

IDENTIFIKASI *CRUDE* DAN ISOLASI KLOORIFIL *a* DARI RUMPUT LAUT
HIJAU (*Caulerpa racemosa*) DENGAN PENGUJIAN SPEKTROKOPI FTIR

LAPORAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN

Oleh:
REDITA SARI WALUYO
NIM. 105080301111045



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2015

**IDENTIFIKASI *CRUDE* DAN ISOLASI KLOOROFIL *a* DARI RUMPUT LAUT
HIJAU (*Caulerpa racemosa*) DENGAN PENGUJIAN SPEKTROSKOPI FTIR**

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

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

**Oleh:
REDITA SARI WALUYO
NIM. 105080301111045**



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

IDENTIFIKASI *CRUDE* DAN ISOLASI KLOOROFIL *a* DARI RUMPUT LAUT
HIJAU (*Caulerpa racemosa*) DENGAN PENGUJIAN SPEKTROSKOPI FTIR

Oleh:
REDITA SARI WALUYO
NIM. 105080301111045

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 4 Desember 2014
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Penguji I

Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS
NIP. 19640726 198903 2 004
Tanggal:

Dosen Penguji II

Dr. Ir. Bambang Budi S, MS
NIP. 19570119 198601 1 001
Tanggal:

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

Dr. Ir. Kartini Zaelani, MS
NIP . 19550503 198503 2 001
Tanggal:

Dosen Pembimbing II

Eko Waluyo S.Pi M.Sc
NIP. 19800424 200501 1 001
Tanggal:

Mengetahui,
Ketua Jurusan

(Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS)
NIP : 19620805 198603 3 001

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 tertulis 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 dengan hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, 10 Oktober 2014
Mahasiswa,

Redita Sari Waluyo
105080301111045

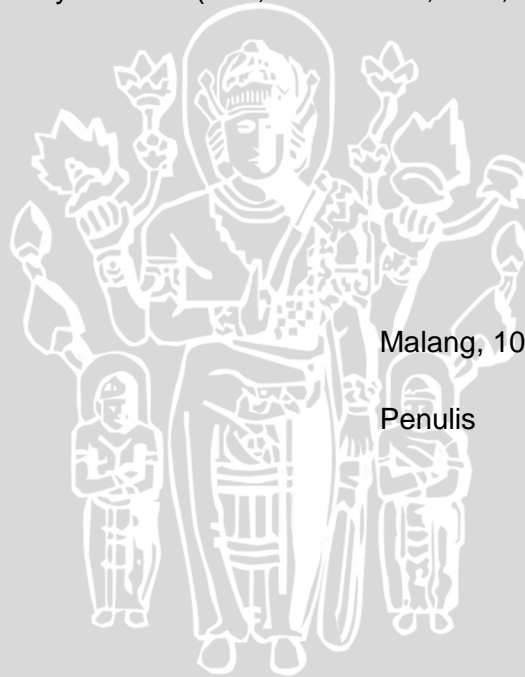


UCAPAN TERIMA KASIH

Dalam penyusunan laporan ini tidak lepas dari dukungan dan kerjasama dari pihak yang berkaitan. Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada:

1. Kepada Allah SWT yang telah memberikan segala nikmat–Nya sehingga diberikan kelancaran dan kemudahan dalam menyelesaikan laporan skripsi ini
2. Ibu Dr. Ir. Kartini Zaelani MS selaku pembimbing 1 atas bimbingan, pengarahan, serta memebantu kelancaran dalam penelitian dan penulisan laporan.
3. Bapak Eko Waluyo S.Pi M.Sc selaku pembimbing 2 atas bimbingan dan pengarahan dalam penyusunan laporan skripsi
4. Ibu Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS selaku dosen penguji 1 dan Bapak Dr. Ir. Bambang Budi Sasmito, MS selaku dosen penguji 2 atas bimbingan dan pengarahan dalam penyusunan laporan skripsi
5. Bpak Ir. Norman Waluyo dan Ibu Sri Susilowati selaku orang tua, Kartika Sari Waluyo selaku kakak, Pramitha Sari Waluyo selaku adik, Namira Sari Waluyo selaku adik, Hanifa Sari Waluyo Selaku adik, dan Tante Zaenab Djafar Badjuber yang telah banyak memberikan doa, semangat, motivasi, biaya dan masih banyak lagi dalam pengerjaan laporan skrispsi
6. Hegar Prastya yang sudah banyak memberikan doa, semangat, motivasi, menemani dan masih banyak lainnya dalam mengerjakan laporan skripsi
7. Teman – teman Fishtech 2010 yang sudah menemani selama 4 tahun di Malang yang tidak dapat disebutkan oleh penulis satu persatu.

8. Teman – teman dari tim penelitian pigmen (Fahrizal, Wawan, Choirul anam, Hosnatus dan M.rizal) yang sudah menemani dan membantu kelancaran penelitian
9. Vinnya Indri Pratiwi selaku sahabat yang selama 4thn sudah menemani dikala senang dan susah.
10. Teman – teman “Perjuangan” (Mira, Ambar, Hesti dan desty) terima kasih buat persahabatan kita.
11. Teman – teman “Keluarga kedua” (Ardy, Iqbal, Prisma, M.rizal, Sabik, Dwi, Teguh, dll)
12. Teman – teman “Griyashanta” (Ana, Mbak raras, anin, erika) terima kasih atas semuanya.



Malang, 10 Oktober 2014

Penulis

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmannirrahim

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala karunia-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan laporan skripsi ini. Skripsi yang disusun ini berjudul **“IDENTIFIKASI *CRUDE* DAN ISOLASI KLOROFIL a DARI RUMPUT LAUT HIJAU (*Caulerpa racemosa*) DENGAN PENGUJIAN SPEKTROSKOPI FTIR**”. Skripsi ini merupakan salah satu syarat dalam memperoleh gelar sarjana pada Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini yang ditulis ini tidak lepas dari kekurangan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang sifatnya membangun dalam penyempurnaan skripsi ini sangat penulis harapkan. Penulis berharap semoga tulisan ini dapat bermanfaat bagi pembaca, pihak yang membutuhkan.

Malang, 10 Oktober 2014

Redita Sari Waluyo
NIM. 105080301111045

RINGKASAN

Redita Sari Waluyo. Laporan Skripsi dengan judul Identifikasi *Crude* dan Isolasi Klorofil *a* dari Rumput Laut Hijau (*Caulerpa racemosa*) dengan Pengujian Spektroskopi FTIR (dibawah bimbingan **Dr. Ir. Kartini Zaelanie, MS** dan **Eko Waluyo, S.Pi, M.Sc**)

Klorofil *a* merupakan pigmen utama yang terdapat pada hampir semua organism fotosintetik, terletak pada pusat reaksi dan bagian tengah antena. Keberadaan klorofil *a* pada rumput laut dilengkapi dengan pigmen pendukung (aksesori) yaitu klorofil *b*, *c*, atau *d* dan karotenoid yang berfungsi melindungi klorofil *a* dari foto-oksidasi, Klorofil tidak hanya penting bagi pertumbuhan rumput laut. Klorofil yang dihasilkan rumput laut berpotensi memiliki bioaktifitas sebagaimana klorofil yang diperoleh dari tanaman. sistem imunitas, detoksifikasi, meredakan radang (inflamatorik) dan menyeimbangkan sistem hormonal. Spektrofotometer FTIR ini digunakan untuk mengetahui untuk pengujian kuantitatif beberapa komponen pada campuran yang tidak diketahui. Spektrofotometer FTIR dapat digunakan untuk analisa sampel yang berupa padatan, cairan dan gas. Spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infrared*) merupakan spektroskopi inframerah yang dilengkapi dengan transformasi Fourier untuk deteksi dan analisis hasil spektrumnya.

Untuk penelitian ini menggunakan prosedur sebagai berikut (1) Ekstraksi dengan menggunakan bahan kimia methanol (CH_3OH) dan aseton (CH_3COCH_3) dan penambahan CaCO_3 (2) Partisi tujuannya yaitu untuk memisahkan antara fase atas dan fase bawah dari hasil maserasi. (3) Isolasi Klorofil *a* dilakukan dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam *silica gel* dan fase gerak menggunakan heksan (C_6H_{14}) : etil asetat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$). (4) Kromatografi lapis tipis (KLT) Penelitian ini menggunakan fase diam *silica gel* F-254 dan fase gerak heksan : aseton dengan perbandingan (7:3 v/v). membuat garis pada pelat dengan menggunakan pensil pada kedua ujung pelat. Bagian bawah pelat berukuran 1 cm yang bertujuan untuk menunjukkan posisi awal fraksi ketika ditolkan, sedangkan bagian atas pelat berukuran 0,5 cm sebagai batas yang ditempuh pelarut. (5) Spektrofotometri UV-Vis Spektrofotometer ini digunakan untuk mengetahui panjang gelombang dan absorbansi klorofil *a* dengan aseton PA 100% hingga pengenceran 10^3 dan larutan pigmen dituang ke dalam kuvet ± 3 ml. Selanjutnya spektrofotometer dinyalakan dan panjang gelombang diatur pada kisaran 350 – 700 nm, lalu kuvet dimasukkan ke dalam instrumen spektrofotometer UV-Vis 1700 merk Shimadzu dan dilakukan pengujian (6) Spektrofotometer FTIR ini digunakan untuk mengetahui gugus fungsi *crude* klorofil dan klorofil murni. Analisis gugus fungsi suatu sampel dilakukan dengan membandingkan pita absorpsi yang terbentuk pada spektrum inframerah menggunakan tabel korelasi dan menggunakan spektrum senyawa pembanding (yang sudah diketahui).

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2014 sampai Mei 2014 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Kimia Fakultas MIPA (Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam) Universitas Brawijaya Malang serta Laboratorium Kimia Fakultas MIPA (Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam) Universitas Negeri Malang.

Kegunaan dari penelitian ini adalah dapat memberikan informasi kepada pihak-pihak yang berkepentingan tentang kandungan klorofil yang terdapat pada spesies rumput laut hijau khususnya *Caulerpa racemosa* yang berasal dari perairan Sumenep, Madura sehingga dapat untuk dimanfaatkan lebih lanjut. serta tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui berapakah kandungan klorofil *a* dan hasil penggunaan FTIR dalam memperkuat adanya klorofil pada *Caulerpa racemosa*.

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah metode eksploratif untuk mengidentifikasi gugus fungsi *crude* klorofil dan klorofil murni dalam alga hijau (*Caulerpa racemosa*) dengan pengujian Spektroskopi FT-IR. Penelitian eksploratif bersifat menjelajah, artinya penelitian yang dilakukan apabila pengetahuan tentang gejala yang diteliti masih sangat kurang atau tidak ada sama sekali. Penelitian eksploratif

seringkali berupa studi kasus dari suatu kelompok atau golongan tertentu, yang masih kurang diketahui orang.

Hasil identifikasi klorofil a pada crude yang diuji dengan KLT diperoleh Rf yaitu 0,38 dengan pola spektra pada pelarut aseton adalah 340 nm serta dari hasil uji spektroskopi FT-IR diperoleh bahwa klorofil a dari crude mengandung gugus fungsi C-H (alkana), gugus C-H (alkena), gugus C-H (cincin aromatik), C-O (eter), C-N (amina), OH (karboksil), C-O (aldehid). Hasil identifikasi klorofil a pada isolasi yang diuji dengan KLT diperoleh Rf yaitu 0,41 dengan pola spektra pada pelarut aseton adalah 340,8 nm serta dari hasil uji spektroskopi FT-IR diperoleh bahwa klorofil a dari hasil isolasi mengandung gugus fungsi C-H (alkana), N-H (amina), C-O (alcohol), C-N (amina). Hasil uji identifikasi menggunakan KLT dengan range 0,38 – 0,42 dinyatakan bahwa klorofil yang didapat adalah klorofil murni. Perlu diadakan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan FT-IR mengenai identifikasi gugus fungsi pigmen klorofil murni pada jenis alga yang lain.



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
LEMBAR UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
KATA PENGANTAR	vi
RINGKASAN.....	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
1. PENDAHULUAN	
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.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Alga Hijau	5
2.2 <i>Caulerpa racemosa</i>	5
2.3 Komposisi Kimia Alga Hijau	7
2.4 Klorofil Pada Algae	7
2.5 Manfaat Klorofil	9
2.6 Ekstraksi	10
2.7 Fraksinasi (partisi)	12
2.8 Pelarut	12
2.8.1 Metanol	13
2.8.2 Aseton	15
2.8.3 Dietil Eter	15
2.8.4 Etil asetat	16
2.8.5 N- Heksan	17
2.9 Kromatografi Kolom	17
2.10 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	19
2.11 Spektrometer UV- Vis	20
2.12 Spektrometer <i>Fourier Transform Infra Red</i> (FTIR)	22
3. METODE PENELITIAN	
3.1. Materi Penelitian	24
3.1.1 Bahan Penelitian.....	24
3.1.2 Alat Penelitian	24
3.2 Metode Penelitian	24
3.3 Prosedur Penelitian.....	26
3.3.1 Persiapan Sampel.....	26
3.3.2 Ekstraksi Klorofil	27
3.3.3 Partisi Alga Hijau	28
3.3.4 Isolasi Klorofil	30
3.3.5 Identifikasi Kandungan Klorofil	32
3.3.5.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	32

3.3.5.2 Spektrometri UV-Vis	34
3.3.5.3 Spektrometer <i>Fourier Transform Infrared</i> (FTIR)	35

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

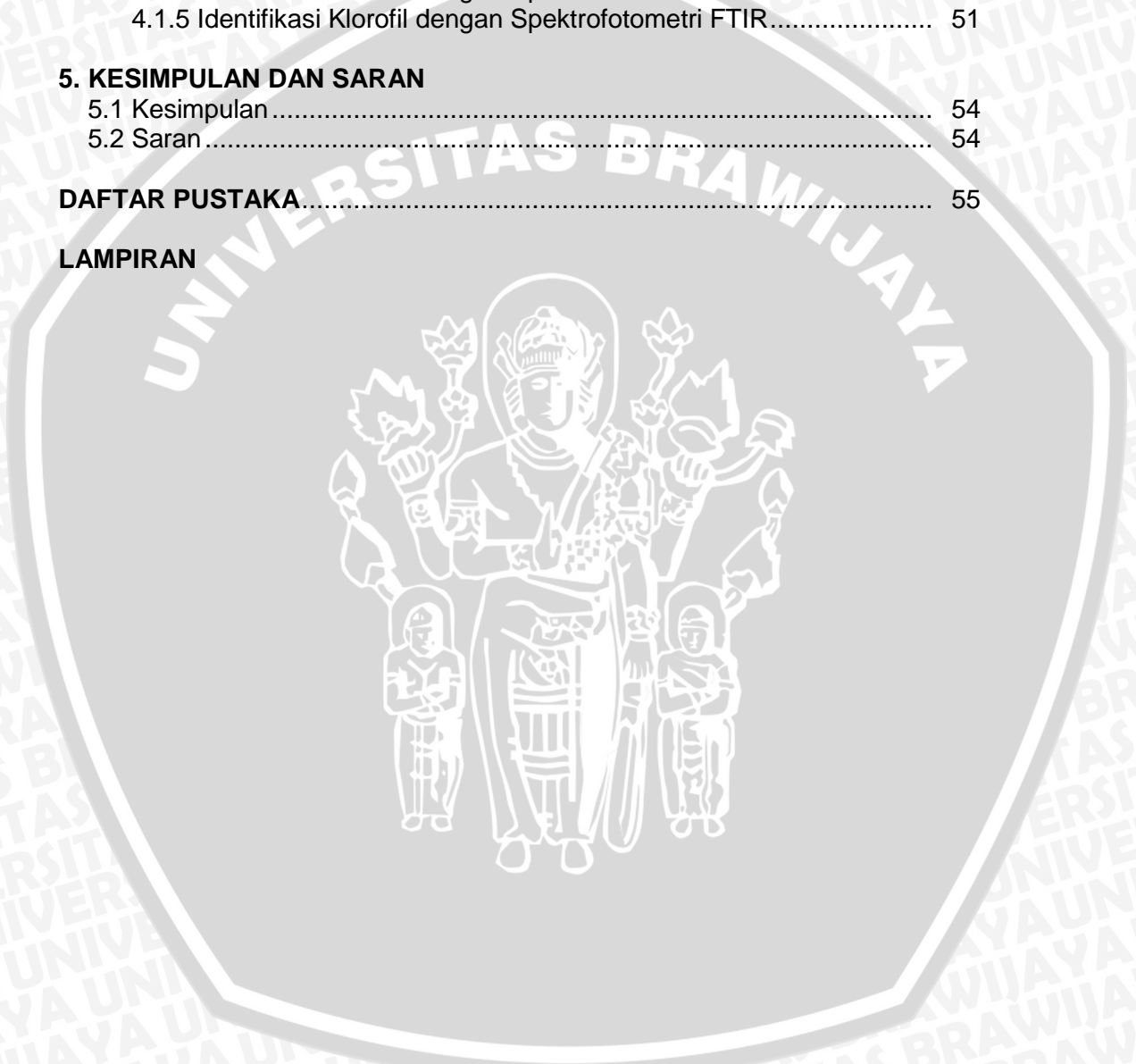
4.1 Hasil Penelitian	43
4.2 Pembahasan	44
4.1.1 <i>Crude</i> Alga Hijau	44
4.1.2 Isolasi Klorofil dengan Kromatografi Kolom	44
4.1.3 Identifikasi Klorofil dengan KLT	47
4.1.4 Identifikasi Klorofil dengan Spektrofotometri UV-1601	49
4.1.5 Identifikasi Klorofil dengan Spektrofotometri FTIR	51

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan	54
5.2 Saran	54

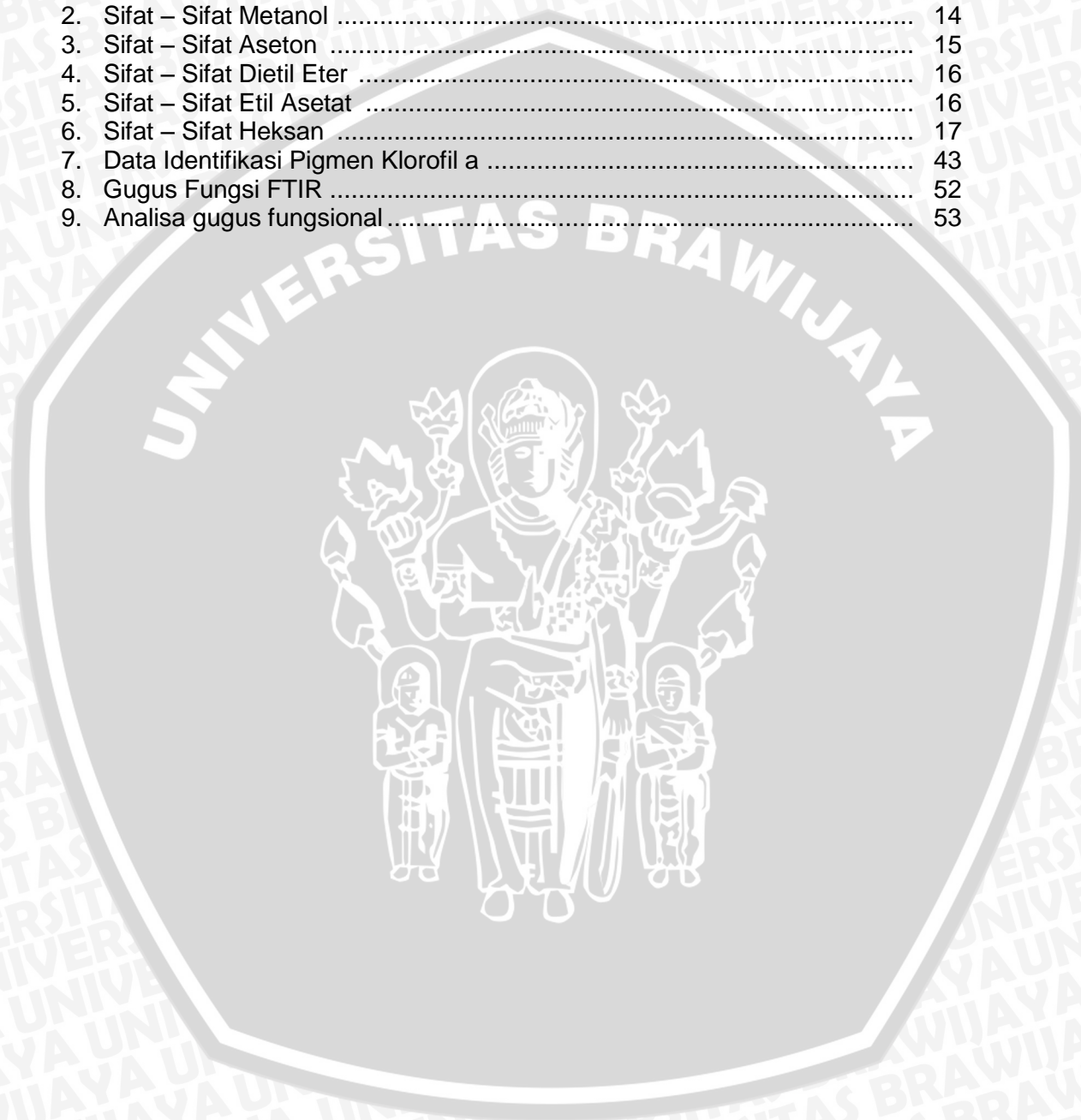
DAFTAR PUSTAKA	55
-----------------------------	----

