

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI β -KAROTEN RUMPUT LAUT COKLAT
Padina australis DENGAN **LIQUID CHROMATOGRAPHY**
MASS SPECTROMETRY (LC-MS)

SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Oleh:
MUHAMMAD CHOIRUL ANAM
NIM. 105080313111007



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI β -KAROTEN RUMPUT LAUT COKLAT
Padina australis DENGAN LIQUID CHROMATOGRAPHY
MASS SPECTROMETRY (LC-MS)**

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

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

**Oleh:
MUHAMMAD CHOIRUL ANAM
NIM. 105080313111007**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

SKRIPSI
ISOLASI DAN IDENTIFIKASI β -KAROTEN RUMPUT LAUT COKLAT
Padina australis DENGAN *LIQUID CHROMATOGRAPHY*
MASS SPECTROMETRY (LC-MS)

Oleh:
MUHAMMAD CHOIRUL ANAM
NIM. 105080313111007

telah dipertahankan di depan penguji
 pada tanggal 27 Oktober 2014
 dan dinyatakan telah memenuhi syarat
 SK Dekan No, : _____
 Tanggal : _____

Dosen Penguji I

Dosen Pembimbing I

(Prof. Ir. Sukoso, M. Sc., Ph. D)

(Dr. Ir. Kartini Zailanie, MP)

NIP. 19640919 198903 1 002

NIP. 19550503 198503 2 001

Tanggal : _____

Tanggal : _____

Dosen Penguji II

Dosen Pembimbing II

(Dr. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS)

(Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS)

NIP. 19570119 198601 1 001

NIP. 19640726 198903 2 004

Tanggal : _____

Tanggal : _____

Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP

(Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS)

NIP. 19620805 198603 2 001

Tanggal : _____



PERNYATAAN ORISINALITAS

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

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

Malang, September 2014
Mahasiswa

Muhammad Choirul Anam
NIM. 10508031311007

UCAPAN TERIMAKASIH

Atas terselesaikannya laporan skripsi ini, penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Ir. Kartini Zailanie, MP selaku dosen pembimbing I, yang senantiasa memberikan bimbingan dan arahan dalam penyusunan usulan, proses penelitian, hingga penyusunan laporan skripsi ini;
2. Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS selaku dosen pembimbing II, yang telah banyak memberikan bimbingan dan arahan terkait aturan penulisan dan penyusunan usulan skripsi sampai dengan penyusunan laporan skripsi ini;
3. Prof. Ir. Sukoso, M. Sc. Ph. D. dan Dr. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik saran pada laporan skripsi ini;
4. Kedua orang tua tercinta, Ibu Hartinik dan Bapak Syafi'i, kakak saya Maria Ulfah dan Yoyok Triyo Wibowo, keponakan saya Fadil dan Fatan yang senantiasa memberikan doa dan semangat dalam penelitian, hingga terselesaikannya penyusunan laporan skripsi ini selama penyusunan laporan skripsi ini;
5. Tim pigmen, yang senantiasa menemani dan membantu dalam setiap tahap penelitian dari awal hingga terselesaikannya laporan skripsi ini;
6. Teman-teman THP 2010 dan seluruh warga HIMATHRIK yang telah banyak memberikan dukungan dan semangat selama penelitian skripsi ini;
7. Orang-orang yang saya cintai Seluruh pihak yang telah membantu terselesaikannya laporan skripsi ini, yang tidak bisa saya sebutkan satu-persatu, sekali lagi saya sampaikan terima kasih.

Malang, September 2014

Penulis

RINGKASAN

MUHAMMAD CHOIRUL ANAM. ISOLASI DAN IDENTIFIKASI β -KAROTEN RUMPUT LAUT COKLAT *Padina australis* DENGAN LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY (LC-MS) (Di bawah bimbingan Dr. Ir. Kartini Zailanie, MP dan Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS.

Padina australis merupakan salah satu spesies rumput laut coklat yang tersebar luas dan sangat mudah ditemukan di daerah tropis (Geraldino *et al.*, 2005). Spesies rumput laut ini sering dianggap sebagai tanaman pengganggu, namun sebenarnya dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak, makanan manusia, pupuk, anti bakteri dan anti mikroba (Hariyano *et al.*, 2010).

Warna rumput laut coklat dipengaruhi oleh keberadaan pigmen atau zat warna alami yang terkandung di dalamnya, yaitu molekul khusus yang dapat memunculkan warna dengan cara menyerap cahaya matahari dan memantulkannya pada panjang gelombang tertentu (Prangdimurti, 2007). Pigmen yang terkandung pada rumput laut coklat terdiri dari golongan klorofil yang merupakan pigmen utama yang berperan dalam proses fotosintesis dan karotenoid yang berfungsi sebagai pigmen pelengkap (Limantara dan Heriyanto, 2010).

β -karoten termasuk jenis karotenoid penting pada alga, termasuk *Padina australis* (Limantara dan Heriyanto, 2010) yang memiliki banyak manfaat bagi industri pangan dan kesehatan, di antaranya sebagai pewarna dan substansi suplemen makanan, antioksidan, anti kanker, kardiovaskuler dan penyakit degeneratif (Fretes *et al.*, 2012), serta merupakan sumber vitamin A utama di banyak negara berkembang (Ahamad *et al.*, 2007).

Beberapa metode telah dilakukan dalam identifikasi dan determinasi kandungan β -karoten, antara lain *spectrophotometry* (Dere *et al.*, 1998), *thin layer chromatography* (TLC), *high performance liquid chromatography* (HPLC), *mass spectrometry* (MS), dan *liquid chromatography mass spectrometry* (LC-MS) (Murthy, 2007). Hingga saat ini identifikasi β -karoten rumput laut coklat *Padina australis* menggunakan LC-MS belum banyak dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui berat molekul β -karoten pada rumput laut coklat *Padina australis* menggunakan instrumen LC-MS.

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif deskriptif untuk mengetahui berat molekul β -karoten yang diisolasi dari *Padina australis* menggunakan instrumen LC-MS. Metode eksploratif bertujuan untuk menemukan sesuatu yang baru berupa pengelompokan suatu gejala atau fakta tertentu untuk menggambarkan suatu variabel, gejala, dan keadaan atau fenomena apa adanya tanpa menguji suatu hipotesis tertentu (Arikunto, 2002).

Hasil analisis LC-MS menunjukkan berat molekul β -karoten yang diisolasi dari rumput laut coklat *Padina australis* adalah 536,8662 yang mendekati hasil penelitian Jeffrey *et al.*, (1997) yang menunjukkan berat molekul β -karoten sebesar 536,88.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait identifikasi dan pemanfaatan isolat β -karoten dari rumput laut coklat *Padina australis* yang mempunyai potensi besar dalam bidang kesehatan dan industri. Di samping itu, studi isolasi dan identifikasi terhadap kandungan pigmen jenis lain pada *Padina australis* juga perlu dilakukan terkait hasil kromatografi kolom yang menunjukkan adanya kandungan beberapa jenis pigmen jenis lain.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji syukur penulis haturkan ke hadirat Allah *Subhanahu Wa Ta'ala* atas segala rahmat, nikmat, dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul Isolasi dan Identifikasi β -Karoten Rumput Laut Coklat *Padina australis* dengan LC-MS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*). Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.

Dalam laporan skripsi ini penulis memaparkan hasil penelitian yang mencakup metode isolasi β -karoten dari rumput laut coklat *Padina australis*, dimulai dari proses ekstraksi hingga proses identifikasi isolat menggunakan kromatografi lapis tipis, spektrofotometri dan LC-MS. Penulis berharap laporan penelitian ini dapat memberikan informasi kepada masyarakat, khususnya kepada insan akademisi dan peneliti sebagai pembanding dari penelitian terdahulu serta acuan untuk penelitian terkait di masa mendatang.

Penulis menyadari bahwa informasi dan pengetahuan yang disajikan dalam laporan penelitian ini masih sangat terbatas. Oleh karena itu kritik dan saran yang membangun dari semua pihak akan diterima dengan senang hati. Semoga laporan ini bermanfaat bagi pembaca.

Malang, 23 September 2014

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
LEMBAR UCAPAN TERIMAKASIH	v
RINGKASAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Kegunaan Penelitian	3
1.5 Waktu dan Tempat	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Rumput Laut	4
2.1.1 Rumput Laut Coklat	5
2.2 <i>Padina australis</i>	6
2.3 Pigmen	8
2.3.1 Pigmen β -Karoten	9
2.4 Pelarut Organik	12
2.4.1 Metanol (CH ₃ OH)	13
2.4.2 Aseton (CH ₃ COCH ₃)	14
2.4.3 Dietil Eter (C ₄ H ₁₀ O)	15
2.4.4 N-Heksan/Heksana (C ₆ H ₁₄)	16
2.4.5 Etil Asetat (C ₄ H ₈ O ₂)	17
2.5 <i>Silica Gel</i> (SiO ₂)	18
2.6 Ekstraksi	19



2.7 Fraksinasi	20
2.8 Evaporasi	21
2.9 Kromatografi	22
2.9.1 Kromatografi Kolom	22
2.9.2 Kromatografi Lapis Tipis	24
2.10 Spektrofotometri UV-Vis	26
2.11 <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i> (LC-MS)	27
3. METODE PENELITIAN	30
3.1. Bahan Penelitian	30
3.2 Alat Penelitian	30
3.3 Metode Penelitian	30
3.4 Prosedur Penelitian	31
3.4.1 Persiapan Sampel	31
3.4.2 Ekstraksi	32
3.4.3 Fraksinasi dan Evaporasi	33
3.4.4 Isolasi Pigmen	37
3.5 Identifikasi β -Karoten	41
3.5.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	41
3.5.2 Spektrofotometri UV-Vis	42
3.5.3 <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i> (LC-MS)	44
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	46
4.1 Data Hasil Penelitian.....	46
4.2 Pembahasan	46
4.2.1 Isolasi β -karoten dengan Kromatografi Kolom.....	46
4.2.2 Identifikasi β -karoten dengan Kromatografi Lapis Tipis	49
4.2.3 Identifikasi β -karoten dengan Spektrofotometer UV-Vis.....	51
4.2.4 Pengukuran Berat Molekul β -karoten dengan LC-MS	53
5. KESIMPULAN DAN SARAN	56
5.1 Kesimpulan	56
5.2 Saran.....	56
DAFTAR PUSTAKA	57



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi kimia rumput laut coklat	6
2. Komposisi Proksimat <i>Padina australis</i>	8
3. Sifat-sifat β -karoten	10
4. Daftar aktifitas provitamin A relatif pada beberapa karotenoid	11
5. Konstanta dielektrik dan tingkat kelarutan dalam air beberapa jenis pelarut	13
6. Sifat-sifat metanol	14
7. Sifat-sifat aseton	15
8. Sifat-sifat dietil eter	16
9. Sifat-sifat heksana	17
10. Sifat-sifat etil asetat	18
11. Sifat-sifat <i>silica gel</i>	19
12. Bentuk umum penambahan ion dalam LC-MS	29
13. Hasil Isolasi dan Identifikasi β -karoten Rumput Laut Coklat <i>Padina australis</i>	46

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Padina australis</i>	7
2. Struktur molekul β -karoten bentuk <i>trans</i> dan <i>cis</i>	11
3. Skema penyusunan kolom kromatografi	24
4. Skema proses kromatografi lapis tipis (KLT)	25
5. Skema prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis	27
6. Skema prinsip kerja instrumen LC-MS	25
7. Prosedur ekstraksi dan fraksinasi alga coklat <i>Padina australis</i>	36
8. Prosedur isolasi pigmen dengan kromatografi kolom	40
9. Prosedur identifikasi β -karoten dengan kromatografi lapis tipis	42
10. Prosedur analisa panjang gelombang dan absorbansi β -karoten dengan spektrofotometer UV-Vis	43
11. Prosedur analisa berat molekul dengan LC-MS	45
12. Proses Isolasi pigmen rumput laut coklat <i>Padina australis</i> dengan kromatografi kolom	48
13. Hasil isolasi β -karoten dari rumput laut coklat <i>Padina australis</i>	49
14. Hasil identifikasi β -karoten rumput laut coklat <i>Padina australis</i> dengan KLT	50
15. Hasil pengujian pola spektra dan serapan maksimum β -karoten dengan spektrofotometer UV-Vis	52
16. Hasil analisa berat molekul β -karoten dengan LC-MS	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Prosedur Penelitian Isolasi dan Identifikasi β -Karoten Rumput Laut Coklat <i>Padina australis</i> dengan LC-MS	64
2. Prosedur Ekstraksi dan Fraksinasi	65
3. Prosedur Isolasi dengan Kromatografi Kolom	66
4. Prosedur Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	67
5. Prosedur Identifikasi dengan Spektrofotometri UV-Vis	67
6. Prosedur Identifikasi dengan LC-MS	68
7. Prosedur Pembuatan Larutan	68
8. Dokumentasi Proses Penelitian	70
9. Tabel hasil isolasi pigmen dengan kromatografi kolom	74
10. Tabel hasil perhitungan KLT β -karoten	76
11. Hasil Uji β -karoten dengan Spektrofotometri UV-Vis	77
12. Hasil Uji β -karoten dengan LC-MS	80
13. Spesifikasi Analisis LC-MS	83

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rumput laut merupakan makro alga yang digolongkan ke dalam organisme fotosintetik tingkat rendah karena tidak memiliki akar, batang dan daun (Nurdiana *et al.*, 2008). Berdasarkan warna *thallus* yang dipengaruhi oleh variasi jenis dan kandungan pigmen utamanya, rumput laut dikelompokkan ke dalam 3 kelas yaitu *Chlorophyceae* (rumput laut hijau), *Rhodophyceae* (rumput laut merah), dan *Phaeophyceae* (rumput laut coklat) (Limantara dan Heriyanto, 2010).

Rumput laut coklat merupakan golongan makroalga dari kelas *phaeophyta* yang tersebar dalam jumlah melimpah di antara koral dan karang pada perairan dekat pantai (*inshore*) (Diaz-Pulido dan McCook, 2008). Di perairan Indonesia terdapat 28 spesies rumput laut coklat yang berasal dari 6 genus yaitu *Sargassum*, *Turbinaria*, *Padina*, *Dictyota*, *Hormophysa*, dan *Hydroclathrus* (Chaidir, 2006).

Padina australis merupakan salah satu spesies yang tersebar luas dan sangat mudah ditemukan di daerah tropis, terutama pada daerah sublitoral, melekat pada pasir, batu, koral, atau menempel pada makroalga lain (Geraldino *et al.*, 2005). *Padina australis* sering dianggap sebagai tanaman pengganggu dalam budidaya *Eucheuma cottonii*, namun sebenarnya mempunyai nilai ekonomis karena dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak, makanan manusia, pupuk, anti bakteri dan anti mikroba (Hariyano *et al.*, 2010).

Warna rumput laut coklat dipengaruhi oleh keberadaan pigmen atau zat warna alami yang terkandung di dalamnya. Pigmen merupakan molekul khusus yang dapat memunculkan warna dengan cara menyerap cahaya matahari dan memantulkannya pada panjang gelombang tertentu (Prangdimurti, 2007).

Pigmen yang terkandung pada rumput laut coklat terdiri dari golongan klorofil yang merupakan pigmen utama yang berperan dalam proses fotosintesis dan karotenoid yang berfungsi sebagai pigmen pelengkap (Limantara dan Heriyanto, 2010). Menurut Nurcahyanti dan Limantara (2007), keberadaan karotenoid mampu melindungi klorofil dari degradasi. Gross (1991), menyebutkan karotenoid memiliki 2 aktifitas utama, yakni sebagai penangkap cahaya dan fotoprotektor terhadap akses cahaya.

β -karoten merupakan salah satu jenis pigmen golongan karotenoid yang terdapat pada *Padina australis* (Limantara dan Heriyanto, 2010). β -karoten termasuk jenis karotenoid penting pada alga yang memiliki banyak manfaat bagi industri pangan dan kesehatan, di antaranya sebagai pewarna dan substansi suplemen makanan, sebagai antioksidan, mencegah kanker, kardivaskuler dan mencegah penyakit degeneratif (Fretes *et al.*, 2012). Di banyak negara berkembang, karotenoid, terutama β -karoten merupakan sumber vitamin A utama dan berperan sebagai penangkap radikal bebas yang bersifat toksik (Ahamad *et al.*, 2007). Menurut Merdekawati *et al.*, (2009), aktifitas antioksidan karotenoid dalam melindungi sel dari kerusakan oksidatif oleh radikal bebas, terutama berasal dari β -karoten.

Beberapa metode telah dilakukan dalam identifikasi dan determinasi kandungan β -karoten. Metode *spectrophotometry* telah digunakan dalam penentuan total karotenoid pada beberapa spesies alga (Dere *et al.*, 1998). Murthy (2005) melakukan studi mengenai produksi β -karoten dari kultur mikroalga menggunakan *thin layer chromatography* (TLC), *high performance liquid chromatography* (HPLC), *mass spectrometry* (MS), dan *liquid chromatography mass spectrometry* (LC-MS). Hingga saat ini identifikasi β -karoten rumput laut coklat *Padina australis* menggunakan LC-MS belum banyak dilakukan. Oleh karena itu data dan informasi baru sangat diperlukan sebagai

penguat dan pembanding dari penelitian terdahulu. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui berat molekul β -karoten pada rumput laut coklat *Padina australis* menggunakan instrumen LC-MS.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut:

- Berapakah berat molekul β -karoten rumput laut coklat *Padina australis* berdasarkan uji LC-MS?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui berat molekul β -karoten rumput laut coklat *Padina australis* menggunakan instrumen LC-MS.

1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan data dan informasi terbaru mengenai berat molekul β -karoten pada rumput laut coklat *Padina australis* menggunakan instrumen LC-MS sehingga dapat dijadikan sebagai pembanding dari penelitian terdahulu dan acuan untuk penelitian terkait di masa mendatang.

1.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai Juli 2014 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang, dan Lembaga Ilmu dan Pengkajian Ilmiah (LIPI) Serpong.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rumput Laut

Rumput laut tersebar luas di seluruh wilayah Indonesia dan merupakan komoditas perikanan ekonomis penting. Menurut data statistik Kementerian Kelautan dan Perikanan (2012), produksi rumput laut Indonesia pada tahun 2010 sebesar $\pm 3.569.990$ ton dengan volume ekspor mencapai ± 123.074 ton. Provinsi Jawa Timur merupakan provinsi dengan produksi rumput laut terbesar setelah Sulawesi Selatan dengan jumlah produksi mencapai ± 388.952 ton dan volume ekspor dengan jumlah paling besar mencapai ± 70.954 ton pada tahun 2010.

Rumput laut merupakan makroalga yang seluruh bagian tubuhnya disebut dengan talus (*thallus*) sehingga termasuk dalam divisi *thallophyta*. Talus pada rumput laut memiliki bentuk yang sangat beragam, di antaranya bulat seperti tabung, bulat seperti kantong, pipih, gepeng, berbentuk seperti rambut dan lain sebagainya (Suparmi dan Sahri, 2009). Menurut Limantara dan Heriyanto (2010), berdasarkan warna talus yang dipengaruhi oleh keberadaan pigmen dominan yang terkandung di dalamnya, rumput laut dapat dikelompokkan ke dalam 3 kelas yaitu *Chlorophyceae* (rumput laut hijau), *Rhodophyceae* (rumput laut merah), dan *Phaeophyceae* (rumput laut coklat).

Rumput laut memiliki kandungan polisakarida, mineral dan beberapa vitamin yang sangat melimpah. Di samping itu, rumput laut juga mengandung substansi bioaktif seperti polisakarida, protein, lemak, dan polifenol yang berfungsi sebagai antibakteri, antifungi, anti virus dan sebagainya (Senthilkumar *et al.*, 2013). Terkait dengan kandungannya, rumput laut telah dimanfaatkan dalam industri makanan, kosmetik, farmasi, tekstil dan agrokomples (Melki *et al.*, 2011). Ditinjau dari kandungan proksimatnya, secara umum rumput laut mengandung 32,25-63,2% karbohidrat, 3-11,4% serat kasar, 12,95-27,5% air,

1,70-10% protein, 3,5-11% lemak, dan 11,5-23,7% abu. Rumpaut laut juga memiliki kandungan asam amino, vitamin dan mineral yang mencapai 10-20 kali lipat lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman darat (Reskika, 2011).

2.1.1 Rumpaut Laut Coklat

Rumpaut laut coklat merupakan golongan makroalga dari kelas *phaeophyta* yang disebut juga sebagai kelas *Ochrophyta*. Rumpaut laut coklat tersebar dalam jumlah yang melimpah di antara koral dan karang pada perairan dekat pantai (*inshore*). Beberapa jenis rumpaut laut paling produktif yang dapat ditemukan di perairan dangkal adalah *Sargassum*, *Dictyota*, *Labophora variegata*, *Colpomenia*, *Chnoospora* dan *Padina*. Rumpaut laut coklat seringkali menjadi habitat dan makanan bagi berbagai jenis invertebrata dan mempunyai peran penting sebagai tempat berkembang biak bagi beberapa jenis ikan (Diaz-Pulido dan McCook, 2008).

Kandungan rumpaut laut coklat dipengaruhi oleh spesies, umur, letak geografis, cuaca dan faktor lingkungan. Beberapa unsur utama yang terkandung dalam rumpaut laut coklat antara lain polisakarida, senyawa fenolik, terpenoid, sterol, protein, peptida, asam lemak tak jenuh, vitamin, dan pigmen (Balboa *et al.*, 2012).

Alga coklat mempunyai dinding sel yang terbentuk dari selulosa, yang umumnya berdampingan dengan asam alginat. Pada beberapa spesies rumpaut laut, selulosa diproduksi dalam jumlah besar dan dipanen untuk tujuan komersial (Wehr, 2003). Dinding sel rumpaut laut coklat mengandung senyawa polisakarida seperti laminaran dan fukoidan yang tergolong dalam serat larut. Laminaran merupakan bentuk polisakarida utama yang terkandung pada alga, sedangkan fukoidan mempunyai peran untuk melindungi rumpaut laut dari desikasi. Polisakarida pada rumpaut laut, termasuk laminaran dan fukoidan dilaporkan

mempunyai aktifitas sebagai antioksidan, antibakteri, anti tumor, anti viral dan anti koagulan (Moroney *et al.*, 2013). Komposisi kimia rumput laut coklat dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi kimia rumput laut coklat

Komposisi Kimia	Jumlah (%)
Serat kasar	28,39
Karbohidrat	19,06
Air	11,71
Protein	5,53
Lemak	0,74
Abu	34,54

Sumber: Yunizal (1999).

Salah satu ciri khas yang dimiliki oleh rumput laut coklat adalah warna coklat pada seluruh bagian talusnya. Warna tersebut disebabkan oleh kandungan pigmen dominan pada rumput laut coklat, yaitu fukosantin (Nurdiana *et al.*, 2008; Limantara dan Heriyanto, 2011). Menurut Wehr (2003), selain berasal dari pigmen karotenoid, fukosantin, warna coklat pada rumput laut makroskopis pada beberapa spesies berasal dari berbagai macam tanin yang terdapat dalam rumput laut coklat (*phaeophycian tannin*). Secara umum, alga coklat mengandung pigmen utama berupa klorofil a, c_1 dan c_2 , β -karoten, violasantin, diatosantin, dan fukosantin dalam jumlah besar, yang jumlahnya sebanding dengan simpanan cadangan laminaran.

2.2 *Padina australis*

Spesies rumput laut coklat yang termasuk genus *Padina* tersebar luas dan sangat mudah ditemukan di daerah tropis. *Padina australis* memiliki tinggi umumnya tumbuh pada daerah sublitoral, melekat pada pasir atau batu dan koral, dan terkadang menempel pada makroalga lain. Spesies yang memiliki tinggi 9,6-11 cm ini tumbuh subur pada perairan tropis dan sub tropis dan tidak ditemukan pada perairan beriklim sedang (Geraldino *et al.*, 2005). Taylor (1974), menyebutkan *Padina australis* tumbuh di atas objek keras di atas pasir atau

potongan karang pada kedalaman 0,6-1,8 m. Klasifikasi *Padina australis* menurut

Zipcodezoo (2012), adalah sebagai berikut:

Domain	: Eukaryota
Kingdom	: Chromista
Subkingdom	: Chromobiota
Infrakingdom	: Heterokonta
Filum	: Ochrophyta
Subfilum	: Phaeista
Infracilum	: Chrysisia
Superkelas	: Phaeistia
Kelas	: Phaeophyceae
Ordo	: Dictyotales
Famili	: Dictyotaceae
Genus	: <i>Padina</i>
Deskriptor spesifik	: <i>australis</i> – Hauck
Nama ilmiah	: <i>Padina australis</i> Hauck



Gambar 1. *Padina australis*

Padina australis merupakan salah satu spesies rumput laut coklat yang tersebar luas di perairan pantai Indonesia. Spesies rumput laut coklat yang termasuk salah satu penghasil alginat ini biasa hidup pada substrat pasir, batu, patahan karang dan substrat campuran. *Padina australis* sering dianggap sebagai tanaman pengganggu dalam budidaya rumput laut *Eucheuma cottonii*, namun sebenarnya mempunyai nilai ekonomis karena dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak, makanan manusia, pupuk, anti bakteri dan anti mikroba (Hariyano *et al.*, 2010). Komposisi proksimat *Padina australis* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi Proksimat *Padina australis*

Komposisi	Jumlah (g/100 g)	
	Segar	Kering
Kadar air	90,56±0,16	
Protein	1,02±0,04	10,76±0,54
Lemak	0,4±0,01	4,17±0,04
Abu	2,11±0,17	22,26±1,98
Karbohidrat (<i>by difference</i>)	5,9±0,37	62,21±3,34

Sumber: Santoso *et al.*, (2013).

2.3 Pigmen

Pigmen merupakan molekul khusus yang dapat memunculkan warna dengan cara menyerap cahaya matahari dan memantulkannya pada panjang gelombang tertentu. Tiap molekul pigmen yang berbeda akan menimbulkan reaksi yang berbeda sehingga warna dan panjang gelombang yang dipantulkan juga berbeda. Pigmen alami dapat diperoleh dari tumbuhan atau hewan, baik secara langsung maupun dengan pemanasan, penyimpanan atau pemrosesan (Prangdimurti, 2007). Menurut struktur kimianya, pigmen tumbuhan dapat diklasifikasikan menjadi 5 famili yaitu tetrapireol (misalnya klorofil), karotenoid (misalnya β -karoten), flavonoid (misalnya antosianin), senyawa fenolik (misalnya teaflavin) dan n-heterosiklik (misalnya betalain) (Schoefs, 2002).

