

**IDENTIFIKASI KOMPONEN PIGMEN PADA RUMPUT LAUT COKELAT
Padina australis DENGAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI
(KCKT)**

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

Oleh:
**NILA TRI RAHAYU
NIM. 115080301111058**



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

**IDENTIFIKASI KOMPONEN PIGMEN PADA RUMPUT LAUT COKELAT
Padina australis DENGAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI
(KCKT)**

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

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

Oleh:
**NILA TRI RAHAYU
NIM. 115080301111058**



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

SKRIPSI
IDENTIFIKASI KOMPONEN PIGMEN PADA RUMPUT LAUT COKELAT
Padina australis DENGAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI
(KCKT)

Oleh:
NILA TRI RAHAYU
NIM. 115080301111058

Telah dipertahankan di depan penguji
Pada tanggal 11 Agustus 2015
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Penguji

Dosen Pembimbing I

(Eko Waluyo, S. Pi., M. Sc)
NIP. 19800424 200501 1 001

(Dr. Ir. Kartini Zailanie, MS)
NIP. 19550503 198503 2 001

Tanggal :

Tanggal :

Dosen Penguji II

Dosen Pembimbing II

(Dr. Ir. Yahya, MP)
NIP. 19630706 199003 1 003

(Prof. Ir. Sukoso. M. Sc. Ph.D)
NIP. 19640919 198903 1 002

Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP

(Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS)
NIP. 19620805 198603 2 001

Tanggal : _____

PERNYATAAN ORISINALITAS

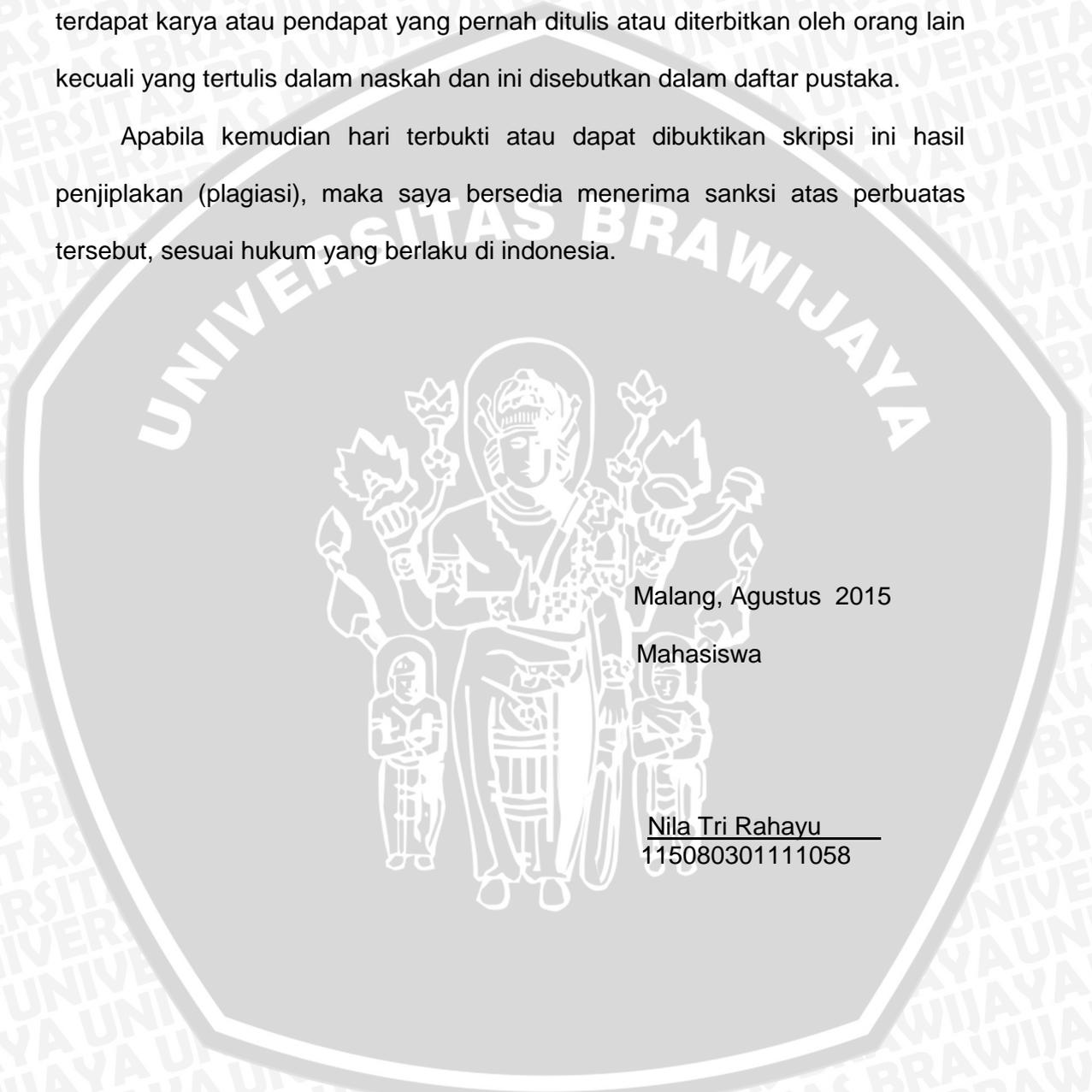
Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah dan ini disebutkan dalam daftar pustaka.

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

Malang, Agustus 2015

Mahasiswa

Nila Tri Rahayu
115080301111058



UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

- Allah SWT atas segala limpahan rahmat, berkah dan hidayahnya sehingga saya dapat menyelesaikan mulai dari penelitian hingga terselesaikannya laporan skripsi.
- Bapak, Ibu dan kakak yang telah memberikan dorongan semangat yang begitu besar serta doa yang tak pernah henti diberikan selama menempuh studi di Universitas Brawijaya, Malang. .
- Ibu Dr. Ir. Kartini Zailanie, MS dan Prof. Ir. Sukoso, M. Sc. Ph. D yang telah memberikan bimbingan serta selalu memberikan arahan selama proses skripsi.
- Team pigmen (Rofi aldita, Rita Istiana, Lulus Mualimin dan Danang Adi Nugroho) yang telah bersama-sama berjuang melaksanakan penelitian dan mengerjakan laporan skripsi sampai dengan selesai. Terima kasih banyak ya rek ☺
- Kelas Q yang udah ngasih doanya, semangatnya, waktunya selama 4 tahun di malang makasih buanyak ya rek ☺
- Temen-temen angkatan 2011 FPIK UB (IK, MSP, BP, PSP khusus nya THP), Kelas Inspirasi Malang, K23, makasih buanyak juga buat Aisyah, fafa, lita, riyanti, novi, hendrian, putri, dian, tia, iid, amoy, puty, estin, ela, kikik yang udah nyempetin ngasih doa, semangat, dukungan serta menemani disaat susah sampai seneng luar biasa rek makasih ☺.

RINGKASAN

NILA TRI RAHAYU. Identifikasi Komposisi Pigmen Rumput Laut Coklat *Padina australis* Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) (di bawah bimbingan **Dr. Ir. Kartini Zaelanie, MS** dan **Prof. Ir. Sukoso, M, Sc, Ph. D**)

Rumput laut coklat jenis *Padina australis* merupakan rumput laut yang berasal dari kelas *Phaeophyta* (rumput laut coklat) yang terdapat secara melimpah selama bermusim-musim. Morfologinya berbentuk seperti kipas dengan diameter 3-4 cm yang tumbuh dalam lingkaran konsentris. Warnanya coklat kekuning-kuningan atau kadang memutih karena terdapat perkapuran atau kapur.

Pigmen merupakan molekul khusus yang dapat memunculkan warna dengan cara menyerap cahaya matahari dan memantulkannya pada panjang gelombang tertentu serta merupakan zat warna alami yang diperoleh dari ekstraksi bahan alam yang berasal dari tanaman maupun hewan. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui kandungan dari masing-masing komponen pigmen, mengetahui jenis pigmen apa saja yang terkandung serta mengetahui pigmen apa saja yang banyak terdapat pada rumput laut coklat jenis *Padina australis* dengan menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (HPLC). Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2015 di laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Perekrayasaan Hasil Perikanan PFIK UB dan laboratorium Ma Cung *Research Center For Photosynthetic Pigmen* (MRCCP). Metode yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode eksploratif. Penelitian eksploratif bertujuan untuk menggambarkan suatu keadaan atau fenomena tertentu secara sistematis, faktual dan akurat melalui berbagai sifat dan faktor yang mempengaruhinya (Chusairi, 2013)

Dari isolasi pigmen pada ekstrak (*crude*) *Padina australis* didapatkan 87 botol isolat warna dengan empat warna dominan yaitu kuning pekat terdapat pada botol ke 2 dan 3. Biru pekat terdapat pada botol ke 28-35. Pada klorofil b didapatkan warna hijau kekuningan pada botol ke 54-60. Pada botol ke 73-81 didapatkan warna oranye. Dari asil KLT dengan sampel *Padina australis* didapat nilai Rf yang diperoleh dari KLT β -karoten yaitu 1,0 ; 0,97 ; 1,05. Nilai Rf dari Klorofil a yaitu 0,6 ; 0,57 ; 0,62, klorofil b yaitu 0,48 ; 0,51 ; 0,54 dan Rf fukosantin yaitu 0,26 ; 0,27 ; 0,28. Hasil dari totalan KLT apabila didapat lebih dari 1 spot maka dapat dikatakan hasil isolat tersebut tidak murni. Nilai rendemen yang didapat dari masing-masing komponen pigmen yaitu β -karoten 0,037% \pm 0,001413, klorofil b 0,117% \pm 0,3275, klorofil a 0,114% \pm 0,26825 dan fukosantin 0,425% \pm 0,26092.

Dari uji spektrofotometer UV-Vis didapatkan pada isolat β -karoten serapan absorbansi tertinggi yaitu pada panjang gelombang 450.50 nm dan 475.00 nm. Hasil isolat pada klorofil a pada panjang gelombang 412.50 nm, 425.00 nm dan 662.00 nm, pada isolat klorofil b didapat panjang gelombang 401,00 dan 669,00 nm sedangkan pada isolat fukosantin dengan serapan absorbansi tertinggi didapat pada panjang gelombang 439,00 nm dan 661,50 nm. Panjang gelombang yang digunakan untuk mengukur nilai absorbansi dari tiap komponen pigmen yaitu mengacu pada metode yang digunakan oleh Fretes *et al.*,(2012) yaitu dengan rentan panjang gelombang 300-800 nm. Dari hasil uji dengan komponen pigmen rumput laut coklat jenis *Padina australis* Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) terdapat 4 puncak yang memiliki warna pekat yaitu fukosantin dengan tR 10,22, klorofil b dengan tR 20,12, klorofil a dengan tR 40,10 dan β - karoten dengan tR 62,15.

KATA PENGANTAR

Dengan Mengucap puji syukur kehadiran Allah SWT, atas limpahan berkah, rahmat serta hidayah-Nya sehingga dapat terselesaikanya penelitian dan penulis dapat menyajikan Laporan Skripsi yang berjudul Identifikasi Komponen Pigmen Rumput Laut Coklat *Padina australis* Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Dalam Laporan ini disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi penelasa mengenai Identifikasi Pigmen yang terkandung pada Rumput Laut Cokelat *Padina australis* dan Analisa dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

Sangat disadari bahwa dalam penulisan laporan ini masih banyak kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki oleh penulis, tetapi masih sangat banyak dirasakan kurang tepat. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Agustus 2015

Mahasiswa

Nilu Tri Rahayu
115080301111058

DAFTAR ISI

HALAMAN

RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	v
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Kegunaan Penelitian	3
1.5 Waktu dan Tempat Penelitian	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Pigmen Rumput Laut	5
2.1.1 <i>Padina australis</i>	6
2.1.2 Komposisi Kimia <i>Padina australis</i>	7
2.1.3 Jenis Pigmen	8
2.1.3.1 β -karoten Pada Alga	8
2.1.3.2 klorofil Pada Alga	9
2.1.3.3 Fukosantin Pada Alga	10
2.2 Rumput Laut	11
2.2.1 Rumput Laut Coklat	13
2.2.2 Komposisi Kimia Rumpu Laut Coklat	14
2.3 Ekstraksi Pigmen <i>Padina australis</i>	15
2.3.1 Maserasi	16
2.3.2 Fraksinasi	17
2.3.3 Evaporasi	17
2.3.4 Nitrogen	19
2.4 Pelarut Ekstraksi Pigmen <i>Padina australis</i>	19
2.4.1 Aseton (CH_3COCH_3)	20
2.4.2 Metanol (CH_3OH)	21
2.4.3 Dietil Eter ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$)	22
2.5 Kromatografi	23
2.5.1 Kromatografi Kolom	23
2.5.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	24
2.5.3 Fase Diam	26
2.5.3.1 Silica Gel (SiO_2)	27
2.5.4 Fase Gerak	28
2.5.4.1 N-Heksan (C_6H_{14})	29
2.5.4.2 Etil Asetat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$)	30

2.5.5 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	31
2.5.5.1 Prinsip KCKT	33
2.6 Spektrofotometri UV-Vis	34
3. METODE PENELITIAN	36
3.1 Bahan Penelitian	36
3.1.1 Alat Penelitian	36
3.1.2 Bahan Penelitian	36
3.2 Metode Penelitian	37
3.3 Prosedur Penelitian	37
3.3.1 Persiapan Sampel <i>Padina australis</i>	37
3.3.2 Ekstraksi	38
3.3.3 Fraksinasi dan Evaporasi	39
3.3.4 Isolasi Pigmen	43
3.4 Identifikasi Pigmen	47
3.4.1 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	47
3.4.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	48
3.4.3 Spektrofotometri UV-Vis	50
3.5 Pengukuran Rendemen	52
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	53
4.1 Hasil Penelitian	53
4.2 Pembahasan	54
4.2.1 Identifikasi Pola Spektra dengan KCKT	54
4.2.2 Kromatografi Kolom	57
4.2.3 Identifikasi Pigmen Dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	60
4.2.4 Hasil Spektrofotometri UV-Vis	63
4.2.5 Rendemen Pigmen	65
5. PENUTUP	67
5.1 Kesimpulan	67
5.2 Saran	67
DAFTAR PUSTAKA	68
LAMPIRAN	79

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
Tabel 1. Komposisi Kimia Rumput Laut	8
Tabel 2. Sifat-sifat β -karoten.....	9
Tabel 3. Komposisi Kimia Rumput Laut per 100 gram	13
Tabel 4. Komposisi Kimia Rumput Laut`	14
Tabel 5. Konstanta Dielektrik dan Kelarutan Beberapa Jenis Pelarut.....	20
Tabel 6. Sifat-sifat Aseton.....	21
Tabel 7. Sifat Fisika dan Kimia Metanol.....	22
Tabel 8. Sifat Fisik dan Kimia Dietil Eter.....	23
Tabel 9. Sifat Fisik dan Kimia N-Heksan.....	29
Tabel 10. Sifat Fisika dan Kimia Etil Asetat.....	30
Tabel 11. Syarat Mutu Etil Asetat.....	30
Tabel 12. Hasil Isolasi dan Identifikasi Pigmen <i>Padina australis</i>	53
Tabel 13. Waktu Retensi (tR) Pigmen <i>Padina australis</i>	56



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 1. Rumput Laut Coklat <i>Padina australis</i>	7
Gambar 2. Struktur kimia β -karoten	8
Gambar 3. Struktur Kimia Klorofil a dan b	10
Gambar 4. Struktur Molekul Fukosantin	13
Gambar 5. Rotary Vacuum Evaporator	17
Gambar 6. Proses Kromatografi Kolom	24
Gambar 7. Proses Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	25
Gambar 8. Struktur Silica Gel	27
Gambar 9. Instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	31
Gambar 10. Spektrofotometri UV-Vis	34
Gambar 11. Skema Kerja Ekstraksi dan Fraksinasi Rumput Laut Coklat	42
Gambar 12. Skema Kerja Isolasi Pigmen Dengan Kromatografi Kolom	46
Gambar 13. Skema Kerja Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	48
Gambar 14. Skema Kerja Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	49
Gambar 15. Skema Kerja Spektrofotometri UV-Vis	51
Gambar 16. Kromatogram Ekstrak Kasar <i>Padina australis</i>	55
Gambar 17. Hasil Isolasi Kolom Kromatografi	58
Gambar 18. Hasil Isolat Murni Pigmen <i>Padina australis</i>	59
Gambar 19. Hasil Proses KLT DARI Isolat Pigmen	61
Gambar 20. Pola Pemisahan Pigmen Rumput Laut Coklat <i>Padina australis</i>	62
Gambar 21. Pola Spektra β -karoten, klorofil a, klorofil b dan fukosantin)	64

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian Identifikasi Pigmen Dengan KCKT	79
Lampiran 2. Prosedur Ekstraksi dan Fraksinasi	80
Lampiran 3. Prosedur Isolasi Dengan Kromatografi Kolom	81
Lampiran 4. Prosedur Identifikasi Dengan KLT	82
Lampiran 5. Prosedur Identifikasi Dengan Spektrofotometri UV-Vis	82
Lampiran 6. Prosedur Identifikasi Dengan KCKT	83
Lampiran 7. Prosedur Pembuatan Larutan)	83
Lampiran 8. Dokumentasi Proses Penelitian	85
Lampiran 9. Data Hasil Isolasi Pigmen <i>Padina australis</i>	93
Lampiran 10. Perhitungan KLT Pigmen <i>Padina australis</i>	95
Lampiran 11. Perhitungan Rendemen	96
Lampiran 12. Data Absorbansi, Kadar Pigmen dan Rendemen	97
Lampiran 13. Perhitungan Kadar Pigmen <i>Padina australis</i>	99
Lampiran 14. Perhitungan Kadar Rendemen Pigmen <i>Padina australis</i>	103



PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rumput laut merupakan makro alga yang digolongkan ke dalam organisme fotosintetik tingkat rendah karena tidak memiliki akar, batang dan daun (Nurdiana, 2008). Berdasarkan warna *thallus* yang dipengaruhi oleh variasi jenis dan kandungan pigmen utamanya, rumput laut dikelompokkan ke dalam 3 kelas yaitu *Chlorophyceae* (rumput laut hijau), *Rhodophyceae* (rumput laut merah), dan *Phaeophyceae* (rumput laut coklat) (Limantara dan Heriyanto, 2011).

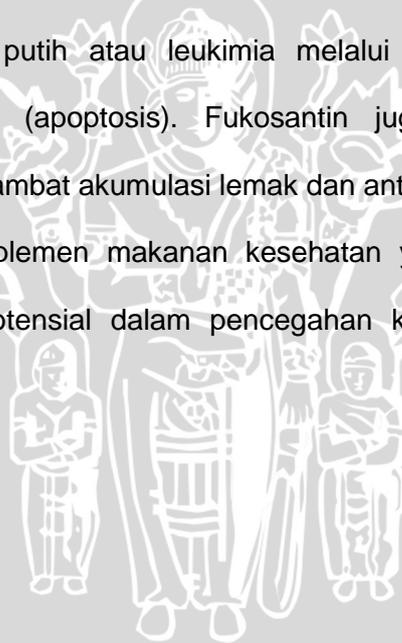
Rumput laut coklat merupakan golongan makroalga dari kelas *phaeophyta* yang tersebar dalam jumlah melimpah di antara koral dan karang pada perairan dekat pantai (*inshore*). Di perairan Indonesia terdapat 28 spesies rumput laut coklat yang berasal dari 6 genus yaitu *Sargassum*, *Turbinaria*, *Padina*,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

Rumput laut merupakan salah satu komoditas hasil laut yang penting, serta tumbuh dan tersebar hampir di seluruh perairan laut Indonesia. Tumbuhan ini bernilai ekonomi tinggi dalam bidang industri makanan maupun bukan makanan (industri kosmetik, tekstil, dan farmasi) untuk memenuhi permintaan dalam negeri maupun luar negeri (Handayani *et al.*, 2004).

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

Istilah klorofil berasal dari bahasa Yunani yaitu *Chloros* artinya hijau dan *phyllos* artinya daun. Istilah ini diperkenalkan pada tahun 1818, dan pigmen tersebut diekstrak dari tanaman dengan menggunakan pelarut organik. Klorofil adalah pigmen pemberi warna hijau pada tumbuhan, alga, dan bakteri fotosintetik. Klorofil mempunyai rantai fitol ($C_{20}H_{39}O$) dimana fitol adalah alkohol primer jenuh yang mempunyai daya afinitas yang kuat terhadap O_2 dalam proses reduksi klorofil (Ai dan Banyo, 2010).

Fukosantin menarik untuk diteliti karena bermanfaat bagi kesehatan manusia. Fukosantin berperan dalam menghambat pertumbuhan sel kanker pada hati, payudara, usus besar, prostat, paru-paru, kelenjar getah bening, lambung, dan sel darah putih atau leukimia melalui pengaruh mekanisme kematian sel terprogram (apoptosis). Fukosantin juga berfungsi sebagai antiobesitas dalam menghambat akumulasi lemak dan anti-diabetes. Lebih lanjut, fukosantin merupakan suplemen makanan kesehatan yang sangat baik dan sebagai kandidat obat potensial dalam pencegahan kanker (Limantara dan Heryanto, 2011).



1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas, adapun perumusan masalah dari penelitian ini yaitu:

- Apa saja jenis pigmen yang terkandung dalam rumput laut coklat jenis *Padina australis*?
- Berapakah besar kandungan dari masing-masing komponen pigmen rumput laut coklat jenis *Padina australis*?
- Pigmen apa saja yang banyak terdapat pada rumput laut coklat jenis *Padina australis* dengan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian Identifikasi Komponen Pigmen Rumput Laut Coklat *Padina australis* dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi yaitu:

- Untuk mengetahui kandungan dari masing-masing komponen pigmen rumput laut coklat jenis *Padina australis*.
- Untuk mengetahui jenis pigmen apa saja yang terkandung dalam rumput laut coklat jenis *Padina australis*
- Untuk mengetahui pigmen apa saja yang banyak terdapat pada rumput laut coklat jenis *Padina australis* dengan menggunakan metode KCKT.

1.4 Kegunaan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan data dan informasi ilmiah mengenai komponen pigmen yang terkandung dalam rumput laut coklat *Padina australis* serta mengetahui kandungan dari masing-masing komposisi pigmen rumput laut coklat jenis *Padina australis* dan kemudian diidentifikasi

menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) sehingga dapat dimanfaatkan lebih lanjut.

1.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai April 2015 di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan dan Perekayasaan Hasil Perikanan, 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 Center for Photosynthetic Pigments* (MRCPP) Universitas Ma Chung Malang.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pigmen Rumput Laut

Pigmen merupakan molekul khusus yang dapat memunculkan warna dengan cara menyerap cahaya matahari dan memantulkannya pada panjang gelombang tertentu. Tiap molekul pigmen yang berbeda akan menimbulkan reaksi yang berbeda sehingga warna dan panjang gelombang yang dipantulkan juga berbeda. Pigmen alami dapat diperoleh dari tumbuhan atau hewan, baik secara langsung maupun dengan pemanasan, penyimpanan atau pemrosesan (Prangdimurti, 2007). Klorofil a, pigmen berwarna hijau kebiruan, merupakan pigmen karotenoid utama dalam proses fotosintetik dari tumbuhan, termasuk didalamnya rumput laut coklat, sedangkan karotenoid hanya sebagai pigmen pelengkap (Marfu'ah, 2014).

Pigmen adalah zat warna alami yang diperoleh dari ekstraksi bahan alam yang berasal dari tanaman maupun hewan. Pigmen utama terdapat pada jaringan tanaman adalah klorofil. Macam dan jumlah pigmen dalam jaringan tanaman tergantung pada jenis, derajat keasaman, tempat tumbuh dan lain-lain (Indriani, 2010).

Warna rumput laut coklat dipengaruhi oleh keberadaan pigmen atau zat warna alami yang terkandung di dalamnya. Pigmen merupakan molekul khusus yang dapat memunculkan warna dengan cara menyerap cahaya matahari dan memantulkannya pada panjang gelombang tertentu. Pigmen yang terkandung pada rumput laut coklat terdiri dari golongan klorofil yang merupakan pigmen utama yang berperan dalam proses fotosintesis dan karotenoid yang berfungsi sebagai pigmen pelengkap (Limantara dan Heriyanto, 2011).

2.1.1 *Padina australis*

Padina australis merupakan rumput laut yang berasal dari kelas *Phaeophyta* (rumput laut coklat) yang terdapat secara melimpah selama bermusim-musim. *Padina australis* memiliki habitat disekitar genangan air diatas batu karang pantai. Morfologinya berbentuk seperti kipas dengan diameter 3-4 cm yang tumbuh dalam lingkaran konsentris. Warnanya coklat kekuning-kuningan atau kadang memutih karena terdapat perkapuran atau kapur (Kerans, 2010).

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

Bentuk thalus yang seperti kipas, membentuk segment-segment lembaran tipis atau disebut lobus dengan garis yang berambut atau radial dan perkapuraan yang terdapat pada permukaan daun sehingga terdapat warna kekuning-kuningan atau kadang memutih. Terdapat holdfas yang berbentuk cakram kecil berserabut, bagian lobus agak melebar dengan pinggir rata dan pada bagian puncaknya terdapat lekukan yang pada ujungnya terdapat dua lapisan sel. Tumbuh menempel pada daerah rata-rata terumbu karang baik ditempat-tempat yang terkena hempasan ombak secara langsung maupun yang terlindungi (Pallalo, 2013).

Klasifikasi *Padina australis* menurut Kerans (2010), adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Eukaryota
Kingdom	: Chromista
Subkingdom	: Chromobiota
Filum	: Ochrophyta
Kelas	: Phaeophyceae
Ordo	: Dictyotales
Famili	: Dictyotaceae
Genus	: <i>Padina</i>



Gambar 1. Rumput Laut Coklat *Padina australis* (Kerans, 2010).

