

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rumput laut tergolong dalam anggota *alga* (tumbuhan yang memiliki zat hijau daun atau biasa disebut klorofil). Rumput laut secara umum berdomisili di perairan dangkal dan melekatkan diri pada karang yang mati. Rumput laut sendiri digolongkan menjadi empat kelas, yaitu: *Rhodophyceae* (alga merah), *Phaeophyceae* (alga coklat), *Chlorophyceae* (alga hijau) dan *Cyanophyceae* (alga biru hijau) (Kadi, 2008 dalam Megayana et al., 2011).

Rumput laut coklat adalah satu dari banyak sumber daya alam yang berasal dari laut dan memiliki kelimpahan tumbuh secara alami di Indonesia khusus perairan Madura. Tetapi potensi rumput laut tersebut belum dimanfaatkan secara optimal untuk saat ini. Umumnya rumput laut coklat memiliki tiga kandungan jenis hidrokoloid, yaitu: agar-agar, alginat dan karagenan yang berfungsi sebagai bahan baku dalam industri makanan, kosmetik dan obat-obatan medis (Limantara dan Heriyanto, 2011).

Menurut Lessy et al., (2013), alga coklat jenis *Turbinaria* adalah salah satu dari banyak sumberdaya laut yang bisa dijumpai pada perairan Indonesia dan masuk kedalam golongan tumbuhan talus (*Thallophyta*). Kelimpahan dari *Turbinaria* bisa di eksplorasi menjadi bahan farmasi dan bermanfaat untuk antikoagulasi atau koagulasi pada darah manusia.

Menurut Limantara dan Heriyanto (2011), komposisi kandungan pigmen yang tersusun dari rumput laut coklat berpengaruh pada warna rumput laut tersebut. Dari masing-masing jenis rumput laut coklat memiliki kandungan pigmen yang berbeda. Pigmen (warna alami) penyusun dari rumput laut coklat berasal dari kelompok klorofil serta turunannya, kelompok karotenoid polar (santofil), serta kelompok karotenoid non polar (karoten). Klorofil a pada pigmen berwarna

hijau kebiruan adalah pigmen utama dalam proses fotosintesis tumbuhan, tetapi hanya karotenoid yang sebagai pigmen pelengkap. Menurut Yahya (2003), molekul pigmen tumbuhan memantulkan foton (partikel) tampak warna hijau dengan ketentuan panjang gelombang. 12 molekul pigmen berbeda akan memantulkan warna lain pada panjang gelombang berbeda berdasarkan sifat dari molekul, sehingga akan menyebabkan reaksi kimia berbeda pula.

Menurut Sudariastuty (2011), rumput laut berdasarkan strukturnya karagenan digolongkan menjadi tiga yaitu; kappa, iota dan lambda karagenan. Kandungan yang terdapat pada rumput laut adalah mineral esensial (besi, iodin, aluminium, mangan, calcium, nitrogen dapat larut, fosfor, sulfat, silicon, rubidium, titanium, strontium, chlor, barium, copper, cobalt, boron, kalium, dan unsur-unsur lainnya), asam amino, asam nukleat, protein, mineral, trace elements, gula, tepung, dan vitamin.

Menurut Muthalib (2009) *dalam* Ai dan Banyo (2011), klorofil merupakan pigmen penyumbang warna hijau untuk tumbuhan, alga serta bakteri fotosintetik. Pigmen tersebut memiliki peranan pada proses fotosintesis tumbuhan dengan cara menyerap dan merubah energi cahaya menjadi energi kimia. Klorofil memiliki rantai fitil ($C_{20}H_{39}O$) yang berubah menjadi fitol ($C_{20}H_{39}OH$) jika bersentuhan dengan air pada katalisator klorofilase. Fitol merupakan alkohol primer jenuh yang memiliki daya afinitas yang lebih kuat terhadap O_2 pada kelangsungan proses reduksi klorofil.

Berdasarkan kandungan gizi dan mineral, rumput laut dimanfaatkan sebagai pembuatan obat-obatan, kosmetik, bahan baku pembuatan macam olahan dan makanan berserat tinggi, sehingga mampu menurunkan kadar kolesterol darah. Selain itu, serat dari rumput laut dapat berfungsi untuk mencegah benjolan dan luka pada usus yang mengakibatkan susah buang air

besar. Rumput laut juga memiliki nilai ekonomis dari hasil olahan tersebut, misalnya: karagenan, agar-agar, alginate, dodol, dan lain-lain (Ariyadi, 2004).

Beberapa metode telah dilakukan dalam identifikasi komponen pigmen alga coklat *Turbinaria conoides*. Menurut Nurhamidah (2005), metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) adalah teknik kromatografi cair kinerja tinggi berasal dari kromatografi kolom klasik, metode ini sensitif dan akurat secara kuantitatif serta untuk pemisahan senyawa yang tidak gampang menguap. Keuntungan dari HPLC dibanding metode konvensional, seperti: analisa waktu yang cepat, biaya rendah dan menganalisa sampel tidak stabil.

1.2 Perumusan Masalah

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

- Belum teridentifikasi komponen molekul pigmen alga coklat *Turbinaria conoides* menggunakan metode HPLC?
- Belum diketahui masing-masing kandungan isolat pigmen alga coklat *Turbinaria conoides*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Mengetahui masing-masing jenis komponen molekul pigmen alga coklat *Turbinaria conoides* menggunakan metode HPLC.
- Mengetahui masing-masing kandungan isolat pigmen alga coklat *Turbinaria conoides*.

1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan data dan informasi terbaru mengenai masing-masing jenis komponen molekul pigmen alga coklat

Turbinaria conoides menggunakan metode HPLC, dan masing-masing kandungan isolat pigmen alga coklat *Turbinaria conoides* sehingga dapat dijadikan sebagai pembandingan dari penelitian terdahulu serta acuan untuk penelitian terkait di masa mendatang.

1.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai April 2015 di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Perekayasaan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Ilmu Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang, dan Laboratorium *Ma Chung Research Centre for Photosynthetic Pigments* (MRCPP) Universitas Ma-Chung Malang.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pigmen

Pigmen merupakan molekul khusus yang dapat memunculkan warna dengan cara menyerap cahaya matahari dan memantulkannya pada panjang gelombang tertentu. Tiap molekul pigmen yang berbeda akan menimbulkan reaksi yang berbeda sehingga warna dan panjang gelombang yang dipantulkan juga berbeda. Pigmen alami dapat diperoleh dari tumbuhan atau hewan, baik secara langsung maupun pemanasan, penyimpanan atau pemrosesan. Struktur kimia pigmen tumbuhan dapat diklasifikasikan menjadi 5 famili yaitu tetrapirel (klorofil), karotenoid (β -karoten), flavonoid (antosianin), senyawa fenolik (teaflavin) dan n-heterosiklik (betalain) (Anam, 2014).

Menurut Sedjati *et al.*, (2012), organisme autotrof mempunyai pigmen utama, yaitu: pigmen klorofil dan dua pigmen pelengkap yaitu karotenoid dan fikobiliprotein/fikobilin. Karotenoid dibagi menjadi dua: kelompok pigmen karoten dan xantofil. Fikobilin dibagi menjadi empat: fikoeritrobin, fikosianobilin, fikoeritrosianin, dan fikourobilin. Berdasarkan tingkat kepolaran dan kelarutannya pigmen dikelompokkan dalam golongan pigmen polar (hidrofilik) dan non polar (lipofilik). Klorofil dan karotenoid termasuk pigmen yang non polar, sehingga harus diekstrak menggunakan pelarut organik (metanol, etanol, aseton) dengan kepolaran berbeda.

Ganggang coklat juga sangat potensial seperti *Sargassum* dan *Turbinaria* karena mempunyai komponen pigmen beta carotene, klorofil a dan b, filakoid, fukosantin, violasantin, pirenoid dan kelebihan cadangan makanan seperti laminarin, dinding selnya terdapat pada selulosa dan algin. Berdasarkan strukturnya karagenan digolongkan menjadi tiga yaitu; kappa, iota dan lambda karagenan. Kandungan yang terdapat pada rumput laut adalah mineral esensial

(besi, iodin, aluminium, mangan, calcium, nitrogen dapat larut, fosfor, sulfat, silikon, rubidium, titanium, strontium, chlor, barium, copper, cobalt, boron, kalium, dan lainnya) (Sudariastuty, 2011). Menurut Limantara dan Heriyanto (2010), anteraxantin adalah pigmen khas yang berasal dari golongan karotenoid pada *P. australis* dan *T. conoides*.

2.2 Rumput Laut

Rumput laut merupakan makroalga yang hidup di perairan payau atau laut dan digolongkan ke dalam organisme fotosintetik tingkat rendah karena tidak memiliki akar, batang dan daun sejati (Nurdiana *et al.*, 2008). Seluruh bagian rumput laut disebut *thallus*, sehingga dapat digolongkan sebagai tanaman tingkat tinggi. Talus berbentuk macam-macam pada rumput laut, seperti: tabung, pipih, gepeng, bulat dan lain-lain. *Thallus* rumput laut tersusun dari satu sel disebut uniseluler atau banyak sel disebut multiseluler (Suparmi dan Sahri, 2009).

Menurut Nawaly *et al.*, (2013), secara garis besar rumput laut memiliki kandungan serat, protein, lemak, vitamin dan mineral. Selain itu, memiliki polisakarida seperti alginat dan karaginan yang merupakan komponen dari rumput laut. Diperjelas oleh Ariyadi (2004), berdasarkan kandungan gizi dan mineralnya, rumput laut dapat dimanfaatkan sebagai pembuatan pupuk organik, campuran obat-obatan serta bahan tambahan kosmetik. Kandungan gizi rumput laut dalam setiap 100 gram, yaitu: karbohidrat 54,3% - 73,7% dan protein 0,3% - 5,9%. Serta beberapa mineral sebagai berikut: calcium, natrium, larutan ester, vitamin (A, B, C, D, E), serta iodium.

Menurut Limantara dan Heriyanto (2010), rumput laut dapat dikelompokkan berdasarkan warna talusnya, yaitu: *Chlorophyta* (alga hijau), *Phaeophyta* (alga cokelat) dan *Rhodophyta* (alga merah). Winarno, *et al.* (1980),

melaporkan bahwa sebagian besar pigmen tanaman terkumpul di dalam sel-sel tenunan, misalnya khlorofil yang terdapat dalam kloroplas.

2.2.1 Rumput Laut Cokelat

Alga coklat memiliki nama lain yaitu gulma air laut yang menyebabkan tubuhnya besar dan sering mendominasi perairan. Ketinggian alga dapat mencapai 100 m. Dinding sel terdiri dari selulosa serta dilapisi oleh gelatin, disebut juga algin. Algin memiliki peranan dalam melindungi talus alga dari getaran gelombang perairan dan kekeringan saat air surut. Alga coklat mempunyai kantung udara yang berfungsi agar mengapung (Karmana, 2008).

Menurut Limantara dan Heriyanto, (2010), warna dari *thallus* alga coklat adalah campuran pigmen golongan klorofil dan golongan karotenoid. Banyaknya warna *thallus* pada spesies alga coklat dipengaruhi komposisi dan kandungan pigmen utama proses fotosintetik. Fukosantin adalah karotenoid utama pada alga coklat. Menurut Palallo (2013), faktor lingkungan berperan sangat penting dalam mendeteksi keberadaan makroalga, diantaranya: suhu, salinitas, kedalaman, nitrat (NO_3), dan fosfat. Menurut Balboa *et al.*, (2012), beberapa unsur utama yang terkandung dalam rumput laut coklat antara lain polisakarida, senyawa fenolik, terpenoid, sterol, protein, peptida, asam lemak tak jenuh, vitamin, dan pigmen.

Menurut Karmana (2008), ciri-ciri alga coklat bereproduksi secara asexual dan seksual melalui pergantian keturunan. Dalam keadaan tertentu, generasi gametofit dan sporofit mempunyai bentuk yang sama (isomorfik) dan pada keadaan lain berbentuk beda (heteromorfik). Sel-sel alga coklat mempunyai klorofil, xantofil, karoten, dan fukosantin. Fukosantin adalah pigmen berwarna coklat keemasan. Dalam banyak percobaan fukosantin lebih dominan daripada pigmen jenis lain.

2.2.2 Komposisi Kimia Rumput Laut Coklat

Dinding sel rumput laut coklat mengandung senyawa polisakarida seperti laminaran dan fukoidan yang tergolong dalam serat larut. Laminaran merupakan bentuk polisakarida utama yang terkandung pada alga, sedangkan fukoidan mempunyai peran untuk melindungi rumput laut dari desikasi. Polisakarida pada rumput laut dilaporkan mempunyai aktifitas sebagai antioksidan, antibakteri, anti tumor, anti viral dan anti koagulan (Moroney *et al.*, 2013). Komposisi kimia rumput laut coklat dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi kimia rumput laut coklat

No.	Komposisi Kimia	Jumlah (%)
1	Serat kasar	28,39
2	Karbohidrat	19,06
3	Air	11,71
4	Protein	5,53
5	Lemak	0,74
6	Abu	34,54

Sumber: Yunizal (1999).

2.2.3 *Turbinaria conoides*

Menurut Yenus *et al.*, (2014), *turbinaria conoides* adalah alga coklat (*Phaeophyta*) yang mempunyai pigmen yang terdapat pada organel sel yang disebut dengan plastida. Menurut Sanger (2014), *Turbinaria conoides* juga mempunyai kemampuan sebagai antioksidan atau penangkal radikal bebas, dan mengandung golongan pigmen karotenoid, yaitu fukosantin. *Turbinaria sp.* Memiliki aktivitas antioksidan dan anti inflamasi. Spesies ini mempunyai senyawa nutrisi esensial yaitu; garam mineral (K, Ca dan Fe), serat larut, protein.

Jenis-jenis makro alga ada yang memiliki sifat hidup musiman dan tergantung dari kondisi habitat. *Turbinaria* lebih cenderung hidup menempel pada habitat karang mati. Pada musiman tertentu akan muncul dan meletakkan *thalus* pada habitatnya, kemudian pada saat-saat tertentu menghilang karena

telah tumbuh dewasa (Papalia dan Arfah, 2013). Klasifikasi *Turbinaria conoides* menurut Zipcodezoo (2011), adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Chromista
Phylum	: Ochrophyta
Class	: Phaeophyceae
Ordo	: Fucales
Family	: Sargassaceae
Genus	: Turbinaria



Gambar 1. Rumpun laut coklat *Turbinaria conoides*

Turbinaria conoides memiliki bentuk batang silindris, kasar, tegak dan terdapat bekas percabangan. Holdfast yaitu cakram berbentuk kecil terdapat akar yang berekspansi radial. Percabangan disekeliling putaran batang utama. *Thallus* daun adalah kesatuan yang terdiri atas tangkai serta lembaran *thallus* daun yang berukuran kecil, diameter satu sentimeter, berbentuk setengah lingkaran seperti ginjal, tepian daun yang bergerigi. Gelembung udara sedikit menonjol ditengah daun Receptacle, membentuk rangkaian tangkai pada *thallus* daun. Warna *thallus* coklat tua atau coklat muda dengan tinggi hingga 75 cm (Palallo, 2013).

2.3 Ekstraksi Pigmen

Ekstraksi merupakan salah satu metode pemisahan satu atau lebih komponen dari bahan yang merupakan sumber dari komponen tersebut (Wardani, 2008). Proses ekstraksi terdiri tiga langkah, yaitu: pencampuran, pembentukan fase setimbang dan pemisahan fasa setimbang. Beberapa faktor yang berpengaruh pada proses ekstraksi, yaitu: temperatur, ukuran partikel, perbandingan pelarut, waktu kontak, waktu dekantasi dan pengadukan (Yasita dan Rachmawati, 2009). Tujuan ekstraksi adalah memisahkan suatu komponen dari senyawa campurannya dengan cara menggunakan pelarut (Purwani, *et al.*, 2008).

Septiana dan Asnani (2012), prinsip dari ekstraksi adalah pemisahan komponen dalam bahan yang diekstrak dengan pelarut tertentu. Proses ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa atau bahan tertentu yang mengandung komponen aktif. Terdapat beberapa metode yang digunakan dalam proses ekstraksi, antara lain ekstraksi dengan pelarut, destilasi, pengepresan mekanik, dan sublimasi.

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

2.3.1 Maserasi

Maserasi dalam bahasa latin *Macerace* yang artinya mengairi dan melunakkan (Istiqomah, 2013). Maserasi merupakan proses pengekstrakan paling sederhana menggunakan pelarut dengan pengadukan pada suhu ruang (kamar). Sedangkan maserasi kinetik dilakukan dengan cara pengadukan terus-menerus. Remaserasi berarti pengulangan penambahan solut (pelarut) yang telah dilakukan penyaringan dari maserasi pertama dan seterusnya (Wulandari, 2011).