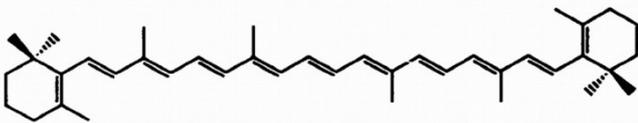
Menurut Limantara dan Heriyanto (2010), pada rumput laut coklat terkandung pigmen golongan klorofil yang merupakan pigmen utama yang berperan dalam proses fotosintesis dan karotenoid yang berfungsi sebagai pigmen pelengkap. Pigmen karotenoid yang terkandung pada *Padina australis* antara lain fukosantin, β -karoten, fukosantol, violasantin. Adapun kandungan pigmen golongan klorofil dalam *Padina australis* meliputi klorofil a, klorofilid a, klorofil a' dan feofitin a.

2.3.1 Pigmen β -Karoten

Struktur dasar dari sebuah molekul karotenoid adalah kerangka tetrapena simetris yang terbentuk dari ikatan ekor ke ekor dari dua molekul geranilgeranil difosfat (unit C_{20}) seperti likopen. Kerangka dasar likopen yang dimodifikasi sehingga memiliki dua cincin segi enam (disiklik) pada kedua ujungnya akan membentuk struktur β -karoten ($C_{40}H_{56}$) yang merupakan jenis karotenoid paling melimpah. Golongan molekul karotenoid dapat dikelompokkan ke dalam dua kelompok senyawa, yaitu karoten yang tidak memiliki fungsi oksigen, dan santofil (*xanthophylls*) yang mengandung setidaknya satu fungsi oksigen seperti lutein. Struktur kimianya secara jelas menandakan bahwa karotenoid merupakan senyawa lipofilik, oleh karena itu karotenoid tidak larut dalam air, kecuali jika golongan yang memiliki sifat sangat polar seperti polisakarida mengesterifikasi rangka dasarnya (Schoefs, 2002).

Beta-karoten ($C_{40}H_{56}$) merupakan sebuah molekul yang termasuk pigmen golongan karotenoid yang memiliki cincin hidrokarbon pada ujungnya. Molekul β -karoten terdiri dari delapan unit isoprenoid yang terhubung seperti sebuah rangkaian di mana gabungan unit-unit isoprenoid pada bagian tengahnya berbalik pada pusat molekul (Murthy, 2005). β -karoten merupakan pigmen berwarna oranye yang pertama kali diisolasi dari wortel, di mana molekulnya dibagi menjadi dua bagian yang identik dalam menghasilkan vitamin A selama proses pencernaan pada vertebrata (Daintith, 2004). Sifat-sifat β -karoten dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Sifat-sifat β-karoten

Karakteristik		Keterangan			
Nama (Trivial)		β-karoten			
(IUPAC)		β,β-karoten			
Rumus molekul		C ₄₀ H ₅₆			
Berat molekul		536,88			
Struktur molekul					
Warna	Kuning-oranye				
Absorptifitas molar ε (1 mol ⁻¹ cm ⁻¹)	134 × 10 ³ (pada 454 nm dalam aseton) 141 × 10 ³ (pada 453 nm dalam etanol) 139 × 10 ³ (pada 453 nm dalam heksana)				
Bentuk perubahan	Isomer <i>cis</i>				
Kultur sumber data SCOR	<i>Pavlova lutheri</i> (<i>sprymnesiophyte</i>)				
Spektra UV-Vis:					
Pelarut	Maksimum (nm)			Rasio kurva %III:II	Referensi
	I	II	III		
Aseton	(426)	453,5	479,9	21	Data SCOR WG 78
Etanol	(427)	449	475		Data SCOR WG 78
Heksana	(422)	449,9	477,7	36	Katayama <i>et al.</i> (1972)

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

Pigmen β-karoten juga mempunyai karakteristik berupa bentuk *trans* dan *cis* sebagaimana jenis karotenoid yang lain. Secara teoritis, masing-masing ikatan rangkap dalam struktur β-karoten dapat membentuk 2 macam konfigurasi. Kurva absorpsi spektra dari karotenoid yang mengalami isomerisasi dari bentuk *trans* ke *cis* menunjukkan bahwa puncak *trans* isomer terletak pada posisi terendah dibandingkan dengan *neo* beta karoten B (13 *mono cis* β-karoten) dan *neo* beta karoten U (9 *mono cis* β-karoten), dan ketika dikenai cahaya dengan panjang gelombang yang makin besar, terjadi perubahan ke posisi puncak teratas.

Sifat dari β-karoten adalah tidak larut dalam air dan pelarut organik polar seperti metanol dan etanol, serta termasuk jenis karotenoid yang mempunyai aktifitas biologis sebagai provitamin A. Di antara beberapa jenis karotenoid, *trans* β-karoten memiliki aktifitas provitamin A yang paling tinggi. Perubahan struktur

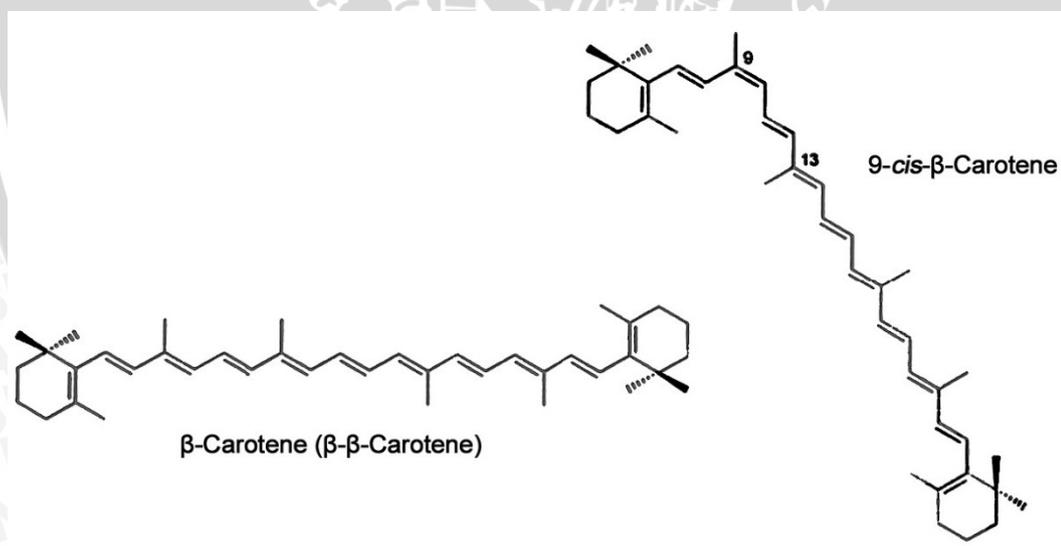
trans β-karoten menjadi isomer lain dapat menyebabkan kerusakan β-karoten dan menurunkan aktifitas provitaminnya (Novianto, 2010). Daftar aktifitas provitamin A relatif pada beberapa karotenoid dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Daftar aktifitas provitamin A relatif pada beberapa karotenoid

Karotenoid	Aktifitas Provitamin A Relatif (%)
Alfa karoten	50-54
Beta karoten	100
Gamma karoten	42-50
Lutein	0
Beta karoten-5-6-mono-epoksi	21
Beta zeakaroten	20-40
3,4 dehidro beta karoten	75

Sumber: Novianto (2010).

Tabel di atas menunjukkan bahwa *trans* β-karoten memiliki aktifitas provitamin A relatif yang paling tinggi dari beberapa jenis karotenoid, yakni mencapai 100%. Struktur molekul beta karoten bentuk *trans* dan *cis* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur molekul β-karoten bentuk *trans* dan *cis* (Erawati, 2006).

Karotenoid, terutama β-karoten merupakan sumber vitamin A utama di banyak negara berkembang, dan berperan sebagai penangkap radikal bebas yang bersifat toksik (Ahamad *et al.*, 2007). β-karoten juga memiliki banyak manfaat bagi industri pangan dan kesehatan, di antaranya sebagai pewarna dan

substansi suplemen makanan, sebagai antioksidan, mencegah kanker, kardiovaskuler dan mencegah penyakit degeneratif (Fretes *et al.*, 2012).

2.4 Pelarut Organik

Pelarut merupakan salah satu faktor yang sangat menentukan dalam proses ekstraksi. Pemilihan pelarut didasarkan pada kemampuan dan kelarutannya dalam mengekstrak senyawa yang diinginkan (Guenther, 1987). Pelarut yang baik untuk digunakan dalam proses ekstraksi adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi terhadap senyawa yang diekstraksi. Daya melarutkan tersebut berhubungan dengan polaritas pelarut dan polaritas senyawa yang diekstraksi (Vogel, 1987). Beberapa sifat pelarut yang ideal antara lain memiliki selektifitas yang tinggi terhadap senyawa yang diekstraksi, memiliki perbedaan titik didih dan densitas yang cukup besar, bersifat inert, tidak beracun, memiliki viskositas yang kecil, tidak bersifat korosif, tidak mudah terbakar, tidak bersifat reaktif terhadap senyawa yang diekstraksi, murah dan mudah didapat (Yasita dan Rachamawati, 2013).

Bahan-bahan dan senyawa kimia akan mudah larut dalam bahan pelarut yang memiliki polaritas yang sama. Secara fisika, tingkat polaritas suatu pelarut ditunjukkan dengan nilai konstanta dielektrik. Suatu pelarut disebut semakin polar apabila semakin besar nilai konstanta dielektriknya (Sudarmadji *et al.*, 2007). Pelarut yang bersifat polar cenderung melarutkan senyawa yang bersifat polar, dan sebaliknya pelarut non polar cenderung melarutkan senyawa non polar (Vogel, 1987). Konstanta dielektrik dan tingkat kelarutannya dalam air beberapa jenis pelarut yang umum digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Konstanta dielektrik dan tingkat kelarutan dalam air beberapa jenis pelarut

Pelarut	Konstanta Dielektrik	Tingkat kelarutan dalam air
Metanol	33,60	Misibel
Aseton	20,70	Misibel
Air	80,40	Misibel
Dietil eter	3,34	Sedikit
Etil asetat	6,02	Sedikit
N-heksan	1,89	Tidak larut
Petroleum eter	1,90	Tidak larut

Sumber: Sudarmadji *et al.*, (2007).

Jumlah pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi akan mempengaruhi konsentrasi jenuh larutan. Semakin banyak pelarut yang digunakan, maka semakin banyak zat terlarut yang dapat terekstrak (Komara, 1991). Dalam jumlah tertentu, pelarut dapat bekerja secara optimal dalam proses ekstraksi, namun dalam jumlah yang berlebihan pelarut tidak akan mengekstrak lebih banyak senyawa (Susanto, 2009).

2.4.1 Metanol (CH₃OH)

Metanol atau metil alkohol (CH₃OH) merupakan asam lemah turunan yang paling sederhana dari alkohol, berbentuk cairan yang tidak berwarna, mudah menguap dan mudah terbakar dan dapat diubah menjadi formaldehid (Vogel, 1987). Dahulu metanol dibuat dari penyulingan kayu sehingga disebut juga sebagai alkohol kayu. Saat ini, senyawa ini dibuat melalui oksidasi katalitik metana dari gas alam. Metanol sering digunakan sebagai pelarut dan dalam pembuatan formaldehid untuk industri plastik dan obat-obatan (Daintith, 2004).

Sifat-sifat metanol dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Sifat-sifat metanol

Karakteristik	Keterangan
Nama	Metanol (<i>Methanol</i>)
Sinonim	Metil alkohol (<i>Methyl alcohol</i>)
Rumus molekul	CH ₄ O; CH ₃ OH
Struktur molekul	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$
Bentuk fisik	Cair
Berat molekul	32,042
Titik didih	64,6 °C
Titik lebur	-97,53 °C
Densitas	0,7914 ²⁰ g/cm ³
Konstanta dielektrik	33,0
Kelarutan	Misibel dalam air, etanol, dietil eter, dan aseton; sangat larut dalam benzena; dan larut dalam kloroform

Sumber: Lide (2005).

2.4.2 Aseton (CH₃COCH₃)

Aseton (CH₃COCH₃) merupakan pelarut organik yang sering digunakan sebagai kutub pelarut aprotik dalam berbagai reaksi organik. Aseton sering dipilih sebagai pelarut dalam proses ekstraksi karena kemampuannya dalam mengekstraksi senyawa-senyawa polar dan non polar (Day dan Underwood, 1986). Aseton yang mempunyai nama lain dimetil asetat, metil asetil, dimetil keton, propanon, ketopropanon, piroasetis spirit, dan piroasetat eter mempunyai sifat higroskopis, sangat mudah menguap, tidak beresidu dan mudah terbakar. Kegunaan lain dari aseton adalah sebagai pelarut senyawa asetilen, bahan campuran resin, campuran adesif, parfum, pembersih dan lain sebagainya (Schelfan *et al*, 1983). Sifat-sifat aseton dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Sifat-sifat aseton

Karakteristik	Keterangan
Nama	Aseton (<i>Acetone</i>)
Sinonim	2-Propanon (<i>2-Propanone</i>)
Rumus molekul	C_3H_6O
Struktur molekul	
Bentuk fisik	Cair
Berat molekul	58,079
Titik didih	56,05 °C
Titik lebur	-94,7 °C
Densitas	0,7845 ²⁵ g/cm ³
Konstanta dielektrik	21,01
Kelarutan	Misibel dalam air, etanol, dietil eter, aseton, benzena, dan kloroform

Sumber: Lide (2005).

2.4.3 Dietil Eter ($C_4H_{10}O$)

Dietil eter ($C_4H_{10}O$) merupakan bahan kimia organik berbentuk cairan tidak berwarna, sedikit larut dalam air, dan biasa digunakan sebagai reagen dan pelarut. Nama lain dari dietil eter yaitu etil eter, etil oksida, atau etilik eter (Hill, 2003). Menurut Daintith (2004), dietil eter merupakan cairan volatil (mudah menguap) dan sangat mudah terbakar yang dikenal dengan bau khas dan sifat anestesik-nya. Terkadang dietil eter masih diaplikasikan sebagai bahan anestesik (obat bius) apabila tidak ada bahan-bahan modern yang sesuai. Pembuatan dietil eter merupakan hasil pengembangan dari sintesis di laboratorium. Dalam proses pembuatannya, etanol uap dilewatkan ke dalam campuran etanol jenuh dan asam sulfat pekat pada suhu 140 °C. Sifat-sifat dietil eter dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Sifat-sifat dietil eter

Karakteristik	Keterangan
Nama	Dietil eter (<i>Diethyl ether</i>)
Sinonim	Etil eter (<i>Ethyl ether</i>)
Rumus molekul	$C_4H_{10}O$
Struktur molekul	
Bentuk fisik	Cair
Berat molekul	74,121
Titik didih	34,5 °C
Titik lebur	-116,2 °C
Densitas	0,7138 ²⁰ g/cm ³
Konstanta dielektrik	4,2666
Kelarutan	Larut dalam air; misibel dalam etanol, benzena, dan dietil eter; sangat larut dalam aseton

Sumber: Lide (2005).

2.4.4 N-Heksan/Heksana (C₆H₁₄)

Heksana (C₆H₁₄) merupakan senyawa hidrokarbon alkana yang memiliki rumus isomer utama CH₃(CH₂)₄CH₃. Awalan *heks-* menunjukkan jumlah atom karbon yang terdapat di dalamnya dan akhiran *-ana* menunjukkan ikatan tunggal yang menghubungkan atom-atom karbon tersebut. Heksana merupakan salah satu jenis pelarut non polar (Maulida dan Zulkarnaen, 2010). Heksana merupakan alkana cair yang diperoleh dari fraksi ringan dari minyak mentah. Penggunaan utama dari heksana adalah sebagai campuran bensin dan sebagai pelarut (Daintith, 2004). Menurut Arindah (2010), heksana merupakan hidrokarbon alifatik yang mudah menguap. Ikatan kovalen pada n-heksana menjadikan n-heksana tidak reaktif sehingga sering digunakan sebagai pelarut inert pada reaksi organik. Sifat-sifat n-heksana dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Sifat-sifat heksana

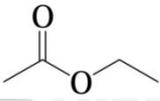
Karakteristik	Keterangan
Nama	Heksana (<i>Hexane</i>)
Rumus molekul	C_6H_{14}
Struktur molekul	
Bentuk fisik	Cair
Berat molekul	86,175
Titik didih	68,73 °C
Titik lebur	-95,35 °C
Densitas	0,6606 ²⁵ g/cm ³
Konstanta dielektrik	1,8865
Kelarutan	Tidak larut dalam air; sangat larut dalam etanol; larut dalam dietil eter, kloroform

Sumber: Lide (2005).

2.4.5 Etil Asetat ($C_4H_8O_2$)

Etil asetat ($C_4H_8O_2$) adalah pelarut organik yang bersifat semi polar, tidak berwarna dan memiliki bau tajam yang kurang enak. Beberapa keuntungan menggunakan etil asetat sebagai pelarut di antaranya yaitu sifatnya yang volatil, non toksik dan tidak higroskopis (Reapina, 2007). Etil asetat juga dikenal sebagai ester asetat, eter asetat dan asetidin dengan rumus isomer utama $CH_3COOC_2H_5$ yang memiliki sifat dapat sedikit larut dalam air dan mendidih pada suhu 77°C (Hill, 2003). Etil asetat merupakan ester yang terbentuk dari etanol dan asam etanoat, berbentuk cairan berbau yang digunakan sebagai pelarut dalam industri plastik, parfum dan pemberi cita rasa (Daintith, 2004). Sifat-sifat etil asetat dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Sifat-sifat etil asetat

Karakteristik	Keterangan
Nama	Etil asetat (<i>Ethyl acetate</i>)
Rumus molekul	$C_4H_8O_2$
Struktur molekul	
Bentuk fisik	Cair
Berat molekul	88,106
Titik didih	77,11 °C
Titik lebur	-83,8 °C
Densitas	0,9003 ²⁰ g/cm ³
Konstanta dielektrik	6,0814
Kelarutan	Larut dalam air, misibel dalam etanol, dan dietil eter; sangat larut dalam aseton dan benzena

Sumber: Lide (2005).

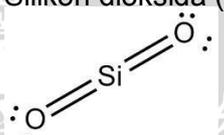
2.5 Silica Gel (SiO₂)

Silikon dioksida (SiO₂) merupakan zat kimia anorganik berbentuk kristal transparan yang tidak berwarna, mudah larut dalam alkali cair dan asam hidrofiorat, dan melebur pada suhu 1710 °C. *Silica gel* umum digunakan dalam industri pembuatan gelas, produk keramik, amplas, dan cetakan dalam pengecoran logam dan beton (Hill, 2003).

Silica gel tidak berbentuk atau memiliki bentuk yang tidak beraturan, sangat porous, merupakan bentuk silika yang terhidrasi sebagian. SiO₂ merupakan sebuah substansi yang terbuat dari dua elemen yang paling banyak terdapat di bumi, yaitu silikon dan oksigen. Sekitar 55% dari luas permukaan bumi terdiri dari silika (silikon dioksida) atau silikat (silika yang terkombinasi dengan metal oksida). Secara alami, sebagian besar silika tidak terhidrasi secara signifikan dan dapat berbentuk kristal atau tidak berbentuk, merupakan material sederhana yang dapat dikarakterisasi secara fisik dan kimia, serta memiliki beberapa sifat khusus yang menjadikannya ideal sebagai material dasar. *Silica gel* dapat dibuat dengan mudah, dengan biaya minimal, dan sifat yang seragam. Kerangka dasar *silica gel* mempunyai sifat *rigid* (kaku/keras), yang dapat sedikit

terlihat apabila mengembang atau menyusut pada pelarut dalam jumlah yang banyak. *Silica gel* dapat dibersihkan dengan mudah sebelum digunakan dalam pekerjaan yang memiliki sensitifitas tinggi. Pertukaran ion pada kerangka dasar silika akan kembali secara cepat dari perubahan pada berbagai pH dan pelarut. Gugus hidroksil pada silika memungkinkan penambahan beragam gugus fungsional untuk meningkatkan selektifitasnya. Karakteristik yang beragam mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap seberapa baik pengikatan fase berperan sebagai perangkat ekstraksi (Telepchak, 2004). Sifat-sifat *silica gel* dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Sifat-sifat *silica gel*

Karakteristik	Keterangan
Nama	Silikon dioksida (<i>Silicon dioxide</i>)
Rumus molekul	
Struktur molekul	
Bentuk fisik	Tidak berwarna, heksagonal, kristal
Berat molekul	60,085
Titik didih	2950 °C
Titik lebur	1722 °C
Densitas	2,648 g/cm ³
Kelarutan	Tidak larut dalam air dan asam; larut dalam hidrogen florida

Sumber: Lide (2005).

2.6 Ekstraksi

Ekstraksi adalah metode pemisahan komponen cair dari campurannya menggunakan sejumlah massa solven (pelarut) sebagai tenaga pemisah. Proses ekstraksi meliputi tiga langkah utama yaitu proses pencampuran, proses pembentukan fase setimbang dan proses pemisahan fase setimbang. Beberapa faktor yang berpengaruh terhadap proses ekstraksi antara lain ukuran partikel, perbandingan pelarut, suhu, waktu kontak, dan pengadukan (Yasita dan Rachmawati, 2013). Tujuan dari proses ekstraksi adalah untuk menarik komponen kimia atau zat-zat aktif yang terdapat dalam bahan (Harborne, 1987).

Prinsip ekstraksi adalah pemisahan satu atau beberapa zat dari suatu padatan atau cairan. Pada proses ekstraksi akan terjadi kontak antara pelarut dengan bahan sehingga akan terjadi pengendapan massa secara difusi sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di dalam dan di luar bahan ekstraksi (Bernasconi, 1995). Ada dua fase penting dalam proses ekstraksi yaitu fase pencucian dan fase ekstraksi. Pada fase pencucian terjadi penyatuan atau kontak langsung antara pelarut dengan bahan yang diekstraksi melalui rusaknya sel-sel zat yang diekstrak atau yang telah lebih dahulu terusak karena proses penghalusan. Dengan demikian diharapkan komponen yang terdapat di dalam sel lebih mudah diambil atau dicuci. Fase ekstraksi yaitu proses yang memungkinkan terjadinya perlintasan bahan pelarut ke dalam bagian dalam sel sehingga pelarut mencapai ke dalam sel. Mengalirnya bahan pelarut ke dalam sel akan menyebabkan protoplasma membengkak dan komponen yang terkandung dalam sel akan terlarut sesuai dengan kelarutannya (Voight, 1994).

Maserasi merupakan teknik ekstraksi paling sederhana yang dilakukan dengan cara merendam sampel dalam cairan penyari atau pelarut organik pada suhu ruang. Prinsip maserasi adalah terjadinya perbedaan konsentrasi cairan di dalam dan di luar sel dalam proses perendaman sampel yang menyebabkan terjadinya pemecahan dinding dan membran sel sehingga komponen yang terkandung dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut. Proses tersebut sangat sesuai digunakan dalam isolasi senyawa bahan alam. Ekstraksi senyawa dengan teknik maserasi akan berjalan sempurna karena lama waktu maserasi dapat diatur (Lenny dan Zuhra, 2006).

2.7 Fraksinasi

Fraksinasi merupakan proses pemisahan fraksi yang mempunyai karakteristik yang berbeda dalam suatu larutan atau suspensi (Yuliasih *et al.*,

2013). Istilah fraksinasi seringkali digunakan untuk menggambarkan pemisahan suatu senyawa di antara dua medium yang tidak saling melarutkan (Sudarmadji, 1997). Fraksinasi atau partisi disebut juga penyarian cair-cair. Prinsip pemisahan dalam proses fraksinasi yaitu distribusi komponen larutan yang difraksinasi berdasarkan perbedaan koefisien partisi dalam dua jenis pelarut yang tidak bercampur sehingga zat akan terbagi dalam dua fase yang terbentuk. Umumnya proses fraksinasi dilakukan menggunakan corong pisah (Sholihah, 2010).

2.8 Evaporasi

Evaporasi (penguapan) atau pemekatan merupakan proses yang melibatkan perpindahan panas dan massa secara simultan. Prinsip dari proses evaporasi adalah penguapan sebagian pelarut dalam suatu produk sehingga diperoleh suatu produk yang kental (konsentrat). Kecepatan penguapan dipengaruhi oleh efektifitas pindah panas dan pindah massa. Penguapan terjadi apabila suhu suatu bahan sama atau lebih tinggi dari titik didih cairan. Pada produk yang sensitif terhadap suhu tinggi, titik didih cairan atau pelarut harus diturunkan sehingga lebih rendah dari titik didih pada kondisi normal. Menurunkan titik didih pelarut atau cairan dilakukan dengan cara menurunkan tekanan di atas permukaan cairan menjadi lebih rendah dari tekanan atmosfer atau disebut vakum (Joharman, 2006).

Pemekatan dengan *rotary vacuum evaporator* merupakan teknik pemekatan ekstrak tanpa merusak senyawa yang diisolasi dari ekstrak karena rangkaian alat ini menggunakan pompa vakum sehingga di dalam evaporator terjadi pengurangan tekanan yang menyebabkan pelarut dapat menguap di bawah titik didihnya. Teknik pemekatan sesuai untuk ekstrak yang mempunyai sensitifitas terhadap suhu tinggi (Siadi, 2012).

2.9 Kromatografi

Kromatografi berasal dari bahasa Yunani *kromatos* yang berarti warna dan *graphos* yang berarti menulis. Kromatografi mencakup berbagai proses yang didasarkan pada perbedaan distribusi dari penyusun cuplikan antara dua fase. Fase yang tinggal pada sistem disebut sebagai fase diam, sedangkan fase yang mengalir melalui celah-celah fase diam disebut dengan fase gerak. Aliran fase gerak menyebabkan perbedaan migrasi dari penyusun cuplikan sehingga dapat digunakan dalam pemisahan suatu bahan alam yang kompleks seperti klorofil dan karotenoid (Maslebu *et al.*, 2013).

Kromatografi merupakan salah satu teknik yang digunakan untuk memisahkan atau menganalisa suatu campuran kompleks. Semua teknik yang berkaitan dengan kromatografi, di dalam prosesnya menggunakan dua fase, yaitu fase gerak (*mobile phase*) berupa cairan atau gas dan fase diam (*stationary phase*) berupa padatan atau cairan yang terikat dengan padatan. Sampel yang dipisahkan atau dianalisis dibawa oleh fase gerak melewati fase diam. Beragam komponen yang terdapat di dalam campuran akan terserap atau terlarut oleh fase diam dengan tingkatan yang berbeda-beda, dan secara konsekuen bergerak dengan kecepatan yang berbeda. Proses inilah yang menjadikan komponen-komponen tersebut dapat terpisah (Daintith, 2004).