LAMPIRAN



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Sifat – sifat Pelarut Umum	14
2. Sifat – Sifat Metanol	14
3. Sifat – Sifat Aseton	15
4. Sifat – Sifat Dietil Eter	16
5. Sifat – Sifat Etil Asetat	16
6. Sifat – Sifat Heksan	17
7. Data Identifikasi Pigmen Klorofil a	43
8. Gugus Fungsi FTIR	52
9. Analisa gugus fungsional	53



DAFTAR GAMBAR

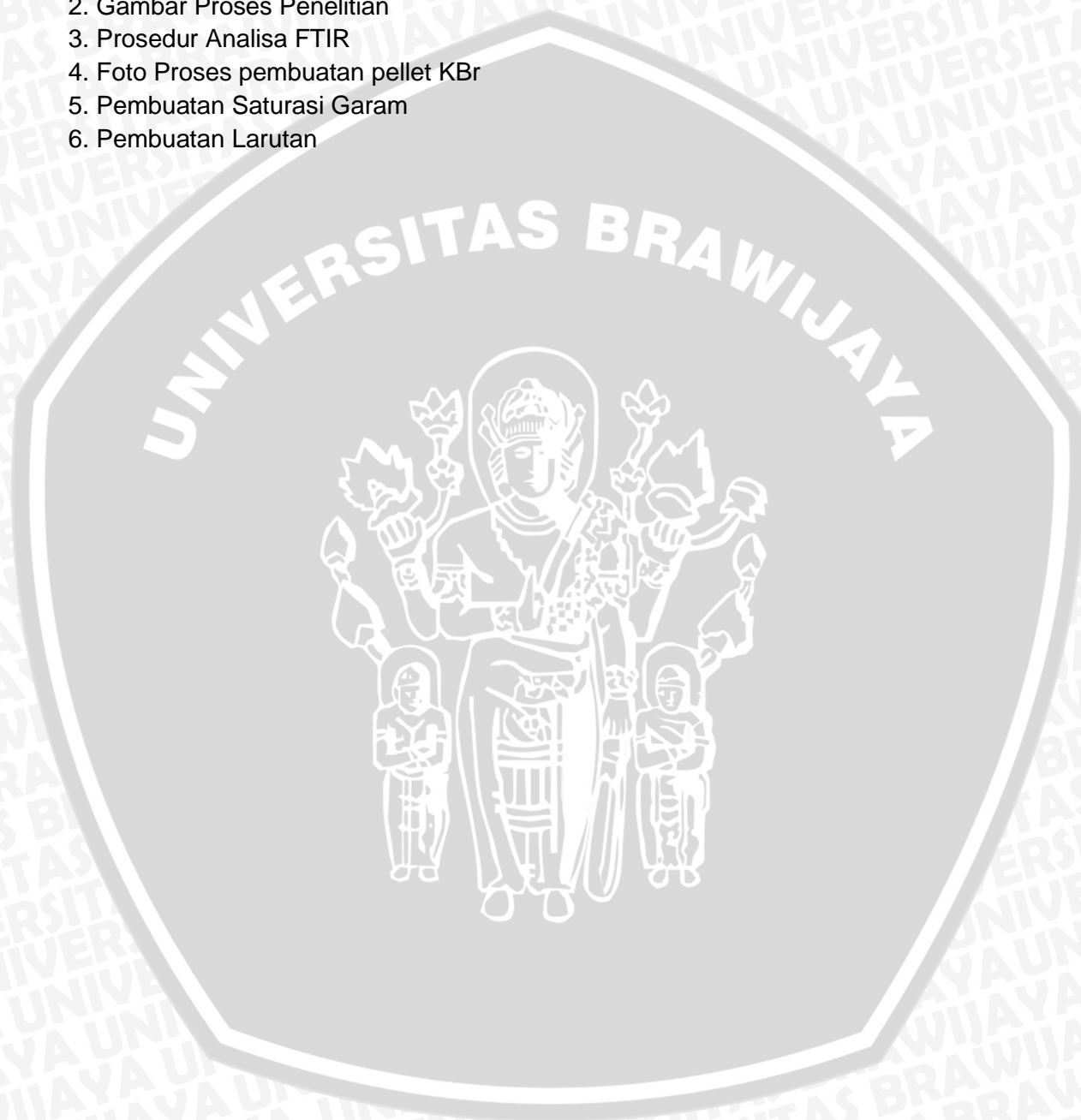
Gambar	Halaman
1. <i>Caulerpa racemosa</i>	6
2. Struktur Klorofil a dan b	9
3. Proses Kromatografi Kolom	18
4. Metode Kromatografi Lapis Tipis.....	20
5. Spektrofotometer UV-VIS	21
6. Spektrofotometer FTIR	23
7. Proses Ekstraksi dan Fraksinasi Alga Hijau	28
8. Proses Isolasi Klorofil Kromatografi Kolom	30
9. Proses Kromatografi Lapis Tipis	32
10. Prosedur Analisa dengan Spektrofotometer UV-1601	34
11. Prosedur Analisa dengan Spektrofotometer FTIR	35
12. Hasil <i>Crude</i> Klorofil	44
13. Hasil Kromatografi Kolom	47
14. Hasil KLT Pigmen Klorofil	48
15. Hasil Pola Spektra	50
16. Spektra IR <i>Crude</i> dan Isolasi Klorofil a	51



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

1. Prosedur Penelitian
2. Gambar Proses Penelitian
3. Prosedur Analisa FTIR
4. Foto Proses pembuatan pellet KBr
5. Pembuatan Saturasi Garam
6. Pembuatan Larutan



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rumput laut (*seaweed*) yang dikenal sebagai *Algae*, sangat populer dalam dunia perdagangan akhir-akhir ini. Rumput laut dikenal pertama kali oleh bangsa Cina kira-kira tahun 2700 SM. Pada saat itu rumput laut banyak digunakan untuk sayuran dan obat-obatan. Pada tahun 65 SM, bangsa romawi memanfaatkannya sebagai bahan baku kosmetik. Namun dengan perkembangan waktu, pengetahuan tentang rumput laut pun semakin berkembang (Alamsjah *et al.*, 2010).

Makroalga atau rumput laut merupakan salah satu sumberdaya laut yang sangat potensial khususnya di Indonesia. Terdapat sekitar 18.000 jenis rumput laut di seluruh dunia dan 25 jenis diantaranya memiliki nilai ekonomi tinggi. Indonesia terdapat 555 jenis rumput laut dan empat jenis diantaranya dikenal sebagai komoditas ekspor, yaitu *Euchema* sp., *Gracilaria* sp., *Gelidium* sp. dan *Sargasum* sp. Rumput laut juga sering disebut sebagai alga atau ganggang pada daerah tertentu di Indonesia (Atmadja *et al.*, 1996). Sedangkan menurut Junaedi (2004) bahwa rumput laut atau yang biasa disebut dengan *seaweed* merupakan tanaman makroalga yang hidup di laut yang tidak memiliki akar, batang dan daun sejati dan pada umumnya hidup di dasar perairan.

Fungsi dari akar, batang dan daun yang tidak dimiliki oleh rumput laut tersebut digantikan dengan thallus. Karena tidak memiliki akar, batang dan daun seperti umumnya pada tanaman, maka rumput laut digolongkan ke dalam tumbuhan tingkat rendah (*Thallophyta*). Rumput laut disebut

tanaman karena memiliki klorofil (zat hijau daun) sehingga bisa berfotosintesis. Klorofil atau pigmen utama tumbuhan banyak dimanfaatkan sebagai *food supplement* yang dimanfaatkan untuk membantu mengoptimalkan fungsi metabolik, sistem imunitas, detoksifikasi, meredakan radang (inflamatorik) dan menyeimbangkan sistem hormonal (Limantara, 2007 dalam Setiari dan Yulita, 2009).

Rumput laut banyak dimanfaatkan sebagai bahan pangan dan obat-obatan karena tumbuhan ini mempunyai berbagai komponen yang dapat menunjang kesehatan tubuh. Rumput laut merupakan sumber gizi karena secara umum tumbuhan ini mempunyai kandungan utama berupa karbohidrat (gula atau vegetable gum), protein, sedikit lemak dan abu yang sebagian besar merupakan senyawa garam natrium dan kalium. Beberapa jenis juga dilaporkan mengandung vitamin (A, B dan C) serta mineral (kalium, kalsium, fosfor, natrium, zat besi dan iodium). Rumput laut juga mengandung berbagai senyawa bioaktif. Sekitar 500 produk alami yang berasal dari rumput laut telah berhasil diidentifikasi, dan prosentase terbesar merupakan senyawa bioaktif yang berupa hasil metabolit sekunder (Yunizal, 2004 dalam Merdekawati *et al.*, 2010).

Spektrofotometer FTIR ini digunakan untuk mengetahui untuk pengujian kuantitatif beberapa komponen pada campuran yang tidak diketahui. Spektrofotometer FTIR dapat digunakan untuk analisa sampel yang berupa padatan, cairan, dan gas. Spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infrared*) merupakan spektroskopi inframerah yang dilengkapi dengan transformasi Fourier untuk deteksi dan analisis hasil spektrumnya.

Intispektroskopi FTIR adalah interferometer Michelson yaitu alat untuk menganalisis frekuensi dalam sinyal gabungan. Spektrum inframerah tersebut dihasilkan dari penransmisian cahaya yang melewati sampel, pengukuran intensitas cahaya dengan detector dan dibandingkan dengan intensitas tanpa sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrum inframerah yang diperoleh kemudian diplot sebagai intensitas fungsi energi, panjang gelombang (μm) atau bilangan gelombang (cm^{-1}) (Anam, *et al.*, 2007).

Sejauh ini belum banyak penelitian kandungan klorofil *a* pada rumput laut hijau *Caulerpa racemosa* yang melakukan pengujian dengan penguatan FTIR. FTIR adalah tipe Intispektroskopi FTIR adalah interferometer Michelson yaitu alat untuk menganalisis frekuensi dalam sinyal gabungan. FTIR digunakan untuk mengetahui untuk pengujian kuantitatif beberapa komponen pada campuran yang tidak diketahui (Kupiec, 2004). Penggunaan FTIR mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan metode konvensional lainnya seperti cepat, daya hisap baik, peka, detektor unik. (Johnson dan Robert, 1991).

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah pada penelitian ini adalah :

1. Mengetahui perbedaan kandungan *crude* dan isolasi klorofil *a* pada *Caulerpa racemosa*?
2. Apakah penggunaan FTIR dapat memperkuat adanya klorofil *a* pada *Caulerpa racemosa*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan kandungan *crude* dan isolasi klorofil *a* serta hasil penggunaan FTIR dalam memperkuat adanya klorofil pada *Caulerpa racemosa*.

1.4 Kegunaan penelitian

Kegunaan dari penelitian ini adalah dapat memberikan informasi kepada pihak-pihak yang berkepentingan tentang kandungan klorofil yang terdapat pada *crude* dan isolasi pada *Caulerpa racemosa* yang berasal dari perairan Sumenep, Madura sehingga dapat untuk dimanfaatkan lebih lanjut.

1.5 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2014 sampai Mei 2014 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Kimia Fakultas MIPA (Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam) Universitas Brawijaya Malang serta Laboratorium Kimia Fakultas MIPA (Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam) Universitas Negeri Malang.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga Hijau

Alga hijau / Chlorophyta adalah salah satu kelas dari ganggang berdasarkan zat warna atau pigmentasinya. Alga hijau ada yang bersel tunggal dan ada pula yang bersel banyak berupa benang, lembaran atau membentuk koloni spesies ganggang hijau yang bersel tunggal ada yang dapat berpindah tempat, tetapi ada pula yang menetap. Alga hijau merupakan kelompok terbesar dari vegetasi algae. Algae hijau berbeda dengan divisi lainnya karena memiliki warna hijau yang jelas seperti tumbuhan tingkat tinggi karena mengandung pigmen klorofil a dan klorofil b lebih dominan dibandingkan karoten dan xantofit. (Hamid, 2009).

Rumput laut hijau secara umum mengandung senyawa klorofil a dan b serta senyawa karoten yang dapat berfungsi sebagai antioksidan (Tamat, *et al.*, 2007). Ditambahkan oleh Bachtiar (2007) bahwa hanya kira-kira 10% dari 7000 spesies alga hijau (Divisi *Chlorophyta*) ditemukan dilaut, selebihnya di air tawar. Dikenali dengan warna hijau rumput yang dihasilkan adanya klorofil a dan b yang lebih dominan dibanding pigmen lain. Pigmen-pigmen terdapat dalam plastid dan sangat tahan terhadap cahaya panas. Dinding sel lapisan luar terbentuk dari bahan pektin sedangkan lapisan dalam dari selulosa. Contohnya : *Enteromorpha*, *Caulerpa*, *Halimeda* dan *Spirulin*.

2.2 *Caulerpa racemosa*

Caulerpa banyak dijumpai pada tempat yang terlindungi dengan air yang jernih, aliran tidak terlalu kuat arusnya dan bagian dasar halus

karena adanya sedimentasi. *Caulerpa racemosa* tumbuh pada bagian tengah sampai bagian bawah zona neritik dengan substrat lumpur atau pasir. Tetapi ditemui juga tumbuh soliter pada batuan mati. *Caulerpa racemosa* ditemukan pada 20-30 m kedalamannya. Warna talus dari *Caulerpa* adalah hijau seperti hijau daun, oleh karena itu dikelompokkan kedalam alga hijau (*Chlorophyceae*). Hal ini karena di dalam sel *Caulerpa* terdapat plastida yang mengandung pigmen klorofil a dan b seperti pada warna hijau daun tumbuhan tingkat tinggi. Ciri secara umum dari *Caulerpa* adalah keseluruhan tubuhnya terdiri dari satu sel dengan bagian bawah yang menjalar menyerupai stolon yang mempunyai rhizoid sebagai alat pelekak pada substrat serta bagian yang tegak. Bagian yang tegak disebut asimilator karena mempunyai klorofil. Stolon dan rhizoid bentuknya hampir sama dari jenis ke jenis. Asimilator pada *Caulerpa racemosa* berbentuk silindris dengan memiliki bulatan-bulatan ujung merata dan bertangkai panjang (Saptasari, 2010).

Menurut Hegazi *et al* (1998) bahwa dalam *Caulerpa prolifera* (chlorophyta), terdeteksi 18 pigmen fotosintesis diantaranya klorofil a, siphonein, neoxanthin, menyerupai neoxanthin, violaxanthin, microxanthin, micronone, menyerupai micronone, lutein-5,6-epoxide, siphonoxanthin, lutein, klorofil b, klorofil a, α -carotene, β -carotene, dan phaeophitin a. Siphonoxanthin merupakan tipe karoten yang paling tampak pada *Caulerpa*. Klorofil a dan b merupakan pigmen yang paling umum dipelajari di alga hijau dan merupakan fakta yang paling merespon memberikan warna hijau pada grup alga ini.

Klasifikasi dari *Caulerpa racemosa* menurut Guiry (2012) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Viridaeplantae
Phylum : Chlorophyta
Class : Bryopsidophyceae
Order : Bryopsidales
Family : Caulerpaceae
Genus : Caulerpa
Species : *Caulerpa racemosa*



Gambar 1: *Caulerpa racemosa*
Sumber: Dokumentasi Penelitian

Spesies *Caulerpa* memiliki *uniauxal thalus* yang biasanya dibagi menjadi *creeping axis* (stolon) dengan rhizoid dan *erect shoot* (fronds) salah satunya seperti nude, seperti daun atau anggur. *Caulerpa Racemosa* memiliki *trabeculate* yang tumbuh di luar dinding sel berfungsi sebagai *buttsress*. Fronds menempel sedikit di atas stolon yang berhubungan dengan substrat melalui rhizoid yang pendek (Klein and Vertaque, 2008).

Pada kawasan timur Indonesia, *Caulerpa racemosa* dimanfaatkan sebagai bahan makanan. Kelompok makroalga *Caulerpa* meskipun demikian belum pernah dibudidayakan untuk keperluan komersial. Padahal *Caulerpa* dilaporkan mengandung bahan yang bersifat bioaktif seperti caulerpin, asam palmitat, β -sisterol dan triterpen teraxerol (Saptasari, 2010).

2.3 Komposisi Kimia Alga Hijau

Menurut Manivannan *et al.*, (2009), beberapa rumput laut hijau memiliki kandungan protein sebesar 13-30%, kabohidrat 14-18% dan lemak sebesar 0,3-1,5%. Sedangkan menurut Kumar *et al.*, (2010),

rumput laut hijau *Caulerpa Recemosa* memiliki kandungan karbohidrat sebesar 40-45%, asam amino 16%, protein 20%, lemak 10% dan fenol 10-20%. Dere *et al.*, (2003) menyatakan kandungan tertinggi klorofil a, klorofil b dan karotenoid adalah $0,79\pm 0,57$ mg/g, $0,57\pm 0,43$ mg/g dan $0,18\pm 0,17$ mg/g yang diketahui pada alga hijau (*Enteromorpha linza*) di permukaan laut Karacaali.

2.4 Klorofil pada Algae

Klorofil merupakan pigmen yang berasal dari organisme fotosintes, termasuk tumbuhan, alga, dan beberapa bakteri. Organisme-organisme ini memproduksi lebih dari 1×10^9 ton per tahun, 75 % diantaranya berasal dari lingkungan laut. Sehingga pigmen hijau ini berlimpah dan berada di alam manusia dan hewan sejak zaman dahulu (Delgado, F. dan Octavia, P., 2003).