Menurut Akbar (2012), ada beberapa metode ekstraksi padat-cair seperti metode maserasi, tekanan tinggi, soklet dan gelombang mikro. Dalam proses maserasi sampel sangat dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan, lama waktu perendaman, serta perlakuan tambahan berupa perlakuan fisik seperti penumbukan yang dapat memberikan efektifitas tinggi terhadap proses ekstraksi sampel. Menurut Winarno, et al. (1980), jika sel-sel mengalami pukulan mekanik kemudian pecah, maka pigmen akan keluar dan sebagian dapat mengalami kerusakan akibat teroksidasi saat kontak dengan udara.

Prinsip maserasi adalah penyarian zat aktif dengan cara merendam secara sederhana dalam cairan selama 24 jam pada suhu ruang (kamar) dan tidak terkena cahaya, cairan penyari masuk dalam sel terlebih dahulu melewati dinding sel. Isi sel akan terlarut akibat perbedaan konsentrasi di dalam dan luar sel. Larutan dengan konsentrasi tinggi akan keluar dan tergantikan oleh cairan yang konsentrasi rendah disebut proses difusi. Endapan yang didapatkan dipisah dan filtratnya akan dipekatkan (Wulandari, 2011).

2.3.2 Fraksinasi (Partisi)

Fraksinasi adalah proses pemisahan fraksi yang terkandung dari suatu larutan atau suspensi dengan karakteristik berbeda (Yuliasih et al., 2013). Istilah

fraksinasi seringkali digunakan untuk menggambarkan pemisahan suatu senyawa di antara dua medium yang tidak saling melarutkan (Sudarmadji, 1997). Fraksinasi atau partisi disebut juga penyarian cair-cair, yaitu proses pemisahan di mana suatu zat terbagi dalam dua pelarut yang tidak bercampur. Komponen yang difraksinasi akan terdistribusi dalam dua pelarut berdasarkan perbedaan koefisien partisi. Umumnya proses fraksinasi dilakukan menggunakan corong pisah (Sholihah, 2010). Menurut Romiyanto (2014), pemisahan pada proses fraksinasi didasarkan bobot tiap fraksi, dimana fraksi berat molekul ringan berada di atas dan fraksi dengan berat molekul tinggi akan berada di bawah. Dalam proses fraksinasi biasanya digunakan pelarut organik seperti eter, aseton, benzena, etanol, diklorometana, atau campurannya.

Menurut Sari (2012), prinsip fraksinasi yaitu proses penarikan senyawa dari suatu ekstrak menggunakan dua pelarut yang berbeda dan saling tidak tercampur. Proses fraksinasi dilakukan dengan ekstraksi cair dan pengocokan menggunakan suatu corong pisah, pada proses ini pemisahan senyawa didasarkan sifat kepolaran. Senyawa polar larut dalam sifat pelarut polar dan senyawa non polar larut dalam sifat pelarut non polar.

2.3.3 Evaporasi

Evaporasi (penguapan) atau pemekatan merupakan proses perpindahan panas dan massa secara simultan. Sebagian pelarut akan diuapkan sehingga diperoleh suatu produk yang kental (konsentrat). Kecepatan penguapan dipengaruhi oleh efektifitas pindah panas dan pindah massa. Penguapan terjadi apabila suhu bahan sama atau lebih tinggi dari titik didih cairan. Pada produk sensitif terhadap suhu tinggi, titik didih cairan atau pelarut harus diturunkan sehingga lebih rendah dari titik didih pada kondisi normal. Menurunkan titik didih pelarut atau cairan dilakukan dengan menurunkan tekanan di atas permukaan

cairan menjadi lebih rendah dari tekanan atmosfer atau disebut vakum (Joharman, 2006). Rotary evaporator dapat dilihat di Gambar 2.



Gambar 2. Rotary evaporator
Sumber: Distantina, et al. (2006)

Pemekatan dengan *rotary evaporator* merupakan teknik pemekatan ekstrak tanpa merusak senyawa yang diisolasi dari ekstrak karena rangkaian alat ini menggunakan pompa vakum sehingga di dalam evaporator terjadi pengurangan tekanan yang menyebabkan pelarut dapat menguap di bawah titik didihnya (Siadi, 2012). Menurut Frayekti (2012), alat yang digunakan dalam proses evaporasi dinamakan evaporator. Evaporator memiliki prinsip dasar berupa penukaran panas dan pemisahan uap yang terbentuk dari cairan pelarut.

2.3.4 Gas Nitrogen

Menurut Romiyanto (2014), nitrogen adalah sebuah senyawa dengan simbol N memiliki unsur atom 7 pada sistem periodik, di udara sekitar komposisinya mencapai 70% pada suhu dan tekanan standar, selanjutnya kandungan yang lain adalah oksigen dan gas yang lebih kecil lainnya. Nitrogen sendiri merupakan gas inert, sebuah zat yang independen, tidak mudah bereaksi dengan unsur atau senyawa yang lain. Berbentuk gas, tidak berwarna, tidak berbau dan tidak berasa. Memiliki titik lebur -196°C dan di proses di kilang

ASP (*Air Separation Plant*) berdasarkan titik leburnya. Prinsip penguapan pelarut dengan menggunakan gas nitrogen ialah molekul N_2 berikatan kovalen rangkap tiga dengan energi ikatan tinggi bereaksi dengan molekul pelarut, selain itu nitrogen bereaksi dengan hidrogen atau oksigen pada suhu tinggi (Romiyanto, 2014). Sifat fisika gas nitrogen dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Sifat Fisika Gas Nitrogen

No.	Karakteristik	Gas Nitrogen
1.	Nama kimia	Nitrogen (N_2)
2.	Massa jenis	(0°C; 101,325 kPa) 1.251 g/L
3.	Titik lebur	63.15 K (-210.00°C, -346.00°F)
4.	Titik didih	77.36 K (-195.79°C, -320.42°F)
5.	Titik kritis	126.21 K, 3.39 MPa
6.	Berat jenis relative	0.97
7.	Berat molekul	28.013
8.	Kalor penguapan	(N_2) 5.57 kJ/mol
9.	Kapasitas kalor	(25°C) (N_2) 29.124 J/(mol K)

Sumber: Romiyanto, (2014).

2.4 Pelarut Ekstraksi

Larutan adalah campuran homogen terdiri dari dua atau lebih zat. Larutan terdiri dari pelarut dan zat terlarut. Pelarut adalah zat larutan dalam jumlah yang besar, sedangkan zat lainnya sebagai zat terlarut. Pelarut yang paling umum dalam kehidupan sehari-hari adalah air. Pelarut lain yang juga umum adalah bahan kimia organik (mengandung karbon) yang juga disebut pelarut organik. Proses ekstraksi, pelarut yang digunakan adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi terhadap zat yang diekstraksi. Daya melarutkan ini berhubungan dengan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang diekstraksi. Terdapat kecenderungan kuat bagi senyawa polar larut dalam pelarut polar, dan

sebaliknya. Prinsip ini disebut *like dissolves like*. Kepolaran pelarut ditunjukkan oleh momen dipol, konstanta dielektrik, dan kelarutannya di air (Romiyanto, 2014). Beberapa sifat-sifat pelarut umum dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Sifat-Sifat Pelarut Umum

Solvent	Rumus Kimia	Titik Didih	Konstanta Dielektrik	Massa Jenis
Pelarut Non-Polar				
Pelarut nonpolar merupakan senyawa yang memiliki konstanta dielektrik yang rendah dan tidak larut dalam air.				
Heksana	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	69°C	2.0	0.655 g/ml
Benzena	C_6H_6	80°C	2.3	0.879 g/ml
Toluena	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_3$	111°C	2.4	0.867 g/ml
Dietil eter	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$	35°C	4.3	0.713 g/ml
Kloroform	CHCl_3	61°C	4.8	1.498 g/ml
Etil asetat	$\text{CH}_3\text{-C(=O)-O-CH}_2\text{-CH}_3$	77°C	6.0	0.894 g/ml
Pelarut Polar Aprotic				
Aprotik adalah molekul tidak mengandung ikatan O-H. Pelarut dalam hal ini, semua memiliki ikatan dipol besar. Biasanya ikatannya adalah ikatan ganda antara karbon dengan oksigen atau nitrogen.				
1,4-Dioksana	$\text{/-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}\backslash$	101°C	2.3	1.033 g/ml
Tetrahidrofuran (THF)	$\text{/-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}\backslash$	66°C	7.5	0.886 g/ml
Diklorometana (DCM)	CH_2Cl_2	40°C	9.1	1.326 g/ml
Asetona	$\text{CH}_3\text{-C(=O)-CH}_3$	56°C	21	0.786 g/ml
Asetonitril (MeCN)	$\text{CH}_3\text{-C}\equiv\text{N}$	82°C	37	0.786 g/ml
Dimetilformamida (DMF)	$\text{H-C(=O)N(CH}_3)_2$	153°C	38	0.944 g/ml
Dimetil Sulfoksida (DMSO)	$\text{CH}_3\text{-S(=O)-CH}_3$	189°C	47	1.092 g/ml
Pelarut Polar Protik				
Protik menunjukkan atom hidrogen yang bisa menyerang atom elektronegatif yang dalam hal ini yaitu oksigen. Dengan kata lain pelarut protik polar adalah senyawa yang mempunyai rumus umum ROH.				
Asam asetat	$\text{CH}_3\text{-C(=O)OH}$	118°C	6.2	1.049 g/ml
n-Butanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	118°C	18	0.810 g/ml
Isopropanol (IPA)	$\text{CH}_3\text{-CH(OH)-CH}_3$	82°C	18	0.785 g/ml
n-Propanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	97°C	20	0.803 g/ml
Etanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	79°C	30	0.789 g/ml
Metanol	$\text{CH}_3\text{-OH}$	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: Romiyanto, (2014).

Bahan-bahan dan senyawa kimia akan mudah larut dalam bahan pelarut yang sama polaritasnya dengan bahan yang akan dilarutkan. Polaritas bahan dapat berubah karena adanya perubahan kimiawi. Secara fisika, tingkat polaritas dapat ditunjukkan dengan lebih pasti melalui pengukuran konstanta dielektrikum suatu bahan pelarut. Semakin besar konstanta dielektrikum suatu bahan pelarut disebut semakin polar (Sudarmadji, *et al.*, 2007). Konstanta dielektrik bahan-bahan pelarut dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Konstanta Dielektrik Bahan-Bahan Pelarut

Bahan Pelarut	Konstanta Dielektrik	Tingkat kelarutan dalam air		
		Tak larut	Sedikit	Misible*
n-heksan	1.89	Tak larut		Non-polar
Petroleum ether	1.90	Tak larut		
Dietilether	3.34		Sedikit	
Etilasetat	6.02		Sedikit	
Aseton	20.70			Misible*
Metanol	33.60			Misible*
Air	80.40			Misible* Polar

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

Keterangan: *Misible artinya dapat bercampur dengan air dalam berbagai proporsi.

Menurut Susanto (1999), jumlah pelarut berpengaruh terhadap efisiensi ekstraksi, tetapi jumlah yang berlebihan tidak akan mengekstrak lebih banyak, dalam jumlah tertentu pelarut dapat bekerja optimal. Indeks polaritas pelarut dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Indeks Polaritas Pelarut

Pelarut	Indeks Polaritas
Heksan (C_6H_{14})	0
Dietileter ($C_4H_{10}O$)	2,8
Etil Asetat ($C_2H_5COOCH_3$)	4,4
Aseton (CH_3COCH_3)	5,1
Metanol (CH_3OH)	5,1
Etanol (C_2H_5OH)	5,2
Air (H_2O)	9,0

Sumber: Watson (2010).

2.4.1 Aseton

Aseton dengan rumus molekul (CH_3COCH_3), yang mempunyai nama lain dimetil keton, dimetil asetat, metil asetat, ketopropan, propanon, piroasetis spirit dan piroasetat eter. Umum digunakan sebagai pelarut karena bersifat higroskopis, sangat volatil, bau ringan, tidak ber-residu dan gampang terbakar. Berat molekul aseton 58,1 g/mol dan titik leleh $-94,6^\circ\text{C}$; titik didih $56,1^\circ\text{C}$ (Arindah, 2010). Sifat-sifat aseton dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Sifat-Sifat Aseton

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

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

Menurut Ambo (2012), Aseton memiliki atom hidrogen α sifat asam. Karena itu terionisasi dapat menghasilkan ion enolat yang berada dalam dua bentuk, yakni: keto dan enoul. Ditambahkan oleh Schelfan *et al.*, (1983), kegunaan lain dari aseton adalah sebagai pelarut senyawa asetilen, bahan campuran resin, campuran adesif, parfum, pembersih dan lain sebagainya.

2.4.2 Metanol

Metanol (*Methyl Alkohol*) dengan rumus molekul (CH_3OH) yang berupa cairan tanpa warna. Dengan densitas 0,79 gram/mL; titik leleh -98°C , titik didih 64°C . Senyawa metanol terbuat dari oksidasi katalitik metana (gas alam) dengan menggunakan udara atau dari karbon monoksida dan oksigen (Arindah, 2010).

Metanol atau metil alkohol merupakan asam lemah turunan yang paling sederhana dari alkohol, mudah menguap dan mudah terbakar dan dapat diubah menjadi formaldehid (Vogel, 1987). Sifat-sifat Metanol dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Sifat-Sifat Metanol

No.	Karakteristik	Metanol
1.	Nama lain	Hidroksi metana, metil alkohol, metil hidrat
2.	Rumus bangun	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.	Titik nyala	11 °C

Sumber: Romiyanto, (2014).

Menurut Susiana (2014), methanol adalah monohidrat yang artinya setiap molekul mengandung satu gugus hidroksil. Ditambahkan oleh Daintith, (2004), dahulu metanol dibuat dari penyulingan kayu sehingga disebut juga sebagai alkohol kayu (*wood alcohol*). Saat ini, senyawa ini dibuat melalui oksidasi katalitik metana dari gas alam. Metanol sering digunakan sebagai pelarut dan dalam pembuatan formaldehid untuk industri plastik dan obat-obatan.

2.4.3 Dietil Eter

Menurut Daintith (2004), dietil eter merupakan cairan volatil (mudah menguap) dan sangat mudah terbakar yang dikenal dengan bau khas dan sifat anestesik-nya. Terkadang dietil eter masih diaplikasikan sebagai bahan anestesik (obat bius) apabila tidak ada bahan-bahan modern yang sesuai. Pembuatan dietil eter merupakan hasil pengembangan dari sintesis di laboratorium. Dalam proses pembuatannya, etanol uap dilewatkan ke dalam campuran etanol jenuh dan asam sulfat pekat pada suhu 140 °C. Dietil eter

(C₄H₁₀O) merupakan bahan kimia organik berbentuk cairan tidak berwarna, sedikit larut dalam air, dan biasa digunakan sebagai reagen dan pelarut. Nama lain dari dietil eter yaitu etil eter, etil oksida, atau etilik eter (Hill, 2003). Sifat-sifat dietil eter dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Sifat-Sifat Dietil Eter

No.	Karakteristik	Dietil Eter
1.	Nama IUPAC	Ethoxyethane 3-oxapentane
2.	Rumus Molekul	C ₄ H ₁₀ O
		
3.	Massa molar	74.12 g/mol
4.	Titik Leleh	-116.3 °C (156.85 K)
5.	Titik didih	34.6 °C (307.75 K)

Sumber: Romiyanto, (2014).

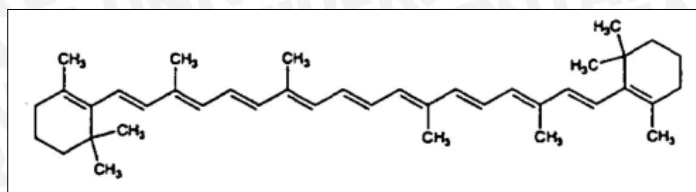
2.5 Jenis Pigmen Rumput Laut

2.5.1 β-karoten

Menurut Akbar (2012), rumus kimia β-karoten adalah C₄₀H₅₆. Menurut Sugesti (2010), β-karoten merupakan salah satu jenis senyawa hidrokarbon dari karotenoid yang termasuk dalam senyawa golongan tetraterpenoid. Ikatan ganda yang ada pada β-karoten menyebabkan menjadi peka terhadap oksidasi. Oksidasi dari β-karoten akan terjadi lebih cepat karena adanya sinar, katalis logam, tembaga, besi dan mangan. β-karoten mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi dan bisa sebagai pro-oksidan.