2.9.1 Kromatografi Kolom

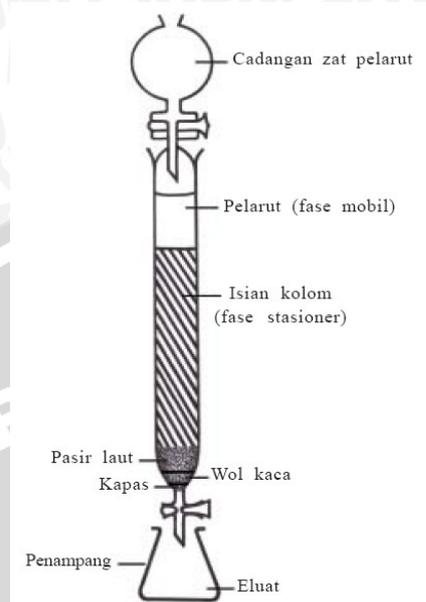
Kromatografi kolom merupakan teknik untuk memisahkan suatu komponen dari campuran komponen lainnya berdasarkan perbedaan interaksinya selama pergerakan melalui fase diam (*stationer*) oleh fase gerak (*mobile*) yang dapat berupa gas atau zat cair (Santi, 2006). Salah satu contoh penggunaan kromatografi kolom adalah pada pemisahan campuran cair. Sebuah kolom vertikal diisi dengan material absorben seperti alumina (aluminium oksida)

atau *silica gel*. Sampel dimasukkan melalui bagian atas kolom kemudian dialiri menggunakan suatu pelarut. Proses ini disebut sebagai elusi (*elution*), pelarut yang digunakan disebut dengan eluen (*eluent*) dan sampel yang dipisahkan disebut dengan eluat (*eluate*). Apabila komponen yang dipisahkan memiliki warna, akan terlihat pita-pita warna yang menandakan pemisahan sampel di dalam kolom. Komponen-komponen tersebut dipisahkan sesuai dengan keluarnya warna dari bagian bawah kolom (Daintith, 2004).

Prinsip kromatografi kolom adalah pemisahan campuran beberapa komponen berdasarkan perbedaan interaksinya dengan fase diam selama pergerakannya mengikuti fase gerak. Kecepatan suatu komponen untuk bergerak di dalam kolom, tergantung pada seberapa besar komponen terhambat atau tertahan oleh penyerap atau fase diam. Senyawa yang diserap lemah akan bergerak lebih cepat dibandingkan dengan senyawa yang diserap kuat oleh fase diam. Jika perbedaan serapan antar senyawa cukup besar, maka akan terjadi pemisahan yang sempurna (Sastrohamidjojo, 2007). Jumlah komponen penyusun campuran yang terpisah dapat terlihat sebagai cincin-cincin berwarna di sepanjang kolom kromatografi yang ditampung pada tempat yang berbeda (Hendayana, 2006).

Menurut Hayani (2007), untuk pengisian kolom, pada bagian bawah kolom dimasukkan sedikit kapas, wol kaca dan pasir laut, kemudian dimasukkan bubuk *silica gel* 70-230 *mesh* sampai mencapai tiga perempat tinggi kolom sambil di aduk agar tidak terdapat rongga udara di tengah-tengah kolom. Untuk pemisahan komponen, mula-mula dialirkan ekstrak cair ke dalam kolom kromatografi, kemudian kran dibuka sehingga ekstrak akan meresap ke dalam *silica gel* sampai batas atas *silica gel* di dalam kolom. Setelah itu dimasukkan pereaksi terus-menerus sambil kran kolom dibuka. Fraksi yang terpisah

ditampung dalam tabung reaksi sampai seluruh ekstrak terpisahkan. Skema penyusunan kolom kromatografi dapat dilihat pada Gambar 3.

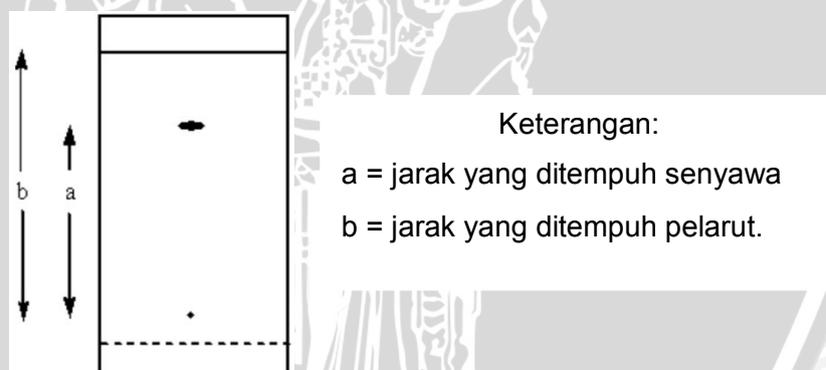


Gambar 3. Skema penyusunan kolom kromatografi (Hayani, 2007).

2.9.2 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode pemisahan senyawa secara cepat menggunakan media berupa serbuk halus yang dilapiskan secara merata pada lempeng kaca yang dapat dianggap sebagai kolom kromatografi terbuka. Prinsip pemisahan dengan kromatografi lapis tipis adalah pemisahan komponen berdasarkan penyerapan, pembagian, atau gabungan antara keduanya dengan daya kapilaritas. Ketika komponen dalam totalan sampel terlarut di dalam pelarut dan terbawa ke atas oleh resapan pelarut pada plat, terjadi interaksi yang berbeda pada setiap komponen penyusun campuran sehingga fraksi yang berbeda di dalam campuran akan terpisah. Kelebihan dari kromatografi lapis tipis adalah dapat dihasilkan pemisahan yang lebih sempurna, kepekaan yang lebih tinggi dan dibutuhkan waktu yang singkat (Mukaromah dan Maharani, 2008; Daintith, 2004).

Dalam proses KLT, sebelum digunakan, dengan hati-hati dibuat sebuah garis batas di dekat bagian dasar plat KLT, kemudian sedikit sampel campuran ditotolkan pada garis tersebut. Plat diletakkan dalam posisi berdiri di dalam pelarut yang akan merambat ke atas melewati garis batas dengan daya kapilaritas. Beberapa komponen akan melekat lebih kuat pada fase gerak dan bergerak ke atas secara lambat sehingga fraksi yang berbeda di dalam campuran akan terpisah. Ketika pelarut hampir mencapai ujung plat, secepat mungkin plat diambil dan dikeringkan (Daintith, 2004). Bercak yang terdeteksi kemudian ditandai dan dihitung nilai *retardation factor* (Rf)-nya. Nilai Rf yang menunjukkan ukuran kecepatan migrasi suatu senyawa kromatografi diperoleh dengan membandingkan jarak bercak dari titik awal penotolan dengan jarak yang ditempuh oleh fase gerak (Hidayati, 2013). Skema proses kromatografi lapis tipis dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Skema proses kromatografi lapis tipis (KLT) (Anderson dan Shine, 2009).

Menurut Striegel dan Hill (1996), nilai Rf adalah nilai yang menyatakan migrasi komponen dalam kromatogram sebagai rasio atau perbandingan jarak yang ditempuh oleh komponen dengan jarak yang ditempuh oleh fase gerak.

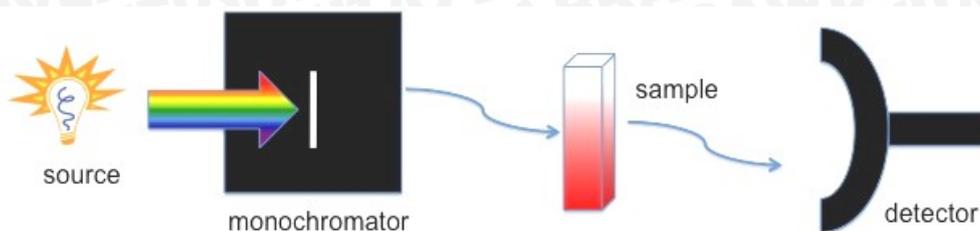
Rasio tersebut dapat dituliskan sebagai berikut:

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

2.10 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis merupakan salah satu metode pengukuran dalam suatu tahapan analisis kimia, baik secara kualitatif maupun secara kuantitatif. Analisis secara kualitatif dilakukan berdasarkan panjang gelombang yang ditunjukkan oleh puncak spektrum (190-900 nm), sedangkan analisis secara kuantitatif dilakukan berdasarkan pada penurunan intensitas cahaya yang diserap oleh suatu media. Intensitas ini sangat tergantung pada tebal tipisnya media dan konsentrasi warna spesifik yang ada pada media tersebut (Fatimah *et al.*, 2009).

Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis adalah berdasarkan penyerapan cahaya atau energi radiasi oleh suatu larutan yang diuji. Setiap kromofor (zat warna) mempunyai panjang gelombang maksimum yang berbeda. Cahaya yang bersifat polikromatis (mempunyai banyak warna) dari sumber cahaya dipancarkan menuju monokromator yang akan menguraikan sinar tersebut menjadi cahaya monokromatis (tunggal) dengan pita-pita panjang gelombang yang dapat digunakan untuk pengukuran suatu zat tertentu. Cahaya atau energi radiasi dari monokromator dipancarkan pada suatu larutan sampel dengan konsentrasi tertentu di dalam kuvet, sehingga ada cahaya yang diserap dan ada pula yang diteruskan. Cahaya yang diserap sebanding dengan konsentrasi larutan sampel, sehingga akan diketahui konsentrasi zat di dalam sampel secara kuantitatif. Jumlah cahaya yang diserap oleh larutan akan menghasilkan sinyal elektrik pada detektor dan diterjemahkan ke dalam bentuk angka-angka oleh pencatat (*reader*) (Triyati, 1985). Skema prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Skema prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis (Oliva-Chatelain and Barron, 2010).

2.11 *Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS)*

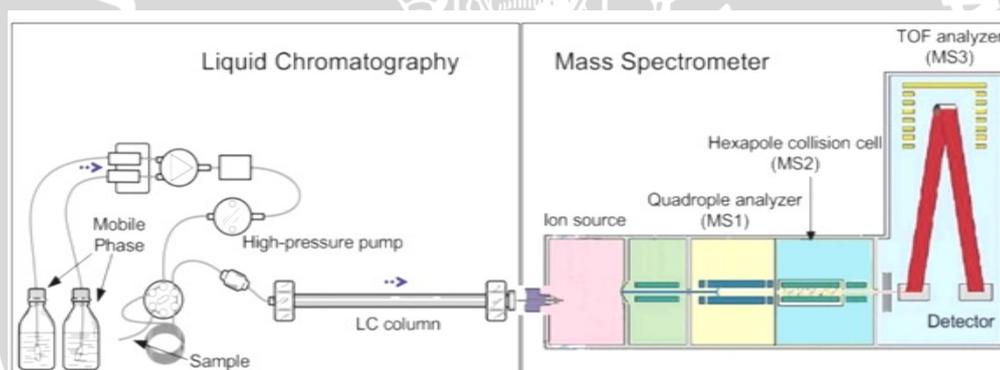
LC-MS adalah teknik analisis kimia yang mengkombinasikan kemampuan pemisahan fisik dari *liquid chromatography* (LC) dengan kemampuan analisis massa dari *mass spectrometry* (MS) dan mempunyai sensitifitas, selektifitas dan akurasi yang tinggi (Kang, 2012). Menurut Zhou, (2011), di dalam analisis, LC-MS memiliki cakupan yang baik dibandingkan dengan GC-MS (*gas chromatography-mass spectrometry*) karena dapat digunakan dalam analisis metabolit non-volatil (tidak mudah menguap) tanpa derivatisasi.

Di dalam prosesnya, setelah sampel disuntikkan ke dalam instrumen LC-MS, pertama kali sampel akan masuk ke dalam sistem pemisahan kromatografi cair (LC). Selama proses pemisahan, sampel dilarutkan dalam fase gerak yang kemudian didorong dengan tekanan tinggi sehingga mengalir melalui kolom yang telah tersusun dengan fase diam yang terdiri dari partikel-partikel kecil berupa lapisan monolitik atau membran berpori (*porous*). Senyawa yang berbeda dalam larutan sampel memiliki kekuatan interaksi yang berbeda pula dengan fase diam, sehingga mengalir keluar dari kolom dalam waktu spesifik yang disebut dengan waktu retensi (*retention time*) (Zhou, 2011).

Setelah dipisahkan dalam kolom (LC), selanjutnya sampel disuntikkan ke dalam *mass spectrometer* (MS). Di dalam *mass spectrometer* sampel diuapkan pada suhu tinggi dan kemudian diionisasi. Ion yang terbentuk dari

proses ionisasi difragmentasi sesuai dengan rasio massa/muatan (m/z) yang selanjutnya dideteksi secara elektrik oleh detektor (Maryam, 2007).

Beberapa metode ionisasi dalam pengukuran massa antara lain *electrospray ionization* (ESI), *atmospheric pressure chemical ionization* (APCI), *atmospheric pressure photoionization*, *fast atom bombardment* (FAB), dan sebagainya. Metode ionisasi paling banyak digunakan dalam identifikasi adalah *electrospray ionization* (ESI). Kelebihan metode ESI yaitu dapat mengionisasi metabolit-metabolit dalam jangkauan yang luas dengan berbagai berat molekul dan polaritas sehingga mampu menghasilkan spektrum massa yang baik dengan fragmentasi yang sesuai dengan struktur senyawa (Maryam, 2007; Zhou, 2011). Skema prinsip kerja instrumen LC-MS dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Skema prinsip kerja instrumen LC-MS (Zhou, 2011).

Menurut Zhou (2011), dalam waktu retensi yang hampir sama, satu jenis metabolit dapat memunculkan beberapa *peak* dengan nilai m/z yang jelas, di mana identifikasi metabolit dapat dilakukan dengan cara menganalisis beberapa *peak* tersebut. Umumnya, dalam data LC-MS, satu metabolit dapat menghasilkan tiga tipe ion, yaitu *adduct* (penambahan), *isotope* (isotop), dan *insource fragment* (fragmen tanpa sumber). Menurut Wahyuni *et al.*, (2009) ion molekul yang terbentuk dari proses ESI adalah ion molekul dengan tambahan ion hidrogen (proton) $[M+H]^+$, ion molekul dengan tambahan kation lain misalnya Na $[M+Na]^+$, ion molekul yang kehilangan proton $[M-H]^-$ atau ion muatan ganda $[M+nH]^{n+}$.

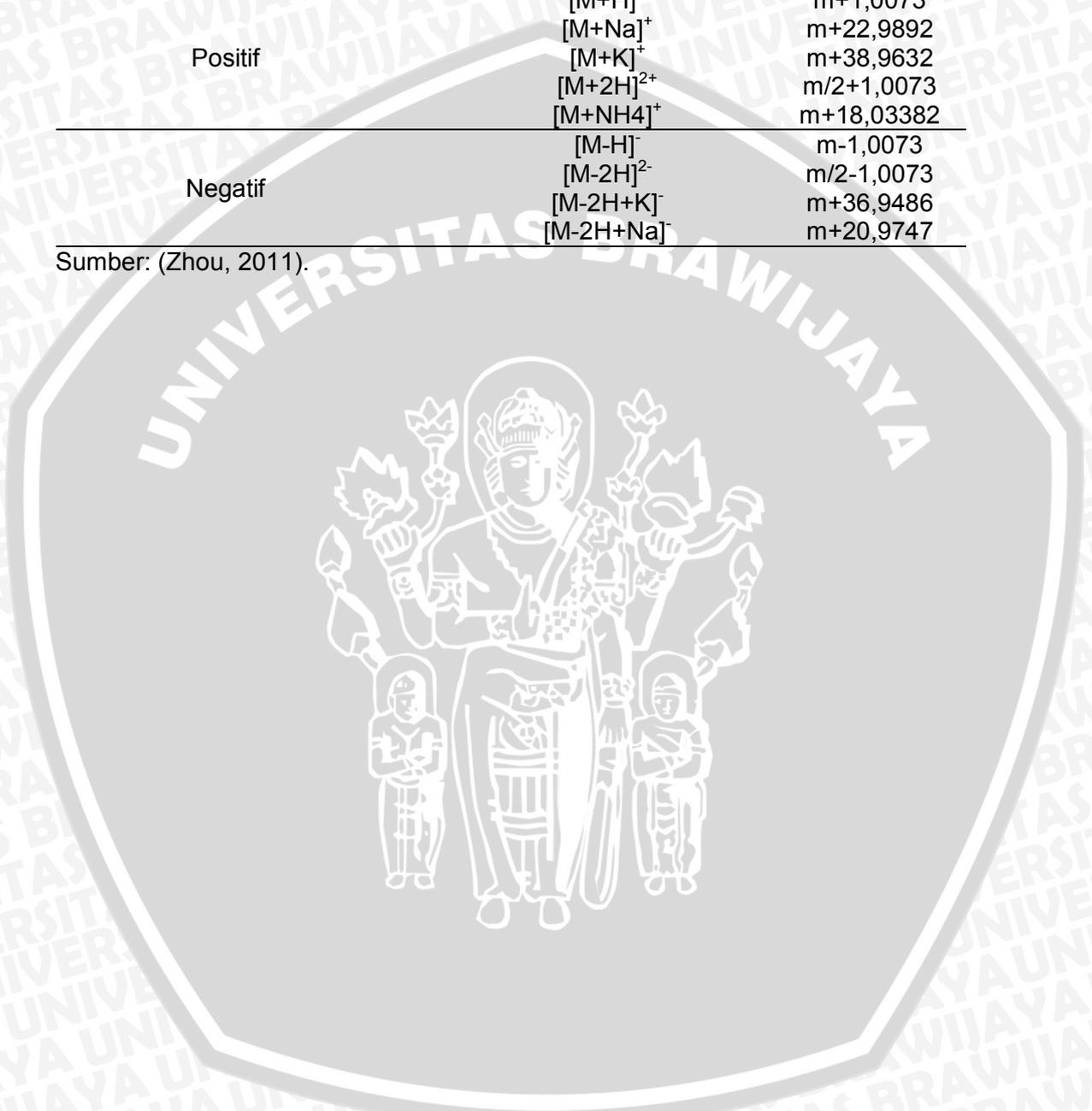
Penambahan ion dapat juga berupa penambahan potasium, dan sebagainya.

Bentuk umum dari penambahan ion dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Bentuk umum penambahan ion dalam LC-MS

Ionisasi	Formasi	Massa ion
Positif	$[M+H]^+$	$m+1,0073$
	$[M+Na]^+$	$m+22,9892$
	$[M+K]^+$	$m+38,9632$
	$[M+2H]^{2+}$	$m/2+1,0073$
	$[M+NH_4]^+$	$m+18,03382$
Negatif	$[M-H]^-$	$m-1,0073$
	$[M-2H]^{2-}$	$m/2-1,0073$
	$[M-2H+K]^-$	$m+36,9486$
	$[M-2H+Na]^-$	$m+20,9747$

Sumber: (Zhou, 2011).



3. METODE PENELITIAN

3.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan adalah rumput laut coklat *Padina australis* yang diambil dari kawasan pantai Kondang Merak, Kabupaten Malang, Jawa Timur. Adapun bahan kimia yang digunakan antara lain metanol PA (*pro analysis*), aseton PA, dietil eter PA, n-heksan PA, etil asetat PA, CaCO₂, garam (NaCl), air, *silica gel* F-254, *aluminium foil*, *plastic wrap*, kertas saring kasar dan halus, kapas, pasir laut, plat KLT (Kromatografi Lapis Tipis) *silica gel* (SiO₂) F-254, kertas label, kertas tisu dan gas nitrogen (N₂).

3.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan untuk ekstraksi dan isolasi, serta peralatan untuk analisa. Alat-alat yang digunakan untuk proses ekstraksi dan isolasi antara lain gunting, timbangan digital, *beakerglass* (ukuran 800 ml, 500 ml, 100 ml), gelas ukur 100 ml, spatula, corong kaca, labu erlenmeyer 250 ml, corong pisah, *rotary vacuum evaporator*, sendok bahan, pipet tetes, kolom kromatografi, statif, dan botol vial/botol sampel 15 ml. Adapun peralatan yang digunakan pada proses analisa antara lain penggaris, *cutter*, pensil, pipa kapiler, pinset, *beakerglass* 50 ml, pipet tetes, Spektrofotometer *UV-Vis* merk Shimadzu 1601, dan instrumen LC-MS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometer*).

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif eksploratif. Analisis dalam penelitian deskriptif hanya dilakukan sampai taraf deskripsi, yaitu menganalisis atau menyajikan data secara sistemik

sehingga lebih mudah dipahami dan disimpulkan, sedangkan penelitian eksploratif bertujuan untuk menemukan sesuatu yang baru berupa pengelompokan suatu gejala atau fakta tertentu. Penelitian deskriptif eksploratif bertujuan untuk menggambarkan suatu variabel, gejala, dan keadaan atau fenomena apa adanya tanpa menguji suatu hipotesis tertentu (Arikunto, 2002). Penelitian eksploratif juga bertujuan untuk menggambarkan suatu keadaan atau fenomena tertentu secara sistematis, faktual dan akurat melalui berbagai sifat dan faktor yang mempengaruhinya (Chusairi, 2013).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Sampel

Sampel rumput laut coklat *Padina australis* yang baru diambil dari laut segera dicuci dengan air laut, dimasukkan ke dalam plastik berwarna hitam kemudian diikat dan dimasukkan ke dalam karung plastik. Perlakuan tersebut bertujuan untuk mempertahankan kualitas rumput laut, terutama agar tidak terkena cahaya matahari secara langsung yang dapat merusak pigmen dalam rumput laut. Setelah sampai di laboratorium, tanpa dikeluarkan dari wadahnya, rumput laut disimpan di dalam *freezer* untuk mempertahankan kesegarannya.

Sebelum dilakukan proses ekstraksi, sampel rumput laut coklat *Padina australis* diambil dari dalam *freezer*, kemudian dibawa ke dalam ruang gelap dan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan garam dari air laut. Selain itu, pencucian bertujuan untuk menghilangkan pasir, batu, karang dan kotoran lainnya sekaligus memilah sampel agar tidak tercampur dengan spesies rumput laut lain. Selanjutnya sampel dikering anginkan dengan cara dihamparkan di atas kertas dan bantuan kain untuk mengurangi air pada permukaan sampel. Keberadaan air yang terlalu banyak pada permukaan sampel dapat menghambat proses ekstraksi sampel.

3.4.2 Ekstraksi

Ekstraksi sampel dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi dengan perendaman serbuk sampel dalam air atau pelarut organik sampai meresap, sehingga akan melunakkan susunan sel dan zat-zat yang terkandung di dalamnya akan terlarut (Daud *et al.*, 2011). Menurut Setyohadi *et al.*, (2013) perbedaan konsentrasi dan tekanan di dalam dan di luar sel pada saat proses maserasi berlangsung, akan memicu terjadinya aliran pelarut ke dalam sel sehingga terjadi pemecahan dinding dan membran sel serta membengkaknya protoplasma. Masuknya zat pelarut ke dalam sel menyebabkan zat-zat yang terkandung di dalam sitoplasma akan terlarut ke dalam pelarut sesuai dengan sifat kelarutannya.

Sampel rumput laut coklat *Padina australis* yang telah tiris dipotong-potong menggunakan gunting dengan ukuran $\pm 1 \text{ cm}^2$ untuk memudahkan proses penghalusan sampel. Selanjutnya, sampel ditimbang sebanyak 100 gram dan dihaluskan menggunakan mortar dan alu untuk memperluas permukaan sampel, sehingga proses ekstraksi dapat berjalan semaksimal mungkin pada seluruh partikel sampel. Pada saat proses penghalusan sampel, ditambahkan $\pm 0,5$ gram CaCO_3 sebagai agen penetral karena proses ekstraksi akan berjalan secara maksimal pada pH netral.

Pada proses maserasi, 100 gram sampel rumput laut coklat *Padina australis* yang telah halus dimasukkan ke dalam *beakerglass* 800 ml yang telah dibungkus dengan *aluminium foil* agar terhindar cahaya yang dapat menyebabkan terjadinya degradasi atau kerusakan pada pigmen yang bersifat sensitif terhadap cahaya. Pelarut dari campuran metanol (CH_3OH) dan aseton (CH_3COCH_3) ditambahkan dengan perbandingan 7 : 3 (v/v) sebanyak 300 ml kemudian ditutup rapat menggunakan *plastic wrap* untuk meminimalkan penguapan pelarut dan dilapisi dengan *aluminium foil* untuk meminimalkan

paparan cahaya pada sampel. Penggunaan metanol dalam proses maserasi sampel dikarenakan sifatnya yang universal sehingga dapat melarutkan senyawa organik yang bersifat polar maupun non polar, sedangkan penggunaan aseton bertujuan untuk mengekstraksi senyawa organik yang bersifat semi polar. Sampel didiamkan selama 24 jam di dalam ruang gelap pada suhu ruang. Menurut Bernasconi (1995), selama proses maserasi berlangsung akan terjadi kontak antara pelarut dengan sampel sehingga akan terjadi pengendapan massa secara difusi sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi larutan di dalam dan di luar sampel yang diekstraksi.

Setelah maserasi berjalan selama 24 jam, dilakukan penyaringan (filtrasi) ekstrak menggunakan kertas saring kasar dan halus untuk memisahkan filtrat hasil ekstraksi dengan residu sampel sehingga filtrat yang dihasilkan bersih tanpa tercampur dengan residu. Untuk memaksimalkan ekstraksi pigmen yang masih terkandung di dalam sampel, proses maserasi diulang sekali lagi dengan lama waktu 12 jam.

