g}}{0,2108 \text{ g}} \right) = 3,8437 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right)$$

$$\text{U3} = \frac{0,168 + 0,022}{0,195} = 0,9743 \left(\frac{\mu\text{g}}{0,2022 \text{ g}} \right) = 4,8188 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right)$$

$$\text{U32} \quad \text{U1} = \frac{0,182 + 0,022}{0,195} = 1,0461 \left(\frac{\mu\text{g}}{0,2006 \text{ g}} \right) = 5,2151 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right)$$

$$\text{U2} = \frac{0,134 + 0,022}{0,195} = 0,8 \left(\frac{\mu\text{g}}{0,2015 \text{ g}} \right) = 3,9702 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right)$$

$$\text{U3} = \frac{0,191 + 0,022}{0,195} = 1,0923 \left(\frac{\mu\text{g}}{0,2078 \text{ g}} \right) = 5,2565 \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right)$$

$$M24 \quad U1 = \frac{0,073 + 0,022}{0,195} = 0,4871 \left(\frac{\mu g}{0,2019 \text{ g}} \right) = 2,4130 \left(\frac{\mu g}{g} \right)$$

$$U2 = \frac{0,081 + 0,022}{0,195} = 0,5282 \left(\frac{\mu g}{0,2104 \text{ g}} \right) = 2,5105 \left(\frac{\mu g}{g} \right)$$

$$U3 = \frac{0,128 + 0,022}{0,195} = 0,7692 \left(\frac{\mu g}{0,2072 \text{ g}} \right) = 3,7125 \left(\frac{\mu g}{g} \right)$$

$$M28 \quad U1 = \frac{0,083 + 0,022}{0,195} = 0,5384 \left(\frac{\mu g}{0,2276 \text{ g}} \right) = 2,3658 \left(\frac{\mu g}{g} \right)$$

$$U2 = \frac{0,102 + 0,022}{0,195} = 0,6358 \left(\frac{\mu g}{0,2185 \text{ g}} \right) = 2,9103 \left(\frac{\mu g}{g} \right)$$

$$U3 = \frac{0,129 + 0,022}{0,195} = 0,7743 \left(\frac{\mu g}{0,2063 \text{ g}} \right) = 3,7526 \left(\frac{\mu g}{g} \right)$$

$$M32 \quad U1 = \frac{0,135 + 0,022}{0,195} = 0,8051 \left(\frac{\mu g}{0,2018 \text{ g}} \right) = 3,9897 \left(\frac{\mu g}{g} \right)$$

$$U2 = \frac{0,090 + 0,022}{0,195} = 0,5743 \left(\frac{\mu g}{0,2231 \text{ g}} \right) = 2,5744 \left(\frac{\mu g}{g} \right)$$

$$U3 = \frac{0,106 + 0,022}{0,195} = 0,6564 \left(\frac{\mu g}{0,2048 \text{ g}} \right) = 3,2051 \left(\frac{\mu g}{g} \right)$$



Npar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Total Karotenoid	Metode	Waktu
N		18	18	18
Normal Parameters ^a	Mean	3,6019	1,5000	2,0000
	Std. Deviation	0,90876	0,51450	0,84017
Most Extreme Differences	Absolute	0,113	0,334	0,216
	Positive	0,113	0,334	0,216
	Negative	-0,104	-0,334	-0,216
Kolmogorov-Smirnov Z		0,478	1,419	0,918
Asymp. Sig. (2-tailed)		0,977	0,036	0,368

a. Test distribution is Normal.

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Metode	1,00	Ultrasonik	9
	2,00	Maserasi	9
Waktu	1,00	24 Menit	6
	2,00	28 Menit	6
	3,00	32 Menit	6

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Total Karotenoid

Metode	Waktu	Mean	Std. Deviation	N
Ultrasonik	24 Menit	4,2680	0,89942	3
	28 Menit	3,5484	0,62418	3
	32 Menit	4,6501	0,70603	3
	Total	4,1555	0,81175	9
Maserasi	24 Menit	2,9228	0,92423	3
	28 Menit	2,6651	0,21477	3
	32 Menit	3,5571	0,30550	3
	Total	3,0483	0,63754	9
Total	24 Menit	3,5954	1,09913	6
	28 Menit	3,1068	0,63906	6
	32 Menit	4,1036	0,77145	6
	Total	3,6019	0,90876	18

