

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KLOROFIL *a* DENGAN
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) PADA ALGA
COKELAT (*Sargassum filipendula*)**

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

Oleh :
**SHANTI MANULE
NIM. 0610830080**



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

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KLOROFIL *a* DENGAN
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) PADA ALGA
COKELAT (*Sargassum filipendula*)**

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

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

**Oleh :
SHANTI MANULE
NIM. 0610830080**



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

SKRIPSI

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KLOROFIL *a* DENGAN
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) PADA ALGA
COKELAT (*Sargassum filipendula*)

OLEH :
SHANTI MANULE
NIM. 0610830080

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

Menyetujui,

Dosen Penguji I,

Dosen Pembimbing I,

(Ir. DARIUS, M.Biotech)
Tanggal :

(Dr. Ir. HARTATI KARTIKA N., MS)
Tanggal :

Dosen Penguji II,

Dosen Pembimbing II,

(Ir. BAMBANG BUDI S., MS)
MP)
Tanggal :

(Ir. KARTINI ZAELANIE,
Tanggal :

MENGETAHUI,
KETUA JURUSAN MSP,

(Dr. Ir. HAPPY NURSYAM, MS.)
Tanggal :

RINGKASAN

SHANTI MANULE. Laporan Skripsi dengan judul Isolasi dan Identifikasi Klorofil a dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada Alga Cokelat (*Sargassum filipendula*) (di bawah bimbingan **Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS** dan **Ir. Kartini Zaelanie, MP**).

Pigmen merupakan molekul khusus yang dapat memunculkan warna dan mampu menyerap cahaya matahari dan memantulkannya pada panjang gelombang tertentu. *Sargassum filipendula* merupakan salah satu spesies dari alga cokelat (*Phaeophyta*). Umumnya alga cokelat tersebut mengandung berbagai pigmen baik dari golongan klorofil maupun dari golongan karotenoid.

Keberadaan klorofil a berfungsi sebagai penangkap cahaya utama dalam proses fotosintesis yaitu sekitar 99%, sedangkan karotenoid memiliki 2 aktivitas utama yaitu sebagai penangkap cahaya dan fotoprotektor terhadap akses cahaya (Gross, 1991). Klorofil a berwarna hijau biru karena menyerap cahaya dengan kuat di daerah merah dan biru pada spektrum tampak. Dengan adanya klorofil akan menyebabkan sel-sel tersebut berkemampuan menyerap energi cahaya, sehingga terjadi proses fotosintesis yang kemudian menghasilkan karbohidrat dan oksigen. Pada alga coklat, klorofil a berfungsi sebagai penangkap cahaya yang utama dalam proses fotosintesis yaitu sekitar 99 %. (Limantara dan Rahayu, 2008).

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Kimia Teknologi Hasil Pertanian (THP), Universitas Muhammadiyah Malang, pada bulan Juni – Juli 2010.

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

Komposisi pigmen hasil identifikasi pada alga coklat (*Sargassum filipendula*) meliputi : klorofil a, fukosantin, dan β -karoten. Nilai rendemen Klorofil a sebesar 0,036 % \pm 0,0022. Nilai Rf pigmen Klorofil a hasil identifikasi KLT (Kromatografi Lapis Tipis) adalah 0,42. Identifikasi pola spektra dan panjang gelombang (λ_{max}) pigmen Klorofil a dengan pelarut aseton dan dietil eter memiliki pola dan panjang gelombang yang mirip dengan penelitian Jeffrey, *et al.*, (1997) yaitu B (soret) : 430 nm; Qx : 616 nm; Qy : 662 nm.

Pada penelitian ini diharapkan lebih berhati-hati dalam proses preparasi kolom dan pemilihan ukuran (diameter dan tinggi) kolom agar pigmen klorofil a yang dihasilkan murni.

KATA PENGANTAR

Atas berkat rahmat dan karunia Tuhan Y.M.E, akhirnya penulis dapat menyelesaikan Laporan Skripsi dengan judul Isolasi Klorofil a Dari Alga Coklat (*Sargassum Filipendula*) Dengan Menggunakan Kromatografi Kolom. Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Perikanan pada Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.

Ucapan terimakasih sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada:

1. Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS selaku dosen pembimbing I dan Ir. Kartini Zaelanie, MP selaku dosen pembimbing II yang telah dengan sabar membimbing.
2. Dr. Nurul Mahmudati, M.Kes selaku ketua Laboratorium Kimia Fakultas MIPA dan segenap keluarga besar (mas angga, Pak Sandi) Universitas Muhamaddiyah Malang.
3. Kedua orang tua ku yang selalu memberi semangat dan dukungan, terutama ibuku (Bu Yayuk Manule) dan ayahku (Pak Yunus manule) serta adikku (Antok manule) yang sudah banyak membantu
4. Teman-teman "Tim Pigmen" yang selalu bersama-sama dari pagi sampai malam. Carda, Ima, Defi, Lisa dan Mas Hamim yang selalu membantu penelitian kami dari awal sampai akhir.
5. Teman dan sahabat THP 2006 yang sudah membantu, menemani, memberikan dorongan sehingga laporan ini bisa terselesaikan.

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

Malang, September 2010

Penulis

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Madura adalah sebuah pulau yang ada di Propinsi Jawa Timur, Sumenep adalah daerah di Madura. Daerah ini merupakan salah satu penghasil rumput laut di Indonesia rumput laut yang dihasilkan pertahunnya mencapai \pm 301.870 ton (Zulham, 2006). Pantai Sumenep sebagai penghasil rumput laut tidak diragukan, karena lingkungan ekologisnya yang menunjang bagi pertumbuhan rumput laut secara maksimal, selain itu pantainya juga terbebas dari polusi atau cemaran industri sehingga hasilnya aman diaplikasikan (Warkoyo, 2008).

Alga disebut juga dengan *seaweed* (rumput laut) merupakan tanaman fotosintetik tingkat rendah yang tidak memiliki perbedaan susunan kerangka seperti akar, batang dan daun. Wujudnya tampak seperti ada perbedaan, tetapi sesungguhnya merupakan bentuk *thallus* saja (Winarno, 1996). Ciri utama dari marga *Sargassum* khususnya jenis *Sargassum filipendula* ini adalah membentuk *thallus* yang umumnya silindris atau gepeng, percabangannya rimbun menyerupai pepohonan di darat dengan bangun daun melebar, lonjong atau seperti gepeng atau seperti pedang, mempunyai gelembung udara (*blader*) yang umumnya soliter, dan panjangnya mencapai tujuh meter dan warna *thallus* umumnya coklat (Kadi, 2008).

Secara taksonomi alga coklat diklasifikasikan dalam divisi *Phaeophyta* dengan ciri khas warna coklat pada seluruh bagian *thallus*. Warna ini disebabkan oleh adanya pigmen fukosantin yang dikandungnya (Nurdiana dan Limantara, 2008). Pigmen merupakan molekul khusus yang dapat

memunculkan warna dan mampu menyerap cahaya matahari dan memantulkannya pada panjang gelombang tertentu (Prangdimurti, 2007).

Pigmen yang terdapat pada alga coklat hingga saat ini belum banyak dimanfaatkan. Alga coklat mengandung pigmen klorofil (Klorofil a dan Klorofil c) dan kaya akan pigmen karotenoid (fukosantin, β -karoten) (Goodwin, 1974 dalam Agustina, *et al.*, 2007; Atmadja, *et al.*, 1996; dan Aslan, 1998). Ditambahkan oleh Pangestuti *et al* (2007), fukosantin merupakan pigmen dominan yang dimiliki alga coklat yang memberikan warna coklat pada seluruh bagian *thallus*. Pigmen klorofil terdapat dalam kloroplas bersama-sama dengan karotenoid dan santofil (Anis, 2008). Ditambahkan oleh Rahayu dan Limantara (2005) sebagian besar pigmen terdapat dalam daun dan terdapat dalam jumlah terbatas pada akar, batang, dan daun.

Sargassum polycystum dan *Sargassum filipendula* merupakan dua spesies dari alga coklat (*Phaeophyta*) (Indriani dan Sumarsih, 1992). Umumnya kedua alga tersebut mengandung berbagai pigmen baik dari golongan klorofil maupun dari golongan karotenoid. Nurdiana, *et al* (2008) menyatakan bahwa klorofil dan karotenoid merupakan pigmen yang melimpah pada alga coklat. Penelitian kandungan pigmen sebelumnya dilakukan oleh Widjayanti (2009), dengan ekstraksi menggunakan DMSO, metanol dan aseton serta teknik isolasi kromatografi kolom diketahui bahwa alga coklat terdiri dari berbagai macam pigmen yakni klorofil *a dan c*, fukosantin dan β -carotene.

Keberadaan klorofil *a* berfungsi sebagai penangkap cahaya utama dalam proses fotosintesis yaitu sekitar 99%, sedangkan karotenoid memiliki 2 aktivitas utama yaitu sebagai penangkap cahaya dan fotoprotektor terhadap akses cahaya (Gross, 1991). Tomita dan Oku (1971) dalam Nurcahyanti dan Limantara (2007) juga menyatakan bahwa kehadiran karotenoid mampu melindungi klorofil dari degradasi. Klorofil *a* dikenal sebagai pigmen fotosintensis berwarna hijau

biru karena menyerap cahaya dengan kuat di daerah merah dan biru pada spektrum tampak. Klorofil mudah terdegradasi menjadi turunannya (Gross, 1991). Hal ini terlihat pada struktur klorofil yang berbentuk lingkaran atau disebut dengan makrosiklik (Nurcahyanti dan Limantara, 2007). Salah satu faktor yang mempengaruhi degradasi klorofil adalah cahaya. Produk degradasi klorofil antara lain feofotin yaitu klorofil yang kehilangan atom magnesium (Mg) pada makrosikliknya (Pekey, *et al.*, 2008).

Klorofil dan turunannya memiliki karakteristik spesifik yang memungkinkan dilakukannya identifikasi secara spektroskopi. Molekul yang berwarna hijau tersebut memiliki serapan khas pada daerah biru dan merah dari spektrum tampak. Dengan demikian, identifikasi suatu kandungan dan komposisi pigmen dapat dilakukan dengan kromatografi dan spektrofotometri. Penyerapan cahaya dari pigmen dengan menggunakan kromatografi selanjutnya dapat dibandingkan dengan pustaka yang ada (Gross, 1991). Identifikasi pigmen yang berasal dari rumput laut diharapkan bisa membantu pengembangan serta pemanfaatannya ke depan (Christiana, *et al.*, 2008).

1.2 Permasalahan

Alga yang dapat dimanfaatkan adalah alga coklat (*phaeophyta*). Alga ini mempunyai kelimpahan yang sangat tinggi, namun pigmen yang terkandung didalamnya belum dimanfaatkan secara optimal (Handayani, *et al.*, 2004). *Sargassum filipendula* adalah salah satu spesies dari alga coklat (*Phaeophyta*) (Indriani dan Sumarsih, 1992). Klorofil dan karotenoid merupakan pigmen yang melimpah pada alga coklat (Nurdiana, *et al.*, 2008).

Pada dasarnya alga coklat mengandung pigmen klorofil dan kaya akan pigmen karotenoid (fukosantin dan β -karoten) (Goodwin, 1974; Atmadja, *et al.*,

1996). Limantara dan Puji Rahayu (2008), menyatakan klorofil dapat berfungsi sebagai obat karena dapat memperbaiki kondisi kesehatan yang buruk. Fungsi utamanya adalah sebagai pembersih, regulator dan regenerasi sel. Namun, penelitian mengenai komposisi pigmen pada alga coklat belum banyak dilakukan. Oleh karena itu dilakukan penelitian mengenai komposisi pigmen yang terdapat pada alga coklat khususnya *Sargassum filipendula*, berdasarkan uraian diatas didapatkan permasalahan :

- Apa sajakah penyusun (komposisi) pigmen alga coklat dan berapakah kandungan Klorofil a yang terdapat pada sargassum filipendula?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui komposisi pigmen alga coklat dan berapakah kandungan pigmen Klorofil a yang terdapat pada *Sargassum filipendula*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada pihak yang berkepentingan tentang komposisi pigmen dan kandungan Klorofil a yang terkandung pada alga coklat (*Sargassum filipendula*) sehingga dapat dimanfaatkan lebih lanjut

1.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia dan Laboratorium Teknologi Hasil Pertanian (THP), Universitas Muhammadiyah Malang, pada bulan Juni – Juli 2010.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga Coklat

Rumput laut merupakan makro alga yang hidup di laut yang tidak memiliki akar, batang dan daun sejati dan pada umumnya hidup di dasar perairan dan menempel pada substrat (benda lain). Fungsi dari akar, batang dan daun yang tidak dimiliki oleh rumput laut tersebut digantikan dengan *thallus*. Karena tidak memiliki akar, batang dan daun seperti umumnya pada tanaman, maka rumput laut digolongkan ke dalam tumbuhan tingkat rendah (Junaedi, 2004). *Thallus* berbentuk lembaran, bulat atau batangan yang bersifat lunak atau keras, mengandung pigmen fotosintetik yaitu karoten, fukosantin, klorofil a dan c, dalam dinding selnya terdapat selulosa dan asam alginik. (Atmadja, *et al.*, 1996).

Menurut Poncomulyo, *et. al.*, (2006), berdasar pigmen (zat warna) yang dikandungnya, alga atau ganggang dikelompokkan menjadi empat kelas, yaitu Rhodophyceae (ganggang merah), Phaeophyceae (ganggang coklat), Chlorophyceae (ganggang hijau), Cyanophyceae (ganggang biru). Ditambahkan oleh Wasetiawan (2010), alga termasuk mikroorganisme eukariotik. Mereka umumnya bersifat fotosintetik dengan pigmen fotosintetik hijau (klorofil), biru kehijauan (fikobilin), coklat (fukosantin), dan merah (fikoeritrin).

Karena memiliki klorofil, maka rumput laut dikatakan bersifat autotrop yaitu dapat hidup sendiri tanpa harus tergantung pada makhluk lainnya (Junaedi, 2004). Makroalga tersebar didaerah litoral dan sublitoral.

Daerah tersebut masih dapat memperoleh cahaya matahari yang cukup, sehingga proses fotosintesis dapat berlangsung. Makroalga menyerap nutrisi berupa nitrogen dari lingkungan sekitar (Dawes, 1981 dalam Muamar 2009).

Sargassum adalah genus makroalga planktonik pada ordo [Fucales](#). Spesies ini dinamai dari [Laut Sargasso](#) di [Samudra Atlantik](#), yang memiliki kandungan spesies *Sargassum* yang besar. Spesies genus ini dapat memanjang hingga beberapa meter. Rumput laut coklat jenis *Sargassum filipendula* merupakan salah satu marga *Sargassum* termasuk dalam kelas *Phaeophyceae*. Ada 150 jenis marga sargassum yang dijumpai di daerah perairan tropis, subtropis dan daerah bermusim dingin. Habitat rumput laut *Sargassum* tumbuh di perairan pada kedalaman 0,5 – 10 m ada arus dan ombak (Wikipedia, 2010^a).

Marga *Sargassum* memiliki sekitar 400 species yang tersebar di seluruh dunia, sedangangkan di Indonesia baru 12 species yang telah diketahui diantaranya adalah *Sargassum filipendula* (Kadi dan Atmadja, 2008). *Sargassum filipendula* memiliki thallus yang umumnya berbentuk silinder atau gepeng, tumbuh dan berkembang pada substrat dasar yang kuat, berukuran relatif besar, cabangnya rimbun menyerupai pohon, bentuk daun melebar, lonjong seperti pedang, mempunyai gelembung udara yang umumnya soliter, panjangnya mencapai 7 meter (di Indonesia terdapat spesies yang panjangnya 3 meter), dan warna thallus umumnya coklat. *Sargassum* tersebar luas di Indonesia, tumbuh di perairan yang terlindung maupun yang berombak besar pada habitat batu. *Sargassum*

filipendula ini hidup melekat pada batu karang dan dapat terlepas dari substratnya apabila ombak besar dan hanyut dipermukaan laut atau terdampar dipermukaan pasir pantai (Anonymous, 2010^a). *Sargassum filipendula* dapat dilihat pada Gambar 1 dan klasifikasi *Sargassum filipendula* adalah sebagai berikut :

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



Gambar 1. *Sargassum filipendula*

2.2 Komposisi Kimia Alga Coklat

Komposisi utama dari rumput laut yang dapat digunakan sebagai bahan pangan adalah karbohidrat. Akan tetapi, karena kandungan karbohidrat sebagian besar adalah senyawa gumi, maka hanya sebagian kecil saja dari kandungan karbohidrat tersebut yang dapat diserap oleh pencernaan manusia. Hal ini disebabkan kandungan protein dan lemak pada rumput laut sangat sedikit. Demikian pula halnya dengan kandungan

mineral rumput laut yang sebagian besar terdiri dari natrium dan kalsium (Winarno, 1996). Dinding sel Alga Cokelat juga tersusun atas lapisan luar dan lapisan dalam, lapisan luar yaitu selulosa dan lapisan dalam yaitu polisakarida (Anonymous, 2010^b). Komposisi kimia dan kandungan unsur-unsur mikro pada alga coklat dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2 sebagai berikut :

Tabel 1. Komposisi Kimia Alga Coklat

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

Sumber : Yunizal (1999)



Tabel 2. Kandungan Unsur-unsur Mikro pada Rumput Laut Coklat

Unsur	Kadar Dalam % Berat Kering
Chlor	9,8 – 15,00
Kalium	6,4 – 7,8
Natrium	2,6 – 3,8
Magnesium	1,0 – 1,9
Belerang	0,7 – 2,1
Silikon	0,5 – 0,6
Fosfor	0,3 – 0,6
Kalsium	0,2 – 0,3
Besi	0,1 – 0,2
Yodium	0,1 – 0,8
Brom	0,03 – 0,14

Sumber : Winarno (1996)

2.3 Pigmen Alga Coklat

Pigmen merupakan molekul khusus yang dapat memunculkan warna. Pigmen mampu menyerap cahaya matahari dengan menyerap dan memantulkannya pada panjang gelombang tertentu (Prangdimurti, 2007).

Ganggang coklat atau *Phaeophyceae* adalah salah satu [kelas](#) dari dari [ganggang](#) berdasarkan zat warna atau pigmentasinya. [Pigmen](#) yang lebih dominan adalah pigmen [xantofil](#) yang menyebabkan ganggang berwarna coklat. Pigmen lain yang terdapat dalam *Phaeophyceae* adalah [klorofil](#) dan [karoten](#) (Indriani dan Sumarsih, 2001).

Warna kuning pada Alga Coklat dihasilkan oleh pigmen fukoxantin (xanthos dari bahasa Yunani yang berarti "coklat"). Pigmen terkandung didalam plastid. Memiliki dinding sel lapisan luar dari bahan pektin (terutama alginat) sedangkan lapisan dalam dari bahan selulosa (Bachtiar, 2007). Ditambahkan oleh Atmadja (2007), Alga coklat memiliki pigmen dominan fucoxanthin yang dapat memberikan warna coklat.