2.1.2 Komposisi Kimia *Padina australis*

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, anti bakteri, anti tumor, anti viral dan anti koagulan (Moroney, *et al.* 2013). Tabel komposisi kimia dari rumput laut coklat *Padina australis* dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Kimia *Padina australis*

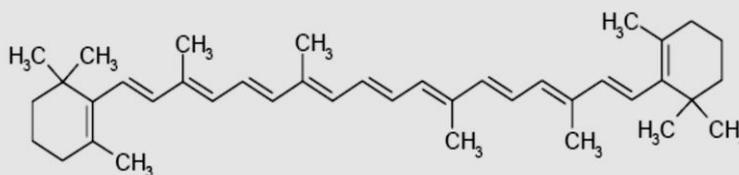
Komposisi	Jumlah (g/100 g)	
	Segar	Kering
Kadar air	90,56±0,16	
Protein	1,02±0,04	10,76±0,54
Lemak	0,4±0,01	4,17±0,04
Abu	2,11±0,17	22,26±1,98
Karbohidrat (<i>by difference</i>)	5,9±0,37	62,21±3,34

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

2.1.3 Jenis Pigmen

2.1.3.1 Pigmen β -Karoten

β -Karoten yaitu pigmen berwarna kuning yang ditemukan secara alami pada tumbuhan dan buah-buahan dan merupakan senyawa organik yang diklasifikasikan sebagai hidrokarbon. Molekul β -karoten terdiri dari delapan unit isoprenoid yang terhubung seperti sebuah rangkaian di mana gabungan unit-unit isoprenoid pada bagian tengahnya berbalik pada pusat molekul sehingga 2 gugus metil pusat terletak pada posisi C1,6 dan sisa gugus metil non-terminal terletak pada posisi C1,5 serta β -karoten mengindikasikan warna kuning (Murthy, 2005). Struktur kimia dari β -karoten menurut Octaviani *et al.*, (2014) dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur β -karoten (Octaviani *et al.*, 2014)

Sifat β -karoten adalah tidak larut dalam air dan pelarut organik polar seperti metanol dan etanol, serta termasuk jenis karotenoid yang mempunyai aktifitas biologis sebagai provitamin A. Di antara beberapa jenis karotenoid, trans β -karoten memiliki aktifitas provitamin A yang paling tinggi. Perubahan struktur trans β -karoten menjadi isomer lain dapat menyebabkan kerusakan β -karoten dan menurunkan aktifitas provitaminnya (Novianto, 2010). Daftar aktivitas provitamin A relatif pada beberapa karotenoid dapat dilihat pada tabel 2.

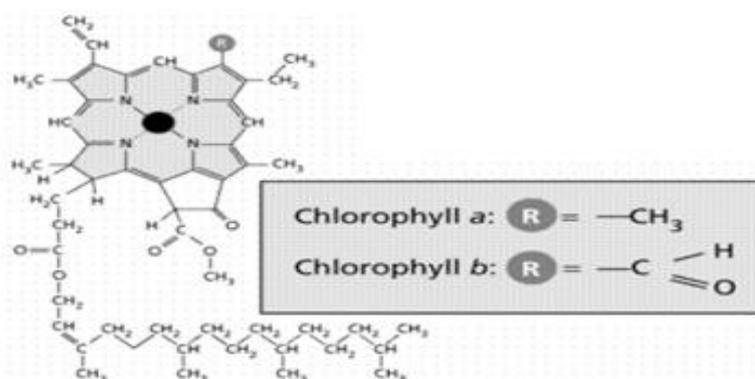
Tabel 2. Sifat-sifat β -karoten

Karakteristik	β -karoten
Nama Kimia	β -karoten
Rumus Bangun	$C_{40}H_{56}$
Berat Molekul	536,87
Densitas	1,0 kg/l
Titik Lebur	180°C-182°C
Kelararutan	Larut dalam lemak dan tidak larut air
Kenampakan	Butiran kristal merah gelap (coklat)

Sumber: Hui dan Yaws (2013).

2.1.3.2 Pigmen Klorofil a dan b

Klorofil adalah suatu magnesium-porfirin yang melekat pada protein. Klorofil adalah katalisator fotosintesis penting yang terdapat dalam membran tilakoid sebagai pigmen hijau dalam jaringan tumbuhan berfotosintesis, yang terikat longgar dengan protein tetapi mudah untuk diekstraksi kedalam pelarut lipid misalnya pelarut aseton dan eter. Tumbuhan tinggi mengandung klorofil a dan klorofil b. Klorofil a adalah senyawa kompleks antara magnesium dan porfirin yang mengandung cincin siklontanon (biasa disebut cincin V). Keempat atom nitrogennya dihubungkan antara ikatan koordinasi dengan ion Mg^{2+} dan membentuk senyawa planar. Rantai sampingnya yang bersifat hidrofob adalah terpenoid alkohol atau fitol yang dihubungkan ikatan ester dengan gugus propionat dari cincin IV (Suharja dan Sutarno, 2009).



Gambar 3. Struktur Klorofil a dan Klorofil b (Ariffaizal, 2008).

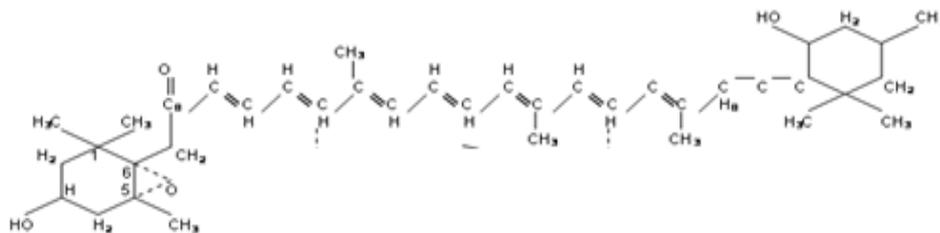
Klorofil merupakan molekul yang sangat besar dan terdiri dari empat cincin pirol yang dibungkan antara yang satu dengan yang lainnya oleh gugus metana ($CH=$). Sifat kimia dari klorofil yaitu dipengaruhi oleh karbon ke tujuh yang mengandung residu propionat dan teresterifikasi dengan fitol sehingga klorofil bersifat nonpolar. Klorofil tidak larut dalam air tetapi larut dalam alkohol, eter dan aseton. Perbedaan yang terdapat pada klorofil a ($C_{55}H_{70}MgN_4O_5$) dan klorofil b ($C_{50}H_{70}MgN_4O_6$) yaitu terletak pada atom C nomor tiga pada klorofil b dan diganti dengan aldehida pada klorofil a.

2.1.3.3 Pigmen Fukosantin

Fukosantin adalah salah satu pigmen yang dihasilkan dari biosintesis karotenoid. Ada perbedaan mengenai pigmen fukosantin. Fukosantin adalah salah satu dari kelimpahan karotenoid, dan berkontribusi lebih dari 10% dari jumlah total produksi dari karotenoid di alam, terutama di lingkungan laut (Murti *et al.*, 2005).

Menurut Nursid *et al.*, (2013). Pigmen Fukosantin merupakan salah satu pigmen karotenoid bioaktif dari alga yang potensial untuk dikembangkan sebagai bahan nutrasetikal. Bentuk formulasi dari senyawa ini telah dipasarkan sebagai produk komersial, dikarenakan memiliki aktivitas sebagai penurun berat badan.

Fukosantin memiliki kemampuan sebagai anti karsinogenik, anti peradangan, melindungi sel terhadap bahan-bahan berbahaya dan penangkal radikal bebas atau sebagai antioksidan. Fukosantin memiliki sifat mudah terdegradasi oleh panas, paparan cahaya dan pH yang rendah.



Gambar 4. Struktur Fukosantin (Nursid, 2013)

2.2 Rumput Laut

Rumput laut merupakan bagian dari tumbuhan tingkat rendah yang tidak memiliki akar, batang dan daun sejati. Tumbuhan ini memiliki bentuk thali yang beragam yaitu uniseluler atau multiseluler dan berpigmen fotosintetik. Rumput laut atau sering disebut makroalga hidup diperairan air tawar atau laut (Indriani, 2010).

Rumput laut memiliki kandungan polisakarida, mineral dan beberapa vitamin yang sangat melimpah. Di samping itu, rumput laut juga mengandung substansi bioaktif seperti polisakarida, protein, lemak, dan polifenol yang berfungsi sebagai antibakteri, antifungi, anti virus dan sebagainya. Ditinjau dari kandungan proksimatnya, secara umum rumput laut mengandung 32,25-63,2% karbohidrat, 3-11,4% serat kasar, 12,95-27,5% air, 1,70-10% protein, 3,5-11% lemak, dan 11,5-23,7% abu. Rumput laut juga memiliki kandungan asam amino, vitamin dan mineral yang mencapai 10-20 kali lipat lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman darat (Reskika, 2011).

Rumput laut dapat digunakan langsung sebagai bahan makanan, beberapa hasil olahan rumput laut seperti agar-agar, karaginan dan alginat merupakan senyawa penting dalam industri. Umumnya rumput laut melekat pada substrat tertentu. Ciri-ciri umum rumput laut adalah tidak mempunyai akar, batang maupun daun sejati tetapi hanya menyerupai batang yang disebut thallus. Rumput laut tumbuh di alam dengan melekatkan dirinya pada karang, lumpur, pasir, batu dan benda keras lainnya. Selain benda mati, rumput laut pun dapat melekat pada tumbuhan lain secara epifitik (Prasetyowati, *et al.*,2008).

Lingkungan tempat hidup rumput laut terutama perairan yang jernih yang memiliki substrat dasar batu karang, karang mati, batuan vulkanik yang berada di dasar perairan. Tumbuhan ini tumbuh didaerah intertidal, sampai daerah tubir dengan ombak besar dan arus deras. Kedalaman yang diperlukan untuk pertumbuhan dari 0,5-10 meter tumbuh subur pada daerah tropis, suhu 27,25-29,30°C dan salinitas 33,5% (Indriani, 2010). Komposisi kimia rumput laut per 100 gram dapat dilihat pada tabel 3:

Tabel 3. Komposisi Kimia Rumput Laut per 100 gram

No	Komposisi	Jumlah
1	Air	81,58 gram
2	Energi	43 kkal
3	Protein	1,68 gram
4	Total Lemak	0,52 gram
5	Karbohidrat	9,57 gram
6	Serat	1,3 gram
7	Kalsium	168 mg
8	Besi	2,85 mg
9	Magnesium	121 mg
10	Fosfor	42 mg
11	Mangan	0,200 mg
12	Sodium	233 mg
13	Vitamin C	3,0 mg
14	Vitamin K	66,0 mcg
15	Vitamin A	116 IU

Sumber: Indriani (2010)

2.2.1 Rumput Laut Coklat

Kelompok rumput laut coklat memiliki bentuk yang bervariasi dan sebagian besar jenis-jenisnya berwarna coklat. Rumput laut coklat biasanya memiliki ciri-ciri sifat adanya pigmen coklat yaitu fukosantin yang menutupi warna hijau dari pigmen klorofil a dan b. Warna rumput laut coklat dipengaruhi oleh komposisi dan kandungan pigmen yang tersusun didalamnya, dimana komposisi pigmen dari masing-masing jenis rumput laut coklat berbeda (Mufti *et al.*, 2013).

Pigmen penyusun pada rumput laut coklat berasal dari golongan klorofil dan turunannya, golongan karotenoid polar (santofil), serta golongan karotenoid non polar (karoten). Klorofil a, pigmen berwarna hijau kebiruan, merupakan pigmen utama dalam proses fotosintetik dari tumbuhan, termasuk didalam rumput laut coklat, sedangkan karotenoid hanya sebagai pigmen pelengkap (Limantara dan Heryanto, 2011).

Beberapa jenis rumput laut juga mengandung protein yang cukup tinggi, karena kandungan gizinya yang tinggi, rumput laut mampu meningkatkan sistem kerja hormonal, limfatik dan juga syaraf. Rumput laut juga bisa meningkatkan fungsi pertahanan tubuh, memperbaiki sistem kerja jantung dan peredaran darah, serta sistem pencernaan. Semua rumput laut kaya akan kandungan serat yang dapat mencegah kanker usus besar. Rumput laut juga membantu pengobatan tukak lambung, radang usus besar, susah buang air besar dan gangguan pencernaan lainnya (Handayani *et al.*, 2005).

2.2.2 Komposisi Kimia Rumput Laut Coklat

Rumput laut coklat memiliki dinding sel yang terdiri atas selulosa dan polisakarida. Rumput laut juga mengandung protein, lemak, serat kasar, vitamin, zat anti bakteri serta mineral. Komposisi dari rumput laut coklat dan kadar mineral dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Komposisi Kimia Rumput Laut Coklat

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

Sumber: Yunizal (1999).

2.3 Ekstraksi Pigmen *Padina australis*

Prinsip ekstraksi yaitu berdasarkan kelarutan, dimana memisahkan zat terlarut yang digunakan atau menghilangkan komponen dari zat terlarut yang tidak digunakan dari fase padat. Kemudian fase padat dicampurkan kedalam fase cair, dalam proses pencampuran tersebut zat terlarut terdifusi dari fase padat ke cair sehingga terjadi pemisahan komponen. Proses tersebut terjadi secara berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara fase padat dan cair. Endapan yang diperoleh dari proses maserasi dipisahkan dan filtratnya dipekatkan (Utami *et al.*, 2009).

Metode yang digunakan dalam ekstraksi berpengaruh pada sifat fisikokimia dan ekstrak yang dihasilkan. Terdapat tiga teknik ekstraksi dengan pelarut organik yaitu maserasi, digestion, perkolasi. Proses maserasi meliputi proses penghancuran sampel, perendaman dengan pelarut dalam waktu tertentu. Kemudian penyaringan dan pengepresan sampai diperoleh cairan. Proses

digestion meliputi pemanasan pada suhu dan waktu yang ditentukan. Proses perkolasi merupakan teknik dengan menggunakan aliran pelarut dengan pemanasan atau tanpa pemanasan (Septiana dan Asnani, 2012).

Ekstraksi bertujuan untuk menarik semua komponen kimia yang terdapat dalam simplisia. Proses pengekstraksian komponen kimia dalam sel tanaman yaitu pelarut organik yang akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dalam pelarut organik diluar sel, maka larutan terpekat akan terdifusi keluar sel maka proses ini akan berulang terus sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi cairan zat aktif didalam dan diluar sel. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi laju ekstraksi adalah tipe persiapan sampel, waktu ekstraksi, kuantitas pelarut, suhu pelarut dan tipe pelarut (Ali *et al.*, 2013).

2.3.1 Maserasi

Maserasi merupakan perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur suatu ruangan. Proses ini bisa dikatakan menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan pada alam. Pada saat proses perendaman, dinding serta membran sel sampel tumbuhan akan terpecah akibat perbedaan tekanan antara diluar dan didalam sel. Hal tersebut mengakibatkan metabolit sekunder yang terdapat dalam sitoplasma akan larut dalam pelarut organik. Lama perendaman yang diatur akan menghasilkan ekstraksi yang sempurna. Pemilihan pelarut dalam proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan dari senyawa bahan pelarut tersebut (Hijaz, 2009).

Prinsip maserasi adalah mengekstraksi komponen yang terkandung dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan pelarut yang sesuai pada temperatur kamar dan terlindungi dari cahaya. Cara kerjanya adalah pelarut akan masuk kedalam sel melewati dinding sel, isi sel akan larut karena adanya

perbedaan konsentrasi antara larutan yang ada didalam sel dan diluar sel. Akan terjadi difusi yaitu ditandai dengan larutan yang mempunyai konsentrasi tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh cairan pelarut yang berkonsentrasi rendah. Hal ini terjadi berulang sampai konsentrasi larutan diluar dan didalam sel seimbang (Miryanti *et al.*, 2011).

Kelebihan menggunakan tehnik maserasi yaitu hasil yang didapat dari ekstraksi banyak serta dapat menghindarkan perubahan kimia terhadap senyawa-senyawa tertentu yang disebabkan oleh pemanasan. Kerugian dari maserasi adalah hasil yang didapat kurang sempurna dikarenakan terjadi kejenuhan pada pelarut dan ekstraksi membutuhkan waktu yang lama. Walaupun demikian, maserasi merupakan proses ekstraksi yang masih umum digunakan karena cara kerja dan peralatan yang dibutuhkan sederhana (Septiyarningsih, 2010).

2.3.2 Fraksinasi

Menurut Romiyanto (2014), pemisahan dalam proses fraksinasi didasarkan dari bobot tiap fraksinya, dimana fraksi dengan berat molekul ringan berada pada bagian atas dan yang memiliki berat molekul tinggi berada pada bagian bawah. Dalam proses fraksinasi biasanya menggunakan pelarut organik sebagai pemisahan fraksi seperti eter, aseton, benzena, etanol, diklorometana atau campuran.

Fraksinasi pada prinsipnya adalah suatu proses penarikan senyawa pada suatu ekstrak dengan menggunakan dua macam pelarut yang tidak saling bercampuran. Dari proses fraksinasi dapat diduga kepolaran dari suatu senyawa yang dipisahkan. Sebagaimana diketahui bahwa senyawa yang bersifat non polar akan larut pada pelarut yang bersifat non polar sedangkan senyawa yang bersifat polar akan larut pada pelarut yang bersifat polar juga (Sari, 2012). Tujuan

fraksinasi adalah untuk mendapatkan fraksi aktif dari sampling. Ditambahkan oleh Ningsih *et al.*, (2006), fraksinasi dan isolasi lebih lanjut terhadap ekstrak kasar dab bertujuan untuk memperoleh senyawa yang lebih murni.

2.3.3 Evaporasi

Prinsip dasar dari evaporator atau biasa disebut *vacum rotary evaporator* yaitu adanya pemanasan menggunakan hot plate yang dibantu dengan penurunan tekanan pada labu alas bulat “sampel” yang dipercepat dengan pemutaran pada labu alas bulat sampel. Dengan bantuan pompa vakum yang mengalirkan air (aquades) dari suatu wadah kedalam kondensor dan dikeluarkan lagi oleh kondensor ke dalam wadah dan begitu seterusnya. Ketika uap dari pelarut mengenai dinding-dinding kondensor, maka pelarut ini mengalami proses yang dinamakan kondensasi yaitu perubahan fase gas menjadi cair. Demikian proses penguapan ini dilakukan hingga diperoleh pelarut yang sudah tidak menetes lagi pada labu alas bulat penampung dan juga bisa dilihat dengan semakin kentalnya zat tersebut dan membentuk gelembung-gelembung pecah pada permukaan zatnya (Romiyanto, 2014).



Gambar 5. Rotary Vacum Evaporator

Evaporasi merupakan proses penguapan atau pemekatan pelarut dalam suatu bahan atau ekstrak kasar cair yang menghasilkan zat cair pekat dengan

konsentrasi yang lebih tinggi. Dalam proses evaporasi menghasilkan sisa penguapan berupa zat cair ataupun zat cair dengan konsentrasi tinggi dan bukan merupakan zat padat ataupun fraksi-fraksi. Alat yang digunakan dalam proses evaporasi dinamakan evaporator. Evaporator sendiri memiliki prinsip dasar berupa penukaran panas dan pemisahan uap yang terbentuk dari cairan pelarut (Hasanah, 2014).

2.3.4 Nitrogen (N₂)

Nitrogen merupakan komponen terbesar pertama pada atmosfer bumi dengan jumlah mencapai 70%, dalam sistem periodik nitrogen disimbolkan "N" dengan 7 unsur atom. Nitrogen bersifat independen dan tidak mudah bereaksi dengan senyawa atau unsur lain, berbentuk gas, tidak berwarna dan tidak berbau. Prinsip penguapan pelarut dengan menggunakan gas nitrogen ialah molekul N₂ berikatan kovalen rangkap tiga dengan energi ikatan tinggi bereaksi dengan pelarut, selain itu nitrogen bereaksi dengan hidrogen atau oksigen pada suhu tinggi (Romiyanto, 2014).

Sifat Kimia gas nitrogen antara lain memiliki energi ikatan sebesar 1410 kJ/mol, sukar bereaksi pada suhu tinggi (endoterm), pada suhu ruang mampu bereaksi dengan logam seperti Li dan mampu bereaksi dengan oksigen maupun hidrogen pada suhu tinggi melalui loncatan bunga api yang membentuk gas NH₃, dan NO₃. Metode penguapan pelarut dengan gas nitrogen yaitu penyemprotan gas N₂ pada tekanan tertentu, sehingga molekul N₂ berikatan dengan molekul pelarut dan diuapkan melalui reaksi dengan oksigen diudara (Hasanah, 2014).

2.4 Pelarut Ekstraksi Pigmen *Padina australis*

Pelarut merupakan faktor yang menentukan hasil ekstraksi sehingga merupakan salah satu faktor yang menentukan sehingga dalam pemilihan

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

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

Nuraini (2007), menyatakan bahwa prinsip ekstraksi dengan pelarut organik ialah dengan mengontakan bahan yang akan diekstrak dengan pelarut selama beberapa waktu tertentu hingga terlarut, kemudian komponen terlarut akan diekstrak dan dipisahkan dengan pelarut dari bahan yang diekstrak. Konstanta dielektrik pelarut menurut Sudarmadji *et al.*, (2007) dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Konstanta Dielektrik dan Tingkat Kelarutan Beberapa Jenis Pelarut

Pelarut	Konstanta Dielektrik	Tingkat Kelarutan Dalam Air
Metanol	33,60	Misibel
Aseton	20,70	Misibel
Air	80,40	Misibel
Dietil Eter	3,34	Sedikit
Ethyl Asetat	6,02	Sedikit
N-heksan	1,89	Tidak larut
Petroleum Eter	1,90	Tidak larut

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

2.4.1 Aseton (CH_3COCH_3)

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

Aseton larut dalam berbagai perbandingan dengan air, etanol, dietil eter, dan lain-lain. Aseton merupakan pelarut yang penting. Dalam laboratorium aseton digunakan sebagai pelarut polar dalam kebanyakan reaksi organik, seperti SN_2 (Putri, 2010). Karakteristik sifat-sifat aseton dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 6. Sifat-sifat Aseton

No	Karakteristik	Aseton
1	Nama lain	B-ketopropana, dimetil keton, dimetilformaldehida, DMK
2	Rumus bangun	CH ₃ COCH 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 °C
7	Massa molar	58.08 g/mol
8	Kelarutan	Larut dalam berbagai perbandingan dengan air, etanol, dietil eter

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

2.4.2 Metanol (CH₃OH)

Metanol atau metil alkohol (CH₃OH) merupakan asam lemah turunan yang paling sederhana dari alkohol, berbentuk cairan yang tidak berwarna, mudah menguap dan mudah terbakar dan dapat diubah menjadi formaldehid (Vogel, 1987). Dahulu metanol dibuat dari penyulingan kayu sehingga disebut juga sebagai alkohol kayu (*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 (Daintith, 2004).

Metanol merupakan monohidrat dimana tiap molekulnya mengandung satu gugus hidroksil. Senyawa ini berbahaya bila dikonsumsi dalam jumlah besar, resiko yang dialami yaitu kebutaan. Sifat dari metanol yaitu dapat larut secara sempurna dalam air pada suhu 20°C, memiliki titik didih 65°C, dalam suhu ruang berbentuk cair, mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar, memiliki bau yang khas dan beracun (Romiyanto, 2014). Sifat fisik dan kimia metanol dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Sifat Fisik dan Kimia Metanol

No	Karakteristik	Metanol
1	Nama Lain	Hidroksi metana, metil alkohol, metil hidrat, alkohol kayu dan karbinol
2	Rumus bangun	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{OH} \\ \\ \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$
3	Sifat	Mudah terbakar, tidak berwarna
4	Titik didih	64.7°C
5	Titik leleh	-97°C
6	Massa molar	32.04 g/mol
7	Densitas	0,7918°C
8	Titik nyala	11°C
9	Konstanta dielektrik	33

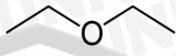
Sumber: Romiyanto (2014)

2.4.3 Dietil eter

SNI (1992) melaporkan bahwa dietil eter merupakan senyawa yang komponen utamanya ($\text{C}_2\text{-H}_5\text{-O-C}_2\text{H}_5$). Adapun sifat dari dietil eter yaitu berbentuk cair jernih, tidak berwarna, mudah menguap, mudah terbakar dan memiliki bau khas. Ditambahkan oleh Romiyanto (2014) bahwa dietil eter dikenal sebagai etoksi etana memiliki kelarutan dalam air sebesar 6,9 g/100 ml. Dietil eter biasanya digunakan pada anestesi umum.