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable : Total Karotenoid

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8,658	5	1,732	3,861	0,026
Intercept	233,528	1	233,528	520,742	0,000
Metode	5,516	1	5,516	12,301	0,004
Waktu	2,981	2	1,491	3,324	0,001
Metode * Waktu	,160	2	0,080	0,179	0,038
Error	5,381	12	0,410		
Total	247,567	18			
Corrected Total	14,039	17			

BNT Test

T tabel = 2,571

$$\text{BNT } 5\% = t_{0,05} \times \sqrt{\frac{2 \text{ KT Galat}}{\text{Ulangan}}} = 2,571 \times \sqrt{\frac{2 \times 0,410}{3}} = 1,128$$

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
M24	2,88	a
M28	3,01	a
M32	3,26	a
U24	3,62	a
U28	4,03	b
U32	4,81	b

Uji Duncan

Sx = 0,37

Perlakuan	Selangan	UJD 5%
2	0	3,635 x 0,37 = 1,34
3	1	3,749 x 0,37 = 1,39
4	2	3,796 x 0,37 = 1,40
5	3	3,814 x 0,37 = 1,41
6	4	3,814 x 0,37 = 1,41

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
M24	2,88	a
M28	3,01	a
M32	3,26	a
U24	3,62	a
U28	4,03	a
U32	4,81	b

Kesimpulan: Total karotenoid tertinggi terdapat pada perlakuan U32 yaitu dengan metode ultrasonik menggunakan waktu ekstraksi 32 menit sebesar 4,81 ug/g.

Post Hoc Test Waktu

Multiple Comparisons						
Total Karotenoid LSD						
(I) Waktu	(J) Waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
24 Menit	28 Menit	0,4887	0,38663	0,230	-0,3537	1,3310
	32 Menit	-0,5082	0,38663	0,213	-1,3506	0,3342
28 Menit	24 Menit	-0,4887	0,38663	0,230	-1,3310	0,3537
	32 Menit	-0,9968	0,38663	0,024	-1,8392	-0,1544
32 Menit	24 Menit	0,5082	0,38663	0,213	-0,3342	1,3506
	28 Menit	0,9968	0,38663	0,024	0,1544	1,8392

Lampiran 5 . Data Total Yield β -Karoten

Perlakuan	Botol	Absorbansi			Yield β -Karoten (ug/0,3g)			Yield β -Karoten eq (ug/g)			SD	Rerata
		U1	U2	U3	U1	U2	U3	U1	U2	U3		
U24	1	1,208	1,241	1,3	6,31	6,48	6,78					
	2	0,933	0,942	0,947	4,90	4,94	4,97	50,376	51,009	52,154	0,90	51,18
	3	0,74	0,735	0,738	3,91	3,88	3,90					
U28	1	2,231	2,287	2,265	11,55	11,84	11,73	57,769	59,205	58,641	0,72	58,54
U32	1	1,802	1,823	1,837	9,35	9,46	9,53					
	2	1,153	1,163	1,166	6,03	6,08	6,10	67,829	69,026	69,094	0,71	68,65
	3	0,947	0,986	0,973	4,97	5,17	5,10					
M24	1	1,585	1,506	1,51	8,24	7,84	7,86					
	2	1,091	1,079	1,063	5,71	5,65	5,56	48,444	46,906	46,752	0,94	47,37
	3	0,092	0,093	0,096	0,58	0,59	0,60					
M28	1	2,993	2,99	2,913	15,46	15,45	15,05	51,538	51,487	50,171	0,78	51,07
M32	1	1,896	1,878	1,813	9,84	9,74	9,41					
	2	1,571	1,568	1,571	8,17	8,15	8,17	60,017	59,658	58,598	0,74	59,42

Perlakuan	U1	U2	U3	Total	Rerata
M24	50,376	51,009	52,154	153,538	51,179
M28	59,205	59,205	58,641	177,051	59,017
U24	67,829	69,026	69,094	205,949	68,650
U28	48,444	46,906	46,752	142,103	47,368
M32	51,538	51,487	50,171	153,197	51,066
U32	60,017	59,658	58,598	178,274	59,425
Total	337,410	337,291	335,410	1010,111	