3.4.3 Fraksinasi dan Evaporasi

Fraksinasi bertujuan untuk mendapatkan fraksi pigmen yang terkandung dalam filtrat hasil maserasi. Menurut Yuliasih *et al.*, (2013) fraksinasi merupakan proses pemisahan fraksi yang mempunyai karakteristik berbeda dalam suatu larutan dengan prinsip *like dissolves like* yaitu pelarut polar akan melarutkan zat terlarut yang bersifat polar dan pelarut non polar akan melarutkan zat terlarut yang bersifat non polar. Fraksinasi dilakukan dengan penambahan dietil eter ($C_4H_{10}O$), saturasi garam, dan air secara berurutan pada filtrat hasil maserasi di dalam corong pisah. Perbandingan jumlah filtrat, dietil eter ($C_4H_{10}O$), saturasi garam, dan air dalam satu kali proses fraksinasi berturut-turut yaitu 50 ml : 25 ml : 60 ml : 5 ml. Pada saat penambahan setiap larutan ke dalam filtrat, sesekali

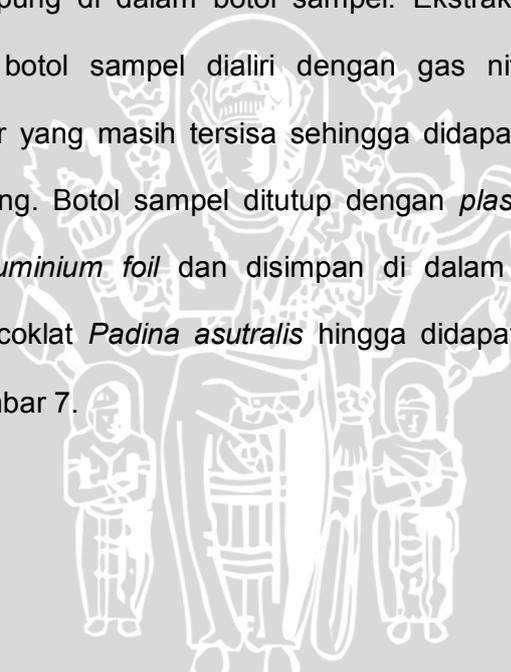
corong pisah digoyangkan untuk menghomogenkan larutan untuk memaksimalkan proses fraksinasi.

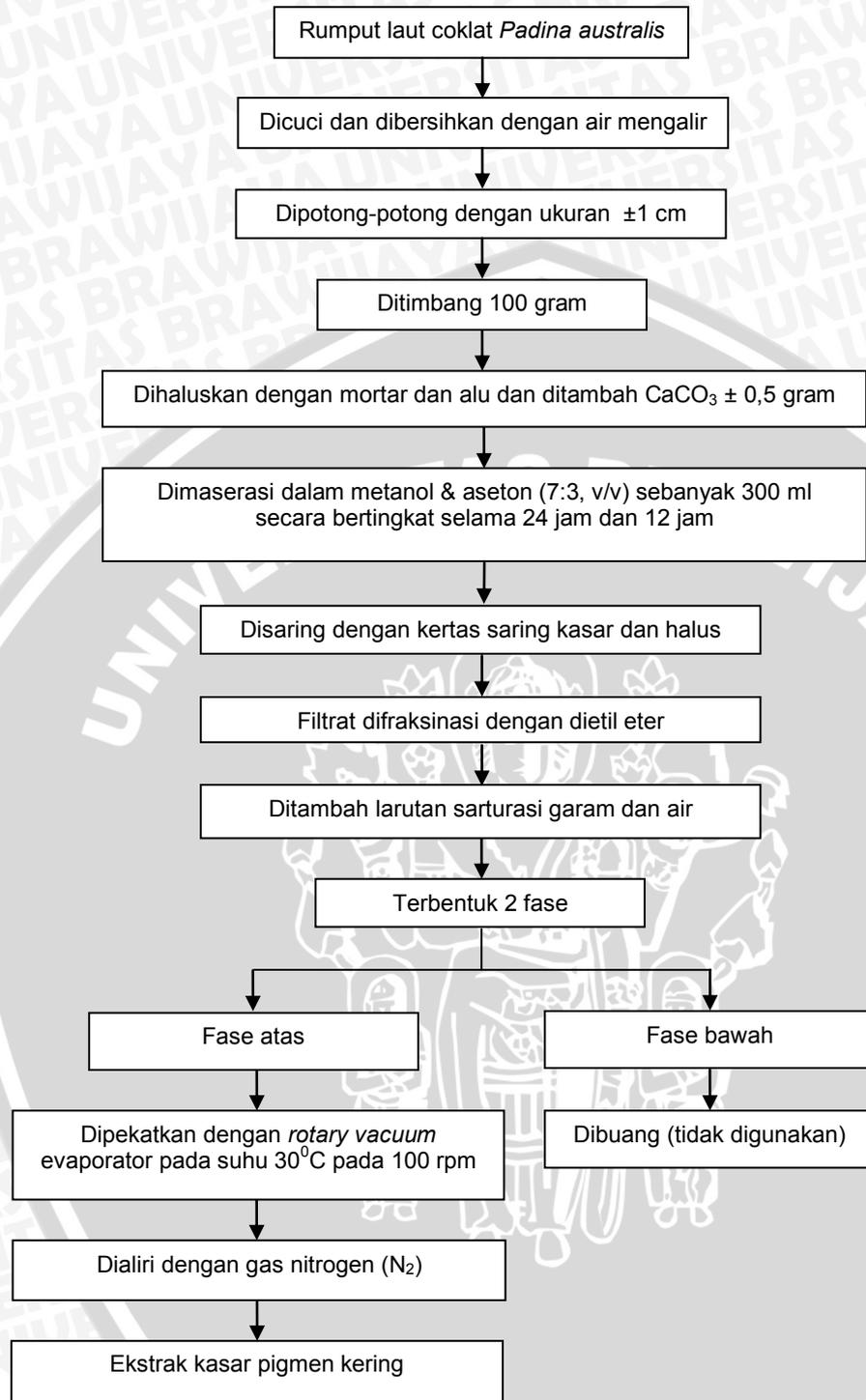
Pada proses fraksinasi, terjadi pemisahan fraksi yang berbeda di dalam larutan berdasarkan polaritas dan massa jenisnya, sehingga terbentuk dua fase, yaitu fase atas dan fase bawah. Penggunaan dietil eter ($C_4H_{10}O$) di dalam proses fraksinasi bertujuan untuk mengikat senyawa pigmen yang terkandung di dalam filtrat hasil maserasi. Dietil eter ($C_4H_{10}O$) mempunyai sifat non polar, sehingga melarutkan senyawa pigmen yang cenderung bersifat non polar. Massa jenis dietil eter yang paling ringan di dalam larutan menyebabkan senyawa pigmen yang terlarut di dalamnya terangkat ke atas membentuk fase atas. Saturasi garam dan air bersifat polar serta memiliki massa jenis yang lebih tinggi sehingga terpisah dari fase atas dan bercampur dengan pelarut dari filtrat yang sebelumnya digunakan pada proses maserasi, yaitu metanol (CH_3OH) dan aseton (CH_3COCH_3) membentuk fase bawah.

Fase bawah dari hasil proses fraksinasi tidak digunakan, sedangkan fase atas yang mengandung hampir seluruh senyawa pigmen ditampung di dalam labu erlenmeyer kemudian dievaporasi atau dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* untuk menguapkan pelarut pada fase atas. Proses pemekatan pada sampel pigmen membutuhkan perlakuan khusus terkait sifatnya yang sensitif terhadap cahaya dan suhu tinggi. Sebelum dilakukan pemekatan, labu evaporasi ditutup dengan menggunakan plastik hitam untuk meminimalkan paparan cahaya pada saat proses pemekatan berlangsung. Pemekatan dilakukan pada suhu $30\text{ }^{\circ}C$ dengan kecepatan 100 rpm selama 60 menit. Penggunaan suhu $30\text{ }^{\circ}C$ didasarkan pada titik didih dietil eter ($C_4H_{10}O$) yaitu $34,5\text{ }^{\circ}C$ (Lide, 2005), di mana dalam kondisi vakum titik didih pelarut akan menjadi lebih rendah. Menurut Kristijarti dan Arlene (2012), prinsip kerja dari evaporator

vakum yaitu dengan penurunan tekanan yang menyebabkan turunnya titik didih cairan, sehingga cairan dengan titik didih lebih rendah akan menguap terlebih dahulu yang kemudian akan terkondensasi kembali pada labu penampung.

Hasil pemekatan berupa ekstrak kasar (*crude*) diambil menggunakan sendok bahan dan dipindahkan ke dalam botol sampel. Sisa ekstrak *crude* yang masih tertinggal di dalam labu evaporator diambil dengan cara dilarutkan kembali dengan dietil eter. Labu evaporasi diisi dengan 5-10 ml dietil eter kemudian diputar-putar untuk meratakan dietil eter sehingga ekstrak *crude* di dalam labu dapat terangkat dan terlarut seluruhnya. Ekstrak *crude* cair diambil menggunakan pipet tetes dan ditampung di dalam botol sampel. Ekstrak *crude* yang telah ditampung di dalam botol sampel dialiri dengan gas nitrogen (N_2) untuk menguapkan dietil eter yang masih tersisa sehingga didapatkan ekstrak kasar yang benar-benar kering. Botol sampel ditutup dengan *plastic wrap* kemudian dibungkus dengan *aluminium foil* dan disimpan di dalam *freezer*. Prosedur ekstraksi rumput laut coklat *Padina asutralis* hingga didapatkan ekstrak *crude* dapat dilihat pada Gambar 7.





Gambar 7. Prosedur ekstraksi dan fraksinasi alga coklat *Padina australis*. (Pangestuti *et al.*, 2007) dimodifikasi oleh Mu'amar (2009).

3.4.4 Isolasi Pigmen

Isolasi pigmen rumput laut coklat *Padina australis* dilakukan menggunakan metode kromatografi kolom. Kromatografi kolom adalah proses pemisahan fraksi berdasarkan perbedaan distribusi campuran komponen antara fase gerak dan fase diam. Fase diam adalah pengisi kolom di mana fase gerak akan mengalir. Setiap senyawa memiliki koefisien yang berbeda terhadap fase gerak dan fase diam. Senyawa yang berinteraksi lemah dengan fase diam akan bergerak lebih cepat melalui fase diam, sedangkan senyawa dengan interaksi yang kuat dengan fase diam akan bergerak sangat lambat (Noviyanti, 2010). Dalam penelitian ini digunakan *normal phase*, yaitu penggunaan fase diam yang bersifat polar dan fase gerak yang bersifat non polar dengan fase diam *silica gel* (SiO_2) F-254 yang bersifat polar dan fase gerak campuran antara n-heksan (C_6H_{14}) dan etil asetat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) yang cenderung bersifat non polar.

Tahap pertama dalam isolasi pigmen menggunakan metode kromatografi kolom adalah preparasi kolom kromatografi. *Silica gel* F-254 ditimbang sebanyak 40 gram kemudian dilarutkan dalam 200 ml fase gerak dari campuran n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 8:2 (v/v) di dalam *beakerglass* kemudian ditutup dengan *plastic wrap* untuk meminimalkan penguapan fase gerak. Selanjutnya *silica gel* dan fase gerak dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam dengan kecepatan 300 rpm agar tidak terbentuk gelembung udara di dalam kolom kromatografi yang dapat menyebabkan pecahnya *silica gel* (fase diam).

Sementara itu, kolom kromatografi dipasang pada statif dan diisi dengan gulungan kapas yang telah dibasahi dengan fase gerak kemudian dipadatkan di dasar kolom kromatografi dengan bantuan lidi. Pemberian kapas bertujuan untuk menahan fase diam agar tidak keluar melalui kran kolom kromatografi. Selanjutnya kolom kromatografi diisi dengan fase gerak n-heksan dan etil asetat

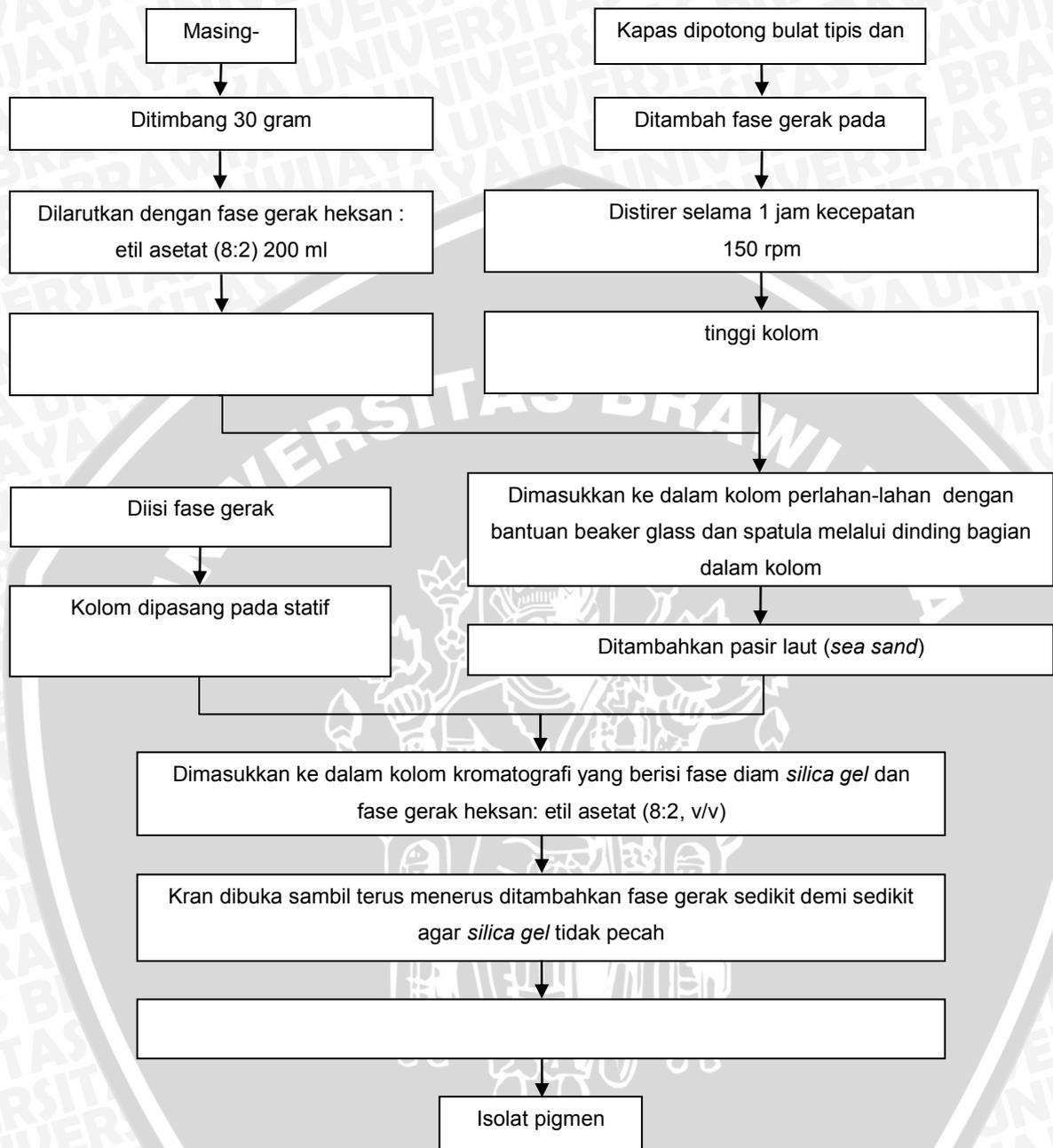
(8:2, v/v) sampai setengah panjang kolom kromatografi untuk membasahi bagian dalam kolom kromatografi. Bubur *silica gel* dimasukkan ke dalam kolom kromatografi sedikit demi sedikit dengan bantuan sendok dalam posisi kran kromatografi terbuka, sambil terus diaduk agar tidak terdapat gelembung udara. Setelah seluruh bubuk *silica gel* dimasukkan, kran ditutup kembali. Kolom diketuk-ketuk menggunakan bola hisap atau alat pemukul lainnya agar fase diam benar-benar padat dan permukaannya rata. Hal ini sesuai dengan pendapat Sudarmadji *et al.*, (2007) yang menyatakan bahwa pengisian kolom kromatografi dilakukan dengan menuangkan serbuk fase diam (bahan adsorben, resin atau gel) ke dalam kolom yang bagian dasarnya sudah ditutup sampai mencapai ketinggian yang dikehendaki, kemudian kolom diketuk-ketuk agar gelembung udara keluar dan isi kolom tersebar merata.

Kolom kromatografi yang telah dipreparasi dibiarkan selama semalam (± 12 jam) untuk memastikan *silica gel* benar-benar padat. Pada saat didiamkan, mulut kolom dan ujung kran ditutup menggunakan *plastic wrap* untuk meminimalkan penguapan fase gerak. Batas atas fase diam ditandai untuk mengetahui padat atau tidaknya fase diam di dalam kolom. Fase diam yang belum padat diketahui dengan turunnya permukaan fase diam, terdapat gelembung udara, terbentuk retakan atau lapisan-lapisan dalam *silica gel*. Apabila fase diam belum padat, maka preparasi kolom kromatografi harus diulangi mulai dari awal.

Kolom kromatografi dengan fase diam yang telah padat, ditambahkan dengan pasir laut sebanyak ± 3 gram di atas permukaan fase diam kemudian diketuk-ketuk agar permukaannya rata. Pemberian pasir laut bertujuan untuk menyaring kotoran atau residu yang tidak diperlukan dari ekstrak kasar (*crude*) rumput laut. Fase gerak di dalam kolom kromatografi dikurangi volumenya dengan cara membuka kran kolom sampai tingginya mendekati permukaan pasir

laut kemudian kran ditutup kembali. *Crude Padina australis* dilarutkan dengan 10 ml fase gerak n-heksan dan etil asetat (8:2, v/v) kemudian dimasukkan ke dalam kolom kromatografi menggunakan pipet tetes secara perlahan-lahan melalui dinding bagian dalam kolom agar permukaan pasir laut dan fase diam tidak rusak. Selanjutnya kran kolom dibuka sehingga larutan ekstrak kasar akan meresap ke dalam fase diam. Ketika permukaan sampel yang meresap telah mendekati permukaan pasir laut, segera ditambahkan fase gerak dengan perbandingan yang sama sampai seluruh *crude* meresap ke dalam fase diam. Fase gerak ditambahkan secara berkesinambungan hingga terbentuk pita-pita warna di dalam fase diam. Selanjutnya setiap fraksi (isolat) warna ditampung di dalam botol vial 15 ml dan dikelompokkan berdasarkan warnanya.

Penuangan fase gerak merupakan salah satu langkah penting yang harus diperhatikan dalam proses kromatografi kolom agar fase diam tidak mengalami pecah. Kemampuan fase diam dalam memisahkan senyawa pigmen menjadi kurang maksimal apabila mengalami pecah atau rusak. Pecahnya fase diam terjadi ketika kondisinya kering atau tidak terisi oleh pelarut, ditandai dengan munculnya garis atau sekat horizontal dan bintik-bintik putih tidak beraturan yang terbentuk dari kristal *silica gel* yang kering karena tidak terendam oleh fase gerak. Semakin lama kolom digunakan, pecahnya fase diam akan semakin mengembang dan berangsur-angsur merata ke sepanjang fase diam di dalam kolom, sehingga kemampuan fase diam dalam memisahkan senyawa pigmen akan semakin menurun. Prosedur isolasi pigmen menggunakan kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 8.



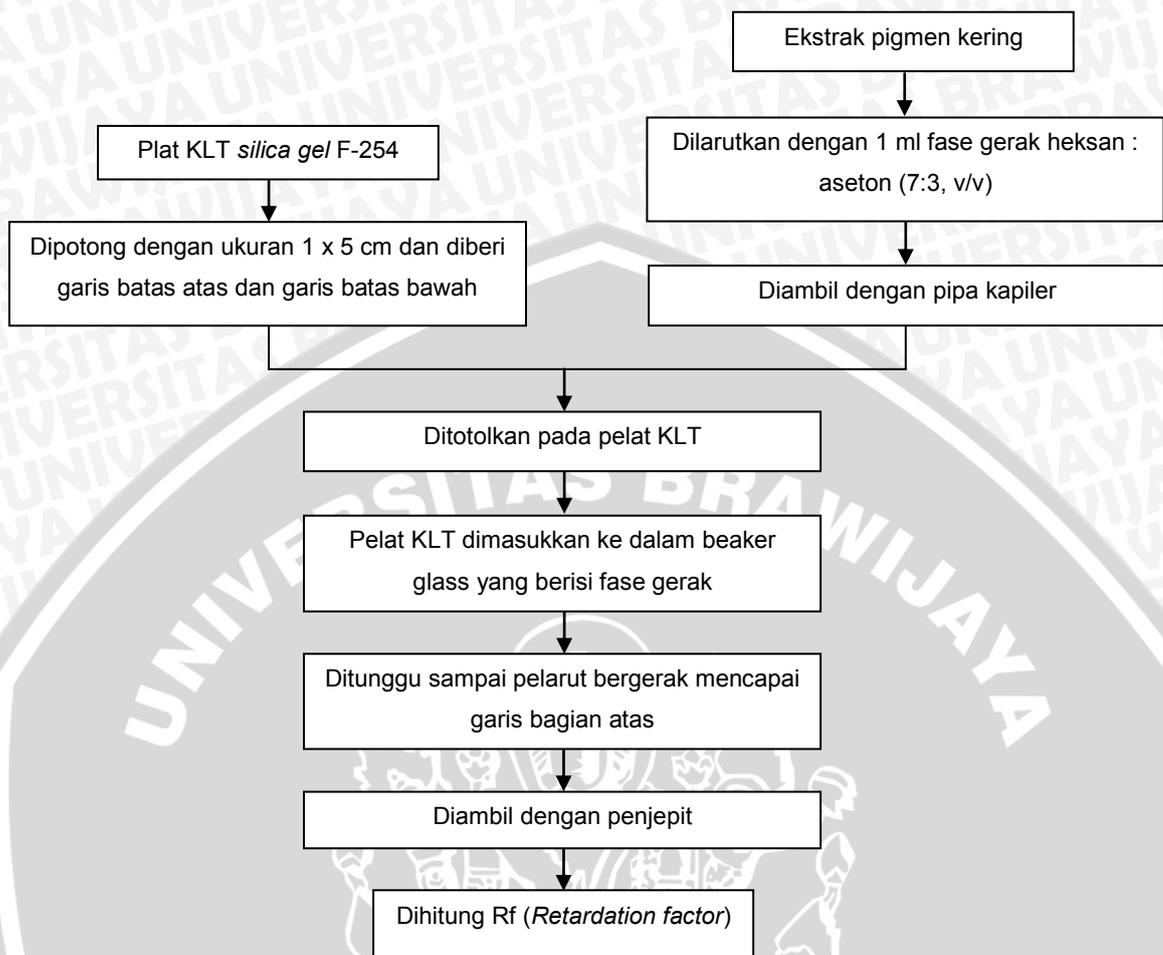
Gambar 8. Prosedur isolasi pigmen dengan kromatografi kolom.
(Pangestuti *et al.*, 2007) dimodifikasi oleh Mu'amar (2009).

3.5 Identifikasi β -Karoten

3.5.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Identifikasi β -karoten dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan plat KLT dengan fase diam *silica gel* F-254, sedangkan fase gerak yang digunakan yaitu n-heksan dan aseton (7:3, v/v). Plat KLT dipotong dengan ukuran 1×5 cm kemudian dibuat garis melintang di kedua ujung plat pada permukaan *silica gel*. Garis pertama dibuat pada jarak 1 cm dari tepi plat KLT untuk menunjukkan batas bawah atau posisi awal fraksi warna ketika ditotolkan, dan garis ke dua dibuat pada ujung lainnya dengan jarak 0,5 cm dari tepi plat KLT untuk menunjukkan batas atas atau batas jarak yang ditempuh oleh fase gerak.

Isolat warna dari hasil kromatografi kolom yang diduga sebagai β -karoten diambil secukupnya menggunakan pipa kapiler kemudian ditotolkan tepat pada garis batas bawah pada plat KLT. Selanjutnya plat KLT dimasukkan ke dalam ± 5 ml fase gerak di dalam *beakerglass* dan ditunggu hingga fase gerak bergerak mencapai garis batas atas. Plat KLT diambil menggunakan pinset, kemudian bercak warna yang muncul pada plat KLT diamati dan dihitung nilai Rf-nya. Prosedur identifikasi β -karoten dengan kromatografi lapis tipis dapat dilihat pada Gambar 9.

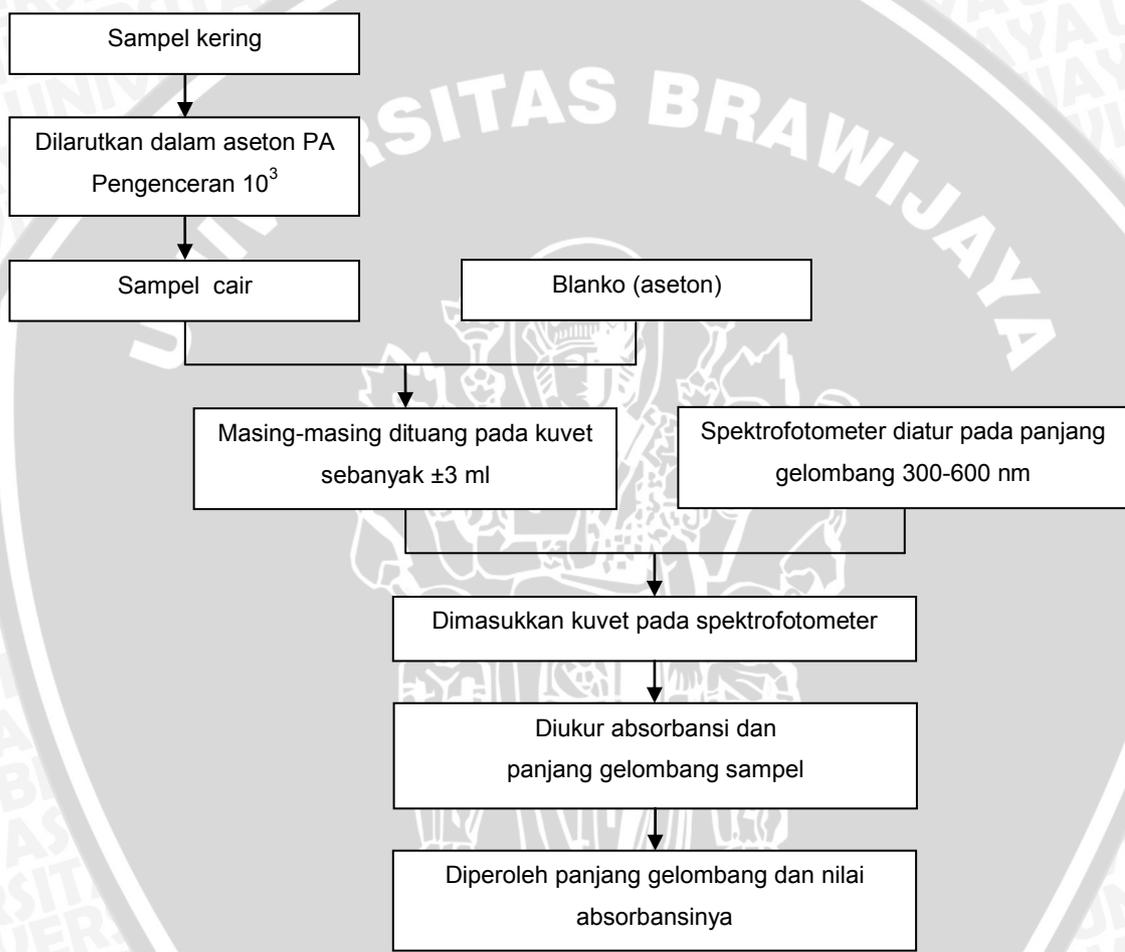


Gambar 9. Prosedur identifikasi β-karoten dengan kromatografi lapis tipis. (Pangestuti *et al.*, 2007).