Dietil eter merupakan cairan bening yang mudah terbakar dan memiliki bau yang khas. Dietil eter banyak dipakai sebagai pelarut laboratorium yang umum, memiliki kelarutan terbatas dalam air dan kelarutan yang tinggi didalam minyak, lemak dan resin sehingga sering digunakan untuk proses ekstraksi cair (Mufti, 2014). Sifat fisik dan kimia dietil eter menurut Romiyanto (2014) dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8. Sifat Fisik dan Kimia Dietil Eter

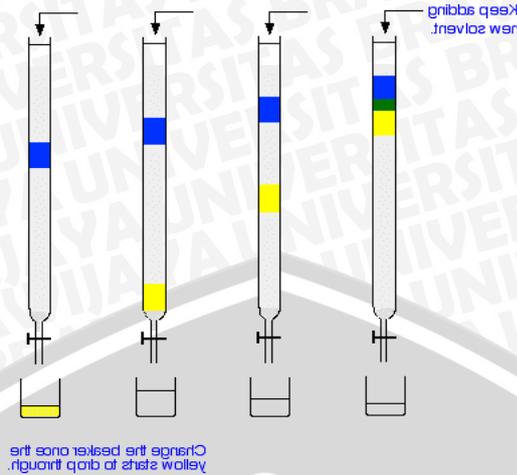
No	Karakteristik	Dietil Eter
1	Nama IUPAC	Ethoxyethane 3-oxapentane
2	Rumus molekul	C ₄ H ₁₀ O (C ₂ H ₅ OC ₂ H ₅)
		
3	Rumus Kimia	CH ₃ – CH ₂ – O – CH ₂ – CH ₃
4	Massa molar	74.12 g/mol
5	Densitas dan Fase	0.7134 g/cm ³ , cair
6	Titik leleh	-116.3°C (156.85 K)
7	Titik didih	34.6°C (307.75 K)
8	Penampilan	Jenir, cairan tak berwarna
9	Viskositas	0.224 cP at 25°C

Sumber: Romiyanto (2014)

2.5 Kromatografi

2.5.1 Kromatografi Kolom

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



Gambar 6. Proses Kromatografi Kolom

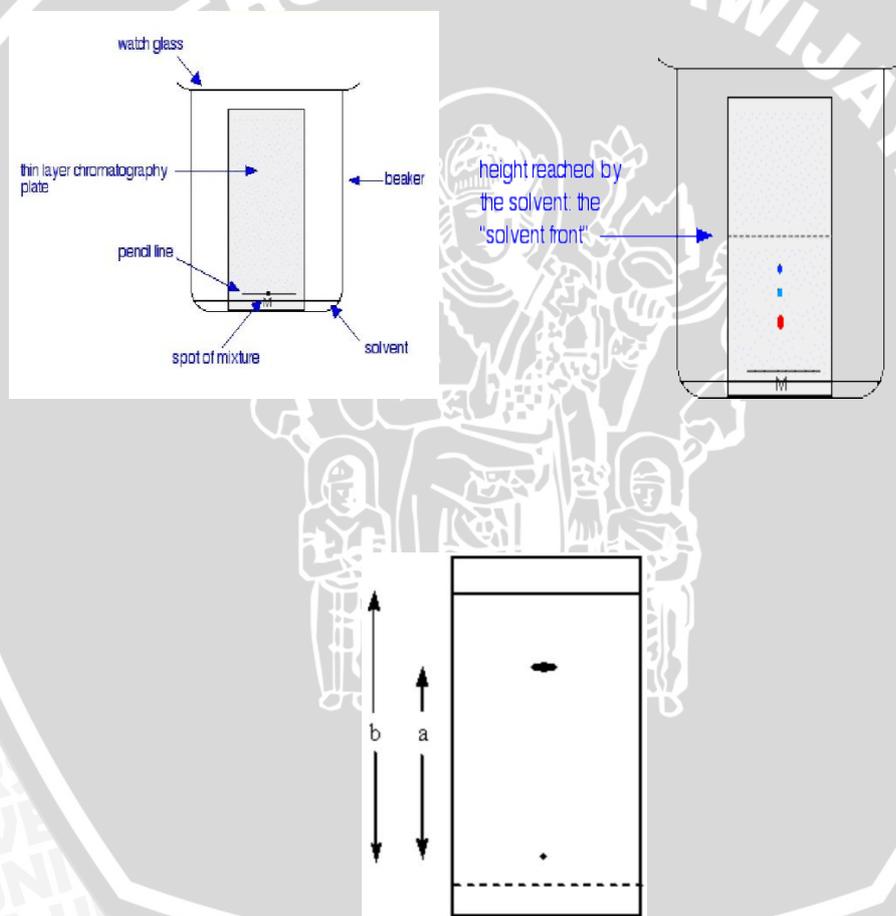
Kromatografi kolom yaitu suatu alat yang digunakan untuk memisahkan komponen-komponen dalam campuran. Prinsip kerjanya yaitu didasarkan pada absorpsi komponen yang afinitas permukaannya berada pada fase diam. Adsorben berperan sebagai fase diam dan cairan yang mengalir disepanjang kolom disebut fase gerak. Sampel yang memiliki afinitas besar akan tertahan dan yang memiliki afinitas kecil akan mengalir mengikuti aliran pelarut. Tujuan dari kromatografi kolom ini yaitu untuk mengisolasi komponen pada sampel dari campurannya (Nurhayati, 2014).

2.5.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Menurut Liana (2010), kromatografi Lapis Tipis adalah metode pemisahan fitokimia. Lapisan yang bertugas memisahkan terdiri atas bahan berbutir-butir (fase diam), diletakan pada penyangga berupa pelat gelas, logam atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisahkan berupa larutan dan ditotolkan berupa bercak atau pita (awal), kemudian pelat dimasukan ke dalam bejana tertutup yang berisi larutan (fase gerak), pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan). Pendeteksi paling sederhana jika senyawa menunjukkan

penyerapan pada UV gelombang pendek (radiasi utama kira-kira 254nm). Pada sistem KLT dikenal dengan istilah kecepatan rambat suatu senyawa yang diberi simbol Rf (*Retardation factor*). Harga dari Rf ditentukan oleh jarak rambat senyawa dari titik awal dan jarak rambat fase gerak dari titik awal. Penentuan harga Rf adalah sebagai berikut:

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



Gambar 7. Proses Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (Clark, 2002)

KLT merupakan cara cepat dan mudah untuk melihat kemurnian suatu sampel maupun karakterisasi suatu sampel dengan menggunakan standart. Cara ini praktis untuk analisis skala kecil karena hanya memerlukan bahan yang sangat sedikit dan waktu yang dibutuhkan sangat singkat. Kemurnian suatu senyawa bisa dilihat dalam jumlah bercak yang terjadi pada plat KLT atau jumlah puncak pada kromatogram KLT. Uji kualitatif dengan KLT dapat dilakukan dengan membandingkan waktu retensi kromatogram sampel dengan kromatogram senyawa standar (Handayani *et al.*,2005).

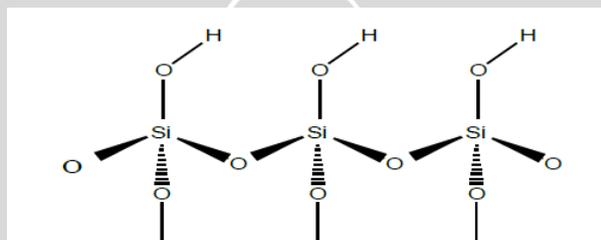
2.5.3 Fase Diam

Fase diam merupakan bahan penyerap yang berperan dalam memisahkan senyawa campuran dalam bahan. Terdapat beberapa fase diam yang akan digunakan dalam kromatografi antara lain fase diam tidak boleh bereaksi dengan fase gerak, fase diam harus berinteraksi dengan sampel ekstrak, dapat dilewati oleh fase gerak dan terikat kuat pada posisinya (Ardianingsih, 2009). Ditambahkan oleh Hasanah (2014) bahwa terdapat beberapa jenis bahan yang digunakan sebagai fase diam kromatografi kolom antara lain selulosa, silika atau poliamida.

Fase diam yang digunakan KLT merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel 10-30 μ m. Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit ukurannya, maka semakin baik efisiensi dan resolusinya. Penjerap yang paling sering digunakan yaitu silika dan serbuk selulosa, sedangkan mekanisme sorpsi yang utama pada KLT yaitu partisi dan adsorpsi. Besarnya distribusi senyawa sangat ditentukan oleh kesesuaian kepolaran senyawa antara fase diam dan fase gerak yang digunakan. Senyawa yang polar akan cenderung terdistribusi pada fase polar sedangkan senyawa nonpolar akan cenderung terdistribusi pada fase nonpolar (Indharini, 2010).

2.5.3.1 Silica Gel

Silica gel memiliki struktur dengan gugus polar berupa ikatan Si-O dan O-H serta dapat berinteraksi dengan senyawa yang dipisahkan silika gel sebagai fase diam dalam kromatografi. Selain itu silika gel dapat membentuk ikatan hidrogen antar alkohol, fenol, amina, amida serta asam karboksilat (Hasanah, 2014). Ditambahkan oleh Romiyanto (2014) yang mengatakan bahwa silika gel merupakan polimer asam silikat dengan berat molekul besar, yang terdiri dari globula-globula SiO_2 tetra hidral tidak beraturan yang membentuk kerangka tiga dimensi, bertekstur padat kenyal, mampu menyerap air dan memiliki sifat polar.



Gambar 8. Struktur Silica Gel (Hasanah, 2014).

Pada sistem kromatografi, pelarut dan solut berinteraksi dengan fase diam. Ketika permukaan *silica gel* kontak langsung dengan pelarut, maka permukaan akan ditutupi dengan suatu lapisan molekul pelarut. Jika fase gerak terdiri dari suatu campuran pelarut maka sebagian permukaan akan ditutupi oleh satu jenis pelarut dan bagian permukaan lain akan ditutupi oleh jenis pelarut yang lain. Interaksi solut dengan fase diam ditimbulkan oleh dua atau lebih interaksi, tergantung dari jenis molekul permukaan (Romiyanto, 2014).

Menurut Asyhar (2010) *silica gel* ada 2 macam yaitu (1) GF245 dengan G melambangkan *gypsum* (CaSO_4), F melambangkan Fluorescence dan angka 245 menunjukkan besarnya pajang gelombang yaitu 245 nm. *Silica gel* jenis ini sering digunakan pada kromatografi lapis tipis (TLC) dan (2) H, tanpa adanya

gypsum fluorescence. *Silica gel* jenis ini biasa digunakan pada kromatografi kolom. *Silica gel* dapat membentuk ikatan hidrogen dipermukaanya karena pada permukaanya terikat gugus hidroksil. Oleh karena itu sifat dari *silica gel* sangat polar.

2.5.4 Fase Gerak

Fase gerak merupakan fase yang bergerak pada reaksi pemisahan senyawa campuran kromatografi berupa bahan cair atau pelarut. Adapun syarat-syarat fase gerak dalam kromatografi yaitu tidak bereaksi dengan fase diam, fase gerak mampu melarutkan sampel dan fase gerak mampu melarutkan sampel dan dapat mengalir melewati fase diam (Ardianingsih, 2009). Ditambahkan oleh Hasanah (2014), fase gerak yang digunakan dalam kromatografi kolom adalah pelarut tunggal maupun campuran yang dipilih melalui tingkat kelarutan bahan dimulai dari pelarut polar hingga non polar.

2.5.4.1 N-Heksan (C_6H_{14})

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. 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). Ditambahkan oleh Abdullah dan Widiyawati (2010) yang melaporkan sifat fisik dari n-heksan adalah berbentuk cair, jernih, tidak berwarna, berbau seperti gasoline, memiliki sifat tidak larut dalam air dan mudah larut dalam alkohol, tekanan uap 151 mmhg, nilai viskositas 0,31 mPas, memiliki titik didih 760 mmhg pada suhu $62^{\circ}C$

- 39°C, titik beku -95°C dan nilai kelarutan 20°C (0,1 g/L). Sifat fisika dan kimia pelarut n-heksan menurut Siswadi dan Permatasari (2009) dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 9. Sifat Fisika dan Kimia N-Heksan

No	Karakteristik	Keterangan
1	Rumus molekul	C ₆ H ₁₄
2	Rumus kimia	H ₃ C-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
3	Berat molekul	86, 18 g/mol
4	Bentuk, warna	Cairan bening
5	Densitas	0.6548 g/cm ³ , cair
6	Titik leleh	-95°C (178 K)
7	Titik didih	69 (342 K)
8	Kelarutan dalam air	Tidak larut
9	Viskositas	0.294 cp (25°C)

Sumber: Siswadi dan Permatasari (2009)

2.5.4.2 Etil Asetat (C₄H₈O₂)

Etil asetat merupakan pelarut polar menengah sehingga golongan senyawa yang bersifat polar menengah akan larut pada pelarut ini. Etil asetat adalah pelarut polar menengah (semi-polar) bersifat volatil yang memiliki indeks polaritas sebesar 4,4 (Reskika, 2011). Etil asetat dengan rumus CH₃COOC₂H₆ digunakan sebagai pelarut tinta, perekat, resin. Sifat fisika dan kimia dari etil asetat dapat dilihat pada tabel 10.

Tabel 10. Sifat Fisika dan Kimia Etil Asetat

No	Spesifikasi	Keterangan
1	Bentuk	Cairan tak berwarna
2	Rumus molekul	CHO (C ₂ H ₅ OC ₂ H ₅)
3	Berat molekul	88,106 g/mol
4	Titik didih (1 atm)	77,1 ^o C
5	Temperatur Kritis	250 ^o C
6	Tekanan kritis	
7	Densitas	1.85 g/mol
8	Kemurnian	>99.5%

Sumber : Absori dan Paramitha (2011)

Menurut SNI (1992), etil asetat adalah cairan jernih, tak berwarna, memiliki bau khas, yang bagian terbesarnya terdiri dari etil asetat yang memiliki rumus CH₃COOC₂H₅ dan terutama digunakan sebagai pelarut tinta, perekat resin. Syarat mutu etil asetat dapat dilihat pada tabel 11.

Tabel 11. Syarat Mutu Etil Asetat

Uraian	Satuan	Persyaratan
Warna	Hazen	Maks. 10
Kadar etil asetat	%b/b	Min 99,0
Bobot jenis 20/20 ^o C	-	0,900-0,903
Indeks bias, NO 20 ^o C	-	1,370-1,375
Jarak destilasi	^o C	76,5-78,5
Sisa penguapan	%b/b	Maks 0,01
Keasaman	%b/b	Maks 0,01
Kadar air	%b/b	Maks 0,01

Sumber: SNI (1992)

2.5.5 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Pada saat ini, KCKT merupakan metode kromatografi cair yang pemakaiannya telah berkembang, baik untuk analisis rutin maupun untuk preparatif yang banyak dilaboratorium. Apabila dibandingkan dengan kromatografi gas KCKT diapresiasi pada suhu kamar dimana senyawa yang tidak tahan panas dapat ditentukan dengan mudah dan sifat fase gerak dapat diubah dengan merubah komposisi dan fase gerak yang digunakan (Romiyanto, 2014).



Gambar 9. Instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Romiyanto, 2014)

Menurut Putri (2010), kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan salah satu metode kimia dan fisikokimia. KCKT termasuk metode analisis terbaru suatu teknik kromatografi dengan fase gerak cairan dan fase diam suatu padatan. Banyak kelebihan metode ini apabila dibandingkan dengan metode lainnya. Kelebihan itu antara lain:

- Mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran
- Memudahkan pelaksanaan
- Kecepatan analisis dan kepekaan tinggi
- Dapat dihindari terjadinya dekomposisi / kerusakan bahan yang dianalisis

- Resolusi yang baik
- Dapat digunakan bermacam-macam detektor
- Kolom dapat digunakan kembali

Menurut Indriani (2010), keunggulan KCKT yaitu dapat menangani yang stabilitasnya terhadap suhu terbatas, begitu juga dengan volatilitas bila tanpa menggunakan derivatisasi. KCKT juga dapat memisahkan senyawa yang sangat serupa dengan resolusi, baik waktu yang diperlukan untuk memisahkan suatu larutan dengan KCKT biasanya singkat. KCKT juga dapat digunakan untuk analisa kuantitatif dengan baik dan dengan presisi yang tinggi dengan koefisien variasi dapat kurang dari 1%.

Menurut Ardianingsih (2009), rangkaian alat atau komponen dasar yang biasa dipakai dalam tehnik kromatografi ion terdiri dari:

- Eluent, yaitu berfungsi sebagai fase gerak yang akan membawa sampel masuk kedalam kolom pemisah.
- Pompa, berfungsi untuk mendorong *eluent* dan sampel masuk ke dalam kolom. Kecepatan alir ini dapat dikontrol dan perbedaan kecepatan bisa mengakibatkan perbedaan hasil.
- Injektor, yaitu tempat masuknya sampel dan kemudian sampel dapat didistribusikan masuk kedalam kolom.
- Kolom pemisah ion, , berfungsi memisahkan ion yang terdapat dalam sampel, keterpaduan antara kolom dan *eluent* bisa memberikan hasil yang maksimal, begitu pula sebaliknya jika tidak ada kecocokan maka tidak akan memberikan hasil.

2.5.5.1 Prinsip Kerja KCKT

Prinsip kerja KCKT adalah sebagai berikut : dengan bantuan pompa fase gerak cair dialirkan melalui kolom ke detektor. Cuplikan dimasukan ke dalam aliran fase gerak dengan cara disuntikan. Di dalam kolom terjadi pemisahan komponen-komponen campuran, karena perbedaan kekuatan interaksi antara solut dengan fase diam. Solut yang kurang kuat interaksinya dengan fase diam maka akan keluar dari kolom terlebih dahulu dan solut yang kuat berinteraksi dengan fase diam akan keluar dari kolom lebih lama. Setiap komponen campuran yang keluar dari kolom kemudian dideteksi oleh detektor kemudian direkam dalam bentuk kromatogram. Jumlah peak menyatakan komponen sedangkan luas peak menyatakan konsentrasi komponen dalam campuran. Komputer dapat digunakan untuk mengontrol sistem kerja dari KCKT, mengumpulkan serta mengolah data hasil pengukuran KCKT. Pada kromatografi atau KCKT, jika pasangan fase diam lebih polar dan fase gerak lebih non polar dikenal dengan KCKT fase normal (*normal phase*) dan apabila pasangan fase diam lebih non polar dari pada fase geraknya maka dikenal dengan KCKT fase terbalik (*reversed phase KCKT*) (Romiyanto, 2014).

Mekanisme KCKT menurut Kupiec (2004), merupakan sistem yang digunakan dalam kromatografi sering dikelompokkan kedalam salah satu dari empat jenis berdasarkan mekanisme kerja, adsorpsi, partisi, pertukaran ion dan eksklusi. Adsorpsi kromatografi muncul dari interaksi antara zat terlarut permukaan fase diam padat. Kromatografi partisi melibatkan fase diam cair yang bercampur dengan eluen dan dilapisi pada suatu pendukung inert. Pertukaran ion kromatografi memiliki fase diam dengan ionically dibebankan permukaan yang berbeda dari tuduhan sampel. Tehnik ini didasarkan pada ionisasi sampel itu kuat pada muatan sampel, semakin kuat daya tarik pada fase diam karena itu akan memakan waktu lebih lama untuk melulusi dari kolom. Ukuran eksklusi

adalah yang sederhana contohnya scrining oleh ukuran molekul. Tahap stasioner terdiri dari bahan dengan tepat dikontrol ukuran pori. Partikel yang lebih kecil tertangkap dalam materi kolom dan akan melulusi lambat partikel lebih besar.

2.6 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometer merupakan instrumen yang digunakan untuk analisa kimia berdasarkan sifat-sifat dengan interaksi antara energi radiasi dengan radiasi elektromagnetik dengan zat kimia. Hasil dari interaksi ini dapat menimbulkan beberapa peristiwa seperti pemantulan, pembiasan, interferensi, difraksi, absorpsi, fluoresensi dan ionisasi (Sudarmadji *et al.*,2007). Menurut Suparmi dan Sahri (2009), besarnya serapan cahaya sebanding dengan jumlah molekul sesuai dengan hukum *Lambert-Beer* dengan ketentuan larutan harus jernih dan encer, alat tidak terdisosiasi, berasosiasi atau bereaksi dengan pelarut, rumus perhitungan ialah: $A = \epsilon bc$

Keterangan:

A = Absorbansi

ϵ = Absorptivitas Molar (*Molar extinction coefficient*)

b = Tebal Tempat Komponen

c = Konsentrasi Komponen



Gambar 10. Spektrofotometri UV-vis

Spektrofotometri merupakan suatu metode analisa yang didasarkan pada pengukuran serapan sinar monokromatis oleh suatu lajur larutan berwarna pada

panjang gelombang spesifik dengan menggunakan monokrom prisma atau kisi difraksi dengan detektor fototube. Spektrofotometri dapat dianggap sebagai perluasan suatu pemeriksaan visual dengan studi yang lebih mendalam dari absorpsi energi. Absorpsi radiasi oleh suatu sampel diukur pada berbagai panjang gelombang dan dialirkan oleh suatu perkam untuk menghasilkan spektrum yang khas untuk komponen yang berbeda (Indriani, 2010).

Prinsip dari spektrofotometri UV-Vis yaitu mengukur jumlah cahaya yang diabsorpsi atau ditransmisikan oleh molekul-molekul di dalam larutan. Ketika panjang gelombang cahaya ditransmisikan melalui larutan sebagian energi akan diserap (diabsorpsi). Besarnya kemampuan molekul-molekul zat terlarut untuk mengabsorpsi cahaya panjang gelombang tertentu dikenal dengan istilah *absorbansi*, yang setara dengan nilai dari konsentrasi larutan tersebut dan panjang berkas cahaya yang dilalui (1 cm dalam spektrofotometri) menuju suatu point dimana presentase jumlah cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi diukur dengan phototube (Rusli, 2009).

Spektrofotometri UV-Vis adalah anggota teknik analisis spektroskopik yang memakai sumber REM (radiasi elektromagnetik) ultraviolet dekat (190-389 nm) dan sinar tampak (380-780 nm) dengan memakai instrumen spektrofotometer. Spektrofotometri UV-Vis melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometri UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibandingkan kualitatif (Mukti, 2013).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan untuk ekstraksi dan isolasi, serta peralatan untuk analisa. Alat-alat yang digunakan untuk proses ekstraksi dan isolasi antara lain gunting, timbangan digital, *beakerglass* (500 ml, 1000 ml), gelas ukur 100 ml, spatula, corong kaca, labu erlenmeyer 250 ml, corong pisah, *rotary vacuum evaporator*, sendok bahan, pipet tetes, kolom kromatografi, statif, dan botol vial/botol sampel 10 ml. Adapun peralatan yang digunakan pada proses analisa antara lain penggaris, *cutter*, pensil, pipa kapiler, pinset, *beakerglass* 50 ml, pipet tetes, Spektrofotometer *UV-Vis* merk Shimadzu 1601, dan instrumen KCKT (*Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*).

3.1.2 Bahan Penelitian

diambil dari kawasan pantai Sumenep, Madura. Adapun bahan kimia Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan adalah rumput laut coklat *Padina australis* yang yang digunakan antara lain dietil eter PA, metanol PA (*pro analysis*), dietil eter PA, etil asetat PA, CaCO_2 , n-heksan PA, garam (NaCl), air, *silica gel* F-254, *aluminium foil*, *plastic wrap*, kertas saring kasar dan halus, kapas, pasir laut, plat KLT (Kromatografi Lapis Tipis) *silica gel* (SiO_2) F-254, kertas label, kertas tisu dan gas nitrogen (N_2).

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksploratif. Analisis dalam penelitian deskriptif hanya dilakukan sampai taraf deskripsi, yaitu menganalisis atau menyajikan data secara sistemik sehingga lebih mudah dipahami dan disimpulkan, sedangkan penelitian eksploratif bertujuan untuk menemukan sesuatu yang baru berupa pengelompokan suatu gejala atau fakta tertentu. Penelitian deskriptif eksploratif bertujuan untuk menggambarkan suatu variabel, gejala, dan keadaan atau fenomena apa adanya tanpa menguji suatu hipotesis tertentu (Arikunto, 2002). Penelitian eksploratif bertujuan untuk menggambarkan suatu keadaan atau fenomena tertentu secara sistematis, faktual dan akurat melalui berbagai sifat dan faktor yang mempengaruhinya (Chusairi, 2013).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Sampel *Padina australis*

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

Sebelum dilakukan proses ekstraksi, sampel rumput laut coklat *Padina australis* diambil dari dalam *freezer*, kemudian dibawa ke dalam ruang gelap dan dicuci dengan air mengalir untuk membersihkan sampel dari kotoran, serta memilah sampel agar tidak tercampur dengan spesies rumput laut lain.

Selanjutnya sampel dikering anginkan dengan cara dihamparkan di atas kertas dan bantuan kain untuk mengurangi air pada permukaan sampel.

3.3.2 Ekstraksi

Ekstraksi pigmen dilakukan dengan menggunakan metode Maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi dengan peredaman serbuk sampel kedalam air atau pelarut organik sampai meresap sehingga melarutkan susunan sel dan zat-zat yang terkandung didalamnya (Daud *et al.*, 2011). Menurut Setyohadi *et al.*, (2013) perbedaan konsentrasi didalam dan diluar sel pada saat proses maserasi berlangsung memicu terjadinya aliran pelarut yang mengalir pada sel sehingga terjadi pemecahan dinding serta membran sel dan juga terjadi pembengkakan pada sitoplasma. Masuknya zat pelarut kedalam sel mengakibatkan zat yang terkandung didalam sitoplasma akan larut kedalam pelarut sesuai tingkat kelarutannya.

Menurut indah *et al.*,(2010), pelarut metanol merupakan pelarut yang mampu mengekstrak paling banyak zat warna dibandingkan dengan pelarut lain. Hal ini dikarenakan metanol bersifat dapat bercampur dengan air dan dapat melarutkan senyawa organik yang terkandung pada bahan dengan cara merusak sel yang ada didalam jaringan sehingga pigmen dapat larut dalam bahan hingga bahan berwarna pucat, sedangkan peran aseton yaitu mengangkat pigmen yang bersifat semipolar.

Sampel rumput laut *Padina australis* dicuci lalu ditiriskan, kemudian dipotong-potong dengan ukuran $\pm 1,5$ cm menggunakan gunting, selanjutnya sampel ditimbang sebanyak 100 gram dan dihaluskan dengan menggunakan mortar alu dengan tujuan untuk memperluas permukaan sampel. Pada saat proses penghalusan sampel ditambahkan $\pm 0,5$ gram CaCO_3 sebagai penetral karena proses ekstraksi akan berjalan secara maksimal pada pH netral.

Pada saat proses maserasi, sampel rumput laut *Padina australis* dimasukan kedalam *beaker glass* yang sudah dibungkus dengan menggunakan *aluminium foil* agar terhindar dari cahaya yang dapat merusak pigmen atau dapat menimbulkan degradasi yang memiliki sifat sensitif terhadap cahaya. Ditambahkan pelarut metanol (CH_3OH) dan aseton (CH_3COCH_3) dengan perbandingan 7/3 (v/v) sebanyak 300 ml kedalam *beaker glass* kemudian ditutup menggunakan *cling wrap* untuk meminimalkan penguapan pelarut dan dilapisi dengan *aluminium foil* untuk meminimalkan dari paparan cahaya. Penggunaan pelarut metanol dikarenakan metanol mempunyai sifat universal sehingga dapat melarutkan senyawa yang memiliki sifat polar dan non polar, sedangkan menggunakan aseton yaitu dengan tujuan mengekstrak senyawa organik yang bersifat polar. Selanjutnya sampel diletakan dalam ruangan gelap pada suhu ruang selama 2 kali 24 jam.