Menurut Fretes *et al.*, (2012), karotenoid, khususnya β-karoten mempunyai aktifitas antioksidan tinggi dan mampu meminimalisir resiko terserang penyakit jantung, stroke, penyakit kardiovaskuler, resiko kanker paru-paru, payudara serta prostat. Aktivitas antioksidan *trans* β-karoten mempunyai kemampuan lebih tinggi dari *cis* β-karoten. Senyawa dari β-karoten bentuk isomer *trans* memiliki aktifitas provitamin A 100%. β-karoten adalah karotenoid

yang banyak ditemui di alam dan hampir seluruh tanaman mengandung β -karoten. Struktur kimia β -karoten dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur kimia β -karoten
Sumber: Fitriani, 2011

Menurut Novianto, (2010), β -karoten gampang rusak pada kondisi terkena cahaya, suhu panas, dan oksigen ekstrim. β -karoten bersifat tidak larut air dan pelarut organik polar seperti contoh metanol dan etanol. β -karoten termasuk dalam jenis karotenoid yang memiliki aktifitas biologis sebagai provitamin A. β -karoten adalah provitamin A yang sangat potensial, β -karoten ekuivalen dan 2 molekul vitamin A. Menurut Romiyanto, (2014), sifat-sifat dari β -karoten dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Sifat-Sifat β -karoten

No.	Karakteristik	Beta Karoten
1.	Nama kimia	β -Karoten
2.	Rumus bangun	$C_{40}H_{56}$
	Berat molekul	536,87
3.	Titik lebur	180°C – 182°C
4.	Kelarutan	Larut dalam lemak dan Tidak larut dalam air
5.	Kenampakan	Butiran kristal merah gelap (cokelat)

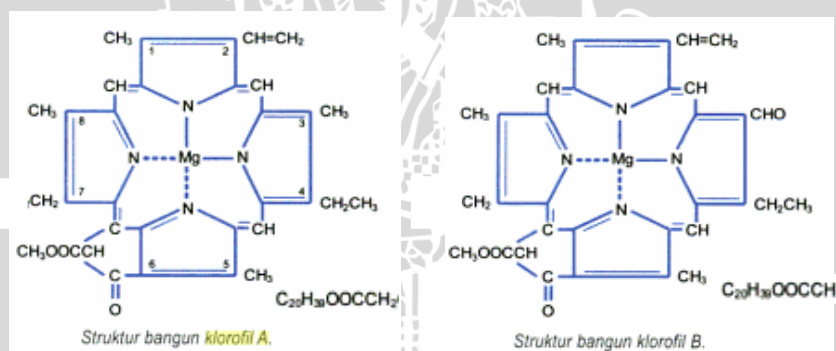
Sumber: Romiyanto, (2014).

2.5.2 Klorofil

Menurut Sumenda *et al.*, (2011), klorofil merupakan pigmen warna hijau yang berada dalam kloroplas. Kloroplas terdapat pada jaringan parenkim palisade dan parenkim spons daun. Fungsi kloroplas sebagai tempat berlangsungnya fotosintesis, pigmen utamanya adalah klorofil, karotenoid dan

xantofil yang terdapat di membrane tilakoid. Pigmen pada membrane tilakoid menyerap cahaya matahari/sumber cahaya lainnya dan akan mengubah energy cahaya menjadi energy kimia bentuk adenosine trifosfat (ATP).

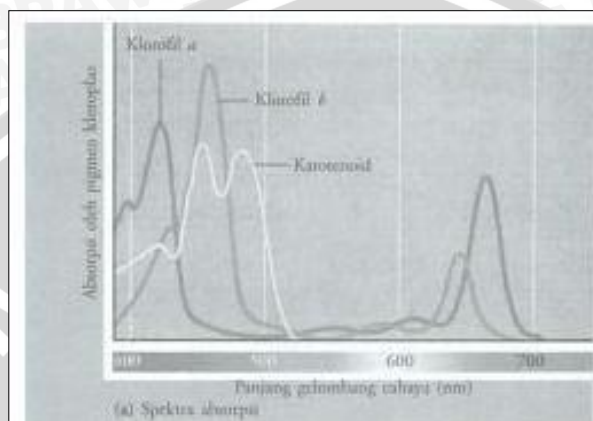
Klorofil a adalah substansi yang tepat untuk menstimulasi terbentuknya singlet oksigen dan merupakan prekursor berpotensi untuk sintesis sensitiser baru. Selain itu, klorofil mempunyai sifat fotofisika yang mirip dengan porfirin. Klorofil memiliki daerah serapan dan intensitas yang besar dibanding porfirin. (Budiyanto *et al.*, 2008). Klorofil a dengan rumus molekul $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ dan klorofil b dengan rumus molekul $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ yang terdapat pada jaringan tanaman dengan perbandingan 3:1. Klorofil a dan b memegang peranan penting proses fotosintesis (Pitojo, 2008). Struktur molekul Klorofil a dan klorofil b dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur molekul Klorofil a dan klorofil b
Sumber: Pitojo (2008)

Sifat fisik dari klorofil adalah menyerap dan memantulkan cahaya menggunakan gelombang berlainan. Klorofil lebih banyak menyerap sinar pada panjang gelombang 400-700 nm, terlebih sinar merah dan biru. Sifat kimiawi klorofil, yaitu: (1) tidak terlarut air, artinya larut dalam pelarut organik yang polar contohnya etanol dan kloroform; (2) inti Mg berpindah menjadi atom H jika suasana asam, sehingga membentuk senyawa *feofitin* berwarna coklat (Dwidjoseputro, 1994 dalam Ai dan Banyo, 2011).

Klorofil *a* mempunyai warna biru kehijauan, sedangkan klorofil *b* mempunyai warna kuning kehijauan. Pigmen aksesoris lainnya yang mendukung seperti: karotenoid, hidrokarbon yang mempunyai warna campuran dari kuning dan jingga (Campbell *et al.*, 2002). Spektra absorpsi dan spektrum aksi untuk fotosintesis dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Spektra absorpsi dan spektrum aksi untuk fotosintesis
Sumber: Campbell *et al.*, (2002)

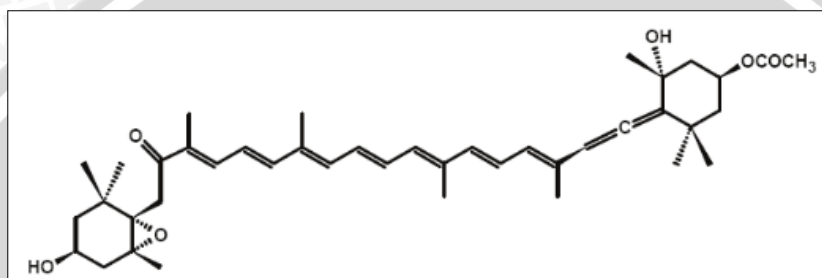
Menurut Nurdiana *et al.*, (2008), pada alga coklat, klorofil *a* memiliki fungsi untuk menangkap cahaya sekitar 99% saat proses fotosintesis dan konsentrasi akan meningkat seiring pematangan *thallus*. Pigmen pendukung lainnya adalah klorofil *c* dan karotenoid yang memiliki fungsi pelindung klorofil *a* karena foto-oksidasi. Fungsi dari klorofil *c* memiliki kesamaan secara alami dengan klorofil *a* dan *b*.

2.5.3 Fukosantin

Fukosantin adalah golongan senyawa karotenoid utama alga coklat, dengan rumus molekul $C_{42}H_{58}O_6$ serta memiliki sifat polar. Fukosantin memiliki struktur kimia yaitu ikatan alenat dan 5,6 monoepoksida dalam bagian molekulnya. Gugus fungsi pada penyusun fukosantin adalah hidroksil (OH) pada gelombang 3483 cm^{-1} , hidrokarbon C-H untuk panjang gelombang 3030-2856

cm^{-1} serta gugus fungsi sebagai ciri khusus terdapat fukosantin yaitu ikatan alenik pada panjang gelombang 1930 cm^{-1} (Zaelani dan Kartikaningsih, 2009).

Menurut Kartikaningsih *et al.*, (2012), kekurangan dari pigmen fukosantin adalah tidak stabilnya pada pH, cahaya, oksigen dan suhu. Pigmen secara luas tidak stabil dalam larutan netral, basa dan larutan asam warnanya bisa memudar sehingga pigmen harus disimpan pada tempat gelap dan bersuhu dingin. Struktur molekul fukosantin dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur molekul fukosantin
Sumber: Nursid *et al.*, (2013)

Fukosantin mempunyai manfaat dibidang kesehatan, antara lain: anti karsinogenik, melindungi sel dari bahan berbahaya, sebagai antioksidan, penghambat sel kanker hati, usus besar, payudara, paru-paru, prostat, lambung, kelenjar getah bening dan antiperadangan. Selain itu, bisa bermanfaat sebagai antiobesitas dalam penghambatan timbunan lemak serta anti diabetes (Limantara dan Heriyanto, 2011).

2.6 Kromatografi

Kromatografi yaitu teknik pemisahan campuran karena perbedaan kecepatan rambat komponen dalam medium tertentu. Kromatografi gabungan dari kata *chroma* yang artinya warna dan *graphein* yang artinya menuliskan. Prinsip pemisahan kromatografi adalah distribusi komponen-komponen pada fase gerak dan fase diam berdasarkan komponen yang dipisahkan (Ardianingsih, 2009).

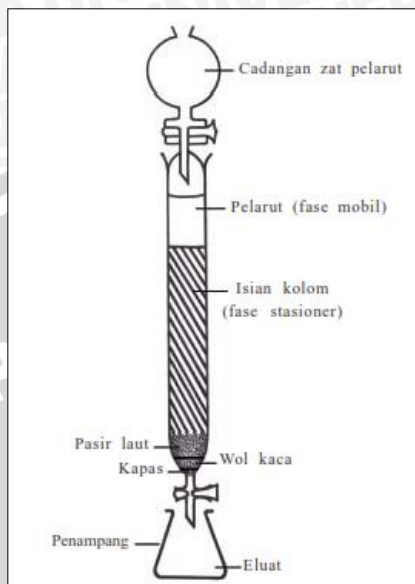
Kromatografi adalah teknik memisahkan komponen dari campuran komponen lain berdasarkan perbedaan interaksinya selama pergerakan melalui fase diam (*stationer*) oleh fase (*mobile*) yang dapat berupa gas ataupun zat cair. Komponen yang tertahan kuat oleh fase diam mengalir bersamaan dengan fase gerak. Dan sebaliknya, komponen yang tertahan lemah oleh fase diam mengalir dengan cepat. Hal ini merupakan akibat perbedaan mobilitas, sehingga komponen sampel terpisah menjadi pita-pita khas atau zona analisis secara kuantitatif dan kualitatif (Santi, 2006).

2.6.1 Kromatografi Kolom

Salah satu contoh penggunaan kromatografi kolom adalah pada pemisahan campuran cair. Sebuah kolom vertikal diisi dengan material absorbent seperti alumina (aluminium oksida) atau *silica gel*. Sampel dimasukkan melalui bagian atas kolom kemudian dialiri menggunakan suatu pelarut. Proses ini disebut sebagai elusi (*elution*), pelarut yang digunakan disebut dengan eluen (*eluent*) dan sampel yang dipisahkan disebut dengan eluat (*eluate*). Apabila komponen yang dipisahkan memiliki warna, akan terlihat pita-pita warna yang menandakan pemisahan sampel di dalam kolom. Komponen-komponen tersebut dipisahkan sesuai dengan keluarnya warna dari bagian bawah kolom (Daintith, 2004).

Menurut Hayani (2007), saat pengisian kolom, bahan pengisi area bawah kolom dimasukkan sedikit kapas, wol kaca dan pasir laut yang kemudian dimasukkan bubuk *silica gel* 70-230 mesh dan tetap diaduk supaya tidak ada rongga udara didalam kolom. Tumpukan bubuk *silica gel* didalam kolom setinggi tiga perempat dari tingginya kolom. Untuk pemisahan komponen dengan kromatografi kolom, pertama-tama dialirkan ekstrak cair, lalu kran dari kromatografi kolom dibuka supaya ekstrak meresap dalam *silica gel* mencapai

batas atas *silica gel*. Setelah itu memasukkan pereaksi secara terus-menerus dan kran kolom dibuka. Fraksi yang sudah terpisah ditampung ke dalam tabung reaksi. Kromatografi kolom pemisahan komponen dapat dilihat pada Gambar 7.

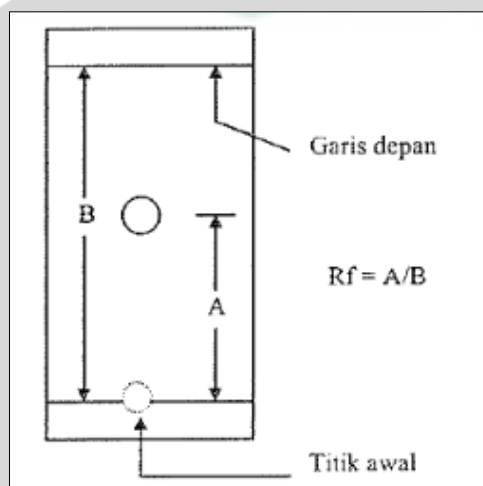


Gambar 7. Kromatografi kolom pemisahan komponen
Sumber: Hayani, (2007)

Kecepatan suatu komponen bergerak di dalam kolom, tergantung pada besarnya komponen terhambat atau tertahan oleh penyerap atau fase diam. Senyawa yang diserap lemah akan bergerak lebih cepat dibandingkan dengan senyawa yang diserap kuat oleh fase diam. Jika perbedaan serapan antar senyawa cukup besar, maka akan terjadi pemisahan yang sempurna (Sastrohamidjojo, 2007). Menurut Santoso *et al.*, (2008), syarat yang digunakan pada fase diam yaitu tidak larut fase gerak, stabil saat kondisi proses dikehendaki dan bisa menyerap zat yang dipisahkan. Bahan yang digunakan untuk fase gerak yaitu mempunyai sifat tidak melarutkan fase diam, stabil pada kondisi proses dan melarutkan zat yang terserap fase diamnya, serta besar kelarutan berbeda.

2.6.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Menurut Khoirunni'mah (2012), kromatografi Lapis Tipis adalah metode pemisahan fisikokimia. Lapisan untuk proses pemisahan terdiri dari fase diam (bahan berbutir-butir), penyangga berupa pelat gelas/ lapisan yang sesuai. Campuran larutan yang ditotolkan berbentuk bercak warna. Plat diletakkan di dalam bejana yang tertutup rapat yang telah terisi fase gerak, pemisahan akan terjadi saat perambatan fase gerak. Prinsip-prinsip kromatografi lapis tipis yang terpenting yaitu adsorben, deteksi dan pengembangan. Skema kromatografi lapis tipis dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Skema kromatografi lapis tipis (KLT)

Sumber: Khoirunni'mah (2012)

Keterangan: a = jarak tempuh senyawa; b = jarak tempuh pelarut (fase gerak).

KLT berfungsi untuk menentukan jenis pigmen. Pemisahan dilakukan diatas pelat silika gel tipe 60 ukuran 10 cm x 10 cm menggunakan larutan pengembangan petroleum eter (PE) dan aseton (80:20) (Kalalo *et al.*, 2014). Selanjutnya bercak yang terdeteksi ditandai untuk dihitung nilai *retardation factor* (R_f)-nya (Hidayati, 2013). Pengembangan adalah proses pemisahan campuran akibat pelarut merambat naik pada lapisan (Arindah, 2010). Sedangkan kemurnian dari senyawa bisa diperlihatkan dari banyaknya bercak dari plat KLT (Handayani *et al.*, 2005).

Menurut Arindah (2010), nilai R_f adalah tetapan fisika sebagai jarak tempuh senyawa titik awal sampai titik berhenti dibagi dengan jarak tempuh pelarut. Faktor yang mempengaruhi nilai R_f , antara lain: suhu, serat kertas, dan banyak senyawa totalan. Nilai R_f didefinisikan sebagai berikut:

$$\text{Nilai } R_f = \frac{\text{Jarak tempuh senyawa}}{\text{Jarak tempuh pelarut (fase gerak)}} = \frac{Y}{X}$$

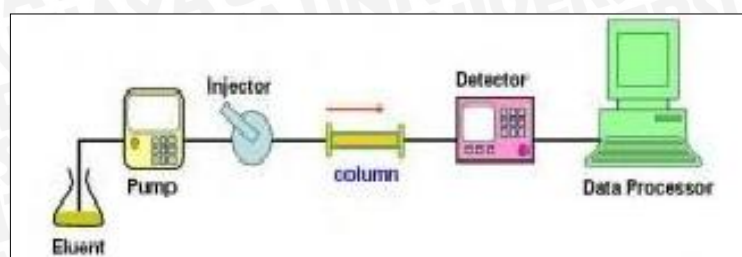
Menurut Azkiyah (2013), fase gerak pada KLT harus mempunyai kemurnian tinggi, karena KLT adalah teknik yang sangat sensitif. Fase gerak yang dipakai yaitu mampu melarutkan senyawa, berpolaritas tertentu, serta tidak bereaksi terhadap adsorban. Volume fase gerak harus mampu mengelusi lempeng sampai batas ketinggian lempeng yang ditentukan. Ketika lempeng sudah terelusi selanjutnya dilakukan pendeteksian bercak. Jarak tempuh fase gerak dihitung sebagai *Retardation Factor* (R_f). Nilai R_f didapatkan dengan cara membandingkan jarak tempuh senyawa dan jarak tempuh pelarut (fase gerak).