Klorofil adalah molekul yang menyerap cahaya matahari dan menggunakannya untuk mensintesa karbohidrat dari CO₂ dan air. Proses ini diketahui sebagai fotosintesis dan merupakan dasar proses kehidupan pada semua tanaman (May, 2008). Kloroplas yang ada di dalam klorofil mengandung beberapa pigmen. Klorofil a menyerap cahaya biru-violet dan merah. Klorofil b menyerap cahaya biru dan oranye dan memantulkan cahaya kuning-hijau (Alamsjah, 2010). Menurut Lawlor (1993) dalam Alamsjah *et al.*, (2010), komponen utama penyusun klorofil adalah N dan Mg. N diperlukan sebagai bahan dasar penyusun protein dan pembentukan klorofil dalam fotosintesis. Mg berperan dalam

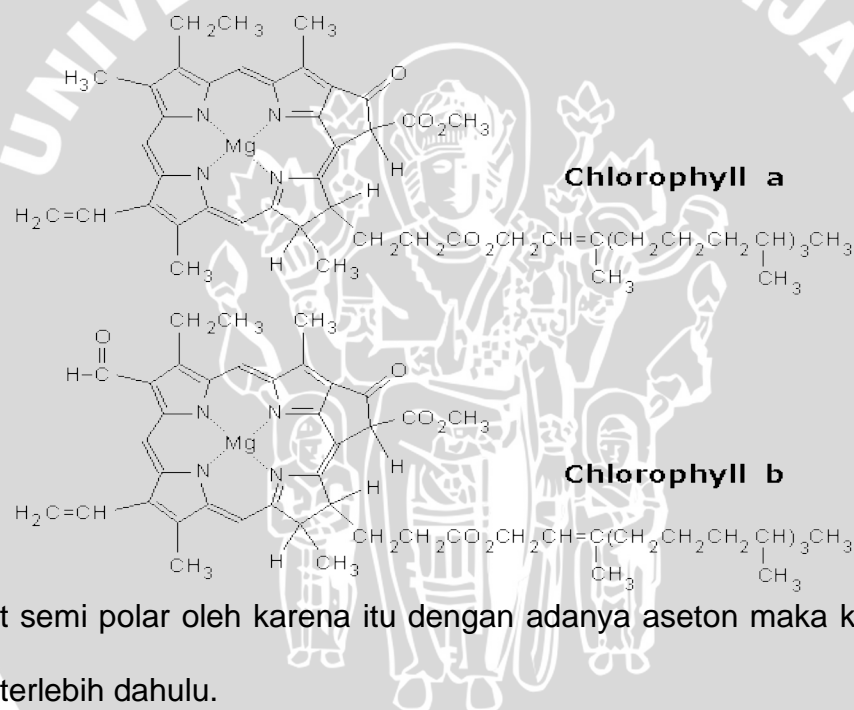
penangkapan cahaya dalam proses fotosintesis. Sifat fisik klorofil adalah menerima atau memantulkannya dalam gelombang yang berlainan. Klorofil banyak menyerap sinar dengan panjang gelombang antara 400-700 nm, terutama sinar merah dan biru.

Menurut Suyitno (2008). Sifat kimia klorofil antara lain :

- (1) Tidak larut dalam air, melainkan larut dalam pelarut organik yang lebih polar, seperti etanol dan kloroform.
- (2) Inti Mg akan tergeser oleh 2 atom H bila dalam suasana asam, sehingga membentuk suatu persenyawaan yang disebut *feofitin* yang berwarna *coklat*

Klorofil *a* merupakan pigmen utama yang terdapat pada hampir semua organisme fotosintetik, terletak pada pusat reaksi dan bagian tengah antena. Klorofil *a* merupakan pigmen utama yang bertanggung jawab terhadap proses fotosintesis. Oleh karena itu, pigmen ini menjadi penting bagi pertahanan hidup rumput laut atau untuk berkompetisi dengan organisme lain dalam sebuah habitat tertentu (Hegazi *et al.*, 1998). Keberadaan klorofil *a* pada rumput laut dilengkapi dengan pigmen pendukung (aksesori) yaitu klorofil *b*, *c*, atau *d* dan karotenoid yang berfungsi melindungi klorofil *a* dari foto-oksidasi (Atmadja *et al.*, 1996).

Perbedaan antara klorofil a dan b yaitu klorofil a berikatan dengan grup metil (-CH₃) sedangkan klorofil b berikatan dengan aldehyd (-CHO). Oleh sebab itu klorofil b sedikit lebih polar daripada klorofil a (Pavia *et al.*, 1999). Putnarubun dan Jane (2009) menyatakan, perbedaan dari klorofil a dan klorofil b adalah terletak pada gugus ketiganya. Pada gugus ketiga klorofil a terdapat gugus metal yang akan berikatan dengan selulosa. Jika pada waktu pemisahan ada aseton dan air maka klorofil a dan klorofil b terdapat gugus aldehyd dan metal berikatan dengan selulosa. Klorofil a



bersifat semi polar oleh karena itu dengan adanya aseton maka klorofil a keluar terlebih dahulu.

Gambar 2: Struktur Klorofil a dan b
Sumber: Google image, 2014

2.5 Manfaat Klorofil

Klorofil tidak hanya penting bagi pertumbuhan rumput laut. Klorofil yang dihasilkan rumput laut berpotensi memiliki bioaktivitas sebagaimana klorofil yang diperoleh dari tanaman. Sistem imunitas, detoksifikasi, meredakan radang

(inflamatorik) dan menyeimbangkan sistem hormonal (Limantara, 2007, dalam Setiari, N. dan Yulita N., 2009).

Selain berperan dalam fotosintesis, klorofil juga memberikan manfaat secara langsung bagi kesehatan manusia. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa klorofil mempunyai bioaktivitas tinggi diantaranya sebagai senyawa antikanker, antioksidan, katalisator pelepas radikal bebas, menghambat oksidasi lipid, fototoksin khususnya terhadap larva nyamuk, membersihkan darah kotor, meningkatkan imunitas, serta dapat bertindak sebagai fotosensitizer dalam terapi fotodinamika untuk penghancuran sel tumor dan kanker (Kusmita dan Limantara, 2009).

F. da Costa *et al.*, (2009) menyatakan bahwa selain berperan penting dalam lingkungan aslinya, klorofil memiliki manfaat penting bagi kehidupan manusia. Sifat biokimia dan fitokimia klorofil memberikan kontribusi yang besar terutama dalam bidang kesehatan dan pangan, antara lain penambah sel darah merah, antioksidan, antibakteria, meningkatkan imunitas, pengganti sel-sel yang rusak, pewarna, dan lain-lain, termasuk yang sekarang banyak diteliti sebagai fotosensitizer generasi baru dalam terapi fotodinamika terhadap tumor atau kanker.

2.6 Ekstraksi

Ekstaksi adalah prosedur klasik untuk memperoleh senyawa organik dari jaringan tumbuhan kering (galih, biji kering, akar, daun) dengan menggunakan pelarut secara berganti-ganti, mulai dengan eter, lalu eter minyak bumi, dan kloroform (untuk memisahkan lipid dan terpenoid). Kemudian digunakan alkohol dan etil asetat (untuk senyawa yang lebih polar). Tujuan ekstraksi bahan alam adalah untuk menarik komponen

kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai cara, tetapi umumnya menggunakan pelarut yang memiliki kepolaran yang sama dengan komponen targetnya. Pelarut polar hanya akan melarutkan solute yang polar dan pelarut nonpolar akan melarutkan solute nonpolar juga, atau disebut "*like dissolves like*" (Shrine *et al.*, 1980 dalam Widjayanti, 2009).

Wanto dan Romli (1997) menyatakan, proses ekstraksi adalah proses pengeluaran atau proses pemisahan suatu zat dari campuran zat dengan jalan menambahkan pelarut (*solvent*) tepat pada waktunya. Proses ekstraksi pada dasarnya dibedakan menjadi dua fase yaitu fase pencucian dan fase ekstraksi. Pada fase pencucian terjadi penyatuan cairan ekstraksi melalui rusaknya sel-sel zat yang diekstrak atau merusakkan dengan operasi penghalusan langsung kontak dengan bahan pelarut. Diharapkan komponen sel yang terdapat dalam sel lebih mudah diambil atau dicuci, sedangkan fase ekstraksi yaitu suatu peristiwa yang memungkinkan terjadinya pelintasan bahan pelarut ke dalam bagian dalam sel. Ditambahkan oleh Voight (1994), mengalirnya bahan pelarut ke dalam sel secara difusi akan menyebabkan protoplasma membengkak dan bahan kandungan sel akan terlarut sesuai dengan kelarutannya.

Menurut Lenny (2006). Maserasi adalah proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada suhu ruang. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dalam perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam sel dan di

luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan.

2.7 Fraksinasi (Partisi)

Istilah partisi atau fraksinasi (pemisahan) atau distribusi (penyebaran) sering dipakai untuk menggambarkan bagaimana suatu senyawa memisah diantara dua medium yang tak saling melarutkan. Fraksinasi adalah proses pemisahan suatu kuantitas tertentu dari campuran yang dibagi dalam beberapa jumlah kecil (fraksi), dimana komposisi perubahan sesuai dengan gradien tertentu (Sudarmadji, 1997).

Metode partisi pelarut biasanya menggunakan dua pelarut yang tidak campur didalam corong pisah. Pada metode ini komponen terdistribusi dalam dua pelarut berdasarkan perbedaan koefisien partisi. Metode partisi juga disebut penyarian cair, yaitu proses pemisahan di mana suatu zat terbagi dalam dua pelarut yang tidak bercampur (Sholihah, 2010). Menurut Harborne (1987), pemisahan jumlah dan jenisnya senyawa menjadi fraksi yang berbeda yang tergantung pada jenis tumbuhan. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan masuk ke pelarut polar, begitu pula senyawa yang bersifat non polar akan masuk ke pelarut non polar.

2.8 Pelarut

Pelarut adalah benda cair atau gas yang melarutkan benda padat, cair atau gas, yang menghasilkan sebuah larutan. Pelarut paling umum digunakan

dalam kehidupan sehari-hari adalah air. Pelarut lain yang juga umum digunakan adalah bahan kimia organik (mengandung karbon) yang juga disebut pelarut organik. Pelarut biasanya memiliki titik didih rendah dan lebih mudah menguap, meninggalkan substansi terlarut yang didapatkan. Untuk membedakan antara pelarut dengan zat yang dilarutkan, pelarut biasanya terdapat dalam jumlah yang lebih besar pelarut (*solvent*) pada umumnya adalah zat yang berada pada larutan dalam jumlah yang besar, sedangkan zat lainnya dianggap sebagai zat terlarut (*solute*) (Joshua (2010)).

Pelarut yang baik untuk ekstraksi adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi terhadap zat yang diekstraksi. Daya melarutkan yang tinggi tersebut berhubungan dengan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang diekstraksi. Terdapat kecenderungan kuat bagi senyawa polar larut ke dalam pelarut polar, dan bagi senyawa nonpolar larut dalam pelarut non polar. Penggunaan pelarut harus memiliki kepolaran sesuai dengan kepolaran senyawa yang akan diekstrak (Dewi, *et al.*, 2007).

Ditambahkan oleh Sastrohamidjojo (2001), pemilihan pertama dari pelarut ialah bagaimana sifat kelarutannya. Tetapi sering lebih baik untuk memilih suatu pelarut yang tak tergantung daripada kekuatan elusi sehingga zat - zat elusi yang lebih kuat dapat dicoba. Beberapa sifat-sifat umum bahan-bahan pelarut dapat dilihat pada Tabel 1.

2.8.1 Metanol

Metanol dikenal dengan nama metil alkohol atau alkohol kayu, merupakan senyawa kimia dengan rumus kimia CH_3OH . Metanol adalah alkohol yang paling sederhana, ringan, volatil, tidak berwarna, mudah

terbakar, cairan yang beracun dengan bau yang sangat tajam. Sifat-sifat metanol dapat dilihat pada Tabel 2.

Pada keadaan atmosfer metanol berbentuk cairan yang ringan, mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar dan beracun dengan bau yang khas (berbau lebih ringan dari etanol). Metanol memiliki titik didih 65°C dan larut sempurna dalam air pada suhu 20°C (Hart, 1983).

Tabel 1. Sifat-Sifat Pelarut Umum

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

Sumber : Wikipedia, 2014

Tabel 2. Sifat-sifat Metanol

No.	Karakteristik	Metanol
1.	Nama lain	Hidroksi metana, metil alkohol, metil hidrat, alkohol kayu dan karbinol

2.	Rumus molekul	CH ₃ OH $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$
3.	Sifat	mudah terbakar, tidak berwarna
4.	Titik leleh	-97 °C
5.	Titik didih	64.7 °C
6.	Massa molar	32.04 g/mol
7.	Densitas	0,7918 g/cm ³ , cair
8.	Titik nyala	11 °C
9.	Konstanta dielektrik	33

Sumber: Wikipedia 2014

2.8.2 Aseton

Aseton adalah senyawa berbentuk cairan yang tidak berwarna dan mudah terbakar. Aseton digunakan sebagai pelarut polar dalam kebanyakan reaksi organik. Oleh karena polaritas aseton yang menengah, ia melarutkan berbagai macam senyawa atau larut dalam berbagai perbandingan dengan air, etanol, dietil eter. Oleh karena polaritas aseton yang menengah, ia melarutkan berbagai macam senyawa (Wikipedia, 2014). Sifat-sifat aseton dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Sifat-sifat Aseton

No.	Karakteristik	Aseton
1.	Nama lain	β-ketopropana, dimetil keton, dimetilformaldehida, DMK
2.	Rumus Molekul	CH ₃ COCH ₃ Mudah terbakar, sangat volatil, tidak beresidu 58.1 -94.6 °C 56.1 – 56.5 °C
3.	Sifat	58,08 g/mol
4.	Berat molekul	larut dalam berbagai perbandingan dengan air, etanol,
5.	Titik leleh	dietil eter
6.	Titik didih	0,79 g/cm ³ , cair
7.	Massa molar	
8.	Kelarutan	

Sumber : Wikipedia, 2014

2.8.3 Dietil Eter

Dietil eter yang juga dikenal sebagai eter dan etoksi etana adalah cairan mudah terbakar yang jernih, tak berwarna, dan bertitik didih rendah serta berbau khas. Anggota paling umum dari kelompok campuran kimiawi yang secara umum dikenal sebagai eter ini merupakan sebuah isomernya butanol. Berformula $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$, dietil eter digunakan sebagai pelarut biasa dan telah digunakan sebagai anestesi umum. Eter dapat dilarutkan dengan menghemat di dalam air (6.9 g/100 mL) (Wikipedia, 2014). Sifat-sifat dietil eter dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Sifat-sifat Dietil Eter

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

Sumber : Wikipedia, 2014

2.8.4 Etil Asetat

Etil asetat adalah senyawa organik dengan rumus $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ Senyawa ini merupakan ester dari etanol dan asam asetat. Senyawa ini berwujud cairan tak berwarna, memiliki aroma khas. Etil asetat diproduksi dalam skala besar sebagai pelarut. Etil asetat adalah pelarut polar menengah yang volatil (mudah menguap), tidak beracun, dan tidak higroskopis. Etil asetat merupakan penerima ikatan hidrogen yang lemah, dan bukan suatu donor ikatan hidrogen karena tidak adanya proton yang bersifat asam (yaitu hidrogen yang terikat pada atom elektronegatif seperti fluor, oksigen, dan nitrogen. Etil asetat dapat melarutkan air hingga 3%, dan larut dalam air hingga kelarutan 8% pada suhu kamar.

Kelarutannya meningkat pada suhu yang lebih tinggi. Namun demikian, senyawa ini tidak stabil dalam air yang mengandung basa atau asam (Wikipedia, 2014).

Sifat-sifat etil asetat dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Sifat-sifat Etil Asetat

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

Sumber : Wikipedia, 2014

2.8.5 Heksan

Heksan adalah hidrokarbon dengan rumus kimia C_6H_{14} merupakan sebuah alkane dengan 6 atom karbon. Heksan memiliki isomer yang tidak bercabang yang disebut normal heksan (n-heksan). Heksan berupa cairan tidak berwarna pada suhu kamar, dengan titik didih antara 50 dan 70°C, dengan bau mirip bensin. Heksan banyak digunakan karena murah, relative aman, sebagian besar tidak reaktif dan mudah menguap (nonpolar pelarut) (Day dan Underwood,1999). Sifat – sifat heksan dapat dilihat pada Tabel 6 sebagai berikut.

Tabel 6. Sifat-sifat n-Heksan

No.	Karakteristik	Keterangan
1.	Nama IUPAC	Propanon Heksan
2.	Nama lain	n-Heksan
3.	Rumus molekul	C_6H_{14}
4.	Massa molar	86,18 g/mol ⁻¹
5.	Penampilan	Cair berwarna
6.	Densitas	0,6548 g/mL, cair
7.	Titik leleh	-95°C, -140°F (178 °K)
8.	Titik didih	69°C, 134°F (342°K)
9.	Kelarutan dalam air	13 mg/L pada 20°C
10.	Keasaman (p K_a)	24,2 -
11.	Titik nyala	-23,3° C
12.	Klasifikasi EU	Mudah terbakar (F)
13.	Angka TTECS	MN9275000

Sumber: Wikipedia, 2014

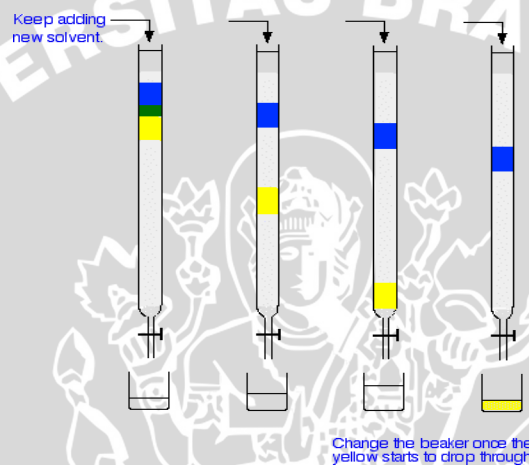
2.9 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan metode pemisahan yang terdiri atas kolom gelas dengan kran pada salah satu ujungnya diisi oleh fase diam berupa silica atau alumina. Ukuran diameter partikel fase diam berkisar 100 μm . Campuran yang akan dipisahkan dituangkan pada bagian atas kolom yang berisi fase diam. Begitu pula fase gerak berupa pelarut organik dialirkan dari bagian atas kolom. Jumlah komponen penyusun campuran dapat terlihat sebagai cincin-cincin berwarna sepanjang kolom gelas dan ditampung pada tempat yang berbeda. Metode pemisahan kromatografi kolom ini memerlukan bahan kimia yang banyak sebagai fase diam dan fase gerak, bergantung pada ukuran kolom gelas (Hendayana, 2006).