Setelah dilakukan maserasi langkah selanjutnya yaitu dilakukan penyaringan (filtrasi) menggunakan kertas *Whatmen* no. 42 untuk memisahkan hasil filtrat dengan residu sehingga filtrat yang dihasilkan bersih tanpa tercampur dengan residu. Dilakukan lagi dengan lama waktu 12 jam untuk memaksimalkan hasil maserasi.

3.3.3 Fraksinasi dan Evaporasi

Fraksinasi atau partisi bertujuan untuk mengendapkan fraksi dari pigmen yang terkandung didalam filtrat hasil dari maserasi. Menurut Yuliasih *et al.*, (2013) fraksinasi yaitu proses pemisahan fraksi yang memiliki karakteristik berbeda dalam larutan dengan prinsip *Like Dissolves Like* yaitu pelarut polar akan melarutkan pelarut yang bersifat polar dan non polar. Pada proses fraksinasi dilakukan penambahan dietil eter ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$), saturasi garam dan air secara berturut (100 ml : 50 ml : 120 : 10 ml) dengan menggunakan corong

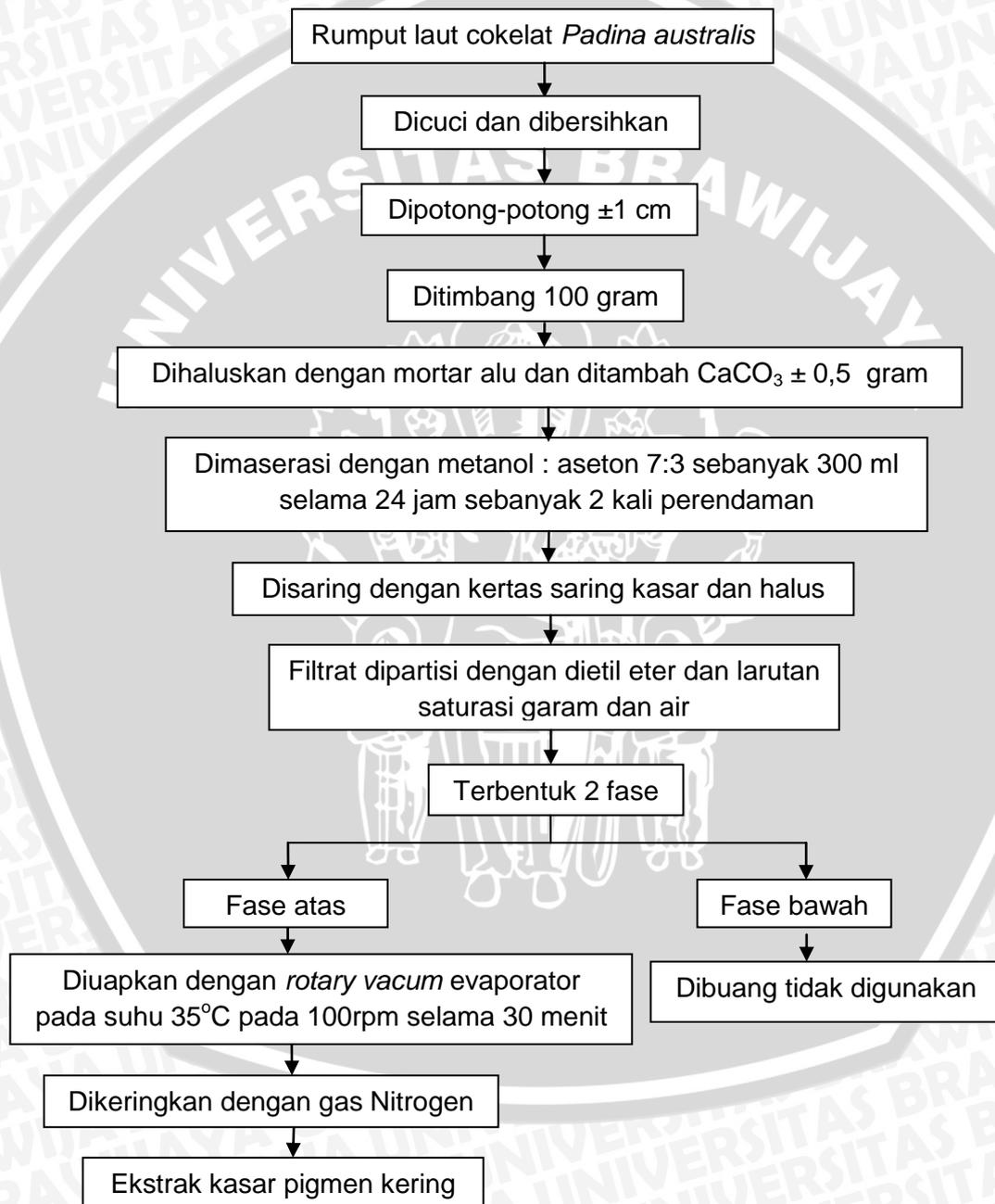
pisah, saat penambahan larutan kedalam filtrat sesekali digoyangkan untuk menghomogenkan larutan untuk memaksimalkan proses fraksinasi.

Pada saat proses fraksinasi berlangsung, terjadi pemisahan antara dua fase yaitu fase atas dan fase bawah berdasarkan kelarutan dan massa jenisnya. Penggunaan dietil eter ($C_4H_{10}O$) bertujuan untuk mengikat senyawa pigmen yang terkandung dalam filtrat hasil maserasi. Dietil eter ($C_4H_{10}O$) memiliki sifat non polar sehingga dapat melarutkan senyawa pigmen yang bersifat non polar. Dietil eter memiliki massa jenis paling ringan didalam larutan menyebabkan senyawa pigmen yang terlarut terangkat keatas dan membentuk fase atas. Air dan saturasi garam bersifat polar dan memiliki massa jenis lebih berat dibandingkan dengan dietil eter dan membentuk fase bawah.

Fase bawah tidak digunakan pada proses fraksinasi sedangkan fase atas yang mengandung hampir seluruh senyawa pigmen ditampung dalam labu erlenmeyer. Kemudian dipekatkan atau dievaporasi menggunakan *rotary vacuum evaporator* untuk menguapkan pada fase atas. Sebelum melakukan pemekatan labu evaporator dibungkus menggunakan plastik hitam terkait dengan sifatnya yang sangat rentan terhadap cahaya dan suhu tinggi. Pemekatan dilakukan pada suhu $35^{\circ}C$ dengan kecepatan 100 rpm selama 30 menit. Penggunaan suhu $30^{\circ}C$ didasarkan pada titik didih dietil eter ($C_4H_{10}O$) yaitu $35,5^{\circ}C$, dimana dalam kondisi vakum titik didih pelarut akan menjadi lebih rendah. Prinsip kerja evaporator menurut Kristijarti dan Arlene (2012), yaitu penurunan tekanan yang menyebabkan turunya titik didih dari cairan, sehingga cairan yang memiliki titik didih rendah akan menguap terlebih dahulu dan kemudian akan terkondensasi kembali pada labu penampung.

Hasil pemekatan berupa (crude) ekstrak kasar yang diambil menggunakan sendok bahan dan dipindahkan pada botol sampel. Kemudian ekstrak *crude* yang ada pada botol sampel dikeringkan menggunakan gas nitrogen untuk

menguapkan dietil eter yang masih tersisa sehingga didapatkan ekstrak kasar yang benar-benar kering. Kemudian botol sampel ditutup dengan plastik *wrap* kemudian dibungkus dengan *aluminium foil* dan disimpan di dalam *freezer*. Prosedur ekstraksi rumput laut coklat *Padina australis* hingga didapatkan ekstrak *crude* dapat dilihat pada gambar 11.



Gambar 11. Ekstraksi dan Fraksinasi Rumput Laut Coklat (Modifikasi metode da Costa *et al.*,2009)

3.3.4 Isolasi Pigmen

Isolasi pigmen rumput laut coklat *Padina australis* dilakukan menggunakan metode kromatografi kolom. Kromatografi kolom adalah proses pemisahan fraksi berdasarkan perbedaan distribusi campuran komponen antara fase gerak dan fase diam. Fase diam adalah pengisi kolom di mana fase gerak akan mengalir. Setiap senyawa memiliki koefisien yang berbeda terhadap fase gerak dan fase diam. Senyawa yang berinteraksi lemah dengan fase diam akan bergerak lebih cepat melalui fase diam, sedangkan senyawa dengan interaksi yang kuat dengan fase diam akan bergerak sangat lambat (Noviyanti, 2010). Dalam penelitian ini digunakan *normal phase*, yaitu penggunaan fase diam yang bersifat polar dan fase gerak yang bersifat non polar dengan fase diam *silica gel* (SiO₂) F-254 yang bersifat polar dan fase gerak campuran antara n-heksan (C₆H₁₄) dan etil asetat (C₄H₈O₂) yang cenderung bersifat non polar.

Isolasi pigmen dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi kolom. *Silica gel* F-245 ditimbang sebanyak 35 gram kemudian dilarutkan dalam 200 ml n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 8:2 (v/v) dalam beaker glass kemudian ditutup dengan menggunakan plastik *Wrap* agar tidak menguap. Kemudian *Silica gel* dihomogenkan dengan *magnetic stirer* dengan kecepatan 150 rpm selama 1 jam, penghomogenan dengan *magnetic stirer* yaitu dengan tujuan agar tidak terjadi gelembung didalam kolom kromatografi yang menyebabkan (fase diam) *silica gel* pecah.

Kolom kromatografi dipasang pada statif dan diisi dengan kapas dan dibasahi dengan fase gerak kemudian dipadatkan didasar kolom kromatografi dengan bantuan lidi. Pemberian kapas yang diletakan pada dasar kromatografi kolom bertujuan untuk menahan fase diam agar tidak keluar melalui kran kolom kromatografi. Kemudian kolom kromatografi diisi dengan fase diam n-heksan dengan etyl asetat dengan perbandingan 8:2 (v/v) sampai setengah bagian

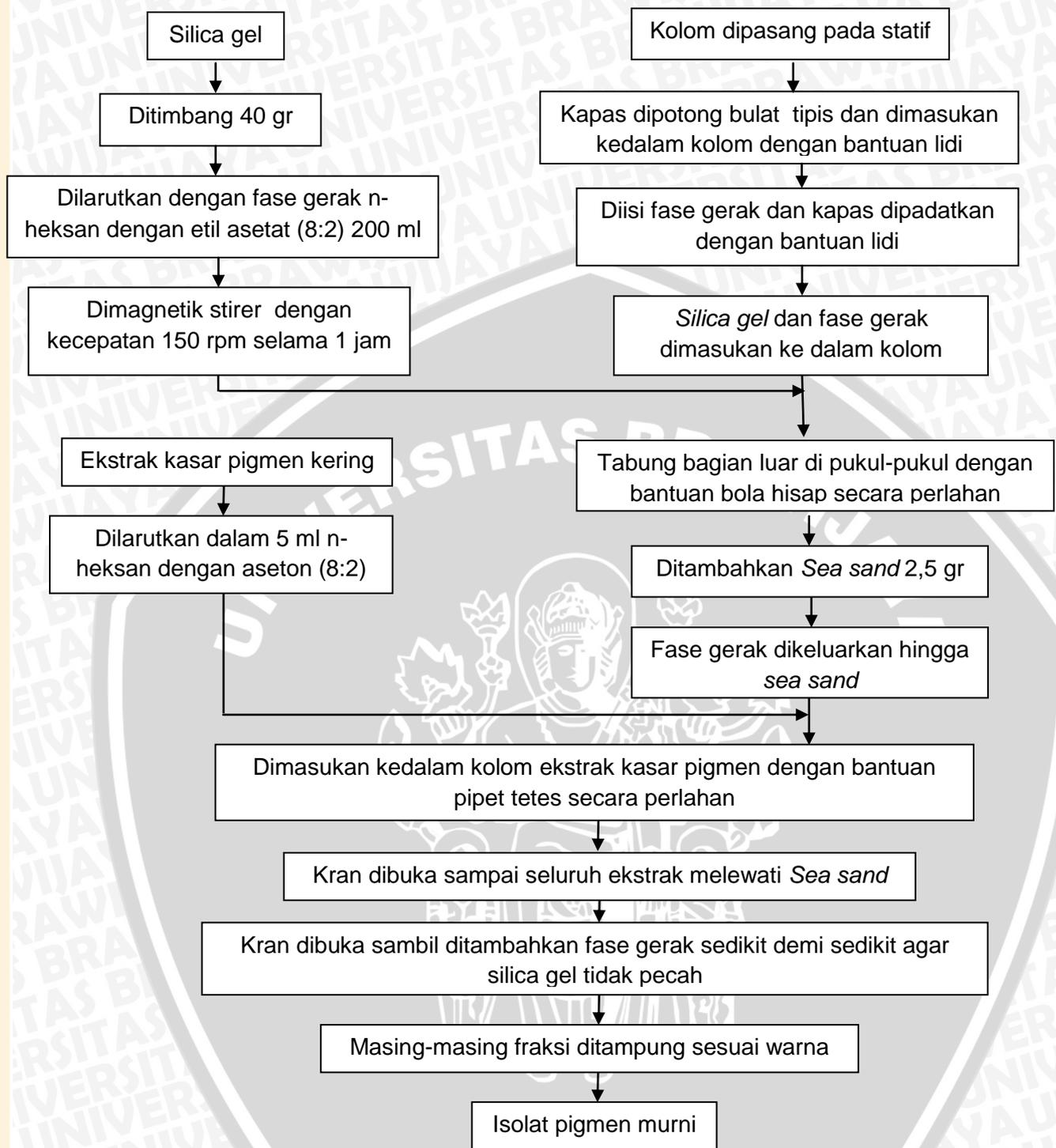
kolom kromatografi. Dimasukan sedikit demi sedikit kedalam kolom kromatografi dengan menggunakan sendok dalam posisi kran kolom kromatografi terbuka. Setelah bubuk *silica gel* dimasukan kran kolom kromatografi kembali ditutup. Pada kolom kromatografi diketuk-ketuk menggunakan bola hisap dengan tujuan agar fase diam yang ada didalam kolom kromatografi benar-benar padat dan permukaanya rata.

Kolom kromatografi yang telah dipreparasi dibiarkan selama semalam \pm 12 jam dengan tujuan agar *silica gel* benar-benar padat. Selama didiamkan semalam kondisi mulut dan ujung kran kolom kromatografi ditutup menggunakan plastik *wrap* dan diikat tali dengan tujuan untuk memaksimalkan terjadinya penguapan fase gerak. Batas atas pada fase gerak ditandai dengan menggunakan kertas label untuk mengetahui padat atau tidaknya fase diam dalam kolom kromatografi. Padat atau tidaknya fase diam dapat ditandai dengan turunnya permukaan fase diam, terdapat gelembung udara, terbentuk retakan atau lapisan-lapisan dalam *silica gel*.

Kolom kromatografi yang berisi fase diam yang telah padat, ditambahkan *sea sand* atau pasir laut \pm 2,5 gram diatas permukaan fase diam kemudian diratakan dengan cara diketuk menggunakan bola hisap agar permukaanya rata. Pemberian *sea sand* atau pasir laut bertujuan untuk menyaring kotoran atau residu yang tidak diperlukan dari ekstrak kasar rumput laut. Dikurangi volume dari fase gerak yang ada pada kolom kromatografi dengan cara membuka kran kolom sampai mencapai batas permukaan *sea sand* kemudian kran ditutup kembali. Ekstrak kasar dari *Padina australis* dilarutkan dengan 5 ml fase gerak yaitu n-heksan dengan ethil asetat dengan perbandingan 8:2 (v/v), kemudian dimasukan kedalam kolom kromatografi dengan bantuan pipet tetes secara perlahan melalui dinding bagian dalam dengan tujuan agar permukaan *sea sand* tidak rusak. Kemudian kran kolom dibuka sehingga ekstrak kasar dapat meresap

kedalam fase diam. Setelah permukaan sampel yang meresap telah mendekati permukaan *sea sand*, segera tambahkan fase gerak. Fase gerak ditambahkan secara berurutan hingga terbentuk pita warna didalam fase diam. Selanjutnya tiap fraksi warna dari tiap komponen pigmen ditampung dalam botol vial berukuran 10 ml dan dikelompokan berdasarkan warna.

Penuangan fase gerak merupakan salah satu penting yang harus diperhatikan dalam proses kromatografi kolom agar fase diam tidak pecah. Kemampuan dalam fase diam memisahkan senyawa pigmen menjadi kurang maksimal apabila mengalami pecah atau rusak. Pecahnya fase diam terjadi karena kondisinya kering atau tidak terisi oleh pelarut, ditandai dengan munculnya garis atau sekat horizontal dan bintik putih tidak beraturan yang terbentuk dari kristal silica gel yang kering karena terendam oleh fase gerak. Semakin lama kolom digunakan, pecahnya fase diam akan semakin mengembang dan berangsur angsur merata sepanjang fase diam didalam kolom, sehingga kemampuan fase diam dalam memisahkan senyawa pigmen semakin menurun. Prosedur isolai pigmen dengan menggunakan kolom kromatografi dapat dilihat pada gambar 12.



Gambar 12. Skema kerja isolasi pigmen dengan kromatografi kolom (Pangestuti *et al.*, 2007) yang dimodifikasi oleh Wijayanti (2010).

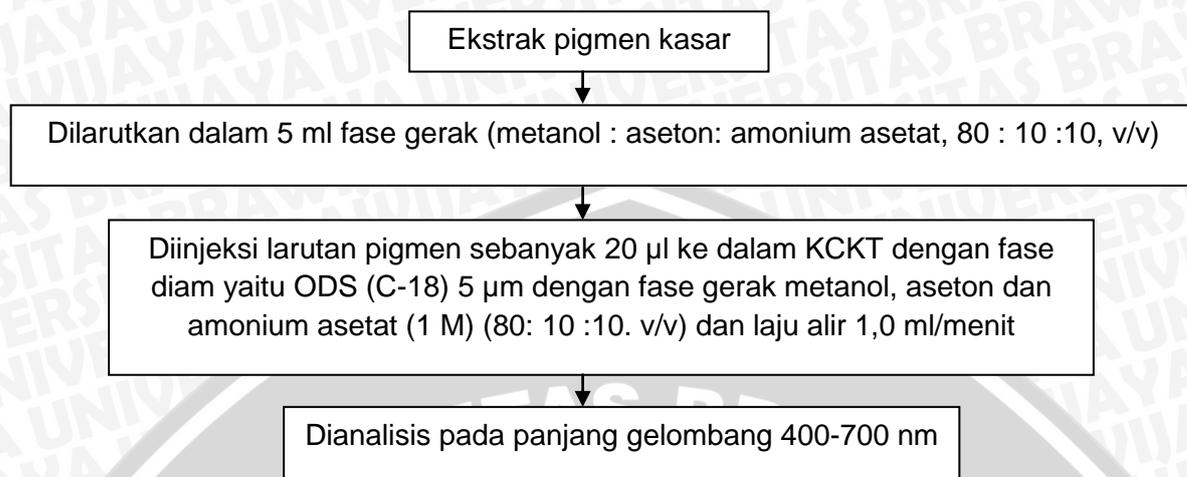
3.4 Identifikasi Pigmen

3.4.1 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Ekstrak pigmen kasar hasil ekstraksi selanjutnya dilakukan identifikasi dengan menggunakan KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi). Proses ini disebut juga proses pemisahan, yaitu memisahkan antara komponen pigmen yang satu dengan yang lain yang terdapat pada rumput laut coklat jenis *Padina australis* dengan melihat serapan maksimum panjang gelombang dari masing-masing puncak yang terbentuk. Identifikasi dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) mengacu pada metode Hegazi *et al.*, (1998).

Langkah pertama yang dilakukan dalam sistem kerja KCKT yaitu ekstrak pigmen kasar dilarutkan dalam 5 ml fase gerak (aseton : metanol : amonium asetat, 80 : 10 : 10 v/v). Dalam kromatografi cair kinerja tinggi, fase gerak selain berfungsi sebagai pembawa komponen-komponen campuran menuju detektor, fase gerak merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan proses analisis (Puspitaningtyas *et al.*, 2013). Tahap berikutnya sebanyak 20 µl larutan pigmen diinjeksikan pada KCKT dengan fase diamnya adalah ODS (C-18) 5 µm dengan sistem elusi *gradient* metanol, aseton dan amonium asetat (1 M) dan laju alir 1,0 ml/menit.

Menurut Putra (2004), elusi gradien yaitu penambahan kekuatan fase gerak selama analisis kromatografi berlangsung. Efek dari elusi gradien adalah mempersingkat waktu retensi dari senyawa-senyawa yang tertahan kuat pada kolom. Skema kerja dari KCKT dapat dilihat pada gambar 13.



Gambar 13. Skema Kerja Instrumen KCKT (Hegazi *et al.*,1988).

3.4.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

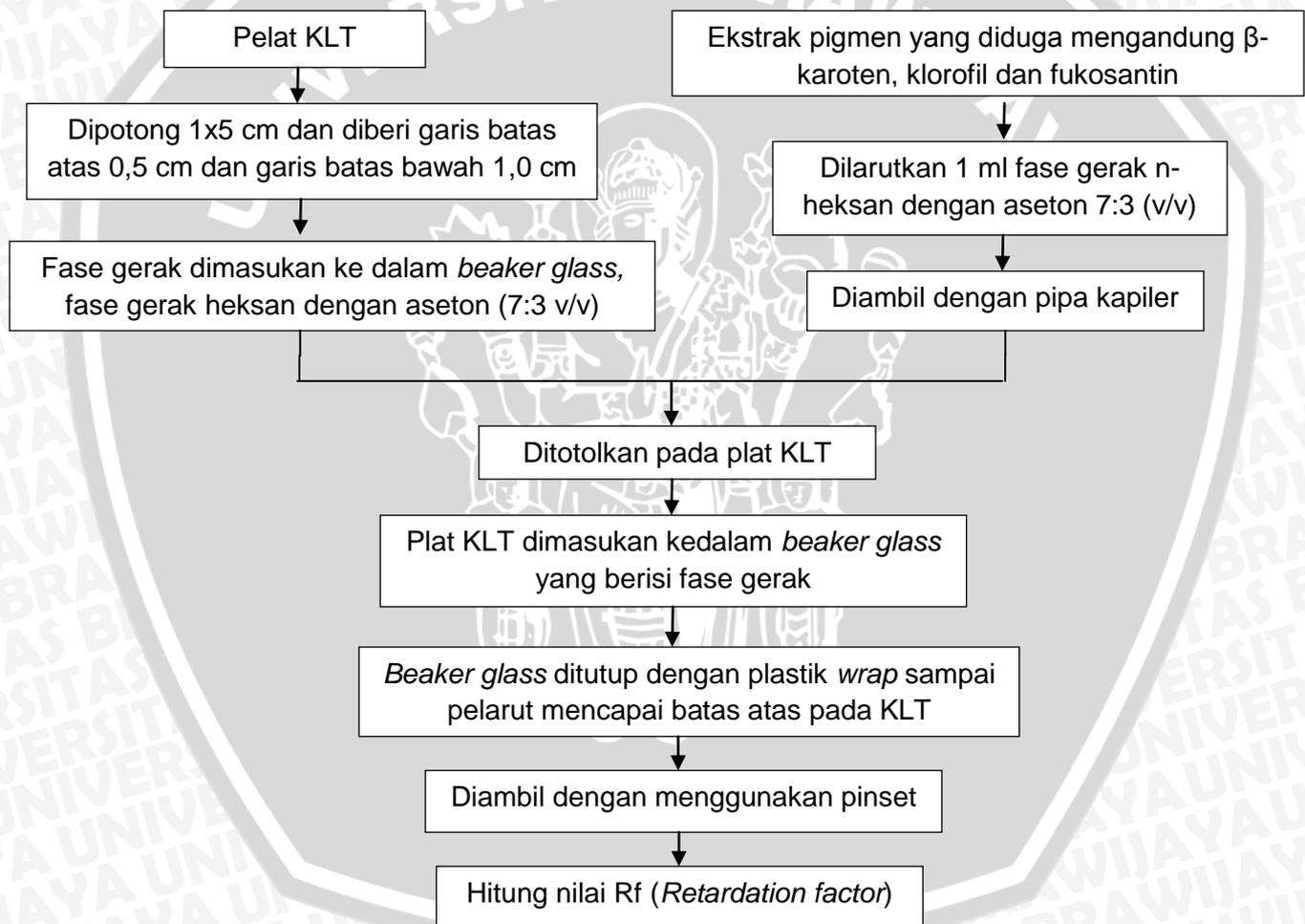
Kromatografi Lapis tipis (KLT) yaitu untuk mengidentifikasi ekstrak kasar pigmen dan isolat hasil isolasi kromatografi kolom. Identifikasi ini dilakukan berdasarkan metode yang digunakan oleh Pangestuti *et al.*,(2007) yang telah dimodifikasi oleh hasanah (2014). Pada penelitian ini menggunakan fase diam yaitu silica gel F-254 dan fase gerak n-heksan dan aseton dengan perbandingan 7:3 (v/v) sebanyak 10 ml.

Tahapan pertama dalam KLT adalah membuat garis pada plat dengan menggunakan pensil pada kedua ujung plat. Bagian bawah pelat berukuran 1 cm yang bertujuan untuk menentukan posisi awal fraksi ketika ditotolkan, sedangkan bagian atas plat berukuran 0,5 cm sebagai batas yang ditembus oleh pelarut. Selanjutnya fraksi dari kolom yang ditampung dalam tabung reaksi diambil secukupnya menggunakan pipa kapiler dan ditotolkan pada pelat KLT.