Pigmen pada alga coklat berdasarkan karakter dan kegunaannya dibagi menjadi 5 macam, yaitu : klorofil, karotenoid, flavonoid, tanin dan kurkuminoid. Klorofil merupakan pigmen yang berwarna hijau yang terdapat dalam kloroplas bersama-sama dengan karoten dan xantofil, terutama pada bagian permukaan atas daun, dekat dinding-dinding sel palisade (Galtson, 1968 dalam Limantara dan Rahayu, 2008). Ditambahkan oleh Zaifbio (2009), menyatakan bahwa alga coklat mengandung pigmen klorofil a, c, betakaroten dan santofil yaitu fukosantin. Pada alga coklat, klorofil a berfungsi sebagai penangkap cahaya yang utama dalam proses fotosintesis yaitu sekitar 99% (Nurdiana, *et al.*, 2008).

Selain klorofil a, alga coklat juga mengandung klorofil c. Secara alami fungsi klorofil c memiliki kesamaan dengan klorofil a dan b yaitu sebagai penangkap cahaya (Nurdiana dan Limantara, 2008). Klorofil a dan c melekat di dalam tilakoid dan menempel dengan ikatan non-kovalen pada molekul protein (Salisbury dan Ross, 1995). Berdasarkan pigmen yang dikandungnya, alga dikelompokkan menjadi 4 filum yang dapat dilihat pada Tabel 3, Jenis pigmen yang terdapat pada alga coklat dapat dilihat pada Tabel 4, Pola spektra beberapa pigmen yang terdapat didalam alga coklat dapat dilihat pada Gambar 2 berikut ini :

Tabel 3. Beberapa kandungan pigmen utama alga

No.	Filum/Alga	Pigmen Klorofil	Pigmen	Dinding sel
1	Chlorophyta	a dan b	Karoten, dan xantofil	Selulosa, pektin, algin
2	Phaeophyta	a dan c	Karoten, dan xantofil	Selulosa, pektin, algin

3	Rhodophyta	a dan d	Karoten, xantofil, fikoeritrin	Selulosa
4	Chrysochyta	a dan c	Karoten, dan xantofil	Selulosa, pektin

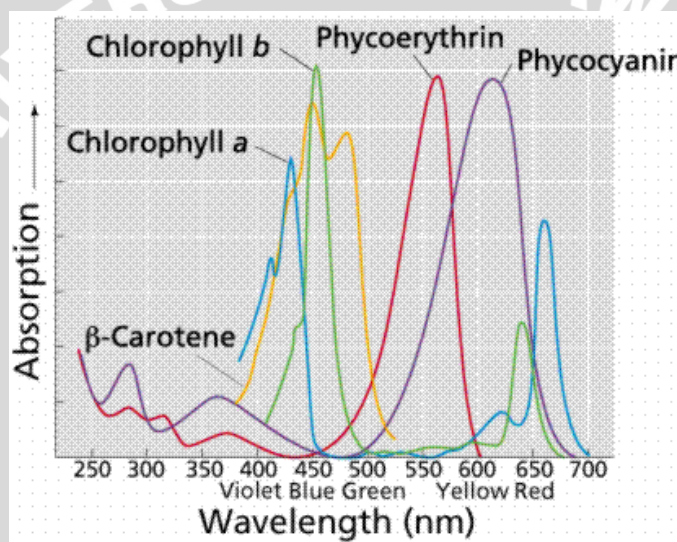
Sumber : (Zaifbio ,2009)



Tabel 4. Pigmen Yang Terkandung Dalam Alga Coklat

Jenis Pigmen	Warna	Pola spektra (Jeffrey, <i>et al.</i> , 1997)	
		Panjang gelombang	Pelarut
Klorofil c	Hijau terang	447, 553	90% aseton
Fukosantin	Oranye	453	Etanol
Klorofil a	Hijau biru	430,3; 616,5; 662,1	Aseton
Xanthofil	Sedikit kuning		
Karoten	Kuning		

Sumber : Strain, *et al.*, (1943) dan Jeffrey, *et al.*, (1997).



Gambar 2. Pola spektra beberapa pigmen alga coklat (phaeophyceae) (Biobook, 2010)

2.4 Klorofil a

Klorofil merupakan pigmen hijau pada tanaman yang paling berperan dalam proses fotosintesis. Dengan adanya klorofil akan menyebabkan sel-sel tersebut berkemampuan menyerap energi cahaya, sehingga terjadi proses fotosintesis yang kemudian menghasilkan karbohidrat dan oksigen (Limantara dan Rahayu, 2008).

Klorofil merupakan pigmen yang berwarna hijau yang terdapat dalam kloroplas sekitar 9,3% bersama-sama dengan karoten dan santofil sekitar 0,5 % terutama pada bagian permukaan atas daun dekat dinding-dinding sel palisade. Ditambahkan oleh Salisbury dan Ross, (1995), Klorofil dan karotenoid melekat di dalam tilakoid dan menempel dengan ikatan ikatan non-kovalen pada molekul protein.

Klorofil berwarna hijau karena menyerap cahaya kuat di daerah merah (650-700 nm) dan biru (400-450 nm) (Anis, 2008). Pada alga coklat, klorofil a berfungsi sebagai penangkap cahaya yang utama dalam proses fotosintesis yaitu sekitar 99 %. Keberadaan klorofil a pada alga coklat dilengkapi dengan pigmen pendukung yaitu klorofil c. Secara alami fungsi klorofil c memiliki kesamaan dengan klorofil a dan b, yaitu sebagai penangkap cahaya (Nurdiana dan Limantara, 2008).

Klorofil a merupakan Mg-tetrapirrol yang tersebar luas di organisme fotosintetik tingkat rendah maupun tingkat tinggi. Pigmen fotosintetik berwarna hijau biru ini memiliki peran yang sangat penting dalam proses fotosintesis, baik sebagai penangkap cahaya, transfer energi maupun dalam konversi energi cahaya. Klorofil a memiliki serapan maksimum didaerah 380-430 nm dan 530-665 nm dalam pelarut organik (Christiana, *et al*, 2008).

Struktur klorofil a dan klorofil b menghasilkan perbedaan dalam spektrum serapan klorofil. Kenyataan tersebut mengakibatkan perbedaan warna hijau pada kedua klorofil. Klorofil a dengan rumus kimia $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ berwarna hijau biru dan mempunyai berat molekul 893.50,

sementara klorofil *b* dengan rumus kimia $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ berwarna hijau kuning (Jeffrey, 1997). Klorofil *a* dan *b* memiliki perbedaan pada posisi atom C-7, dimana pada klorofil *b* ditempati grup aldehid, sedangkan klorofil *a* ditempati grup metil. Kenyataan tersebut berdampak pada pola spektra serapan klorofil *b* yang lebih bergeser ke daerah hijau sehingga menyebabkan perbedaan warna hijau pada keduanya. Dalam menjalankan fungsinya, klorofil dibantu oleh karotenoid yang menyerap cahaya pada daerah yang tidak diserap oleh molekul klorofil, kemudian mentransfer energi cahaya tersebut ke klorofil (Costa, *et al.*, 2008).

Menurut Limantara dan Rahayu (2008), adanya gugus aldehid pada klorofil *b* akan menyebabkan klorofil *b* lebih bersifat hidrofilik dibandingkan dengan klorofil *a*. Adanya klorofil *c* dapat dilihat pada spektrum absorpsi dengan puncak absorpsi pada warna merah pada 630-638 nm (Nurdiana, *et al.*, 2008).

Ada beberapa jenis klorofil, yaitu klorofil *a*, klorofil *b*, klorofil *c1* dan *c2*. Perbedaan beberapa klorofil tersebut dapat dilihat pada Tabel 5. Serta perbedaan struktur kimia klorofil *a*, *b*, *c1* dan *c2* dapat dilihat pada Gambar 3.

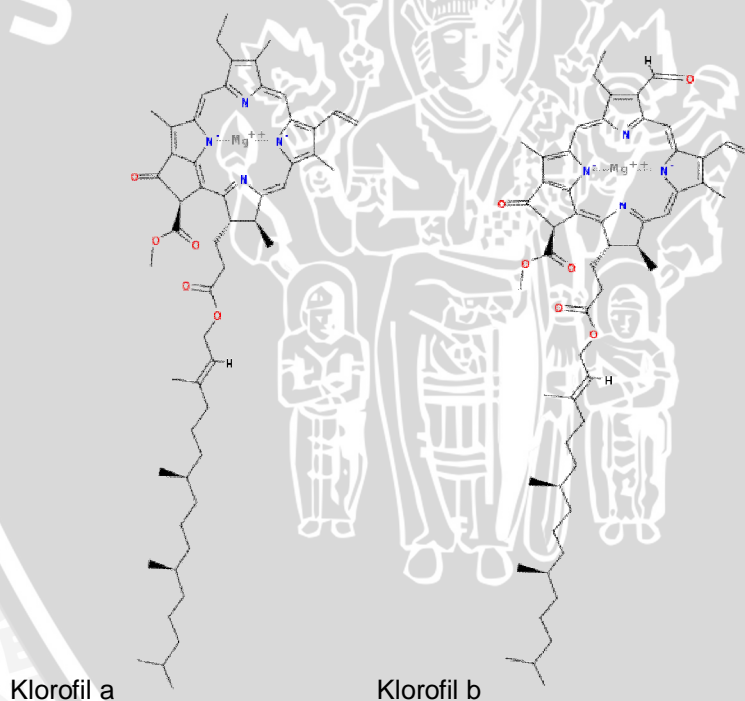
Tabel 5. Perbedaan Beberapa Klorofil

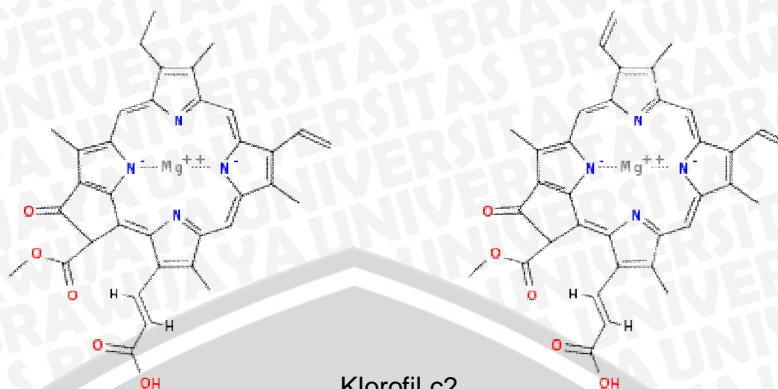
Pembeda	Klorofil a	Klorofil b	Klorofil c1	Klorofil c2
Struktur molekul	$C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$	$C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$	$C_{35}H_{30}O_5N_4Mg$	$C_{35}H_{28}O_5N_4Mg$
Kelompok rantai C3	-CH=CH ₂	-CH=CH ₂	-CH=CH ₂	-CH=CH ₂
Kelompok rantai C7	-CH ₃	-CHO	-CH ₃	-CH ₃
Kelompok rantai C8	-CH ₂ CH ₃	-CH ₂ CH ₃	-CH ₂ CH ₃	-CH=CH ₂
Kelompok rantai C17	-CH ₂ CH ₂ COO-	-CH ₂ CH ₂ COO-	-CH=CHCOOH	-CH=CHCOOH
Rantai C17-C18	Tunggal	Tunggal	Ganda	Ganda

Terdapat	Semua tanaman	Kebanyakan tanaman	Beberapa jenis alga	Beberapa jenis alga
----------	---------------	--------------------	---------------------	---------------------

Sumber : Anonymous, 2009^a

Struktur dasar klorofil adalah porifirin (gambar 4) dan mengandung cincin tetrapirrol yang salah satunya tereduksi. Keempat cincin pirol tersebut dipersatukan dengan ion Mg oleh atom N. Cincin isosiklik kelima terletak didekat cincin pirol ketiga. Pada cincin keempat, substituen asam propionat diesterifikasi dengan alkohol fitol diterpen yang bersifat hidrofobik, sedangkan sisi molekul lainnya dalam struktur klorofil bersifat hidrofilik. Adanya ekor hidrokarbon panjang (fitol) tersebut menyebabkan klorofil dapat larut lemak dan tidak larut air (Gross, 1991).



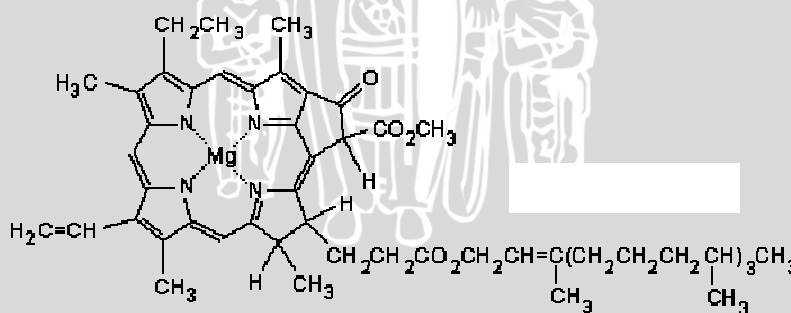


Klorofil c1

Klorofil c2

Gambar 3. Struktur kimia beberapa klorofil (Anonymous, 2010^c).

Klorofil *a* berfungsi sebagai penangkap cahaya utama dalam proses fotosintesis. Klorofil *a* mempunyai rumus kimia $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$, mengandung atom magnesium yang diikat oleh nitrogen dari dua cincin pirol dengan ikatan kovalen serta oleh dua atom nitrogen dari dua cincin pirol lain melalui ikatan koordinat kovalen, yaitu N dari pirol menyumbangkan pasangan elektronnya pada magnesium (pada gambar struktur molekul dinyatakan dengan garis putus) (Anis, 2008). Struktur kimia klorofil *a* dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur kimia klorofil *a* (Wright dan Jeffrey, 2005).

Klorofil dikenal sangat mudah berubah menjadi turunan-turunannya seperti feofitin, feoforbid, klorofilid (Gross, 1991). Degradasi klorofil melibatkan faktor internal seperti sifat kimia pigmen, aktivitas enzim dan beberapa faktor eksternal seperti suhu, intensitas cahaya, oksigen, air,

asam dan kelembaban atau kombinasi faktor-faktor tersebut (Rahayu dan Limantara, 2005).

Biosintesis klorofil terjadi di dalam plastida dengan proses yang hampir sama dengan biosintesis hemim pada sel hewan. Perbedaannya terletak pada logam yang disisipkan ke dalam inti porifirin. Jika Mg disisipkan oleh enzim Mg-kelase dengan diikuti beberapa tahap khusus maka akan terbentuklah klorofil (Devlin, 1983 dalam Rymsza, 2000). Ditambahkan oleh Limantara dan Puji Rahayu (2008), biosintesis klorofil terjadi dalam 11 tahap dan selalu dikatalisis oleh enzim spesifik.

Klorofil dan turunannya memiliki karakteristik spesifik yang memungkinkan dilakukannya identifikasi secara spektroskopi. Molekul yang berwarna hijau tersebut memiliki serapan khas pada daerah biru dan merah dari spektrum tampak (Gross, 1991).

Penggunaan klorofil bagi tubuh manusia dapat membantu dalam hal meningkatkan jumlah sel-sel darah, khususnya meningkatkan produksi hemoglobin dalam darah, mengatasi anemia, membersihkan jaringan tubuh, membersihkan hati dan membantu fungsi hati, meningkatkan daya tahan tubuh terhadap senyawa asing (virus, bakteri, parasit), memperkuat sel, dan melindungi DNA terhadap kerusakan. Yang terpenting dari molekul klorofil adalah aman terhadap tubuh (Chemistry, 2010).

2.5 Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat aktif dari bagian tanaman, hewan dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Zat-zat aktif terdapat di dalam sel, namun sel tanaman dan hewan berbeda demikian pula ketebalannya, sehingga

diperlukan metode ekstraksi dengan pelarut tertentu dalam mengekstraksinya. Tujuan ekstraksi bahan alam adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Harbone, 1987).

Prinsip Ekstraksi adalah pemisahan satu atau beberapa zat dari suatu bahan padatan atau cairan. Pada proses ini akan terjadi kontak antara pelarut dengan bahan sehingga pada bidang antar muka dari keduanya akan terjadi pengendapan massa secara difusi sampai tercapai keseimbangan konsentrasi larutan di dalam dan di luar bahan ekstraksi (Bernasconi, *et al.*, 1995). Ditambahkan oleh Shriner, *et al.*, 1980 dalam Widjayanti (2009), Pelarut polar akan melarutkan zat terlarut yang polar dan pelarut non polar akan melarutkan zat terlarut yang non polar juga atau disebut "*like dissolves like*".

Proses ekstraksi pada dasarnya dibedakan menjadi dua fase, yaitu fase pencucian dan fase ekstraksi. Pada fase pencucian terjadi penyatuan cairan ekstraksi, melalui rusaknya sel-sel zat yang diekstrak atau terusaknya dengan operasi penghalusan, langsung kontak dengan bahan pelarut. Diharapkan komponen sel yang terdapat dalam sel lebih mudah diambil atau dicuci. Sedangkan fase ekstraksi yaitu suatu peristiwa yang memungkinkan terjadinya pelintasan bahan pelarut ke dalam bagian dalam sel, sehingga bahan ekstraksi mencapai ke dalam sel. Dengan mengalirnya bahan pelarut ke dalam sel akan menyebabkan protoplasma membengkak, dan bahan kandungan sel akan terlarut sesuai dengan kelarutannya (Voight, 1994). Ditambahkan Warsito (2007), mengekstraksi suatu zat dapat dilakukan dengan beberapa metode, yaitu dengan menggunakan metode maserasi atau metode perendaman, metode perkolasi, destilasi uap dan sokletasi.

Maserasi adalah proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada suhu ruang. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dalam perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam sel dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan (Lenny, 2006). Ditambahkan oleh Widodo (2007), maserasi merupakan metode perendaman sampel dengan pelarut organik yang memiliki molekul relatif kecil dan diperlakukan pada temperatur ruang. Pada umumnya maserasi bertingkat digunakan karena lebih efisien bila dilakukan berulang kali dengan jumlah pelarut lebih kecil dari pada bila jumlah pelarutnya banyak tetapi mengekstraknya hanya sekali.

Faktor yang menentukan hasil ekstraksi adalah jangka waktu dimana sampel kontak dengan cairan pengestraksi (waktu ekstraksi) dan perbandingan antara sampel terhadap cairan pengestraksi (jumlah bahan pengestraksi) (Voight, 1994). Menurut Vogel (1987) dalam Widjayanti (2009), ekstraksi dengan pelarut cukup dilakukan sampai semua zat terlarut yang terkandung dalam padatan tersebut larut. Kesetimbangan dicapai ketika semua zat terlarut tersebut terlarut. Tidak mungkin semua cairan dapat dipisahkan dari padatan sehingga ampas selalu mengandung cairan yang di dalamnya terlarut zat terlarut (solut).