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

Beberapa sifat fase gerak yang digunakan dalam semua ragam kromatografi menurut Johnson dan Robert (1991) diantaranya:

- Murni, tanpa cemaran
- Tidak bereaksi dengan kemasam
- Sesuai dengan detektor
- Dapat melarutkan cuplikan
- Mempunyai viskositas rendah
- Memungkinkan memperoleh kembali cuplikan dengan mudah, jika diperlukan



Gambar 3. Proses Kromatografi Kolom
Sumber: Google image, 2014

2.10 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

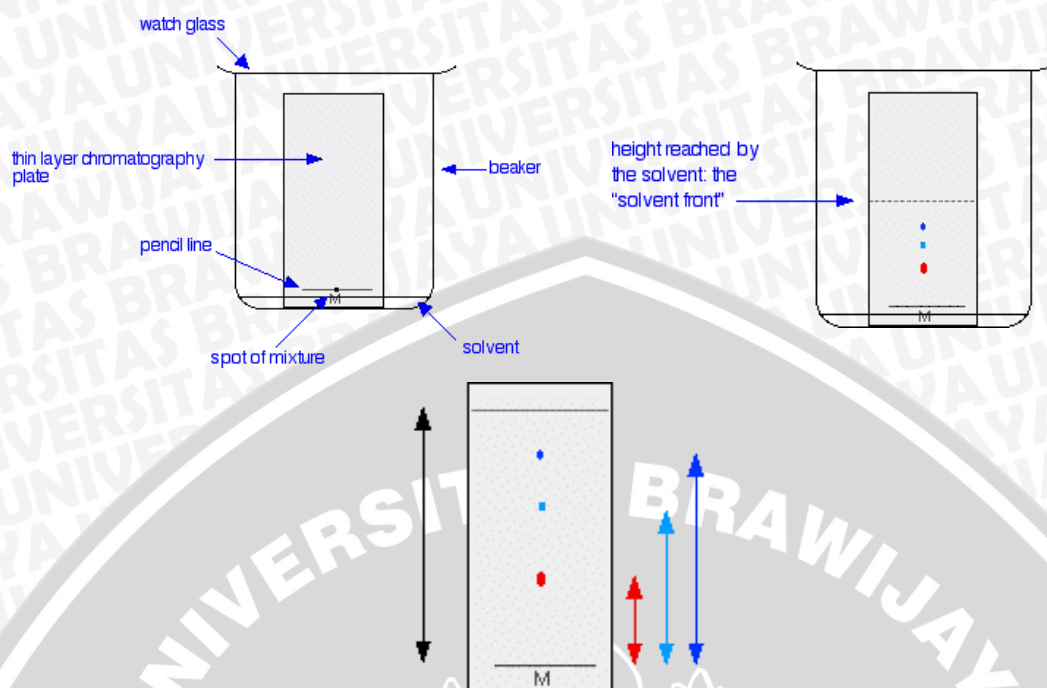
Identifikasi awal untuk mengetahui komponen pigmen adalah dengan menggunakan KLT. KLT merupakan salah satu contoh kromatografi serapan. Fase diam berbentuk lapis tipis yang melekat pada gelas kaca atau plastik, aluminium sedangkan fase gerak berupa campuran pelarut dengan perbandingan tertentu (Sastrohamidjojo, 2001). Selain dapat dimanfaatkan untuk metode pemisahan KLT juga dapat digunakan untuk mengetahui tingkat kemurnian senyawa hasil isolasi. Jika dari hasil eluen (dua arah) dan telah divariasikan jenis eluen diperoleh satu

noda maka dapat diperkirakan senyawa hasil isolasi dalam keadaan murni (Warsito, 2007).

Pengukuran jumlah perbedaan warna yang terbentuk dari campuran dilakukan berdasarkan pada jarak yang ditempuh oleh pelarut dan jarak yang ditempuh oleh bercak warna. Nilai R_f untuk setiap warna dapat dihitung dengan rumus :

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

Identifikasi secara visual dapat dilakukan dengan melihat warna total pada pelat KLT. Ketebalan warna total menunjukkan kuantitas pigmen sedangkan banyak noda menunjukkan jumlah pigmen minimal yang terdapat dalam ekstrak. Proses identifikasi pigmen dengan metode KLT dapat dilihat pada Gambar 4. Clark (2007) menyatakan bahwa rangkaian alat pada KLT terdiri dari pelat KLT yang telah ditotol ekstrak pada garis awal pelat, lalu pelat dimasukkan dalam *beakerglass* berisi sedikit pelarut kemudian ditutup dengan cawan petri. Pelarut akan merambat melalui pelat dan terbentuk pemisahan warna pada total tersebut. Setelah pelarut mencapai garis akhir pelat maka jarak total dapat nilai R_fnya.



Gambar 4. Metode kromatografi lapis tipis (Clark, 2007)

2.11 Spektrofotometer UV Vis

Spektrofotometer UV-Visible adalah alat yang umum digunakan di laboratorium kimia. Alat ini biasanya digunakan untuk analisa kimia kuantitatif, namun dapat juga digunakan untuk analisa kimia semi kualitatif. Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis didasarkan pada fenomena penyerapan sinar oleh spesi kimia atau gugus fungsi tertentu di daerah ultra lembayung (ultra violet) dan sinar tampak (visible) (Huda, 2001). Ditambahkan oleh Riyadi (2009), spektrofotometri menggunakan dua buah sumber cahaya berbeda, sumber cahaya UV dan sumber cahaya visible. Meskipun untuk alat yang lebih canggih sudah menggunakan hanya satu sumber sinar sebagai sumber UV dan Vis, yaitu photodiode yang dilengkapi dengan monokromator. Untuk sistem

spektrofotometri, UV-Vis paling banyak tersedia dan paling populer digunakan. Kemudahan metode ini adalah dapat digunakan baik untuk sample berwarna juga untuk sample tak berwarna. Spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 5.

Spektrofotometer sangat berhubungan dengan pengukuran jauhnya pengabsorbansian energi cahaya oleh suatu sistem kimia sebagai fungsi panjang gelombang dengan absorbansi maksimum dari suatu unsur atau senyawa. Spektrum absorbansi selain bergantung pada sifat dasar kimia, juga bergantung pada faktor-faktor lain. Perubahan pelarut sering menghasilkan pergeseran dari pita absorbansi. Larutan pembanding dalam spektrofotometri pada umumnya adalah pelarut murni atau suatu larutan blanko yang mengandung sedikit zat yang akan ditetapkan atau tidak sama sekali (Day dan Underwood, 2008).

Pergeseran panjang gelombang ke arah lebih pendek atau ke daerah merah (hipsokromik) maupun ke arah yang lebih panjang atau ke daerah merah (batokromik) menunjukkan terjadinya degradasi (Limantara, 2006). Ditambahkan Nurcahyanti dan Limantara (2007), penurunan absorbansi (pergeseran hypokromik) menunjukkan terjadinya pembentukan produk degradasi yang lebih kecil dari molekul awal sedangkan (pergeseran hyperkromik) adalah kenaikan absorbansi. Kenaikan absorbansi dapat disebabkan karena laju penguapan pelarut pada larutan fukusantin lebih



cepat dibandingkan dengan laju degradasinya.

Gambar 5. Spektrofotometer UV-Vis

(**Sumber:** Laboratorium Kimia Universitas Brawijaya)

2.12 Spektrofotometer *Fourier Transform Infra Red* (FTIR)

Spektrofotometri Infra Red atau Infra Merah merupakan suatu metode yang mengamati interaksi molekul dengan radiasi elektromagnetik yang berada pada daerah panjang gelombang 0,75 – 1.000 μm atau pada Bilangan Gelombang 13.000 – 10 cm^{-1} (Teguh, 2007). Pada dasarnya Spektrofotometer FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) adalah sama dengan Spektrofotometer IR dispersi, yang membedakannya adalah pengembangan pada sistim optiknya sebelum berkas sinar infra merah melewati contoh (Wikipedia, 2014).

Spektrofotometer FTIR ini digunakan untuk pengujian kuantitatif beberapa komponen pada campuran yang tidak diketahui. Dapat digunakan untuk analisa sampel yang berupa padatan, cairan dan gas. Spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infrared*) merupakan spektroskopi inframerah yang dilengkapi dengan transformasi Fourier untuk deteksi dan analisis hasil spektrumnya. Inti spektroskopi FTIR adalah interferometer Michelson yaitu alat untuk menganalisis frekuensi dalam sinyal gabungan. Spektrum inframerah tersebut dihasilkan dari pentransmisian cahaya yang melewati sampel, pengukuran intensitas cahaya dengan detektor dan dibandingkan dengan intensitas tanpa sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrum inframerah yang diperoleh kemudian diplot sebagai

intensitas fungsi energy, panjang gelombang (μm) atau bilangan gelombang (cm^{-1}) (Anam, *et al.*, 2007).

Secara keseluruhan, analisis menggunakan Spektrofotometer ini memiliki dua kelebihan utama dibandingkan metoda konvensional lainnya,



yaitu dapat digunakan pada semua frekuensi dari sumber cahaya secara simultan sehingga analisis dapat dilakukan lebih cepat daripada menggunakan cara sekuensial atau pemindaian dan sensitifitas dari metoda Spektrofotometri Fourier Transform Infra Red lebih besar daripada cara dispersi, sebab radiasi yang masuk ke sistem detektor lebih banyak karena tanpa harus melalui celah (Wikipedia, 2014). Gambar spektrofotometer FTIR dapat dilihat pada Gambar 6.

Gambar 6. Spektrofotometer FTIR
(Sumber: Laboratorium Kimia Universitas Negeri Malang)

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan adalah alga hijau *Caulerpa racemosa* yang diperoleh dari Desa Cabiye, Pulau Talango, Sumenep, Madura. Bahan kimia yang digunakan adalah metanol, aseton, dietil eter, n-heksan, etil asetat. Selain itu digunakan bahan lainnya yaitu air, garam grosok, kertas Watchman no. 1, kain saring, gas nitrogen, pasir laut (*seasand*), kapas, pelat KLT, *silica gel*, alumunium foil, *cling wrap*, tisu, dan kertas label.

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari peralatan untuk ekstraksi dan peralatan untuk analisa. Peralatan yang digunakan untuk ekstraksi antara lain timbangan digital, nampan, *rotary evaporator*, gunting, beaker glass (ukuran 1000 ml, 500 ml, dan 50 ml), erlenmeyer ukuran 1000 ml, gelas ukur 100 ml, corong, spatula, botol sampel, pipet volume 1 ml dan 10 ml, pipet tetes, dan bola hisap, corong pisah. Peralatan yang digunakan untuk analisa adalah microsyringe, statif, kolom kromatografi, tabung reaksi, rak tabung reaksi, spektrofotometer UV-Vis 1700 merk Shimadzu, pensil, penggaris, beaker glass 100 ml, pinset dan cawan petri, serta Fourier transform infra red (FTIR).

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif. Metode deskriptif bertujuan untuk membuat deskripsi, gambaran, atau lukisan secara sistematis, fluktuatif dan akurat mengenai fakta-fakta, sifat-sifat serta hubungan antarfenomena yang diselidiki (Nazir, 2003).

Suryabrata (1991), menyatakan penelitian deskriptif adalah penelitian yang bermaksud untuk membuat pencandraan (deskripsi) mengenai situasi-situasi atau kejadian-kejadian. Dalam arti ini penelitian deskriptif itu adalah akumulasi data dasar dalam cara deskriptif semata-mata tidak perlu mencari atau menerangkan saling hubungan, menguji hipotesis, membuat ramalan, atau mendapatkan makna dan implikasi, walaupun penelitian yang bertujuan untuk menemukan hal-hal tersebut dapat mencakup juga metode-metode deskriptif. Sedangkan tujuan penelitian deskriptif adalah untuk membuat pencandraan secara sistematis, fluktuatif, dan akurat mengenai fakta-fakta dan sifat-sifat populasi atau daerah tertentu. Ditambahkan oleh Singarimbun dan Sofian (1995) bahwa penelitian deskriptif merupakan penelitian pengembangan konsep dan menghimpun fakta, tetapi tidak melakukan pengujian hipotesa.

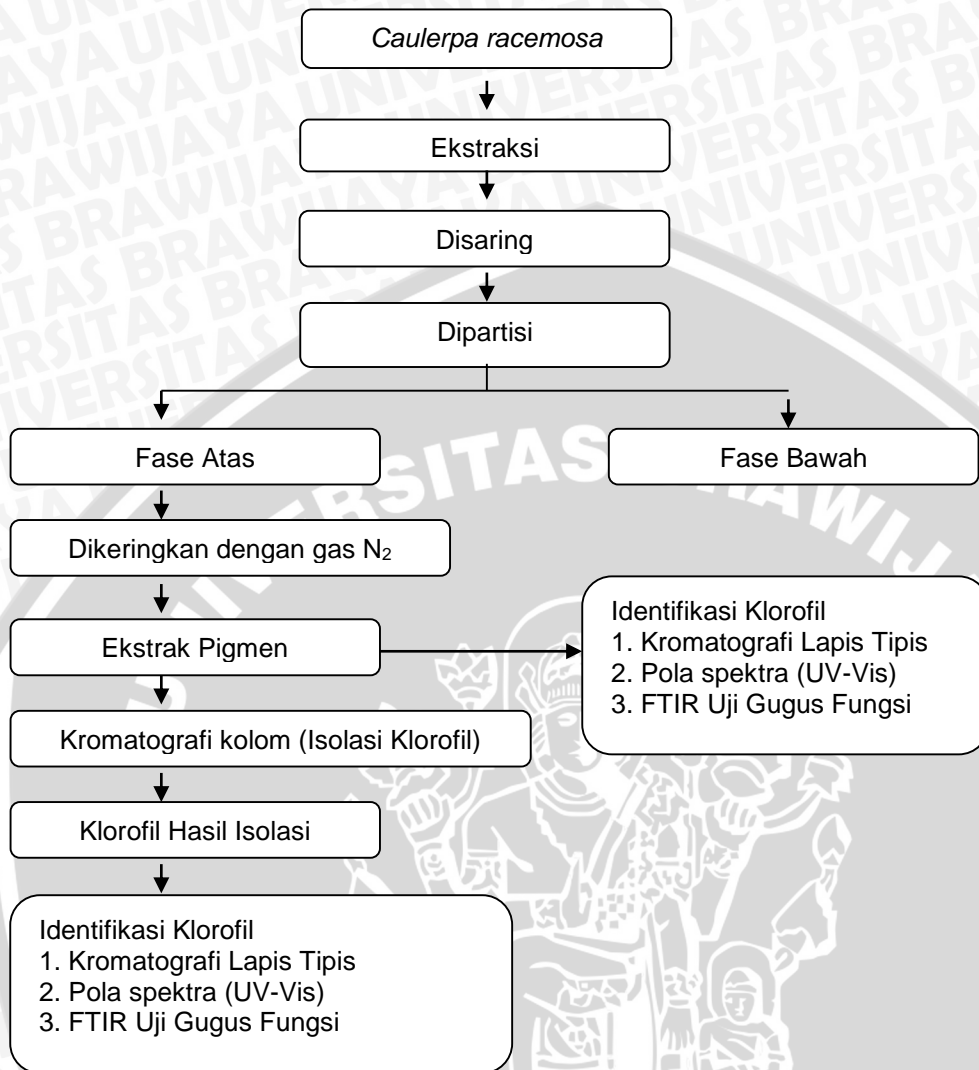
Menurut Nazir (2003), dalam metode deskriptif peneliti bisa saja membandingkan fenomena-fenomena tertentu sehingga merupakan suatu studi komparatif. Adakalanya peneliti mengadakan klasifikasi, serta penelitian terhadap fenomena-fenomena dengan menetapkan suatu

standar atau suatu norma tertentu, sehingga banyak sekali ahli menamakan metode deskriptif ini dengan nama survei normatif (*normative survey*). Dengan metode deskriptif ini juga diselidiki kedudukan (*status*) fenomena atau faktor dan melihat hubungan antara faktor dan melihat hubungan antara satu faktor dengan faktor yang lain. Karenanya, metode deskriptif juga dinamakan studi status (*status study*).

Ciri-ciri penelitian deskriptif diantaranya memberikan gambaran terhadap fenomena-fenomena, menerangkan hubungan (korelasi), menguji hipotesis yang diajukan, membuat prediksi (*forcase*) kejadian serta memberikan arti atau makna atau implikasi pada suatu masalah yang diteliti. Jadi penelitian deskripsi mempunyai cakupan yang lebih luas (Masyhuri dan M. Zainuddin, 2007).

3.3 Prosedur Penelitian

Untuk mengukur kandungan klorofil a pada *crude* dan isolasi alga hijau (*Caulerpa racemosa*) dilakukan beberapa tahapan yaitu

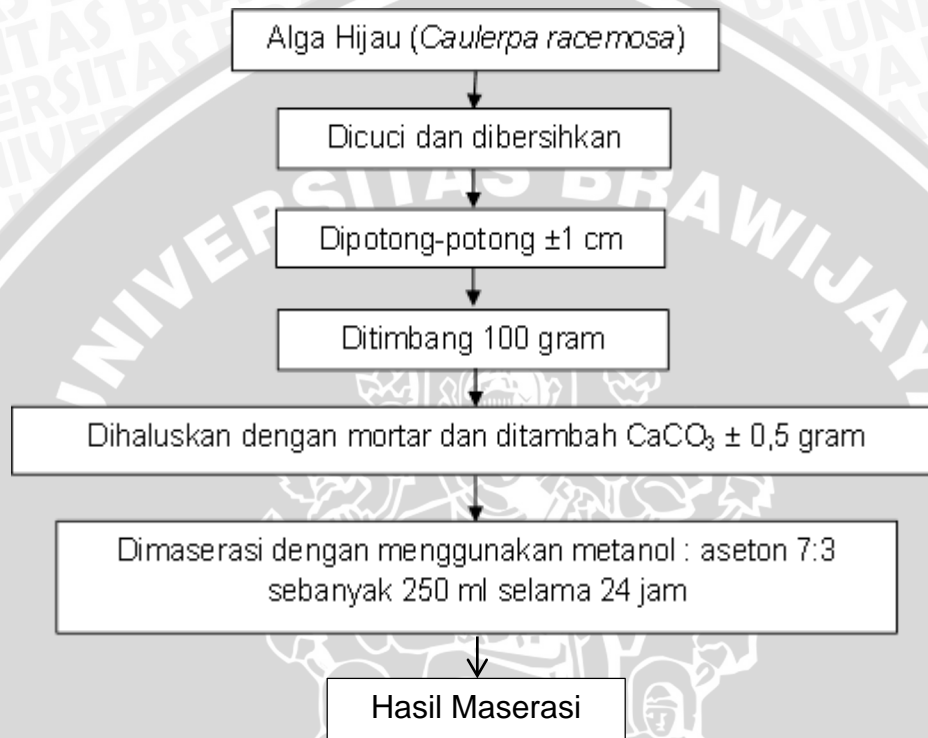


3.3.1 Persiapan Sampel

Sampel berupa alga hijau (*Caulerpa racemosa*) sebanyak 100gr dicuci dengan air laut untuk menghilangkan kotoran dan dibilas dengan air tawar untuk menghilangkan garam yang berasal dari air laut (lingkungan). Selanjutnya sampel dikeringkan dengan kain dan dimasukkan ke dalam kantong *polyback* hitam. selama perjalanan, sampel disimpan dalam *cool box* yang berisi es. Untuk penyimpanan selanjutnya, sampel dimasukkan ke dalam *freezer*.

3.3.2 Ekstraksi Klorofil

Tahapan selanjutnya untuk mengukur kandungan klorofil a pada *crude* dan isolasi dilakukan proses ekstraksi klorofil dengan menggunakan metode Pangestuti *et al.*, (2007) yang dimodifikasi oleh Mu'amar (2009).