Setelah bercak tersebut mengering, plat dimasukkan dalam *beaker glass* yang berisi fase gerak. Dimasukan fase gerak \pm 5 ml yang dimasukkan dalam

beaker glass 50 ml. Selanjutnya *beaker glass* ditutup dengan plastik *wrap* dan biarkan sampai pelarut bergerak mendekati garis atas. Kemudian diambil dengan pinset tanpa menyentuh garis atas pelat. Total yang terbentuk pada plat diamati dan dihitung nilai R_f -nya (*retardation factory*). Sari (2012) menyatakan bahwa derajat retensi dinyatakan dari zat setelah pengembangan, dapat dihitung dengan rumus :

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



Gambar 14. Skema Kerja Kromatografi Lapis Tipis (Pangestuti *et al.*, 2007) yang dimodifikasi oleh Hasanah (2014).

3.4.3 Spektrofotometri UV-Vis

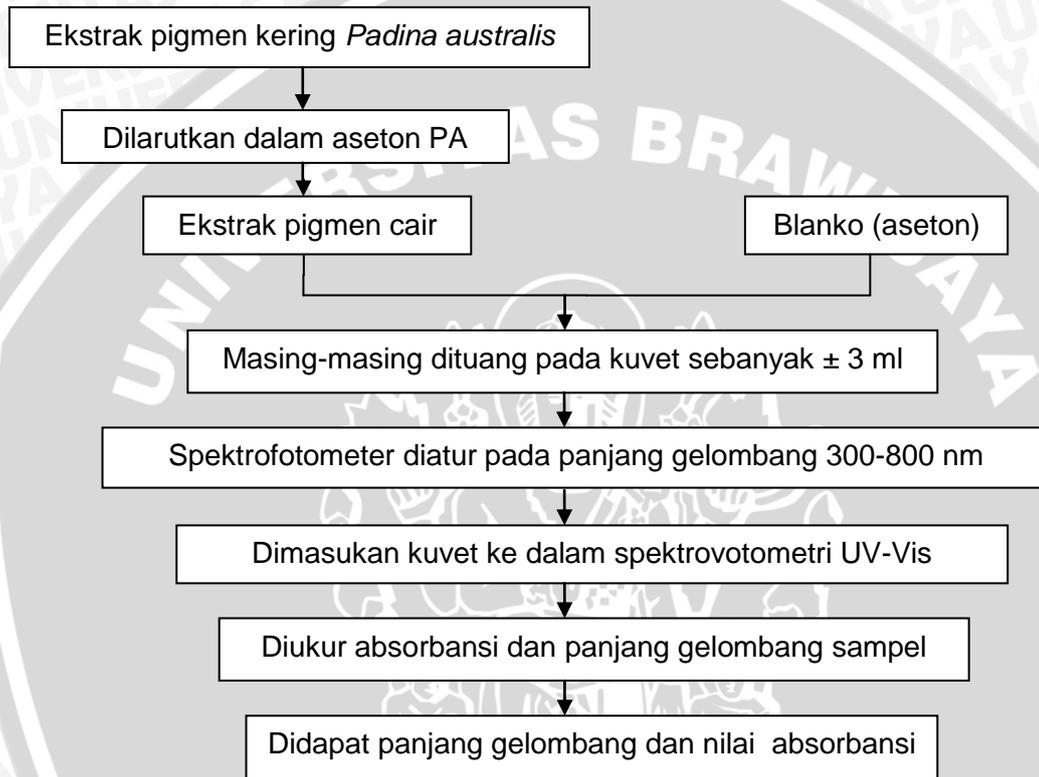
Spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk mengidentifikasi pigmen, selanjutnya diidentifikasi berdasarkan panjang gelombang dan nilai absorbansinya. Penelitian ini mengacu pada metode Fretes *et al.*, (2012). Prinsip kerja dari spektrofotometri UV-Vis yaitu berdasarkan pada penyerapan cahaya atau energi radiasi yang diserap sehingga memungkinkan jumlah zat penyerap dalam larutan secara kuantitatif (Triyati, 1985).

Isolat warna yang diketahui sebagai pigmen β -karoten, klorofil dan fukosantin berdasarkan warna dan nilai Rf yang dari proses KLT terlebih dahulu dikeringkan dengan dialiri menggunakan gas nitrogen (N_2). Isolat warna yang telah kering diencerkan menggunakan aseton PA sampai pengenceran 10^4 , kemudian dimasukkan ke dalam cuvet ± 3 ml. Selanjutnya dimasukan kedalam instrumen spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1601 dan diuji pada kisaran panjang gelombang 300-800 nm, sehingga diketahui pola spektra dan nilai absorbansi maksimal dari isolat warna yang diuji.

Penerapan spektrofotometri UV-Vis pada senyawa organik didasarkan pada transisi $n-\pi$ atau $\pi-\pi$. Transisi ini terjadi pada daerah dengan spektrum sekitar 300-200 yang digunakan dalam eksperimen dan memerlukan gugus kromofor dalam molekul tersebut. Kromofor merupakan gugus tak jenuh kovalen yang dapat menyerap radiasi dalam daerah-daerah UV dan Vis, pada senyawa organik dikenal pula aoksokrom yaitu gugus jenuh yang terikat pada kromofor. Terikatnya gugus aoksokrom pada kromofor dapat mengubah panjang gelombang dan intensitas serapan maksimum (Pratimasari, 2009).

Utami *et al.*, (2010), setiap pengukuran harus dilakukan pada panjang gelombang maksimum. Pada panjang gelombang maksimum kepekaan juga maksimum, karena pada panjang gelombang tersebut perubahan serapan untuk

satuan konsentrasi adalah yang paling besar. Ditambahkan oleh indriani (2010), hasil pengujian berupa serapan maksimum yang terbentuk kemudian dibandingkan dengan serapan spectra maksimum. Prosedur spektrofotometri dapat dilihat pada gambar 15.



Gambar 15. Skema Kerja Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Fretes, 2012).

3.4.4 Pengukuran Rendemen

Rendemen merupakan parameter yang penting untuk mengetahui nilai ekonomis dan efektivitas suatu produk. Semakin tinggi nilai rendemen maka hasil akhir yang dihasilkan semakin banyak. Analisa rendemen merupakan suatu presentase produk yang diperoleh dari perbandingan berat awal bahan dengan berat akhir. Sehingga diketahui hilangnya berat ketika mengalami proses pengolahan.

Pigmen yang telah diketahui nilai absorbansinya dikonversikan dengan menggunakan hukum '*Lambert-Beer*'. Menurut Markham (1988), hukum '*Lambert-Beer*' adalah $A = \epsilon bc$.

Keterangan :

A = Absorbansi

ϵ = Absortifitas Molar

b = Lebar Bagian Kuvet Dalam

c = Konsentrasi (molar)

Dari rumus diatas, dapat ditentukan hasil dari kadar masing-masing pigmen. Selanjutnya dihitung nilai rendemen menurut Khotimah (2013) dengan rumus :

$$= \frac{\text{nilai kadar yang didapatkan}}{\text{jumlah awal sampel yang digunakan}} \times 100\%$$

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Data hasil penelitian identifikasi komponen pigmen rumput laut coklat *Padina australis* dengan isolasi kolom kromatografi, uji identifikasi dengan Kromatografi Lapis tipis (KLT), pola spektra dengan Spektrofotometri UV-Vis dan analisa komponen pigmen dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, dapat dilihat pada tabel 12.

Tabel 12. Hasil Isolasi dan Identifikasi Pigmen *Padina australis*

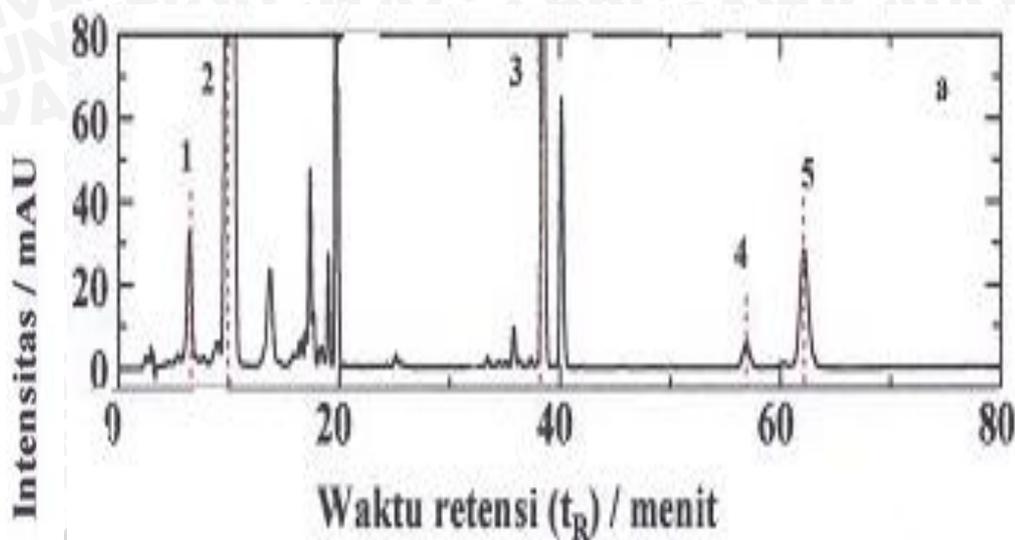
Uji Identifikasi	Alat	Hasil			Literatur	
		<i>Padina australis</i>				
Spektra KCKT	KCKT Shimadzu Tipe LC-20A	tR (Time Retention)			Menurut Limantara dan Heriyanto (2010)	
		Fukosantin	10,22		Fukosantin	10,11
		Klorofil b	20,12		Klorofil b	30,88
		Klorofil a	40,10		Klorofil a	38,39
		β -karoten	62,14		β -karoten	57,14
Kromatografi Kolom	Kromatografi Kolom	<ul style="list-style-type: none"> - Isolat warna kuning pekat pada botol nomer 1 dan 2 - Isolat warna hijau pekat pada botol nomer 28 sampai 35 - Isolat warna biru pekat pada botol nomer 54 sampai 60. - Isolat warna kuning orange pada botol nomer 73 sampai 81 			<ul style="list-style-type: none"> - Menurut Yudiati <i>et al.</i>, (2011), β-karoten berwarna kuning. - Menurut Pramesti (2013) klorofil b berwarna hijau kuning - Menurut Pramesti (2013) klorofil a berwarna hijau biru - Menurut Mufti <i>et al.</i>, (2014) fukosantin berwarna orange 	
Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	Pelat KLT	Ulangan			<ul style="list-style-type: none"> - Menurut Yudiati <i>et al.</i>, (2011), Nilai Rf β-karoten yaitu 0,8 - 1 - Menurut Pramesti (2013), Nilai Rf Klorofil a yaitu 0,42 – 0,56. 	
		1	2	3		
		β -karoten				
		1,0	0,97	1,05		
Klorofil b						

		0,48	0,51	0,54	- Menurut Pramesti (2013) Nilai Rf yaitu 0,57 – 64.	
		Klorofil a				
		0,6	0,57	0,62		- Menurut Zaelanie dan Hartati (2014) Nilai Rf fukosantin yaitu 0,25 – 0,28.
		Fukosantin				
		0,26	0,27	0,28		
Spektrofotometri UV-Vis Shimadzu 1610	Spektrofotometri UV-Vis Shimadzu 1610	Ulangan			- Menurut Khotimah <i>et al.</i> , (2013) panjang gelombang β -karoten yaitu 400-700 nm.	
		1	2	3		
		β-karoten				
		475,00	470,00	450,50	- Menurut Aryanti (2008) panjang gelombang klorofil b yaitu 519 nm.	
		Klorofil b				
		499,00	669,00	401,00		
		Klorofil a			- Menurut Kalalo <i>et al.</i> , (2014) panjang gelombang klorofil a yaitu 380-700 nm	
662,00	425,00	412,50				
Fukosantin			- Menurut Wijayanti (2010), panjang gelombang 450-465 nm.			
345,00	661,50	439,00				
Rendemen	Nilai Rendemen					
	β -karoten	0,037 \pm 0,001413				
	Klorofil b	0,205 \pm 0,0405				
	Klorofil a	0,267 \pm 0,000733				
	Fukosantin	0,425 \pm 0,26092				

4.2 Pembahasan

4.2.1 Identifikasi Pola Spektra dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Analisa kualitatif komponen pigmen rumput laut coklat *Padina australis* dilakukan dengan menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) yang didasarkan pada waktu retensi dan untuk tujuan identifikasi. Prinsip dari Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) yaitu berdasarkan pada tingkat kepolaranya dan pada metode ini digunakan tekanan tinggi untuk membantu mendorong fase gerak oleh elusi gradient nya. Hasil analisa komponen pigmen dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dapat dilihat pada gambar 16.



Gambar 16. Kromatogram dari Ekstrak Kasar *Padina australis*

Dari penelitian ini mengacu pada literatur menurut Limantara dan Heriyanto (2010), yang menggunakan fase diam dan fase gerak yang hampir sama. Pada setiap puncak atau peak menandakan adanya pigmen yang terkandung dalam rumput laut coklat jenis *Padina australis*. Urutan dari setiap puncak atau peak sesuai dengan urutan dari tingkat kepolarannya. Dari pigmen yang memiliki tingkat kepolaran paling tinggi sampai pada pigmen yang memiliki tingkat kepolaran paling rendah, karena pada penelitian ini diterapkan sistem fase terbalik atau 'reversed phase'. Menurut Syarif (2009), Kromatografi fase terbalik menggunakan fase diam yang kurang polar dari pada fase gerak nya, karena pada umumnya metode KCKT menggunakan fase diam yang bersifat hidrofobik.

Dari hasil KCKT diatas didapatkan jumlah peak atau puncak pada kromatogram ekstrak kasar *Padina australis* berkisar antara 11 peak atau puncak dengan intensitas yang berbeda dengan jumlah totalan yang terdapat pada pelat KLT. Hal ini menunjukkan bahwa pada kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dapat memisahkan pigmen yang tidak teridentifikasi oleh KLT. Menurut Syarif (2009), menyatakan bahwa kelebihan dari metode KCKT adalah cepat, daya

pisah baik, peka, kolom dapat digunakan berulang kali dan alat atau perangkatnya dapat digunakan secara otomatis. Diketahui bahwa terdapat 4 puncak pada KLT yang memiliki warna pekat. Berdasarkan sistem *reversed phase* yang digunakan pada penelitian ini, diketahui bahwa pita pigmen yang muncul terlebih dahulu yaitu pigmen yang memiliki waktu tambat paling kecil, memiliki sifat lebih polar dibandingkan dengan pita pigmen yang muncul setelahnya (Christina *et al.*, 2008). Berdasarkan waktu retensi (tR) 4 puncak hasil kromatogram pada grafik dapat dilihat pada tabel 13.

Tabel 13. Waktu Retensi (tR) Untuk Pigmen *Padina australis*

No	Jenis Pigmen	Waktu Retensi (tR) <i>Padina australis</i>	Waktu Retensi (tR) Limantara dan Heriyanto (2010)
1	Fukosantin	10,22	5,85
2	Klorofil b	20,12	30,88
3	Klorofil a	40,10	38,01
4	B- karoten	62,14	57,14
5	Zaexantin	19,72	19,68
6	Klorofil b	33,63	33,40
7	Klorofil b'	34,91	34,40
8	Klorofil a'	38,41	38,39
9	Klorofil a'	40,13	40,10
10	Feofitina	56,84	56,79
11	Beta-karoten	62,10	62,08

Waktu retensi (t_R) adalah ukuran waktu injeksi mulai cuplikan hingga suatu komponen pigmen keluar dari kolom, dengan kata lain yang diperlukan dalam suatu komponen campuran untuk keluar dari kolom (Wijayanti, 2010). Dari data diatas untuk rumput laut coklat *Padina australis* agak berbeda dari hasil yang diperoleh dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Limantara dan Heriyanto (2010). Hal ini dikarenakan fase diam yang digunakan berbeda merk, sehingga waktu retensi yang dilakukan pada penelitian ini agak bergeser. Waktu retensi

pada KCKT sensitif terhadap perubahan fasa diam, suhu, nilai pH, komposisi fase gerak dan laju.

Dari 11 puncak atau peak yang dihasilkan, diambil hanya 4 puncak atau peak yang disesuaikan dengan hasil dari KLT. Pigmen yang diambil untuk dianalisa yaitu β -karoten, klorofil b, klorofil a dan fukosantin. Berdasarkan dari keempat pigmen tersebut pigmen yang paling memiliki sifat polar yaitu fukosantin karena memiliki waktu retensi yang paling singkat dibandingkan dengan waktu retensi pigmen lainnya.

4.2.2 Kromatografi Kolom

Isolasi komponen pigmen rumput laut coklat *Padina australis* dilakukan dengan menggunakan kolom kromatografi dengan tujuan memisahkan antara komponen senyawa pigmen yang terdapat pada *Padina australis*. Dalam penelitian ini digunakan *normal phase* yaitu fase diam yang bersifat polar dan fase gerak yang bersifat non polar. Fase diam yang digunakan yaitu *silica gel f-254* (SiO_3) dengan ukuran 60 mesh, kemudian fase gerak yang digunakan yaitu n-heksan (C_6H_{14}) dan etil asetat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) dengan perbandingan 8:2, 7:3, 6:4 dan 5:5 (v/v). N-heksan memiliki tingkat kepolaran yang rendah dan bersifat non polar dari etil asetat yang memiliki sifat semi polar, sehingga semakin tinggi perbandingan n-heksan dalam campuran fase gerak maka semakin non polar sifat dari fase gerak tersebut begitu pula sebaliknya. N-heksan akan melarutkan senyawa pigmen yang bersifat non polar, sedangkan etil asetat akan melarutkan senyawa pigmen yang bersifat lebih polar. Isolasi menggunakan kromatografi kolom dimulai dengan penggunaan fase gerak yang paling non polar yaitu n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 8:2 (v/v) secara kontinyu serta ditingkatkan polaritasnya sesuai dengan tingkat kepolaran dari senyawa pigmen yang dikeluarkan.

Dari uraian diatas dapat diambil kesimpulan bahwa senyawa pigmen yang bersifat non polar dari ekstrak kasar pigmen *Padina australis* akan keluar terlebih dahulu karena memiliki interaksi yang lemah terhadap fase diam yang bersifat polar. Sedangkan senyawa pigmen yang bersifat lebih polar akan keluar secara berurutan setelah senyawa pigmen yang bersifat non polar sesuai dengan tingkat kepolaranya karena memiliki interaksi yang lebih kuat dengan fase diam dan sebanding dengan polaritas fase gerak yang ditambahkan. Noviyanti (2010), menyatakan 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 dengan sangat lambat. Proses isolasi pigmen rumput laut coklat *Padina australis* dapat dilihat pada gambar 17.



Gambar 17. Hasil Isolasi Kolom Kromatografi

Gambar diatas menunjukan fraksi atau pita warna didalam kolom kromatografi berdasarkan tingkat kepolaranya. Fraksi warna kuning pekat keluar dengan penambahan fase gerak n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 8:2 (v/v), fraksi warna hijau pekat keluar dengan penambahan fase gerak n-heksan dengan etil asetat perbandingan 7:3 (v/v), fraksi warna biru pekat keluar dengan penambahan fase gerak n-heksan dengan etil asetat perbandingan 6:4 (v/v) dan fraksi warna orange pekat keluar dengan penambahan fase gerak perbandingan 5:5 (v/v).

Dari isolasi pigmen pada ekstrak (*crude*) *Padina australis* didapatkan 87 botol isolat warna dengan empat warna dominan yaitu kuning pekat terdapat pada botol ke 2 dan 3, isolat berwarna hijau pekat terdapat pada botol ke 28 sampai 35, isolat berwarna biru pekat terdapat pada botol ke 54 sampai 60 dan isolat yang berwarna orange terdapat pada botol ke 73 sampai 81. Hasil isolasi pigmen yang ditampung didalam botol vial berukuran ± 10 ml dapat dilihat pada gambar 18.

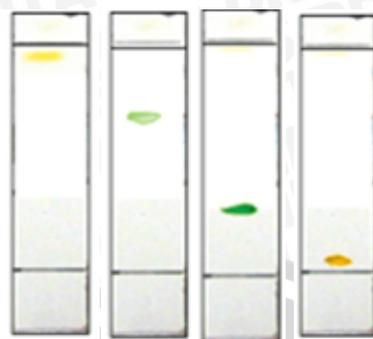


Gambar 18. Hasil Isolasi Pigmen *Padina australis*

Menurut Yudiati *et al.*,(2011), β -karoten mengindikasikan munculnya pita berwarna kuning. Menurut Fadillah *et al.*,(2014) bahwa klorofil b mengindikasikan munculnya warna hijau kekuning-kuningan. Menurut Adnan (2010), pada klorofil a mengindikasikan munculnya warna biru kehijauan. Sedangkan menurut Murti *et al.*,(2010), mengindikasikan bahwa munculnya warna orange adalah fukosantin.

4.2.3 Identifikasi Pigmen Dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

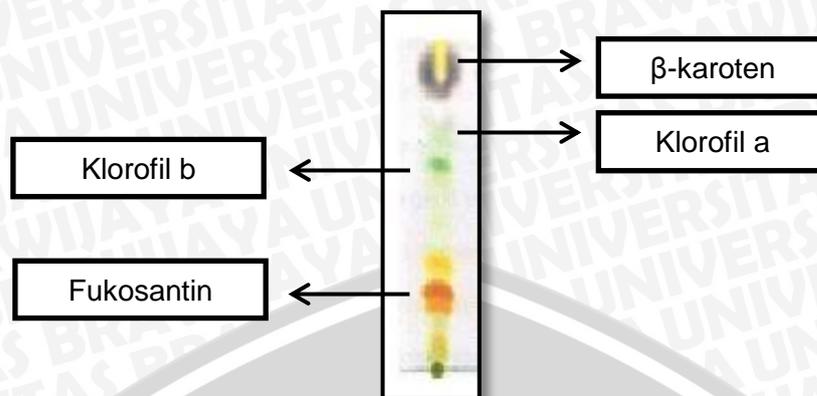
Hasil isolat yang diduga sebagai komponen pigmen dari rumput laut coklat jenis *Padina australis* kemudian diidentifikasi dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) untuk membuktikan bahwa isolat tersebut merupakan komponen dari pigmen *Padina australis* atau tidak berdasarkan total warna yang muncul dan perhitungan nilai *retardation factor* (Rf). Dalam identifikasi pigmen dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan plat KLT *silica gel* F-254 sebagai fase diam dan menggunakan n-heksan:aseton dengan perbandingan 7:3 (v/v) sebagai fase gerak. Tujuan penggunaan fase gerak yaitu untuk melarutkan senyawa yang tidak polar, polar dan semi polar, sehingga senyawa yang diidentifikasi akan larut dan tertarik keatas sesuai dengan tingkat kepolaranya Hasil isolat yang diduga β -karoten, klorofil a, klorofil b dan fukosantin dalam pengujian KLT komponen pigmen rumput laut coklat *Padina australis* dapat dilihat pada gambar 19.



Gambar 19. Hasil Proses KLT dari Isolasi Pigmen (β -karoten, klorofil a, klorofil b, fukosantin)

Dari gambar diatas diketahui bahwa pengujian KLT menghasilkan spot warna kuning pekat, hijau pekat, biru pekat dan oranye. Menurut Yudiati *et al.*, (2010), menyatakan bahwa nilai Rf dari β -karoten yaitu 0,8-1 dengan warna yang dihasilkan Kuning pekat. Hal ini tidak berbeda jauh dengan nilai Rf yang diperoleh dari KLT diatas yaitu 1,0 ; 0,97 ; 1,05. Nilai Rf dari Klorofil a dan b menurut Pramesti (2013), klorofil a yaitu kisaran 0,57-0,64 dengan warna yang dihasilkan biru kehijauan, sedangkan hasil penelitian yaitu biru pekat (klorofil a) *Padina australis* dengan nilai Rf 0,6 ; 0,57 ; 0,62. Sedangkan klorofil b yaitu kisaran 0,42-0,56 dan hasil penelitian menunjukkan nilai Rf klorofil b *Padina australis* yaitu 0,48 ; 0,51 ; 0,54 dapat dinyatakan bahwa nilai Rf klorofil b *Padina australis* masuk dalam range.

Nilai Rf fukosantin yaitu kisaran 0,25-0,28 dan hasil penelitian diatas didapatkan nilai Rf fukosantin *Padina australis* yaitu 0,26 ; 0,27 ; 0,28 dapat dinyatakan bahwa nilai Rf fukosantin *Padina australis* masuk dalam range. Hasil dari totalan KLT apabila didapat lebih dari 1 spot maka dapat dikatakan hasil isolat tersebut tidak murni (Zaelanie dan Hartati, 2014). Nilai Rf diperoleh dengan cara membagi jarak yang ditempuh pigmen dengan jarak yang ditempuh pelarut.



Gambar 20. Pola Pemisahan Pigmen Rumput Laut Coklat *Padina australis* (Wijayanti, 2010).

Pada gambar 19 diatas menunjukkan jumlah total hasil pemisahan pigmen penyusun alga coklat *Padina australis* menggunakan KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Jika dilihat dari warna dan jumlah total, pigmen penyusun rumput laut coklat *Padina australis* terbentuk 8 warna yaitu total (1) warna kuning sebagai karoten, total (2) warna abu-abu sebagai feofitina, total (3) hijau biru sebagai klorofil a, total (8) warna hijau sebagai klorofil b, total (4) kuning oranye, (5) orange pekat, (6) oranye, (7) oranye diduga sebagai karotenoid golongan xantofil. Warna dari hasil KLT diatas digunakan sebagai dasar untuk mengidentifikasi pigmen.