2.6 Pelarut

Pelarut merupakan salah satu faktor yang menentukan dalam proses ekstraksi sehingga banyak faktor yang harus diperhatikan. Dalam pemilihan pelarut, pelarut harus melarutkan ekstrak yang diinginkan saja, mempunyai kelarutan yang besar, dan titik didih antara zat yang diekstrak (Guenther, 1987 dalam Roskyana, 2010). Pelarut merupakan komponen zat dalam jumlah lebih besar dalam suatu larutan (Rivai, 1995).

Menurut Susanto (1999), jumlah pelarut berpengaruh terhadap efisiensi ekstraksi, tetapi jumlah yang berlebihan tidak akan mengekstrak lebih banyak, dalam jumlah tertentu pelarut dapat bekerja optimal. Ditambahkan Komara (1991), banyaknya pelarut yang akan digunakan mempengaruhi konsentrasi jenuh larutan selama ekstraksi, makin banyak pelarut yang digunakan makin banyak zat terlarut yang terekstrak. Salah satu ciri penting pelarut yang akan digunakan untuk mengekstraksi suatu zat atau senyawa adalah tetapan dielektriknya. Dalam ilmu [kimia](#), konstanta dielektrik dapat dijadikan pengukur relatif dari [kepolaran](#) suatu pelarut. Misalnya air yang merupakan pelarut polar memiliki konstanta dielektrik 80,10 pada 20 °C sedangkan n-[heksana](#) (sangat non-polar) memiliki nilai 1,89 pada 20 °C (Lide, 2010).

Pelarut yang baik untuk ekstraksi adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi terhadap zat yang diekstraksi. Daya melarutkan yang tinggi tersebut berhubungan dengan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang diekstraksi. Terdapat kecenderungan kuat

bagi senyawa polar larut ke dalam pelarut polar, dan bagi senyawa non-polar larut dalam pelarut non polar (Vogel, 1987 dalam Widjayanti, 2009). Beberapa nilai konstanta atau tetapan dielektrik bahan-bahan pelarut dapat dilihat pada Tabel 6.



Tabel 6. Konstanta Dielektrik Beberapa Bahan Pelarut

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

Keterangan : Misibel = dapat bercampur dengan air dalam berbagai proporsi

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

Penggunaan pelarut harus memiliki kepolaran sesuai dengan kepolaran senyawa yang akan diekstrak (Dewi, *et al.*, 2007). Pelarut yang sering digunakan dalam proses ekstraksi adalah aseton, etilen diklorida, etanol, heksana, isopropil alkohol dan metanol (Perry, 1984). Beberapa sifat-sifat umum bahan-bahan pelarut dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Sifat-Sifat Pelarut Umum

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

Sumber: Wikipedia, (2010^b).

2.6.1 Metanol

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

Metanol, juga dikenal sebagai metil alkohol, *wood alcohol* atau spiritus, adalah senyawa kimia dengan rumus kimia CH_3OH . Ia merupakan bentuk alkohol paling sederhana. Pada "keadaan atmosfer" ia berbentuk cairan yang ringan, mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar, dan beracun dengan bau yang khas (berbau lebih ringan daripada etanol) (Wikipedia, 2009^a).

Tabel 8. Sifat-sifat Metanol

No.	Karakteristik	Metanol
1.	Nama lain	Hidroksi metana, metil alkohol, metil hidrat, alkohol kayu dan karbinol
2.	Rumus molekul	CH_3OH $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$
3.	Sifat	Mudah terbakar, tidak berwarna
4.	Titik leleh	$-97\text{ }^\circ\text{C}$
5.	Titik didih	$64.7\text{ }^\circ\text{C}$
6.	Massa molar	32.04 g/mol
7.	Densitas	$0,7918\text{ g/cm}^3$, cair
8.	Titik nyala	$11\text{ }^\circ\text{C}$
9.	Konstanta dielektrik	33

Sumber: Wikipedia (2009^a)

2.6.2 Aseton

Aseton mempunyai nama lain dimetil asetat, dimetil keton, ketopropan, metilasetil, propanon, piroasetat eter dan piroasetis spirit. Rumus molekul dari aseton adalah CH_3COCH_3 . Aseton biasa digunakan sebagai pelarut karena mempunyai sifat higroskopis, sangat volatil, tidak beresidu dan mudah terbakar. Kegunaan aseton antara lain adalah sebagai pelarut senyawa asetilen, campuran adesif, parfum, pembersih, bahan campuran resin dan lain sebagainya (Schelfan, *et al.*, 1983 dalam Widjayanti, 2009), dalam laboratorium aseton digunakan sebagai pelarut

[aportik polar](#) dalam kebanyakan [reaksi organik](#), seperti [reaksi S_N2](#).

Penggunaan pelarut aseton juga berperan penting pada [oksidasi Jones](#).

Oleh karena polaritas aseton yang menengah, ia melarutkan berbagai macam senyawa. Sehingga ia umumnya ditampung dalam botol cuci dan digunakan sebagai untuk membilas [peralatan gelas laboratorium](#). Sifat-sifat aseton dapat dilihat pada Tabel 9 di bawah ini:



Tabel 9. Sifat-sifat Aseton


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

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

2.6.3 Heksana

Heksana adalah sebuah senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia C_6H_{14} (isomer utama *n*-heksana memiliki rumus $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$). Awalan *heks-* merujuk pada enam karbon atom yang terdapat pada heksana dan akhiran *-ana* berasal dari *alkana*, yang merujuk pada ikatan tunggal yang menghubungkan atom-atom karbon tersebut. Seluruh isomer heksana amat tidak reaktif, dan sering digunakan sebagai pelarut organik yang inert. Heksana juga umum terdapat pada bensin dan lem sepatu, kulit dan tekstil. Dalam keadaan standar senyawa ini merupakan cairan tak berwarna yang tidak larut dalam air (Wikipedia, 2010°).

Tabel 10. Sifat-sifat Heksan

No.	Karakteristik	Heksan
1.	Nama lain Rumus molekul	<i>n</i> -heksana C_6H_{14} 
2.	Sifat	sangat reaktif dan sering digunakan sebagai pelarut dalam reaksi organik

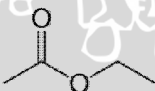
3.	Titik didih	69 °C
4.	Massa Jenis	0.655 g/ml

Sumber : Wikipedia (2010^c)

2.6.4 Etil Asetat

Etil asetat adalah senyawa organik dengan rumus $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$. Senyawa ini merupakan ester dari etanol dan asam asetat. Senyawa ini berwujud cairan tak berwarna, memiliki aroma khas. Senyawa ini sering disingkat EtOAc, dengan Et mewakili gugus etil dan OAc mewakili asetat. Etil asetat diproduksi dalam skala besar sebagai pelarut. Etil asetat adalah pelarut polar menengah yang volatil (mudah menguap), tidak beracun, dan tidak higroskopis. Etil asetat merupakan penerima ikatan hidrogen yang lemah, dan bukan suatu donor ikatan hidrogen karena tidak adanya proton yang bersifat asam (yaitu hidrogen yang terikat pada atom elektronegatif seperti flor, oksigen, dan nitrogen. Etil asetat dapat melarutkan air hingga 3%, dan larut dalam air hingga kelarutan 8% pada suhu kamar. Kelarutannya meningkat pada suhu yang lebih tinggi. Namun demikian, senyawa ini tidak stabil dalam air yang mengandung basa atau asam (Wikipedia, 2010^d). Sifat-sifat etil asetat dapat dilihat pada Tabel 11 di bawah ini:

Tabel 11. Sifat-sifat Etil Asetat

No.	Karakteristik	Etil Asetat
1.	Nama lain Rumus Molekul	Etil ester, Ester asetat, Ester etanol $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ 
2.	Massa molar	88.12 g/mol
3.	Densitas dan Fase	0.897 g/cm ³ , <u>cairan</u> pada 30°C
4.	Titik Lebur	-83.6°C (189.55 K)
5.	Titik didih	77.1°C (350.25 K)
6.	Penampilan	Cairan tak berwarna

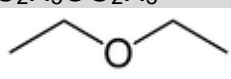
Sumber: Wikipedia (2010^d)

2.6.5 Dietil Eter

Dietil eter, yang juga dikenal sebagai eter dan etoksi etana, adalah cairan mudah terbakar yang jernih, tak berwarna, dan bertitik didih rendah serta berbau

kelas. Anggota paling umum dari kelompok campuran kimiawi yang secara umum dikenal sebagai eter ini merupakan sebuah isomernya butanol. Berformula $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$, dietil eter digunakan sebagai pelarut biasa dan telah digunakan sebagai anestesi umum. Eter dapat dilarutkan dengan menghemat di dalam air (6.9 g/100 mL) (Wikipedia, 2010^e). Sifat-sifat dietil eter dapat dilihat pada Tabel 12 di bawah ini:

Tabel 12. Sifat-sifat Dietil Eter

No.	Karakteristik	Dietil Eter
1.	Nama IUPAC	Ethoxyethane 3-oxapentane
2.	Rumus Molekul	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5$ 
3.	Massa molar	74.12 g/mol
4.	Densitas dan Fase	0.7134 g/cm ³ , cair
5.	Titik Leleh	-116.3 °C (156.85 K)
6.	Titik didih	34.6 °C (307.75 K)
7.	Penampilan	Jernih, cairan tak berwarna
8.	Viskositas	0.224 cP at 25°C

Sumber: Wikipedia (2010^e)

2.7 Partisi/Fraksinasi

Istilah partisi/fraksinasi (pemisahan) atau distribusi (penyebaran) sering dipakai untuk menggambarkan bagaimana suatu senyawa memisah diantara dua medium yang tak saling melarutkan (Sudarmadji, 1996). Fraksinasi adalah proses pemisahan suatu kuantitas tertentu dari campuran yang dibagi dalam beberapa jumlah kecil (fraksi), dimana komposisi perubahan sesuai dengan gradien tertentu (Wikipedia, 2010^f).

Metode partisi pelarut biasanya menggunakan dua pelarut yang tidak campur didalam corong pisah. Pada metode ini komponen terdistribusi dalam dua pelarut berdasarkan perbedaan koefisien partisi.

Metode partisi juga disebut penyarian cair-cair, yaitu proses pemisahan di mana suatu zat terbagi dalam dua pelarut yang tidak bercampur (Sholihah, 2010). Ditambahkan oleh Wanto dan Romli, 1977 dalam Widjayanti (2010), pemisahan yang diinginkan dapat terjadi karena adanya perbedaan dalam sifat yaitu dapat larutnya antara bagian-bagian campuran zat pada bahan pelarut dan tingkat kepolarannya.

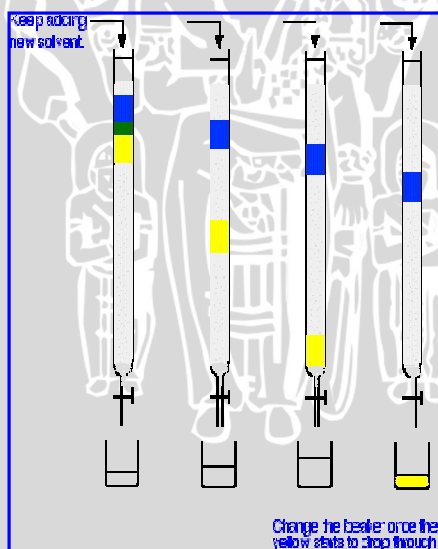
2.8 Kromatografi Kolom

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

Menurut Asyhar (2010), kromatografi kolom bertujuan untuk mengisolasi komponen senyawa organik dari campurannya. Pada kromatografi kolom digunakan kolom dengan adsorben silika gel karena kolom yang dibentuk dengan silika gel memiliki tekstur dan struktur yang lebih kompak dan teratur. Silika gel memadat dalam bentuk tetrahedral raksasa, sehingga ikatannya kuat dan rapat. Dengan demikian, adsorben silika gel mampu menghasilkan proses pemisahan yang lebih optimal. Silica gel ada 2 macam yaitu: GF245, dengan G melambangkan gypsum (CaSO_4), F melambangkan floroscene, dan angka 245 menunjukkan besarnya panjang gelombang yaitu, 245 nm. Silika jenis ini sering

digunakan pada kromatografi lapis tipis (TLC). H, dengan tanpa adanya gypsum dan floroscene. Silika jenis ini biasa digunakan pada kromatografi kolom.

Prinsip kerja kromatografi kolom adalah sebagai berikut : kolom gelas dengan kran pada salah satu ujungnya diisi oleh fase diam berupa *silica* atau alumina. Campuran yang akan dipisahkan dituangkan pada bagian atas kolom yang berisi fase diam. Begitu pula fase gerak berupa pelarut organik seperti heksan atau eter dialirkan dari bagian atas kolom. Komponen yang telah terpisah dari campurannya bergerak terbawa fase gerak ke bawah kolom. Jumlah komponen penyusun campuran dapat terlihat sebagai cincin-cincin berwarna sepanjang kolom gelas (Hendayana, 2006). Gambar 5 menunjukkan perubahan yang mungkin terjadi sejalan dengan perubahan waktu.



Gambar 5. Proses kromatografi kolom (Suhanda,2010).

2.9 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi awal untuk mengetahui komponen pigmen adalah dengan menggunakan KLT. KLT merupakan salah satu contoh kromatografi serapan. Fase diam berbentuk lapis tipis yang melekat pada gelas kaca atau plastik, aluminium sedangkan fase gerak berupa campuran pelarut dengan perbandingan tertentu (Sastrohamidjoyo, 2002).

Selain dapat dimanfaatkan untuk metode pemisahan KLT juga dapat digunakan untuk mengetahui tingkat kemurnian senyawa hasil isolasi. Jika dari hasil eluen (dua arah) dan telah divariasikan jenis eluen diperoleh satu noda maka dapat diperkirakan senyawa hasil isolasi dalam keadaan murni (Warsito, 2007).

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

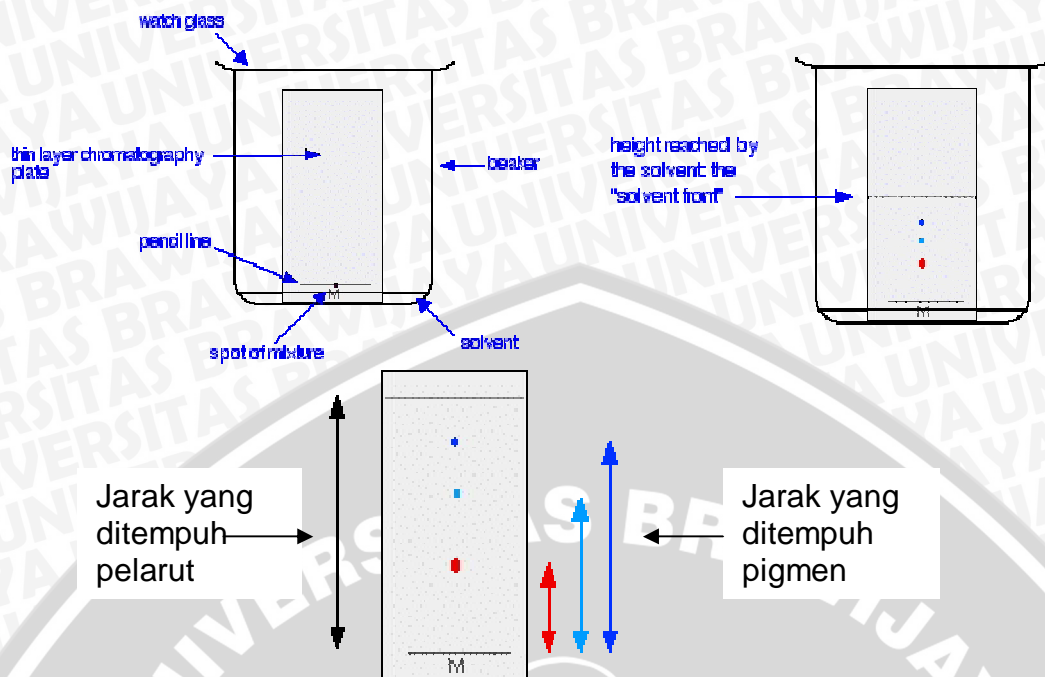
Identifikasi pigmen secara kualitatif dilakukan dengan cara menghitung nilai *retardation factor* (R_f) (Jeffrey, *et al.*, 1997). Pengukuran jumlah perbedaan warna yang terbentuk dari campuran dilakukan berdasarkan pada jarak yang ditempuh oleh pelarut dan jarak yang ditempuh oleh bercak warna. Nilai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

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

Identifikasi secara visual dapat dilakukan dengan melihat warna total pada pelat KLT. Ketebalan warna total menunjukkan kuantitas pigmen sedangkan banyak noda menunjukkan jumlah pigmen minimal yang terdapat dalam ekstrak. Proses identifikasi pigmen dengan metode KLT dapat dilihat pada Gambar 6. Clark (2007) menyatakan bahwa rangkaian alat pada KLT terdiri dari pelat KLT yang telah ditotol ekstrak pada garis

awal pelat, lalu pelat dimasukkan dalam *beakerglass* berisi sedikit pelarut kemudian ditutup dengan cawan petri. Pelarut akan merambat melalui pelat dan terbentuk pemisahan warna pada totol tersebut. Setelah pelarut mencapai garis akhir pelat maka jarak totol dapat nilai R_f nya.





Gambar 6. Metode kromatografi lapis tipis (Clark, 2007)

2.10 Multispec-1601 Spektrofotometer

Spektrofotometer UV-Visible adalah alat yang umum digunakan di laboratorium kimia. Alat ini biasanya digunakan untuk analisa kimia kuantitatif, namun dapat juga digunakan untuk analisa kimia semi kualitatif. Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis didasarkan pada fenomena penyerapan sinar oleh spesi kimia tertentu di daerah ultra lembayung (ultra violet) dan sinar tampak (visible) (Huda, 2001).