2.6.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Menurut Nurhamidah (2005), metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) adalah teknik kromatografi cair kinerja tinggi berasal dari kromatografi kolom klasik, metode ini sensitif dan akurat secara kuantitatif serta untuk pemisahan senyawa yang tidak gampang menguap, yaitu: asam amino, protein, pestisida dan lain sebagainya. Keuntungan dari HPLC dibanding metode konvensional seperti analisa waktu yang cepat, biaya rendah dan menganalisa sampel tidak stabil.

Menurut Ardianingsih (2009), ciri teknik HPLC adalah kegunaan tekanan tinggi untuk mengirim fase gerak dalam kolom. Dengan tekanan tinggi, laju serta efisiensi pemisahan bisa ditingkatkan. Teknik HPLC (mempunyai kelebihan sehingga dapat disebut "*the best choice*" dalam kepentingan pemisahan ion atau

logam, antara lain: Kecepatan, Sensitivitas, Selektivitas, Pendeteksian serta Kestabilan kolom pemisah. Rangkaian dasar komponen HPLC dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Rangkaian dasar komponen HPLC
Sumber: Ardianingsih (2009)

Menurut Ardianingsih (2009), rangkaian alat atau komponen dasar yang dipakai pada teknik kromatografi ion, yaitu:

- *Eluent*, fase gerak yang membawa sampel masuk ke dalam kolom pemisah;
- Pompa, untuk mendorong *eluent* dan sampel masuk ke dalam kolom. Kecepatan aliran dapat dikontrol dan kecepatan yang berbeda-beda dapat mempengaruhi hasil;
- Injektor, tempat memasukkan sampel yang kemudian sampel di distribusikan masuk ke dalam kolom;
- Kolom pemisah ion, memisahkan ion-ion dalam sampel. Keterpaduan kolom dengan *eluent* memberikan hasil (puncak) yang maksimum, dan sebaliknya;
- Detektor, untuk membaca ion yang melewati ke dalam detektor.

Menurut Lestari (2014), prinsip kerja HPLC yaitu; fase gerak dialirkan menggunakan bantuan pompa melalui kolom ke dalam detector. Dimasukkan cuplikan dalam aliran fase gerak dengan disuntikkan. Fase diam dalam hal ini menggunakan sifat non polar, maka sifat dari fase gerak lebih polar yang mempunyai kekuatan interaksi lebih lemah. Solut yang interaksinya kurang kuat dengan fase diam keluar terlebih dahulu dan sebaliknya. Komponen yang keluar

pada kolom dideteksi oleh detector dan direkam dengan bentuk kromatogram. Jumlah *peak* adalah jumlah komponen, sedangkan luas *peak* adalah konsentrasi komponen dalam campuran.

Pada prinsip kerja HPLC yaitu pemisahan analit-analit berdasarkan kepolarannya, alatnya terdiri dari kolom (sebagai fase diam) dan larutan tertentu sebagai fase geraknya. Yang paling membedakan HPLC dengan kromatografi lainnya adalah pada HPLC digunakan tekanan tinggi untuk mendorong fase gerak. Campuran analit akan terpisah berdasarkan kepolarannya dan kecepatannya untuk sampai kedetektor (waktu retensinya) akan berbeda, hal ini akan teramati pada spektrum yang puncak-puncaknya terpisah (Romiyanto, 2014). Perbandingan metode Spektrofotometri UV-Vis dan HPLC dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Perbandingan Metode Spektrofotometri UV-Vis dan HPLC/KCKT

Perbandingan	Metode Analisis Spektrofotometri UV-Vis	Metode Analisis HPLC
Prinsip kerja	Spektrofotometri	Kromatografi
Preparasi	Tidak perlu fase gerak	Perlu adanya optimasi komposisi fase gerak
Biaya	Untuk pelarut yang digunakan tidak semahal fase gerak HPLC	Fase gerak yang digunakan cukup mahal
Waktu	Tidak memerlukan waktu yang lama	Waktu analisis cukup singkat, tetapi waktu untuk mencapai kondisi stabil
Hasil analisis	Tidak terlalu peka (karena signal berasal dari campuran)	Dapat diketahui kandungan sampel benar-benar murni atau tidak (kepekaan tinggi dalam analisis)

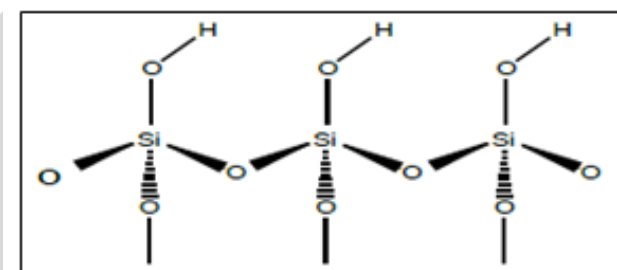
2.6.4 Fase Diam

Menurut Hasanah (2014), fase diam adalah bahan penyerap yang memiliki peran untuk memisahkan senyawa campuran pada bahan. Syarat fase diam optimal untuk digunakan, ada beberapa di antaranya: tidak berinteraksi dengan fase gerak dan terikat kuat pada posisinya. Ditambahkan oleh Komariah

(2013), fase diam berperan sebagai penyerap, contohnya: alumina, *silica gel*, dan resin penukar ion.

2.6.4.1 *Silica Gel* (SiO_2)

Silikon dioksida (SiO_2) merupakan zat kimia anorganik berbentuk kristal transparan yang tidak berwarna, mudah larut dalam alkali cair dan asam hidroflorat, dan melebur pada suhu 1710°C . *Silica gel* umum digunakan dalam industri pembuatan gelas, produk keramik, amplas, dan cetakan dalam pengecoran logam dan beton (Hill, 2003). Struktur kimia dari silika gel dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Struktur Silika Gel
Sumber: Lestari, (2011)

Silica gel berbentuk amorf dan berpori-pori. Sifat *Silica gel* pada kromatografi, yaitu struktur kombinasi dari padatan, kerangka zat, dan rongga. *Silica gel* berasal dari bentukan tetrahedral atom oksigen yang berpasangan dengan atom silicon, memiliki jembatan Si-O-Si, serta SiOH untuk ujung asam polisiklik (Santi, 2006). SiO_2 merupakan sebuah substansi yang terbuat dari dua elemen yang paling banyak terdapat di bumi, yaitu silikon dan oksigen. Sekitar 55% dari luas permukaan bumi terdiri dari silika (silikon dioksida) atau silikat (silika yang terkombinasi dengan metal oksida) (Telepchak, 2004).

Menurut Romiyanto, (2014), *silica gel* ada 2 macam yaitu: (a) GF245, dengan G melambangkan gypsum (CaSO_4), F melambangkan floroscene, dan angka 245 menunjukkan besarnya panjang gelombang yaitu, 245 nm. Silika jenis ini sering digunakan pada kromatografi lapis tipis (TLC), dan (b) H, dengan tanpa

adanya gypsum dan floroscene. Silika jenis ini biasa digunakan pada kromatografi kolom. *Silica gel* dapat membentuk ikatan hidrogen di permukaannya, karena pada permukaannya terikat gugus hidroksil. Oleh karena itu, *silica gel* sifatnya sangat polar. Bentuk *Silica gel* dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. *Silica gel*

Sumber: Dokumentasi penelitian (2015)

2.6.5 Fase Gerak

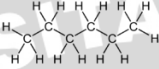
Menurut Labib (2013), fase gerak (eluen) biasanya terdiri dari campuran pelarut yang secara keseluruhan berperan pada daya elusi dan resolusi. Daya dari elusi dan resolusi ditentukan berdasarkan dari polaritas keseluruhan pelarut, polaritas diam, dan sifat komponen sampel. Pada fase normal yaitu fase diam bersifat lebih polar dibanding fase gerak, kemampuan elusi yang meningkat bersamaan dengan meningkatnya polaritas dari pelarut. Dan fase terbalik yaitu fase diam lebih kurang polar dibanding fase gerak, kemampuan elusi yang menurun bersamaan dengan meningkatnya polaritas dari pelarut.

2.6.5.1 N-heksan

Heksana (C_6H_{14}) merupakan senyawa hidrokarbon alkana yang memiliki rumus isomer utama $CH_3(CH_2)_4CH_3$. Awalan *heks-* menunjukkan jumlah atom

karbon yang terdapat di dalamnya dan akhiran *-ana* menunjukkan ikatan tunggal yang menghubungkan atom-atom karbon tersebut. Heksana merupakan salah satu jenis pelarut non polar (Maulida dan Zulkarnaen, 2010). Sifat-sifat n-Heksan dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Sifat-Sifat n-Heksan

No.	Karakteristik	n-Heksan
1.	Nama lain	n-heksana
2.	Rumus bangun	$C_6 H_{14}$ 
3.	Sifat	sangat reaktif dan sering digunakan sebagai pelarut dalam reaksi organik
4.	Titik leleh	$-96-94^{\circ}C$
5.	Titik didih	$68-69^{\circ}C$
6.	Massa molar	86.18 g mol^{-1}

Sumber: Romiyanto, (2014).

Menurut Arindah (2010), n-Heksana adalah hidrokarbon alifatik yang gampang menguap. Ikatan dari heksana adalah tunggal serta sifatnya yang kovalen menjadikan n-heksana tidak reaktif dan umum digunakan sebagai pelarut inert untuk reaksi organik. Karakteristik heksana sangat tidak polar, volatil, dan bau khas. Berat molekul heksana yaitu 86,2 gram/mol dan mempunyai titik leleh $-94,3$ sampai $-95,3^{\circ}C$; titik didih heksana tekanan 760 mmHg yaitu 66 sampai $71^{\circ}C$. Heksana merupakan alkana cair yang diperoleh dari fraksi ringan dari minyak mentah. Penggunaan utama dari heksana adalah sebagai campuran bensin dan sebagai pelarut (Daintith, 2004).

2.6.5.2 Ethil Asetat

Etil asetat merupakan komponen organik bersifat semi polar yang memiliki rumus molekul ($C_4H_8O_2$). Etil asetat tidak berwarna dan berbau tajam yang kurang enak. Keuntungan dari penggunaan etil asetat sebagai pelarut

adalah sifatnya yang volatil, non toksik dan tidak higroskopis (Reapina, 2007). Etil asetat juga dikenal sebagai ester asetat, eter asetat dan asetidin dengan rumus isomer utama $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ yang memiliki sifat dapat sedikit larut dalam air dan mendidih pada suhu 77°C (Hill, 2003). Etil asetat merupakan ester yang terbentuk dari etanol dan asam etanoat, berbentuk cairan berbau yang digunakan sebagai pelarut dalam industri plastik, parfum dan pemberi cita rasa (Daintith, 2004). Sifat-sifat etil asetat dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Sifat-sifat Etil Asetat

No.	Karakteristik	Etil Asetat
1.	Nama lain Rumus bangun	Etil ester, Ester asetat, Ester etanol $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ 
2.	Massa molar	88.12 g/mol
3.	Titik Lebur	-83.6°C (189.55 K)
4.	Titik didih	77.1°C (350.25 K)
5.	Penampilan	Cairan tak berwarna

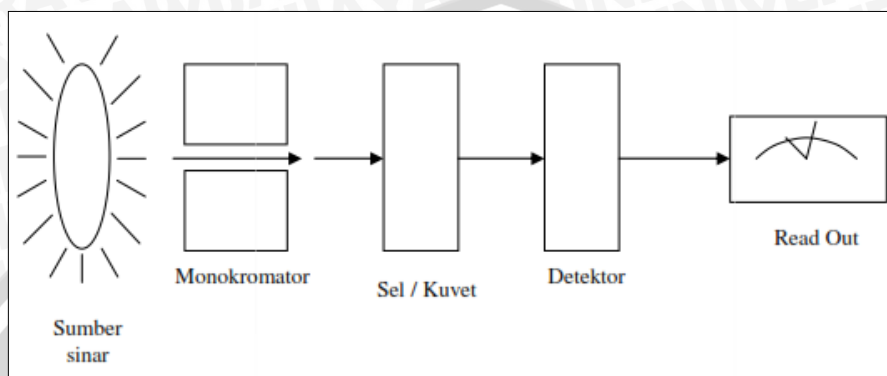
Sumber: Romiyanto, (2015).

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 (Romiyanto, 2014).

2.7 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis merupakan salah satu metode dalam analisis kimia, secara kualitatif maupun kuantitatif. Analisis kualitatif dengan parameter panjang gelombang oleh puncak spektrum (190 nm-900 nm), sedangkan analisis

kuantitatif dengan parameter penurunan intensitas cahaya serapan oleh media. Intensitas ini tergantung pada tebal atau tipisnya media serta konsentrasi warna spesifik pada media tersebut (Fatimah *et al.*, 2009). Rangkaian alat Spektrofotometer UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Rangkaian alat Spektrofotometer UV-Vis
Sumber: Setiono dan Dewi (2013)

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

Tujuan dari Spektrofotometri UV-Vis adalah mengetahui senyawa yang dianalisis memiliki ikatan rangkap konjugasi ataukah tidak (Handayani *et al.*,

2005). Menurut Markham (1988), besar penyerapan cahaya sebanding dengan jumlah molekul, sesuai dengan hukum Lambert-Beer, dengan ketentuan harus jernih yang bebas koloid dan encer:

$$A = \epsilon bc$$

Keterangan:

A = absorbansi

ϵ = absorptifitas molar ($\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

b = tebal kuvet (cm)

c = konsentrasi β -karoten (mol)



3. METODE PENELITIAN

3.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari peralatan untuk ekstraksi, isolasi dan peralatan analisa. Alat yang digunakan untuk ekstraksi dan isolasi yaitu gunting, timbangan digital, *beakerglass* (ukuran 1000 ml, 500 ml, 250 ml), gelas ukur 100 ml, spatula, corong kaca, labu erlenmeyer 250 ml, corong pisah, *rotary vacuum evaporator*, sendok bahan, pipet tetes, *hot plate*, *magnetic stirer*, bola hisap, kolom kromatografi, statif, dan botol vial 10 ml. Adapun alat yang digunakan pada proses analisa, yaitu: penggaris, *cutter*, pensil, pipa kapiler, pinset, *beakerglass* 50 ml, pipet tetes, Spektrofotometer UV-Vis merk Shimadzu 1601, dan instrumen HPLC (High Performance *Liquid Chromatography*) merk Shimadzu.

3.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan yaitu rumput laut coklat *Turbinaria conoides*, diambil dari perairan desa Cabiye, pulau Talango, Kabupaten Sumenep, Madura. Adapun bahan kimia yang digunakan antara lain metanol PA (*pro analysis*), aseton PA, dietil eter PA, n-heksan PA, aquadest pH-7, etil asetat PA, CaCO_2 , saturasi garam, gas Nitrogen (N_2), air, *silica gel* F-254 (60 mesh), *aluminium foil*, *plastic wrap*, kertas saring kasar dan halus, kapas, pasir laut (*sea sand*), plat KLT (Kromatografi Lapis Tipis), kertas label, kertas tisu, kertas Koran dan kertas Whatman no. 42.

3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan merupakan metode eksploratif. Dalam penelitian eksploratif memiliki tujuan untuk mengetahui hal yang baru berupa pengelompokan suatu gejala atau fakta tertentu. Penelitian deskriptif eksploratif bertujuan untuk menggambarkan suatu variabel, gejala, dan keadaan atau fenomena apa adanya tanpa menguji suatu hipotesis tertentu (Arikunto, 2002). Sedangkan menurut Chusairi (2013), tujuan penelitian eksploratif adalah menggambarkan suatu fenomena tertentu melalui sifat dan faktor yang mempengaruhinya secara sistematis, faktual dan akurat.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Sampel

Sampel rumput laut coklat *Turbinaria conoides* yang baru diambil dari laut segera dicuci dengan air laut, dimasukkan ke dalam *cool box* berisi es kemudian diikat dan dimasukkan ke dalam karung plastik. Perlakuan tersebut bertujuan untuk mempertahankan kualitas rumput laut, terutama agar tidak terkena cahaya matahari secara langsung yang dapat merusak pigmen dalam rumput laut. Menurut Kartikaningsih *et al.*, (2012), kekurangan dari pigmen secara umum adalah tidak stabilnya pada pH, cahaya, oksigen dan suhu.

Setelah sampai di laboratorium, rumput laut *Turbinaria conoides* dibawa dalam ruang gelap dan disortir agar tidak tercampur rumput laut spesies lain dan diambil bagian thallus (menyerupai daun) yang dipisahkan dengan bagian lain. Kemudian dicuci menggunakan air mengalir untuk menghilangkan sisa kotoran dan garam yang menempel pada sampel. Berikutnya sampel dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di atas kertas Koran agar air dipermukaan sampel berkurang.