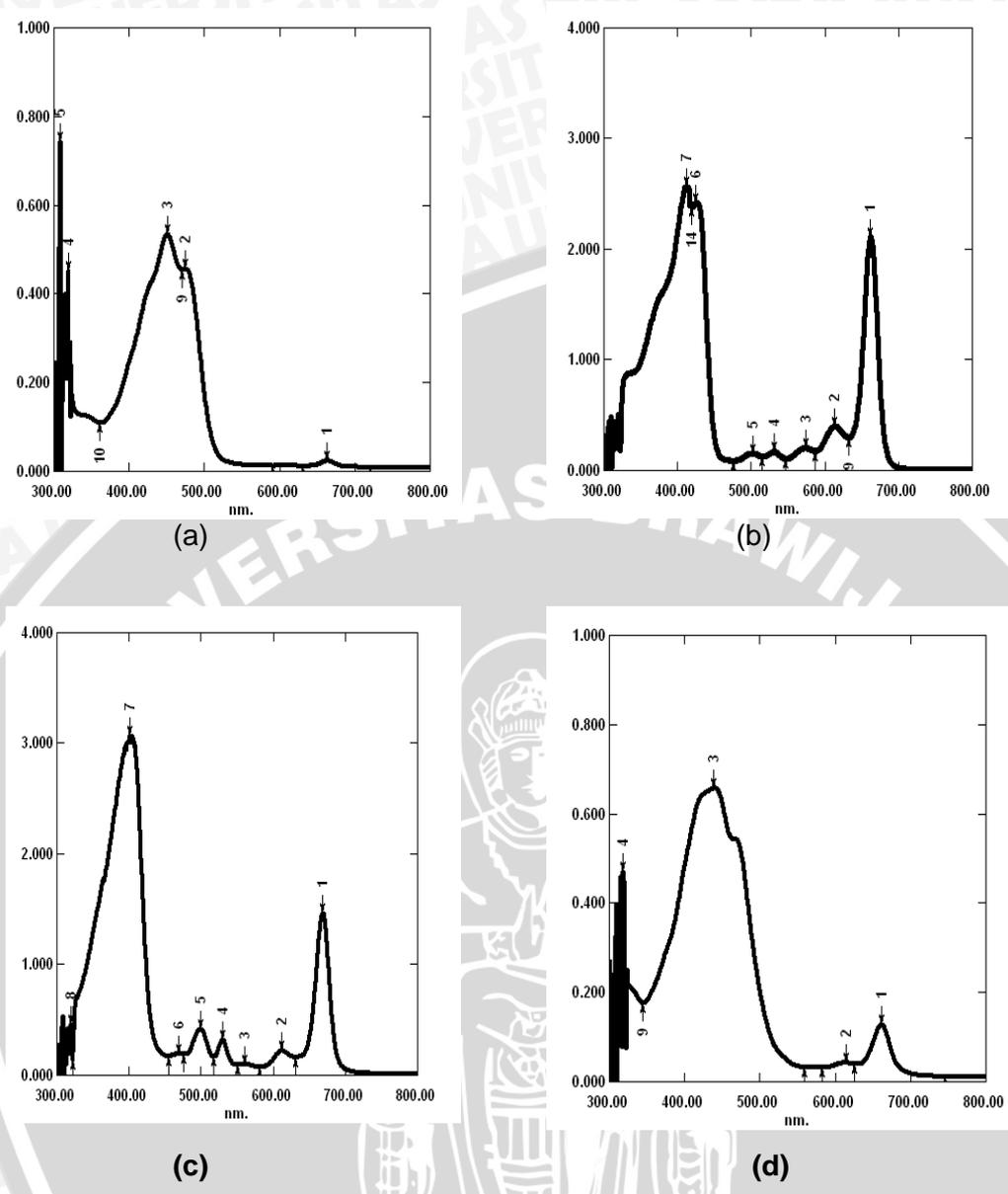
Pigmen warna kuning diduga merupakan β -karoten, hal ini didukung oleh Jeffrey *et al.*, (1998) yang menyatakan bahwa pigmen β -karoten berwarna kuning. Pigmen hijau biru diduga sebagai klorofil a, warna hijau kuning diduga sebagai klorofil b, pigmen kuning, kuning oranye, kuning pekat diduga sebagai fukosantin. Analisa terhadap faktor retensi (R_f) masing-masing dari total digunakan untuk mengindikasikan berdasarkan warna. Perbedaan kepekaan warna total pigmen yang nampak pada pemisahan pigmen tersebut berkaitan dengan konsentrasi pigmen yang terkandung didalamnya.

4.2.4 Hasil Spektrofotometri UV-Vis

Untuk menguatkan hasil KLT maka diperlukan identifikasi lanjutan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. Identifikasi ini dipilih karena prosenya sederhana dan tidak perlu melakukan preparasi khusus. Sampel dimasukan pada cuvet spektro kemudian ditaruh pada tempat khusus pada alat kemudian didetektor dan pola spektra akan terbaca dan panjang gelombang yang dihasilkan. Selain itu sampel yang digunakan untuk proses identifikasi ini sangat sedikit $\pm 20 \mu\text{m}$. Keuntungan dari identifikasi menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis adalah cara yang sederhana dan konsentrasi larutan yang sangat kecil (Indriani, 2010).

Hasil sampel pigmen yang diduga sebagai isolat dari β -karoten, klorofil a, klorofil b dan fukosantin dilakukan untuk identifikasi selanjutnya, yaitu identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis menggunakan metode Fretes *et al.*,(2012) dengan rentan panjang gelombang yang digunakan yaitu 300-800 nm. Dari uji spektrofotometer UV-Vis didapatkan hasil pada isolat β -karoten serapan absorbansi tertinggi didapat pada panjang gelombang 450.50 nm dan 475.00 nm.

Hasil isolat klorofil b dengan serapan absorbansi tertinggi didapat pada panjang gelombang 401,00 dan 669,00 nm. Pada isolat klorofil a dengan serapan absorbansi tertinggi didapat pada panjang gelombang 412.50 nm, 425.00 nm dan 662.00 nm. sedangkan pada isolat fukosantin dengan serapan absorbansi tertinggi didapat pada panjang gelombang 439,00 nm dan 661,50 nm. Hasil grafik absorbansi rumput laut coklat *Padina australis* dapat dilihat pada gambar 21.



Gambar 21. Pola spektra *Padina australis* (a) β -karoten, (b) klorofil a, (b) klorofil b, (fukosantin)



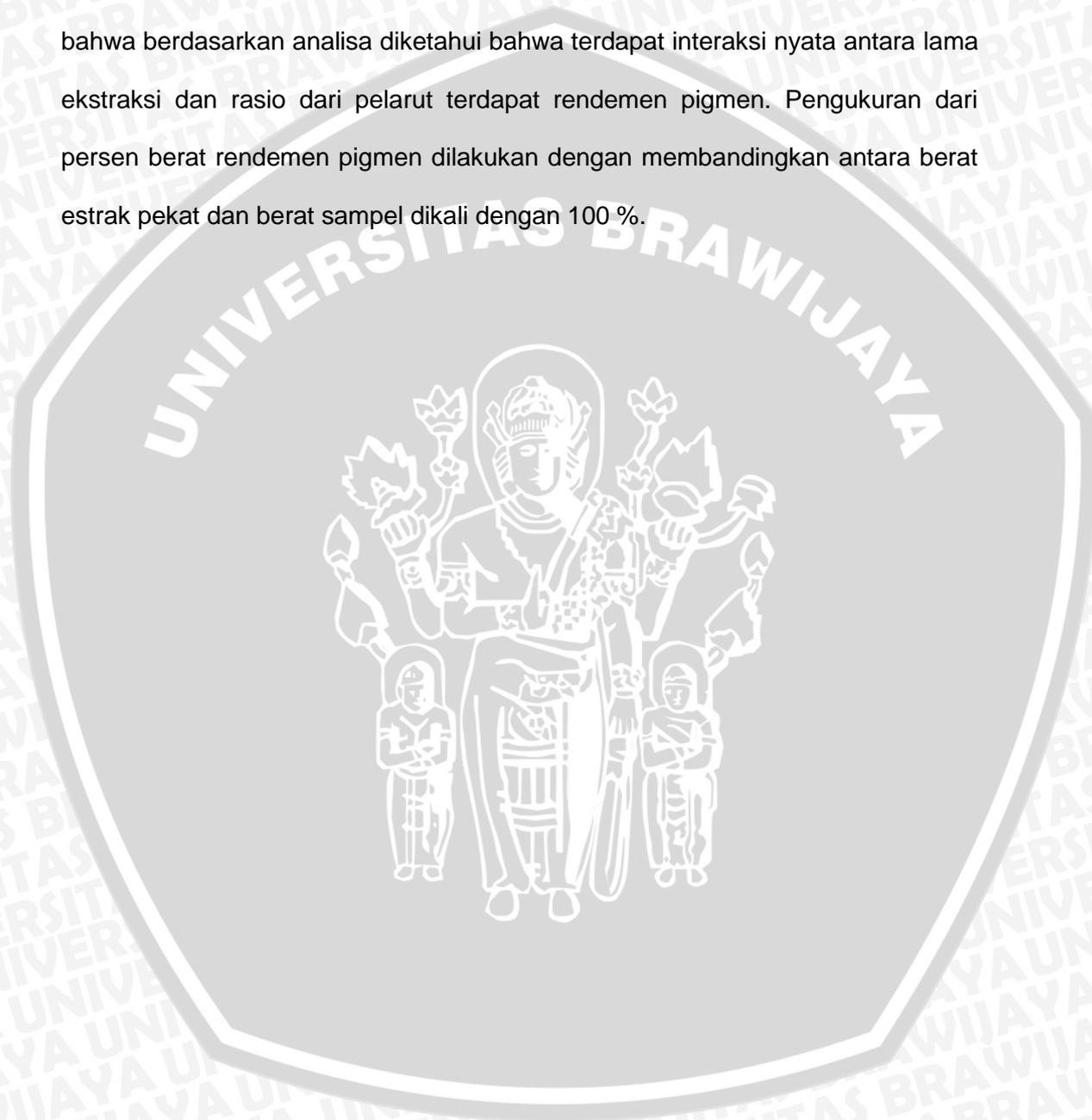
Dari gambar pola spektra diatas dengan menggunakan pelrut aseton menunjukkan nilai absorbansi maksimum pada tiap pigmen rumput laut coklat *Padina australis* hampir sama dengan acuan literatur yang digunakan. Dimana terlihat panjang gelombang maksimum pada β -karoten berada pada panjang gelombang 475,00 nm, 470,50 nm, 450,50 nm. Serapan maksimum pada klorofil a berada pada panjang gelombang 662,00 nm, 425,00 nm, 412,00 nm. Serapan maksimum pada klorofil b berada pada panjang gelombang 499,00 nm, 669,00 nm, 401,00 nm, dan serapan maksimum pada fukosantin berada pada panjang gelombang 345,00, 661,00 dan 439,00 nm. Menurut Wijayanti (2010), panjang gelombang yang dimiliki oleh β -karoten yaitu 426 nm, 451 nm dan 476 nm. Klorofil a pada panjang gelombang 414 nm, 432 nm dan 418 nm.

Absorbansi adalah perbandingan intensitas cahaya yang diserap oleh intensitas cahaya yang datang. Nilai dari absorbansi ini akan tergantung pada kadar dari zat yang terkandung. Semakin banyak kadar zat yang terkandung dalam suatu sampel maka semakin banyak molekul yang menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu sehingga nilai dari absorbansinya semakin besar pula atau sama dengan nilai absorbansi nya berbanding lurus dengan konsentrasi zat yang terkandung dalam sampel (Neldawati *et al.*, 2013)

4.2.5 Rendemen Pigmen

Perhitungan rendemen dilakukan untuk mendapatkan atau mengetahui seberapa besar epektifitas dari riset yang dilakukan. Semakin tinggi nilai rendemen maka dapat dikatakan semakin efektif karena semakin banyak pula ekstrak yang didapat. Nilai rendemen dari β -karoten yaitu $0,037 \pm 0,001413$, nilai rendemen dari klorofil a yaitu $0,267 \pm 0,000733$, nilai rendemen dari klorofil b yaitu $0,205 \pm 0,0405$ dan nilai rendemen dari fukosantin yaitu $0,425 \pm 0,26092$

Menurut Khotimah *et al.*,(2013), dalam rendemen mengalami pengurangan akibat dari adanya proses atau prosedur yang dilakukan. Adanya perbedaan rendemen yang didapat karena adanya perbedaan kuantitas yang didapat saat kromatografi kolom. Pada penelitian Simanjunta *et al.*,(2014) menyebutkan bahwa berdasarkan analisa diketahui bahwa terdapat interaksi nyata antara lama ekstraksi dan rasio dari pelarut terdapat rendemen pigmen. Pengukuran dari persen berat rendemen pigmen dilakukan dengan membandingkan antara berat estrak pekat dan berat sampel dikali dengan 100 %.



5 PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian Identifikasi komponen pigmen pada rumput laut coklat *Padina australis* dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

- Pigmen yang terdapat dalam rumput laut coklat jenis *Padina australis* antara lain β -karoten, klorofil a, klorofil b dan fukosantin.
- Kandungan dari masing-masing komposisi pigmen rumput laut coklat jenis *Padina australis* yaitu β -karoten 0,037; klorofil a 0,267%; klorofil b 0,205%; dan fukosantin 0,425% .
- Berdasarkan hasil uji dari Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dari masing-masing komposisi pigmen rumput laut coklat jenis *Padina australis* didapatkan nilai tR (retention time) fukosantin 10,22; klorofil b 20,12; klorofil a 40,10; β -karoten 62,14

5.2 Saran

Perlu diadakan penelitian dan pemanfaatan lebih lanjut mengenai komponen pigmen yang terdapat pada rumput laut coklat jenis *Padina australis* dengan pengambilan sampel dari lokasi dan daerah yang berbeda

DAFTAR PUSTAKA

- Absori, M. U. Dan S. B. U Paramitha. 2011. **Tugas Perancangan Pabrik Etil Asetat Dengan Reaktif Destilasi 30.000 Ton Per Tahun**. Universitas Diponegoro. Semarang
- Abdullah, Wahid dan WIDjayanti. 2010. **Penentuan Kondisi Optimum HPLC Untuk Pemisahan Residu Pestisida Imidakloprid, Profenofos Dan Deltametrin Pada Cabai (*Capsicum annum*)**. Jurna Ilmu-Ilmu Pertanian Indonesia. Vol. 7, No. 2, 2005. ISSN 1411-0067
- Adnan, M.1997. **Teknik Kromatografi Untuk Analisis Bahan Makanan**. Andi yogyakarta. Yogyakarta
- Agam T., Hariyano, M. Tahalea. K. Samal. 2010. **Koleksi Bibit Alga Coklat (*Padina australis*) dengan Metode Rentangan Net**. Balai Budidaya Laut Ambon 1 (1): 1-7
- Ahamad, M. N., M. Saleemullah, H. U. Shah, I. A. Khalil, A. U. R. Saljoqi. 2007. **Determination of Beta Carotene Content in Fresh Vegetables Using High Performance Liquid Chromatography**. J.of Agriculture. 23 (3): 765-770
- Ai, Nio Song dan Banyo Yunia. 2010. **KONSENTRASI KLKOROFIL DAUN SEBAGAI INDIKATOR KEKURANGAN AIR PADA TANAMAN**. Program Studi Biologi Mipa Universitas SamRatulangi. Manado.
- Ali, Farida, Ferawati dan Risma Arqomah. 2013. **Ekstraksi Zat Warna Dari Kelopak Bunga Rosella (Studi Pengaruh Konsentrasi Asam Asetat dan Asam Sitrat)**. Jurnal Teknik Kimia. No. 1 Nol. 19. Januari 2013
- Almatsier, S. 2002. **PRINSIP DASAR ILMU GIZI**. PT . Gramedia Pustaka Utama,Jakarta
- Anam, Muhammad Choirul. 2014. **ISOLASI DAN IDENTIFIKASI β -KAROTEN PADA RUMPUT LAUT COKLAT *Padina australis* DENGAN LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROFOTOMETRY (LC-MS)**. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang
- Anderson, S and Shine. 2009. **Organic Chemistry Laboratory Manual**. Rammapo Collage Of New Jersey. Mahwal. New Jersey
- Ardianingsih, R. 2009. **Penggunaan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Dalam Proses Analisa Deteksi Ion**. Berita Dirgantara:10 (4) 101-104
- Ariffaizal. 2008. **Kesaan Struktur Hemoglobin Dengan Klorofil**. [Http://www.kesamaan-struktur-hemoglobin-klorofil.org](http://www.kesamaan-struktur-hemoglobin-klorofil.org). Diakses pada tanggal 24 April 2015 Pukul 14.25 WIB
- Arikunto, Suharsimi. 2002. **Metodologi Penelitian**. Penerbit PT. Rineka Cipta. Jakarta.

- Arindah, D. 2010. **Fraksinasi dan Identifikasi Golongan Senyawa pada Daging Buah Pepino (*Solanum muricatum* Aiton) yang Berpotensi sebagai Antioksidan**. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. [Skripsi].
- Ariyanti, Riski Kurnia. 2008. **ESTIMASI KANDUNGAN ANTOSIANIN DAN KLOROFIL TERHADAP VARIASI WARNA BUAH *BLACK MULBERRY* DAN STROBERI MELALUI METODE OPTIK**. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Asyhar. 2010. **Kromatografi, Kolom dan Lapis Tipis**. <http://asyharstf08.wordpress.com>. Diakses pada tanggal 01 juli 2015
- Balboa, E. M., E. Conde, A. Moure, E. Falqué, and H. Domínguez. 2012. **In Vitro Antioxidant Properties of Crude Extracts and Compounds from Brown Algae**. *Food Chemistry Review*. (138): 1764-1785.
- Cark, J. 2002. **Kromatografi Lapis Tipis**. <http://www.Chem.-is-tri.org>. Diakses Pada tanggal 24 Juli 2015.
- Christiana, R., A.B. Susanto dan L. Limantara. 2008. **Analisis Pigmen Ekstrak Aseton Rumput Laut *Udotea sp*, *Amphiora rigida* dan *Turbinaria conoides***. Prosiding Sains dan Teknologi Pigmen Alami. Semarang. Hal 194-210.
- Chaidir, A. 2006. **Kajian Rumput Laut Sebagai Sumber Serat Alternatif Untuk Minuman Berserat**. Institut Pertanian Bogor. [Tesis].
- Chusairi, A. 2013. **Health Seeking Behavior Para Pasien Poli Perawatan Paliatif Studi Eksploratif terhadap Lima Pasien Poli Perawatan Paliatif RSUD Dr. Soetomo Surabaya**. Fakultas Psikologi Universitas Airlangga. Surabaya. [Skripsi].
- Costa, Junet. F. Da, Ferry F. Karwur dan Leenawaty Limantara. 2009. **Efek Beta Karoten dan Agregasi Klorofil Pada Fotostabilitas Klorofil a dalam Pelarut Aseton**. *Jurnal Natural Indonesia* 11 (2), April; 115-123. ISSN 1440-9379, Keputusan Akreditasi No. 65 A/DIKTI/Kep/2008.
- Daintith, J. 2004. **The Facts on File Dictionary of Organic Chemistry**. Facts On File, Inc. New York: 247 pp.
- Daud, Mohamad Fajar, Esti R. Sadiyah, Endah Rismawati. 2011. **PENGARUH PERBEDAAN METODE EKSTRAKSI TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL BUAH JAMBU BIJI (*Psidium guajava* L) BERDAGING BUAH PUTIH**. Prosiding SNaPP2011 Sains, Teknologi dan Kesehatan. ISSN 2089-3582. Universitas Islam Bandung. Bandung
- Day, R.A dan Underwood, A.L. 1999, **Analisis Kimia Kuantitatif**, Erlangga, Jakarta.

- Dewi, J. R., T. Estiasih dan E. S. Murtini. 2007. **Aktivitas Antioksidan Dedak Sorgum Lokal Varietas Coklat (*Sorghum bicolor*) Hasil Ekstraksi Berbagai Pelarut**. Jurnal Teknologi Pertanian, Vol. 8 No. 3. Desember 2007.
- Fadillah, Lessy, A., Paransa, D. S., Gerung, G. 2014. **Uji Aktivitas Antikoagulan Pada Sel Darah Manusia Dari Ekstrak Alga Coklat *Turbinaria ornate***. Jurnal Pesisir dan Laut Tropis. Vol. 2, No. 1, Tahun 2014.
- Frete, Helly de. AB. Susanto. Budhi Prasetyo. Heriyanto. Tatas H.P. Brotosudarmono. Leenawaty Limantara. 2012. **Estimasi Produk Degradasi Ekstrak Kasar Pigmen Alga Merah *Kappaphycus alvarezzi* (Doty) Doty Varian Merah, Coklat dan Hijau: Telaan Perbedaan Spektrum Serapan**. ISSN 0853-7291. Jurnal Ilmu Kelautan Vol. 17 (1): 31-38.
- Geraldino, P. J. L., L. M. Liao and S. M. Boo. 2005. **Morphological Study of the Marine Algal Genus *Padina* (Dictyolales, Phaeophyceae) from Southern Philippines: 3 Species New to Philippines**. Algae. 20 (2): 99-112.
- Gross, J. 1991. **Pigments In Vegetables: Chlorophylls and Carotenoids**. Springer Science+Business Media, LLC. New York: 351 pp
- Handayani Tri., Sutarno,, dan Ahmad Dwi Setiawan. 2004. **Analisis Komposisi Nutrisi Rumput Laut *Sargassum crassifolium* J. Agardh. Nutritional composition analysis of seaweed *Sargassum crassifolium* J. Agardh**. Biofarmasi 2(2):45-52, Agustus 2004: ISSN 1693-2242. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Handayani, Sri. Sunarto Dan Susila Kristaningrum. 2005. **KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS UNTUK PENENTUAN KADAR HESPIRIDIN DALAM KULIT BUAH JERUK**. Jurnal Penelitian Saintek. ISSN 1421-3991. Volume 10, Nomor 1, April 2005.
- Harbone. 1987. **Metode Fitokimia -Penuntun Cara Menganalisa Tumbuhan**.ITB. Bandung
- Hariyano, M. Tahalea, K. Samal dan T. Agam. 2010. **Koleksi Bibit Alga Coklat (*Padina australis*) dengan Metode Rentangan Net**. Balai Budidaya Laut Ambon 1 (1): 1-7
- Hasanah, Hosnatus. 2014. **Uji Aktifitas Antioksidan β -karoten Pada Rumput Laut Merah *Euचेuma cottoni* Dan *Euचेuma sponissum***. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang. Malang
- Hegazi, M. M., A. P. Ruzafa, L. Almela, and M. Candela. 1998. **Separation and Identification of Chlorophylls and Carotenoids from *Caulerpa prolifera*, *Jania rubens* and *Padina pavonica* by Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography**. J. of Chromatography. A (829): 153-159
- Hendayana, T., Sutarno dan A. D. Setiawan. 2006. **Analisis Komposisi Nutrisi**

- Rumput Laut *Sargassum crassifolium* IJ. Agard.** Biofarmasi 2(2) Hal 45-52
- Hijaz, M. N. 2009. **Uji Kativitas Antioksidan Karagenan dalam Alga Merah Jenis *Eucheuma cottoni*.** Universitas Islam Negeri Malang (UIN) Malang. 116 hlm
- Huda, N. 2011. **Pemeriksaan Kinerja Spektrofotometri UV-Vis Menggunakan Pewarna Tetrazine.** Bidang Evaluasi Dan Pengembangan Keselamatan Instalasi. Sigma Epsilon
- Hui, Y. H dan Yaws, Stephan. 2013. **Ensylopedia Of Food Science & Technology. Vol 2. A Willey Interscience Publication.** Jhon Willey & Sons Inc. New York
- Hutajulu Tiurlan Farida., Eddy Sapto Hartanto., dan Subagia. 2008. **Proses Ekstraksi Zat Warna Hijau Klorofil Alami Untuk Pangan Dan Karakterisasinya.** Jurnal Riset Industri Vol. 2, No 1, Juni 2008:: 44-45
- Indharini, Ulfah. 2010. **PENETAPAN KADAR α -MANGOSTIN PADA INFUSA KERING KULIT BUAH MANGGIS (*Garcinia mangostana L.*).** Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.Surakarta.
- Indriani, Elisa. 2010. **ISOLASI FUKOSANTIN PADA ALGA COKLAT (*Sargassum filipendula*) DENGAN MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI KOLOM.** Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang
- Indah, Ufy Rahmana, Dr. Rer.Nat. Irmira Kris Murwani, Dr. Didik Prasetyoko. M.Sc. 2010. **Optimasi Ekstrak Zat Warna Pada Kayu *Intsia bijuga* Dengan Metode Pelarut.** Institut Teknologi Sepuluh Nopember:9 hlm
- Januar, Hedi Indra dan Wikanta Thamrin. 2011. **KORELASI KANDUNGAN FUKOSANTIN DARI *Turbinaria sp.* TERHADAP NUTRIENT LAUT DI PANTAI BINUANGEUN DAN KRAKAL.** Squalen Vol. 6 No. 1, Mei 2011.
- Jeffrey, S. W.,R. F. C. Mantoura and S. W. Wright. 1998. **Phytoplankton Pigmen In Oceanography. Guidlines To Modern Methods.** UNESCO Publishing. Paris. 661 pp.
- Kerans, Frans. 2010. **Metode Ekstraksi Rumput Laut Coklat *Padina australis* dan *Sargassum filipendula* Dengan Penambahan Etanol Menggunakan Metode Spektrofotometri UV-Vis.** E-Journal. Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Yogyakarta
- Kalalo. Julia L, Desy Manitri, Joice. 2014. **ANALISIS JENIS-JENIS PIGMEN ALGA COKLAT *Padina australis* Hauck DARI PERAIRAN LAUT SULAWESI.** Jurnal Pesisir dan Laut Tropis. Volume 1 Nomor 1 Tahun 2014. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Sam Ratulangi, Manado.