3.5.2 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk mengidentifikasi pigmen β-karoten berdasarkan panjang gelombang dan nilai absorbansinya. Isolat warna yang diketahui sebagai β-karoten berdasarkan warna dan nilai Rf yang dari proses KLT terlebih dahulu dikeringkan dengan dialiri menggunakan gas nitrogen (N_2). Isolat warna yang telah kering diencerkan menggunakan aseton PA sampai pengenceran 10^4 , kemudian dimasukkan ke dalam instrumen spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1601 dan diuji pada kisaran panjang gelombang 300-600 nm, sehingga diketahui pola spektra dan nilai absorbansi maksimal dari isolat warna

yang diuji. Pola spektra dan nilai absorbansi pada puncak-puncak yang tertinggi dibandingkan dengan pola spektra dan nilai absorbansi maksimal β -karoten dari penelitian Jeffrey *et al.*, (1997) untuk mengetahui apakah fraksi warna yang diuji tersebut merupakan β -karoten. Prosedur analisa panjang gelombang dan absorbansi β -karoten dengan spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 10.

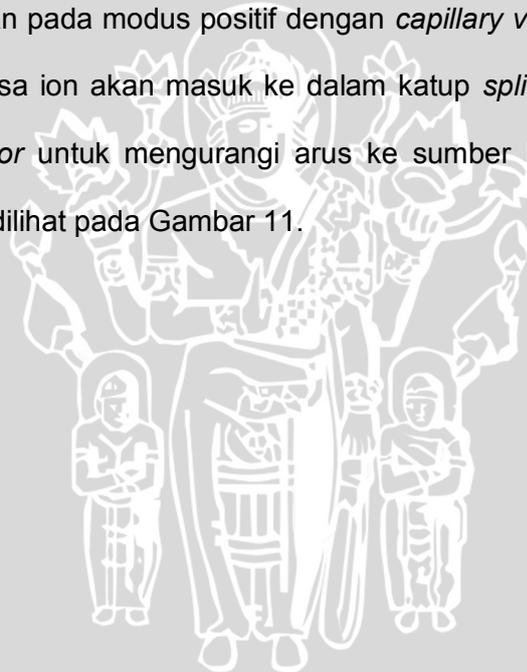


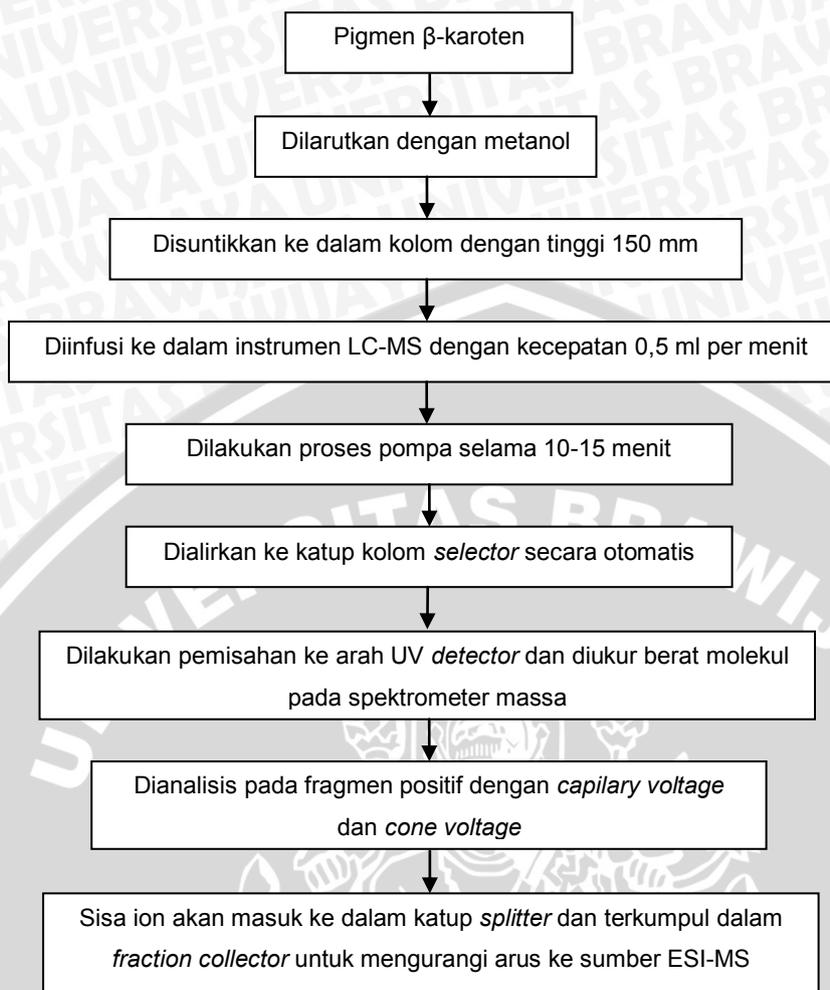
Gambar 10. Prosedur analisa panjang gelombang dan absorbansi β -karoten dengan spektrofotometer UV-Vis (Jenie *et al.*, 1997).



3.5.3 Pengukuran Berat Molekul dengan *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS)

Pada penelitian ini dilakukan pengukuran berat molekul menggunakan instrumen LC-MS berdasarkan metode ionisasi *electrospray ionization* (ESI) modus positif dengan pelarut metanol (CH_3OH). Sampel pigmen β -karoten dilarutkan dalam metanol dan disuntikkan ke dalam botol dengan tinggi 150 mm kemudian dan diinfusi ke dalam instrumen LC-MS dengan kecepatan 0,5 ml/menit. Selanjutnya dilakukan proses pompa yang dialirkan ke katup kolom *selector* secara otomatis selama 10-15 menit sehingga terjadi pemisahan ke arah UV detektor dan berat molekul dapat terukur pada spektrometer massa. Analisa berat molekul dilakukan pada modus positif dengan *capillary voltage* 1800 V dan *cone voltage* 60 V. Sisa ion akan masuk ke dalam katup *splitter* dan terkumpul dalam *fraction collector* untuk mengurangi arus ke sumber ESI-MS. Prosedur analisa LC-MS dapat dilihat pada Gambar 11.





Gambar 11. Prosedur analisis berat molekul dengan LC-MS (dimodifikasi dari Zailanie, 2012).

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Data Hasil Penelitian

Hasil isolasi dan identifikasi β -karoten dari rumput laut coklat *Padina australis* dengan kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis (KLT), spektrofotometri UV-Vis, dan *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS) dapat dilihat pada Tabel 13.

Tabel 13. Hasil Isolasi dan Identifikasi β -karoten Rumput Laut Coklat *Padina australis*

Uji Identifikasi	Alat	Hasil	Literatur
Kromatografi Kolom	Kromatografi Kolom	Diperoleh isolat berwarna kuning pada tabung ke 3 sampai 6.	β -karoten berwarna kuning. (Jeffrey <i>et al.</i> , 1997).
Warna dan Rf totalan fraksi warna	Plat KLT <i>silica gel</i> F-254	Nilai Rf dari isolat warna kuning	Nilai Rf
		Ulangan	β -karoten adalah 0,8-1,0. (Britton <i>et al.</i> , 1995).
Panjang gelombang serapan maksimum	Spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1601	Panjang gelombang serapan maksimum dalam pelarut aseton (nm):	Panjang gelombang maksimum β -karoten dalam pelarut aseton adalah 453,5 nm. (Jeffrey <i>et al.</i> , 1997).
		Ulangan	
		I II III	
		0,94 0,91 0,97	
Berat molekul	LC-MS	536,8662	Berat molekul β -karoten sebesar 536,88. (Jeffrey <i>et al.</i> , 1997)

4.2 Pembahasan

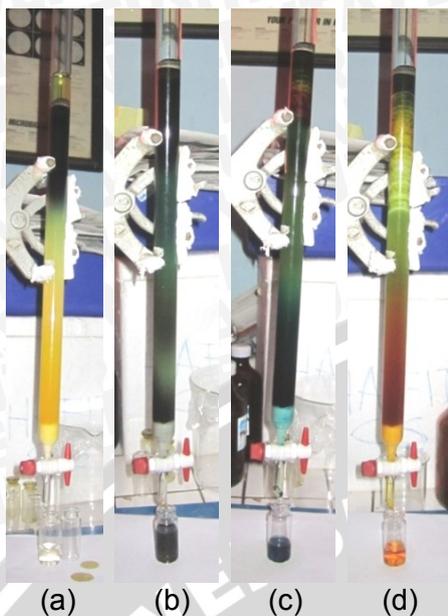
4.2.1 Isolasi β -karoten dengan Kromatografi Kolom

Metode kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan dan mengisolasi β -karoten dari beberapa senyawa pigmen yang terdapat pada *Padina australis*. Dalam penelitian ini digunakan *normal phase*, yaitu penggunaan fase diam yang bersifat polar dan fase gerak yang bersifat non polar. Fase diam yang digunakan adalah *silica gel* (SiO_2) F-254 dengan ukuran

60 *mesh* dan fase gerak yang digunakan yaitu campuran n-heksan (C_6H_{14}) dan etil asetat ($C_4H_8O_2$) dengan perbandingan 8:2, 7:3, 6:4, dan 5:5 (v/v). N-heksan bersifat non polar atau memiliki polaritas yang lebih rendah dari etil asetat yang bersifat semi polar, sehingga semakin tinggi perbandingan n-heksan di dalam campuran fase gerak, maka semakin non polar sifat fase gerak tersebut, dan sebaliknya. N-heksan akan melarutkan senyawa pigmen yang bersifat non polar, sedangkan etil asetat akan melarutkan senyawa pigmen yang lebih polar.

Menurut Vogel (1987), pelarut yang bersifat polar cenderung melarutkan senyawa yang bersifat polar dan pelarut yang bersifat non polar cenderung melarutkan senyawa yang bersifat non polar. Isolasi dengan kromatografi kolom dimulai dengan penggunaan fase gerak yang paling non polar (n-heksan:etil asetat, 8:2, v/v) dan berangsur-angsur dinaikkan polaritasnya sesuai dengan tingkat polaritas senyawa pigmen yang akan dikeluarkan. Lenny dan Zuhra (2005), menyebutkan bahwa pemilihan fase gerak (eluen) sebaiknya dimulai dari pelarut yang tidak polar seperti n-heksan dan selanjutnya dilakukan peningkatan kepolaran dengan etil asetat atau pelarut yang lebih polar lainnya.

Dari uraian di atas dapat disimpulkan bahwa senyawa pigmen yang bersifat non polar dari ekstrak kasar *Padina australis* akan keluar terlebih dahulu karena memiliki interaksi yang lemah dengan fase diam yang bersifat polar, sedangkan senyawa pigmen yang lebih polar akan keluar berikutnya secara berurutan sesuai dengan tingkat polaritasnya karena memiliki interaksi yang lebih kuat dengan fase diam, sebanding dengan polaritas fase gerak yang ditambahkan, sebagaimana pernyataan Noviyanti (2010), bahwa senyawa yang berinteraksi lemah dengan fase diam akan bergerak lebih cepat melalui fase diam, sedangkan senyawa dengan interaksi yang kuat dengan fase diam akan bergerak sangat lambat. Proses isolasi pigmen rumput laut coklat *Padina australis* dapat dilihat pada Gambar 12.



Keterangan:

- (a) Fraksi warna kuning pekat (diduga β -karoten).
- (b) Fraksi warna hijau gelap kecoklatan (diduga feofitin).
- (c) Fraksi warna biru pekat (diduga klorofil a).
- (d) Fraksi warna oranye pekat (diduga fukosantin).

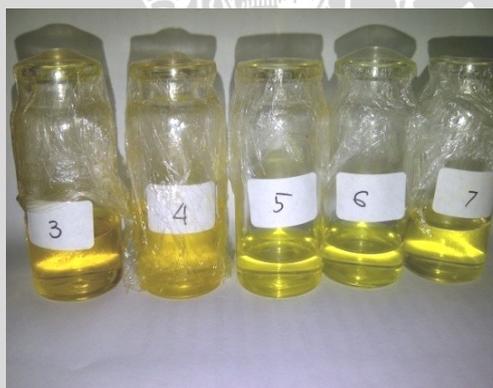
Gambar 12. Proses Isolasi pigmen rumput laut coklat *Padina australis* dengan kromatografi kolom.

Gambar di atas menunjukkan terbentuknya pita-pita warna di dalam kolom kromatografi berdasarkan tingkat polaritasnya. Fraksi warna kuning pekat (a) dan hijau gelap kecoklatan (b) keluar dengan penambahan fase gerak n-heksan:etil asetat (8:2, v/v), fraksi warna biru pekat (c) keluar dengan penggunaan fase gerak n-heksan:etil asetat (7:3, v/v), dan fraksi warna oranye pekat (d) keluar dengan penggunaan fase gerak n-heksan:etil asetat (5:5, v/v). Adapun fraksi yang memiliki warna, tetapi cenderung bening dan terdapat di antara di antara fraksi-fraksi warna di atas, disebut sebagai fase antara. Fase antara hanya mengandung fraksi warna dalam jumlah kecil atau campuran dari dua fraksi warna, dan bukan merupakan fraksi warna spesifik dari satu jenis pigmen tertentu, sehingga tidak digunakan.

Dalam proses kromatografi lapis tipis (KLT), fase antara tidak memunculkan bercak warna, atau terkadang hanya muncul dalam intensitas yang sangat kecil. Isolasi pigmen menunjukkan bahwa fraksi warna kuning pekat merupakan fraksi yang pertama kali keluar dengan penggunaan fase gerak yang paling non polar n-heksan:etil asetat (8:2, v/v), sehingga dapat disimpulkan

bahwa isolat warna kuning memiliki polaritas yang paling rendah atau memiliki sifat paling non polar di antara keempat fraksi warna di atas. Tabel hasil isolasi pigmen dengan kromatografi kolom disajikan pada lampiran 9.

Dari isolasi pigmen pada *crude Padina australis* ini didapatkan 87 botol isolat warna dengan empat warna dominan, yaitu kuning pekat, hijau gelap kecoklatan, biru pekat dan oranye pekat. Berdasarkan warna yang muncul, isolat yang berwarna kuning pada tabung 3-6 diduga sebagai β -karoten, sebagaimana hasil penelitian Jeffrey *et al.*, (1997) yang menunjukkan bahwa β -karoten berwarna kuning. Dengan demikian, perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut untuk memastikan bahwa isolat tersebut merupakan β -karoten. Hasil isolasi β -karoten dari rumput laut coklat *Padina australis* dapat dilihat pada Gambar 13.



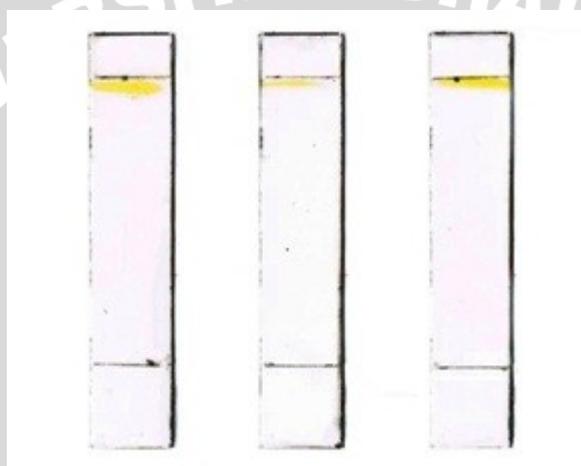
Gambar 13. Hasil isolasi β -karoten dari rumput laut coklat *Padina australis*.

4.2.2 Identifikasi β -karoten dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Hasil isolat yang diduga sebagai β -karoten diidentifikasi dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) untuk membuktikan bahwa isolat tersebut merupakan β -karoten berdasarkan total warna yang muncul dan perhitungan nilai *retardation factor* (Rf). Dalam kromatografi lapis tipis digunakan plat KLT *silica gel* F-254 sebagai fase diam dan campuran n-heksan:aseton (7:3, v/v) sebagai fase gerak. Fase gerak yang digunakan cenderung bersifat non polar dengan penambahan n-heksan yang lebih banyak dibandingkan aseton karena isolat

warna yang diduga sebagai β -karoten cenderung bersifat non polar, sebagaimana diketahui dari hasil kromatografi kolom.

Isolat warna pada botol 3-6 dari hasil kromatografi kolom yang diduga sebagai β -karoten diidentifikasi dengan KLT, kemudian bercak warna yang muncul pada plat KLT diamati dan dihitung nilai Rf-nya dengan cara membagi jarak bercak warna dari titik awal penotolan dengan jarak yang ditempuh oleh fase gerak dari titik awal penotolan. Hasil identifikasi β -karoten dengan KLT dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Hasil identifikasi β -karoten rumput laut coklat *Padina australis* dengan KLT.

Gambar di atas menunjukkan bahwa identifikasi isolat β -karoten dengan KLT menghasilkan total berwarna kuning pada jarak tertentu. Warna kuning mengindikasikan bahwa isolat yang diidentifikasi merupakan β -karoten, sebagaimana pendapat Britton *et al.*, (1995) yang menyatakan bahwa warna kuning merupakan warna β -karoten. Terbentuknya total warna tunggal tanpa terbentuk total warna lain membuktikan bahwa isolat tersebut tidak tercampur dengan isolat pigmen lain. Isolat yang merupakan campuran dari beberapa senyawa pigmen akan menghasilkan beberapa total warna tertentu dengan jarak tempuh yang bervariasi. Dari perhitungan nilai Rf berdasarkan perbandingan jarak yang ditempuh oleh total warna dan pelarut, didapatkan nilai Rf dari isolat

yang diduga sebagai β -karoten tersebut berturut-turut sebesar 0,94; 0,91; dan 0,97. Nilai tersebut mendekati hasil penelitian Astutiningsih *et al.*, (2010) yang menunjukkan Rf β -karoten adalah 0,93. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Britton *et al.*, (1995) yang menunjukkan Rf β -karoten yaitu 0,8-1,0. Perhitungan nilai Rf β -karoten *Padina australis* disajikan pada Lampiran 10.

Sebagaimana telah diuraikan di atas, dalam KLT pada penelitian ini digunakan *normal phase*, yaitu fase diam yang bersifat polar (*silica gel* F-254 (SiO_2)) dan fase gerak yang cenderung bersifat non polar (n-heksan (C_6H_{14}) dan etil asetat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$)), sehingga semakin non polar atau semakin rendah polaritas suatu senyawa, maka semakin jauh jarak yang ditempuh oleh senyawa tersebut mengikuti aliran fase gerak. Sebaliknya jika semakin tinggi polaritas suatu senyawa, maka akan semakin terhambat pada fase diam. Oleh karena itu β -karoten memiliki nilai Rf yang paling besar di antara pigmen lainnya karena memiliki polaritas yang paling rendah sehingga paling jauh pula jarak yang dapat ditempuh mengikuti aliran fase gerak. Dengan demikian, berdasarkan identifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), dapat disimpulkan bahwa isolat pada botol 3-6 dari hasil kromatografi kolom teridentifikasi sebagai β -karoten.

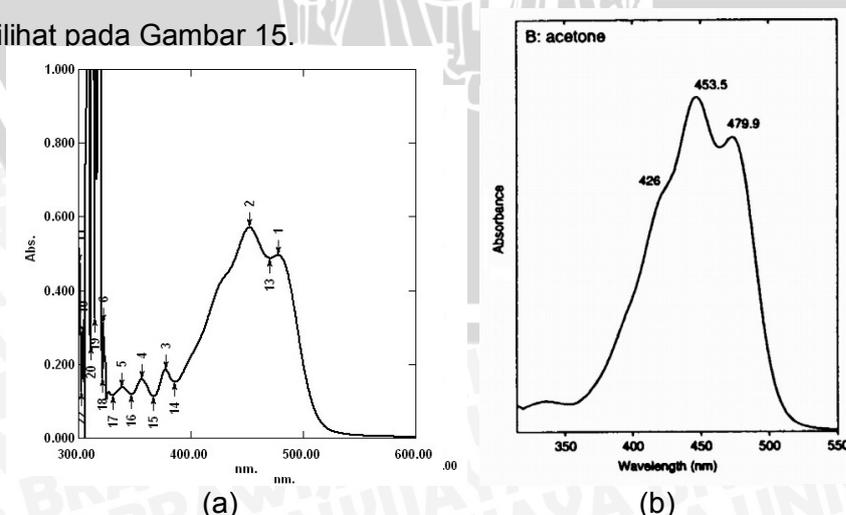
4.2.3 Identifikasi β -karoten dengan Spektrofotometer UV-Vis

Setiap jenis pigmen mempunyai pola spektra dan serapan maksimum spesifik yang dapat dijadikan sebagai acuan untuk mengidentifikasi suatu jenis pigmen tertentu. Isolat warna yang diketahui sebagai β -karoten berdasarkan identifikasi dengan KLT, dianalisis menggunakan Spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui pola spektra dan serapan maksimumnya, kemudian dibandingkan dengan pustaka sehingga dapat diketahui kesesuaiannya dengan pola spektra dan serapan maksimum β -karoten.

Isolat warna yang sebelumnya telah dikeringkan dengan gas nitrogen (N_2), dilarutkan dengan aseton PA (*pro analysis*) sampai pengenceran 10^{-4} . Larutan diisikan ke dalam kuvet dan dimasukkan ke dalam instrumen spektrofotometer UV-Vis, kemudian dilakukan pengujian pada kisaran panjang gelombang (λ) 300-600 nm yang merupakan kisaran panjang gelombang yang dapat diserap oleh β -karoten di mana menurut Jeffrey *et al.*, (1997) serapan maksimum β -karoten dalam pelarut aseton terdapat pada panjang 453,5 nm.

Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis adalah berdasarkan penyerapan cahaya atau energi radiasi oleh suatu larutan yang diuji, di mana setiap zat warna mempunyai panjang gelombang maksimum yang berbeda. Di dalam proses analisis, ada cahaya dari sumber cahaya yang diserap dan ada pula yang diteruskan oleh sampel. Cahaya yang diserap sebanding dengan konsentrasi larutan sampel, sehingga konsentrasi zat di dalam sampel dapat diketahui secara kuantitatif. Jumlah cahaya yang diserap oleh larutan akan menghasilkan sinyal elektrik pada detektor dan diterjemahkan ke dalam bentuk angka-angka oleh pencatat (*reader*) (Triyati, 1985).

Hasil pengujian pola spektra dan serapan maksimum β -karoten hasil isolasi dan β -karoten dari penelitian Jeffrey *et al.*, (1997) dalam pelarut aseton dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Hasil pengujian pola spektra dan serapan maksimum β -karoten dengan spektrofotometer UV-Vis.

Keterangan:

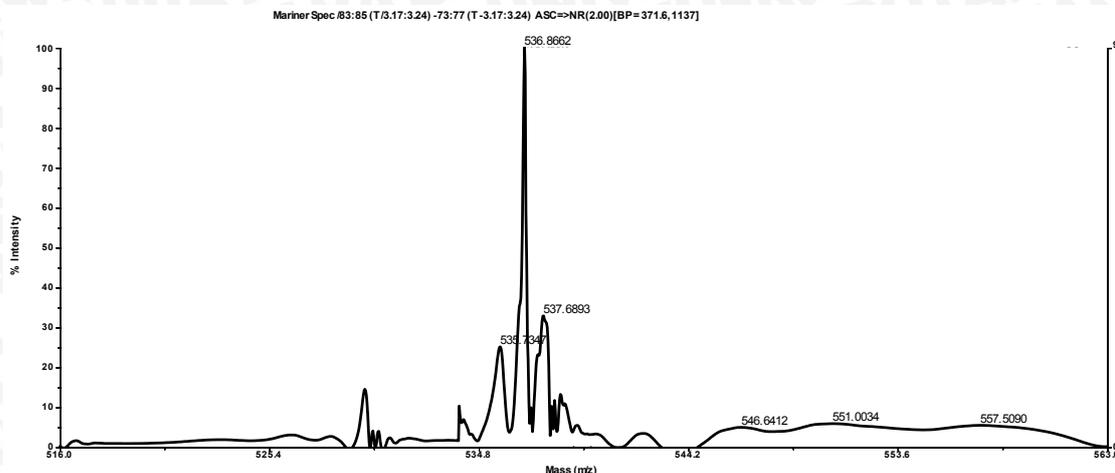
- (a) Pola spektra dan serapan maksimum β -karoten dari *Padina australis* dalam pelarut aseton.
- (b) Pola spektra dan serapan maksimum β -karoten dalam pelarut aseton (Jeffrey *et al.*, 1997).

Gambar di atas menunjukkan bahwa spektra β -karoten yang diisolasi dari *Padina australis* memiliki pola yang mirip dengan hasil penelitian Jeffrey *et al.*, (1997). Spektra isolat β -karoten dari *Padina australis* memiliki serapan maksimum yang terletak pada panjang gelombang 452,20 nm dalam pelarut aseton. Hasil tersebut tidak berbeda jauh apabila dibandingkan dengan pola spektra β -karoten dari penelitian Jeffrey *et al.*, (1997) yang menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 453,5 nm dalam pelarut yang sama. Dari perbandingan pola spektra dan serapan maksimum tersebut dapat disimpulkan bahwa isolat dari *Padina australis* tersebut teridentifikasi sebagai β -karoten. Menurut Toto *et al.*, (2006) pergeseran pola spektra dan serapan maksimum pada uji spektrofotometri diduga terjadi karena adanya interaksi antara zat terlarut (pigmen) dengan pelarut yang digunakan. Tingkat kemurnian dari pelarut akan mempengaruhi interaksi tersebut di dalam proses spektrofotometri.