3.4.2 Ekstraksi Pigmen

Sesudah proses preparasi sampel dilakukan, dilanjutkan proses ekstraksi pigmen dengan sampel *Turbinaria conoides*. Proses ekstraksi pigmen dari sampel *Turbinaria conoides* berpedoman pada metode Costa *et al.*, (2009), yang dimodifikasi beberapa prosesnya untuk memaksimalkan hasil ekstraksi.

Ekstraksi sampel menggunakan metode maserasi, maserasi merupakan proses penyaringan menggunakan cara perendaman ke dalam pelarut organik hingga meresap dan akan melunakkan susunan dari sel, sehingga zat yang terkandung akan larut (Daud *et al.*, 2010). Menurut Wulandari (2011), isi dari sel akan terlarut karena perbedaan konsentrasi di dalam dan luar sel. Larutan dengan konsentrasi tinggi akan terdesak keluar dan akan diganti oleh cairan konsentrasi rendah. Proses tersebut akan berulang sampai konsentrasi seimbang antara larutan diluar dan dalam sel. Endapan yang didapatkan harus dipisahkan serta filtratnya di pekatkan.

Sampel rumput laut coklat *Turbinaria conoides* di *blender* dengan selama ± 1 menit untuk memperluas permukaannya, sehingga memaksimalkan proses ekstraksi, kemudian ditimbang sebanyak 100 gram dan dihaluskan menggunakan mortar dan alu sambil ditambahkan $\pm 0,5$ g CaCO_3 sebagai agen penetral. Menurut Romiyanto (2014), ukuran dari sampel yang semakin kecil maka luas permukaan semakin besar dan laju senyawa yang berpindah dari sel ke pelarut semakin tinggi. Hal tersebut karena jarak dari difusi zat terlarut menjadi semakin kecil.

Sampel yang sudah halus dimasukkan dalam *beakerglass* 1000 ml yang sudah dibungkus *aluminium foil* dan ditambahkan pelarut metanol (CH_3OH) dan aseton (CH_3COCH_3) perbandingan 7:3 (v/v) sebanyak 300 ml kemudian ditutup rapat menggunakan *plastic wrap*, yang dilapisi *aluminium foil*. Menurut Hasanah (2014), pelarut yang baik digunakan untuk ekstraksi karotenoid adalah senyawa

polar, seperti contoh methanol, aseton, serta etanol. Menurut Susiana (2014), metanol memiliki sifat dapat tercampur dengan air dan bisa melarutkan senyawa organik yang terkandung pada bahan melalui cara merusak sel dalam jaringan, sehingga pigmen bisa larut pada bahan hingga bahan warna pucat, sedangkan fungsi aseton adalah mengangkat pigmen bersifat semi polar.

Selanjutnya sampel didiamkan 24 jam di dalam ruang gelap, kemudian disaring menggunakan kertas Whatmen no. 42 yang fungsinya untuk memisahkan filtrate dan residu dari sampel. Proses maserasi diulang sekali lagi dengan cara yang sama dengan lama waktu 12 jam untuk memaksimalkan ekstraksi pigmen. Prinsip maserasi adalah penyarian zat aktif dengan cara merendam secara sederhana dalam cairan selama 24 jam pada suhu ruang (kamar) dan tidak terkena cahaya, cairan penyari masuk dalam sel terlebih dahulu melewati dinding sel. Isi sel akan terlarut akibat perbedaan konsentrasi di dalam dan luar sel. Larutan dengan konsentrasi tinggi akan keluar dan tergantikan oleh cairan yang konsentrasi rendah disebut proses difusi. Endapan yang didapatkan dipisah dan filtratnya akan dipekatkan (Wulandari, 2011).

3.4.3 Fraksinasi dan Evaporasi

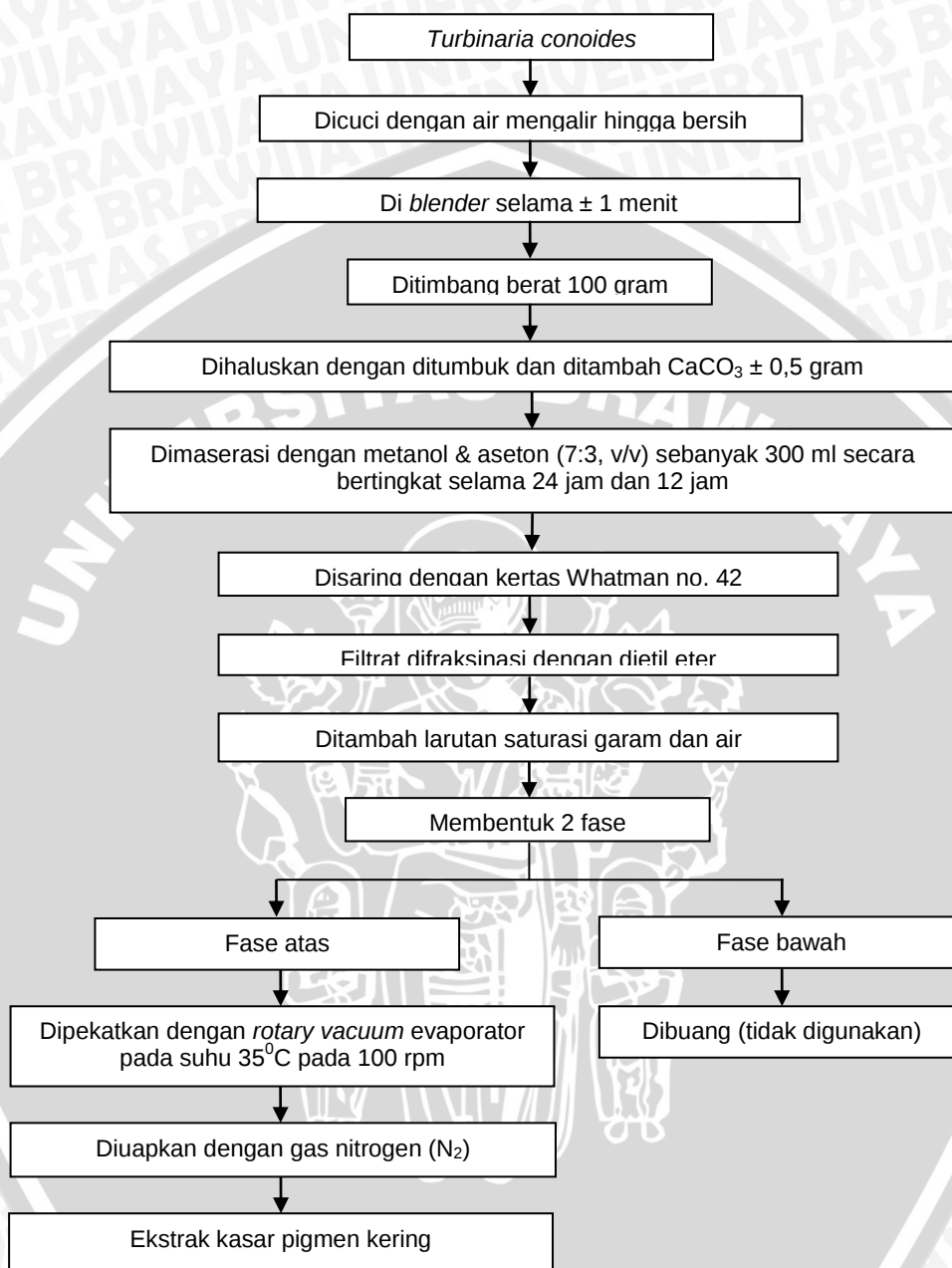
Proses fraksinasi, memiliki tujuan pemisahan fraksi pigmen yang terkandung dalam filtrat dalam larutan berdasarkan polaritas dan massa jenis, maka akan terbentuk dua fase yakni fase atas dan fase bawah. Fraksinasi dilakukan dengan penambahan dietil eter ($C_4H_{10}O$), saturasi garam, serta air berurutan dengan perbandingan (100 ml : 50 ml : 120 ml : 10 ml) dari filtrat hasil ekstraksi dalam corong pisah, sehingga *crude* pigmen non polar terangkat oleh dietil eter dan terbentuk dua fase (fase atas dan bawah). Fase atas (non polar) yaitu fraksi yang terkandung ekstrak kasar pigmen terlarut dalam dietil eter, fase bawah (polar) yaitu fraksi dari campuran saturasi garam, air serta pelarut.

Kegunaan dari dietil eter ($C_4H_{10}O$) pada proses fraksinasi memiliki tujuan untuk mengikat larutan senyawa pigmen yang ada didalam filtrat hasil dari maserasi. Dietil eter ($C_4H_{10}O$) memiliki sifat yang non polar, sehingga dapat melarutkan senyawa dari pigmen yang bersifat non polar. Masa jenis dari dietil eter adalah yang paling ringan dalam larutan yang menjadikan senyawa pigmen terlarut dan terangkat ke atas yang disebut fase atas. Pada saturasi garam yang terlarut air akan bersifat non polar dan mempunyai massa jenis lebih tinggi, ini menyebabkan terpisahnya fase atas serta tercampur dengan pelarut filtrat dan sebelumnya digunakan dari proses maserasi, yakni metanol (CH_3OH) dan aseton (CH_3COCH_3) yang terbentuk fase bawah.

Fase bawah dari fraksinasi tidak dipergunakan sedangkan fase atas diukur serta ditampung dalam labu Erlenmeyer 250 ml. Hasil dari fraksinasi dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* suhu $35^{\circ}C$ kecepatan 100 rpm lama waktu ± 90 menit. Menurut Sari (2012), pengevaporasian dengan suhu 30-40 menggunakan alat vakum dan didapatkan ekstrak kental metanol. Tujuan evaporasi untuk menguapkan pelarut (dietil eter) dan didapatkan *crude* kemudian ditampung dalam botol sampel. Prinsip fraksinasi adalah proses penarikan senyawa suatu ekstrak menggunakan dua jenis pelarut yang saling tidak tercampur.

Hasil dari pemekatan berbentuk *crude* diambil dengan bantuan sendok bahan dan dipindahkan dalam botol sampel. Sisa *crude* dalam labu evaporator diambil dengan cara dilarutkan menggunakan dietil eter 5-10 ml kemudian diputar-putar dengan tujuan meratakan dietil eter, serta diambil dengan bantuan pipet tetes dan ditampung pada botol sampel. *Crude* yang ditampung dalam botol sampel dialiri gas nitrogen (N_2) yang bertujuan menguapkan dietil eter yang tersisa dan didapatkan *crude* yang kering. Botol sampel tersebut ditutup *plastic wrap* dan dibungkus menggunakan *aluminium foil* lalu disimpan dalam *freezer*.

Diagram alir ekstraksi dan fraksinasi *Turbinaria conoides* dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Diagram Alir Ekstraksi dan Fraksinasi *Turbinaria conoides*
Sumber: Modifikasi metode Costa *et al.*, (2009)

3.4.4 Isolasi Pigmen

Pada isolasi pigmen rumput laut coklat jenis *Turbinaria conoides* menggunakan metode kromatografi kolom. Kromatografi kolom merupakan proses pemisahan fraksi dari perbedaan distribusi campuran komponen fase

gerak dan fase diam. Pada senyawa yang berbeda mempunyai koefisien partisi juga berbeda terhadap fase gerak dan fase diam. Interaksi senyawa yang lemah dengan fase diam akan bergerak lebih cepat pada sistem kromatografi, sedangkan senyawa dengan interaksi yang kuat dengan fase diam geraknya sangat lambat (Noviyanti, 2010).

Dalam penelitian ini menggunakan *normal phase*, yaitu menggunakan fase diam bersifat polar dan fase gerak bersifat non polar dengan menggunakan fase diam *silica gel* (SiO_2) F-254 yang bersifat polar dan fase gerak campuran senyawa n-heksan (C_6H_{14}) dan etil asetat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) yang bersifat non polar. Tahap awal isolasi pigmen menggunakan metode kromatografi kolom merupakan preparasi kolom kromatografi. Serbuk *Silica gel* F-254 ditimbang seberat 40 gram selanjutnya dilarutkan dalam 200 ml fase gerak dari gabungan n-heksan dan etil asetat perbandingan 8:2 (v/v) dalam *beakerglass*, kemudian ditutup dengan *plastic wrap* dengan tujuan meminimalisir penguapan pada fase gerak. Berikutnya *silica gel* dan fase gerak dicampur dengan tujuan penghomogenan dengan *magnetic stirrer* selama ± 1 jam dengan kecepatan 150 rpm, supaya tidak muncul gelembung udara dalam kolom kromatografi yang menyebabkan terpecahnya *silica gel* (fase diam).

Selanjutnya, kolom kromatografi dipasang pada statif serta diisi dengan beberapa gulung kapas yang sudah dibasahi fase gerak, lalu dipadatkan di dasar kolom kromatografi dengan bantuan lidi. Diberikan kapas dengan tujuan menahan fase diam supaya tidak keluar lewat kran kolom kromatografi. Berikutnya, kolom kromatografi diisi fase gerak n-heksan dan etil asetat perbandingan (8:2, v/v) sampai batas setengah dari panjang kolom kromatografi untuk membasahi bagian dari dalam kolom kromatografi. Bubur dari *silica gel* dimasukkan dalam kolom kromatografi secara sedikit-sedikit dengan bantuan sendok pada kran kromatografi terbuka, bubur *silica gel* sambil terus diaduk

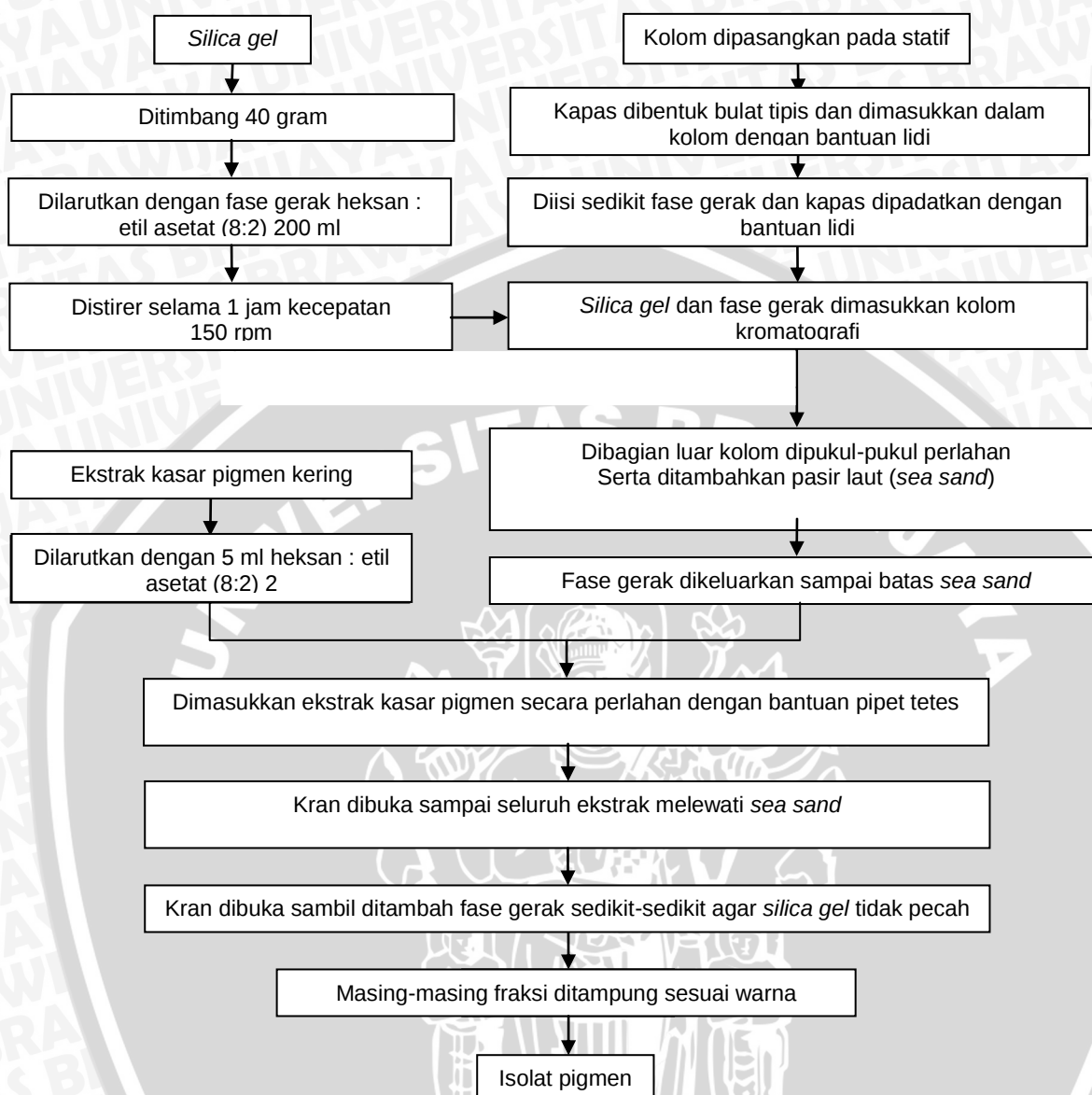
supaya tidak ada gelembung udara. Setelah semua bubur *silica gel* telah dimasukkan, kemudian kran dari kolom kromatografi ditutup kembali. Kolom kromatografi perlahan dipukul-pukul menggunakan bola hisap supaya fase diam padat dan permukaan rata. Menurut Hendayana (2006), prinsip kerja kromatografi yaitu kolom gelas pada salah satu ujungnya diisi fase diam *silica gel*. Campuran yang akan dipisahkan dituang ke dalam bagian atas kolom berisi fase diam. Fase gerak digunakan berupa pelarut organik yang dialirkan pada bagian atas kolom. Komponen yang terpisah dari campuran bergerak terbawa fase gerak ke bawah dan dapat terlihat cincin berwarna sepanjang kolom.