- Khotimah, Khusnul. Darius. Bambang Budi Sasmita. 2013. **UJI AKTIVITAS SENYAWA AKTIF ALGA COKLAT (*Sargassum fillipendula*) SEBAGAI ANTIOKSIDAN PADA MINYAK IKAN LEMURU (*Sardinella longiceps*)**. THPI STUDENT JOURNAL, VOL.1 NO. 1 pp 10-20. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Komara, A. 1991. **Mempelajari Ekstraksi Oleoresin dan Karakteristik Mutu Oleoresin dari Bagian Cabe Rawit (*Capsicum frutescens* L.)**. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. [Skripsi].
- Kristijarti, A. P., dan A. Arlene. 2012. **Isolasi Zat Warna Ungu Pada *Ipomoea batatas* Poir dengan Pelarut Air**. Laporan penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat. LPPM. Universitas Katolik Parahyangan. Perjanian No. II/LPPM/2012/02/10-P: hlm. 1-31.
- Kartikaningsih, Hartati, Kartini Zaeanie dan Sri Dayuti. 2014. **Stabilitas Fukosantin Dari Rumput Laut Coklat *Padina australis* Terhadap Perubahan Suhu**. Fakultas Sains dan Teknologi. UIN Maliki. Malang
- Kupiec, Tom. 2014. **Kuality-Control Analitical Methods:High-Performance Liquid Chromatographi. Analitical Research Laboratories Oklahoma**.International Journal Of Pharmaseutical Coumpounding Vo. 8 No. 3 Mei-Juni 2004.
- Leny, Andriana. 2006. Studi Termostabilitas Pigmen Fukosantin, Klorofil a dan Ekstrak Kasar *Padina australis* dan *Sargassum polycystum* Terhadap Suhu dan Nurdiana, D. N dan L. Limantara. 2006. Ragam Pigmen Rumput Laut Coklat: Potensi dan Aplikasi. Departemen Biologi, Universitas Airlangga. Surabaya.
- Lestari, P. 2001. Isolasi Dan Identifikasi Komponen Kimia Ekstrak Etanol Buah Merah *Pandanus conoideus*. Universitas Sebelas Maret. Surakarta
- Liana, Ida. 2010. **Ativitas Antimikroba Fraksi Dari Ekstrak Metanol Daun Senggani *Mellastoma candidum* D. Doun Terhadap *Staphylococcus* Dan *Salmonella* Serta Profil Kromatografi Lapis Tipis Fraksi Teraktif**. Skripsi. Program Sarjana. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret. Surakarta
- Limantara Leenawaty dan Heryanto. 2010. **Studi Komposisi Pigmen dan Kandungan Fukosantin Rumput laut Coklat Dari Perairan Madura Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi**. Ilmu Kelautan maret 2010. vol. 15 (1) 23-32. Teknik Industri, Universitas Ma Chung. Malang
- Limantara Leenawaty dan Heryanto. 2011. **Optimasi ProsesEkstraksi Rumput Laut Coklat *Padina australis* Hauck Menggunakan Pelarut Organik Polar**. Ilmu Kelautan Juni 2011. Vol. 16 (2)86-94. Teknik Industri, Universitas Ma Chung. Malang Jawa timur.
- Marfu'ah, Arik. 2014. **UJI AKTIFITAS ANTIOKSIDAN DAN ANALISA TOTAL FENOL Klorofil a PADA RUMPUT LAUT COKLAT PADA**

RUMPUT LAUT COLAT *Sargassum filipendula*

- Moroney, N. C., M. N. O'Grady, J. V. O'Doherty, J. P. Kerry. 2013. **Effect of a Brown Seaweed (*Laminaria digitata*) Extract Containing Laminarin and Fucoidan on The Quality and Shelf-Life of Fresh and Cooked Minced Pork Patties.** Meat Science. (94): 304-311
- Mufti, Eka Deviana, Kartini Zaelanie dan Hartati Kartikaningsih. 2013. **Stabilitas Fukosantin Dari Alga Cokelat (*Sargassum cristaefolium*) Pada Berbagai pH.** THP Student Journal, Vol 1. No. 1 pp. 41-50
- Mulyono, L. Rohmatussolihat dan Marzuki. 2012. Uji Kinerja Spektrofotometri UV-Vis Tampak Berkas Ganda Terhadap Pengukuran Ambroksol HCL Pada Tabel Ekspektora. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Murthy, K. N. C., 2005. **Production of β -Carotene from Cultured *Dunaliella* sp. And Evaluation of Biological.** Plant Cell Biotechnology Departement. Central Food Technological Reasearch Institute. Mysore. India. [Tesis].
- Murti, Paulus D. B. Ferdy S. Rondonuwu. OckyK. Radjasa AB Susanto. 2010. **POTENSI FUKOSANTIN DARI RUMPUT LAUT COKLAT DALAM DUNIA KESEHATAN.** Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Mukti, Kusananto. 2013. **Analisis Spektroskopi UV-Vis "Penentuan Konsentrasi Permanganat ($KMnO_4$)".** Universitas Sebelas Maret Surakarta 118 hlm.
- Markham, K.R.1988. **Cara Identifikasi Flavonoid.** Penerbit ITB:Bandung
- Miryanti Arry Y.I.P.Ir.,M.Si, Dr. Lenny Sapei, S.T., M.Sc, Kurniawan Budiono, Stephan Indra. 2011.**Ekstraksi Antioksidan Dari Kulit Buah Manggis (*Gracinia mangostana* L).** Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat. Universitas Katolik Parahyangan: Bandung.
- Ningsih, Dian Riana, Winarsih dan Suwandri. 2006. **Fraksinasi Ekstrak Metanol Kulit Batang *Rhizopora mucronata* dan Uji Daya Hambatnya Terhadap Bakteri *Escherecia coli*.** UNSOED Purwokerto. Molekul. Vol. 1 No. 1, Nopember 2006:30-35
- Nuraini, A, D. (2007). **Ekstraksi Komponen Antibakteri dan Antioksidan dari biji Teratai (*Nymphaea pubescens* Wild).** Institut Pertanian Bogor. Bogor 94 hlm
- Neldawati., Ratnawulan dan Gusnedi. 2013. **Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid untuk Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat.** Universitas Negeri Padang. Pillar of Physics
- Novianto, D. B. 2010. **Bioviabilitas Beta Karoten dari Hasil Pemurnian CPO (Crude Palm Oil) dalam Bentuk RPO (Red Palm Oil) dan Isolat secara In Vivo.** Program Studi Gizi Masyarakat dan Sumberdaya Keluarga Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor. [Skripsi].

- Noviyanti, L. 2010. **Modifikasi Tehnik Kromatografi Kolom Untuk Pemisahan Trigliserida Dari Ekstrak Buah Merah (*Pandanus conoideus*)**. Universitas Sebelas Maret. Surakarta
- Nurchayanti, A. D. R. dan Limantara L. 2007. **Fotodegradasi Ekstrak Kasar, Klorofil a dan Fucoxanthin Padina australis dan Dictyota crenulata**. Prosiding Seminar Nasional Pigmen di Universitas Kristen Satya Wacana Salatiga: hlm. 243-260
- Nurdiana, D. R., L. Limantara, A. B. Susanto. 2008. **Komposisi dan Fotostabilitas Pigmen Rumput Laut Padina australis Hauck. dari Kedalaman yang Berbeda**. Ilmu Kelautan. 13 (4): 233-240.
- Nurhayati, Rena. 2014. **ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA FLAVONOID SEBAGAI ANTIOKSIDAN PADA KULIT BUAH MANGGIS**. Tesis, Universitas Negeri Gorontalo.
- Nursid, Muhammad. Thamrin Wikanta dan Rini Susilowati. 2013. **AKTIVITAS ANTIOKSIDAN, SITOTOKSISITAS DAN KANDUNGAN FUKOSANTIN EKSTRAK RUMPUT LAUT COKLAT DARI PANTAI BINUANGEUN, BANTEN**. JPB Kelautan dan Perikanan Vol. 8 No. 1 Tahun 2013:73-84
- Parwati, Anny. 2010. **PENETAPAN KADAR SENYAWA α -MANGOSTIN PADA SEDIAAN DECOCTA KULIT BUAH MANGGIS**. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Pallalo, alfian. 2013. **DISTRIBUSI MAKROALGA PADA EKOSISTEM LAMUN DAN TERUMBU KARANG DI PULAU BONEBATANG, KECAMATAN UJUNG TANAH, KELURAHAN BARRANG LOMPO, MAKASSAR**. Skripsi Program Studi Ilmu Kelautan Jurusan Ilmu Kelautan. Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Uiversitas Hasanuddin. Makassar.
- Pangestuti, R., L. Limantara dan A. Susanto. 2007. **Kandungan dan Aktivitas Antioksidan Fukosantin *Sargassum polycustum* C. A. Agardh**. Prosiding Back to Nature dengan Pigmen Alami di Salatiga: hlm. 201-209.
- Pramesti, Rini. 2013. **Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rumput Laut *Caulerpa serrulata* Dengan Metode DPPH (1,1 difenil 2 pikrilhidrazil)**
- Prangdimurti. 2007. **Pigmen Alami**. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Pratimasari, Diah. 2009. **UJI AKTIVITAS PENANGKAP RADIKAL BUAH *Carica papaya*. L DENGAN METODE DPPH dan PENETAPAN KADAR FENOLIK SERTA FLAVONOID TOTALNYA**. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta
- Prasetyowati., Corrine Jasmine A., dan Devy Agustawan. 2008. **PEMBUATAN TEPUNG KARAGENAN DARI RUMPUT LAUT (AUCHEUMA COTTONI) BERDASARKAN PERBEDAAN METODE PENGENDAPAN**. Jurnal Teknik Kimia, No. 2, Vol. 15, April 2008. Jurusan Teknik kimia Fakultas Teknik Universitas Sriwijaya.

- Putri, Synli Evan. 2010. **Alga Laut Sebagai Biotarget Industri**. [Http://www.Chem-is-try.org](http://www.Chem-is-try.org). Html diakses pada tanggal 23 April 2015 Pukul 15.30 WIB.
- Puspitaningtyas, Auliya, Surjani Wonorahardjo dan Neena Zakia. 2013. **Pengaruh Komposisi Fase Gerak Pada Penempatan Kadar Asam Benzoat dan Kafein dalam Kopi Kemasan Menggunakan Metode KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi)**. Jurusan Kimia. FMIPA. Universitas Negeri Malang.
- Putra, Effendy De lux. 2004. **Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Dalam Bidang Farmasi**. Universitas Sumatera Utara. 22 hlm
- Reskika Andi. 2011. **Evaluasi Potensi Rumput Laut Coklat (*Phaeophyceae*) dan Rumput Laut Hijau (*Chlorophyceae*) Asal Perairan Takalar Sebagai Antibakteri *Vibrio spp.***. Skripsi. Jurusan Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Riyono, Sumijo Hadi. 2007. **BEBERAPA SIFAT UMUM DARI KLOOROFIL FITOPLANKTON. Oseana, Volume XXXII, Nomor 1, tahun 2007 : 23-31**
- Romiyanto,1. 2014. Studi Kandungan β -karoten Pada Rumput Laut Merah *Euclidean spinosum* Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Malang 118 hlm
- Santoso, J., F. Podunge and H. Sumaryanto. 2013. **Chemical Composition and Antioxidant Activity of Tropical Brown Algae Padina australis from Pramuka Island, District of Seribu Island, Indonesia**. J. Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis. 5 (2): 287-297.
- Sari, Irna Rinia Mutia. 2012. **Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Jamur *Pleurotus ostreatus* Dengan Metode DPPH Dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Dari Fraksi Interaktif**. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Program Sarjana Ekstensi Farmasi. Depok
- Schelfan, Leopold and M. B. Jacobs. 1983. **The Handbok of Solvent. D. Van Nostrand Comp, Inc. New York. Pp**
- Schoefs, Benoit. 2002. **Chlorophyll and Carotenoid Analysis in Food Products. Properties of the Pigments and Methods of Analysis**. Trends in Food Science & Technology Review. (13): 361–371
- Septianingsing, Dyah. 2010. **Isolasi dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Biji Buah Merah *Pandanus conoideus* Lamk**. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret:Surakarta
- Setyohadi, R., Sidharta, R., Nandar, D.S.A. 2013. **Pengaruh Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Terhadap Ketebalan Epitel Gingiva Tikus Jantan Galur Wistar Yang Diinduksi *Actinobacillusactinomycetemcomitans***. Program Studi Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Malang.

- Septiana, A. T. Dan A. Asnani. 2012. **Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat *Sargassum duplicatum* Menggunakan berbagai pelarut dan Metode Estraksi.** Agrotek. 6(1):22-28
- Sheriner, R.I., R.C Fuson ., D.Y Curtin., C.K.F Herman and T.C Morili.1980. **The Systematic Identification of Organic Compounds. 6nd. Editor John Willey and Sons Inc.** Singapore.
- Sholihah, H. M. 2010. **Uji Afrodisiaka Fraksi Larut Air Ekstrak Etanol 70% Kuncup Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr.& Perry) Terhadap Libido Tikus Jantan.** Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Siswadi, A. D dan G. Permatasari. 2009. **Ekstrak Asphaltene Dari Minyak Bumi. Universitas Diponegoro.** UNDIP. Semarang
- SNI. 06-2954. 1992. **Dietil Eter Teknis.** Badan Standar Standarisasi Nasional. 8 hlm
- Sudarmadji, S. B. Haryono dan Suhardi. 2007. **Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian.** Liberty. Yogyakarta.
- Sudiarta, I Wayan, Ni Putu Diantariani dan Putu Suarya. 2013. **Modifikasi Silika Gel Dari Abu Sekam Padi Dengan Ligan Difenilkarbazon.** Jurusan Kimia FMIPA. Universitas Udayana, Bukit Jimbaran. Bali.
- Suharja dan Sutarno 2009. **Biomassa, Kandungan Klorofil dan Nitrogen Daun Dua Varietas Cabai (*Capsicum anum*) Pada Berbagai Perlakuan Pemupukan.** Bioteknologi 6 (1):11-20, Mei 2009. Halaman 12
- Susanto, A. B. 2009. **Penelitian Rumput Laut di Indonesia dan Potensi Pemanfaatan Klorofil.** Prosiding Sains dan Teknologi Pigmen Alami di mana?: hlm 43-50.
- Susanto, A. B. 2009. **Penelitian Rumput Laut di Indonesia dan Potensi Pemanfaatan Klorofil.** Prosiding Sains dan Teknologi Pigmen Alami di mana?: hlm 43-50.
- Susiana. 2014. **Isolasi dan Identifikasi Klorofil a Dengan *Liquid Chromatography Mass Spectrofotometry* (LC-MS) Pada Alga Coklat (*Sargassum filipendula*).** Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang.
- Suparmi dan Sahri, A. 2009. **Mengenal Potensi Rumput Laut: Kajian Pemanfaatan Sumber Daya Rumput Laut dari Aspek Industri dan Kesehatan.** Vol. XLIV, No. 118 Juni-Agustus 2009.
- Simanjuntak, Lidya, Chairina Sinaga dan Faimah. 2014. **Ekstraksi Pigmen Antosianin Dari Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*).** Skripsi. Jurnal Teknik Kimia USU. Vol. 3, No. 2 Juni 2014.
- Syarif, Syarifana Andiana. 2009. **Penerapan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Pada Penetapan Kadar Deksametason**

Dalam Tablet Campuran Dengan Deksklorofeniramin Maleat. Skripsi. Universitas Sumatera Utara:Medan.

- Triyati, Ety. 1985. **Spektrofotometer Ultra-Violet dan Sinar Tampak Serta Aplikasinya Dalam Oseanologi.** Oseana, Volume X, Nomor 1:39-47. ISSN 0216-1877, 9 hlm
- Octaviani, Subekti, S dan Alamsjah, M. A. 2004. **Studies Alginate and Chlorophyll Content of Seaweed *Sargassum* sp.** At Different Harvest Age. Universitas Airlangga: Surabaya.
- Utami, D. P. Rahayu, Karwur dan L. Limantara. 2009. **Identifikasi dan Isolasi Pigmen Karotenoid Berbagai Jenis Kuning Telur Unggas.** Organisme, Vol (2):100-110
- Vogel, A. I. 1987. **Text Book Of Practical Organic Chemistry.** Revised by Furnies, B. S Fourth Edition. New York.
- Wehr, J. D. 2002. **Brown Algae, in Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification.** Academic Press. San Diego. CA.
- Widayanti, L. 2009. **Studi Komposisi Pigmen Dan Kandungan Fukosantin Pda Alga Coklat *Sargassum duplicatum*, *iPadina australis*.** Skripsi. Program Studi THP fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang. Malang
- Widayanti, L. 2010. **Studi Komposisi Pigmen dan Kandungan Fukosantin Pada Alga Coklat (*Sargassum duplicatum*, *Sargassum polycystum*, *Sargassum filipendula*, *Padina australis*, dan *Turbinaria conoides*).** Skripsi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.
- Indriani, Elisa. 2010. **ISOLASI FUKOSANTIN DARI ALGA COKLAT *Sargassum fillipindelua* DENGAN MENGGUNAKAN METODE KCKT.** Teknologi Industri Hasil Perikanan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Rusli, Anggara. 2009. **IDENTIFIKASI Klorofil b DENGAN LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROFOTOMETRI PADA ALGA MERAH *Eucheuma cottoni*.** Universitas Udayana. Bali
- Yudiati, Ervia. Sri Sedjati. Rani Agustian. **Aktifitas Antioksidan dan Toksisitas Ek Metanol dan Pigmen Kasar *Spirullina* sp.** Jurnal Ilmu Kelautan. ISSN Vol. 16 (4) 187-192. Universitas Diponegoro. Semarang
- Yuliasih, Indah, Tun Tedja Irawadi, Illah Sailah, Hardaning Pranamuda, Krisnani Setyowati, Titi Candra Sunarti. 2013. **PENGARUH PROSES FRAKSINASI PATI SAGU TERHADAP KARAKTERISTIK FRAKSI AMILOSANYA.** Jurnal Teknik Pert. Vol. 17 (1), 29-36. Teknologi Industri Pertanian. Fakultas Teknologi Pertanian. IPB
- Yunizal. 1999. **Teknologi Pengolahan Alginat.** Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan. Departemen Kelautan dan Perikanan. Jakarta

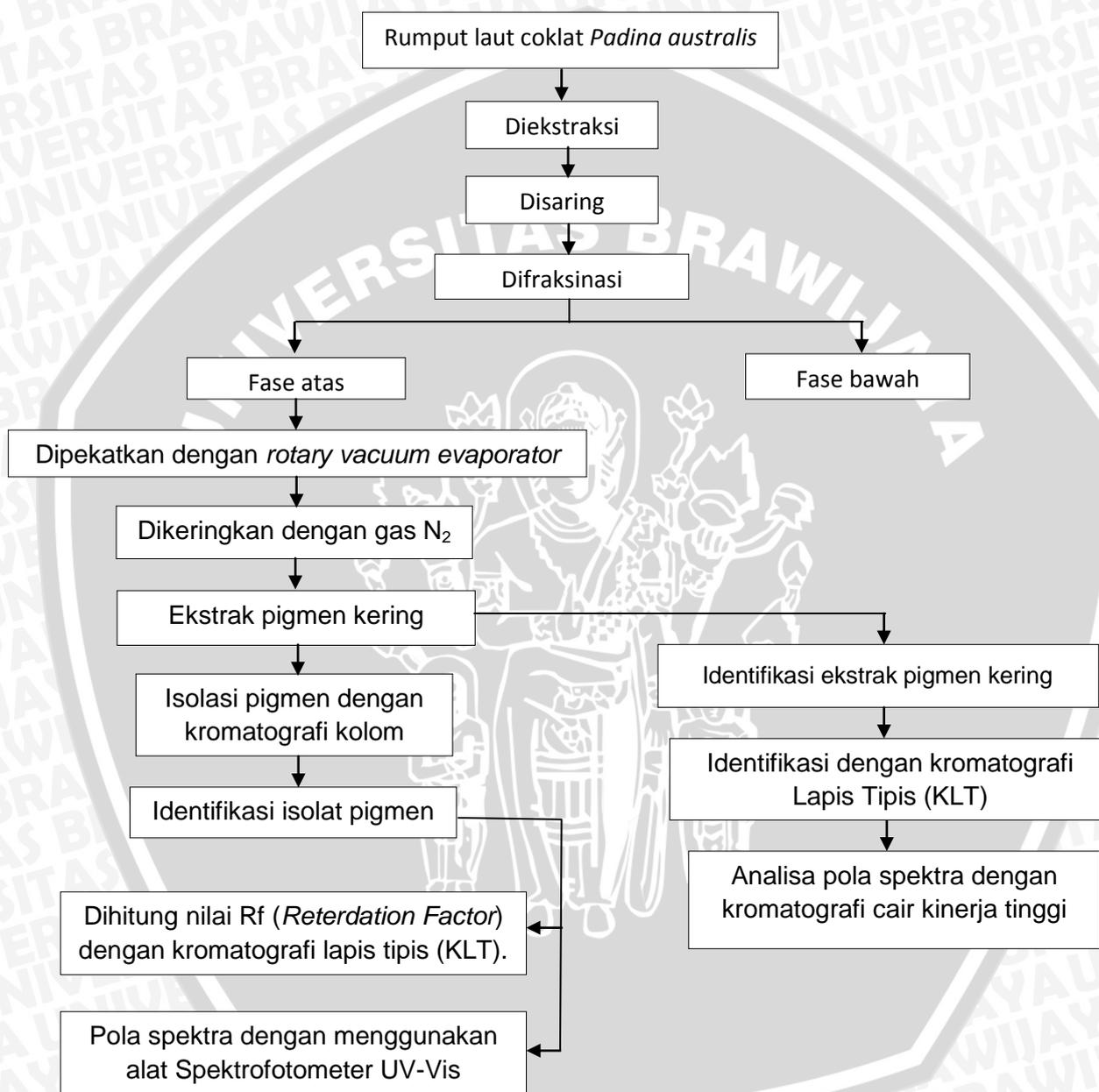
Zaelanie, Kartini dan Hartati Kartikaningsih. 2014. **STUDI IDENTIFIKASI CRUDE DAN FUKOSANTIN HASIL ISOLASI DARI ALGA COKLAT (*Padina australis*) DENGAN PENGUJIAN SPEKTROSKOPI FTIR**

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



LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir Prosedur Penelitian Identifikasi Pigmen Pada Rumpun Laut Coklat *Padina australis* Dengan KCKT



Lampiran 2. Prosedur Ekstraksi dan Fraksinasi (da Costa *et al.*,2009)

➤ Prosedur Ekstraksi

- Rumput laut coklat *Padina australis* dicuci dan dibersihkan dengan air mengalir, kemudian dipotong-potong dengan ukuran $\pm 1,5$ cm
- Rumput laut coklat *Padina australis* ditimbang sebanyak 100 gram dan dihaluskan dengan menggunakan mortar dan alu sambil ditambahkan $\text{CaCO}_3 \pm 0,5$ gram.
- Dimaserasi dengan metanol (CH_3OH) dan aseton (CH_3COCH_3) dengan perbandingan 7/3 sebanyak 300 ml selama 24 jam sebanyak 2 kali.
- Disaring dengan menggunakan kertas Whatmen No. 42 hingga didapatkan filtrat.

➤ Prosedur Fraksinasi

- Filtrat Dietil Eter ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$), saturasi garam dan air dimasukkan kedalam corong pisah n secara berurutan dengan berbanding berturut-turut yaitu 50 ml : 25 ml : 60 ml : 5 ml didalam ruangan gelap.
- Larutan dalam corong pisah dihomogenkan sampai terbentuk dua fase yaitu fase atas dan bawah.
- Fase atas ditampung dalam labu erlenmeyer dan fase bawah dibuang.
- Fase atas yang ditampung dalam labu erlenmeyer dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 35°C pada 100 rpm dalam kondisi labu evaporator ditutup plastik hitam sampai pelarut menguap dan terbentuk pasta atau kerak.
- Pasta atau kerak diletakan didalam botol sampel kemudian dialiri dengan gas nitrogen (N_2) untuk menguapkan sisa pelarut sehingga didapatkan ekstrak kasar pigmen kering.
- Botol sampel ditutup dengan plastik *wrap* dan dilapisi dengan *aluminium foil*, kemudian disimpan didalam *freezer*.

Lampiran 3. Prosedur Isolasi Dengan Kromatografi Kolom (Markham, 1988)

➤ Preparasi Kolom Kromatografi

- *Silica gel* F-254 ditimbang sebanyak 35 gram kemudian dihomogenkan dengan fase gerak m-heksan (C_6H_{14}) dan etil asetat ($C_4H_8O_2$) dengan perbandingan 8/2 (v/v) sebanyak 200 ml dengan menggunakan *magnetic stirer* selama 1 jam dengan kecepatan 150 rpm sampai benar-benar didapatkan bubur *silica gel*.
- Kolom dipasang pada statif, kemudian kolom diisi dengan fase gerak untuk membasahi bagian dalam kolom, kemudian kapas direndam dengan larutan fase gerak, dibentuk bulat tipis dan dimasukkan ke dalam kolom dengan bantuan lidi.
- Fase gerak ditambahkan secara perlahan sampai setengah tinggi kolom.
- Bubur *silica gel* dimasukkan ke dalam kolom secara perlahan-lahan dengan bantuan sendok melalui dinding bagian dalam kolom sambil terus diaduk.
- Kolom dipadatkan dengan cara diketuk-ketuk pada bagian kolom dengan menggunakan bola hisap, kemudian didiamkan selama ± 12 jam sampai bubur *silica gel* padat dan ditambahkan pasir laut atau *sea sand* sebanyak $\pm 2,5$ gram.