Perhitungan:

$$\text{Total Yield } \beta\text{-karoten} = \frac{\text{Nilai absorbansi} + 0,022}{0,195} \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$$

$$\text{U24 U1 B1} = \frac{1,208 + 0,022}{0,195} = 6,308 \frac{\mu\text{g}}{0,3\text{g}}$$

$$\text{B2} = \frac{0,933 + 0,022}{0,195} = 4,897 \frac{\mu\text{g}}{0,3\text{g}}$$

$$\text{B3} = \frac{0,74 + 0,022}{0,195} = 3,908 \frac{\mu\text{g}}{0,3\text{g}}$$

$$\text{U2 B1} = \frac{1,241 + 0,022}{0,195} = 6,477 \frac{\mu\text{g}}{0,3\text{g}}$$

$$\text{B2} = \frac{0,942 + 0,022}{0,195} = 4,944 \frac{\mu\text{g}}{0,3\text{g}}$$

$$\text{B3} = \frac{0,735 + 0,022}{0,195} = 3,882 \frac{\mu\text{g}}{0,3\text{g}}$$

$$\text{U3 B1} = \frac{1,3 + 0,022}{0,195} = 6,779 \frac{\mu\text{g}}{0,3\text{g}}$$

$$\text{B2} = \frac{0,947 + 0,022}{0,195} = 4,969 \frac{\mu\text{g}}{0,3\text{g}}$$

$$\text{B3} = \frac{0,738 + 0,022}{0,195} = 3,897 \frac{\mu\text{g}}{0,3\text{g}}$$

Total Yield β -karoten

$$\begin{aligned} \text{U1} &= \text{B1} + \text{B2} + \text{B3} = 6,308 + 4,897 + 3,908 \\ &= 15,113 \frac{\mu\text{g}}{0,3\text{g}} = 50,376 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{U2} &= \text{B1} + \text{B2} + \text{B3} = 6,477 + 4,944 + 3,882 \\ &= 15,303 \frac{\mu\text{g}}{0,3\text{g}} = 51,009 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{U3} &= \text{B1} + \text{B2} + \text{B3} = 6,779 + 4,969 + 3,897 \\ &= 15,646 \frac{\mu\text{g}}{0,3\text{g}} = 52,154 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \end{aligned}$$

$$\text{U28 U1 B1} = \frac{2,231 + 0,022}{0,195} = 11,554 \frac{\mu\text{g}}{0,3\text{g}}$$

$$\text{U2 B1} = \frac{2,287 + 0,022}{0,195} = 11,841 \frac{\mu\text{g}}{0,3\text{g}}$$

$$\text{U3 B1} = \frac{2,265 + 0,022}{0,195} = 11,728 \frac{\mu\text{g}}{0,3\text{g}}$$

Total Yield β -karoten

$$U1 = B1 = 11,554 \frac{\mu g}{0,3g} = 57,769 \frac{\mu g}{g}$$

$$U2 = B1 = 11,841 \frac{\mu g}{0,3g} = 59,205 \frac{\mu g}{g}$$

$$U3 = B1 = 11,728 \frac{\mu g}{0,3g} = 58,641 \frac{\mu g}{g}$$

$$U32 \quad U1 \ B1 = \frac{1,803 + 0,022}{0,195} = 9,354 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$B2 = \frac{1,153 + 0,022}{0,195} = 9,462 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$B3 = \frac{0,947 + 0,022}{0,195} = 9,533 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$U2 \ B1 = \frac{1,823 + 0,022}{0,195} = 6,026 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$B2 = \frac{1,166 + 0,022}{0,195} = 6,077 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$B3 = \frac{0,986 + 0,022}{0,195} = 6,092 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$U3 \ B1 = \frac{1,837 + 0,022}{0,195} = 4,969 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$B2 = \frac{1,166 + ,022}{0,195} = 5,169 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$B3 = \frac{0,973 + 0,022}{0,195} = 5,103 \frac{\mu g}{0,3g}$$

Total Yield β -karoten

$$\begin{aligned} U1 = B1 + B2 + B3 &= 9,354 + 9,462 + 9,533 \\ &= 15,113 \frac{\mu g}{0,3g} = 50,376 \frac{\mu g}{g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} U2 = B1 + B2 + B3 &= 6,026 + 6,077 + 6,092 \\ &= 15,303 \frac{\mu g}{0,3g} = 51,009 \frac{\mu g}{g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} U3 = B1 + B2 + B3 &= 4,969 + 5,169 + 5,103 \\ &= 15,646 \frac{\mu g}{0,3g} = 52,154 \frac{\mu g}{g} \end{aligned}$$

$$M24 \quad U1 \ B1 = \frac{1,585 + 0,022}{0,195} = 8,241 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$B2 = \frac{1,091 + 0,022}{0,195} = 5,708 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$B3 = \frac{0,092 + 0,022}{0,195} = 0,585 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$U2 \ B1 = \frac{1,506 + 0,022}{0,195} = 7,836 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$B2 = \frac{1,079 + 0,022}{0,195} = 5,646 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$B3 = \frac{0,093 + 0,022}{0,195} = 0,590 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$U3 \ B1 = \frac{1,51 + 0,022}{0,195} = 7,856 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$B2 = \frac{1,063 + 0,022}{0,195} = 5,564 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$B3 = \frac{0,096 + 0,022}{0,195} = 0,605 \frac{\mu g}{0,3g}$$