4.2.4 Pengukuran Berat Molekul β -karoten dengan LC-MS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*)

Analisis menggunakan instrumen LC-MS bertujuan untuk mengukur berat molekul β -karoten yang diisolasi dari *Padina australis* untuk menguatkan hasil identifikasi dengan KLT dan spektrofotometri UV-Vis yang telah dilakukan sebelumnya. Analisis β -karoten dengan instrumen LC-MS ini dilakukan dengan metode ionisasi *electrospray ionization* (ESI) modus positif dengan pelarut metanol. Ionisasi dengan metode ESI positif akan menghasilkan ion molekul dengan penambahan kation, misalnya $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ atau ion muatan ganda $[M+nH]^{n+}$, sedangkan ion molekul yang terbentuk dengan metode ESI negatif

umumnya mengalami kehilangan proton, misalnya $[M-H]^-$. Hasil analisa berat molekul β -karoten menggunakan instrumen LC-MS dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. Hasil analisa berat molekul β -karoten dengan LC-MS.

Spektra massa hasil analisa berat molekul dengan LC-MS di atas menunjukkan bahwa dalam sampel terdapat senyawa kimia yang mempunyai karakteristik adanya 3 pecahan ion molekul dengan massa yang diduga sebagai berat molekul β -karoten. Data fragmentasi ion yang terukur pada spektra massa LC-MS dapat dilihat pada tabel 14.

Tabel 14. Pecahan ion molekul senyawa β -karoten pada *Padina australis*

Massa ion (m/z)	Dugaan pecahan ion molekul	Dugaan senyawa
536,8662	$C_{40}H_{56}$	β -karoten
537,6893	$C_{40}H_{56}+H$	β -karoten + hidrogen

Tabel 14. menunjukkan puncak pertama pada spektra massa di atas merupakan pecahan ion β -karoten dengan berat molekul 536,8662 m/z, sedangkan puncak kedua dengan berat molekul 537,6893 m/z merupakan pecahan ion molekul β -karoten dengan penambahan satu atom H (hidrogen). Adapun puncak ketiga dengan berat molekul 535,7347 m/z diduga sebagai pecahan ion molekul β -karoten dengan pengurangan satu atom H, namun pada umumnya pecahan ion molekul dengan pengurangan atom terjadi pada modus

ionisasi negatif (ESI negatif). Menurut Zhou (2011), di dalam LC-MS memungkinkan terjadi penambahan ion dengan bentuk $[M+H]^+$ dan kehilangan ion dengan bentuk $[M-H]^-$.

Jeffrey *et al.*, (1997) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa berat molekul β -karoten adalah 536,88. Pergeseran nilai berat molekul pada hasil uji LC-MS tersebut diduga karena adanya penambahan atau kehilangan ion, yaitu ion H pada proses ionisasi dengan metode ESI modus positif, sebagaimana telah disebutkan pula oleh Wahyuni *et al.*, (2009) bahwa ion yang terbentuk pada proses ESI dapat berupa ion molekul dengan tambahan ion hidrogen (proton) $[M+H]^+$ atau ion molekul yang kehilangan proton, misalnya $[M-H]^-$.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian mengenai isolasi dan identifikasi β -karoten pada rumput laut coklat *Padina australis* dengan LC-MS dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

- Hasil identifikasi dengan LC-MS modus ESI positif menunjukkan berat molekul β -karoten yang diisolasi dari rumput laut coklat *Padina australis* adalah sebesar 536,8662 yang mendekati nilai berat molekul dari penelitian Jeffrey *et al.*, (1997).

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait identifikasi dan pemanfaatan isolat β -karoten dari rumput laut coklat *Padina australis* yang mempunyai potensi besar dalam bidang kesehatan dan industri. Hasil kromatografi kolom menunjukkan ada beberapa jenis pigmen lain yang terkandung pada rumput laut coklat *Padina australis* sehingga studi isolasi dan identifikasi terhadap kandungan pigmen jenis lain juga perlu dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahamad, M. N., M. Saleemullah, H. U. Shah, I. A. Khalil, A. U. R. Saljoqi. 2007. Determination of Beta Carotene Content in Fresh Vegetables Using High Performance Liquid Chromatography. *J.of Agriculture*. **23** (3): 765-770.
- Anderson, S. and R. Shine. 2009. Organic Chemistry. Laboratory Manual. Ramapo College of New Jersey. Mahwah. New Jersey.
- Arikunto, Suharsimi. 2002. Metodologi Penelitian. Penerbit PT. Rineka Cipta. Jakarta.
- Arindah, D. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Golongan Senyawa pada Daging Buah Pepino (*Solanum muricatum* Aiton) yang Berpotensi sebagai Antioksidan. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. **[Skripsi]**.
- Astutiningsih, C., L. Limantara, O. K. Radjasa. 2010. Uji Mutagenik β -Karoten Alga Merah *Rhodomenia pseudopalmeta* terhadap Mencit Jantan Galur Balb/C yang Diinduksi 2,12-Dimetilbenzen (A) Antrasen (DMBA). *J. Biosaintifika*. **2** (1): 1-9.
- Balboa, E. M., E. Conde, A. Moure, E. Falqué, and H. Domínguez. 2012. In Vitro Antioxidant Properties of Crude Extracts and Compounds from Brown Algae. *Food Chemistry Review*. (138): 1764-1785.
- Bernasconi, G. 1995. Teknologi Kimia. Jilid 2 Edisi Pertama. PT. Pradaya Paramita. Jakarta.
- Britton, G. L., S. Jensen, dan H. Pfander. 1995. Carotenoids Volume 1A: Isolation and Analysis. Birkhauser Verlag. Berlin.
- Chaidir, A. 2006. Kajian Rumput Laut Sebagai Sumber Serat Alternatif Untuk Minuman Berserat. Institut Pertanian Bogor. Bogor. **[Skripsi]**.
- Chusairi, A. 2013. *Health Seeking Behavior* Para Pasien Poli Perawatan Paliatif Studi Eksploratif terhadap Lima Pasien Poli Perawatan Paliatif RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Fakultas Psikologi Universitas Airlangga. Surabaya. **[Skripsi]**.
- Daintith, J. 2004. The Facts on File Dictionary of Organic Chemistry. Facts On File, Inc. New York: 247 pp.
- Daud, M. F., E. R. Sadiyah, dan E. Rismawati. 2011. Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) Berdaging Buah Putih. Prosiding Seminar Nasional Penelitian dan PKM Sains, Teknologi dan Ilmu Kesehatan Tahun 2011 di Bandung. **2** (1): hlm. 55-62.

- Dere, S., T. Gunes, and R. Sivaci. 1998. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll – A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. *J. of Botany*. (22): 13-17.
- Day, R. A. dan A. L. Underwood. 1986. Analisis Kimia Kuantitatif Edisi Kelima. Erlangga. Jakarta.
- Diaz-Pulido, G. and L. J. McCook. 2008. Macroalgae (Seaweeds). The State of the Great Barrier Reef (On-line). Great Barrier Reef Marine Park Authority. Townsville.
- Erawati, C. M. 2006. *Kendali Stabilitas Beta Karoten Selama Proses Produksi Tepung Ubi Jalar (Ipomoea batatas L.)*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. [Tesis].
- Fatimah, S., I. Haryati, A. Jamaludin. 2009. Pengaruh Uranium terhadap Analisis Thorium Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Seminar Nasional V SDM Teknologi Nuklir di Yogyakarta tanggal 5 November 2009: hlm. 573-578.
- Frete, H. D., A. B. Susanto, B. Prasetyo, dan L. Limantara. 2012. Karotenoid dari Makroalgae dan Mikroalgae: Potensi Kesehatan, Aplikasi dan Bioteknologi. *J. Teknologi dan Industri Pangan*. **23** (2): 221-228.
- Geraldino, P. J. L., L. M. Liao and S. M. Boo. 2005. Morphological Study of the Marine Algal Genus *Padina* (Dictyolales, Phaeophyceae) from Southern Philippines: 3 Species New to Philippines. *Algae*. **20** (2): 99-112.
- Gross, J. 1991. Pigments In Vegetables: Chlorophylls and Carotenoids. Springer Science+Business Media, LLC. New York: 351 pp.
- Harborne, J. B. 1987. Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Penerbit Institut Teknologi Bandung.
- Hariyanto, M. Tahalea, K. Samal dan T. Agam. 2010. Koleksi Bibit Alga Coklat (*Padina australis*) dengan Metode Rentangan Net. Balai Budidaya Laut Ambon **1** (1): 1-7.
- Hayani, E. 2007. Pemisahan Komponen Rimpang Temu Kunci secara Kromatografi Kolom. *Buletin Teknik Pertanian*. **12** (1):35-37.
- Hendayana, S. 2006. Kimia Pemisahan. PT. Remaja Rosdakarya. Bandung.
- Hidayati, I. K. 2013. Uji Toksisitas Sari Kulit Kayu Kamboja (*Plumeria acuminata* Ait) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach dan Telaah Fitokimia. Fakultas Ilmu Kesehatan. Universitas Muhammadiyah Malang. [Skripsi].
- Hill, M. G. 2003. Dictionary of Chemistry Second Edition. McGraw-Hill Companies, Inc. United States of America: 431 pp.
http://www.gbrmpa.gov.au/corp_site/info_services/publications/sotr/downloads/SORR_Macroalgae.pdf. Diakses tanggal 8 Juli 2014.

- Jeffrey, S. W., R. F. C. Mantoura and S. W. Wright. 1997. *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*. UNESCO Publishing. Paris. 661 pp.
- Jenie, B. S. L., K. D. Mitrajanty dan S. Fardiaz. 1997. Produksi Konsentrat dan Bubuk Pigmen Angkak dari *Monascus purpureus* Serta Stabilitasnya Selama Penyimpanan. *Buletin Teknologi dan Industri Pangan*. **8** (2): 39-46.
- Kang, J. 2012. *Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples. Tandem Mass Spectrometry-Applications and Principles*. InTech. Shanghai. China: 794 pp.
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2012. *Statistik Perikanan Tangkap, Perikanan Budidaya dan Ekspor-Impor Setiap Provinsi seluruh Indonesia 2003 – 2010*. Pusat Data Statistik dan Informasi. Sekretariat Jenderal Kementerian Kelautan dan Perikanan Indonesia.
- Komara, A. 1991. *Mempelajari Ekstraksi Oleoresin dan Karakteristik Mutu Oleoresin dari Bagian Cabe Rawit (*Capsicum frutescens* L.)*. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. [Skripsi].
- Kristijarti, A. P., dan A. Arlene. 2012. *Isolasi Zat Warna Ungu pada *Ipomoea batatas* Poir dengan Pelarut Air*. Laporan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat. LPPM Universitas Katholik Parahyangan. Perjanjian No. III/LPPM/2012/-02/10-P: hlm. 1-31.
- Lenny, S. dan C. F. Zuhra. 2005. *Isolasi dan Uji Bioaktivitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah (*Graptophyllum pictum* L. Griff) dengan Metode Uji Brine Shrimp*. *J. Komunitas Penelitian*. **17** (5): 56-59.
- Lide, D. R. 2005. *Physical Constants of Organic Compounds in CRC Handbook of Chemistry and Physics, Internet Version*. <http://www.hbcpnetbase.com>. CRC Press. Boca Raton, FL.
- Limantara, L., dan Heriyanto. 2010. *Studi Komposisi Pigmen dan Kandungan Fukosantin Rumput Laut Cokelat dari Perairan Madura dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. *Ilmu Kelautan*. **15** (1): 23-32.
- Limantara, L., dan Heriyanto. 2011. *Optimasi Ekstraksi Fukosantin Rumput Laut Cokelat *Padina australis* Hauck Menggunakan Pelarut Organik Polar*. *Ilmu Kelautan*. **16** (2) 86-94.
- Maryam, R. 2007. *Metode Deteksi Mikotoksin*. *J. Mikologi Kedokteran Indonesia*. **7** (1-2): 12-24.
- Maslebu, G., S. Trihandaru, N. A. Wibowo. 2013. *Kombinasi Teknik Kromatografi Kolom Gravitasi Spektrometer Sederhana sebagai Permodelan Kromatografi Cair Kerja Tinggi (KCKT)*. Prosiding Seminar Nasional Sains dan Pendidikan Sains VII di Universitas Kristen Satya Wacana. Salatiga: hlm. 88-94.

- Maulida, D., dan N. Zulkarnaen. 2010. Ekstraksi Antioksidan (Likopen) dari Buah Tomat dengan Menggunakan Solven Campuran N-Heksana, Aseton dan Etanol. Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro Semarang. **[Skripsi]**.
- Melki, W. E. P. Ayu dan Kurniati. 2010. Uji Antibakteri Ekstrak *Gracilaria* sp (Rumput Laut) terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Program Studi Ilmu Kelautan FMIPA. Universitas Sriwijaya Indralaya.
- Merdekawati, W., A. B. Susanto dan L. Limantara. 200. Kandungan dan Aktifitas Antioksidan Klorofil a dan β -Karoten *Sargassum* sp. *Jurnal Kelautan Nasional*. **2**: 144-155.
- Moroney, N. C., M. N. O'Grady, J. V. O'Doherty, J. P. Kerry. 2013. Effect of a Brown Seaweed (*Laminaria digitata*) Extract Containing Laminarin and Fucoidan on The Quality and Shelf-Life of Fresh and Cooked Minced Pork Patties. *Meat Science*. (94): 304-311.
- Mu'amar, H. A. 2009. Studi Termostabilitas Pigmen Fukosantin, Klorofil a dan Ekstrak Kasar *Padina australis* dan *Sargassum polycyustum* terhadap Suhu dan Lama Pemanasan yang Berbeda. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang. **[Skripsi]**.
- Mukaromah, A. H. dan E. T. Maharani. 2008. Identifikasi Zat Warna Rhodamine B pada Lipstik Berwarna Merah. *J. Ilmu Kesehatan*. **1** (1): 34-40.
- Murthy, K. N. C., 2005. *Production of β -Carotene from Cultured Dunaliella sp. And Evaluation of Biological*. Plant Cell Biotechnology Departement. Central Food Technological Reasearch Institute. Mysore. India. **[Tesis]**.
- Novianto, D. B. 2010. Bioviabilitas Beta Karoten dari Hasil Pemurnian CPO (*Crude Palm Oil*) dalam Bentuk RPO (*Red Palm Oil*) dan Isolat secara In Vivo. Program Studi Gizi Masyarakat dan Sumberdaya Keluarga Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor. **[Skripsi]**.
- Noviyanti, L. 2010. Modifikasi Teknik Kromatografi Kolom untuk pemisahan Trigliserida dari Ekstrak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret. Surakarta. **[Skripsi]**.
- Nurchayanti, A. D. R. dan L. Limantara. 2007. Fotodegradasi Ekstrak Kasar, Klorofil a dan Fucoxanthin *Padina australis* dan *Dictyota crenulata*. Prosiding Seminar Nasional Pigmen, Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga: 243-260.
- Nurdiana, D. R., L. Limantara, A. B. Susanto. 2008. Komposisi dan Fotostabilitas Pigmen Rumput Laut *Padina australis* Hauck. dari Kedalaman yang Berbeda. *Ilmu Kelautan*. **13** (4): 233-240.
- Oliva-Chatelain and Barron. 2010. Basics of UV-Visible Spectroscopy. OpenStax-CNX. Module m34525 pdf version. cnx.org/content/m34525/1.1/. Diakses tanggal 7 August 2014.

- Pangestuti, R., L. Limantara dan A. Susanto. 2007. Kandungan dan Aktivitas Antioksidan Fukosantin *Sargassum polycustum* C. A. Agardh. Prosiding *Back to Nature* dengan Pigmen Alami di Salatiga: hlm. 201-209.
- Prangdimurti, E. 2007. Pigmen Alami. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Reapina, E. M. 2007. Kajian Aktivitas Antimikroba Ekstrak Kulit Kayu Mesoyi (*Cryptocaria massoia*) terhadap Bakteri Patogen dan Pembusuk Pangan. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. **[Skripsi]**.
- Reskika, A. 2011. Evaluasi Potensi Rumput Laut Coklat (*Phaeophyceae*) dan Rumput Laut Hijau (*Chlorophyceae*) asal Perairan Takalar sebagai Antibakteri *Vibrio spp.* Jurusan Perikanan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan. Universitas Hasanuddin Makassar. **[Skripsi]**.
- Santi. 2006. Onggok Sagu Termodifikasi sebagai Fase Diam dalam Kromatografi Kolom. Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor. **[Skripsi]**.
- Santoso, J., F. Podungge and H. Sumaryanto. 2013. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Tropical Brown Algae *Padina australis* from Pramuka Island, District of Seribu Island, Indonesia. *J. Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. **5** (2): 287-297.
- Sastrohamidjojo, H. 1991. Spektroskopi. Liberty. Yogyakarta.
- Schelfan, Leopold and M. B. Jacobs. 1983. The Handbook of Solvent. D. Van Nostrand Comp, Inc. New York.
- Schoefs, Benoît. 2002. Chlorophyll and Carotenoid Analysis in Food Products. Properties of the Pigments and Methods of Analysis. *Trends in Food Science & Technology Review*. (13): 361–371.
- Senthilkumar, K., P. Manivasagan, J. Venkatesan, S. Kim. 2013. Brown Seaweed Fucoïdan: Biological Activity and Apoptosis, Growth Signaling Mechanism in Cancer. *International J. of Biological Macromolecules*. (60): 366-374.
- Setyohadi, R., R. Sidharta, D. S. A. Nandar. 2013. Pengaruh Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap Ketebalan Epital Gingiva Tikus Jantan Galur Wistar yang Diinduksi *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Program Studi Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Malang.
- Sholihah, H. M. 2010. Uji Afrodisiaka Fraksi Larut Air Ekstrak Etanol 70% Kuncup Bungan Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L. Merr & Perry) terhadap Libido Tikus Jantan. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. **[Skripsi]**.
- Siadi, K. 2012. Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) sebagai Biopestisida yang Efektif dengan Penambahan Larutan NaCl. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Semarang. *Jurnal MIPA*. **1** (35): 77-83.

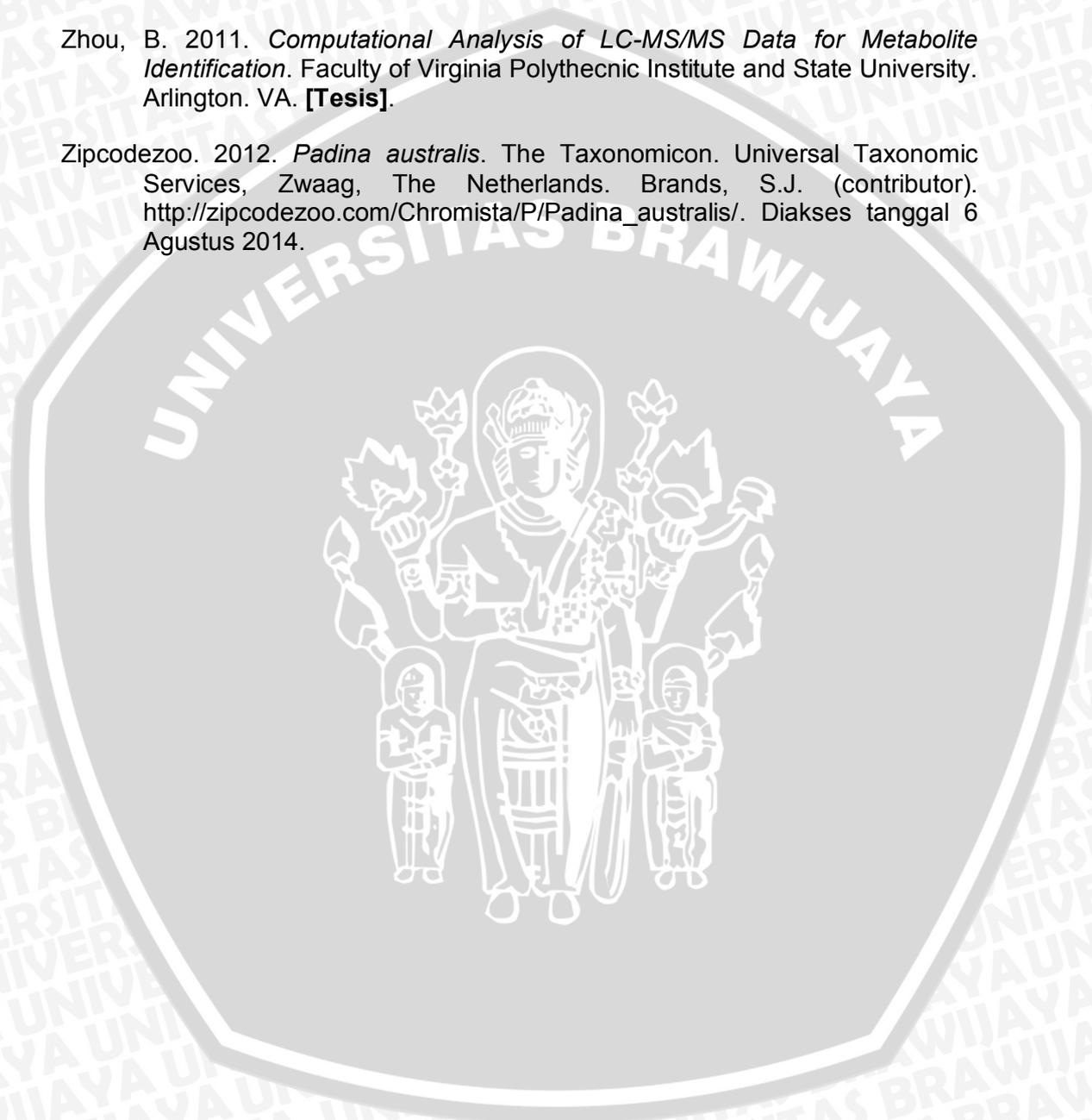
- Striegel, M. F. and J. Hill. 1996. Thin-Layer Chromatography for Binding Media Analysis. Scientific Tools for Conservation. The Getty Conservation Institute. Los Angeles. United States of America: 174 pp.
- Sudarmadji, S. B. Haryono dan Suhardi. 2007. Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Liberty. Yogyakarta.
- Suparmi dan A. Sahri. 2009. Mengenal Potensi Rumput Laut: Kajian Pemanfaatan Sumber Daya Rumput Laut dari Aspek Industri dan Kesehatan. *Sultan Agung*. **44** (118): 95-116.
- Susanto, A. B. 2008. Penelitian Rumput Laut di Indonesia dan Potensi Pemanfaatan Klorofil. Prosiding Sains dan Teknologi Pigmen Alami: hlm. 43-50.
- Taylor, W. R. 1974. Marine Algae of The Te Vega 1965 Expedition in The Western Pacific Ocean. Departement of Botany University of Michigan. *Atoll Research Bulletin February 1977*: hlm. 581-596.
- Telepchak, M. J. 2004. Forensic and Clinical Applications of Solid Phase Extraction. Humana Press, Inc. Totowa, NJ XII: 370 pp.
- Toto, Z. A. D., P. Rahayu, F. F. Karwur dan L. Limantara. 2006. Identifikasi dan Isolasi Pigmen Karotenoid Berbagai Jenis Kuning Telur Unggas. *Organisme* **1** (2): 100-110.
- Triyati, E. 1985. Spektrofotometer Ultra-Violet dan Sinar Tampak serta Aplikasinya dalam Oseanologi. *Oseana*. **10** (1): 39-47.
- Vogel, A. I. 1987. Textbook of Practical Organic Chemistry, Revised by Furnies, B. S. Fourth Edition. New York.
- Voight, R. Terjemahan oleh Dr. Soendani Noerono. 1994. Buku Pelajaran Teknologi Farmasi, Edisi ke-5. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 987 pp.
- Wahyuni, R. H., M. Da'l, B. Santoso. Sintesis Senyawa Analog Kurkumin 3,6-Bis-(4'-Hidroksi-3'-5'-Dimetilbenzolidin)-Piperazin-2'-5'-Dion dengan Katalis HCl. *Pharmacon*. **10** (2): 70-77.
- Wehr, J. D. 2002. Brown Algae, in Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification. Academic Press. San Diego. CA.
- Yasita, D. dan I. D. Rachmawati. 2013. Optimasi Proses Ekstraksi pada Pembuatan Karaginan dari Rumput Laut (*Euचेuma cottonii*) untuk mencapai *Food Grade*. Makalah penelitian. Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik. Universitas Diponegoro Semarang.
- Yuliasih, I., T. T. Irawadi, I. Sailah, H. Pranamuda, K. Setyowati dan T. C. Sunarti. 2013. Pengaruh Proses Fraksinasi Pati Sagu terhadap Karakteristik Fraksi Amilosanya. IPB. Bogor. *J. Teknologi Industri Pertanian*. **17** (1): 29-36.

Yunizal. 1999. Teknologi Pengolahan Alginat. Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan. Badan Riset Kelautan dan Perikanan. Jakarta. 66 pp.