Menurut Apriyantono, *et al.*, (1989), panjang gelombang maksimum absorptifitas molar (ϵ) dapat ditentukan dengan menggunakan hukum *lambert-beer* sebagai berikut :

$$A = \epsilon L C$$

Keterangan : A = absorbans

ϵ = absorptifitas molar

L = diameter kuvet

C = konsentrasi (molar)

Spektrofotometer Multispec-1601 mempunyai kelebihan yakni dapat memperoleh pola spektra pada keseluruhan panjang gelombang hanya dengan waktu 100 *milliseconds*. Detektor yang digunakan pada multispec-1601 spektrofotometer adalah *Photo Diode Array (PDA)* (Anonymous, 2009^b). Gambar multispec-1601 spektrofotometer dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Multispec-1601 Spektrofotometer
Sumber : Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan adalah *Sargassum filipendula* yang diperoleh dari Desa Padike, Kecamatan Talango, Sumenep, Madura, sedangkan bahan kimia yang digunakan adalah metanol, aseton, dietil eter, etil asetat, heksan, CaCO_3 , *silica gel*, *sea sand* (pasir laut). Bahan kimia yang digunakan memiliki *grade pro analis* (PA) dengan merk merck. Selain itu juga digunakan aseton teknis, aluminium foil, *cling wrap*, kertas saring, kapas, gas argon, akuades dan saturasi garam dapur serta pelat KLT.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan untuk proses ekstraksi adalah gunting, nampan, timbangan digital, mortar, *beaker glass*, erlemeyer, gelas ukur, pipet tetes, pipet volume, spatula, *hot plate*, *magnetic stirrer*, corong, corong pisah, *rotary vacuum evaporator* dan botol sampel. Peralatan yang digunakan untuk analisa adalah kolom kromatografi, buret, statif, tabung reaksi, tabung reaksi tertutup, pipa kapiler, spektrofotometer multispec-1601 UV Vis merk Shimadzu.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif. Metode eksploratif bertujuan untuk memperoleh pengetahuan

tentang suatu gejala, sehingga setelah melalui tahap observasi, masalah serta hipotesisnya dapat dirumuskan. Dalam penelitian eksploratif pengetahuan tentang gejala yang hendak diteliti masih sangat terbatas dan merupakan langkah pertama bagi penelitian yang lebih mendalam (Singarimbun dan Effendi, 1989).

Amirin (2009) menyatakan bahwa penelitian eksploratif merupakan salah satu **pendekatan** dalam penelitian. Metode eksploratif berupaya menemukan informasi umum mengenai sesuatu topik/masalah yang belum dipahami sepenuhnya oleh seseorang peneliti. Jadi, **penelitian eksploratif merupakan salah satu pendekatan penelitian yang digunakan untuk meneliti sesuatu (yang menarik perhatian) yang belum diketahui, belum dipahami, belum dikenali, dengan baik.**

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Sampel

Sampel dicuci dengan air laut untuk menghilangkan kotoran. Selanjutnya sampel dikeringkan dengan kain dan dimasukkan ke dalam kantong *polyback* hitam. selama perjalanan, sampel disimpan dalam *cool box* yang berisi es. Untuk penyimpanan selanjutnya, sampel dimasukkan ke dalam *freezer*.

3.3.2 Ekstraksi Alga Coklat untuk Isolasi

Ekstraksi pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Pangestuti, *et al* (2008) yang telah dimodifikasi oleh Muamar (2009). *Sargassum filipendula* segar dicuci, dibersihkan dan dikeringkan dengan tisu untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel. Kemudian dipotong-potong kurang lebih 1 cm dan ditimbang sebanyak

200 g dengan menggunakan timbangan digital kemudian sampel di haluskan dengan mortar dan ditambahkan CaCO_3 sebanyak $\pm 0,5$ gram sebagai agen penetral. Proses pemotongan bertujuan untuk memperluas permukaan alga coklat sehingga mempermudah proses esktraksi (Yunizal, 1999).

Tahap selanjutnya adalah ekstraksi, dimana ekstraksi adalah proses penarikan keluar atau proses pemisahan suatu bahan dari campurannya dan biasanya dengan menggunakan pelarut (Shriner, *et al.*, 1980). Ekstraksi pada penelitian ini adalah dengan maserasi bertingkat. Maserasi adalah proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada suhu ruang. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dalam perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam sel dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan (Lenny, 2006). Ditambahkan oleh Widodo (2007), maserasi merupakan metode perendaman sampel dengan pelarut organik yang memiliki molekul relatif kecil dan perlakuan temperatur ruang Ekstraksi bertingkat digunakan karena lebih efisien dibanding dengan ekstraksi lainnya. Ekstraksi lebih efisien bila dilakukan berulang kali dengan jumlah pelarut lebih kecil dari pada bila jumlah pelarutnya banyak tetapi mengekstraknya hanya sekali.

Alga coklat diekstraksi menggunakan pelarut metanol : aseton (7:3 v/v) sebanyak 750 ml selama 60 menit pada suhu kamar. Adapun tujuan dari pemberian metanol yaitu agar dapat melarutkan semua senyawa organik dalam bahan. Sedangkan penggunaan pelarut aseton adalah untuk mengangkat pigmen dengan merusak sel dalam jaringan sehingga pigmen dapat larut. Dan prinsip dari maserasi ini adalah mengambil senyawa target dengan cara merendam dalam suhu ruang. Prosedur ekstraksi untuk isolasi dapat dilihat pada Gambar 8.

3.3.3 Fraksinasi Alga Coklat untuk Isolasi

Tahapan setelah ekstraksi adalah Fraksinasi. Fraksinasi pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Pangestuti, *et al* (2008) yang telah dimodifikasi oleh Muamar (2009). Filtrat selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring halus yang bertujuan untuk mengambil filtrat hasil ekstraksi. Proses fraksinasi ini menggunakan filtrat hasil ekstraksi, dietil eter, saturasi garam dan air ledeng. Filtrat selanjutnya di partisi menggunakan dietil eter sampai semua pigmen terangkat ke fase atas dan fase bawah. Menurut Shriener, *et al.*, (1980), pelarut polar akan melarutkan zat terlarut yang polar dan pelarut non polar akan melarutkan zat terlarut yang non polar juga atau disebut "*like dissolves like*". Fraksinasi adalah proses pemisahan suatu kuantitas tertentu dari campuran yang dibagi dalam beberapa jumlah kecil (fraksi), dimana komposisi perubahan sesuai dengan gradien tertentu (Wikipedia, 2010^f). Ditambahkan oleh Sudarmadji (1996), istilah partisi (pemisahan)

sering dipakai untuk menggambarkan bagaimana suatu senyawa memisah diantara 2 medium yang tak saling melarutkan.

Filtrat yang dihasilkan selanjutnya di *rotary evaporator vacuum* dengan suhu 35°C dan kecepatan 100 rpm untuk menguapkan pelarut sampai volume berkurang. Penguapan atau “evaporasi” adalah salah satu cara untuk mengeluarkan atau menghilangkan sebagian air dari suatu bahan sehingga didapatkan larutan zat cair yang memiliki kosentrat pekat (Mc Cabe, *et al.*, 1987). Hui (1992) menyatakan bahwa pemekatan dilakukan sampai tidak ada pelarut yang menguap masing-masing perlakuan mempunyai waktu penguapan yang berbeda tergantung dari jumlah pelarut yang digunakan.

Filtrat kemudian dipindahkan ke dalam botol sampel dan dikeringkan dengan gas N₂ sampai kering sempurna. Ekstrak pigmen kering dibungkus dengan alumunium foil dan bagian penutup botol sampel dilapisi dengan *cling wrap* selanjutnya disimpan dalam *freezer*. Prosedur fraksinasi untuk isolasi dapat dilihat pada Gambar 8.

3.3.4 Isolasi Pigmen (Pangestuti., *et. al*, 2008)

Isolasi pigmen dilakukan dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam *silica gel* fase gerak heksan : etil asetat. Hal pertama yang dilakukan adalah preparasi fase diam untuk kolom dimana *Silica gel* sebanyak 40 gram dilarutkan dalam fase gerak heksan : etil asetat (8 : 2 v/v) ± 150 mL dan distirer selama 1 jam dengan kecepatan 150 rpm.

Tujuannya adalah untuk ekuilibrasi antara fase gerak dan fase diam agar fase diam yang di *packing* dalam kolom tidak pecah atau retak.

Tahap selanjutnya kolom di pasang pada statif dan dimasukkan sedikit fase gerak untuk membasahi kapas. Kapas tipis dimasukkan ke dalam kolom dengan bantuan lidi, kemudian ditambahkan fase gerak sampai hampir penuh. Bubur *silica gel* dimasukkan ke dalam kolom dengan pipet tetes. *Silica gel* yang akan dimasukkan diaduk terus menerus agar tidak terdapat rongga udara di tengah tengah kolom. Timbunan bubur *silica gel* akan mencapai $\frac{3}{4}$ tinggi kolom. Pada proses tersebut kolom yang telah berisi fase diam dibiarkan selama 12 jam yang bertujuan untuk mengetahui apakah *silica gel* (fase diam) pecah atau tidak, jika pecah atau retak sebaiknya diulang lagi dari proses awal guna memperoleh hasil yang terbaik yaitu proses penjerapan oleh *silica gel* terhadap senyawa dengan sempurna, jika retak fase diam tidak melakukan proses penjerapan dengan baik. Selanjutnya ditambahkan *sea sand* (pasir laut) agar pelarut tidak mengenai silika gel dan sebagai penyaring saat sampel dimasukkan.

Menurut Sudarmadji (1996), pengisian kolom merupakan pekerjaan yang sangat menentukan keberhasilan alat. Pengisian biasanya dilakukan dengan menuangkan bubuk serbuk fase diam (bahan adsorben, resin atau gel) kedalam kolom yang dasarnya sudah ditutup seraya diaduk dibagian atas atau kolom diketuk-ketuk sehingga gelembung udara keluar dan isi kolom tersebar merata. Bubur diisikan sampai mencapai ketinggian yang dikehendaki. Kalau sudah tercapai, aliran cairan pelarut dimulai

dengan membuka kran dibawah sampai isi kolom mampat merata.

Meskipun nampak sederhana namun pekerjaan ini memerlukan ketrampilan dan pengalaman sehingga hasilnya memuaskan.

Untuk pemisahan komponen dengan menggunakan kromatografi kolom, prinsip kerja kromatografi kolom adalah sebagai berikut : kolom gelas dengan kran pada salah satu ujungnya diisi oleh fase diam berupa *silica*. Campuran yang akan dipisahkan dituangkan pada bagian atas kolom yang berisi fase diam. Begitu pula fase gerak berupa pelarut organik dialirkan dari bagian atas kolom. Komponen-komponen yang telah terpisah dari campurannya bergerak terbawa fase gerak ke bawah kolom. Jumlah komponen penyusun campuran dapat terlihat sebagai cincin-cincin berwarna sepanjang kolom gelas (Hendayana, 2006).

Ekstrak alga coklat yang telah dilarutkan dalam 10 mL fase gerak dimasukkan dalam kolom kemudian kran kolom yang berada dibawah dibuka. Ekstrak akan meresap ke *silica gel* (berfungsi sebagai penjerap) dalam kolom sampai batas atas *silica gel*. Setelah itu dimasukkan fase gerak heksan : etil asetat sambil kran kolom terus dibuka. Fase gerak akan mengalir kontinyu sehingga perlu menambahkan fase gerak (eluen) baru dari bagian atas kolom agar *silica* tidak kering yang dapat menyebabkan fase diam pecah atau retak. Fase gerak yang ditambahkan ke dalam kolom ditingkatkan kepolarannya dengan menambahkan etil asetat secara bertingkat dimana komposisi yang digunakan adalah heksan : etil asetat (8:2, 7:3, 6:4, 5:5 v/v) volume totalnya sebanyak ± 1

liter yang bertujuan untuk mengeluarkan pigmen yang bersifat non polar yaitu klorofil a ke yang lebih bersifat semi polar yaitu fukosantin.

Lenny (2006), menyatakan bahwa pemilihan eluen sebaiknya dimulai dari pelarut yang tidak polar seperti heksan dan selanjutnya dilakukan peningkatan kepolaran dengan etil asetat atau pelarut yang lebih polar lainnya. Selanjutnya fraksi yang keluar dari kolom ditampung dengan menggunakan tabung reaksi berdasarkan warnanya. Kemudian setiap fraksi dianalisis dengan menggunakan KLT. Prosedur isolasi dengan kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 9.

3.3.4.1 Isolasi Klorofil a (Costa, et al., 2008)

Isolasi Klorofil a dilakukan dengan buret menggunakan fase diam *silica gel* dan fase gerak menggunakan heksan : aseton (8,5 : 1,5 v/v) (Costa, et al, 2008). Hal pertama yang dilakukan adalah preparasi fase diam untuk kromatografi kolom dengan menggunakan buret dimana *Silica gel* sebanyak 20 gram dilarutkan dalam heksan : etil asetat (8 : 2 v/v) \pm 50 mL dan distirer selama 1 jam dengan kecepatan 150 rpm. Tujuannya adalah untuk ekuilibrasasi antara fase gerak dan fase diam agar fase diam yang di *packing* dalam kolom tidak pecah atau retak.

Pada isolasi Klorofil a dengan menggunakan buret ini dilakukan sama sesuai dengan prosedur isolasi pigmen dengan menggunakan kromatografi kolom. Penggunaan buret ini bertujuan untuk mendapatkan pigmen murni yang diinginkan yaitu Klorofil a.

3.3.5 Identifikasi Klorofil a

3.3.5.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (Pangestuti, *et al.*, 2008)

Kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan untuk mengidentifikasi pigmen berdasarkan total warna yang terbentuk dan nilai R_f . Pada penelitian ini, fase diam yang digunakan *silica gel* F-254. Fase gerak menggunakan heksan : aseton (7:3 v/v). Tahapan pertama dalam KLT adalah membuat garis pada pelat dengan menggunakan pensil pada kedua ujung pelat. Bagian bawah pelat berukuran 1 cm yang bertujuan untuk menunjukkan posisi awal fraksi ketika ditotolkan, sedangkan bagian atas pelat berukuran 0,5 cm sebagai batas yang ditempuh pelarut.

Fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom dan buret ditotolkan pada garis bagian bawah pelat dengan menggunakan pipa kapiler sambil ditiup-tiup. Setelah bercak tersebut mengering pelat ditempatkan kedalam beaker glass berisi fase gerak dalam jumlah yang tidak terlalu banyak (± 1 ml) dan kertas saring yang dipotong memanjang. Tujuan penambahan kertas saring adalah agar menjadi homogen. Selanjutnya beaker glass ditutup dengan cawan petri dan dibiarkan sampai pelarut bergerak mendekati garis atas. Kemudian diambil dengan penjepit tanpa menyentuh garis pelat. Setelah itu warna dari tiap pigmen pada pelat diamati dan dihitung R_f -nya. Identifikasi pigmen secara kualitatif dilakukan dengan cara menghitung nilai *retardation factor* (R_f) (Jeffrey, *et al.*, 1997). Pengukuran jumlah perbedaan warna yang terbentuk dari campuran dilakukan berdasarkan pada jarak yang ditempuh oleh pelarut dan jarak yang ditempuh oleh bercak warna. Nilai R_f untuk setiap warna dapat dihitung dengan rumus :

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

Prosedur KLT untuk komposisi pigmen dan identifikasi klorofil *a* dapat dilihat pada Gambar 10.

3.3.5.2 Pengukuran Pola Spektra Klorofil *a*

Metode spektrofotometri ini dilakukan untuk mengetahui pola spektra (serapan cahaya yang diabsorpsi) pigmen yang terkandung dalam alga coklat. Fraksi hasil dari kromatografi kolom dan KLT yang diyakini sebagai klorofil *a* yang dilihat berdasarkan warna dan nilai *retardation factor* (RF) diupkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dan dikeringkan dengan gas nitrogen. Pigmen yang telah dikeringkan kemudian ditambahkan aseton PA 100% hingga pengenceran 10^4 . Larutan pigmen dituang pada kuvet ± 3 ml dan kuvet kemudian dimasukkan ke dalam instrumen spektrofotometer 1601 Shimidzu dan dilakukan pengujian. Hasil dari pengujian yang berupa serapan maksimum yang terbentuk oleh pigmen Klorofil *a* kemudian dibandingkan dengan serapan spektra maksimum menurut Jeffrey, *et al.*, (1997).

Pola spektrum klorofil *a* hasil isolasi dalam pelarut aseton dan dietil eter digunakan untuk identifikasi lebih lanjut, kedua pigmen tersebut menggunakan Spektrofotometer UV-Visible 1601 merk Shimadzu. Pola spektra yang terbentuk dibandingkan dengan pola spektra klorofil *a* menurut Jeffrey, *et al* (1997).

3.3.6 Pengukuran Rendemen

Untuk mengetahui kandungan Klorofil *a* yang dapat digunakan maka dilakukan penghitungan rendemen. Rendemen adalah perhitungan efektivitas prosedur, dihitung dengan membagi jumlah produk yang didapatkan dibagi dengan jumlah produk semula (Wikipedia, 2010⁹).