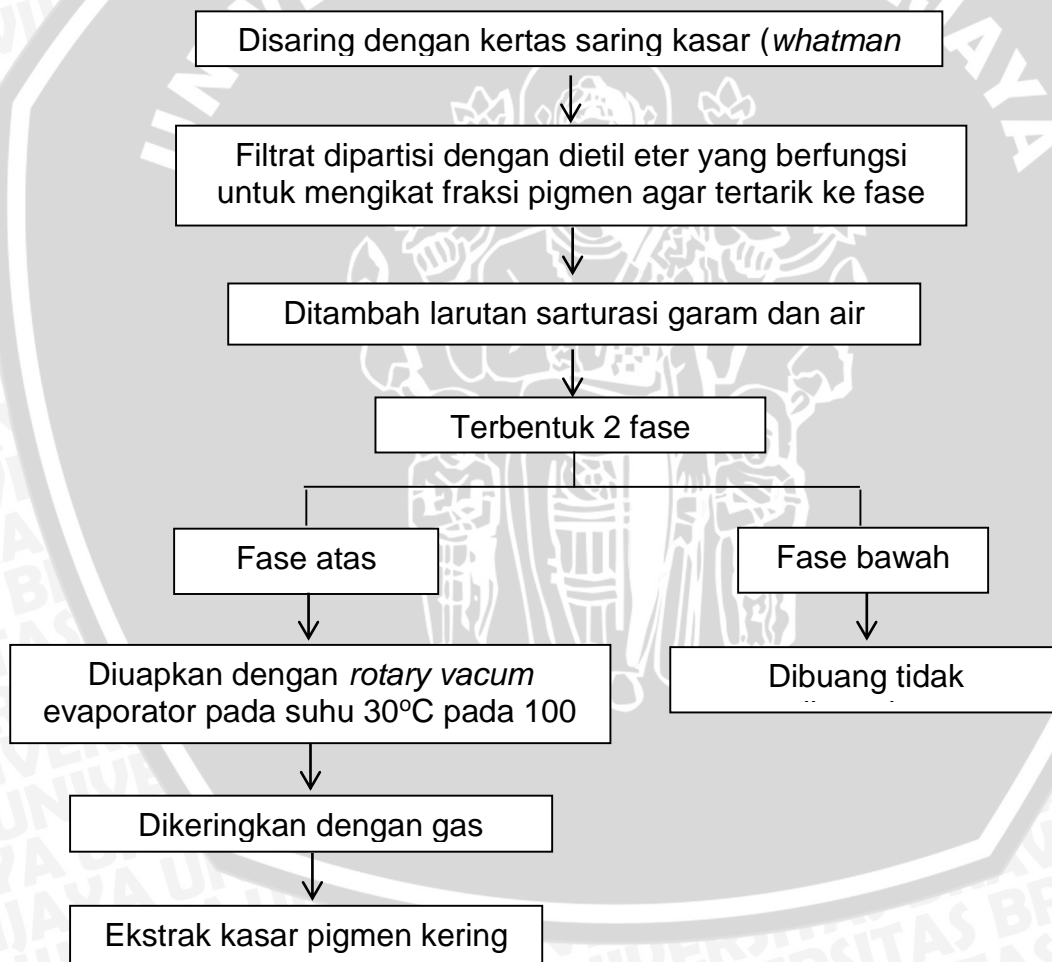
Gambar 7. Ekstraksi Alga Hijau

Rumput laut hijau *Caulerpa racemosa* segar dicuci sampai bersih dan dibersihkan dari kotoran dan rumput laut lain yang menempel. Rumput laut segar diambil sebanyak 100 gr dengan menggunakan timbangan digital dan dihaluskan dengan blender selama kurang dari 1 menit tujuannya yaitu untuk memperluas permukaan. Lalu ditambah CaCO₃ ± 1 gr. Penambahan CaCO₃ ini bertujuan untuk menetralkan alga hijau agar tidak bersifat basa hal ini karena pigmen klorofil yang terkandung didalamnya tidak tahan pada pH tertentu (basa). Kemudian dilakukan maserasi dengan ditambahkan bahan kimia methanol (CH₃OH) dan aseton (CH₃COCH₃) perbandingan (7:3) sebanyak 250 ml selama

24 jam pada suhu kamar. Adapun tujuan dari penggunaan methanol (CH_3OH) agar dapat melarutkan semua senyawa organik yang terkandung dalam bahan. Sedangkan penggunaan pelarut aseton (CH_3COCH_3) adalah untuk mengangkat pigmen yang bersifat polar.

3.3.3 Partisi Alga Hijau

Untuk mengukur atau membandingkan kandungan klorofil a pada *crude* dan isolasi digunakan metode partisi alga hijau berdasarkan pada Pangestuti *et al.*, (2007) yang dimodifikasi oleh Mu'amar (2009).



Setela **Gambar 7. Ekstraksi dan Fraksinasi Alga**

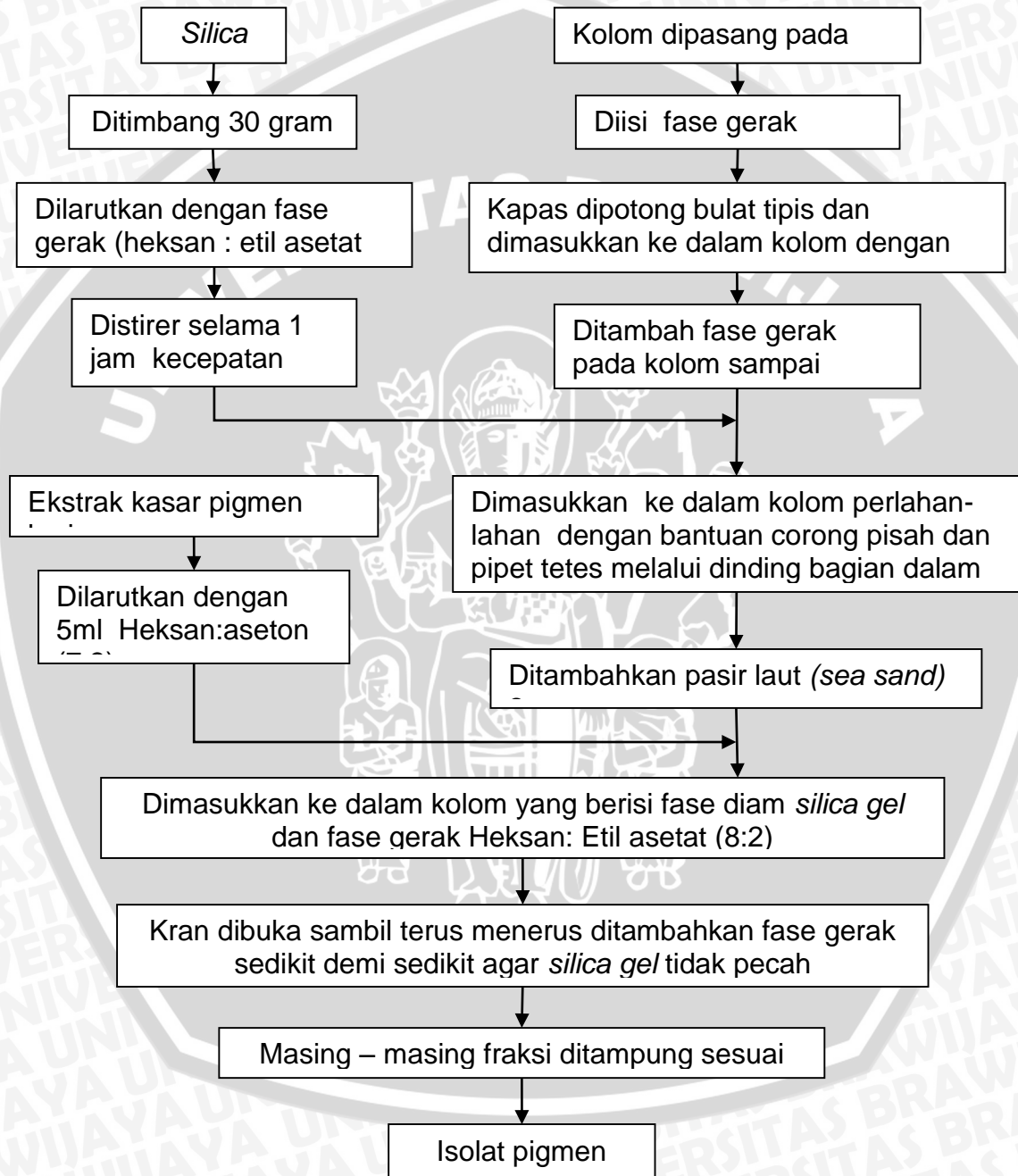
penyaringan menggunakan kain saring dan kertas saring halus hingga diperoleh filtrat. Proses penyaringan ini bertujuan untuk mengambil zat-zat yang

mengandung pigmen dan sisa-sisa (ampas) rumput laut dibuang, kemudian filtrat di partisi. Filtrat di partisi menggunakan corong pisah dengan larutan dietil eter, saturasi garam dan air. Penggunaan dietil eter berfungsi untuk mengikat seluruh senyawa yang bersifat non polar sehingga senyawa tersebut berada pada fase atas, lalu ditambahkan dengan saturasi garam grosok dan air yang berfungsi untuk mengikat senyawa yang bersifat polar serta agar pelarut lebih tertarik mengikat larutan saturasi garam grosok dan air yang memiliki elektronegatifan dan elektropositifan yang lebih tinggi dari pada senyawa target sehingga pelarut metanol dan aseton terikat pada larutan saturasi garam grosok dan air sehingga berada dibawah.

Menurut Shriner *et al.*, (1980), pelarut polar akan melarutkan zat terlarut yang polar dan pelarut non polar akan melarutkan zat terlarut yang non polar juga atau disebut "*like dissolves like*". Fase yang diambil dalam partisi adalah fase atas karena hampir seluruh pigmen berada pada fase ini, dan hasil dari fase bawah tidak digunakan karena merupakan campuran dari methanol, aseton serta air. Hasil dari fase atas dimasukkan kedalam tabung *rotavapor* kemudian di *rotary vacuum evaporator* pada suhu 30°C dengan kecepatan 100 rpm yang bertujuan untuk menguapkan pelarut sampai volume berkurang. Filtrat kemudian dipindahkan kedalam botol sampel dan filtrat dikeringkan dengan gas nitrogen yang bertujuan agar pigmen tidak rusak sehingga pigmen kering sempurna. Ekstrak pigmen kering ditutup dengan *aluminium foil* dan disimpan dalam *freezer*.

3.3.4 Isolasi Klorofil

Isolasi Klorofil *a* baik untuk *crude* dan isolasi dilakukan dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam *silica gel* dan fase gerak menggunakan heksan : etil asetat (8:2 v/v).



Gambar 8. Isolasi Klorofil Kromatografi Kolom (Pangestuti, et al., 2007)

Hal pertama yang dilakukan adalah preparasi fase diam (*silica gel*) untuk kromatografi kolom dengan menggunakan *beaker glass* dimana *Silica gel* sebanyak 30 gram dilarutkan dalam heksan : etil asetat (8 : 2 v/v) 200 mL dan distirer selama ± 1 jam dengan kecepatan 100 rpm. Tujuannya adalah untuk penyamaan antara fase gerak dan fase diam agar fase diam yang di masukkan dalam kolom tidak pecah atau retak.

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

Hendayana (2006), menyatakan bahwa untuk pemisahan komponen dengan menggunakan kromatografi kolom, prinsip kerja kromatografi kolom adalah sebagai berikut : kolom gelas dengan kran

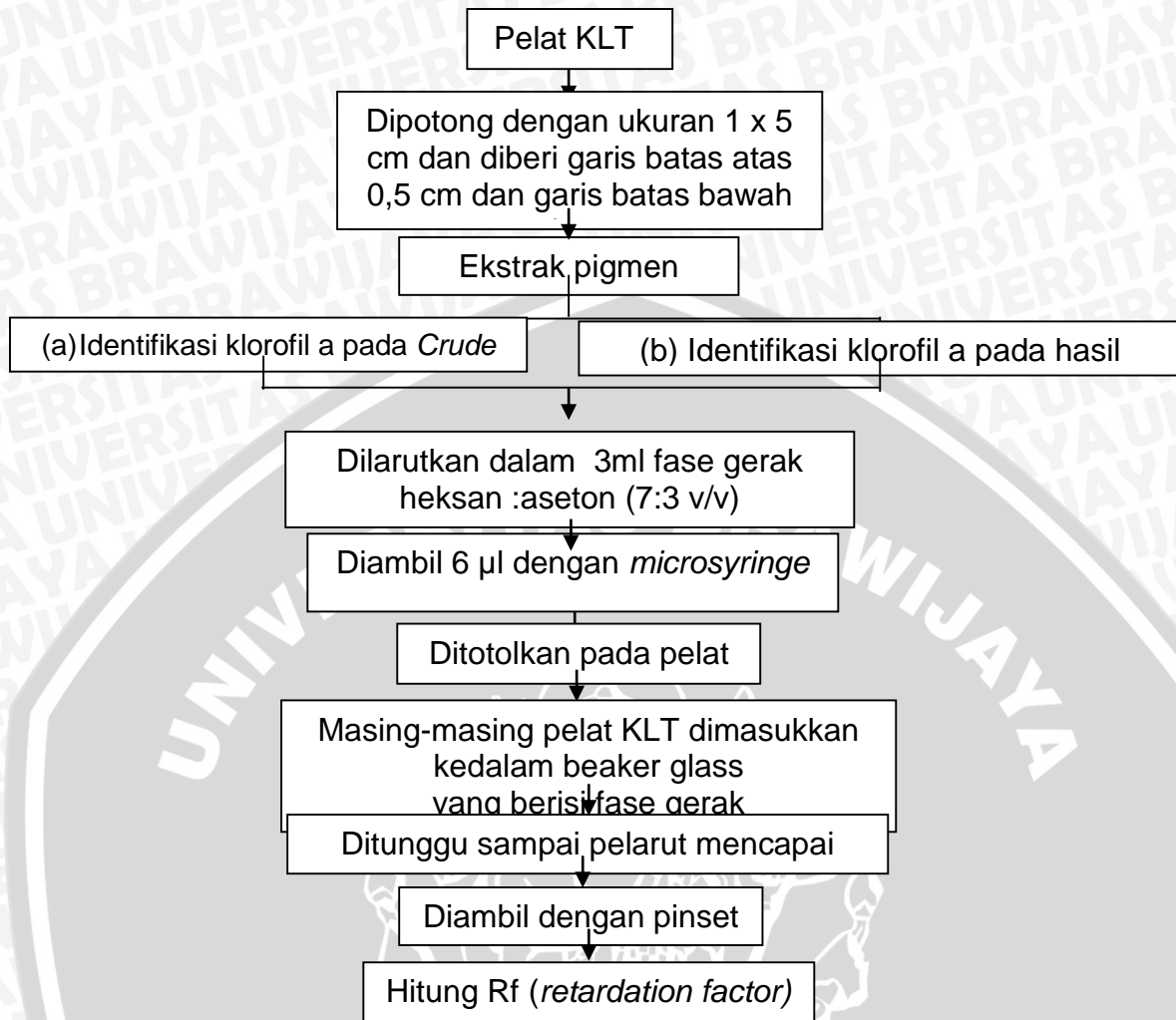
pada salah satu ujungnya diisi oleh fase diam berupa *silica*. Campuran yang akan dipisahkan dituangkan pada bagian atas kolom yang berisi fase diam. Begitu pula fase gerak berupa pelarut organik dialirkan dari bagian atas kolom. Komponen-komponen yang telah terpisah dari campurannya bergerak terbawa fase gerak ke bawah kolom. Jumlah komponen penyusun campuran dapat terlihat sebagai cincin – cincin berwarna sepanjang kolom gelas

Ekstrak kasar klorofil dari *Caulerpa racemosa* kering yang telah dilarutkan dalam 10 mL fase gerak (heksan : etil asetat 8:2 v/v), kemudian dimasukkan ke dalam kolom. Kran kolom yang berada di bawah dibuka. Ekstrak akan meresap ke *silica gel* dalam kolom sampai batas atas *silica gel*. Selanjutnya dimasukkan fase gerak sambil kran kolom dibuka. Fase gerak akan mengalir terus menerus, sehingga perlu menambahkan fase gerak baru agar kolom tidak menjadi kering. Fase gerak yang ditambahkan kedalam kolom ditingkatkan terus menerus kepolarannya dengan menaikkan konsentrasi etil asetat secara bertingkat dimana komposisi yang digunakan untuk heksan:etil asetat 8:2v/v, 7:3 v/v. 6:4 v/v. Kemudian fraksi yang keluar dari kolom ditampung dengan menggunakan botol vial atau botol sampel berdasarkan warnanya. Setiap fraksi dianalisis dengan menggunakan KLT.

3.3.5 Identifikasi Kandungan Klorofil

3.3.5.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Penelitian ini menggunakan fase diam *silica gel* F-254 dan fase gerak heksan : aseton dengan perbandingan (7:3 v/v)

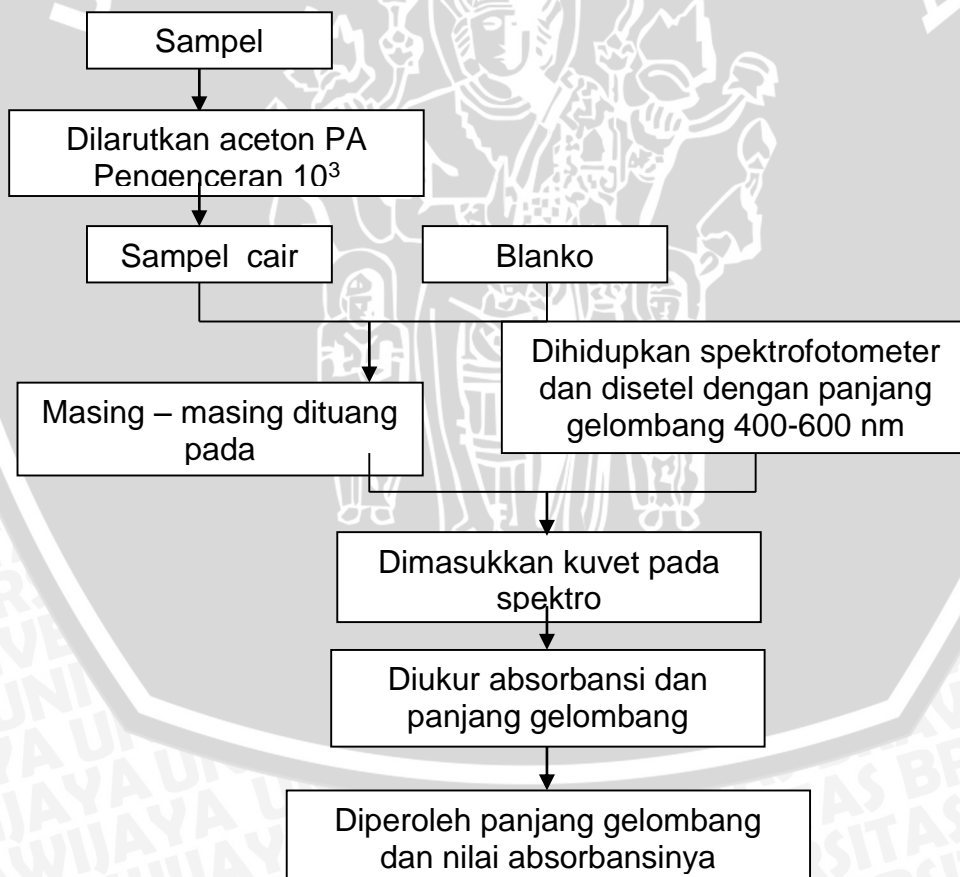


Gambar 9. Kromatografi Lapis Tipis (a) Crude Klorofil (Soviani, et al., 2004) dan (b) identifikasi Klorofil Hasil Isolasi (Yan, et al., 2000)

Tahapan pertama dalam KLT adalah membuat garis pada pelat dengan menggunakan pensil pada kedua ujung pelat. Bagian bawah pelat berukuran 1 cm yang bertujuan untuk menunjukkan posisi awal fraksi ketika ditotolkan, sedangkan bagian atas pelat berukuran 0,5 cm sebagai batas yang ditempuh pelarut. Selanjutnya, fraksi dari kolom yang ditampung dalam tabung reaksi diambil secukupnya menggunakan *microsyringe* dan ditotolkan pada pelat KLT sambil ditiup-tiup. Setelah

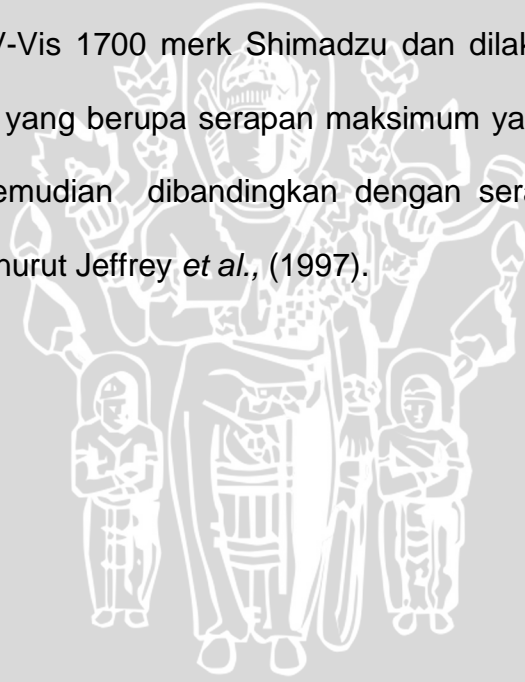
bercak tersebut mengering, pelat dimasukkan dalam *beaker glass* berisi fase gerak dan kertas saring. Fase gerak yang dimasukan dalam beaker glass jumlahnya tidak terlalu banyak sekitar 4ml dan tujuan dari pemberian kertas saring adalah untuk mengetahui apakah kehomogenan larutan didalam *beaker glass*. Selanjutnya *beaker glass* ditutup dengan cawan petri dan dibiarkan sampai pelarut bergerak mendekati garis atas. Kemudian diambil dengan pinset tanpa menyentuh garis atas pelat. Total yang terbentuk pada pelat diamati dan dihitung nilai Rf-nya (*retardation factor*).