Zailanie, K. 2012. *Studi Kandungan dan Identifikasi Fukosantin Alga Coklat dari Desa Padike Kecamatan Talango Kepulauan Madura*. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya. Malang. **[Disertasi]**

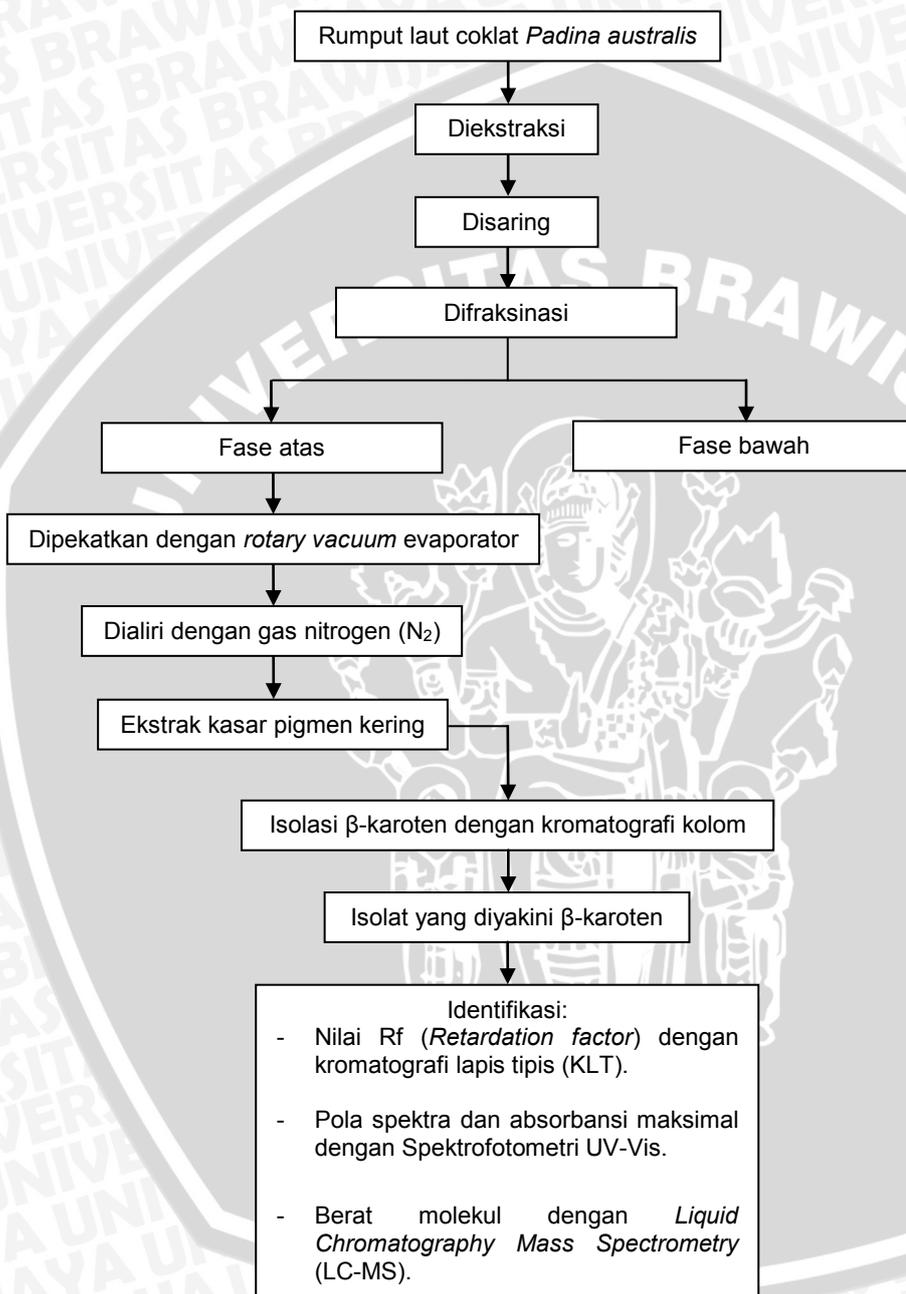
Zhou, B. 2011. *Computational Analysis of LC-MS/MS Data for Metabolite Identification*. Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University. Arlington. VA. **[Tesis]**.

Zipcodezoo. 2012. *Padina australis*. The Taxonomicon. Universal Taxonomic Services, Zwaag, The Netherlands. Brands, S.J. (contributor). http://zipcodezoo.com/Chromista/P/Padina_australis/. Diakses tanggal 6 Agustus 2014.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Prosedur Penelitian Isolasi dan Identifikasi β -Karoten Rumput Laut Coklat *Padina australis* dengan LC-MS



Lampiran 2. Prosedur Ekstraksi dan Fraksinasi (Pangestuti *et al.*, 2008) yang dimodifikasi oleh Mu'amar, (2009).

• **Prosedur Ekstraksi**

- Rumput laut coklat *Padina australis* dicuci dan dibersihkan dengan air mengalir, kemudian dipotong-potong dengan ukuran ± 1 cm.
- Rumput laut coklat *Padina australis* ditimbang 100 gram dan dihaluskan menggunakan mortar dan alu sambil ditambahkan $\text{CaCO}_3 \pm 0,5$ gram.
- Dimaserasi dalam metanol (CH_3OH) dan aseton (CH_3COCH_3) dengan perbandingan 7:3 (v/v) sebanyak 300 ml secara bertingkat selama 24 jam dan 12 jam.
- Hasil maserasi disaring dengan kertas saring kasar dan halus sehingga didapatkan filtrat.

• **Prosedur Fraksinasi**

- Filtrat, dietil eter ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$), sarturasi garam dan air dimasukkan ke dalam corong pisah secara berurutan dengan perbandingan berturut-turut 50 ml : 25 ml : 60 ml : 5 ml di dalam ruang gelap.
- Larutan dalam corong pisah dihomogenkan sampai terbentuk 2 fase.
- Fase atas ditampung dalam labu erlenmeyer dan fase bawah dibuang.
- Fase atas dipekatkan dengan *rotary vacuum* evaporator pada suhu 30°C pada 100 rpm dengan kondisi labu evaporasi ditutup plastik hitam sampai pelarut menguap dan terbentuk kerak atau pasta.
- Kerak atau pasta ditampung dalam botol sampel kemudian dialiri dengan gas nitrogen (N_2) untuk menguapkan sisa pelarut sehingga didapatkan ekstrak kasar pigmen kering.
- Botol sampel ditutup dengan *plastic wrap* dan dilapisi dengan *aluminium foil* kemudian disimpan dalam *freezer*.

Lampiran 3. Prosedur Isolasi dengan Kromatografi Kolom

• Preparasi kolom kromatografi

- *Silica gel* F-254 ditimbang 30 gram kemudian dihomogenkan dengan fase gerak n-heksan (C_6H_{14}) dan etil asetat ($C_4H_8O_2$) dengan perbandingan 8:2 (v/v) sebanyak 200 ml menggunakan *magnetic stirer* selama 1 jam dengan kecepatan 150 rpm sampai didapatkan bubuk *silica gel*.
- Kolom dipasang pada statif kemudian diisi fase gerak untuk membasahi bagian dalam kolom, kemudian kapas dipotong bulat tipis dan dimasukkan ke dalam kolom dengan bantuan lidi.
- Fase gerak di dalam kolom ditambah sampai setengah tinggi kolom.
- Bubuk *silica gel* dimasukkan ke dalam kolom perlahan-lahan dengan bantuan *beaker glass* dan spatula melalui dinding bagian dalam kolom sambil terus diaduk.
- Kolom dipadatkan dengan cara diketuk-ketuk menggunakan alat pemukul kemudian didiamkan selama semalam sampai bubuk *silica gel* padat, selanjutnya ditambahkan pasir laut (*sea sand*) sebanyak ± 3 gram.

• Isolasi pigmen

- Ekstrak kasar pigmen kering dilarutkan dalam ± 10 ml fase gerak n-heksan (C_6H_{14}) dan etil asetat ($C_4H_8O_2$) perbandingan 8:2 (v/v) kemudian dimasukkan ke dalam kolom kromatografi.
- Kran kolom kromatografi dibuka sambil terus menerus ditambahkan fase gerak sedikit demi sedikit agar *silica gel* tidak pecah.
- Fraksi yang keluar dari kolom kromatografi ditampung dalam botol vial sesuai warna.
- Polaritas fase gerak dinaikkan sesuai dengan pergantian warna fraksi yang keluar dari kolom kromatografi dengan penambahan n-heksan

(C_6H_{14}) dan etil asetat ($C_4H_8O_2$) perbandingan 7:3, 6:4, 5:5 (v/v) dan seterusnya) sampai semua fraksi warna sampel yang terpisah keluar dari kolom.

Lampiran 4. Prosedur Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (Pangestuti *et al.*, 2008).

- Plat KLT *silica gel* F-254 dipotong dengan ukuran 1 x 5 cm dan diberi garis batas bawah (1 cm dari tepi) dan garis batas atas (0,5 cm dari tepi).
- Isolat kering pigmen yang diduga sebagai β -karoten dilarutkan dengan 1 ml fase gerak heksan : aseton (7:3, v/v) kemudian diambil dengan pipa kapiler dan ditotolkan pada garis batas bawah plat KLT.
- Plat KLT dimasukkan ke dalam *beaker glass* yang berisi fase gerak dan ditunggu sampai pelarut bergerak mencapai garis batas atas, kemudian plat KLT diambil dengan penjepit.
- Dihitung R_f (*Retardation factor*) dengan rasio jarak yang ditempuh oleh total warna dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut.

Lampiran 5. Prosedur Identifikasi dengan Spektrofotometri UV-Vis (Jenie *et al.*, 1997).

- Sampel kering isolat β -karoten hasil identifikasi dari KLT dilarutkan dalam aseton PA dan dituang pada kuvet sebanyak ± 3 ml.
- Spektrofotometer diatur pada panjang gelombang 300-600 nm
- Kuvet dimasukkan pada instrumen spektrofotometer UV-Vis.
- Diukur absorbansi dan panjang gelombang sampel.

Lampiran 6. Prosedur Identifikasi dengan LC-MS (Sangeetha *et al.*, 2007).

- Pigmen β -karoten disuntikkan ke dalam botol dengan ukuran tinggi 7 cm.
- Dilarutkan dengan metanol dan asam asetat 0,3% dalam air (1:1, v/v).
- Diinfusi ke dalam instrumen LC-MS dengan kecepatan 1 ml per menit.
- Dilakukan proses pompa selama 10-15 menit.
- Dialirkan ke katup kolom *selector* secara otomatis.
- Dilakukan pemisahan ke arah UV *detector* dan diukur berat molekul pada spektrometer massa.
- Dianalisis pada fragmen positif dengan *capillary voltage* dan *cone voltage*.
- Sisa ion akan masuk ke dalam katup *splitter* dan terkumpul dalam *fraction collector* untuk mengurangi arus ke sumber ESI-MS.

Lampiran 7. Prosedur Pembuatan Larutan

• Prosedur Pembuatan Larutan Saturasi Garam

- Disiapkan \pm 300 gram garam grosok, air, botol plastik 1500 ml, kertas saring kasar, kertas saring halus, corong.
- Garam grosok dimasukkan dalam dalam botol kemudian ditambahkan air sampai \pm 1000 ml
- Dihomogenkan dengan cara dikocok sampai larutan jenuh (garam tidak terlarut lagi).
- Larutan disaring dengan kapas, kertas saring kasar, dan kertas saring halus dengan bantuan corong dan ditampung dalam botol.

• Pembuatan Larutan Ekstraksi

Metanol (CH_3OH) : aseton (CH_3COCH_3) (7:3, v/v) dalam 300 ml

- Metanol = $\frac{7}{10} \times 300 = 210 \text{ ml}$
- Aseton = $\frac{3}{10} \times 300 = 90 \text{ ml}$

- **Pembuatan Fase Gerak Kromatografi Kolom**

Heksan (C₆H₁₄) : etil asetat (C₄H₈O₂) (8:2, v/v) dalam 100 ml

- Heksan = $\frac{8}{10} \times 100 = 80 \text{ ml}$
- Etil asetat = $\frac{2}{10} \times 100 = 20 \text{ ml}$

Heksan (C₆H₁₄) : etil asetat (C₄H₈O₂) (7:3, v/v) dalam 100 ml

- Heksan = $\frac{7}{10} \times 100 = 70 \text{ ml}$
- Etil asetat = $\frac{3}{10} \times 100 = 30 \text{ ml}$

Heksan (C₆H₁₄) : etil asetat (C₄H₈O₂) (6:4, v/v) dalam 100 ml

- Heksan = $\frac{6}{10} \times 100 = 60 \text{ ml}$
- Etil asetat = $\frac{4}{10} \times 100 = 40 \text{ ml}$

Heksan (C₆H₁₄) : etil asetat (C₄H₈O₂) (5:5, v/v) dalam 100 ml

- Heksan = $\frac{5}{10} \times 100 = 50 \text{ ml}$
- Etil asetat = $\frac{5}{10} \times 100 = 50 \text{ ml}$

- **Pembuatan Fase Gerak Kromatografi Lapis Tipis**

Heksan (C₆H₁₄) : aseton (CH₃COCH₃) (7:3, v/v) dalam 10 ml

- Heksan = $\frac{7}{10} \times 10 = 7 \text{ ml}$
- Aseton = $\frac{3}{10} \times 10 = 3 \text{ ml}$

Lampiran 8. Dokumentasi Proses Penelitian

- Proses ekstraksi rumput laut coklat *Padina australis*



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Keterangan:

- (a) Pencucian;
- (b) Pemetongan;
- (c) Penghalusan dan penambahan CaCO_3 ;
- (d) Penuangan pelarut;
- (e) Proses maserasi;
- (f) Proses filtrasi.

- Proses fraksinasi hasil maserasi, pemekatan dan pengeringan ekstrak kasar (*crude*) rumput laut coklat *Padina australis*



(a)



(b)



Keterangan:

- (a) Proses fraksinasi filtrat/ekstrak hasil maserasi.
- (b) Pemekatan fase atas ekstrak rumput laut coklat *Padina australis* dengan rotary vacuum evaporator,
- (c) Pengeringan ekstrak *crude Padina australis* dengan gas N₂

- Proses Preparasi Kolom Kromatografi



(a)

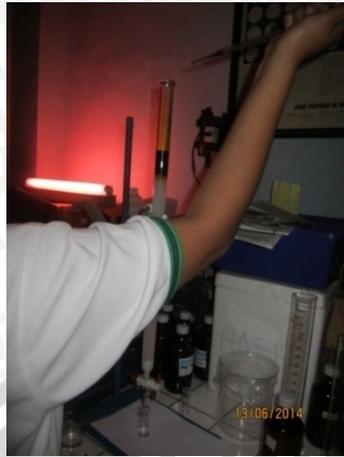


(b)

Keterangan:

- (a) Homogenisasi *silica gel* dalam fase gerak dengan *magnetic stirrer*.
- (b) Penuangan bubuk *silica gel* dalam kolom kromatografi.

- Proses Isolasi Pigmen dengan Kromatografi Kolom



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

Keterangan:

- (a) Proses penuangan ekstrak kasar ke dalam kolom kromatografi.
- (b), (c), (d), (e) Terbentuknya pita-pita warna (pemisahan senyawa).
- (f) Hasil isolasi β -karoten.

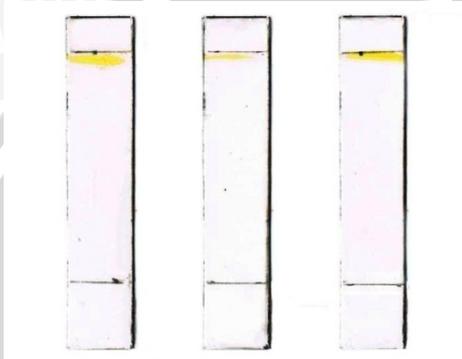
- Proses identifikasi β -karoten dengan kromatografi lapis tipis (KLT)



(a)



(b)



(c)

Keterangan:

- (a) Penotolan pigmen β -karoten pada plat KLT.
- (b) Proses elusi fase gerak pada KLT.
- (c) Hasil KLT pigmen β -karoten.

- Proses identifikasi β -karoten dengan spektrofotometri UV-Vis



(a)



(b)



(c)

Keterangan:

- (a) Pengenceran dan penuangan sampel pigmen β -karoten dalam kuvet.
- (b) Sampel pigmen β -karoten yang telah diencerkan.
- (c) Penempatan kuvet sampel dalam instrumen spektrofotometer UV-Vis.

Lampiran 9. Tabel hasil isolasi pigmen dengan kromatografi kolom

Panjang kolom kromatografi = 50 cm

Diameter kolom kromatografi = 2 cm

Botol ke-	Waktu	Warna Isolat	Fase Gerak
1	13:20	Bening	n-heksana (C ₆ H ₁₄) : etil asetat (C ₄ H ₈ O ₂) (8:2, v/v)
2	15:27	Kuning bening	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
3	15:36	Kuning pekat	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
4	15:43	Kuning pekat	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
5	15:47	Kuning pekat	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
6	15:53	Kuning pekat	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
7	15:59	Kuning	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
8	16:05	Kuning	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
9	16:19	Kuning bening	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
10	16:34	Kuning bening	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
11	16:53	Kuning bening kehijauan	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
12	17:13	Bening kehijauan	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
13	17:36	Bening kehijauan	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
14	17:58	Bening kehijauan	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
15	18:10	Bening kehijauan	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
16	18:18	Hijau gelap kecoklatan	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
17	18:39	Hijau gelap kecoklatan	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
18	18:54	Coklat	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
19	19:10	Coklat muda	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
20	19:25	Coklat bening	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
21	19:40	Coklat bening	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
22	19:57	Coklat bening	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
23	20:13	Coklat kehijauan	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
24	20:32	Coklat bening	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (8:2, v/v)
25	20:53	Hijau kekuningan bening	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
26	21:15	Hijau kekuningan bening	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
27	21:36	Hijau kekuningan bening	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
28	21:55	Hijau kekuningan bening	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
29	22:15	Hijau kekuningan bening	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
30	22:23	Hijau	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
31	22:31	Hijau kebiruan	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
32	22:40	Hijau kebiruan bening	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
33	22:46	Hijau kebiruan bening	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
34	22:55	Hijau kebiruan agak bening	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
35	23:18	Biru	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
36	23:31	Biru tua	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
37	23:39	Biru tua	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
38	23:45	Biru tua	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
39	23:51	Biru tua	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
40	00:01	Biru tua	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
41	00:10	Biru tua	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
42	00:22	Biru tua	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
43	00:36	Biru tua	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
44	00:48	Biru tua	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
45	00:57	Biru tua bening	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)
46	01:08	Biru tua bening	C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂ (7:3, v/v)



Botol ke-	Waktu	Warna Isolat	Fase Gerak
47	01:26	Hijau kebiruan	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (7:3, v/v)
48	01:39	Hijau kebiruan bening	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (6:4, v/v)
49	01:55	Hijau bening	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (6:4, v/v)
50	02:14	Hijau bening	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (6:4, v/v)
51	02:30	Hijau bening	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (6:4, v/v)
52	02:43	Hijau bening	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (6:4, v/v)
53	10:30	Hijau kekuningan bening	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (6:4, v/v)
54	10:41	Hijau	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (6:4, v/v)
55	10:52	Hijau bening kekuningan	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (6:4, v/v)
56	11:01	Hijau bening kekuningan	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (6:4, v/v)
57	11:13	Hijau kekuningan	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (6:4, v/v)
58	11:19	Hijau kekuningan	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (6:4, v/v)
59	11:24	Hijau pekat kekuningan	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (6:4, v/v)
60	11:32	Hijau pekat kekuningan	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (6:4, v/v)
61	11:38	Hijau pekat kekuningan	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (6:4, v/v)
62	11:42	Hijau pekat kekuningan	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (6:4, v/v)
63	11:59	Hijau pekat kekuningan	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (6:4, v/v)
64	12:10	Kuning kehijauan	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
65	12:20	Kuning kehijauan	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
66	12:31	Hijau kekuningan	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
67	12:41	Hijau kekuningan	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
68	12:52	Hijau kekuningan	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
69	13:04	Hijau agak pekat kekuningan	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
70	13:14	Hijau pekat kekuningan	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
71	13:18	Kuning tua/emas+hijau	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
72	13:22	Oranye/kemerahan	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
73	13:26	Oranye pekat	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
74	13:30	Oranye pekat	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
75	13:35	Oranye pekat	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
76	13:39	Oranye pekat	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
77	13:45	Oranye pekat	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
78	13:49	Oranye pekat	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
79	13:55	Oranye pekat	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
80	14:01	Oranye pekat	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
81	14:13	Oranye pekat	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
82	14:19	Oranye	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
83	14:27	Oranye bening	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
84	14:39	Oranye bening	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
85	14:50	Kuning tua/ Oranye bening	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
86	15:01	Kuning tua bening	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)
87	15:11	Kuning tua bening	$C_6H_{14} : C_4H_8O_2$ (5:5, v/v)

Lampiran 10. Tabel hasil perhitungan KLT β-karoten

Ulangan	Jarak yang ditempuh total warna (cm)	Jarak yang ditempuh pelarut (cm)	Rf
1	3,3	3,5	0,94
2	3,2	3,5	0,91
3	3,4	3,5	0,97

Perhitungan:

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

Ulangan 1

$$R_f = \frac{3,3}{3,5} = 0,9428571$$

Ulangan 2

$$R_f = \frac{3,2}{3,5} = 0,9142857$$

Ulangan 3

$$R_f = \frac{3,4}{3,5} = 0,9714286$$

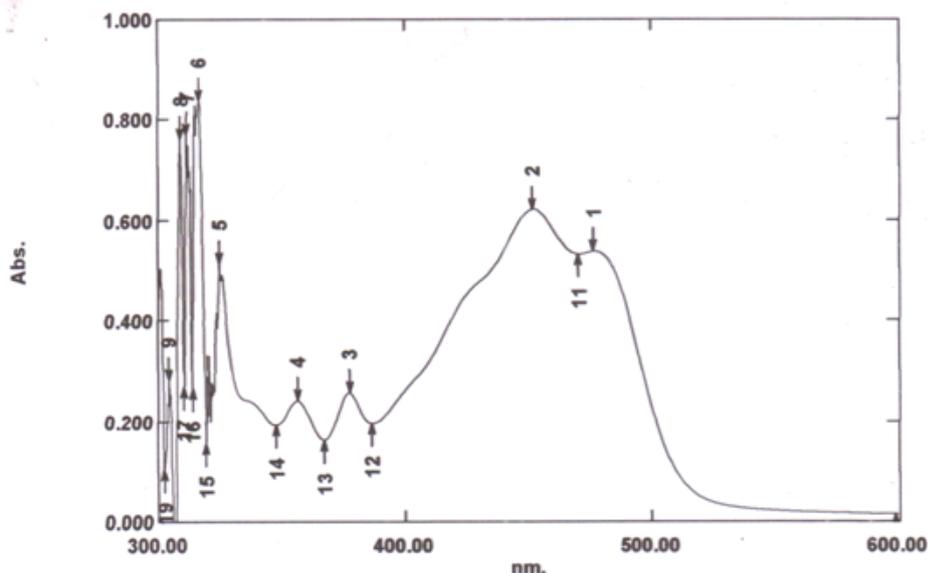


Lampiran 11. Hasil Uji β -karoten dengan Spektrofotometri UV-Vis

Spectrum Peak Pick Report

06/23/2014 08:57:53 PM

Data Set: Betakaroten_2 - RawData - E:\PERIKANAN23 JUNI 14\Betakaroten_2.spc



Measurement Properties
 Wavelength Range (nm.): 300.00 to 600.00
 Scan Speed: Fast
 Sampling Interval: 0.2
 Auto Sampling Interval: Enabled
 Scan Mode: Single

Sample Preparation Properties
 Weight:
 Volume:
 Dilution:
 Path Length:
 Additional Information:

Instrument Properties
 Instrument Type: UV-1600 Series
 Measuring Mode: Absorbance
 Slit Width: 2.0 nm
 Light Source Change Wavelength: 340.8 nm
 S/R Exchange: Normal

Attachment Properties
 Attachment: None

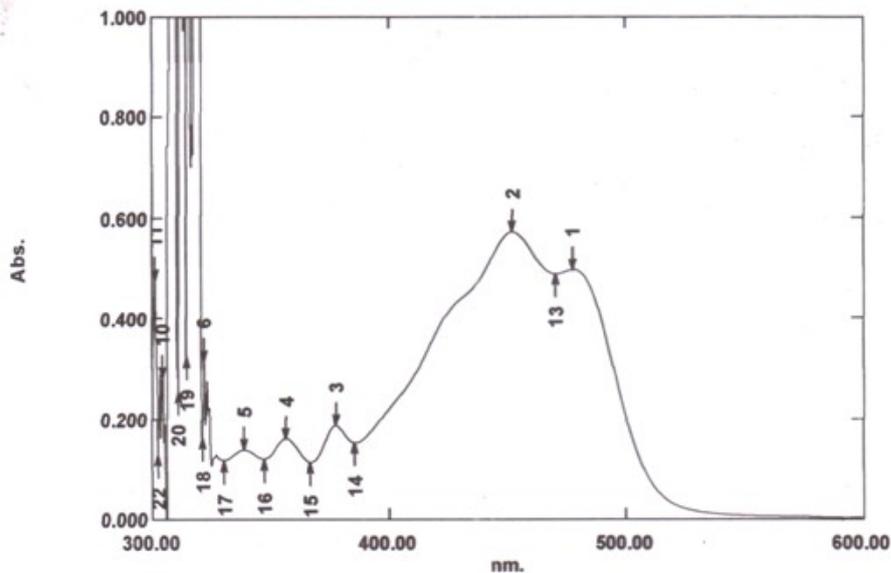
No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	●	476.60	0.537	
2	●	451.80	0.622	
3	●	377.40	0.257	
4	●	356.20	0.240	
5	●	324.80	0.515	
6	●	316.60	0.838	
7	●	311.60	0.772	
8	●	309.20	0.763	
9	●	304.20	0.282	
10	●	599.00	0.014	
11	●	470.60	0.532	
12	●	386.60	0.195	
13	●	367.20	0.163	
14	●	347.80	0.191	
15	●	319.60	0.157	
16	●	313.80	0.267	
17	●	310.60	0.271	
18	●	307.00	-0.131	
19	●	302.60	0.105	



Spectrum Peak Pick Report

06/23/2014 08:50:40 PM

Data Set: Betakaroten_1 - RawData - E:\PERIKANAN\23 JUNI 14\Betakaroten_1.spc



Measurement Properties
 Wavelength Range (nm.): 300.00 to 600.00
 Scan Speed: Fast
 Sampling Interval: 0.2
 Auto Sampling Interval: Enabled
 Scan Mode: Single

Sample Preparation Properties
 Weight:
 Volume:
 Dilution:
 Path Length:
 Additional Information:

Instrument Properties
 Instrument Type: UV-1600 Series
 Measuring Mode: Absorbance
 Slit Width: 2.0 nm
 Light Source Change Wavelength: 340.8 nm
 S/R Exchange: Normal

Attachment Properties
 Attachment: None

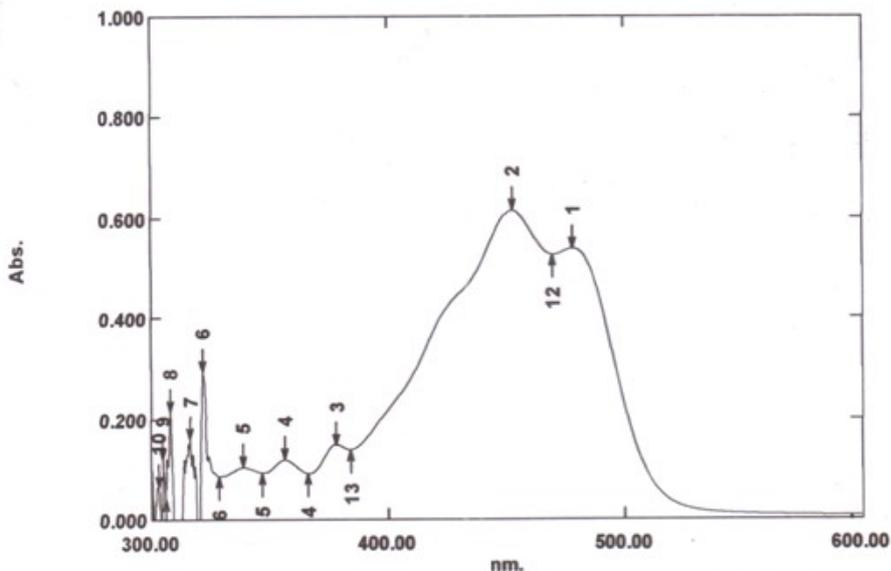
No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	●	477.60	0.496	
2	●	452.20	0.572	
3	●	377.60	0.186	
4	●	356.40	0.160	
5	●	338.60	0.137	
6	●	322.00	0.313	
7	●	315.60	2.400	
8	●	311.80	1.874	
9	●	309.20	2.374	
10	●	304.40	0.283	
11	●	301.20	0.478	
12	●	591.60	0.002	
13	●	470.20	0.488	
14	●	385.60	0.152	
15	●	366.80	0.113	
16	●	347.00	0.120	
17	●	330.40	0.117	
18	●	321.00	0.163	
19	●	314.40	0.325	
20	●	310.80	0.252	
21	●	306.20	-0.332	
22	●	302.60	0.128	