Pigmen yang telah diketahui nilai absorbasinya dikonversi menggunakan hukum "lamber-beer" $A = \epsilon L C$, dimana :

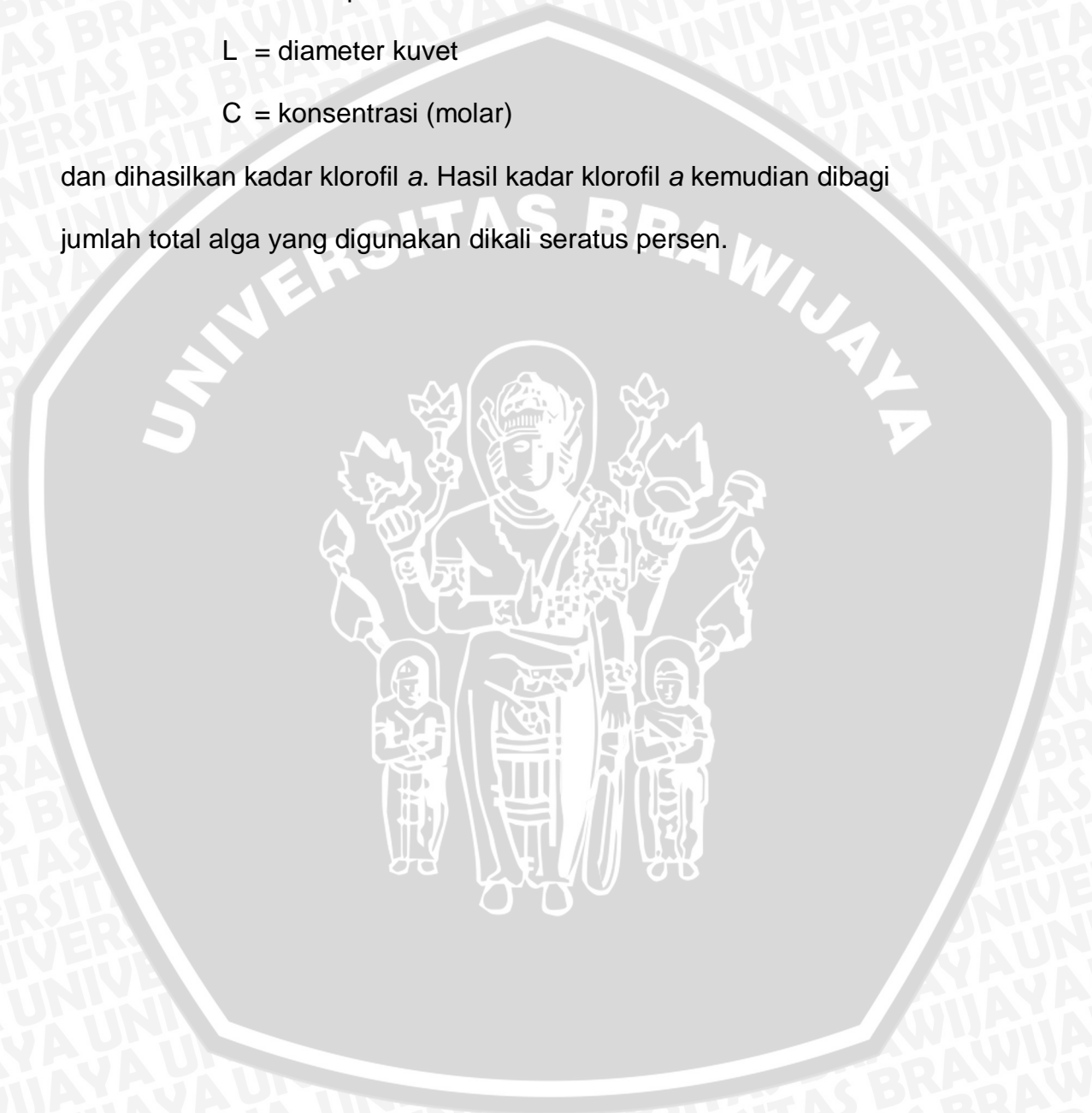
Keterangan : A = absorbans

ϵ = absorptifitas molar

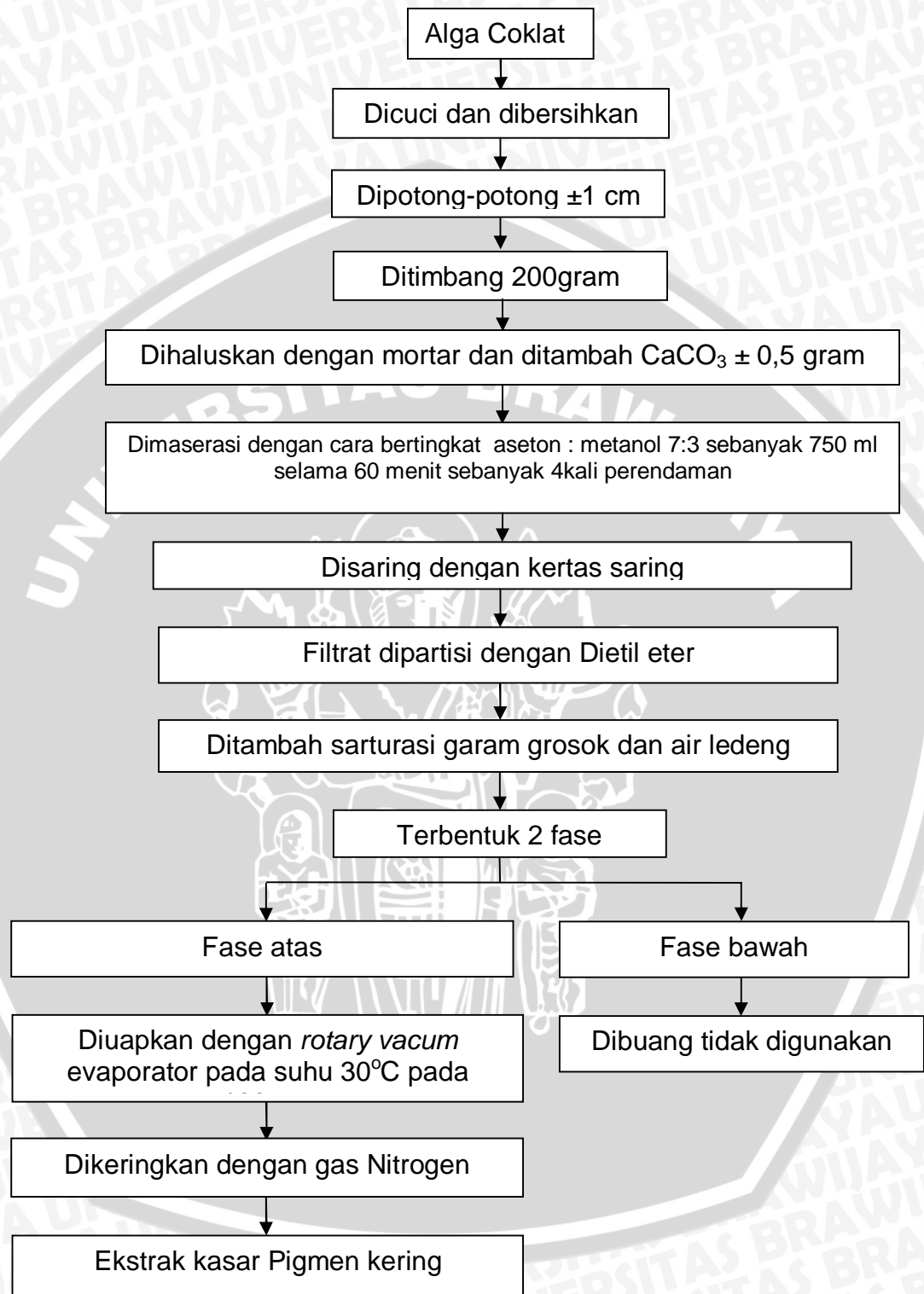
L = diameter kuvet

C = konsentrasi (molar)

dan dihasilkan kadar klorofil a. Hasil kadar klorofil a kemudian dibagi jumlah total alga yang digunakan dikali seratus persen.

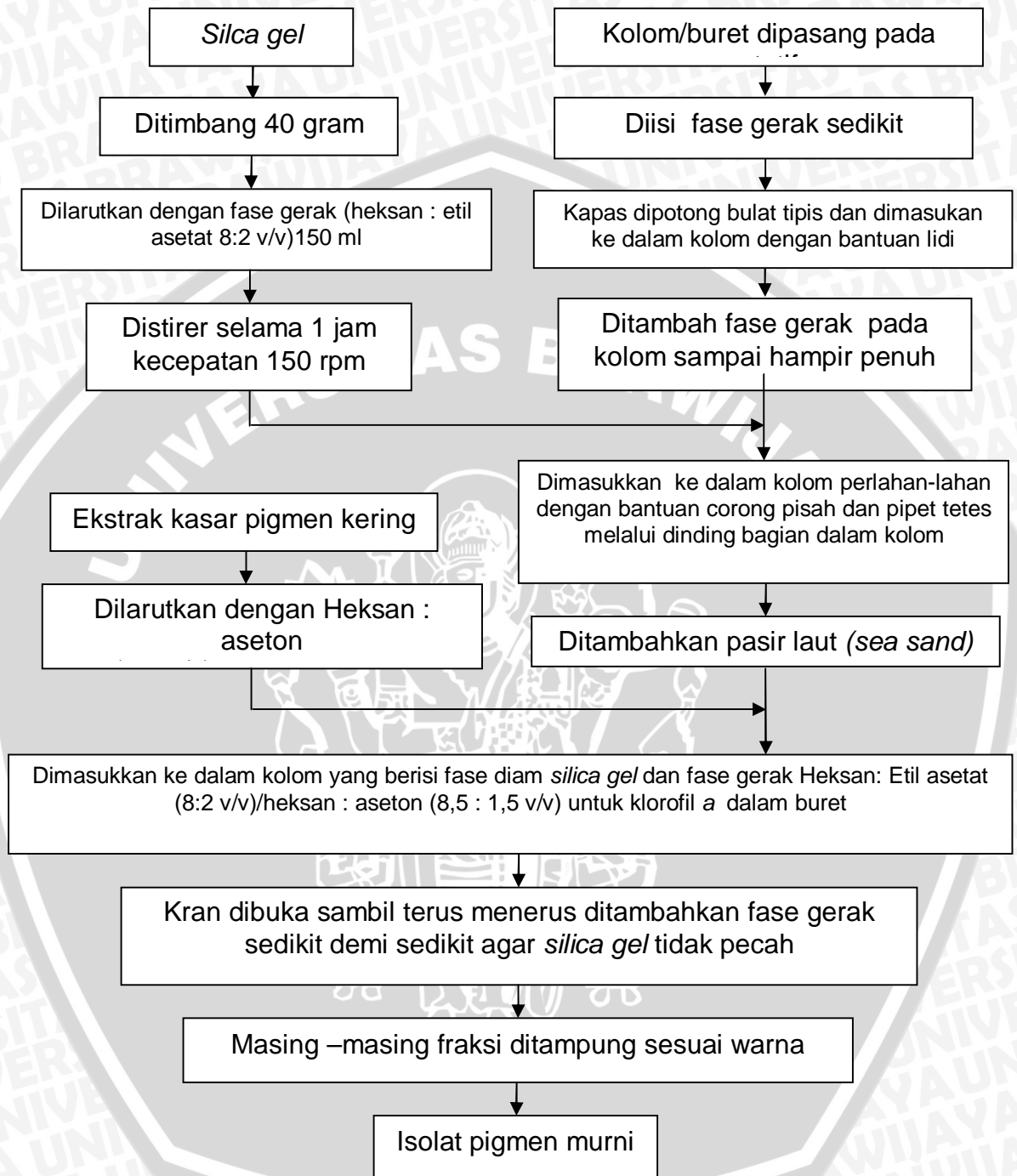


3.4 Skema Kerja Ekstraksi dan Fraksinasi



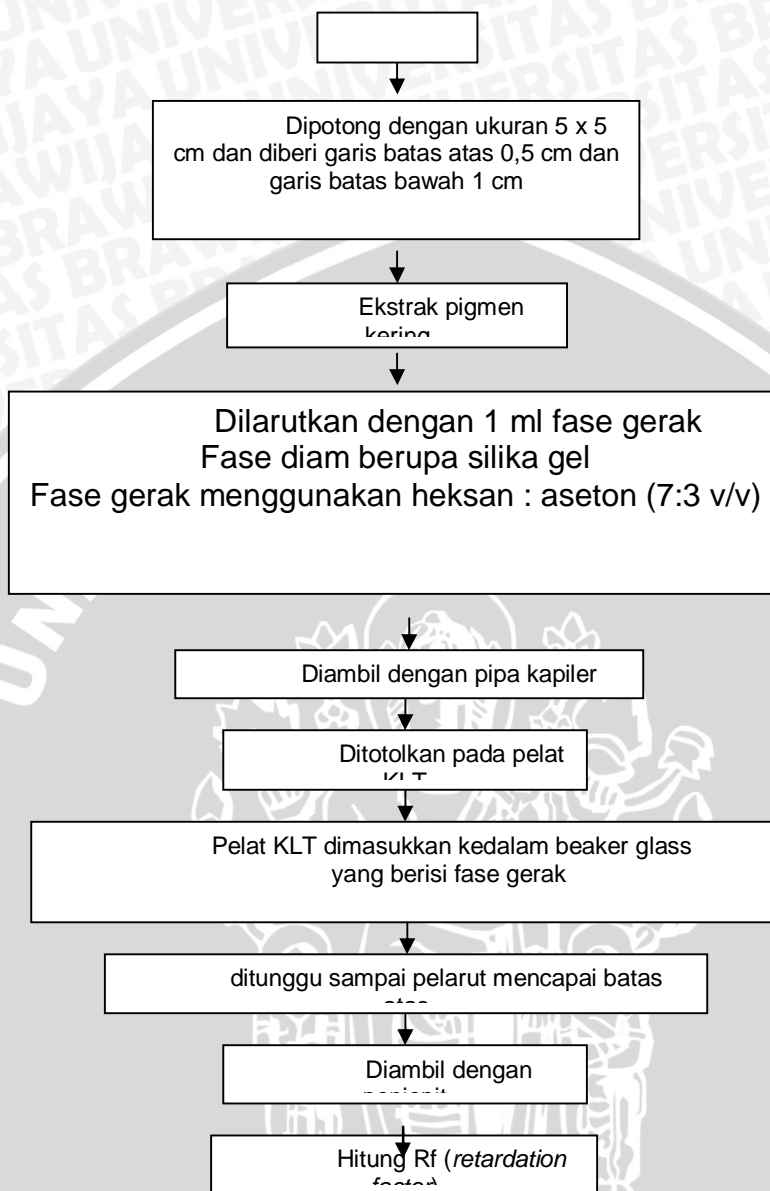
Gambar 8. Ekstraksi dan Fraksinasi Alga Coklat untuk Isolasi (Pangestuti, *et al.*, 2008) yang dimodifikasi oleh Muamar (2009).

3.5 Skema Kerja Kromatografi Kolom



Gambar 9. Kromatografi kolom (Pangestuti, *et al.*, 2008) yang dimodifikasi oleh Muamar (2009).

3.6 Skema Kerja Kromatografi Lapis Tipis (KLT)



Gambar 10. Kromatografi Lapis Tipis (Pangestuti, *et al.*, 2008).

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Pengamatan

Hasil penelitian isolasi Klorofil *a* dari alga coklat (*Sargassum filipendula*) dengan parameter hasil kolom, uji identifikasi klorofil *a* dengan menggunakan KLT (kromatografi lapis tipis), uji identifikasi pola spektra dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Visible 1601 merk Shimadzu, dan perhitungan rendemen dapat dilihat pada Tabel 13 dibawah ini :

Tabel 13. Data Uji Identifikasi Klorofil *a*

Uji Identifikasi	Alat	Hasil	Literatur
Rendemen		0,0022 ± 0,036 %	
Kolom	Kromatografi kolom	135 isolat pigmen dalam tabung reaksi. Diperoleh 13-49 adalah klorofil <i>a</i> berwarna hijau hingga hijau biru	Menurut Jeffrey, <i>et al</i> (1997) menyatakan bahwa klorofil <i>a</i> berwarna hijau kebiruan.
	Buret	143 isolat pigmen dalam tabung reaksi. Diperoleh 107-126 adalah klorofil <i>a</i> berwarna hijau-biru	
KLT	KLT	Hasil kolom : Rf : 0.42	Rf Klorofil <i>a</i> 0.38-0.42 (Pangestuti, <i>et al.</i> , 2007)
		Hasil buret : Rf : 0.42	
Pola spektra	Spektrofotometer UV-Vis	Pelarut	
		Aseton	Dietil eter
		B (soret) : 430 nm Qx : 616 nm Qy : 662 nm	B (soret) : 429 nm Qx : 615 nm Qy : 661 nm
			Dalam pelarut aseton (Jeffrey, <i>et al.</i> , 1997). B (soret) : 430,3 nm Qx : 616,5 nm Qy : 662,1 nm

4.1.1 Ekstraksi Klorofil *a*

Ekstraksi pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode Pangestuti, *et al* (2008) yang telah dimodifikasi oleh Muamar (2009). *Sargassum filipendula* segar dicuci, dibersihkan dan dikeringkan dengan tisu untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel.

Kemudian dipotong-potong kurang lebih 1 cm dan ditimbang 200 g kemudian di haluskan dengan mortar dan ditambahkan CaCO_3 sebanyak $\pm 0,5$ gram sebagai agen penetral. Menurut Yunizal, (1999) proses pemotongan bertujuan untuk memperluas permukaan alga coklat sehingga mempermudah proses ekstraksi.

Tahap selanjutnya adalah ekstraksi, dimana ekstraksi pada penelitian ini adalah dengan maserasi bertingkat. Menurut Lenny (2006), maserasi adalah proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada suhu ruang. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dalam perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam sel dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan.

Alga coklat diekstraksi menggunakan pelarut metanol : aseton (7:3 v/v) sebanyak 750 ml selama 60 menit pada suhu kamar. Adapun tujuan dari penggunaan metanol dan aseton adalah melarutkan semua senyawa organik yang terkandung pada bahan dengan merusak sel dalam jaringan sehingga pigmen dapat larut dalam bahan hingga bahan berwarna pucat. Proses pengekstraksian komponen kimia dalam sel tanaman yaitu pelarut organik (aseton dan metanol) akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dalam pelarut organik di luar sel, maka larutan terpekat akan berdifusi keluar sel

dan proses ini akan berulang terus sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi cairan zat aktif di dalam dan di luar sel.

Prinsip dari maserasi ini adalah mengambil senyawa target dengan cara merendam dalam suhu ruang. Dari hasil ekstraksi 200 gram alga coklat dengan pelarut aseton : metanol (7:3 v/v) sebanyak 750 ml (4 kali perendaman) dihasilkan 700 ml filtrat berwarna hijau kecoklatan. Proses pencucian awal hingga proses maserasi dapat dilihat pada Gambar 11 berikut ini :



Gambar 11. Proses Ekstraksi

- (a). Pencucian alga coklat
- (b). Pengeringan alga coklat
- (c). Pemotongan alga coklat
- (d). Penumbukan alga coklat

- (e). Penambahan pelarut
- (f). Proses ekstraksi (perendaman)

4.1.2 Fraksinasi Klorofil a

Tahapan setelah ekstraksi adalah fraksinasi dengan menggunakan corong pisah. Fraksinasi adalah proses pemisahan suatu kuantitas tertentu dari campuran yang dibagi dalam beberapa jumlah kecil atau fraksi-fraksi, dimana komposisi perubahan sesuai dengan gradien tertentu (Wikipedia, 2010^f). Ditambahkan oleh Sudarmadji (1996), istilah partisi (pemisahan) sering dipakai untuk menggambarkan bagaimana suatu senyawa memisah diantara 2 medium yang tak saling melarutkan. Proses fraksinasi ini menggunakan filtrat hasil ekstraksi, dietil eter, saturasi garam dan air ledeng.

Penyaringan menggunakan kertas saring halus yang bertujuan untuk mengambil filtrat hasil ekstraksi. Filtrat yang dihasilkan berwarna hijau kecoklatan dan pekat, sedangkan sisa rumput laut setelah diekstraksi berwarna coklat muda (pudar) yang menunjukkan bahwa pigmen telah terlarut dalam pelarut organik yang digunakan. Proses penyaringan dapat dilihat pada Gambar 12 berikut ini :



Gambar 12. Proses Penyaringan

Filtrat selanjutnya di fraksinasi hingga membentuk 2 fase yaitu fase atas dan fase bawah. Fraksinasi menggunakan dietil eter bertujuan untuk mengangkat semua pigmen ke fase atas. Fraksinasi menggunakan corong pisah merupakan pemisahan komponen kimia di antara 2 fase pelarut yang tidak saling bercampur di mana sebagian komponen larut pada fase atas dan sebagian larut pada fase bawah, kedua fase yang mengandung zat terdispersi dikocok dan dibiarkan sampai terjadi pemisahan sempurna dan terbentuk dua lapisan fase cair, dan komponen kimia akan terpisah ke dalam kedua fase tersebut sesuai dengan tingkat kepolarannya dengan perbandingan konsentrasi yang tetap.