3.3.5.2 Spektrofotometri UV-Vis

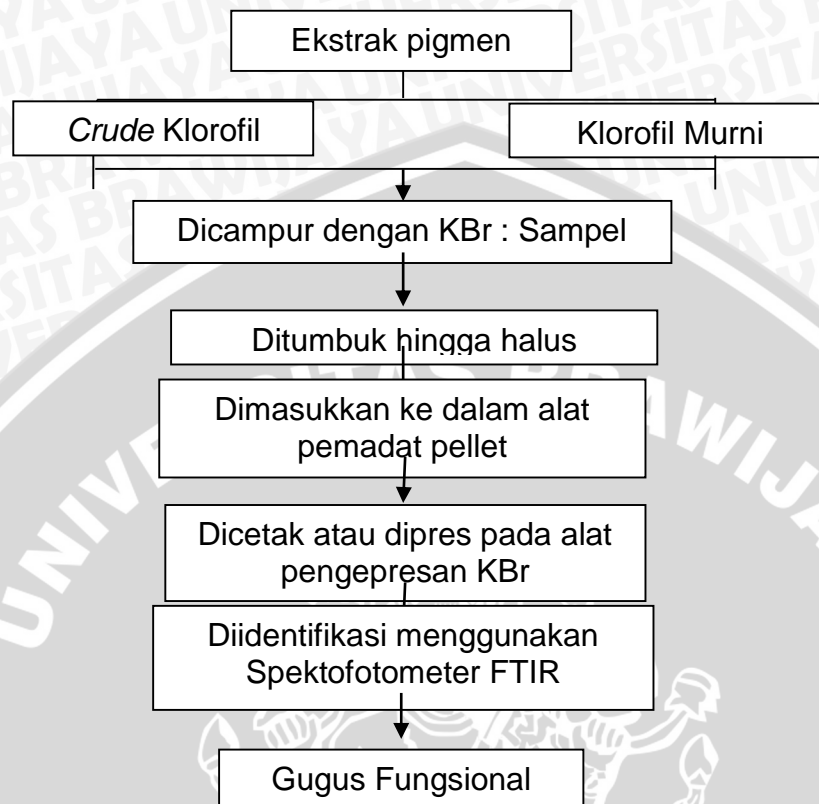


Gambar 10 . Prosedur Analisa dengan Spektrofotometer UV 1601 (Jenie, et al., 1997)

Spektrofotometer ini digunakan untuk mengetahui panjang gelombang dan absorbansi klorofil a pada *Caulerpa racemosa*. Fraksi hasil dari kromatografi kolom dan KLT yang telah diyakini sebagai klorofil dikeringkan dengan diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dan dikeringkan dengan gas nitrogen. Pigmen yang sudah dikeringkan kemudian ditambahkan aseton PA 100% hingga pengenceran 10^3 dan larutan pigmen dituang ke dalam kuvet ± 3 ml. Selanjutnya spektrofotometer dinyalakan dan panjang gelombang diatur pada kisaran 350-700 nm, lalu kuvet dimasukkan ke dalam instrumen spektrofotometer UV-Vis 1700 merk Shimadzu dan dilakukan pengujian. Hasil dari pengujian yang berupa serapan maksimum yang dibentuk oleh pigmen klorofil a kemudian dibandingkan dengan serapan maksimum spektra klorofil a menurut Jeffrey *et al.*, (1997).



3.3.5.3 Spektrofotometer FTIR (*Fourier Transform Infrared*)



Gambar 11. Prosedur Analisa Gugus Fungsional *Crude* Klorofil dan Klorofil Hasil Isolasi dengan Spektrofotometer FTIR

Spektrofotometer FTIR ini digunakan untuk mengetahui gugus fungsi *crude* klorofil dan klorofil murni. Spektrofotometer FTIR dapat digunakan untuk analisa sampel yang berupa padatan, cairan dan gas. Spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infrared*) merupakan spektroskopi inframerah yang dilengkapi dengan transformasi Fourier untuk deteksi dan analisis hasil spektrumnya. Inti spektroskopi FTIR adalah interferometer Michelson yaitu alat untuk menganalisis frekuensi dalam sinyal gabungan. Spektrum inframerah tersebut dihasilkan dari pentransmisiian cahaya yang melewati sampel, pengukuran intensitas cahaya dengan detektor dan dibandingkan dengan intensitas tanpa sampel sebagai

fungsi panjang gelombang. Spektrum inframerah yang diperoleh kemudian diplot sebagai intensitas fungsi energy, panjang gelombang (μm) atau bilangan gelombang (cm^{-1}).

Untuk pengambilan spektra IR jumlah sampel yang diperlukan antara 1-5 mg, sedangkan bentuk sampel dapat berupa padatan, cairan atau dalam bentuk gas. Sampel klorofil yang digunakan pada spektroskopi FTIR ini berupa cairan sehingga ditetapkan menggunakan plat NaCl/NaCl window sekitar 2-3 tetes selanjutnya diukur serapannya di FT-IR.

Analisis gugus fungsi suatu sampel dilakukan dengan membandingkan pita absorpsi yang terbentuk pada spektrum inframerah menggunakan tabel korelasi dan menggunakan spektrum senyawa pembanding (yang sudah diketahui) (Anam, *et al.*, 2007). Menurut Sastrohamidjojo (1991), daerah pada spektrum infra merah diatas 1500 cm^{-1} menunjukkan pita spektrum atau gugus-gugus fungsi dalam molekul kimia, sedangkan daerah dibawah 1500 cm^{-1} menunjukkan daerah sidik jari.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Hasil penelitian dari isolasi Klorofil *a* Alga hijau (*Caulerpa racemosa*) dengan parameter hasil dari kromatografi kolom, uji identifikasi dengan KLT (kromatografi lapis tipis), uji identifikasi pola spektra dengan spektrofotometer UV-Vis 1601 Shimadzu, uji identifikasi gugus fungsi dengan spektrofotometri FTIR dapat dilihat dari Tabel 7 berikut ini :

Tabel 7. Data Uji Identifikasi Pigmen Klorofil *a*

No	Uji Identifikasi	Metode	Hasil	Literatur
1.	Hasil	Ekstraksi dan Fraksinasi	100 gram sampel alga hijau menghasilkan <i>crude</i> klorofil hasil ekstraksi sebesar 644 ml warna hijau	Ekstak kasar berwarna hijau dan klorofil berwarna biru (Jeffrey, <i>et al.</i> , 1997)
		Kromatografi Kolom	56 Isolat pigmen dalam botol vial. Isolat klorofil dari tabung 35-38 warna biru	
2.	Kemurnian dan Komposisi	KLT <i>crude</i>	Rf 0,38	Rf klorofil 0,38-0,42 Yan, <i>et al.</i> ,(1999)
		KLT Klorofil Hasil Isolasi	Rf 0,41	
3.	Pola spektra	Spektrofotometer UV-VIS 1601 Shimadzu	Pelarut Aseton Crude 340 nm klorofil 340,8 nm	Dalam pelarut Aseton (Jeffrey, <i>et al.</i> , 1997) panjang gelombang 340.10 nm
4.	Gugus Fungsi	Spektrofotometer FTIR	Ekstrak Kasar Klorofil C-H → 2850-2970 dan 1340-1470 cm^{-1} C-H cincin aromatik → 3010-3100 dan 675-995 cm^{-1} C-O → 1050-1300 cm^{-1} C-N → 1180-1360 cm^{-1} O-H → 2500-2700 cm^{-1} C=C → 1500-1600 cm^{-1} Klorofil Hasil Isolasi C-H → 1340-1470 cm^{-1} N-H → 3300-3500 cm^{-1} C-O → 1050-1300 cm^{-1} C-N → 1180-1360 cm^{-1} C=O → 1690-1760 cm^{-1}	Haugan <i>et al.</i> (1992)

4.2 Pembahasan

4.1.1 Crude Alga Hijau

Hasil ekstraksi 100 gram alga hijau dengan pelarut metanol : aseton (7:3 v/v) sebanyak \pm 250 ml dihasilkan filtrat berwarna hijau pekat. Setelah alga hijau diekstraksi, kemudian difraksinasi. Hasil filtrat yang diperoleh dari partisi fase atas pada alga hijau sebanyak \pm 644 ml. Kemudian hasil filtrat dirotary *vacum evaporator* dan diberi gas nitrogen untuk mengeringkan sampel. Berikut hasil ekstraksi pigmen *crude* klorofil pada Gambar 12.



Gambar 12. Hasil Crude Klorofil

4.1.2 Isolasi Klorofil dengan Kromatografi Kolom

Kromatografi merupakan cara pemisahan yang mendasarkan partisi cuplikan antara fasa bergerak (*mobile*) dan fasa diam (*stationary*). Kecepatan bergerak suatu komponen tergantung pada berapa besarnya ia terhambat atau tertahan oleh penyerap di dalam kolom. Jadi suatu senyawa yang diserap lemah akan bergerak lebih cepat daripada yang diserap kuat (Sastrohamidjojo, 1985).

Pemisahan suatu campuran dengan kromatografi kolom dimana kolom diisi dengan fasa diam (*silica gel* F₂₅₄) sebagai penahan senyawa sementara

bersifat polar (karena gugus H) dan dialiri dengan pelarut (heksan (C_6H_{14}) : etil asetat ($C_4H_8O_2$)) sebagai fase gerak.

Ekstrak pigmen kering yang telah dilarutkan dengan sedikit fase gerak dimasukkan melalui sebelah atas dari kolom kemudian membentuk jalur-jalur serapan dari senyawa tersebut. Fase diam akan mengikat terlebih dahulu senyawa yang memiliki tingkat kepolaran yang sama, kemudian pelarut (fase gerak) dialirkan ke dalam kolom sedikit demi sedikit yang akan mengangkut pigmen. Pigmen β -karoten akan keluar lebih dulu, kemudian klorofil dan terakhir fukosantin. Dilihat dari sifat masing-masing pigmen yang bersifat polar akan diserap terlebih dahulu oleh fase diam dan yang bersifat non polar akan keluar mengikuti fase gerak terlebih dahulu. Selanjutnya fase gerak dinaikkan tingkat kepolarannya yaitu heksan (C_6H_{14}) : etil asetat ($C_4H_8O_2$) 8:2 v/v, 7:3 v/v dan 6:4 v/v untuk mengelurkan pigmen klorofil dan fukosantin. Senyawa-senyawa yang lebih larut akan bergerak lebih lambat turunnya dalam kolom daripada yang kurang kelarutannya.

Isolasi klorofil *a* rumput laut hijau *Caulerpa racemosa* pada penelitian ini menggunakan kromatografi kolom dengan kolom berukuran panjang 40 cm dan diameter 3,5 cm. Teknik kromatografi kolom dipilih karena dapat memisahkan antara senyawa pigmen satu dengan yang lainnya sesuai tingkatan kepolaran (warna). Kromatografi kolom memiliki keuntungan selain dapat digunakan analisa kualitatif juga dapat digunakan analisa kuantitatif. Kromatografi kolom memiliki kekurangan yaitu memiliki waktu yang relatif cukup lama karena panjang dan diameter kolom, fase gerak (jenis dan jumlah pelarut yang digunakan), dan kecepatan aliran (Sastrohamidjojo, 1985).

Isolasi pigmen rumput laut hijau *Caulerpa racemosa* dengan kromatografi kolom didapatkan 3 jenis pigmen yaitu β -karoten ditunjukkan dengan warna

kuning, klorofil *a* ditunjukkan dengan warna hijau biru, dan fukosantin ditunjukkan dengan warna kuning orange. Sesuai dengan deskripsi Gross (1991) yang menyatakan bahwa klorofil *a* berwarna hijau biru, klorofil *b* hijau kuning dan karotenoid berwarna kuning, orange, merah. Ditambahkan oleh Putnarubun dan Dangeubun (2009), pigmen yang pertama kali keluar dalam isolasi dengan kromatografi kolom adalah karoten ditandai dengan warna kuning tua bersifat hidrofob juga bersifat non polar. Pigmen kedua adalah klorofil *a* ditandai dengan warna hijau biru yang bersifat semi polar.

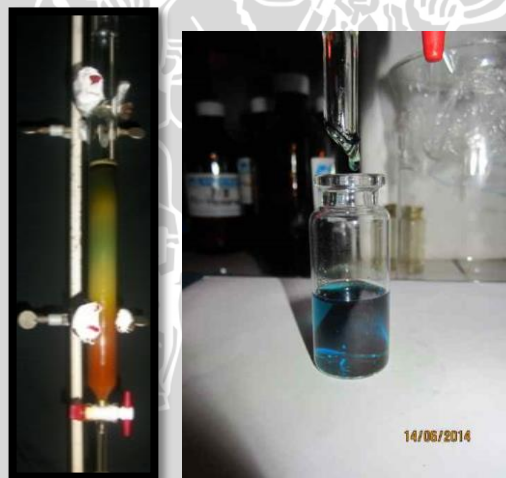
Isolasi pigmen menggunakan kromatografi kolom dilakukan dengan dua fase, dimana *silica gel* sebagai fase diam dan pelarut sebagai fase gerak. Pelarut yang digunakan adalah heksan (C_6H_{14}) : etil asetat ($C_4H_8O_2$) dengan perbandingan yang berbeda yaitu 8:2 v/v, 7:3 v/v dan 6:4 v/v dikarenakan perbedaan tingkat kelarutan pigmen tersebut. Sastrohamidjojo (1985), kecepatan bergerak dari suatu komponen dari campuran tergantung pada kelarutannya dalam fase tetap, sehingga senyawa-senyawa yang lebih larut akan bergerak lebih lambat turunnya dalam kolom daripada yang kurang kelarutannya. Selama mereka bergerak senyawa-senyawa mengalami partisi di antara dua fase. Untuk menurunkan pigmen tersebut menggunakan sifat kelarutan dimana pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan pelarut non polar akan melarutkan senyawa non polar.

Pigmen yang dihasilkan sebanyak 56 isolat yang ditampung pada botol-botol vial berdasarkan warnanya. Pada ulangan 1 fraksi yang diduga klorofil *a* terdapat pada botol 35-38, dengan ciri khas warna pigmen klorofil *a* yang berwarna hijau biru. Penelitian oleh Manule (2010), memperlihatkan pemisahan pigmen menggunakan kromatografi kolom dihasilkan sebanyak 136 fraksi yang ditampung pada tabung reaksi berdasarkan warnanya dengan fase gerak yang sama (heksan : etil asetat 8:2 v/v). Fraksi yang diduga klorofil *a* terdapat pada

tabung 13-49 berwarna hijau biru, warna tersebut merupakan ciri khas dari pigmen klorofil *a* (Jeffrey, *et al.*, 1997; Gross, 1991). Perbedaan jumlah fraksi yang didapatkan diduga karena jenis sampel, jumlah sampel, diameter dan tinggi kolom yang berbeda.

Pigmen klorofil *a* pada rumput laut hijau *Caulerpa racemosa* yang didapatkan dari kromatografi kolom selanjutnya diidentifikasi kemurniannya dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Isolasi pigmen Klorofil dari alga hijau (*Caulerpa racemosa*) dilakukan untuk mendapatkan klorofil murni. Isolasi pigmen dilakukan dengan metode kromatografi kolom menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak heksan : etil asetat (8:2v/v, 7:3v/v, 6:4 v/v dan 5:5 v/v). Berikut hasil kromatografi kolom pigmen klorofil *a* dapat dilihat pada Gambar 14.

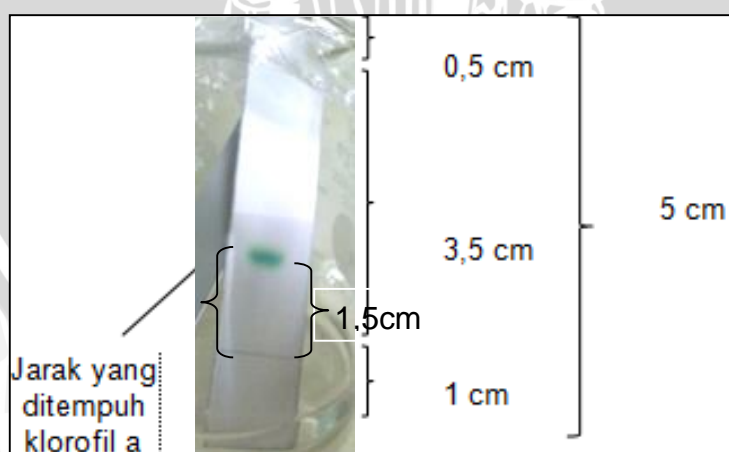


Gambar 14. Hasil Kromatografi Kolom
Sumber : Dokumentasi Penelitian

4.1.3 Identifikasi Klorofil dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan untuk mengetahui kemurnian pigmen pada ekstrak kasar berdasarkan jumlah serta warna total yang terbentuk

(Merdekawati dan Susanto, 2014). Untuk menentukan kemurnian pigmen klorofil *a* pada rumput laut hijau *Caulerpa racemosa* dari kromatografi kolom dilakukan uji total warna pada kromatografi lapis tipis (KLT). Identifikasi kemurnian pigmen klorofil *a* ini menggunakan plat KLT dengan fase gerak heksan (C_6H_{14}) : aseton (CH_3COCH_3) (7:3 v/v) sebanyak 10 ml. Nilai Rf yang didapatkan sebesar 0,42 dan terbentuk satu spot warna hijau biru, dimana warna yang terbentuk tersebut merupakan ciri khas klorofil *a*. Sesuai dengan deskripsi Gross (1991) yang menyatakan bahwa klorofil *a* berwarna hijau biru, klorofil *b* hijau kuning dan karotenoid berwarna kuning, orange, merah. Total warna yang dihasilkan membuktikan bahwa pigmen yang dihasilkan murni. Nilai Rf yang didapatkan juga tidak jauh beda dengan penelitian yang dilakukan oleh Pangestuti, *et al.*, (2008), nilai Rf klorofil *a* berkisar 0,38 – 0,42 dengan fase diam dan fase gerak yang sama. Penelitian sebelumnya oleh Manule (2010), nilai Rf klorofil *a* pada *Caulerpa racemosa* dengan fase gerak heksan (C_6H_{14}) : aseton (CH_3COCH_3) (7:3 v/v) juga didapatkan Rf sebesar 0,42 dan terbentuk satu spot warna hijau biru. Hasil identifikasi kemurnian klorofil *a* pada rumput laut hijau *Caulerpa racemosa* dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Hasil Kromatografi Lapis Tipis Klorofil *a* *Caulerpa racemosa*

Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan fase diam polar dan fase gerak dominan nonpolar akan menyebabkan klorofil *a* bergerak mengikuti fase geraknya, sehingga memiliki nilai R_f yang lebih tinggi (Ati, *et al.*,2006). Mekanisme terbentuknya total warna disebabkan oleh komponen kimia yang bergerak naik mengikuti fase gerak karena daya serap adsorben terhadap komponen-komponen kimia tidak sama, sehingga komponen kimia dapat bergerak dengan kecepatan yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya, hal inilah yang menyebabkan terjadinya pemisahan. Noda-noda yang terbentuk terpisah berdasarkan kepolarannya. Noda yang mempunyai nilai R_f lebih rendah cenderung memiliki kepolaran yang lebih tinggi karena lebih terdistribusi ke fase diam yang bersifat polar, dibandingkan noda yang mempunyai harga R_f lebih besar karena lebih terdistribusi ke dalam fase gerak (Wikipedia, 2014).