Kolom kromatografi yang sudah dipreparasi didiamkan selama ± 12 jam supaya *silica gel* benar-benar padat, untuk mulut kolom dan ujung kran ditutup dengan lapisan *plastic wrap* untuk meminimalisir fase gerak menguap. Batas atas untuk fase diam ditandai sebagai parameter padat tidaknya fase diam tersebut. Pada fase diam yang belum padat dapat dilihat jika permukaan fase diam menurun, ada gelembung udara, dan terbentuk retakan atau lapisan dalam *silica gel*. Jika fase diam tidak padat maka preparasi kolom kromatografi harus diulang dari awal.

Preparasi kolom kromatografi yang telah berhasil, bisa ditambahkan pasir laut ke dalam kolom kromatografi sebanyak ± 3 gram pada atas permukaan fase diam dan diketuk perlahan supaya permukaan rata. Diberikan pasir laut dengan tujuan menyaring kotoran/residu yang tidak digunakan dari ekstrak kasar rumput laut. Selanjutnya, pengurangan volume fase gerak di kolom kromatografi dengan membuka kran kolom kromatografi sampai mendekati permukaan dari *sea sand* dan kran harus ditutup kembali. Ekstrak kasar pigmen kering *Turbinaria conoides* dilarutkan 10 ml fase gerak n-heksan dan etil asetat perbandingan (8:2, v/v). Berikutnya seluruh fase gerak dikeluarkan dahulu dari kolom kromatografi sampai batas *sea sand*. Kemudian larutan ekstrak pigmen dimasukkan dalam

kolom kromatografi dengan bantuan pipet tetes sedikit-sedikit dan perlahan melewati dinding kolom kromatografi. Berikutnya, kran kolom kromatografi dibuka dan ditunggu sampai ekstrak pigmen melewati *sea sand* dan masuk ke dalam fase diam *silica gel*. Berikutnya ditambahkan fase gerak n-heksan dan etil asetat perbandingan (8:2, v/v) perlahan-lahan sampai kolom hampir penuh. Fase gerak yang ditambahkan harus berkesinambungan sampai muncul pita warna. Fase gerak ditingkatkan ke polarannya dengan volume 200-300 ml dengan larutan n-heksan dan etil asetat perbandingan (8:2, v/v), (7:3, v/v), hingga (6:4, v/v). Fraksi warna yang keluar ditampung dalam botol vial 10 ml yang diberi label nomor dan dibungkus aluminium foil supaya isolat terlindung dari degradasi cahaya, serta dicatat keterangan warna beserta waktu saat ditampung.

Pemberian fase gerak adalah yang harus diperhatikan pada proses kromatografi kolom supaya fase diam tidak pecah. Fase diam bisa pecah pada kondisi kering atau tidak terisi pelarut, bisa dilihat dari munculnya sekat-sekat secara horizontal dan titik putihnya tidak beraturan yang akibat bentukkan *silica gel* kering yang tidak terendam fase gerak. Fase diam yang pecah akan menurunkan kemampuan fase diam untuk memisahkan senyawa dari pigmen. Diagram alir isolasi pigmen dengan kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Diagram Alir Isolasi Pigmen dengan Kromatografi Kolom
Sumber: Pangestuti *et al.*, (2007) dimodifikasi oleh Wijayanti (2010)

3.5 Identifikasi Pigmen

3.5.1 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

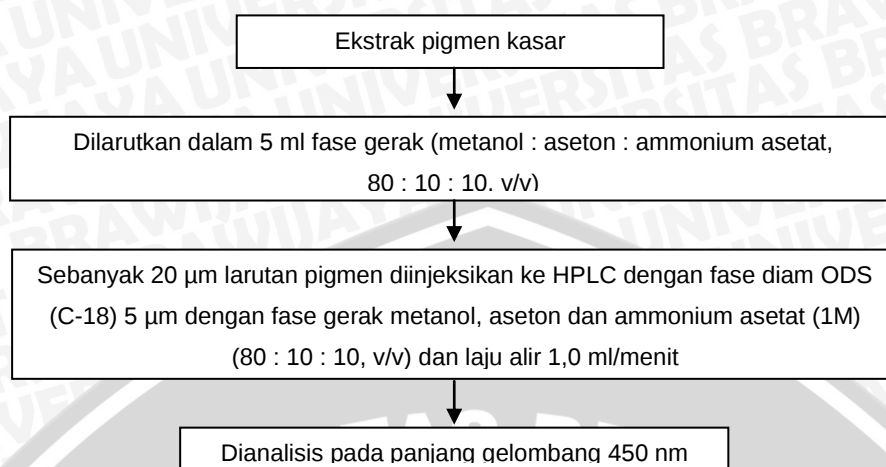
Ekstrak kasar (*crude*) pigmen hasil dari evaporasi lalu diidentifikasi menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* dengan metode dari Hegazi *et al.*, (1998). Instrumen menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* merk Shimadzu LC 20-A. Tahap ini terjadi pemisahan antara jenis pigmen yang diidentifikasi dengan pigmen lainnya pada *Turbinaria conoides*

dengan melihat serapan maksimum panjang gelombang dari masing-masing bentuk puncak.

Tahap pertama proses HPLC yakni *crude* pigmen kering dilarutkan 5 ml fase gerak menggunakan fase gerak (metanol : aseton : amonium asetat, perbandingan 80 : 10 : 10, v/v). Menurut Puspitaningtyas *et al.*, (2013), fase gerak pada HPLC berfungsi sebagai pembawa komponen campuran menuju dalam detektor, salah satu faktor penentu keberhasilan analisis. Menurut Sabrina *et al.*, (2012), HPLC memiliki prinsip kromatografi, yang di dalam terdapat proses pemisahan dan pengukuran.

Berikutnya larutan pigmen sebanyak 0,2 μm diinjeksi ke instrumen HPLC dengan fase diam ODS (C-18) sebanyak 5 μm dengan *microsyringe* sistem elusi *gradient* metanol, aseton, dan ammonium asetat (1 M) dan laju alir 1,0 ml/menit . Syarat fase diam menurut Komariah (2013), yaitu tidak berinteraksi dengan fase gerak. Menurut Putra (2004), elusi *gradient* adalah penambahan kekuatan fase gerak saat analisis kromatografi berlangsung. Efek elusi *gradient* yaitu mempersingkat t_R dari senyawa yang tertahan pada kolom.

Analisis dengan panjang gelombang 430 nm. Berikutnya komponen yang dihasilkan direkam pada bentuk kromatogram. Fungsi detektor sebagai pendeteksi adanya komponen dalam sampel (analisis kualitatif) dan hitungan kadar (analisis kuantitatif). Detektor dengan sensitifitas tinggi adalah yang baik, *noise* (gangguan) rendah, respon *linier* luas, dan memberi respon semua senyawa (Putra (2004). Diagram alir HPLC dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Diagram Alir HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)
Sumber: Hegazi *et al.*, (1998)

3.5.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pada identifikasi *crude* pigmen dan isolat hasil isolasi kromatografi kolom menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Identifikasi ini berdasarkan metode dari Pangestuti *et al.*, (2007) yang dimodifikasi Hasanah (2014). Pada penelitian ini identifikasi KTL digunakan fase diam plat KLT *silica gel* F-254, dan fase gerak menggunakan *n*-heksan dan aseton (7:3, v/v).

Menurut Puspita (2009), pemilihan fase gerak dalam hal ini sangat diperhatikan. Eluen (fase gerak) yang digunakan digolongkan menjadi 2 jenis, yaitu untuk memisahkan senyawa hidofil dan lipofil. Eluen untuk memisahkan senyawa hidofil (air, metanol, asam asetat, etanol, isopropanol, aseton, *n*-propanol, *tert*-butanol, fenol, dan *n*-butanol. Sedangkan eluen untuk memisahkan senyawa lipofil (etil asetat, eter, kloroform, benzena, toluena, sikloheksana dan petroleum eter).

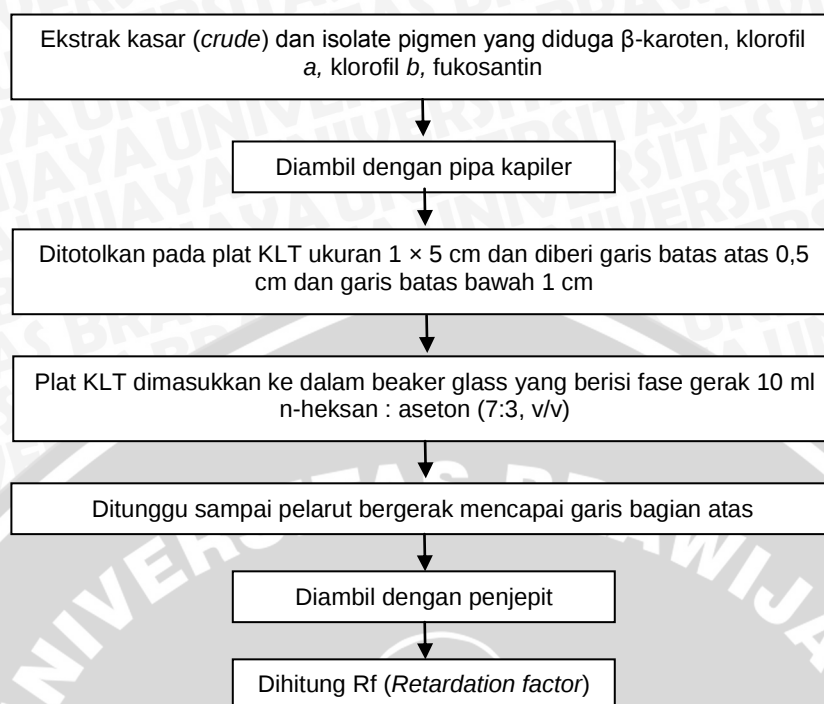
Plat KLT terlebih dahulu dipotong berukuran 1 × 5 cm, selanjutnya diberi garis melintang kedua ujungnya plat dipermukaan *silica gel*. Pertama diberi garis berjarak 1 cm tepi pada plat KLT sebagai batas awal fraksi warna saat ditotolkan

dan garis berikunya untuk ujung lainnya berjarak 0,5 cm pada tepi plat KLT sebagai batas jarak tempuh fase gerak. Sehingga terbentuk jarak tempuh senyawa 3,5 cm.

Berikutnya, disiapkan 10 ml fase gerak campuran n-heksan : aseton perbandingan (7:3, v/v). *Crude* dan isolat pigmen hasil kromatografi kolom yang diduga β -karoten, klorofil *a*, klorofil *b*, fukosantin diambil dengan pipa kapiler dan ditotolkan tepat digaris batas bawah plat KLT. Berikutnya plat KLT dimasukkan dalam $\pm$ 5 ml fase gerak di dalam *beakerglass* 50 ml yang ditutup menggunakan *cling wrap* untuk meminimalkan penguapan dan ditunggu beberapa saat sampai fase gerak mencapai garis batas atas. Plat KLT diambil dengan bantuan pinset, selanjutnya bercak warna akan muncul di plat KLT dan dihitung nilai *Rf*. Menurut Arindah (2010), nilai *Rf* adalah tetapan fisika sebagai jarak tempuh senyawa titik awal sampai titik berhenti dibagi dengan jarak tempuh pelarut. Nilai *Rf* didefinisikan sebagai berikut:

$$\text{Nilai } R_f = \frac{\text{Jarak tempuh senyawa}}{\text{Jarak tempuh pelarut (fase gerak)}} = \frac{Y}{X}$$

Menurut Puspita (2009), untuk mendapatkan penotolan yang baik dan optimum berupa bercak atau pita harus sekecil mungkin. Diagram alir identifikasi pigmen dengan kromatografi lapis tipis dapat dilihat pada Gambar 16.



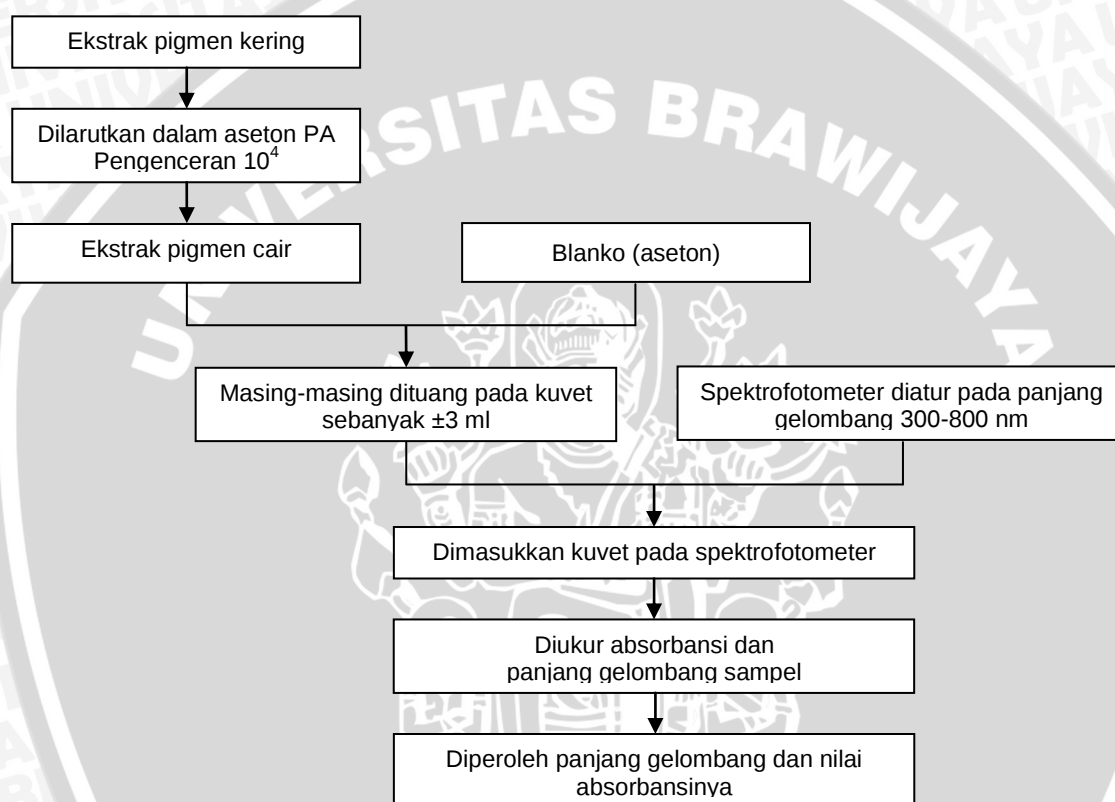
Gambar 16. Diagram Alir identifikasi Pigmen dengan Kromatografi Lapis Tipis
Sumber: Pangestuti *et al.*, (2007) Dimodifikasi Oleh Hasanah (2014)

3.5.3 Spektrofotometri UV-Vis

Identifikasi pigmen menggunakan Spektrofotometri UV-Vis pada penelitian ini dengan metode Fretes *et al.*, (2012). Spektrofotometri UV-Vis digunakan sebagai identifikasi pigmen dengan parameter panjang gelombang dan nilai absorbansi. Menurut Triyati (1985), prinsip kerja Spektrofotometri UV-Vis berdasarkan penyerapan cahaya yang diserap dalam larutan secara kuantitatif.

Isolat warna pigmen hasil kromatografi kolom yang diduga β -karoten, klorofil *a*, klorofil *b* dan fukosantin berdasarkan nilai Rf dari proses KLT, yang terlebih dahulu dikeringkan dengan dialiri gas nitrogen (N_2). Untuk isolat warna yang telah kering diencerkan terlebih dahulu dengan aseton PA pengenceran 10^4 dan dituang dalam kuvet ± 3 ml. Selanjutnya dimasukkan dalam instrumen spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1601 serta dilakukan pengujian pada panjang gelombang 300-800 nm, sehingga dapat diketahui pola spektra dan nilai absorbansi maksimum isolat warna.