Menurut Shriner, *et al.*, (1980), pelarut polar akan melarutkan zat terlarut yang polar dan pelarut non polar akan melarutkan zat terlarut yang non polar disebut "*like dissolves like*". Pelarut non polar yang digunakan adalah dietil eter yang bersifat non polar yang akan melarutkan sampel (pigmen) yang cenderung bersifat non polar walau didalam sampel (pigmen) tersebut tidak semua larut dalam dietil eter. Bahan organik yang larut dalam dietil eter akan berada di bagian atas corong pisah yang dinamakan fase atas. Dietil eter merupakan sebuah [pelarut](#) laboratorium yang umum dan memiliki kelarutan terbatas di dalam air, karena kurang rapat bila dibandingkan dengan air, lapisan eter biasanya berada paling atas (Wikipedia, 2010⁶). Ditambahkan oleh Sudarmadji, *et al* (2003), jika suatu senyawa ditaruh dalam corong pisah yang berisi dua macam pelarut

yang sukar bercampur (air dan eter), maka senyawa tersebut akan terpartisi (terpisah) diantara kedua pelarut tersebut.

Fase bawah merupakan bagian yang lebih bersifat polar terisi oleh aseton, metanol, saturasi garam, air ledeng dan terdapat sedikit pigmen yang larut pada pelarut yang bersifat polar. Aseton digunakan sebagai [pelarut apotik polar](#) dalam kebanyakan [reaksi organik](#), polaritas aseton yang menengah dapat melarutkan berbagai macam senyawa dan metanol merupakan pelarut portik polar yang mempunyai polaritas yang tinggi yang dapat melarutkan berbagai senyawa organik (Wikipedia, 2010^h). Ditambahkan oleh Sudarmadji, *et al.*, (1997), bahwa aseton, metanol, serta air mempunyai sifat *misible* yaitu dapat bercampur dengan air dalam berbagai proporsi. Saturasi garam dan air ledeng dapat meningkatkan keelektronegatifan dan keelektropositifan larutan menjadi lebih polar sehingga mengikat senyawa yang bersifat polar.

Hasil fase bawah dari proses fraksinasi ini tidak digunakan karena kandungan pigmen yang terkandung didalamnya jumlahnya sangat sedikit. Fase atas ditampung pada sebuah erlenmeyer yang telah dibungkus dengan alumunium foil. Pada proses fraksinasi perbandingan antara filtrat : dietil eter : saturasi garam : air ledeng adalah 50 : 25 : 70 : 5 ml. Dari perbandingan tersebut fase atas yang dihasilkan \pm 25 ml. Berdasarkan hasil ini dapat diasumsikan bahwa dietil eter yang digunakan mampu mengikat hampir seluruh pigmen. Proses fraksinasi dapat dilihat pada Gambar 13 berikut ini :



(a)

(b)

(c)

Gambar 13. Proses Fraksinasi

(a). 2 fase yang terbentuk (fase atas dan fase bawah)

(b). Fase atas yang digunakan

(c). Fase bawah yang tidak digunakan

Filtrat yang dihasilkan dari proses fraksinasi selanjutnya di *rotary evaporator vacuum* dengan suhu 30°C dan kecepatan 100 rpm untuk menguapkan pelarut sampai volume berkurang. Penguapan atau “evaporasi” adalah salah satu cara untuk mengeluarkan atau menghilangkan sebagian pelarut dari suatu bahan sehingga didapatkan larutan zat cair yang memiliki kosentrat pekat (Mc Cabe, *et al.*, 1987). Hui (1992) menyatakan bahwa pemekatan dilakukan sampai tidak ada pelarut yang menguap masing-masing perlakuan mempunyai waktu penguapan yang berbeda tergantung dari jumlah pelarut yang digunakan.

Setelah kering ekstrak pigmen kasar tersebut ditampung pada labu *rotary vacuum evaporator*, namun karena tidak dapat diambil maka

terlebih dahulu ekstrak kasar pigmen dilarutkan pada dietil eter sebanyak 5-10 ml atau sampai tidak ada ekstrak pigmen kasar yang menempel pada labu *rotary vacuum evaporator*. Dietil eter memiliki titik didih rendah yaitu $34,6^{\circ}\text{C}$ (sehingga mudah dihilangkan) dan dapat melarutkan berbagai senyawa organik.



Gambar 14. Proses Evaporasi

Filtrat kemudian dipindahkan ke dalam botol sampel dan dikeringkan dengan gas N_2 hingga didapatkan ekstrak pigmen kering. Fungsi gas N_2 adalah mengeringkan sampel tanpa merusak pigmen, mencegah pigmen dari oksidasi dan membuat suasana *vaccum* bebas dari oksigen yang dapat merusak pigmen. Ekstrak pigmen kering dibungkus dengan alumunium foil dan bagian penutup botol sampel dilapisi dengan *cling wrap* selanjutnya disimpan dalam *freezer*.



Gambar 15. Proses pengeringan sampel dengan gas Nitrogen

4.1.3 Isolasi Klorofil a dengan Kromatografi Kolom

Isolasi pigmen klorofil a dilakukan dengan menggunakan kolom mempunyai panjang 40 cm, diameter 2,5 cm. Fase diam *silica gel* dan fase gerak heksan : etil asetat (8:2, 7:3, 6:4, 5:5 v/v). Pemisahan pigmen dengan kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. kromatografi kolom dengan

Dari gambar di atas dapat dilihat terbentuknya pita-pita pigmen hasil pemisahan berdasarkan warna dan tingkat kepolarannya. Sistem kromatografi kolom pada penelitian ini menggunakan *normal phase* yaitu

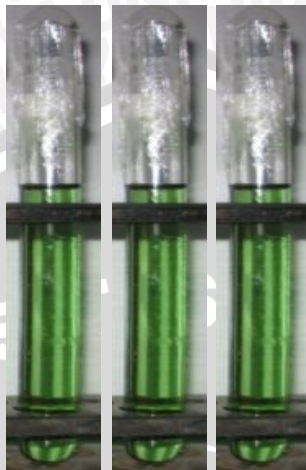
fase diam bersifat polar dan fase gerak cenderung bersifat nonpolar, sehingga pigmen yang bersifat nonpolar akan keluar terlebih dahulu (Jeffrey, *et al.*, 1997).

Prinsip kromatografi kolom adalah suatu proses migrasi diferensial dalam mana komponen-komponen pigmen ditahan secara selektif oleh fase diam, yaitu pigmen yang lebih kuat (polar) terserap oleh absorbent (fase diam) akan menggantikan tempat yang ditempati oleh pigmen yang terserap lebih lemah (non polar) dan memaksa pigmen yang lebih lemah (non polar) turun. Dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa pigmen klorofil *a* bersifat non polar (Hendayana, 2006). Hal ini juga sesuai dengan Britton, *et al* (1995), menyatakan prinsip kromatografi kolom adalah fase gerak mengalir melalui fase diam dan membawa komponen yang terdapat dalam campuran. Komponen yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal, sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat.

Pemisahan pigmen dengan kromatografi kolom ini dihasilkan 135 fraksi yang ditampung pada tabung reaksi berdasarkan warnanya. Fraksi yang diduga klorofil *a* terdapat pada tabung 13 sampai tabung ke 49 yaitu berwarna hijau biru (Gambar 17). Hal ini sesuai dengan Jeffrey, *et al* (1997) menyatakan bahwa klorofil *a* berwarna hijau kebiruan.

Fraksi klorofil *a* yang dihasilkan oleh kromatografi kolom masih belum memenuhi tingkat kemurnian yang sesuai ditandai dengan pigmen klorofil *a* yang masih bercampur dengan pigmen yang lainnya. Hal ini dibuktikan dengan adanya hasil KLT yang menghasilkan banyak spot

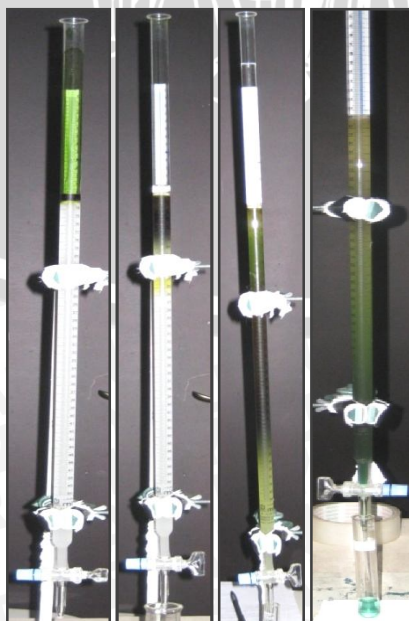
(tailing). Hal ini disebabkan pigmen klorofil a yang bercampur sebagai akibat perbedaan spesifikasi polaritas yang sangat kecil juga panjang dan diameter kolom yang digunakan terlalu besar.



Gambar 17. Klorofil a hasil isolasi kromatografi kolom

4.1.3.1 Isolasi Klorofil a dengan Buret

Hasil isolat yang diperoleh berdasarkan pengelompokan warnanya diisolasi lagi dengan menggunakan buret mempunyai panjang 50 cm, diameter 1,5 cm, dengan fase diam silica gel 20 gram dan fase gerak heksan : aseton (8,5 : 1,5 v/v) (Costa, *et al*, 2008). Pemisahan pigmen dengan kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 18. Pemisahan klorofil a dengan buret

Kemudian diperoleh fraksi yang diduga klorofil a terdapat pada tabung 107 sampai tabung ke 126 dari 143 fraksi yang diperoleh yaitu berwarna hijau biru (Gambar 19). Hal ini sesuai dengan Jeffrey, *et al* (1997) menyatakan bahwa klorofil a berwarna hijau kebiruan.

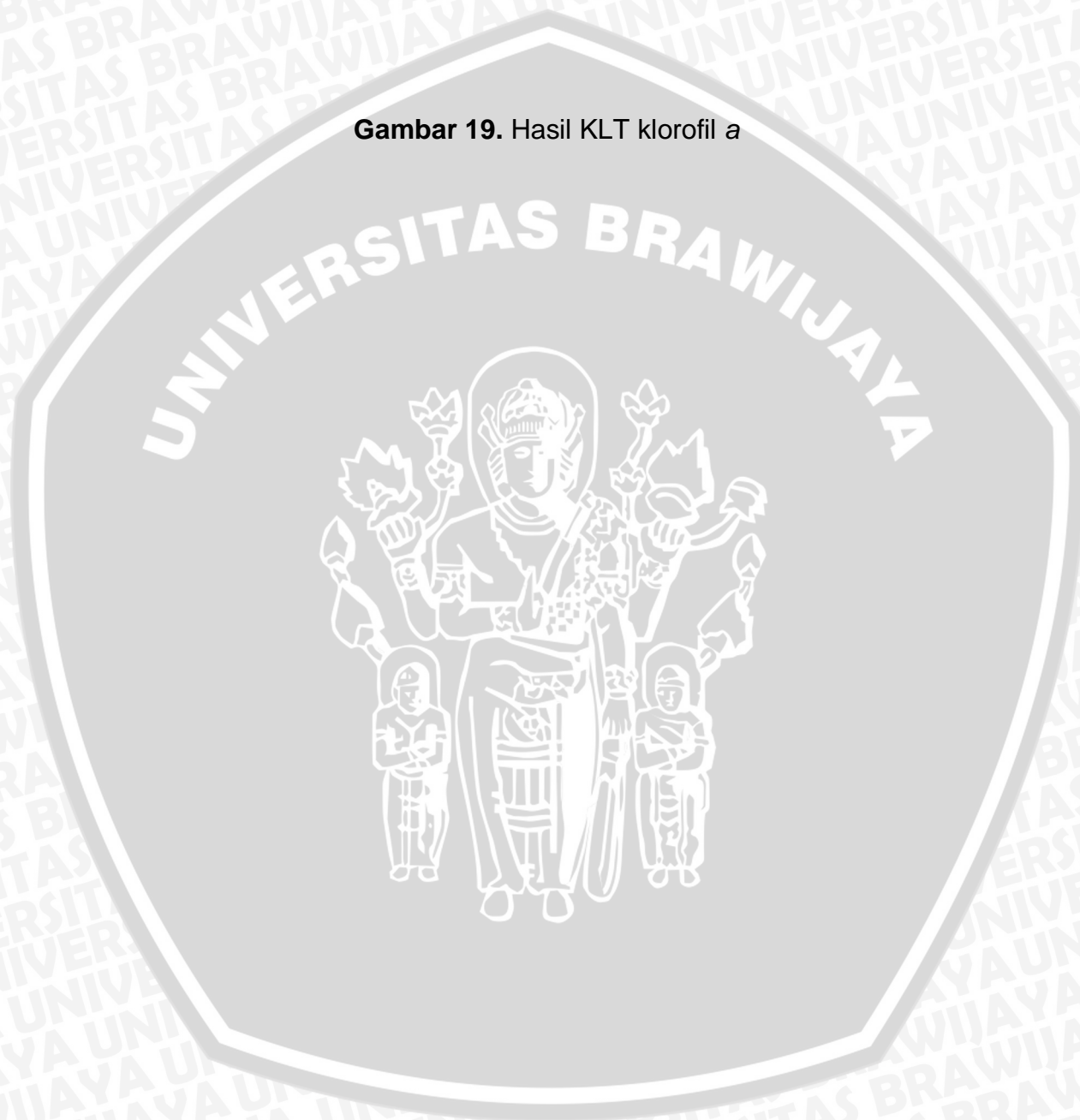
**Gambar 18.** Klorofil a hasil isolasi kromatografi kolom dengan buret**4.1.4 Identifikasi Klorofil a****4.1.4.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Hasil Kolom**

Klorofil a hasil kromatografi kolom diidentifikasi menggunakan KLT dengan fase diam *silica gel* dan fase gerak Heksan : Aseton (7:3 v/v).

Hasil KLT klorofil a dapat dilihat pada Gambar 19.



Gambar 19. Hasil KLT klorofil a



Dari gambar di atas diketahui bahwa total warna yang terbentuk lebih dari satu spot, yaitu berwarna hijau biru. Jeffrey, *et al* (1997), menyatakan pigmen klorofil *a* berwarna hijau biru. Jumlah total warna yang terbentuk pada pelat KLT memberikan informasi mengenai jumlah pigmen yang terdapat pada ekstrak. Dengan demikian ekstrak yang dihasilkan belum murni karena terbentuk lebih dari satu spot. Selain berdasarkan warna, pengukuran nilai *R_f* juga dilakukan untuk memperkuat identifikasi klorofil *a* hasil isolasi. Nilai *R_f* yang diperoleh dari KLT di atas yaitu 0.42, hasil ini tidak berbeda jauh dengan penelitian yang dilakukan oleh Pangestuti, *et al* (2008), nilai *R_f* klorofil *a* berkisar 0.38 - 0.42 dengan fase diam dan fase gerak yang sama. Metode KLT menggunakan fase diam polar dan fase gerak dominasi nonpolar akan menyebabkan klorofil *a* bergerak mengikuti fase geraknya, sehingga memiliki nilai *R_f* yang lebih tinggi (Ati, *et al.*, 2006).

4.1.4.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Hasil Buret

Klorofil *a* hasil buret diidentifikasi menggunakan KLT dengan fase diam *silica gel* dan fase gerak Heksan : Aseton (7:3 v/v). Hasil KLT klorofil *a* dapat dilihat pada Gambar 20.



Gambar 20. Hasil KLT klorofil a

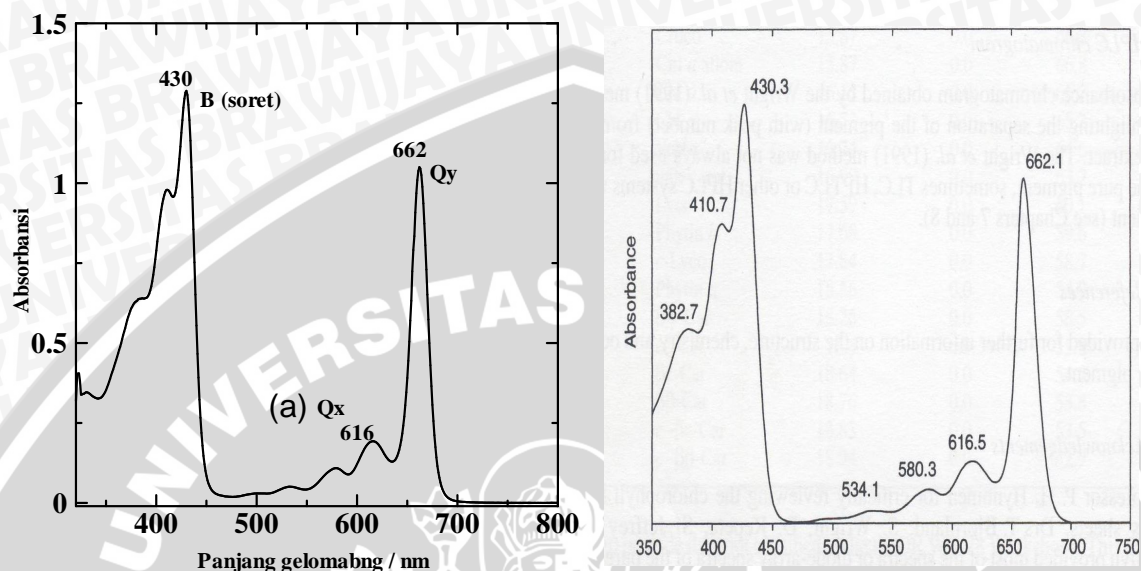
Dari gambar di atas diketahui bahwa total warna yang terbentuk hanya satu spot, yaitu berwarna hijau biru. Jeffrey, *et al* (1997), menyatakan pigmen klorofil a berwarna hijau biru. Jumlah total warna yang terbentuk pada pelat KLT memberikan informasi mengenai jumlah pigmen yang terdapat pada ekstrak. Selain berdasarkan warna, pengukuran nilai Rf juga dilakukan untuk memperkuat identifikasi klorofil a hasil isolasi. Nilai Rf yang diperoleh dari KLT di atas yaitu 0.42, hasil ini tidak berbeda jauh dengan penelitian yang dilakukan oleh Pangestuti, *et al* (2008), nilai Rf klorofil a berkisar 0.38 - 0.42 dengan fase diam dan fase gerak yang sama. Metode KLT menggunakan fase diam polar dan fase gerak dominasi nonpolar akan menyebabkan klorofil a bergerak mengikuti fase geraknya, sehingga memiliki nilai Rf yang lebih tinggi (Ati, *et al.*, 2006).

4.1.4.3 Spektrofotometri

Klorofil dan turunannya memiliki karakteristik spesifik yang memungkinkan dilakukannya identifikasi secara spektroskopi. Molekul yang berwarna hijau tersebut memiliki serapan khas pada daerah biru dan merah dari spektrum tampak (Gross, 1991).