Total Yield β -karoten

$$U1 = B1 + B2 + B3 = 8,241 + 5,708 + 0,585 \\ = 14,533 \frac{\mu g}{0,3g} = 48,444 \frac{\mu g}{g}$$

$$U2 = B1 + B2 + B3 = 7,836 + 5,646 + 0,590 \\ = 14,072 \frac{\mu g}{0,3g} = 46,906 \frac{\mu g}{g}$$

$$U3 = B1 + B2 + B3 = 7,856 + 5,564 + 0,605 \\ = 14,026 \frac{\mu g}{0,3g} = 46,752 \frac{\mu g}{g}$$

$$M28 \ U1 \ B1 = \frac{2,993 + 0,022}{0,195} = 15,462 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$U2 \ B1 = \frac{2,99 + 0,022}{0,195} = 15,446 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$U3 \ B1 = \frac{2,913 + 0,022}{0,195} = 15,051 \frac{\mu g}{0,3g}$$

Total β -karoten

$$U1 = B1 = 15,462 \frac{\mu g}{0,3g} = 51,538 \frac{\mu g}{g}$$

$$U2 = B1 = 15,446 \frac{\mu g}{0,3g} = 51,487 \frac{\mu g}{g}$$

$$U3 = B1 = 15,051 \frac{\mu g}{0,3g} = 50,171 \frac{\mu g}{g}$$

$$M32 \ U1 \ B1 = \frac{1,896 + 0,022}{0,195} = 9,836 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$B2 = \frac{1,571 + 0,022}{0,195} = 8,169 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$U2 B1 = \frac{1,878 + 0,022}{0,195} = 9,744 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$B2 = \frac{1,568 + 0,022}{0,195} = 8,154 \frac{\mu g}{0,3g}$$

$$U3 B1 = \frac{1,813 + 0,022}{0,195} = 9,410 \frac{\mu g}{0,3g}$$

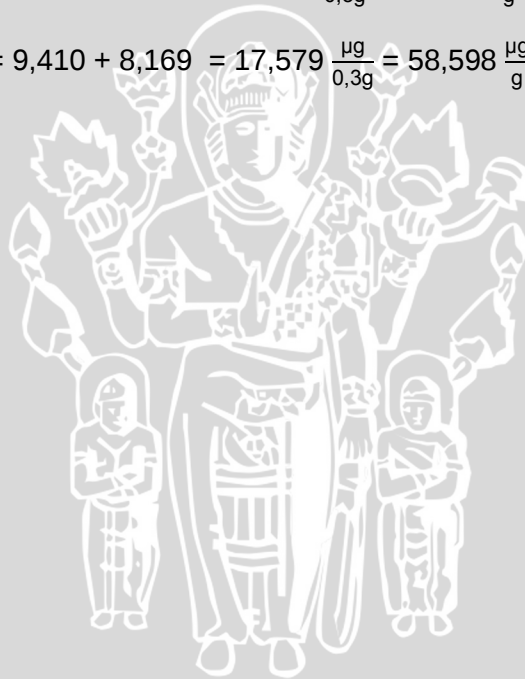
$$B2 = \frac{1,571 + ,022}{0,195} = 8,169 \frac{\mu g}{0,3g}$$

Total β-karoten

$$U1 = B1 + B2 = 9,836 + 8,169 = 18,005 \frac{\mu g}{0,3g} = 60,017 \frac{\mu g}{g}$$

$$U2 = B1 + B2 = 9,744 + 8,154 = 17,897 \frac{\mu g}{0,3g} = 59,658 \frac{\mu g}{g}$$

$$U3 = B1 + B2 = 9,410 + 8,169 = 17,579 \frac{\mu g}{0,3g} = 58,598 \frac{\mu g}{g}$$



Npar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Metode	Waktu	Total Yield β -Karoten
N		18	18	18
Normal Parameters ^a	Mean	1,5000	2,0000	56,0383
	Std. Deviation	0,51450	0,84017	7,31093
Most Extreme Differences	Absolute	0,334	0,216	0,203
	Positive	0,334	0,216	0,203
	Negative	-0,334	-0,216	-0,113
Kolmogorov-Smirnov Z		1,419	0,918	0,859
Asymp. Sig. (2-tailed)		0,036	0,368	0,451

a. Test distribution is Normal.