Spectrum Peak Pick Report

06/25/2014 01:38:05 AM

Data Set: Betakaroten_2 - RawData - E:\PERIKANAN\24 JUNI 14\Betakaroten_2.spc



Measurement Properties
 Wavelength Range (nm.): 300.00 to 600.00
 Scan Speed: Fast
 Sampling Interval: 0.2
 Auto Sampling Interval: Enabled
 Scan Mode: Single

Sample Preparation Properties
 Weight:
 Volume:
 Dilution:
 Path Length:
 Additional Information:

Instrument Properties
 Instrument Type: UV-1600 Series
 Measuring Mode: Absorbance
 Slit Width: 2.0 nm
 Light Source Change Wavelength: 340.8 nm
 S/R Exchange: Normal

Attachment Properties
 Attachment: None

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	●	478.20	0.539	
2	●	452.60	0.614	
3	●	378.00	0.148	
4	●	356.20	0.118	
5	●	339.00	0.103	
6	●	321.80	0.294	
7	●	316.40	0.160	
8	●	308.00	0.214	
9	●	305.00	0.120	
10	●	302.80	0.065	
11	●	595.80	0.007	
12	●	469.80	0.526	
13	●	384.00	0.138	
14	●	366.20	0.091	
15	●	346.80	0.093	
16	●	328.60	0.085	
17	●	320.00	-0.152	
18	●	311.00	-0.363	
19	●	305.80	0.039	
20	●	304.00	-0.005	
21	●	301.00	-0.025	



Lampiran 12. Hasil Uji β -karoten dengan LC-MS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*)

β -karoten

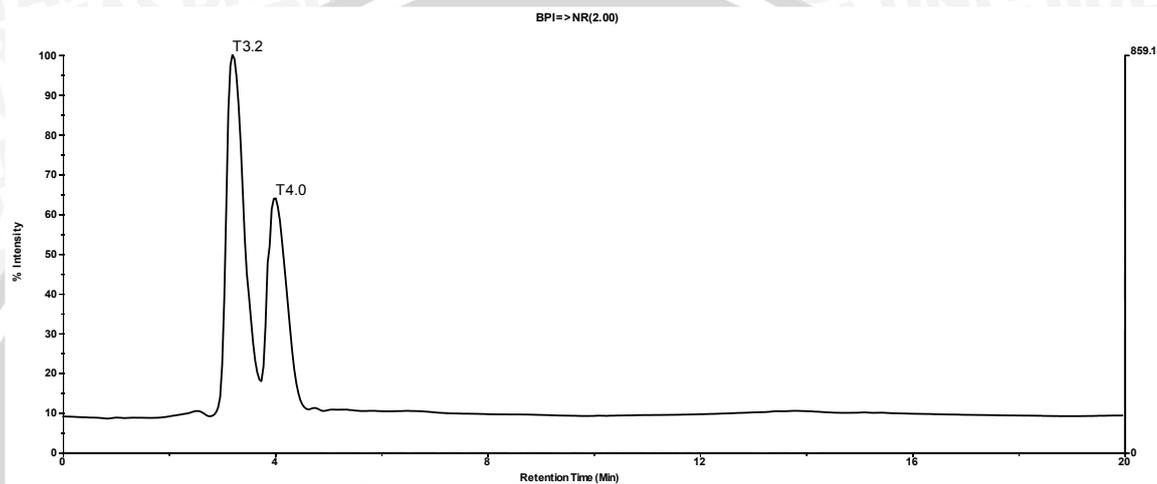
LC MS –ESI pos ion

Vol injection 20 ul

Flow 1 ml/min

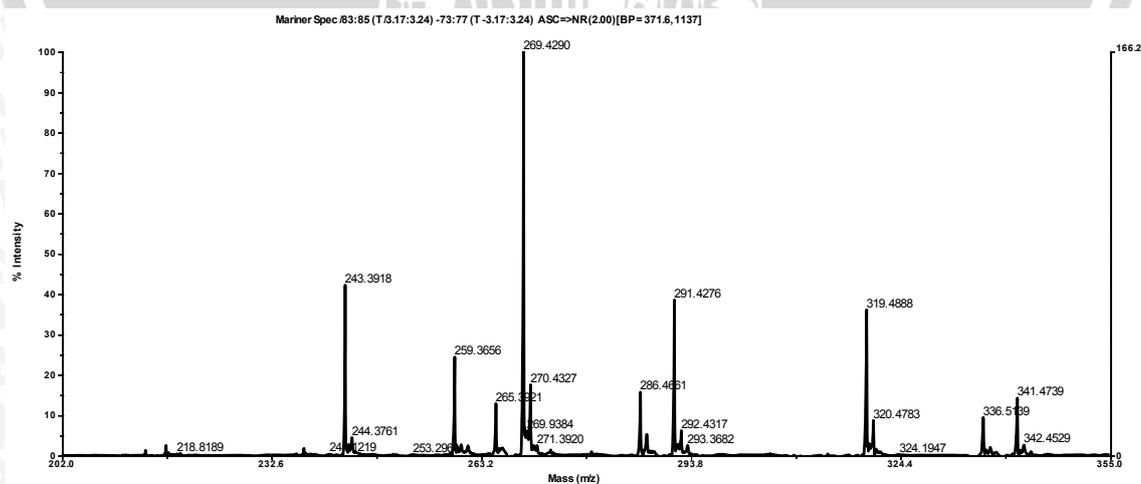
Eluent MeOH

Operating by : Puspa D N Lotulung

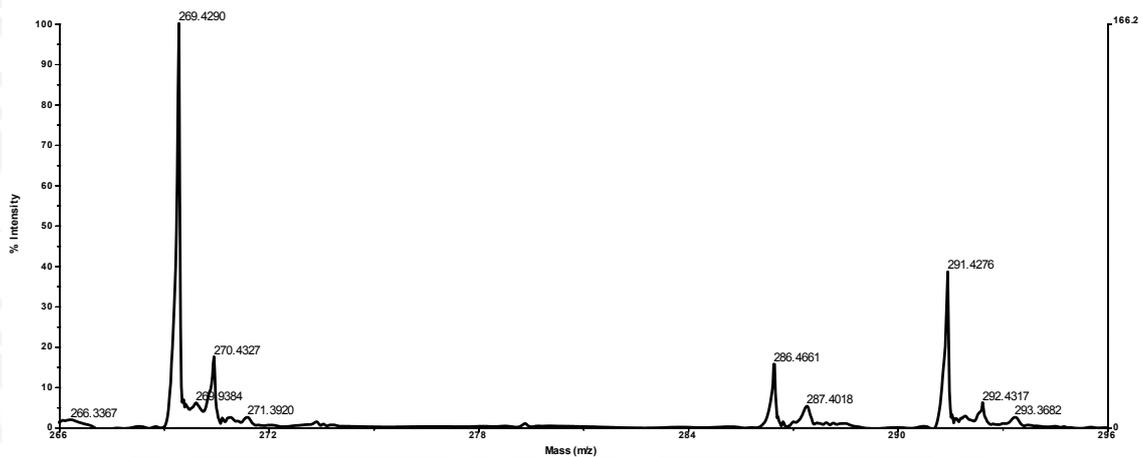


Index	Time	Lower Bound	Upper Bound	Height	Area
1	3.205100	2.819217	3.750217	859	7997.75
2	4.020450	3.827500	4.603617	548	4707.86

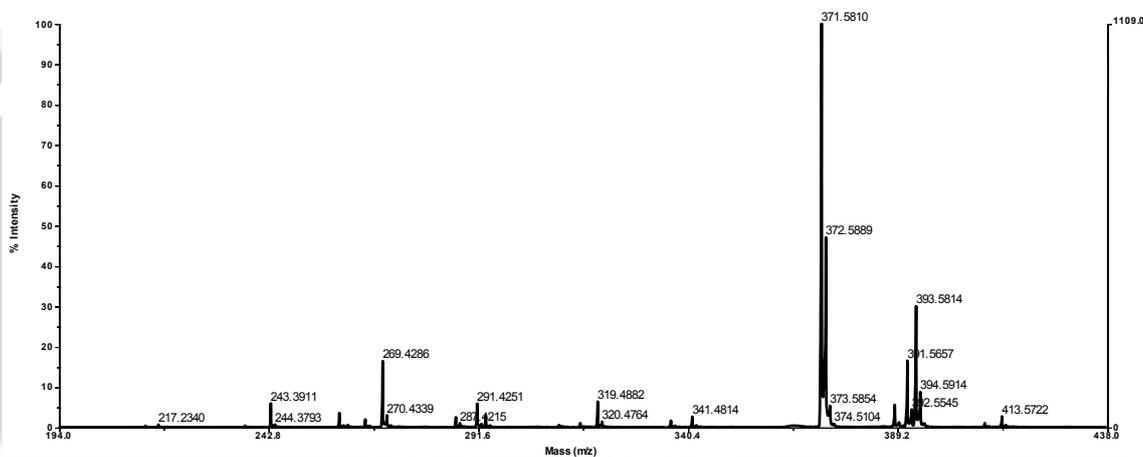
Rt 3.2



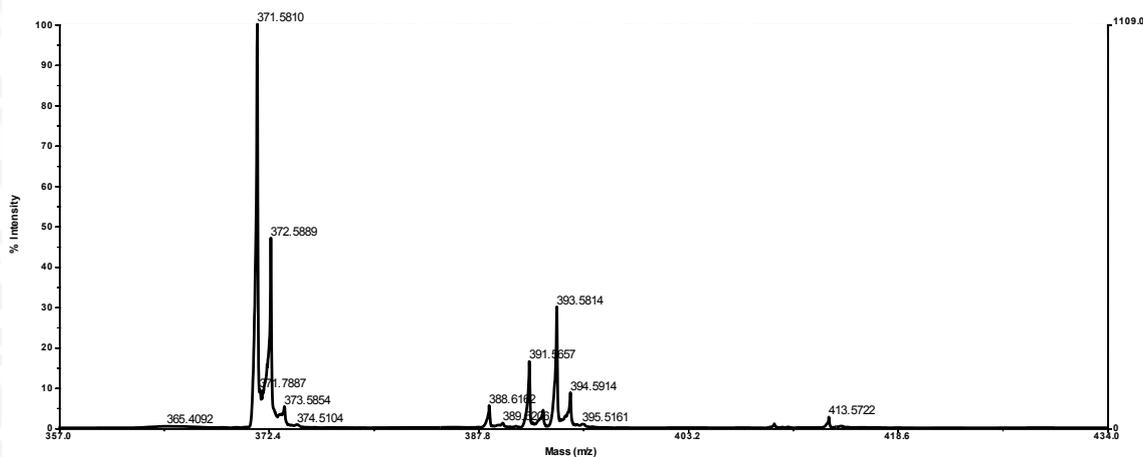
Mariner Spec :83:86 (T:3.17:3.24) -73:77 (T-3.17:3.24) ASC=>NR(2.00)[BP= 371.6, 1137]

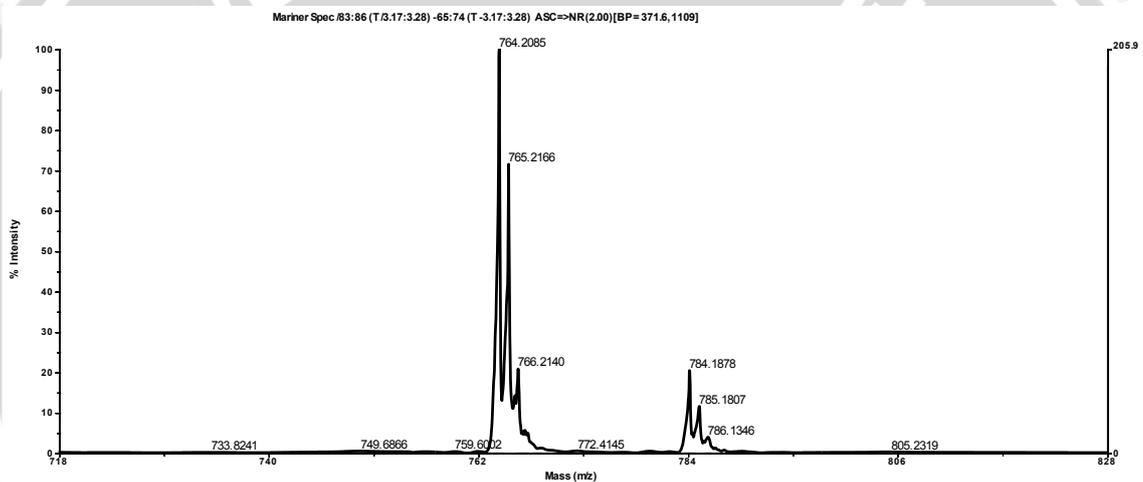
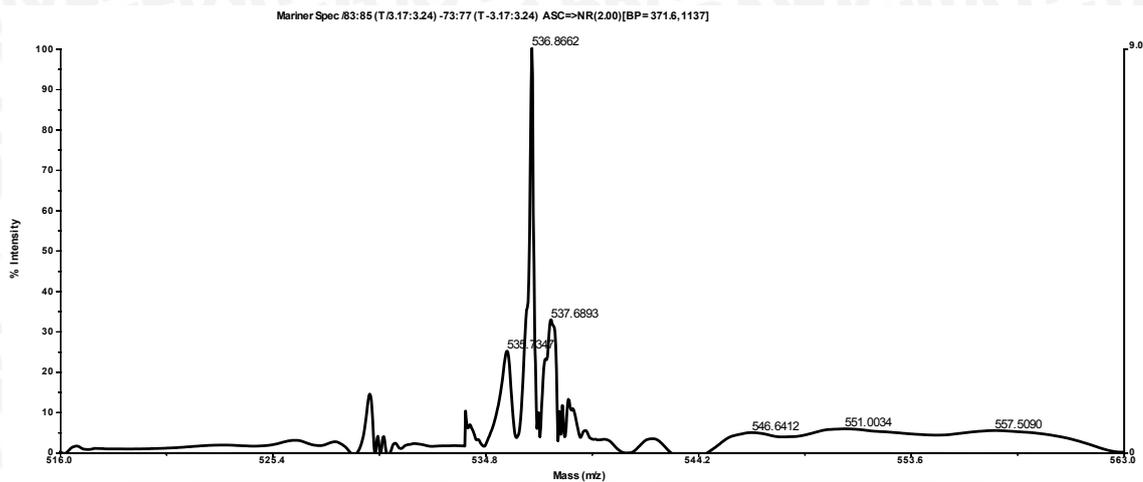


Mariner Spec :83:86 (T:3.17:3.28) -65:74 (T-3.17:3.28) ASC=>NR(2.00)[BP= 371.6, 1109]

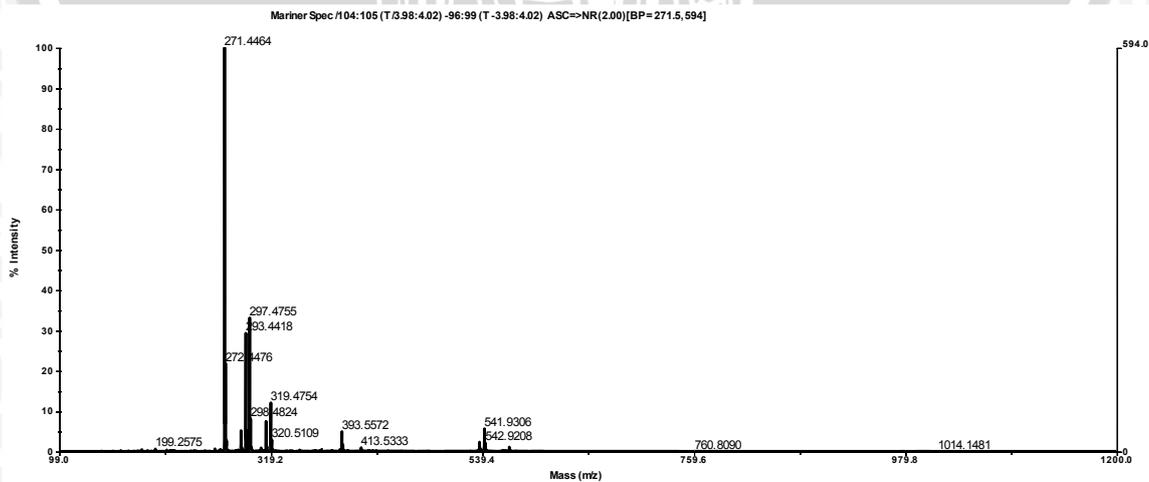


Mariner Spec :83:86 (T:3.17:3.28) -65:74 (T-3.17:3.28) ASC=>NR(2.00)[BP= 371.6, 1109]

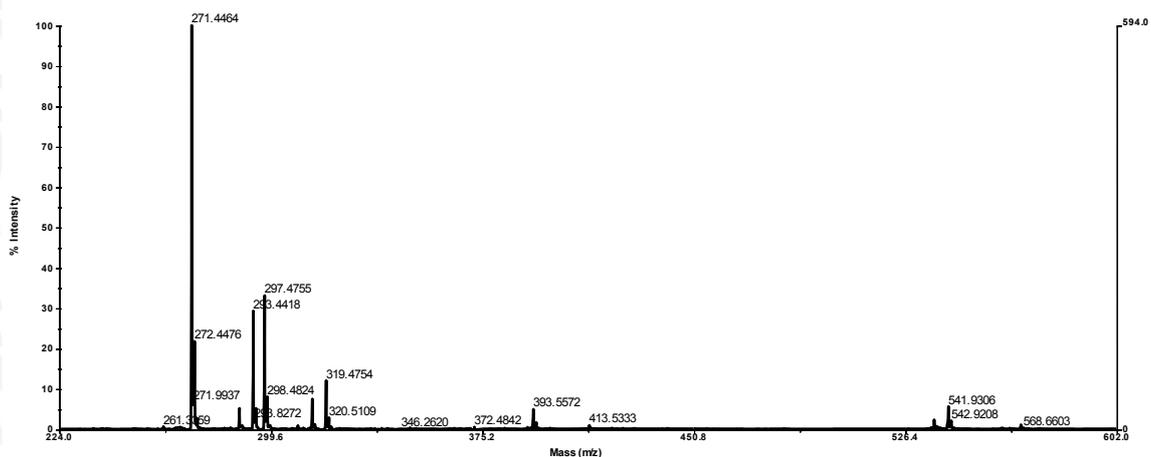




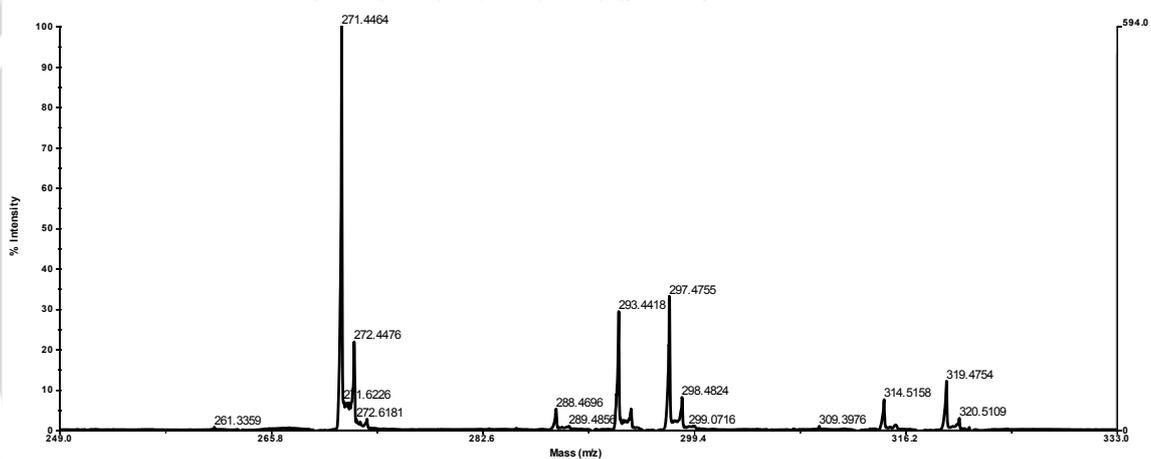
Rt 4.0



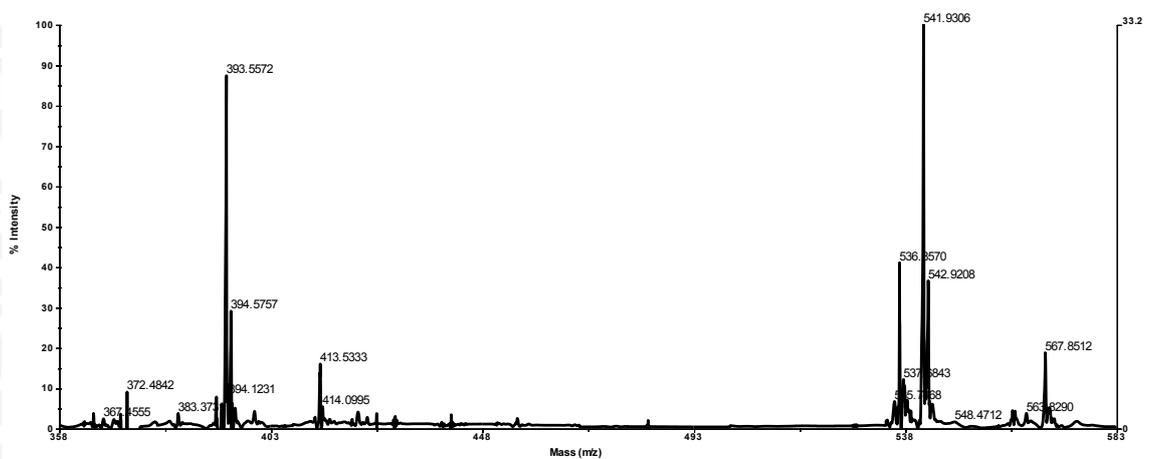
Mariner Spec /104:105 (T:3.98:4.02) -96:99 (T -3.98:4.02) ASC=>NR(2.00)[BP=271.5,594]

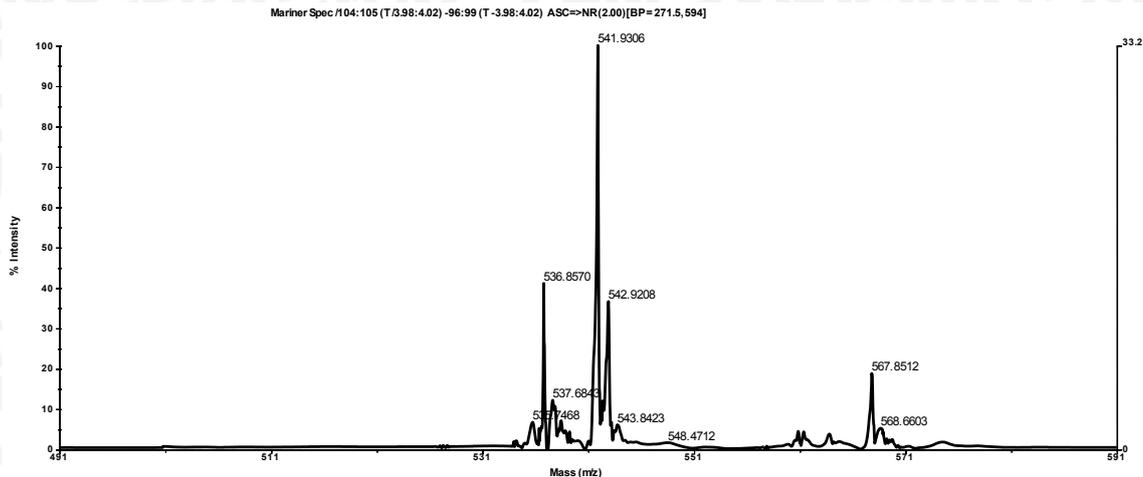


Mariner Spec /104:105 (T:3.98:4.02) -96:99 (T -3.98:4.02) ASC=>NR(2.00)[BP=271.5,594]



Mariner Spec /104:105 (T:3.98:4.02) -96:99 (T -3.98:4.02) ASC=>NR(2.00)[BP=271.5,594]





Lampiran 13. Spesifikasi Analisis LC-MS

Sample
Vol injection 20 ul
Flow rate 0.5 ml/min
Eluent Methanol
LC-MS : Mariner Biospectrometry
LC: Hitachi L 6200
System ESI (Electrospray Ionisation)
Positive ion mode
Kolom C18 (RP 18) Phenomenex
Column length : 150 mm
ID : 2 mm
Particle size : 5 µm
Analysis by : Puspa .D. Lotulung, Pusat Penelitian Kimia – LIPI

BPI = Base Peak Intensity
BP = Base Peak
TIC = Total Ion Current
NR = Noise Removal
BC = Base Correction
MC = Mass Calibration
BP = Base Peak
CT = Centroiding
SM = Gaussian smooth

Temperatur kolom = temp ruangan ;
isokratik, Detector massa

Method : positive ion

LC-MS Analysis

LC-MS analysis was performed using an Mariner Biospectrometry equipped with a binary pump. The HPLC was interfaced with a Q-tof mass spectrometer fitted with an ESI source. Full-scan mode from m/z 100 to 1200 was performed with a source temperature of 140 ° C. HPLC column (Phenomenex 5 µm C18, 150 × 2 mm i.d.,) was used for the analysis. Solvent was Methanol with 0.3% acetic acid. Solvents were delivered at a total flow rate of 0.5 mL/min. The solvent running by isocratic elution.