Pola spektra klorofil a diidentifikasi menggunakan aseton dan dietil eter. Selanjutnya pola spektra dan serapan maksimum hasil isolasi

dibandingkan dengan pola spektra dan serapan maksimum pada literatur (Jeffrey, *et al.*, 1997) dengan pelarut yang sama. Hasil pola spektra dalam pelarut aseton dapat dilihat pada Gambar 21.



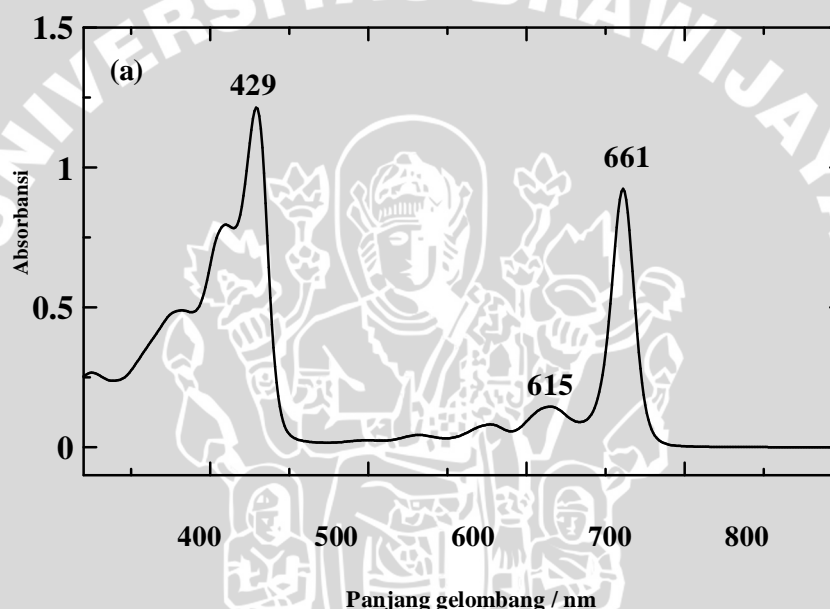
Gambar 21 (a). Pola spektra pigmen klorofil a hasil isolasi dalam pelarut aseton.

(b). Pola spektra klorofil a dalam pelarut aseton (Jeffrey, *et al.*, 1997).

Dari Gambar 21 (a) diketahui bahwa pola spektra klorofil a hasil isolasi memiliki kemiripan dengan pola spektra klorofil a menurut Jeffrey, *et al* (1997), yang ditunjukkan pada Gambar 21 (b). Serapan maksimum klorofil a hasil isolasi pada pita Qy, Qx dan pita B (solet) berturut-turut 662, 616 dan 430 nm. Hal ini mendekati dengan serapan maksimum klorofil a menurut Jeffrey, *et al* (1997) yaitu 662.1, 616.5 dan 430.1 nm. Costa, *et al* (2008), menyatakan bahwa berdasarkan urutan tingkatan energinya, pola spektra klorofil memiliki tiga pita utama yang dinyatakan dengan pita Qy, pita Qx dan pita B (solet). Ditambahkan oleh Gross (1991) dalam Tugiman, *et al.*, (2008), yang menyatakan bahwa klorofil a

mempunyai serapan maksimum pada daerah biru solet (B) 400-450 nm dan daerah merah (Qy) pada 650-700 nm.

Pengukuran pola spektra klorofil *a* hasil isolasi dilakukan juga dalam pelarut dietil eter. Berdasarkan Gambar 22 diketahui bahwa serapan maksimum klorofil *a* hasil isolasi pada pita Qy, Qx dan pita B (solet) terletak pada panjang gelombang 661, 615 dan 429 nm, dimana serapan tersebut memiliki kemiripan dengan serapan klorofil *a* menurut Jeffrey, *et al* (1997) yaitu 662, 615 dan 430 nm.



Gambar 22. Pola spektra pigmen klorofil *a* hasil isolasi dalam pelarut dietil eter

Dari data di atas diketahui bahwa pola spektra dan serapan maksimum klorofil *a* hasil isolasi dalam pelarut aseton dan dietil eter memiliki kemiripan dengan pola spektra dan serapan maksimum klorofil *a* menurut Jeffrey, *et al* (1997), meskipun terdapat pergeseran panjang gelombang yang tidak terlalu jauh. Toto, *et al* (2006) menyatakan bahwa pergeseran yang terjadi diduga karena adanya interaksi antara zat terlarut

(pigmen) dan pelarut yang sangat ditentukan oleh kualitas pelarut atau kemurnian pelarut yang digunakan untuk analisa.

4.2 Pembahasan

4.2.1 Kromatografi Kolom

Isolasi klorofil *a* pada penelitian ini menggunakan kolom kromatografi dengan diameter 3,5 cm dan 40 cm. Teknik kromatografi kolom dipilih karena dapat memisahkan senyawa (pigmen) dan memurnikannya. Kolom kromatografi memiliki keuntungan selain digunakan untuk analisa kualitatif juga digunakan analisa kuantitatif. Kolom kromatografi memiliki kekurangan yaitu memiliki waktu retensi yang cukup lama karena panjang dan diameter kolom, fase cair (jenis dan jumlah), kecepatan aliran (Sastrohamidjojo, 2007). Isolasi alga coklat (*Sargassum filipendula*) dihasilkan 3 pigmen utama yang diidentifikasi yaitu klorofil *a*, betakaroten, dan fukosantin. Menurut Zaifbio (2009), alga coklat mengandung pigmen klorofil *a*, *c*, betakaroten dan santofil yaitu fukosantin.

Pemisahan pigmen menggunakan kromatografi kolom dilakukan dengan fase diam silika gel dan fase gerak heksan : etil asetat dengan perbandingan pelarut yang berbeda yaitu 8:2 v/v, 7:3 v/v, 6:4 v/v dan 5:5 v/v dikarenakan perbedaan kepolaran pigmen tersebut. Menurut Gross (1991), klorofil *a* dan karoten memiliki sifat non polar sedangkan fukosantin memiliki sifat yang lebih polar. Untuk menurunkan pigmen tersebut menggunakan prinsip "*like dissolves like*" dimana proses

pemisahan suatu bahan dari campurannya. Pelarut polar akan melarutkan yang polar dan pelarut non polar akan melarutkan non polar.

Pigmen yang dihasilkan sebanyak 135 fraksi yang ditampung pada tabung reaksi berdasarkan warnanya. Fraksi yang diduga klorofil *a* terdapat pada tabung 13 – 49 berwarna hijau biru, warna tersebut merupakan ciri khas dari pigmen klorofil *a* (Jeffrey, *et al*, 1997; Gross, 1991). Penelitian oleh Widjayanti (2009), memperlihatkan pemisahan pigmen dengan kolom kromatografi dihasilkan 71 fraksi yang ditampung pada tabung reaksi berdasarkan warnanya dengan fase gerak yang sama (heksan : etil asetat 8 : 2 v/v). Perbedaan jumlah fraksi diduga karena jumlah sampel, diameter dan tinggi kolom yang berbeda.

Pigmen yang dihasilkan belum murni ditandai dengan timbulnya total warna lebih dari satu spot pada pelat KLT, diduga pigmen klorofil *a* tercampur dengan pigmen lain akibat perbedaan tingkat kepolaran yang kecil dan kolom yang digunakan terlalu besar. Hasil isolat dikelompokkan berdasarkan warna dan di isolasi lagi menggunakan buret. Buret yang digunakan memiliki diameter 1,5 cm dan tinggi 50 cm. Pemisahan pigmen menggunakan fase diam silika gel sebanyak 20 gram dan fase gerak menggunakan heksan : aseton (8,5 : 1,5 v/v) (Costa, *et al*, 2008). Pigmen yang dihasilkan sebanyak 143 fraksi yang ditampung pada tabung reaksi berdasarkan warnanya. Fraksi yang diduga klorofil *a* terdapat tabung 107 – 126 berwarna hijau biru, warna tersebut merupakan ciri khas dari pigmen klorofil *a* (Jeffrey, *et al*, 1997; Gross, 1991).

4.2.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi awal penelitian ini menggunakan KLT dengan fase gerak heksan : aseton (7 : 3 v/v). Nilai Rf yang dihasilkan adalah 0.42 dan terbentuk satu spot warna hijau biru, warna tersebut merupakan ciri khas dari pigmen klorofil a (Harborne, 1987; Gross, 1991; Jeffrey, *et al* 1997), total warna yang dihasilkan membuktikan bahwa pigmen yang dihasilkan murni. Hasil tersebut didukung penelitian Pangestuti, *et al*, (2008) dan Wang, *et al*, 1995 dengan fase gerak yang sama menyatakan bahwa klorofil a memiliki kisaran nilai Rf antara 0.38-0.42. Penelitian sebelumnya oleh Madalena (2006), nilai Rf klorofil a pada daun *alfalfa* dengan fase gerak aseton : metanol : IPA : toluene (5 : 4 : 1 : 90 v/v) berkisar antara 0.40-0.63. Nilai Rf bervariasi tergantung pada pelarut, penjerap, kemurnian, dan konsentrasi pigmen (Heriyanto dan Limantara, 2006).

4.2.3 Spektrofotometer UV-VIS

Klorofil dan turunannya memiliki karakteristik spesifik yang memungkinkan dilakukannya identifikasi secara spektroskopi. Molekul yang berwarna hijau tersebut memiliki serapan khas pada daerah biru dan merah dari spektrum tampak (Gross, 1991). Pola spektra dan serapan maksimum klorofil a hasil isolasi dalam pelarut aseton pada pita Qy, Qx, dan pita B (soret) 662, 616, dan 430 nm sedangkan dalam pelarut dietil eter pada pita Qy, Qx, dan pita B (soret) 661, 615, dan 429 nm memiliki kemiripan dengan pola spektra dan serapan maksimum klorofil a menurut Jeffrey, *et al* (1997) yaitu pada pita Qy, Qx, dan pita B (soret) 662.1, 616.5, dan 430.1 nm, meskipun terdapat pergeseran panjang gelombang yang tidak terlalu jauh. Toto, *et al* (2006) menyatakan bahwa pergeseran

yang terjadi diduga karena adanya interaksi antara zat terlarut (pigmen) dan pelarut yang sangat ditentukan oleh kualitas pelarut atau kemurnian pelarut yang digunakan untuk analisa.

4.2.4 Rendemen Klorofil a

Nilai rendemen klorofil a sebesar $0,036 \% \pm 0,0022$. Menurut Nurdiana dan Limantara (2008), kandungan klorofil a pada *Sargassum muticum* sebesar 0,6319 (g/kg) dan *Laminaria saccharina* sebesar 0,538 (g/kg) membuktikan bahwa kandungan klorofil a dalam *Sargassum filipendula* lebih rendah dibandingkan dengan jenis alga coklat yang lain. Perbedaan kandungan diduga pada pengambilan sampel yang berbeda. *Sargassum filipendula* diambil pada kedalaman 4 meter, substrat pasir berlumpur, ombak dan arus sedang. Menurut Nurdiana, *et al*, (2008), total klorofil pada kedalaman 3 meter lebih rendah dibandingkan kedalaman 6 meter. Pada alga coklat klorofil c dan fukosantin berfungsi sebagai pigmen pemanen cahaya, energi yang diperoleh kemudian ditransfer ke klorofil a. Cahaya yang masuk pada kedalaman 3 meter akan lebih banyak dibandingkan dengan cahaya yang masuk pada kedalaman 6 meter. Intensitas cahaya tinggi pada klorofil a dapat menyebabkan pigmen mengalami fotodegradasi.

5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian mengenai Isolasi Klorofil a dari Alga Coklat (*Sargassum filipendula*) dengan Menggunakan Kromatografi Kolom diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

- Komposisi pigmen hasil identifikasi pada alga coklat (*Sargassum filipendula*) meliputi : klorofil a, fukosantin, dan β -karoten. Hasil rendemen Klorofil a sebesar $0,036 \% \pm 0,0022$.
- Nilai Rf pigmen Klorofil a hasil identifikasi KLT (Kromatografi Lapis Tipis) adalah 0,42.
- Identifikasi pola spektra dan panjang gelombang (λ_{max}) pigmen Klorofil a dengan pelarut aseton dan dietil eter memiliki pola dan panjang gelombang yang mirip dengan penelitian Jeffrey, *et al.*, (1997) yaitu B (soret) : 430 nm; Qx : 616 nm; Qy : 662 nm.

5.2 Saran

Pada penelitian ini diharapkan lebih berhati-hati dalam proses preparasi kolom dan pemilihan ukuran (diameter dan tinggi) kolom agar pigmen Klorofil a yang dihasilkan murni.

DAFTAR PUSTAKA

- Anis, E. 2008. **Pigmen Sebagai Zat Pewarna dan Antioksidan Alami**. UMM Press. Malang
- Anonymous. 2009^a. **Structure and Reactions of Chlorophyll**. <http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/steer/chloro.htm>. Diakses tanggal 09 Agustus 2009.
- _____. 2009^b. **Spektrofotometer**. <http://rgmaisayah.wordpress.com/2008/11/25/spektrofotometer/>. Diakses tanggal 09 Agustus 2009.
- _____. 2010^a. **Sargassum filipendula**. www.diaryroomblog.blogspot.com. Diakses Tanggal 26 Agustus 2010 pukul 13.00 WIB.
- _____. 2010^b. **Modul Phaeophyta**. <http://yeadhi.blogspot.com/> Diakses Tanggal 26 Agustus 2010 pukul 13.00 WIB.
- _____. 2010^c. **Perbedaan Struktur Klorofil a dan b**. <http://www.food-info.net/uk/colour/natcolour.htm> Diakses Tanggal 26 Agustus 2010 pukul 13.00 WIB.
- Aslan, L. M. 1998. **Rumput Laut**. Kanisius. Yogyakarta.
- Ati, N. H; P. Rahayu; S. Notoesoedarmo; dan L. Limantara. 2006. **Komposisi dan Kandungan Pigmen Tumbuhan Pewarna Alami Tenun Ikat di Kabupaten Timor Tengah Selatan, Propinsi Nusa Tenggara Timur**. Indo. J. Chem Vol 6 (3), 325 – 331.
- Atmadja, W. S; A. Kadi; Sulistijo, dan Rachmaniar. 1996. **Pengenalan Jenis-jenis Rumput Laut Indonesia**. Puslitbang Oseanologi-LIPI. Jakarta.
- Atmadja, W. 2007. **Apa Rumput Laut Itu Sebenarnya?**. <http://www.coremap.or.id/print/article.php?id=264>, diakses pada 29 April 2009.
- Bachtiar, E. 2007. **Penelusuran Sumber Daya Hayati Laut (Alga) Sebagai Biotarget Industri, Makalah**. Universitas Padjadjaran Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Jatinangor. Bandung.
- Christiana, R; A.B Susanto; dan L. Limantara. 2008. **Analisis Pigmen Ekstrak Aseton Rumput Laut *Udotea sp*, *Amphiora rigida*, dan *Turbinaria conoides***. Prosiding Sains dan Teknologi Pigmen Alami. Hal.194-210.
- Costa, J.F, F.F. Karwur dan L. Limantara. 2008^a. **Efek Beta KARoten dan Agregasi Klorofil Pada Fotostabilitas Klorofil a dalam Pelarut Aseton**. Jurnal Natur Indonesia 11(2)
- Costa, J.F., F. F Karwur dan L. Limantara. 2008^b. **Pengaruh Lutein dan Agregat Klorofil Dalam Fotostabilitas Klorofil a**. Prosiding Sains dan Teknologi Pigmen Alami
- Dewi, J. R., T. Estiasih dan E. S. Murtini. 2007. **Aktivitas Antioksidan Dedak Sorgum Lokal Varietas Coklat (*Sorghum bicolor*) Hasil**

Ekstraksi Berbagai Pelarut. Jurnal Teknologi Pertanian, Vol. 8 No. 3. Desember 2007.

Eva. 2008. **Budidaya Rumput Laut.** www.w3.org. diakses tanggal 15 Februari 2009

Falkowski, P.G. 1997. **Aquatic Photosynthesis.** Blackwell Science.

Goodwin, T. W. 1974. **Carotenoid and Biliproteins in Algal Physiology and Biochemistry.** University of California Press. Berkeley

Gross, J. 1991. **Pigments In Vegetables Chlorophylls and Carotenoids.** An Avi Book. New York.

Guenther, E. Diterjemahkan oleh S. Ketaren. 1987. **Minyak Atsiri I.** Penerbit UI. Jakarta.

Handayani, T., Sutarno dan A.D Setyawan. **Analisis Komposisi Nutrisi Rumput Laut Sargassum crassifolium IJ. Agardh.** Biofarmasi 2 (2) Hal: 45:52.

Hart, H. 1983. **Kimia Organik.** Houghton Mifflin Co. Michigan State University. USA. Alih Bahasa Dr. Suminar Achmadi Ph. D. Erlangga. Jakarta.

Hendayana, S. 2006. **Kimia Pemisahan.** PT Remaja Rosdakarya. Bandung.

Heriyanto dan L.Limantara. 2006. **Komposisi dan Kandungan Pigmen Utama Tumbuhan Taliputri *Cuscuta australis* R.Br dan *Cassytha filiformis* L.** Markara Sains Vol 10 :2.

Huda, N. 2001. **Pemeriksaan Kinerja Spektrofotometer UV-Vis. GBC911A Menggunakan Pewarna Tartrazine CL 19140.** Bidang Evaluasi dan Pengembangan Keselamatan Instalasi. Sigma Epsilon.

Hui, Y. H. 1992. **Encyclopedia of Foods Science & Technology. Vol 2. A** Wiley Interscience Publication. John Willey & Sons Inc. New York

Indriani, H dan Sumarsih. 1992. **Budidaya, Pengolahan dan Pemasaran Rumput Laut.** Penebar Swadaya. Jakarta.

Jeffrey, S. W, R. F. C Mantoura, and S. W Wright. 1997. **Phytoplankton Pigments in Oceanography.** Guidelines to Modern Methods. Paris. UNESCO

_____. 1997. **Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Method.** UNESCO Publishing. Paris

Kadi, A. 1989. **Peranan Rumput Laut Sebagai Salah Satu Bahan Baku Industri Penunjang Kesehatan.** Makalah Seminar nasional Obat-Pangan dari Laut LON-LIPI. Jakarta

_____, A. 2008. **Beberapa Catatan Kehadiran Marga *Sargassum* di Perairan Indonesia.** Pusat Penelitian Oseanografi-LIPI. Jakarta.

Komara, A. 1991. **Mempelajari Ekstraksi Oleoresin dan Karakteristik Mutu Oleoresin dari Bagian Cabe Rawit (*Capsicum frutescens*, L) dalam Anam, C. (2000). Ekstraksi Oleoresin**

Jahe (*Zingiber officinale*) Kajian Dari Ukuran Bahan, Pelarut, Waktu dan Suhu. Tesis. Universitas Brawijaya. Malang.