Nilai absorbansi pada puncak (*peak*) tertinggi bisa dibandingkan dengan nilai absorbansi maksimum komponen molekul pigmen pada penelitian Hegazi *et al.*, (1998) untuk mengetahui fraksi yang di uji tersebut adalah jenis pigmen yang dibandingkan dengan penelitian terdahulu. Menurut Utami *et al.*, (2010), pengukuran dilakukan pada panjang gelombang maksimum. Diagram alir analisa pigmen dengan Spektrofotometri UV-Vis dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 17. Diagram Alir Analisa Pigmen dengan Spektrofotometer UV-Vis
Sumber: Fretes *et al.*, (2012)

3.6 Pengukuran Rendemen

Untuk dapat mengetahui kandungan dari jenis pigmen, maka harus dilakukan perhitungan rendemen. Menurut Maulidy *et al.*, (2014), rendemen adalah parameter untuk mengetahui nilai ekonomis dan efektivitas produk. Semakin besar rendemen maka produk akhir semakin banyak. Analisa rendemen adalah prosentase produk dari perbandingan berat awal bahan dan berat akhir, sehingga dapat diketahui berat yang hilang saat proses pengolahan.

Pigmen yang sudah diketahui nilai absorbansi dikonversi menggunakan hukum dari "Lambert-Beer". Rumus hukum "Lambert-Beer" menurut Markham (1988) adalah $A = \epsilon bc$

Keterangan : A = Absorbansi

ϵ = Absorptifitas molar (Molar extinction coefficient)

b = Lebar bagian kuvet dalam

c = Konsentrasi (molar)

Rumus tersebut diatas didapatkan dari hasil masing-masing pigmen. Berikutnya, dihitung nilai rendemen dengan rumus menurut Khotimah (2013), yaitu:

$$\frac{\text{nilai kadar yang diperoleh}}{\text{jumlah awal sampel yang dipakai}} \times 100\%$$



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Data Hasil Penelitian

Hasil identifikasi komponen pigmen dari *crude* dan isolat alga coklat *Turbinaria conoides* dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), Kromatografi kolom, Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Spektrofotometri UV-Vis, dapat dilihat pada Tabel 13.

Tabel 13. Hasil Isolasi dan Identifikasi Komponen Pigmen alga Coklat *Turbinaria conoides*

Uji Identifikasi	Alat	Hasil	Literatur
HPLC	HPLC Shimadzu LC-20A	Nilai tR	Menurut Limantara dan Heriyanto (2010), masing – masing Nilai tR yaitu: β – karoten 62,08; Klorofil <i>a</i> 38,39; Klorofil <i>b</i> 33,40; Fukosantin 10,11
		β - karoten	
		62,19	
		Klorofil <i>a</i>	
		38,5	
		Klorofil <i>b</i>	
Kromatografi Kolom	Kromatografi Kolom	36,02	- β -karoten identifikasi warna kuning pekat (Robertus, (2009). - Menurut Campbell <i>et al.</i> , (2002), identifikasi pigmen Klorofil <i>a</i> berwarna biru kehijauan, Klorofil <i>b</i> berwarna kuning kehijauan - Fukosantin identifikasi warna oranye Zaelani dan Kartikaningsih (2009) -
		Fukosantin	
		10,13	
		Diperoleh isolat berwarna kuning pekat botol vial ke 4 sampai 6, kuning kehijauan botol vial ke 10 sampai 12, biru kehijauan botol vial ke 22 sampai 25, oranye pekat botol vial ke 41 sampai 45	

KLT	Plat KLT silica gel F-254	Ulangan			- Nilai Rf β-karoten sebesar 0,8 – 1,0 (Britton <i>et al.</i>, 1995). - Menurut Pramesti, (2013), nilai Rf Klorofil <i>a</i> sebesar 0,57-0,64; Rf Klorofil <i>b</i> sebesar 0,42-0,56 - Fukosantin sebesar 0,25-0,28 (Zaelani dan Kartikaningsih, 2009). - Menurut Hegazi <i>et al.</i>, (1998), gelombang (λ) maks pada pelarut aseton, yaitu: β-karoten sebesar 428; 452; 476 nm, Klorofil <i>a</i> sebesar 412; 532; 580 nm, Klorofil <i>b</i> sebesar 468; 548; 652 nm, Fukosantin sebesar 452 nm
		1	2	3	
		β - karoten			
		0,94	0,90	0,91	
		Klorofil <i>a</i>			
		0,6	0,66	0,57	
Spektrofotometer UV-Vis	Spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1601	Klorofil <i>b</i>			
		0,51	0,46	0,43	
		Fukosantin			
		0,2	0,29	0,26	
		Ulangan			
		1	2	3	
Nilai Rendemen		β - karoten			
		0,028% $\pm$ 0,00007			
		Klorofil <i>a</i>			
		0,061% $\pm$ 0,00024			
		Klorofil <i>b</i>			
		0,043% $\pm$ 0,00009			
		Fukosantin			
		0,036% $\pm$ 0,000232			

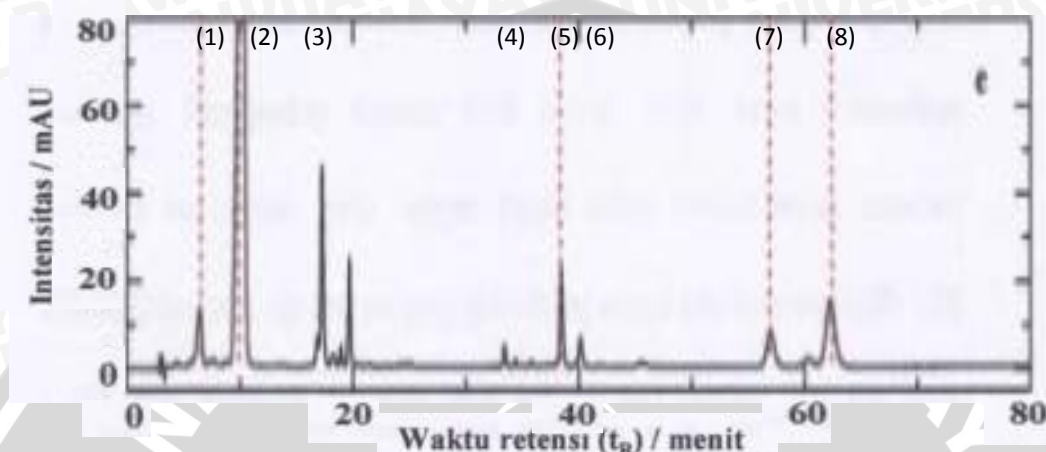
4.2 Pembahasan

4.2.1 Identifikasi pigmen dengan *High Performance Liquid Chromatography*

HPLC

Analisa kualitatif pigmen dengan metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) berdasarkan waktu retensi dan untuk identifikasi .

Prinsip HPLC adalah pemisahan setiap komponen dalam sampel berdasarkan tingkat kepolaran. Metode HPLC menggunakan tekanan tinggi berfungsi untuk mendorong fase gerak yang diatur *gradient* elusinya. Hasil analisa komposisi pigmen rumput laut coklat *Turbinaria conoides* dapat dilihat pada Gambar 18.



Gambar 18. Kromatogram ekstrak kasar alga coklat *Turbinaria conoides* pada panjang gelombang 450 nm

(1) Klorofil c, (2) Fukosantin, (3) Zaexantin, (4) Klorofil b, (5) Klorofil a, (6) Klorofil a', (7) Feofitin a, (8) β-karoten

Identifikasi puncak pigmen dilakukan dengan membandingkan literatur dengan sampel dan metode yang hampir sama. Penelitian ini membandingkan penelitian dari Limantara dan Heriyanto (2010), menggunakan fase diam dan pelarut yang hampir sama. Tiap puncak HPLC menandakan adanya pigmen dalam *crude Turbinaria conoides*. Nomor dari puncak pigmen sesuai urutan elusi, yaitu pigmen dengan kepolaran tinggi sampai dengan pigmen kepolaran rendah. Menurut Sundari (2010), fase diam pada fase terbalik menggunakan fase diam bersifat hidrofobik. Ditegaskan oleh Syarif (2009), kromatografi pada fase terbalik menggunakan fase diam kurang polar dibanding fase gerak, kemampuan dari elusi menurun dengan meningkatnya polaritas dari pelarut.

Dari hasil HPLC tersebut diatas menggunakan analisa panjang gelombang 430 nm, menunjukkan jumlah pita warna dari alga coklat *Turbinaria conoides* berkisar antara 11 sampai 13 puncak dengan kapasitas berbeda. Hasil dari HPLC diatas menunjukkan jika pita warna yang muncul lebih banyak

dibanding bercak warna pada KLT. Komposisi pigmen hasil HPLC mempunyai jumlah yang lebih banyak jika dibandingkan dengan hasil KLT. Hal ini menunjukkan bahwa HPLC memiliki daya pisah (resolusi) tinggi sehingga mampu memisahkan pigmen-pigmen yang tidak terdeteksi pada KLT.

Hasil puncak yang dihasilkan menunjukkan 4 puncak tertinggi dominan, yaitu: β -karoten, klorofil *a*, klorofil *b*, fukosantin. Berdasarkan waktu retensi (*t_R*) puncak hasil kromatogram diatas pada alga coklat *Turbinaria conoides* diidentifikasi dan dapat dilihat pada Tabel 14.

Tabel 14. Waktu retensi (*t_R*) alga coklat *Turbinaria conoides*

No	Jenis Pigmen	Waktu retensi (<i>t_R</i>)	Waktu retensi (<i>t_R</i>)
			(Limantara dan Heriyanto, 2010)
1	Klorofil <i>c</i>	6,45	6,42
2	Fukosantin	10,13	5,85
3	Zaexantin	19,72	19,68
4	Klorofil <i>b</i>	36,02	30,88
5	Klorofil <i>a</i>	38,5	38,01
6	Klorofil <i>a'</i>	40,13	40,10
7	Feofitin <i>a</i>	56,84	56,79
8	β -karoten	62,19	57,14

Waktu retensi (*t_R*) adalah ukuran waktu mulai injeksi cuplikan hingga suatu komponen campuran keluar kolom, dengan kata lain waktu yang diperlukan oleh suatu komponen campuran untuk keluar dari kolom (Hendayana, 2004). Waktu retensi sensitif terhadap perubahan fase diam, suhu, nilai pH, komposisi fase gerak, laju alir (Idroes, 2009). Dari tujuh puncak yang dihasilkan diambil 4 puncak yang sesuai dengan hasil KLT pigmen yang terisolasi. Pigmen yang dianalisa merupakan β -karoten, klorofil *a*, klorofil *b*, fukosantin. Yang paling bersifat polar di antara pigmen tersebut adalah fukosantin karena waktu retensi lebih singkat dan mempunyai puncak tertinggi.

Metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) pada penelitian ini menggunakan sistem “*reversed phase*” atau fase terbalik, fase diam yang digunakan memiliki sifat nonpolar dan fase gerak memiliki sifat lebih polar (Hendayana, 2004). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian, yaitu pigmen fukosantin dan klorofil *b* muncul lebih dahulu serta memiliki waktu retensi yang paling kecil dibanding dengan pigmen lainnya, dimana pigmen golongan karotenoid (β -karoten) bersifat nonpolar muncul paling akhir serta memiliki waktu retensi terbesar.

4.2.2 Isolasi Pigmen dengan Kromatografi Kolom

Metode dari Kromatografi Kolom difungsikan untuk memisahkan dan mengisolasi komponen molekul pigmen dari senyawa yang terdapat pada *Turbinaria conoides*. Pada penelitian ini menggunakan *normal phase*, yakni menggunakan fase diam bersifat polar dan fase gerak bersifat non polar. Pada fase diam menggunakan *silica gel* (SiO_2) F-254 dengan ukuran 60 *mesh* serta fase gerak menggunakan senyawa n-heksan (C_6H_{14}) dan etil asetat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) perbandingan 8:2, 7:3, dan 6:4 (v/v).

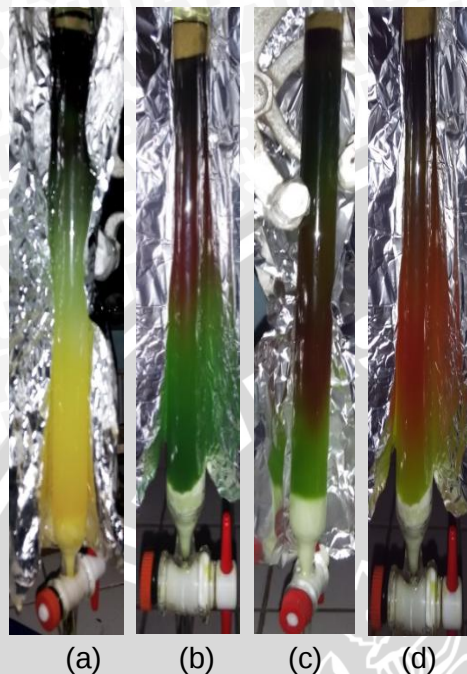
Menurut Susiana (2010), *silica gel* F-254 yaitu F melambangkan *floroscene*, dan 254 adalah panjang gelombang satuan nm. *Silica gel* dapat membentuk ikatan hidrogen, karena permukaan terikat gugus hidroksil. N-heksan memiliki sifat non polar atau memiliki polaritas lebih rendah dibandingkan etil asetat yang memiliki sifat semi polar, dan dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi bandingan n-heksan pada senyawa campuran fase gerak, sehingga semakin non polar sifat dari fase gerak, serta sebaliknya. N-heksan dapat melarutkan senyawa pigmen sifatnya non polar, jika etil asetat dapat melarutkan senyawa pigmen sifatnya polar.

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

Hasil diatas menyimpulkan jika senyawa pigmen memiliki sifat non polar dibandingkan *crude Turbinaria conoides* maka akan keluar dahulu, ini disebabkan bahwa mempunyai keterkaitan lemah terhadap fase diam bersifat polar, serta senyawa pigmen yang sangat polar akan keluar selanjutnya secara berturut-turut sesuai tingkat polaritas karenanya mempunyai keterkaitan lebih kuat dengan fase diam, dibandingkan dengan polaritas fase gerak yang ditambah, didukung oleh pernyataan dari Noviyanti (2010), bahwa senyawa yang berinteraksi lemah dengan fase diam akan bergerak lebih cepat melalui fase diam, sedangkan senyawa dengan interaksi yang kuat dengan fase diam akan bergerak sangat lambat.

Pita-pita warna yang terdapat dalam kromatografi kolom didasarkan tingkat polaritas. Fraksi warna kuning pekat (a) dan hijau pekat kecoklatan (b) keluar dari penambahan fase gerak n-heksan : etil asetat (8:2, v/v), Fraksi warna biru (c) keluar dari penambahan fase gerak n-heksan : etil asetat (7:3, v/v), dan fraksi warna oranye pekat (d) keluar dari penambahan fase gerak n-heksan : etil asetat (6:4, v/v). Pada penelitian ini terdapat fraksi yang mempunyai warna tetapi terlihat bening dan terdapat di antara fraksi warna, ini disebut fase antara. Pada fase antara juga mengandung fraksi warna tetapi sangat sedikit karena

campuran dua fraksi warna yang bukan fraksi warna spesifik dari salah satu jenis pigmen, sehingga tidak diperlukan. Proses isolasi komponen pigmen rumput laut coklat *Turbinaria conoides* dapat dilihat pada Gambar 19.



Keterangan :

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

Gambar 19. Proses isolasi komponen pigmen alga coklat *Turbinaria conoides* dengan kromatografi kolom
Sumber: Dokumentasi penelitian (2015)

Isolasi komponen pigmen dari *crude* alga coklat *Turbinaria conoides* didapatkan 54 botol vial untuk isolat warna dengan warna dominan kuning pekat, hijau pekat kecoklatan, biru serta oranye pekat. Berdasarkan fraksi warna yang keluar, isolat warna kuning pekat terdapat pada botol vial ke 4 sampai 6 diduga β -karoten, dipertegas oleh Robertus (2009), β -karoten adalah zat yang memiliki warna kuning, warna hijau pekat kecoklatan terdapat pada botol vial ke 13 & 14 diduga feofitin dipertegas oleh Yuniwati *et al.*, (2012), feofitin adalah zat yang memiliki warna hijau agak kecoklatan, isolat warna kuning kehijauan terdapat pada botol vial ke 10 sampai 12 diduga klorofil *b*, menurut Campbell *et al.*, (2002) klorofil *b* berwarna kuning kehijauan, isolat warna biru kehijauan terdapat pada botol vial ke 22 sampai 25 diduga klorofil *a*, menurut Campbell *et al.*, (2002)

klorofil *a* berwarna biru kehijauan, isolat warna oranye pekat terdapat pada botol vial ke 41 dan 45 diduga fukosantin, menurut Zaelani dan Kartikaningsih (2009) fukosantin adalah zat yang memiliki warna oranye. Hasil isolasi komponen molekul pigmen pada rumput laut coklat *Turbinaria conoides* dapat dilihat pada Gambar 20.