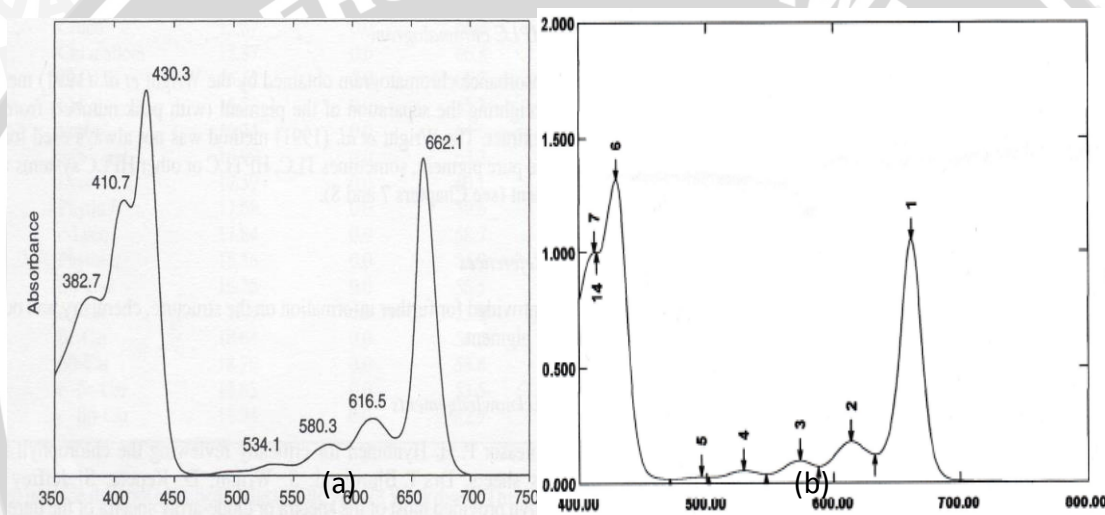
Tujuan penggunaan fase gerak heksan dan aseton (7:3 v/v) adalah untuk melarutkan senyawa yang tidak polar, polar maupun semi polar seperti klorofil, sehingga senyawa tersebut dapat larut dan tertarik keatas sesuai tingkat kepolarannya. Waktu tempuh pelarut dari batas bawah hingga batas atas plat KLT selama ± 5 menit.

4.1.4 Identifikasi Klorofil *a* dengan Spektrofotometri UV-1601

Hasil isolasi yang diyakini sebagai klorofil *a* dan telah dianalisis kualitatif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), selanjutnya dianalisis kualitatif menggunakan spektrofotometer UV-VIS yang bertujuan untuk mengetahui pola spektra dan serapan maksimum. Klorofil dan turunannya memiliki karakteristik spesifik yang memungkinkan dilakukannya identifikasi secara spektroskopi. Molekul yang berwarna hijau tersebut

memiliki serapan khas pada daerah biru dan merah dari spektrum tampak (Gross, 1991).

Pengukuran pola spektra dan absorbansi klorofil *a* diidentifikasi menggunakan pelarut aseton (CH_3COCH_3). Selanjutnya pola spektra dan serapan maksimum hasil isolasi dibandingkan dengan pola spektra dan serapan maksimum pada literatur Jeffrey, *et al.*, (1997) dengan pelarut yang sama. Hasil pola spektra dalam pelarut aseton (CH_3COCH_3) dapat dilihat pada Gambar 17.



No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	●	661.50	0.908	
2	●	614.50	0.176	
3	●	573.50	0.095	
4	●	529.00	0.054	
5	●	496.00	0.028	
6	●	429.00	0.871	

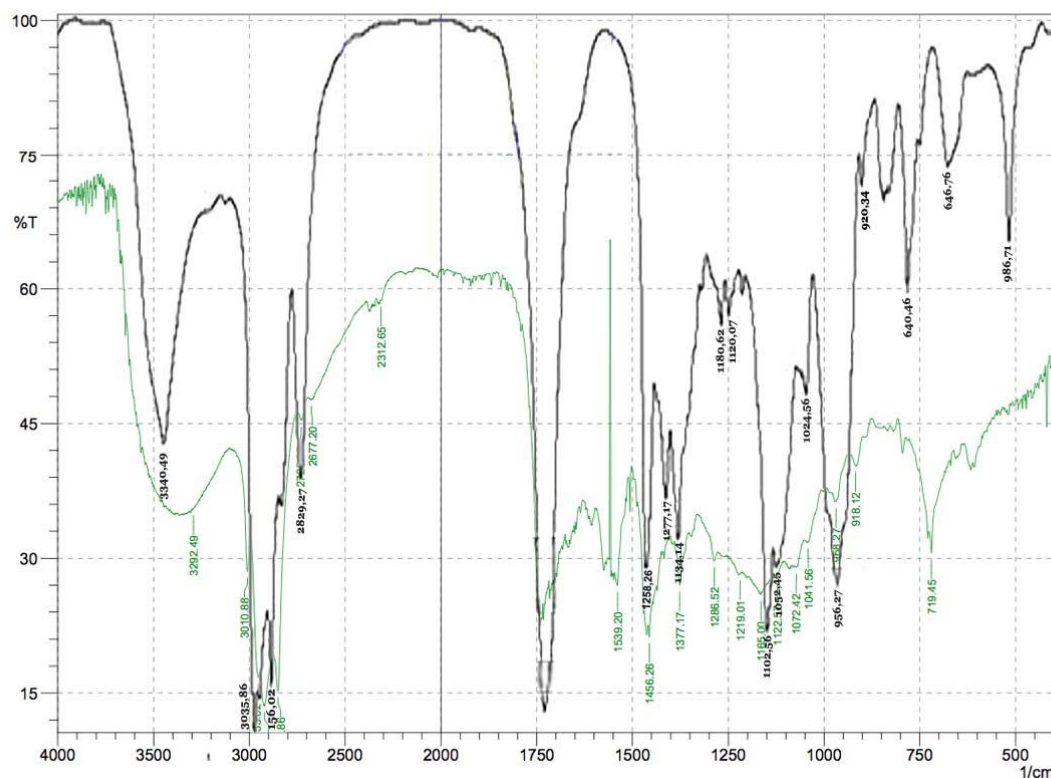
Gambar 17 (a). Pola spektra pigmen klorofil *a* hasil isolasi dalam pelarut aseton (CH_3COCH_3).

(b). Pola spektra klorofil *a* dalam pelarut aseton (CH_3COCH_3)(Jeffrey, *et al.*, 1997).

Isolasi memiliki kemiripan dengan pola spektra klorofil *a* menurut Jeffrey, *et al* (1997), yang ditunjukkan pada Gambar 17 (b). Serapan maksimum klorofil *a*

hasil isolasi pada pita Qy dan Qx berturut-turut 661,5 ; 614,5 dan 429,5. Hal ini mendekati dengan serapan maksimum klorofil *a* menurut Jeffrey, *et al* (1997) yaitu 662.1, 616.5 dan 430.1 nm. Costa, *et al* (2008), menyatakan bahwa berdasarkan urutan tingkatan energinya, pola spektra klorofil memiliki tiga pita utama yang dinyatakan dengan pita Qy, pita Qx dan pita B (soret). Ditambahkan oleh Gross (1991) yang menyatakan bahwa klorofil *a* mempunyai serapan maksimum pada daerah biru soret (B) 400-450 nm dan daerah merah (Qy) pada 650-700 nm. Meskipun terdapat pergeseran panjang gelombang yang tidak terlalu jauh. Menurut Toto, *et al.*, (2006) menyatakan bahwa pergeseran yang terjadi diduga karena adanya interaksi antara zat terlarut (pigmen) dan pelarut yang sangat ditentukan oleh kualitas pelarut atau kemurnian pelarut yang digunakan untuk analisa.

4.1.5 Identifikasi Klorofil *a* dengan Spektrofotometer FTIR



Gambar 18. Spektra IR *Crude* dan Isolasi Klorofil a

Gambar Spektrum Inframerah pigmen klorofil menggunakan KBr pada sampel *crude* dan hasil isolasi memiliki serapan yang hampir sama hanya berbeda pada gugus OH hal ini dikarenakan pada sampel *crude* klorofil a masih terdapat kandungan senyawa lebih banyak dibandingkan dengan klorofil hasil isolasi karena pada hasil isolasi senyawa senyawa lainnya selain klorofil sudah terisolasi pada tahap isolasi (kromatografi kolom). Gugus fungsi FTIR dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Gugus fungsi FTIR

Gugus Fungsi	Crude Klorofil	Klorofil Hasil Isolasi	Vibrasi Referensi	Intensitas Reverensi
O-H	3292,49	3340,49	Uluran O-H dari ikatan	terdeteksi kuat - lemah
C-H	3035,86	3010,86	uluran C-H dari alkena	Terdeteksi sedang - kuat
C-O	1377,17	1258,28	Uluran C-O dari alkohol/eter	Terdeteksi sedang-lemah
C-N	1219,01	1180,62	Uluran C-N dari amina	Terdeteksi kuat-sedang

Pada gugus uluran C-H pada *crude* klorofil intensitas peaknya 3035,86 terdeteksi sedang berbeda dengan klorofil hasil isolasi yang memiliki intensitas peaknya sebesar 3010,86 yang terdeteksi kuat. Hal ini hampir mirip dengan Marsell (1998) yang memiliki panjang peak 3010 yang terdeteksi kuat.

Pada gugus uluran C-O pada *crude* klorofil memiliki intensitas peak 1377,17 terdeteksi sedang, berbeda dengan klorofil hasil isolasi yang memiliki intensitas peaknya sebesar 1258,28 yang terdeteksi lemah. Hal

ini mirip dengan Marsell (1998) yang memiliki panjang 1200 yang terdeteksi lemah.

Pada gugus uluran C-N pada crude klorofil memiliki intensitas peak 1219,01 terdeteksi kuat, berbeda dengan klorofil hasil isolasi yang memiliki intensitas peaknya sebesar 1180,62 yang terdeteksi sedang. Hal ini mirip dengan literatur Marsell (1998) yang memiliki angka gelombang 1100 yang terdeteksi sedang.

Analisa gugus fungsional sampel Klorofil dan *crude* klorofil dan klorofil murni *Caulerpa racemosa* menggunakan FTIR Spektrofotometer dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Analisa gugus fungsional sampel Klorofil *a* dan sampel *crude* dan Klorofil *Caulerpa racemosa* menggunakan FTIR Spektrofotometer

No	Gugus Fungsional	V_{\max} (cm^{-1}) (A)	V_{\max} (cm^{-1}) (B)	V_{\max} (cm^{-1}) (C)
1	C-H (Alkana)	2950	2850-2970	1340-1470
2	C-H(Alkena)	3030-3090	3010-3095	-
3	C-H cincin aromatik	3050	3010-3100	-
4	C-O	1100	1050	1300
5	C-N	1240	1180	1360
6	O-H	2650	2500-2700	-
7	C=C	1700	1500-1600	-
8	O-H alcohol ikatan hydrogen	3300	3200-3600	-
9	C=O (aldehid)	1640, 1765	1690-1760	-
10	N-H amina	3300	-	3300-3500

Keterangan : (A) = V_{\max} (cm^{-1}) ekstrak klorofil *a* Menurut Haugan *et al.*, (1992)

(B) = V_{\max} (cm^{-1}) *crude* Klorofil (*Caulerpa racemosa*) berdasarkan uji FTIR

(C) = V_{\max} (cm^{-1}) ekstrak Klorofil *a* (*Cauerlpa racemosa*) berdasarkan uji FTIR.

5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian mengenai identifikasi *crude* dan isolasi klorofil a dari alga hijau (*Caulerpa racemosa*) diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

- Hasil identifikasi klorofil a pada *crude* yang diuji dengan KLT diperoleh Rf yaitu 0,38 dengan pola spektra pada pelarut aseton adalah 340 nm serta dari hasil uji spektroskopi FT-IR diperoleh bahwa klorofil a dari *crude* mengandung gugus fungsi C-H (alkana), gugus C-H (alkena), gugus C-H (cincin aromatik), C-O (eter), C-N (amina), OH (karboksil), C-O (aldehid).
- Hasil identifikasi klorofil a pada isolasi yang diuji dengan KLT diperoleh Rf yaitu 0,41 dengan pola spektra pada pelarut aseton adalah 340,8 nm serta dari hasil uji spektroskopi FT-IR diperoleh bahwa klorofil a dari hasil isolasi mengandung gugus fungsi C-H (alkana), N-H (amina), C-O (alcohol), C-N (amina).
- Hasil uji identifikasi menggunakan KLT dengan range 0,38 – 0,42 dinyatakan bahwa klorofil yang didapat adalah klorofil murni.

5.2 Saran

Selalu lebih berhati-hati dalam proses penanganan sampel sebelum dilakukan proses identifikasi karena dilihat dari sifat pigmen yang sangat rentan akan cahaya dan suhu supaya tidak timbul suatu pengotor yang akan mempengaruhi hasil analisa FTIR dan perlu diadakan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan Spektrofotometer FT-IR mengenai identifikasi gugus fungsi pigmen klorofil murni pada jenis alga yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Anam, Choirul; Sirojudin, dan K. Sofjan Firdausi. 2007. **Analisis Gugus Fungsi pada Sampel Uji, Bensin dan Spiritus Menggunakan Metode Spektroskopi FTIR**. Jurusan Fisika fakultas MIPA Universitas Diponegoro. Semarang.
- Anis, E. 2008. **Pigmen Sebagai Zat Pewarna dan Antioksidan Alami**. UMM Press. Malang
- Apriyantono. A, D. Fardiaz, N. Puspitasari, Sedarnawati dan S. Budiyanto. 1989. **Analisis Pangan**. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan DIKTI Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Aslan, L. M. 1998. **Rumput Laut**. Kanisius. Yogyakarta.
- Ati, N. H; P. Rahayu; S. Notoesoedarmo; dan L. Limantara. 2006. **Komposisi dan Kandungan Pigmen Tumbuhan Pewarna Alami Tenun Ikat di Kabupaten Timor Tengah Selatan, Propinsi Nusa Tenggara Timur**. Indo. J. Chem Vol 6 (3), 325 – 331.
- Atmadja, W. S; A. Kadi; Sulistijo, dan Rachmaniar. 1996. **Pengenalan Jenis-jenis Rumput Laut Indonesia**. Puslitbang Oseanologi-LIPI. Jakarta.
- Bachtiar, E. 2007. **Penelusuran Sumber Daya Hayati Laut (Alga) Sebagai Biotarget Industri, Makalah**. Universitas Padjadjaran Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Jatinangor. Bandung.
- Clark, Jim. 2002 (Modified 2004) **The Mechanism For Esterification Reaction**, [Http:// www. Chemguide.co.uk/organicprops / estermenu .Html1#top](http://www.Chemguide.co.uk/organicprops/estermenu.Html1#top)
- Clark, J. 2007. **Kromatografi Lapis Tipis**. <http://www.chem-is-try.org>. Diakses tanggal 13 April 2014.
- Day, R.A dan Underwood, A.L., 1986, **Analisis Kimia Kuantitatif**, Erlangga, Jakarta.
- Gandjar, Ibnu Gholib dan Abdul Rohman. 2007. **Kimia Analisis Farmasi**. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Gross, J. 1991. **Pigments In Vegetables Chlorophylls and Carotenoids**. An Avi Book. New York.
- Guenther, E. Diterjemahkan oleh S. Ketaren. 1987. **Minyak Atsiri I**. Penerbit UI. Jakarta.
- Handayani, T., Sutarno dan A.D Setyawan. 2004. **Analisis Komposisi Nutrisi Rumput Laut *Sargassum crassifolium* IJ. Agardh**. Biofarmasi 2 (2) Hal: 45:52,

- Harborne, J. B. 1987. **Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan**. Penerbit ITB. Bandung
- Hart, H. 1983. **Kimia Organik**. Houghton Mifflin Co. Michigan State University. USA. Alih Bahasa Dr. Suminar Achmadi Ph. D. Erlangga. Jakarta.
- Hendayana, S. 2006. **Kimia Pemisahan**. PT Remaja Rosdakarya. Bandung.
- Heriyanto dan L. Limantara. 2006. **Komposisi dan Kandungan Pigmen Utama Tumbuhan Taliputri *Cuscuta australis* R.Br dan *Cassytha filiformis* L**. Makara, Sains, Vol 10 (2) : 69-75.
- Hui, Y. H. 1992. **Encyclopedia of Foods Science & Technology. Vol 2. A** Willey Interscience Publication. John Willey & Sons Inc. New York
- Indriani, H dan Sumarsih. 1992. **Budidaya, Pengolahan dan Pemasaran Rumput**. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Kadi, A dan Atmadja.1996. **Rumput Laut, Jenis, Reproduksi, Budidaya dan Pasca Panen**. Seri sumber daya alam no 141. Puslitbang Oceanologi LIPI Jakarta
- Kusmardiyani, S. dan A. Nawawi. 1992. **Kimia Bahan Alam**. Universitas Bidang Ilmu Hayati. Jakarta.
- Lenny, S. 2006. **Isolasi dan Uji Bioaktivitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metode Uji Brine Shrimp**. USU repository
- Limantara, L dan P. Rahayu. 2008. **Sains dan Teknologi Pigmen Alami**. Prosiding Sains dan Teknologi Pigmen Alami. Hal: 2-42.
- Maeda, H, T. Tsukui, T. Sashima, M. Hosokawa dan K. Miyashita. 2008. **Seaweed Carotenoid, Fucoxanthin, as a multi-functional nutrient**. Asia Pacific journal of clinical nutrition. 17 Suppl (1) hal :196-199.
- Mu'amar, Hamim Ahmad. 2009. **Studi Termostabilitas Pigmen Fukosantin, Klorofil a dan Ekstrak Kasar *Padina australis* dan *Sargassum polycystum* Terhadap Suhu dan Lama Pemanasaan yang Berbeda**. Universitas Brawijaya.Malang.
- Nurdiana, D. N dan L. Limantara. 2008. **Ragam Pigmen Rumput Laut Coklat: Potensi dan Aplikasi**. Departemen Biologi, Universitas Airlangga. Surabaya.
- Nurdiana, D. R, L Limantara dan Susanto AB. 2008. **Komposisi dan Fotostabilitas Pigmen Rumput Laut *Padina australis* Hauck dari kedalaman yang berbeda**.

Pratikno, M. K, S. P. Hastuti, dan L. Limantara. 2004. **Pengaruh Penyimpanan Daun Terhadap Komposisi Pigmen Daun dan Gelatin Cincau Perdu (*Melastoma polyanthum* B).** Prosiding Seminar Nasional Kimia VI Hal : 127-133.

Rahayu, P dan L. Limantara. 2005. **Studi Lapangan Kandungan Klorofil In Vivo Beberapa Tumbuhan Hijau di Salatiga dan Sekitarnya.** Seminar Nasional MIPA.