Kusmita, L dan L. Limantara. 2007. **Karakterisasi dan Komposisi Karotenoid Limbah Serabut Kelapa Sawit dengan KCKT *Photo Diode Array*.** Jurnal Organisme, Vol (2): 201-208

Khuluq, A.D., S.B. Widjanarko dan E. S. Murtini. 2007. **Ekstraksi dan Stabilitas Betasianin Daun Darag (Alternatif dentata) Kajian Perbandingan Pelarut Air : Etanol dan Suhu Ekstraksi).** Jurnal Teknologi Pertanian. 8(3) Hal: 169-178.

Lide, Ed. 2010. **Handbook of Chemistry and Physics.** CRC Press. Boca Rato. Hal 8-141.

Lenny, S. 2006. **Isolasi dan Uji Bioaktivitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metode Uji Brine Shrimp.** USU repository

Limantara, L. 2006. **Buku Panduan Praktikum.** Widya Sari Press. Salatiga

Limantara, L dan P. Rahayu. 2008. **Sains dan Teknologi Pigmen Alami. Prosiding Sains dan Teknologi Pigmen Alami.** Hal: 2-42.

Muamar, H. A. 2009. **Termostabilitas Pigmen Fukosantin, Klorofil a dan Ekstrak Kasar *Padina australis* dan *Sargassum polycystum* Terhadap Suhu dan Lama Pemanasan yang Berbeda.** Skripsi. Program Studi THP Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang.

Nurchayanti, A. D. R dan L. Limantara. 2007. **Fotodegradasi Ekstrak Kasar, Klorofil a dan Fucoxanthin *Padina australis* dan *Dyctyota crenulata*.** Prosiding Back To Nature dengan Pigmen Alami. Hal : 224- 241

Nugrohadi, S., L. Kusmita dan L. Limantara. 2000. **Pengaruh Agregasi Pada Pola Spektra Ekstrak Kasar Pigmen Daun Alfalfa (*Medicago sativa* L) dalam Pelarut Aseton dan Metanol.** Seminar Nasional Pendidikan Biologi.

Nurdiana, D. N dan L. Limantara. 2008. **Ragam Pigmen Rumput Laut Coklat: Potensi dan Aplikasi.** Departemen Biologi, Universitas Airlangga. Surabaya.

Pangestuti, R, L. Limantara, dan A. Susanto. 2007. **Kandungan dan Aktivitas Antioksidan Fukosantin *Sargassum polycystum* C. A Agardh.** Prosiding Back to Nature dengan Pigmen Alami Hal. 201- 209.

Perry. 1984. dalam Syaflan dan Hastuti. 2002. **Ekstraksi Oleorisin Suatu Alternatif Untuk Memberikan Nilai Tambah Bagi Vanili.** Seminar PATPI. Malang.

Prangdimurti, E. 2007. **Pigmen Alami.** Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Pratiwi, R., A. B. Prasetyo dan L. Limantara. **Stabilitas Pigmen Bixin Biji Kesumba (*Bixa Orellana*) Terhadap Suhu.** Prosiding Back To Nature dengan Pigmen Alami. Hal : 205-213

Putri, W. D. R, E. Zubaidah, dan N. Sholahudin. 2001. **Ekstraksi Pewarna Alami Daun Suji, Kajian Pengaruh Blanching dan Jenis Bahan Pengekstrak.** Jurnal Teknik Pertanian Vol 4 (1) : 13-24.

- Rahayu, P dan L. Limantara. 2005. **Studi Lapangan Kandungan Klorofil In Vivo Beberapa Tumbuhan Hijau di Salatiga dan Sekitarnya.** Seminar Nasional MIPA.
- Rivai, H. 1995. **Azas Pemeriksaan Kimia.** UI Press. Jakarta.
- Sastrohamidjoyo, H. 2007. **Kromatografi.** Liberty. Yogyakarta.
- Schefflan., Leopold dan Morns B. Jacobs. 1983. **Bioactive Properties of Wild Blueberry Fruits.** Journal Food Sciences.
- Sholihah, H. M. 2010. **Uji Afrodisiaka Fraksi Larut Air Ekstrak Etanol 70% Kuncup Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr.& Perry) Terhadap Libido Tikus Jantan.** Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Shriner, R. L., R. C. Fuson., D. Y Curtin., C. K. F Herman and T. C Morili. 1980. **The Systematic Identificatin of Organic Compounds.** 6nd Edition. John Willey and Sons Inc. Singapore.
- Strain, H. H., Winston, M. M., and G. Hardins. 1943. **Xanthophylls and Carotenes of Diatoms, Brown Algae, Dinoflagellates, and Sea-Anemones.** Carnegie institution of Washington. Division of Plant Biology. Stanford University. California.
- Sudarmadji, S, B. Haryono, dan Suhardi. 1997. **Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian.** Liberty. Yogyakarta.
- Susanto, AB. 2008. **Penelitian Rumput Laut Di Indonesia dan Potensi Pemanfaatan Klorofil.** Prosiding Sains dan Teknologi Pigmen Alami. Hal: 43-50.
- Sutrisno, A. D. 1987. **Pembuatan dan Peningkatan Kualitas Zat Warna Merah Alami yang Dihasilkan Oleh *Monascus purpureus*.** Di dalam Risalah Seminar Bahan Tambahan Kimiawi. PAU Pangan dan Gizi. Bogor.
- Toto, Z. A. D, P. Rahayu, F. F. Karwur, dan L. Limantara. 2006. **Identifikasi dan Isolasi Pigmen Karotenoid Berbagai Jenis Kuning Telur Unggas.** Organsime, Vol I (2) : 100-110.
- Tugiman, L. Kusmita, F. S. Rondonuwu dan L. Limantara. 2008. **Kandungan dan Fotostabilitas Pigmen Utama Ekstrak Kasar Sayuran Lokal.** Prosiding Sains dan Teknologi Pigmen Alami. Hal : 99-108
- Vogel, A. I. 1987. **Texbook of Practical Organic Chemistry,** Revised by Furnies, B.S. Fourth Edition. New York.
- Voight, R. 1994. **Lehrbuch Der Pharmazeutischen Technologie 5th Edition.** (Terjemahan S. Noerono). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Wanto dan M. Ramli. 1977. **Alat – alat Industri Kimia I.** Departemen Pendidikan Dan Kebudayaan. Jakarta.
- Warkoyo. 2008. **Metode Ekstraksi *carrageenan* Dari Rumput Laut Asal Pantai Sumenep Madura Jenis *Eucheuma spinasum*.** Uiversitas Muhamadiyah Malang
- Warsito. 2007. **Metode Isolasi dan Pemurnian Senyawa Metabolit Sekunder Dari Tanaman.** Disampaikan pada Workshop :Skrinning Senyawa Bioaktif

Widjayanti. L. 2009. **STUDI KOMPOSISI PIGMEN DAN KANDUNGAN FUKOSANTIN PADA ALGA COKLAT (*Sargassum duplicatum*, *Sargassum polycystum*, *Sargassum filipendula*, *Padina australis*, dan *Turbinaria conoides*)**. Skripsi. Program Studi THP Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang.

Wikipedia. 2009. **Metanol**. <http://www.wikipedia.org>. Diakses pada tanggal 30 Juni 2009.

Wikipedia. 2010^a. **Sargassum**. <http://www.wikipedia.org>. Diakses pada tanggal 7 Mei 2010 pukul 11.00 WIB.

_____. 2010^b. **Pelarut**. <http://www.wikipedia.org>. Diakses pada tanggal 23 Agustus 2010 pukul 13.00 WIB.

_____. 2010^c. **Heksana**. <http://www.wikipedia.org>. Diakses tanggal 3 September 2010 pukul 12.30 WIB.

_____. 2010^d. **Etil Asetat**. <http://www.wikipedia.org>. Diakses tanggal 3 September 2010 pukul 12.30 WIB.

_____. 2010^e. **Dietil Eter**. <http://www.wikipedia.org>. Diakses tanggal 3 September 2010 pukul 12.45 WIB.

_____. 2010^f. **Fraksinasi**. <http://www.wikipedia.org>. Diakses tanggal 3 September 2010 pukul 13.00 WIB.

_____. 2010^g. **Definisi Rendemen**. <http://www.wikipedia.org>. Diakses tanggal 3 September 2010 pukul 13.10 WIB.

_____. 2010^e. **Aseton**. <http://www.wikipedia.org>. Diakses tanggal 3 September 2010 pukul 12.45 WIB.

Winarno. 1990. **Teknologi Pengolahan Rumput Laut**. Pustaka Sinar Harapan. Jakarta.

Yan, X., Y. Chuda, M. Suzuki and T. Nagata. 1999. **Fucoxanthin as The Major Antioxidant in *Hijika fujiiformia*, a Common Edible Seaweed**. Biochem Vol 63(3), 605-607

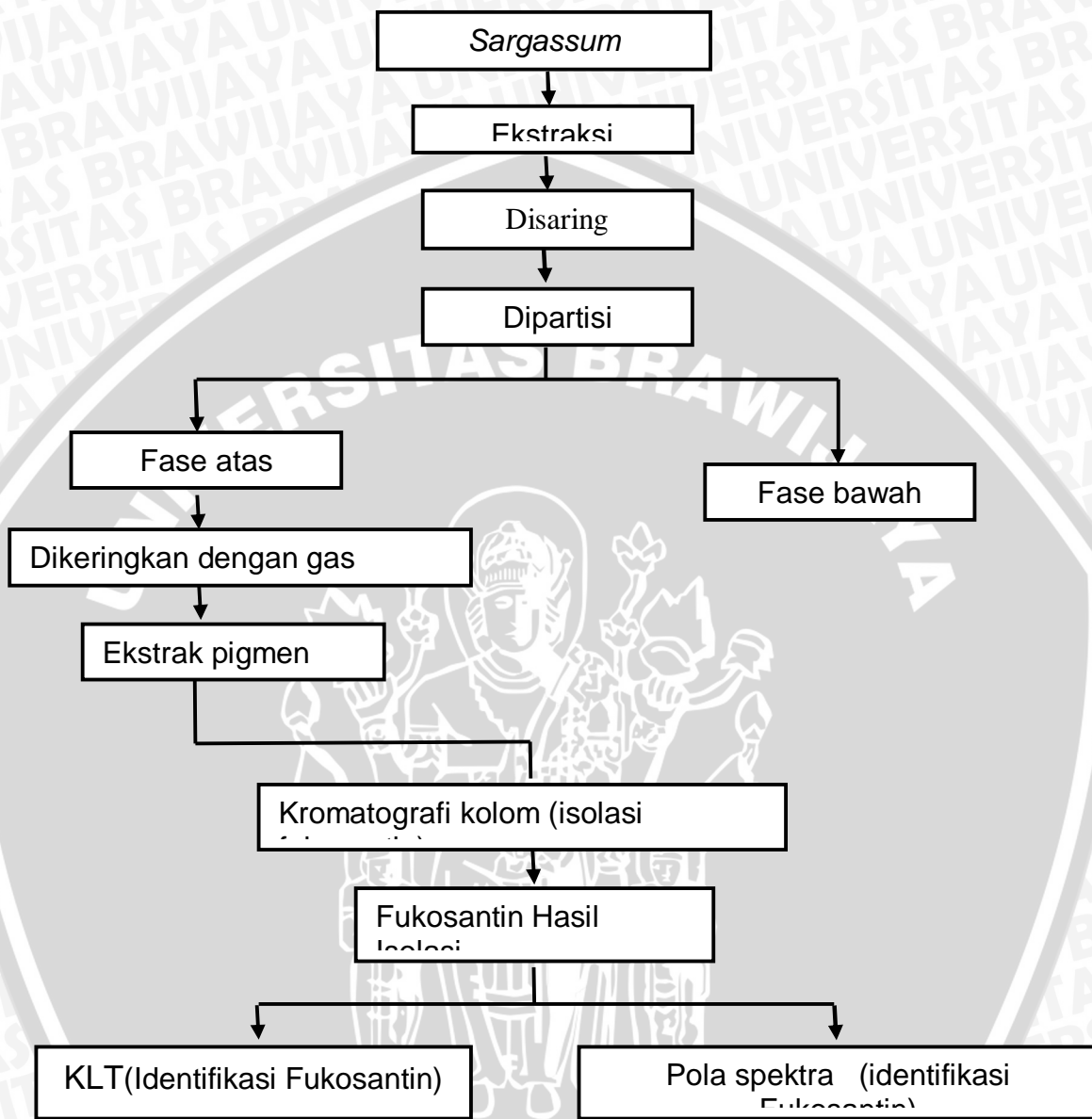
Yunizal. 1999^a. **Teknologi Pengolahan Alginat**. Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan. Departemen Kelautan dan Perikanan. Jakarta.

Yunizal. 1999^b. **Teknologi Ekstraksi Alginat Dari Rumput Laut Coklat (*Phaeophyceae*)**. Balai Penelitian Perikanan Laut. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan. Jakarta

Zaifbio. 2009. **Modul Alga**. Wordpress.com Diakses tanggal 15 Februari. 2009.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Prosedur Penelitian



Lampiran 2. Data absorbansi

Alga Coklat	Ulangan	Pengenceran	absorbansi
<i>Sargassum filipendula</i>	1	10 ⁴	0,225
	2	10 ⁴	0,245

Lampiran 3. Kadar Klorofil a

Alga Coklat	Ulangan	Jumlah Klorofil a
<i>Sargassum filipendula</i>	1	0,069 g
	2	0,075 g

Lampiran 4. Data Rendemen

Alga Coklat	Ulangan	Gram sampel	Kandungan Klorofil a	Rendemen (%)	Rata-rata Rendemen (%)
<i>Sargassum filipendula</i>	1	200 gram	0,069 g	0,02935	0,036
	2	200 gram	0,075 g	0,0303	

Lampiran 5. Perhitungan Kadar Klorofil a

A = εLc

Ket: A = absorbansi

ε = absorptifitas molar

L = lebar bagian dalam kuvet

c = konsentrasi (molar)

Ulangan 1 :

Absorbansi 0,225 pengenceran 10⁴

$A = \epsilon L C$

$0,225 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times C$

$0,225 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1}) \times C$

$C = \frac{0,225}{78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol})}$

$C = \frac{0,225}{78750 (1 \text{ mol})}$

$C = 2,85 \times 10^{-6} (1 \text{ mol})$

Mencari massa

$\text{Mol} = \frac{gr}{mr} \times \frac{1000}{v}$

$2,85 \times 10^{-6} = \frac{gr}{893,5} \times \frac{1000}{27 \text{ liter}}$

$2,85 \times 10^{-6} = \frac{gr}{893,5} \times \frac{1}{27}$

$$2,85 \times 10^{-6} = \frac{gr}{24124,5}$$

Kadar klo a = 0, 06892 gram

Ulangan 2

Absorbansi 0,245 pengenceran 10^4

$$A = \varepsilon L C$$

$$0,245 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times C$$

$$0,245 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1}) \times C$$

$$C = \frac{0,245}{78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol})}$$

$$C = \frac{0,245}{78750}$$

$$C = 3,1 \times 10^{-6}$$

Mencari massa

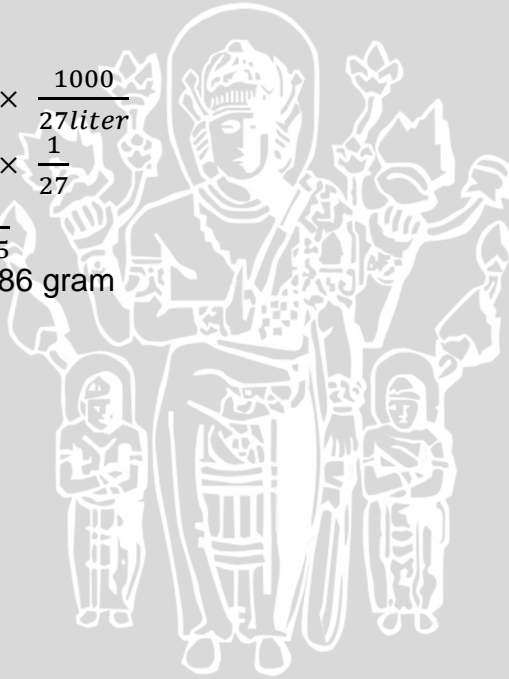
$$\text{Mol} = \frac{gr}{mr} \times \frac{1000}{v}$$

$$3,1 \times 10^{-6} = \frac{gr}{893,5} \times \frac{1000}{27 \text{ liter}}$$

$$3,1 \times 10^{-6} = \frac{gr}{893,5} \times \frac{1}{27}$$

$$3,1 \times 10^{-6} = \frac{gr}{24124,5}$$

Kadar klo a = 0, 074786 gram



Lampiran 6. Perhitungan Kadar Rendemen

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

$$\text{Ulangan 1} = \frac{0,06892}{200 \text{ gram}} \times 100\% = 0,034 \%$$

$$\text{Ulangan 2} = \frac{0,074786}{200 \text{ gram}} \times 100\% = 0,037 \%$$

$$\text{Rata-rata } (\bar{x}) = \frac{0,034 + 0,037}{2} = 0,036 \%$$

Standar deviasi :

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

$$= \frac{(0,034 - 0,036)^2 + (0,037 - 0,036)^2}{2-1}$$

$$= \frac{0,000004 + 0,000001}{1}$$

$$S = 0,0022$$

$$\text{Nilai rendemen} = 0,036 \% \pm 0,0022$$

Lampiran 7 Pembuatan Larutan

Larutan ekstraksi

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

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

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

Larutan kolom

Heksan : Etil Asetat (8:2 v/v) → Membuat 50ml

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

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

Heksan : Etil Asetat (7:3 v/v) → Membuat 50ml

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

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

Heksan : Etil Asetat (6:4 v/v) → Membuat 50ml

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

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

Heksan : Etil Asetat (6:4 v/v) → Membuat 50ml

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

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

Heksan : Etil Asetat (5:5 v/v) → Membuat 50ml

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

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

Heksan : Aseton (8,5 : 1,5 v/v) → Membuat 50ml

$$\text{Heksan} = \frac{8,5}{10} \times 50\text{ml} = 42,5 \text{ ml}$$

$$\text{Etil Asetat} = \frac{1,5}{10} \times 50\text{ml} = 7,5 \text{ ml}$$

Larutan KLT

Heksan : Aseton (7:3 v/v) → Membuat 20 ml

$$\text{Heksan} = \frac{7}{10} \times 20\text{ml} = 14\text{ml}$$

$$\text{Etil Asetat} = \frac{3}{10} \times 20\text{ml} = 6 \text{ ml}$$

Lampiran 8. Pembuatan Saturasi Garam Dapur