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Metode	1,00	Ultrasonik	9
	2,00	Maserasi	9
Waktu	1,00	24 Menit	6
	2,00	28 Menit	6
	3,00	32 Menit	6

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Total β -Karoten

Metode	Waktu	Mean	Std. Deviation	N
Ultrasonik	24 Menit	58,6600	8,75898	3
	28 Menit	59,7500	9,02213	3
	32 Menit	59,9600	8,54679	3
	Total	59,4567	7,62606	9
Maserasi	24 Menit	53,3333	5,99468	3
	28 Menit	52,6867	6,45869	3
	32 Menit	51,8400	6,09896	3
	Total	52,6200	5,39747	9
Total	24 Menit	55,9967	7,31945	6
	28 Menit	56,2183	8,01328	6
	32 Menit	55,9000	7,99239	6
	Total	56,0383	7,31093	18

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Total Yield β -Karoten

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	216,617	5	43,323	,751	0,001
Intercept	56525,306	1	56525,306	980,167	0,000
Metode	210,330	1	210,330	3,647	0,010
Waktu	0,320	2	0,160	0,003	0,017
Metode * Waktu	5,968	2	2,984	0,052	0,005
Error	6,470	12	0,539		
Total	56965,011	18			
Corrected Total	908,646	17			

BNT Test

T tabel = 2,571

$$\text{BNT } 5\% = t_{0,05} \times \sqrt{\frac{2 \text{ KT Galat}}{\text{Ulangan}}} = 2,571 \times \sqrt{\frac{2 \times 0,539}{3}} = 1,541$$

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
M24	47,37	a
M28	51,07	b
U24	51,18	b
U28	58,54	c
M32	59,42	d
U32	68,65	e

Uji Duncan

Sx = 0,42

Perlakuan	Selangan	UJD 5%
2	0	3,635 x 0,42 = 1,54
3	1	3,749 x 0,42 = 1,59
4	2	3,796 x 0,42 = 1,61
5	3	3,814 x 0,42 = 1,62
6	4	3,814 x 0,42 = 1,62

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
M24	47,37	a
M28	51,07	b
U24	51,18	b
U28	58,54	c
M32	59,42	c
U32	68,65	d

Kesimpulan: Total Yield β -karoten tertinggi terdapat pada perlakuan U32 yaitu dengan metode ultrasonik menggunakan waktu ekstraksi 32 menit sebesar 68,65 ug/g.

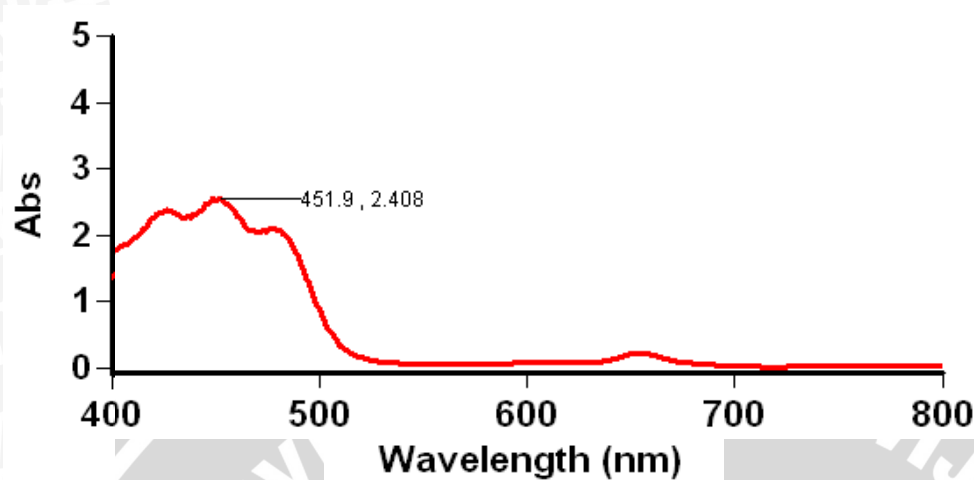
Pos Hoc Test

Waktu

Multiple Comparisons

Total Yield β -Karoten LSD						
(I) Waktu	(J) Waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
24 Menit	28 Menit	-0,2217	4,38441	0,961	-9,7745	9,3311
	32 Menit	0,0967	4,38441	0,983	-9,4561	9,6495
28 Menit	24 Menit	0,2217	4,38441	0,961	-9,3311	9,7745
	32 Menit	0,3183	4,38441	0,943	-9,2345	9,8711
32 Menit	24 Menit	-0,0967	4,38441	0,983	-9,6495	9,4561
	28 Menit	-0,3183	4,38441	0,943	-9,8711	9,2345