Sastrohamidjojo, Hardjono, 1991. **Spektroskopi.** Liberty. Yogyakarta.

_____, 2007. **Kromatografi.** Liberty. Yogyakarta.

Sholihah, H. M. 2010. **Uji Afrodisiaka Fraksi Larut Air Ekstrak Etanol 70% Kuncup Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr.& Perry) Terhadap Libido Tikus Jantan.** Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Soviani, H. Soetjipto, dan L. Limantara. 2004. **Komposisi Pigmen Tomat Buah (*Lycopersicum esculentum* Mill) Varietas Arthaloka Selama Pematangan.** Prosiding Seminar Nasional Kima VI Hal : 197-203.

Sudarmadji, S, B. Haryono, dan Suhardi. 1997. **Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian**

Susanto, AB. 2008. **Penelitian Rumput Laut Di Indonesia dan Potensi Pemanfaatan Klorofil.** Prosiding Sains dan Teknologi Pigmen Alami. Hal: 43-50.

Syahputra, Rio, Ferry F. Karwur dan Leenawaty Limantara. 2007. **Analisa Komposisi dan Kandungan Karetenoid Total dan Vitamin A Fraksi Cair dan Padat Minyak Sawit Kasar (CPO) menggunakan KCKT Dektektor PDA.** Jurnal *Nature* Indonesia Hal 89-97

Toto, Z. A. D, P. Rahayu, F. F. Karwur, dan L. Limantara. 2006. **Identifikasi dan Isolasi Pigmen Karotenoid Berbagai Jenis Kuning Telur Unggas.** *Organsime*, Vol I (2) : 100-110.

Vogel, A.I. 1978. **Kimia Analisa Kuantitatif Anorganik.** EGC. Jakarta. Diterjemahkan Pudjaatmaka.

Voight, R. 1994. **Lehrbuch Der Pharmazeutischen Technologie 5th Edition.** (Terjemahan S. Noerono). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

Wanto dan M. Ramli. 1977. **Alat – alat Industri Kimia I.** Departemen Pendidikan Dan Kebudayaan. Jakarta.

Wahyuriyadi. 2009. **Macam Spektrofotometri dan Perbedaanya.** <http://wahyuriyadi.blogspot.com>. Diakses tanggal 31Juli2010

Warsito. 2007. **Metode Isolasi dan Pemurnian Senyawa Metabolit Sekunder Dari Tanaman**. Fakultas MIPA Universitas Brawijaya. Malang.

Wikipedia. 2014^a. **Klorofil**. <http://id.wikipedia.org/wiki/Klorofil>. Diakses tanggal 17 Juli 2014

_____. 2014^b. **Metanol**. <http://id.wikipedia.org/wiki/metanol>. Diakses tanggal 26 Juli 2014.

_____. 2014^c. **Aseton**. <http://id.wikipedia.org/wiki/aseton>. Diakses tanggal 26 Juli 2014.

_____. 2014^d. **Dietil Eter**. <http://id.wikipedia.org/wiki/Dietil-eter>. Diakses tanggal 26 Juli 2014.

_____. 2014^e. **Etil Asetat**. <http://id.wikipedia.org/wiki/Etilasetat>. Diakses tanggal 26 Juli 2014.

_____. 2014^f. **Heksan**. <http://id.wikipedia.org/wiki/heksan>. Diakses tanggal 26 Juli 2014.

_____. 2014^g. **Fraksinasi**. <http://id.wikipedia.org/wiki/Fraksinasi>. Diakses tanggal 4 Mei 2014

_____. 2014^h. **Silika Gel**. http://id.wikipedia.org/wiki/Silika_gel. Diakses tanggal 4 Mei 2014

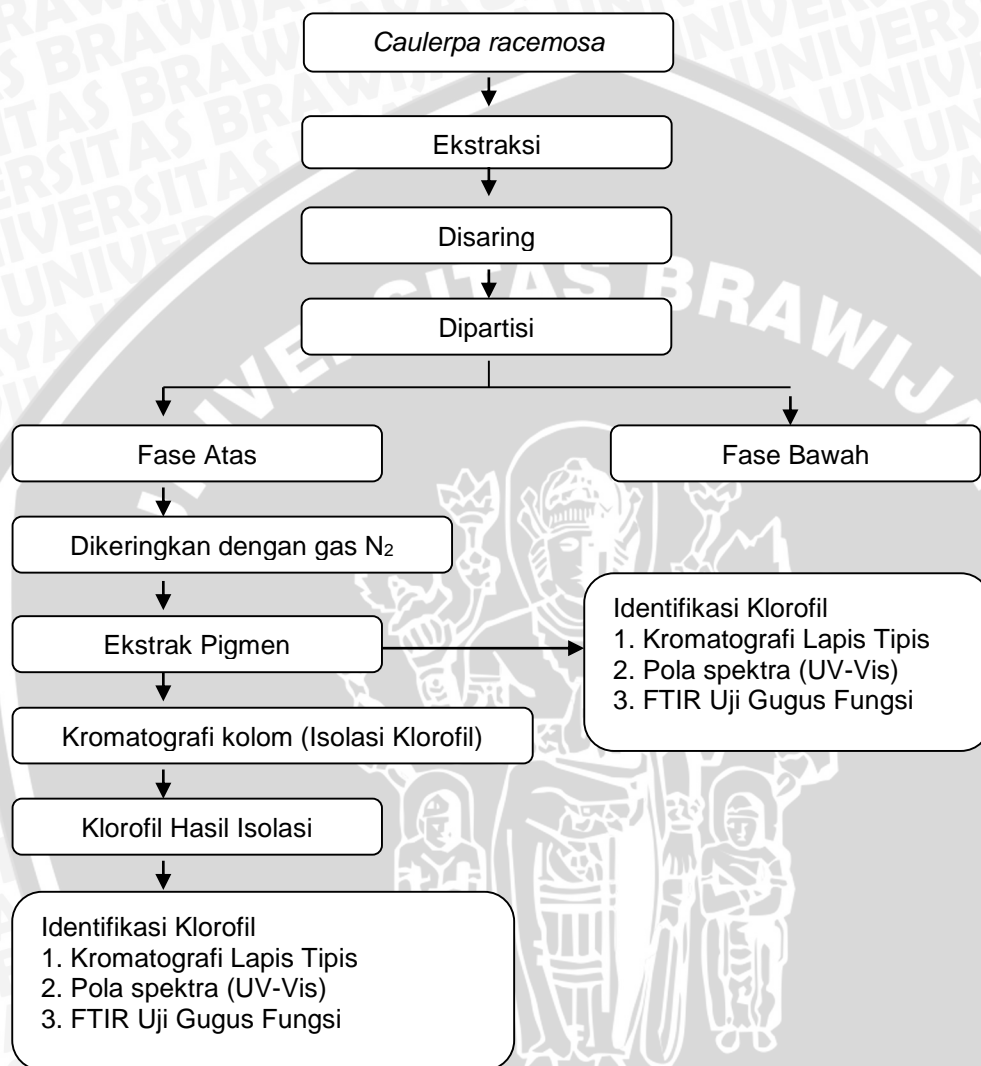
_____. 2014ⁱ. **Gugus Fungsional**. http://id.wikipedia.org/wiki/Gugus_fungsional. Diakses tanggal 3 juni 2014

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

Yanti, S.D.P. 2011. **Sintesis Silika Gel Dari Abu Sekam Padi dengan Ammonium Karbonat**. Universitas Diponegoro. Semarang.

Yunizal. 1999. **Teknologi Pengolahan Alginat**. Badan Riset Kelautan dan Perikanan. Jakarta

Prosedur Penelitian



Lampiran 2. Gambar Proses Penelitian



(A)



(B)



(C)



(D)



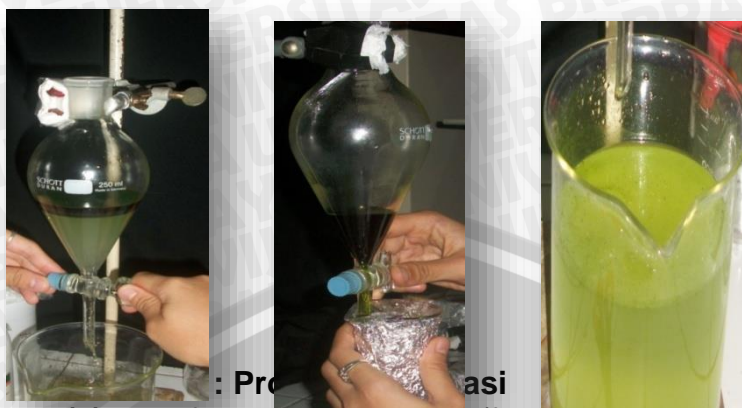
(E)



(F)

Gambar 2: Proses Ekstraksi

- (a) : pencucian alga hijau
- (b) : pengeringan alga hijau
- (c) : penambahan CaCO_3
- (d) : penghalusan alga hijau
- (e) : penambahan pelarut
- (f) : proses maserasi



: Proses Ekstraksi

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

Gambar 3 : Proses Evaporasi dan pengeringan sampel dengan



N₂

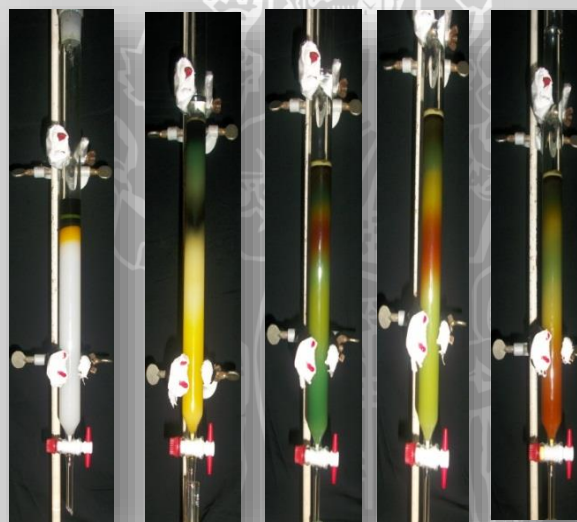


Gambar 4 : Perbandingan antara saturasi garam, dietil etel, air dan filtrat



Gambar 5 : Proses Preparasi Kolom

- (a) : Penimbangan *silica gel*
- (b) : Distirer selama \pm 1jam
- (c) : Persiapan kolom



Gambar 6 : Proses Kromatografi Kolom

Lampiran 3. Prosedur Analisa FTIR (Hadik, 2008)

- Pembuatan Pelet KBr

KBr yang digunakan yaitu jenis Spektro Grade, langkah pertama KBr dioven pada suhu $105^{\circ}\text{C} \pm 1$ jam, selanjutnya ditumbuk halus : apabila sampel padat maka langsung dicampurkan ke dalam KBr tersebut serta ditumbuk halus bersama KBr, dengan perbandingan KBr : Sampel (10:1). Setelah KBr ditumbuk halus kemudian dicetak/dipres pada alat pengepresan pellet siap diukur pada FT-IR, namun apabila sampel cair maka setelah KBr menjadi pellet barulah sampel ditetaskan (antara 2-3 tetes), dan siap diukur pada FT-IR.

Prosedur penggunaan FTIR – 8400S SHIMADZU (Hadik, 2008).

- Tahap Awal

FTIR di hubungkan pada sumber tegangan 220 volt, selanjutnya dinyalakan alat FT-IR dengan menekan tombol ON diikuti dengan menyalakan komputer, dipilih program [IR SOLUTION] dan di klik 2x pada program [IR SOLUTION] untuk masuk ke dalam program. Dilanjutkan memilih menu [MEASUREMENT] yang ada pada *Function Tabs*, dan memilih menu [MEASUREMENT] yang ada pada *Menu Bar* dengan mengklik [INITIALIZE] kemudian TUNGGU sampai computer terhubung dengan alat FTIR.

- Pengukuran Sampel

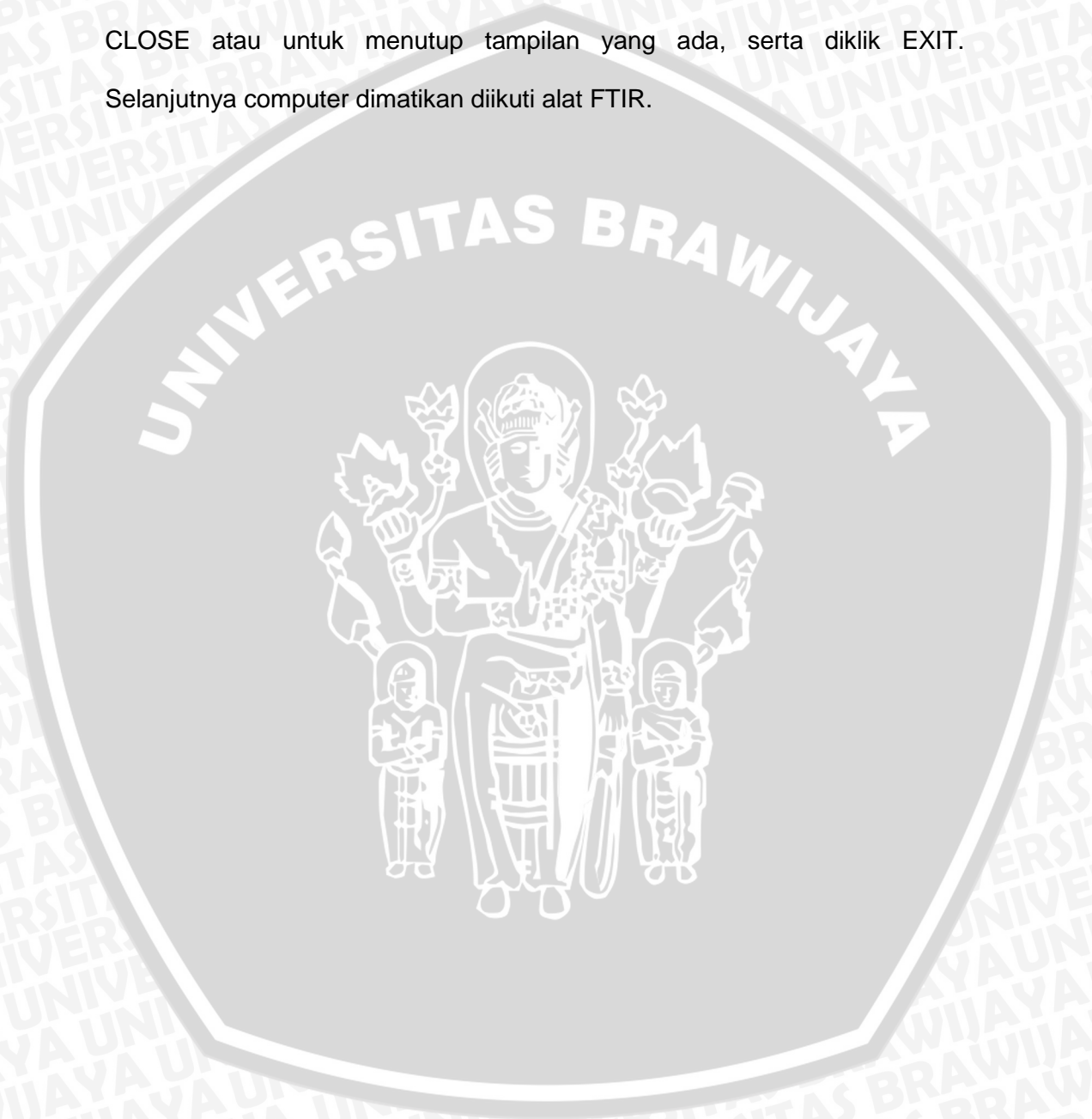
Sebelum dilakukan pengukuran sampel, *Sample Compartment* (ruangan didalam alat yang disediakan untuk tempat sampel) dikosongkan terlebih dahulu dan diklik background [BKG] serta ditunggu hingga proses scanning selesai. Langkah selanjutnya membuka *sample compartment* dan masukkan sampel, kemudian ditutup alat FT-IR dan tunggu hingga proses scanning

selesai. Untuk mencetak hasil, klik menu FILE dan dipilih PRINT selanjutnya dipilih bentuk TEMPLATE yang diinginkan dan tekan ENTER.

- Tahap Akhir

Untuk keluar dari program IR Solution, diklik menu FILE dan dipilih CLOSE atau untuk menutup tampilan yang ada, serta diklik EXIT.

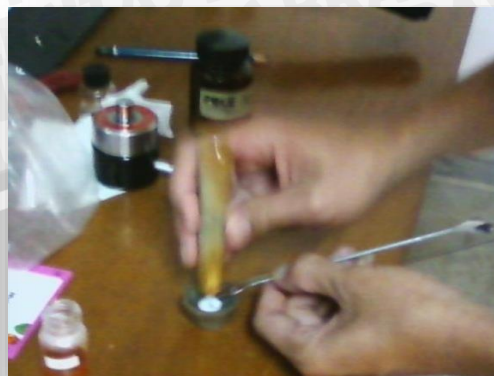
Selanjutnya computer dimatikan diikuti alat FTIR.



Lampiran 4. Gambar Proses Pembuatan Pellet KBr



a. Proses pengambilan Sampel



b. Proses Pencampuran Sampel dengan KBr



c. Pemasukan Sampel ke dalam tabung Menjadi Pekat



d. Pematatan Sampel Pellet



e. Sampel Telah dipadatkan



f. Identifikasi Gugus fungsi dengan FTIR

Lampiran 5. Pembuatan Saturasi Garam

Garam grosok 300 g

Dilarutkan dengan air ledeng 600 ml

Disaring dengan kapas

Disaring dengan kertas saring kasar

Disaring dengan kertas saring halus

Larutan saturasi garam dapur



Lampiran 6. Pembuatan Larutan

Larutan Ekstraksi

Metanol : Aseton (7 : 3 v/v) dalam 450 ml

$$\text{Metanol} = \frac{7}{10} \times 450 \text{ ml} = 315 \text{ ml}$$

$$\text{Aseton} = \frac{3}{10} \times 450 \text{ ml} = 135 \text{ ml}$$

Larutan Kolom

- Heksan : Etil Asetat (8 : 2 v/v) dalam 200 ml

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

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

- Heksan : Etil Asetat (7 : 3 v/v) dalam 200 ml

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

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

- Heksan : Etil Asetat (6 : 4 v/v) dalam 200 ml

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

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

- Heksan : Etil Asetat (5 : 5 v/v) dalam 200 ml

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

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

Larutan KLT

Heksan : Aseton (7 : 3 v/v) dalam 5 ml

$$\text{Heksan} = \frac{7}{10} \times 5 \text{ ml} = 3,5 \text{ ml}$$

$$\text{Aseton} = \frac{3}{10} \times 5 \text{ ml} = 1,5 \text{ ml}$$

Pengukuran Rendemen

Untuk mengetahui kandungan klorofil a yang dapat digunakan maka dilakukan perhitungan rendemen. Rendemen adalah presentase produk yang didapatkan dari perbandingan berat awal bahan dengan berat akhirnya, sehingga dapat diketahui kehilangan beratnya pada proses pengolahan. Rendemen didapatkan dengan cara (menghitung) menimbang berat akhir bahan yang dihasilkan dari proses dibandingkan dengan berat bahan awal sebelum mengalami proses (Pereira,2009). Pigmen yang telah diketahui nilai absorbansinya dikonversi menggunakan hukum "Lambert-Beer" yaitu $A = \epsilon bc$.

Keterangan A : Absorbansi

ϵ : Absorptifitas molar

b : Lebar bagian kuvet dalam

c : Konsentrasi (molar)

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

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

Rendemen adalah berat akhir setelah perlakuan. Menurut Hanum (2000), perhitungan rendemen berdasarkan berat/volume input dan output yang dihasilkan proses ekstraksi (ekstrak atau konsentrasi).