Gambar 20. Hasil isolasi pigmen pada alga coklat *Turbinaria conoides*
Sumber: Dokumentasi Penelitian (2015)

(A) Fase antara, (B & C) β -karoten, (D) Klorofil *b*, (E) Klorofil *a*, (F) Fukosantin

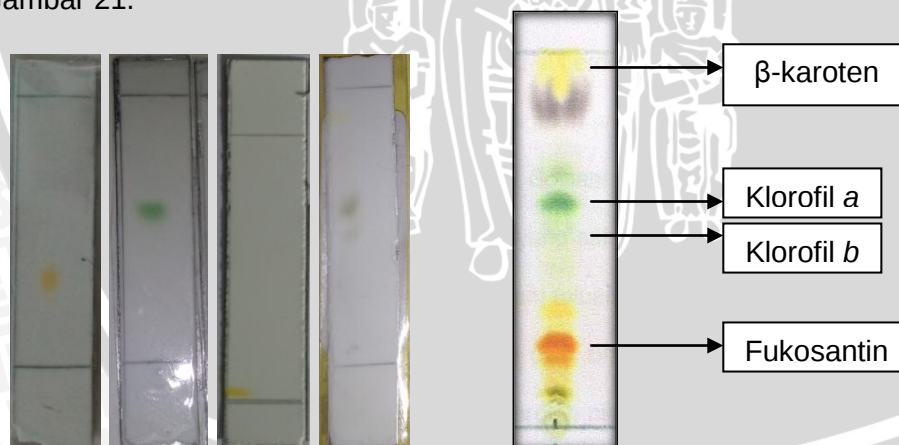
Proses Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dalam hal ini tidak terlihat bercak warna yang ditimbulkan, atau hanya terlihat dalam intensitas sangat kecil. Dari isolasi pigmen memperlihatkan bahwa fraksi warna kuning pekat adalah fraksi warna pertama yang keluar dengan fase gerak non polar yaitu n-heksan : etil asetat (8:2, v/v), dapat disimpulkan bahwa isolat warna kuning mempunyai polaritas paling rendah dan memiliki sifat non polar di antara fraksi warna tersebut di atas. Tabel hasil isolasi pigmen menggunakan kromatografi kolom dapat dilihat pada Lampiran 9.

4.2.3 Identifikasi pigmen dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Hasil dari isolat diduga sebagai komponen molekul pigmen diidentifikasi menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) sebagai pembuktian bahwa isolat di atas merupakan komponen molekul pigmen, antara lain: fukosantin, β -karoten, klorofil *a* dan *b* berdasarkan bercak warna yang muncul dan nilai R_f . Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan plat KLT, *silica gel* F-254 untuk fase diam dan campuran larutan n-heksan aseton (7:3, v/v) untuk fase

gerak. Sifat dari fase gerak yang digunakan bersifat non polar, pada penambahan n-heksan lebih banyak dibanding aseton dikarenakan isolat warna diduga fukosantin bersifat semi polar, isolat warna diduga β -karoten bersifat non polar, isolat warna diduga klorofil *a* dan *b* bersifat semi polar, sebagaimana telah diketahui hasil dari kromatografi kolom.

Isolat warna botol vial ke 4-6 hasil dari kromatografi kolom diduga sebagai β -karoten dengan ulangan 1-3 didapatkan nilai R_f masing-masing 0,94; 0,90; 0,91; botol vial ke 10-12 diduga sebagai klorofil *b* dengan ulangan 1-3 didapatkan nilai R_f masing-masing 0,51; 0,46; 0,43, botol vial ke 22-25 diduga sebagai klorofil *a* dengan ulangan 1-3 didapatkan nilai R_f masing-masing 0,6; 0,66; 0,57, botol vial ke 41-45 diduga sebagai fukosantin dengan ulangan 1-3 didapatkan nilai R_f masing-masing 0,2; 0,29; 0,26 yang diidentifikasi diamati serta dihitung nilai R_f dengan cara jarak bercak warna titik awal totolan dibagi jarak tempuh fase gerak titik awal totolan. Hasil identifikasi komponen molekul pigmen rumput laut coklat *Turbinaria conoides* dengan KLT dapat dilihat pada Gambar 21.



Gambar 21. Hasil identifikasi komponen pigmen rumput laut coklat *Turbinaria conoides* dengan KLT

Gambar tersebut diatas adalah identifikasi isolat komponen molekul pigmen dengan cara KLT yang menghasilkan bercak warna berbeda sesuai identifikasinya dan mempunyai jarak yang berbeda pula. Warna kuning pekat

mengidentifikasi isolat β -karoten, dipertegas oleh Robertus (2009) yang menyatakan warna kuning pekat adalah β -karoten, warna kuning kehijauan mengidentifikasi isolat klorofil *b*, menurut Campbell *et al.*, (2002) klorofil *b* berwarna kuning kehijauan, warna biru kehijauan mengidentifikasi isolat klorofil *a*, menurut Campbell *et al.*, (2002) klorofil *a* berwarna biru kehijauan, warna oranye pekat mengidentifikasi isolat fukosantin, menurut Zaelani dan Kartikaningsih (2009) fukosantin berwarna oranye. Perhitungan nilai R_f komponen molekul pigmen *Turbinaria conoides* dapat dilihat pada Lampiran 10.

Dari uraian KLT diatas menggunakan metode *normal phase*, yakni fase diam bersifat polar seperti *silica gel* F-254 (SiO_2) dan fase gerak bersifat non polar adalah n-heksan (C_6H_{14}) dan etil asetat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$), maka semakin non polar/ semakin berpolaritas rendah senyawa tersebut sehingga semakin jauh jarak tempuh senyawa tersebut mengikuti alirannya fase gerak. Dan jika lebih tinggi polaritas senyawa, sehingga semakin terhambat fase diamnya. Oleh sebab itu β -karoten mempunyai nilai R_f paling besar dibanding komponen molekul pigmen lain, karena mempunyai polaritas paling rendah sehingga jarak tempuhnya lebih jauh mengikuti alirannya fase gerak.

Menurut Susiana (2010), mekanisme terbentuk total warna disebabkan komponen kimia bergerak naik bersamaan dengan fase gerak, karena daya serap komponen kimia tidak sama. Sehingga komponen bergerak pada kecepatan berbeda berdasarkan tingkat kepolaran. Noda dari nilai R_f yang rendah mempunyai kepolaran lebih tinggi karena terdistribusi pada fase diam bersifat polar.

4.2.4 Identifikasi Pigmen dengan Spektrofotometer UV-Vis

Setiap komponen molekul pigmen memiliki pola spektra serta serapan maksimal yang spesifik untuk dijadikan acuan mengidentifikasi komponen

molekul pigmen tertentu. Isolat warna yang sudah diketahui komponen molekul pigmennya dari identifikasi dengan KLT, selanjutnya dianalisa dengan Spektrofotometer UV-Vis dalam mengetahui pola spektra serta serapan maksimalnya, selanjutnya dibandingkan dengan literatur agar diketahui kesamaan pola spektra serta serapan maksimal komponen molekul pigmennya.

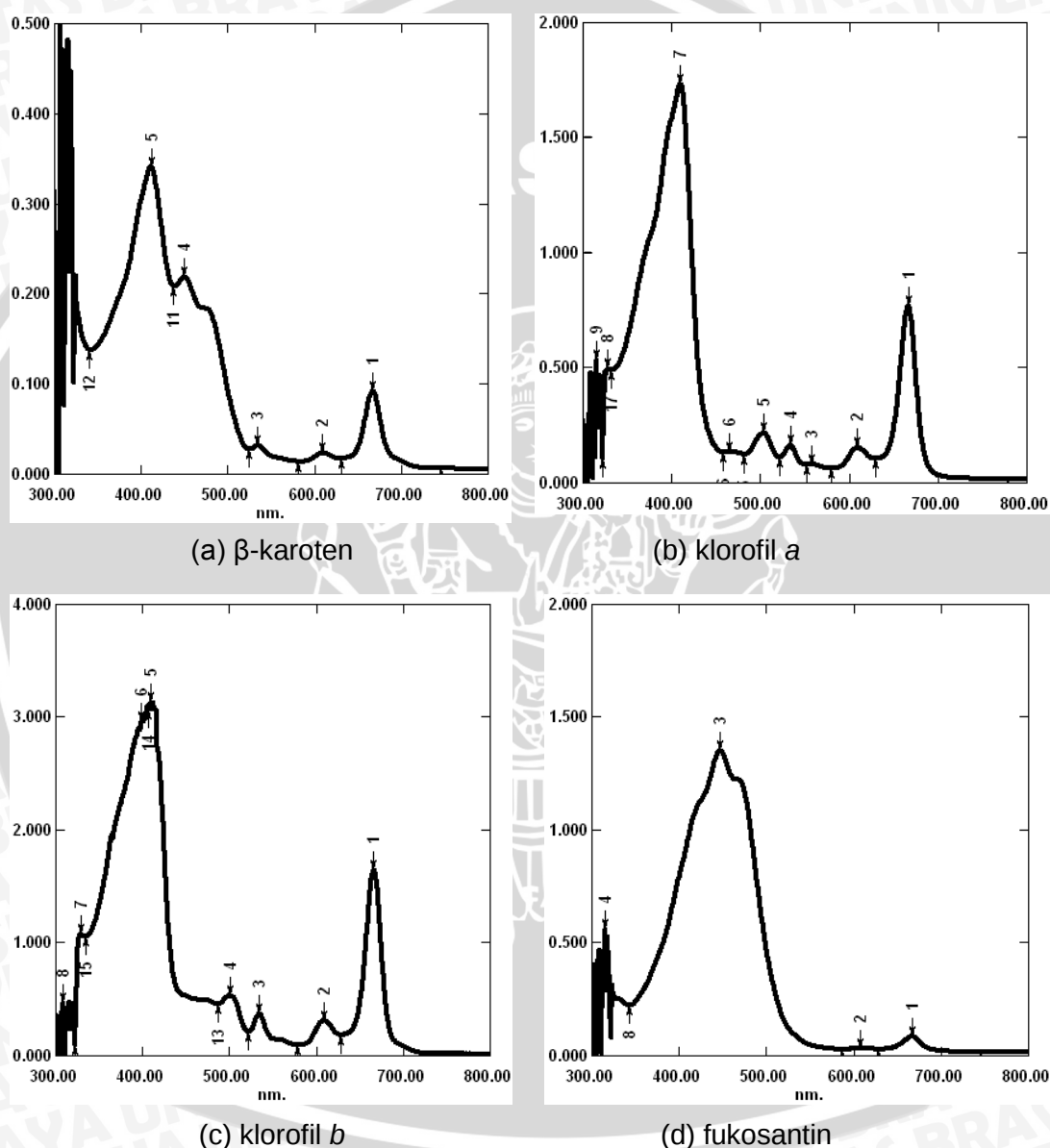
Hasil isolat warna yang telah dikeringkan menggunakan gas nitrogen (N_2), dilarutkan menggunakan aseton PA (*pro analysis*) pengenceran 10^4 larutan diisikan ke kuvet dan dimasukkan dalam instrument Spektrofotometer UV-Vis, selanjutnya dilakukan pengujian pada panjang gelombang (λ) 300-800 nm Hegazi *et al.*, (1998) yang menyatakan masing-masing panjang gelombang (λ) maksimum β -karoten pada pelarut aseton pada panjang 428 nm; 452 nm; 476 nm, panjang gelombang (λ) maksimum klorofil *a* pada pelarut aseton pada panjang 412 nm; 532 nm; 580 nm, panjang gelombang (λ) maksimum klorofil *b* pada pelarut aseton pada panjang 468 nm; 548 nm; 652 nm; panjang gelombang (λ) maksimum fukosantin pada pelarut aseton pada panjang 452 nm.

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

Menurut Neldawati *at al.*, (2013), absorbansi merupakan perbandingan intensitas cahaya yang diserap dengan intensitas cahaya datang. Semakin banyak kadar yang terkandung dalam sampel maka semakin banyak molekul terserap cahaya pada panjang gelombang, sehingga nilai absorbansi semakin

besar. Nilai absorbansi berbanding lurus pada konsentrasi zat terkandung dalam sampel.

Hasil pola spektra dengan isolasi larutan aseton yang diidentifikasi secara kualitatif pada alga coklat *Turbinaria conoides* menggunakan serapan maksimal. Pola spektra dapat dilihat pada Gambar 22.



Gambar 22. Pola Spektra Pigmen Hasil Isolasi *Turbinaria conoides* dalam Pelarut Aseton

Menurut Toto *et al.*, (2006), pergeseran pola spectra dan serapan maksimum pada uji spektrofotometri diduga terjadi karena adanya interaksi

antara zat terlarut (*pigmen*) dengan pelarut yang digunakan. Tingkat kemurnian dari pelarut akan mempengaruhi interaksi tersebut di dalam proses spektrofotometri. Data absorbansi setiap pola spektra komponen molekul pigmen dapat dilihat pada Tabel 15.

Tabel 15. Data Absorbansi Maksimum

No.	Jenis Pigmen	Absorbansi maksimum (nm)	Absorbansi maksimum (Hegazi <i>et al.</i> , 1998)
		<i>Turbinaria conoides</i>	
1	β -karoten	411, 449, 667	428, 452, 476
2	klorofil <i>a</i>	410, 503, 666	412, 532, 580
3	klorofil <i>b</i>	399, 410, 666	468, 548, 652
4	Fukosantin	315, 447, 667	452

Dari Gambar. 22 dan Tabel 15 di atas menunjukkan bahwa spektra komponen pigmen yang diisolasi dari alga coklat *Turbinaria conoides* memiliki serapan yang tidak bedah jauh dengan hasil penelitian Hegazi *et al.*, (1998). Panjang gelombang β -karoten hasil dari penelitian menunjukkan bahwa ulangan 1-3 masing-masing 411 nm; 449 nm; 667 nm, panjang gelombang klorofil *a* menunjukkan bahwa ulangan 1-3 masing-masing 411 nm; 449 nm; 667 nm, panjang gelombang klorofil *b* menunjukkan bahwa ulangan 1-3 masing-masing 399 nm; 410 nm; 666 nm, panjang gelombang fukosantin menunjukkan bahwa ulangan 1-3 masing-masing 315 nm; 447 nm; 667 nm dalam pelarut aseton. Dari serapan maksimum dapat disimpulkan bahwa isolat dari alga coklat *Turbinaria conoides* tersebut teridentifikasi.

4.2.5 Rendemen Pigmen

Dari perhitungan rendemen pigmen, dilakukan dengan tujuan mengetahui besarnya ke efektivitasan penelitian yang dilakukan. Hasil rendemen yang semakin tinggi maka akan lebih efektif, dikarenakan ekstrak yang di dapat

semakin banyak. Nilai rendemen masing-masing adalah: β -karoten sebesar $0,028\% \pm 0,00007$, klorofil *a* sebesar $0,061\% \pm 0,00024$, klorofil *b* sebesar $0,043\% \pm 0,00009$, fukosantin sebesar $0,036\% \pm 0,000232$. Setelah diperoleh hasil rendemen tiap pigmen dapat dilihat adanya kesamaan nilai rendemen. Rendemen nilai tertinggi adalah klorofil *a* dan nilai terendah pada β -karoten .

Menurut Khotimah et al., (2013), rendemen hasil penelitian dapat mengalami pengurangan karena proses yang telah dilakukan. Hasil perbedaan rendemen dikarenakan adanya beda kuantitas hasil yang didapatkan saat kromatografi kolom. Berat rendemen dapat dihitung dengan perbandingan berat akhir serbuk yang dihasilkan (g) dengan berat sampel awal (g) kali 100%.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang Identifikasi Komponen Pigmen Alga Coklat *Turbinaria conoides* dengan High Performance Liquid Chromatography (HPLC), diambil kesimpulan sebagai berikut:

- Alga coklat *Turbinaria conoides* memiliki puncak berkisar antara 11 sampai 13 dengan kapasitas berbeda pada uji HPLC. Dari hasil puncak yang dihasilkan menunjukkan 4 puncak tertinggi dominan, yaitu: β -karoten, klorofil *a*, klorofil *b*, fukosantin. Identifikasi HPLC berdasarkan waktu retensi (tR) yang akan dibandingkan dengan literatur.
- Hasil uji HPLC didapatkan nilai waktu retensi (tR) masing-masing komponen pigmen, yaitu: β -karoten sebesar 62,19; klorofil *a* sebesar 38,5; klorofil *b* sebesar 36,02; fukosantin sebesar 10,13.

5.2 Saran

Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai Identifikasi Komponen Pigmen Alga Coklat *Turbinaria conoides* dengan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) selain dilihat dari waktu retensi (tR), sehingga bisa bermanfaat dalam bidang sains khususnya dan bidang ilmu lain umumnya.