Lampiran 6. Pola Spektra Senyawa β -Karoten



Scan Analysis Report

Report Time : Thu 08 Oct 10:29:40 AM 2015

Method:

Batch: D:\Layanan Analisa\UB\Vandy Nur Faizal\Lamdha Maks Standar Beta Karoten

AlR3 (08-10-2015).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: Standar

Collection Time

10/8/2015 10:31:19 AM

Peak Table

Peak Style

Peak Threshold

Range

Peaks

0.0100

799.9nm to 200.1nm

Wavelength (nm)	Abs
654.9	0.186
480.9	1.955
478.0	1.961
473.9	1.937
451.9	2.408
450.0	2.394
438.0	2.145
428.9	2.230
427.0	2.241
373.1	1.258
370.0	1.232
328.0	2.562
325.0	3.227
323.0	3.223
320.0	3.637
318.0	10.000
316.0	10.000
309.1	4.423
305.0	4.268

302.0	3.387
300.0	4.104
295.9	10.000
293.0	10.000
290.0	3.635
287.9	4.289
285.0	3.226
282.0	3.622
279.9	3.516
278.1	10.000
276.0	3.535
273.0	3.453
270.0	4.761
267.1	10.000
265.0	3.261
262.0	3.801
260.0	10.000
257.9	3.775
255.0	3.809
252.0	3.662
249.9	3.793
247.0	4.029
244.0	3.746
241.9	10.000
239.0	10.000
236.9	10.000
234.0	3.020
231.0	10.000
228.9	10.000
224.1	4.587
220.9	4.097
217.0	3.994
215.0	3.870
212.9	3.552
211.1	4.383
209.0	4.089
206.0	3.770
201.9	3.594



Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian

➤ Kultur Mikroalga *Spirulina* sp.



a.



b.



c.

Keterangan:

- a. Kultur dilakukan di BBAP Situbondo
- b. Kultur laboratorium kapasitas 1 – 2 liter
- c. Kultur intermediete kapasitas 1000 liter

➤ Ekstraksi *Spirulina* sp.



a.



b.



c.



d.



e.



f.



g.



h.



i.



j.



k.

Keterangan:

- Spirulina* sp. kering 2 g
- Ditetesi pelarut metanol PA secukupnya
- Ditambahkan pelarut n-heksan 100 mL
- Ekstraksi dengan ultrasonik pada frekuensi 40 kHz dan amplitudo 54 selama 24, 28, dan 32 menit
- Ekstraksi dengan maserasi pada suhu 30° C selama 24, 28, dan 32 menit
- Hasil ekstraksi ditampung dalam cuvet
- Sentrifuse 3000 rpm pada suhu 27° C selama 15 menit
- Penyaringan residu dengan kertas Whatman No. 42
- Dipartisi dengan perbandingan filtrat : dietil eter : saturasi garam : air (100 mL : 50 mL : 120 mL : 10 mL)
- Evaporasi 10 rpm pada suhu 32° C
- Sisa pelarut diuapkan dengan gas N₂

➤ **Isolasi Senyawa β -Karoten dengan Kromatografi Kolom**



a.



b.



c.



d.



e.



f.

Keterangan:

- Ditimbang 20 g silica gel sebagai fase diam
- Ditambahkan fase gerak (petroleum eter) 100 mL lalu distirer selama 15 menit
- Ditimbang ekstrak pekat *Spirulina* sp. 0,2 g
- Proses isolasi senyawa β -Karoten
- Fraksi yang muncul ditampung pada botol fial
- Diuapkan dengan N_2 agar pelarut hilang

➤ Spektrofotometer UV-Vis



a.



b.



c.



d.



e.



f.

Keterangan:

- Ditimbang 0,0032 g sampel standard β -Karoten
- Diitambahkan pelarut PE hingga 25 mL
- Dilakukan pengenceran 8 ppm, 4 ppm, 2 ppm, 1 ppm, 0,5 ppm, 0, 25 ppm, 0,125 ppm
- Menentukan *blank zero*
- Masukkan standard β -Karoten ke dalam cuvet
- Diukur nilai absorbansi