➤ Isolasi Pigmen

- Ekstrak kasar pigmen dilarutkan dalam ekstrak kasar pigmen kering $\pm 0,3-0,4 \pm 10$ ml fase gerak n-heksan (C_6H_{14}) dan etil asetat ($C_4H_8O_2$) dengan perbandingan 8:2 (v/v).
- Bagian kran pada kolom kromatografi dibuka dan fase gerak dikeluarkan sampai batas *sea sand* sambil ditambahkan fase gerak sedikit demi sedikit agar *silica gel* pada kolom tidak pecah.
- Ekstrak pigmen dimasukkan secara perlahan ke dalam kolom kromatografi dengan menggunakan bantuan pipet tetes.
- Setelah ekstrak kasar melewati *Sea sand* dan masuk ke dalam *silica gel*, kemudian ditambahkan fase gerak n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 8:2 v/v sedikit demi sedikit agar *silica* tidak pecah.
- Fraksi yang keluar dari kromatografi kolom ditampung dengan menggunakan botol vial sesuai dengan warna.
- Polaritas dari fase gerak dinaikkan sesuai dengan pergantian warna fraksi yang keluar dari kromatografi kolom dengan penambahan n-heksan

(C₆H₁₄) dan etil asetat (C₄H₈O₂) dengan perbandingan 7:3, 6:4, 5:5 (v/v) sampai semua warna fraksi keluar dari kolom.

Lampiran 4. Prosedur Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (Pangestuti et al., 2008) yang dimofidifikasi oleh Hasanah, (2014).

- Disiapkan fase gerak n-heksan : aseton 7:3 (v/v) sebanyak 10 ml ke dalam beaker glass kemudian ditutup dengan plastik *wrap* agar tidak menguap.
- Plat KLT *silica gel* F-254 dipotong dengan ukuran 1x5 cm dan diberi garis batas bawah 1,0 cm dari batas tepi dan garis batas atas 0,5 cm dari batas tepi dan terbentuk jarak 3,5.
- Fraksi yang diduga terdapat komponen pigmen ditotolkan pada garis batas bawah plat KLT dengan menggunakan pipa kapiler.
- Plat KLT dimasukkan kedalam *beaker glass* yang berisi fase gerak dan ditunggu sampai pelarut bergerak sampai garis batas atas dan ditutupi dengan plastik *cling wrap*, kemudian plat KLT diambil menggunakan pinset.
- Dihitung nilai R_f (*Reterdation Factor*) dengan rasio jarak yang ditempuh oleh totol warna dengan jarak yang tempuh oleh pelarut.
- Di keringkan dengan menggunakan gas nitrogen (N₂), kemudian disimpan didalam *freezer*

Lampiran 5. Prosedur Identifikasi dengan Spektrofotometri UV-Vis (Fretes et al., 2012).

- Sampel kering fraksi komponen pigmen hasil identifikasi dari KLT yang telah diketahui nilai R_f nya dilarutkan dalam aseton PA dan dituangkan dalam kuvet sebanyak ± 3 ml .
- Alat Spektrofotometer UV-Vis diatur pada panjang gelombang 300-800 nm.
- Kuvet dimasukkan pada instrumen Spektrofotometer UV-Vis.
- Diukur panjang gelombang dan absorbansi sampel.

Lampiran 6. Prosedur Identifikasi dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

- Ekstrak pigmen kasar kering dilarutkan dalam 5 ml fase gerak (metanol : aseton : amonium asetat, 80 : 10 : 10 v/v)
- 20 µl larutan pigmen diinjeksikan ke KCKT dengan fase diam ODS (C-18) 5 µm dengan sistem elusi gradient metanol, aseton, dan amonium asetat (1 M) (80 : 10 : 10, v/v) dan laju alir sebesar 1,0 ml/menit
- Dianalisis pada panjang gelombang 430 nm

Lampiran 7. Prosedur Pembuatan Larutan

➤ Prosedur Pembuatan Larutan Saturasi Garam (Costa *et al.*, 2009)

- Disiapkan ± 1500 gram garam grosok
- Dimasukan kedalam botol plastik dengan ukuran 1500 ml dan ditambahkan air hingga penuh.
- Dihomogenkan dengan cara dikocok sampai larutan jenuh (garam tidak larut lagi).
- Larutan garam jenuh disaring dengan menggunakan kertas saring kasar dan halus dengan bantuan corong kemudian dilakukan 2 kali penyaringan
- Didapat larutan saturasi garam.

➤ Pembuatan Larutan Ekstraksi

Metanol (CH₃OH) : Aseton (CH₃COCH₃) 7:3 (v/v) 300 ml

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

➤ Pembuatan Fase Gerak Kromatografi Kolom

Heksan (C₆H₁₄) : Etil Asetat (C₄H₈O₂) 8:2 (v/v) 200 ml

- Heksan = $\frac{8}{10} \times 200 \text{ ml} = 160 \text{ ml}$
- Etil Asetat = $\frac{2}{10} \times 200 \text{ ml} = 40 \text{ ml}$

Heksan (C₆H₁₄) : Etil Asetat (C₄H₈O₂) 7:3 (v/v) 200 ml

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

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

Heksan (C₆H₁₄) : Etil Asetat (C₄H₈O₂) 6:4 (v/v) 200 ml

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

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

➤ **Pembuatan Fase Gerak Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Heksan (C₆H₁₄) : Aseton (CH₃COCH₃) 7:3 (v/v) 10 ml

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

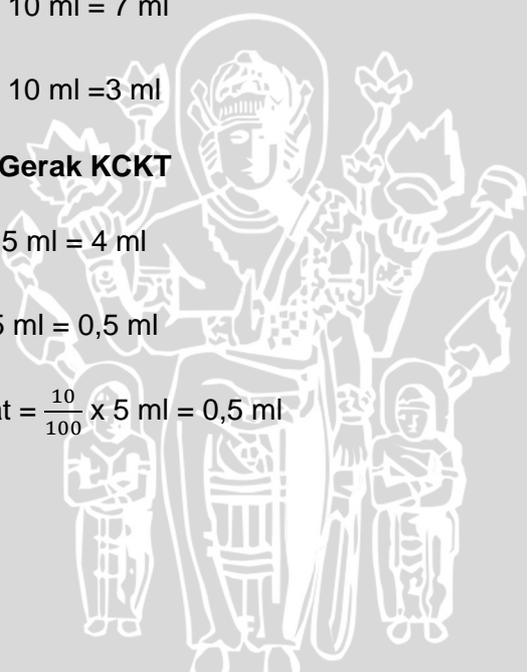
- Aseton = $\frac{3}{10} \times 10 \text{ ml} = 3 \text{ ml}$

➤ **Pembuatan Fase Gerak KCKT**

- Metanol = $\frac{80}{100} \times 5 \text{ ml} = 4 \text{ ml}$

- Aseton = $\frac{10}{100} \times 5 \text{ ml} = 0,5 \text{ ml}$

- Amonium Asetat = $\frac{10}{100} \times 5 \text{ ml} = 0,5 \text{ ml}$



Lampiran 8. Dokumentasi Proses Penelitian

- Proses Ekstraksi Rumput Laut Coklat *Padina australis*
- Maserasi



a. Pencucian



b. Pematangan



c. Penimbangan rumput laut



d. Penimbangan CaCO_3



e. Penghalusan dan penambahan CaCO_3



f. Penambahan Pelarut



g. Proses maserasi



h. Proses filtrasi

➤ Pembuatan Saturasi Garam



a. Dimasukan garam grosok dan ditambah air



b. Dikocok dan didiamkan



c. Penyaringan 1 dan 2



d. Saturasi garam

➤ **Proses Fraksinasi**



a. Penuangan larutan atas



b Terbentuk 2 fase



c Pengukuran fase

➤ **Proses Evaporasi dan Pengeringan Gas Nitrogen**



a. Filtrat hasil partisi dengan N₂



b. Proses evaporasi



c. Hasil Evaporasi



d. Pengeringan

➤ **Proses Isolasi Pigmen Rumput Laut *Padina australis* dengan Kromatografi Kolom**

- **Preparasi Kolom Kromatografi**



a. Penimbangan *Silica gel* 150 rpm selama 1 jam



b. Dicampurkan fase gerak



c. Dimagnetic Stirrer



d. Penimbangan *Sea Sand*



e. Dimasukan fase gerak



f. Dimasukan *Sea Sand*



Proses Isolasi Kolom Kromatografi



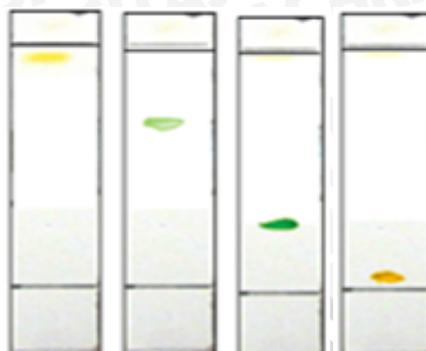
a. Isolasi pigmen *Padina australis* dengan kromatografi kolom

➤ Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)



a. Preparasi dan Proses Uji Kromatografi Lapis Tipis

- Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT)



a. Hasil proses KLT Ekstrak Kasar

c. Hasil Proses KLT dari Hasil Isolasi

➤ **Bagian Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Shimadzu LC 20A**



a. Rangkaian Alat Instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)



b. Kolom Untuk Fase Gerak



c. Pompa



d. Injektor



e. Detektor

➤ Identifikasi Pigmen Dengan Spektrofotometri UV-Vis



a. Rangkaian Alat Spektrofotometri UV-Vis



b. Ekstrak Pigmen Kering



c. Pengenceran aseton dalam cuvet



d. Cuvet dimasukkan dalam alat spektrofotometer



d. Pengukuran nilai absorbansi



e. Kromatogram Hasil Spektrofotometri UV-Vis

**Lampiran 9. Data Hasil Isolasi Pigmen Rumput Laut *Padina australis*
Kromatografi Kolom**

- Ulangan 1

No Botol	Waktu	Warna	Konsentrasi Fase Gerak (v/v)
1	11:11 WIB	Bening (Fase antara)	(8:2) N-Heksan : Ethyl Asetat
2	11:18 WIB	Kuning Pekat (β -karoten)	(8:2)
3	11:21 WIB	Kuning Pekat (β -karoten)	(8:2)
4	11:24 WIB	Kuning Bening	(8:2)
5	11:26 WIB	Kuning Bening	(8:2)
6	11:39 WIB	Kuning Bening	(8:2)
7	11:30 WIB	Bening	(8:2)
8	11:34 WIB	Bening	(8:2)
9	11:36 WIB	Bening	(8:2)
10	11:37 WIB	Bening	(8:2)
11	11:40 WIB	Bening	(8:2)
12	11:42 WIB	Hijau Bening	(8:2)
13	11:44 WIB	Hijau Bening	(8:2)
14	11:46 WIB	Bening	(8:2)
15	11:49 WIB	Bening	(8:2)
16	11:51 WIB	Bening	(8:2)
17	11:55 WIB	Bening	(8:2)
18	11:58 WIB	Bening	(8:2)
19	12:00 WIB	Bening	(8:2)
20	12:01 WIB	Bening	(8:2)
21	12:03 WIB	Hijau Bening	(8:2)
22	12:06 WIB	Hijau Bening	(8:2)
23	12:10 WIB	Hijau Bening	7:3 N-Heksan : Ethyl Asetat
24	12:12 WIB	Hijau Bening	(7:3)
25	12:05 WIB	Hijau Bening	(7:3)
26	12:18 WIB	Hijau Bening	(7:3)
27	12:21 WIB	Hijau Bening	(7:3)
28	12:26 WIB	Hijau Pekat (Klorofil b)	(7:3)
29	12:27 WIB	Hijau Pekat (Klorofil b)	(7:3)
30	12:29 WIB	Hijau Pekat (Klorofil b)	(7:3)
31	12:30 WIB	Hijau Pekat (Klorofil b)	(7:3)
32	12:32 WIB	Hijau Pekat (Klorofil b)	(7:3)
33	12:35 WIB	Hijau Pekat (Klorofil b)	(7:3)
34	12:36 WIB	Hijau Pekat (Klorofil b)	(7:3)
35	12:38 WIB	Hijau Pekat (Klorofil b)	(7:3)
36	12:41 WIB	Bening	(7:3)
37	12:43 WIB	Bening	(7:3)
38	12:45 WIB	Bening	(7:3)
39	12:47 WIB	Bening	(7:3)
40	12:49 WIB	Bening	(7:3)
41	12:51 WIB	Bening	(7:3)
42	12:53 WIB	Bening	(7:3)
43	12:55 WIB	Bening	(7:3)
44	12:57 WIB	Bening	(7:3)

45	12:59 WIB	Biru Bening	6:4 N-Heksan : Ethyl Asetat
46	13:02 WIB	Biru Bening	(6:4)
47	13:04 WIB	Biru Bening	(6:4)
48	13:07 WIB	Biru Bening	(6:4)
49	13:09 WIB	Biru Bening	(6:4)
50	13:13 WIB	Biru Bening	(6:4)
51	13:15 WIB	Biru Bening	(6:4)
52	13:19 WIB	Biru Bening	(6:4)
53	13:21 WIB	Biru Bening	(6:4)
54	13:23 WIB	Biru Pekat (kloroil a)	(6:4)
55	13:26 WIB	Biru Pekat (kloroil a)	(6:4)
56	13:29 WIB	Biru Pekat (kloroil a)	(6:4)
57	13:31 WIB	Biru Pekat (kloroil a)	(6:4)
58	13:34 WIB	Biru Pekat (kloroil a)	(6:4)
59	13:38 WIB	Biru Pekat (kloroil a)	(6:4)
60	13:40 WIB	Biru Pekat (kloroil a)	(6:4)
61	13:42 WIB	Biru Bening	(6:4)
62	13:45 WIB	Biru Bening	(6:4)
63	13:47 WIB	Biru Bening	(6:4)
64	13:50 WIB	Bening	(6:4)
65	13:52 WIB	Bening	(6:4)
66	13:54 WIB	Bening	5:5 N-Heksan : Ethyl Asetat
67	13:57 WIB	Bening	(5:5)
68	14:01 WIB	Orange Bening	(5:5)
69	14:05 WIB	Orange Bening	(5:5)
70	14:08 WIB	Orange Bening	(5:5)
71	14:10 WIB	Orange Bening	(5:5)
72	14:13 WIB	Orange Bening	(5:5)
73	14:16 WIB	Orange pekat (fuko)	(5:5)
74	14:18 WIB	Orange pekat (fuko)	(5:5)
75	14:21 WIB	Orange pekat (fuko)	(5:5)
76	14:24 WIB	Orange pekat (fuko)	(5:5)
77	14:28 WIB	Orange pekat (fuko)	(5:5)
78	14:31 WIB	Orange pekat (fuko)	(5:5)
79	14:34 WIB	Orange pekat (fuko)	(5:5)
80	14:35 WIB	Orange pekat (fuko)	(5:5)
81	14:38 WIB	Orange pekat (fuko)	(5:5)
82	14:40 WIB	Kuning Bening	(5:5)
83	14:43 WIB	Kuning Bening	(5:5)
84	14:45 WIB	Kuning Bening	(5:5)
85	14:48 WIB	Bening	(5:5)
86	14:50 WIB	Bening	(5:5)
87	14:54 WIB	Bening	(5:5)

Lampiran 10. Perhitungan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Pigmen Rumput Laut *Padina australis*

➤ Rumus Perhitungan Rf (Reterdation Factor)

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik asal}}$$

- Rf β -Karoten

$$\text{Rf} = \frac{3,5 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$$

$$= 1,0$$

$$\text{Rf} = \frac{3,4 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$$

$$= 0,97$$

$$\text{Rf} = \frac{3,7 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$$

$$= 1,05$$

- Rf Klorofil a

$$\text{Rf} = \frac{2,1 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$$

$$= 0,6$$

$$\text{Rf} = \frac{2 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$$

$$= 0,57$$

$$\text{Rf} = \frac{2,2 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$$

- Rf Klorofil b

$$\text{Rf} = \frac{1,7 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$$

$$= 0,48$$

$$\text{Rf} = \frac{1,8 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$$

$$= 0,51$$

$$\text{Rf} = \frac{1,9 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$$

$$= 0,54$$

- Rf Fukosantin

$$\text{Rf} = \frac{0,92 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$$

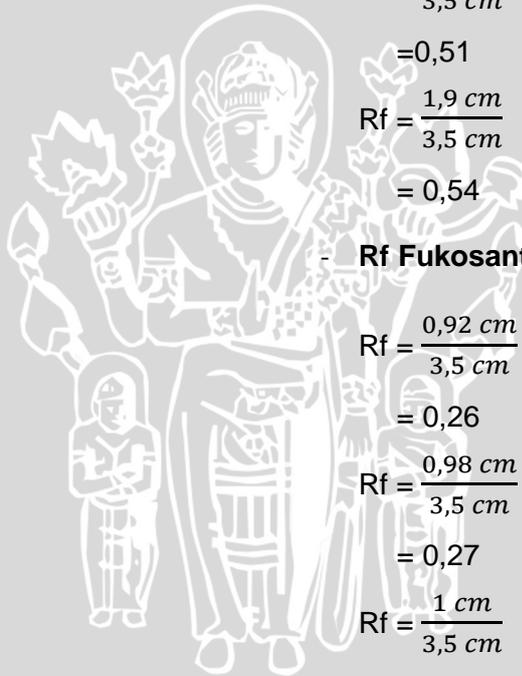
$$= 0,26$$

$$\text{Rf} = \frac{0,98 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$$

$$= 0,27$$

$$\text{Rf} = \frac{1 \text{ cm}}{3,5 \text{ cm}}$$

$$= 0,28$$



Lampiran 11. Perhitungan Rendemen

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat akhir}}{3,5 \text{ cm}} \times 100\%$$

- B- Karoten

Ulangan 1

$$= \frac{0,002145}{100 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 0,002145 \%$$

Ulangan 2

$$= \frac{0,001893}{100 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 0,001893 \%$$

Ulangan 3

$$= \frac{0,002139}{100 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 0,002139 \%$$

- Klorofil a

Ulangan 1

$$= \frac{0,001746}{100 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 0,001746 \%$$

Ulangan 2

$$= \frac{0,002039}{100 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 0,002039 \%$$

Ulangan 3

$$= \frac{0,001884}{100 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 0,001884 \%$$

- Klorofil b

Ulangan 1

$$= \frac{0,002015}{100 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 0,002015 \%$$

Ulangan 2

$$= \frac{0,001996}{100 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 0,001996 \%$$

Ulangan 3

$$= \frac{0,002119}{100 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 0,002119 \%$$

- Fukosantin

Ulangan 1

$$= \frac{0,001955}{100 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 0,001955 \%$$

Ulangan 2

$$= \frac{0,001898}{100 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 0,001898 \%$$

Ulangan 3

$$= \frac{0,001934}{100 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 0,001934 \%$$

Lampiran 12. Data Absorbansi, Kadar Pigmen dan Rendemen *Padina australis*

➤ Data Absorbansi

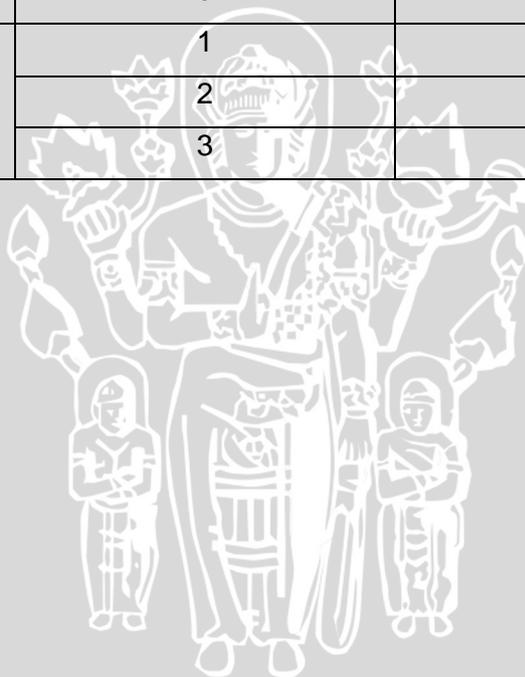
Jenis Pigmen	Ulangan	Panjang Gelombang	Absorbansi	Pengenceran
β-Karoten	1	475,00	0,457	10 ⁻⁴
	2	470,50	0,456	10 ⁻⁴
	3	450,50	0,534	10 ⁻⁴
Klorofil a	1	662,00	0,398	10 ⁻⁴
	2	425,00	0,422	10 ⁻⁴
	3	412,50	0,300	10 ⁻⁴
Klorofil b	1	499,00	0,416	10 ⁻⁴
	2	669,00	0,223	10 ⁻⁴
	3	401,00	0,463	10 ⁻⁴
Fukosantin	1	345,00	0,176	10 ⁻⁴
	2	661,50	0,128	10 ⁻⁴
	3	439,00	0,657	10 ⁻⁴

➤ Data Rendemen

Jenis Pigmen	Ulangan	Sampel (gr)	Rendemen (%)	Standart deviasi Nilai Rendemen
β-Karoten	1	100 gr	0,081	0,037 % ± 0,001413
	2	100 gr	0,018	
	3	100 gr	0,014	
Klorofil a	1	100 gr	0,238	0,267 % ± 0,000733
	2	100 gr	0,274	
	3	100 gr	0,291	
Klorofil b	1	100 gr	0,047	0,205 % ± 0,0405
	2	100 gr	0,016	
	3	100 gr	0,348	
Fukosantin	1	100 gr	0,106	0,425 % ± 0,26092
	2	100 gr	0,773	
	3	100 gr	0,397	

➤ Data Kadar Pigmen

Jenis Pigmen	Ulangan	Kadar Pigmen
β-Karoten	1	0,081 gram
	2	0,018 gram
	3	0,014 gram
Klorofil a	1	0,238 gram
	2	0,274 gram
	3	0,291 gram
Klorofil b	1	0,047 gram
	2	0,016 gram
	3	0,348 gram
Fukosantin	1	0,106 gram
	2	0,773 gram
	3	0,397 gram



Lampiran 13. Perhitungan Kadar Pigmen

Hukum *Lambert-Beer*, yaitu:

$$A = \epsilon bc$$

Keterangan:

A = Absorbansi

ϵ = Absorptifitas molar (*Molar Extention Coefficient*)

b = Lebar bagian dalam cuvet

c = Konsentrasi (molar)

- β -karoten

Ulangan 1

$$A = \epsilon bc$$

$$0,457 = 134 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,457}{134 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 3,410 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari Massa:

$$\text{Mol} = \frac{\text{gr}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{V (\text{ml})}$$

$$3,410 \times 10^{-6} = \frac{X}{536,87} \times \frac{1000}{10000}$$

$$3,410 \times 10^{-6} = \frac{X}{5368,7}$$

$$X = 5368,7 \times 3,410 \times 10^{-6}$$

$$X = 0,081 \text{ gr}$$

Ulangan 2

$$A = \epsilon bc$$

$$0,456 = 134 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,456}{134 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 3,402 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari Massa:

$$\text{Mol} = \frac{\text{gr}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{V (\text{ml})}$$

$$3,402 \times 10^{-6} = \frac{X}{536,87} \times \frac{1000}{10000}$$

$$3,402 \times 10^{-6} = \frac{X}{5368,7}$$

$$X = 5368,7 \times 3,402 \times 10^{-6}$$

$$X = 0,018 \text{ gr}$$

Ulangan 3

$$A = \epsilon bc$$

$$0,534 = 134 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,534}{134 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 2,641 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari Massa:

$$\text{Mol} = \frac{\text{gr}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{V (\text{ml})}$$

$$2,641 \times 10^{-6} = \frac{X}{536,87} \times \frac{1000}{10000}$$

$$2,641 \times 10^{-6} = \frac{X}{5368,7}$$

$$X = 5368,7 \times 2,641 \times 10^{-6}$$

$$X = 0,014 \text{ gr}$$

• **Klorofil a**

Ulangan 1

$$A = \epsilon bc$$

$$0,398 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,398}{78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 0,054 \times 10^{-5} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Ulangan 2

$$A = \epsilon bc$$

$$0,422 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,422}{78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 5,358 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari Massa:

$$\text{Mol} = \frac{\text{gr}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{V (\text{ml})}$$

$$0,054 \times 10^{-5} = \frac{X}{893,5} \times \frac{1000}{10000}$$

$$0,054 \times 10^{-5} = \frac{X}{8935}$$

$$X = 8935 \times 0,054 \times 10^{-5}$$

$$X = 0,005 \text{ gram}$$

Mencari Massa:

$$\text{Mol} = \frac{\text{gr}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{V (\text{ml})}$$

$$5,358 \times 10^{-6} = \frac{X}{893,5} \times \frac{1000}{10000}$$

$$5,358 \times 10^{-6} = \frac{X}{8935}$$

$$X = 8935 \times 5,358 \times 10^{-6}$$

$$X = 0,048 \text{ gram}$$



Ulangan 3

$$A = \epsilon bc$$

$$0,300 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,300}{78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 3,81 \times 10^{-5} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari Massa:

$$\text{Mol} = \frac{\text{gr}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{V (\text{ml})}$$

$$3,264 \times 10^{-5} = \frac{X}{893,5} \times \frac{1000}{10000}$$

$$3,264 \times 10^{-5} = \frac{X}{8935}$$

$$X = 8935 \times 3,264 \times 10^{-5}$$

$$X = 0,291 \text{ gr}$$

- Klorofil b**

Ulangan 1

$$A = \epsilon bc$$

$$0,416 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,416}{78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 5,282 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Ulangan 2

$$A = \epsilon bc$$

$$0,223 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$c = \frac{0,223}{78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$c = 2,832 \times 10^{-5} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari Massa:

$$\text{Mol} = \frac{\text{gr}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{V (\text{ml})}$$

$$5,282 \times 10^{-6} = \frac{X}{893,5} \times \frac{1000}{10000}$$

$$5,282 \times 10^{-6} = \frac{X}{8935}$$

$$X = 8935 \times 5,282 \times 10^{-6}$$

$$X = 0,047 \text{ gr}$$

Mencari Massa:

$$\text{Mol} = \frac{\text{gr}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{V (\text{ml})}$$

$$2,832 \times 10^{-5} = \frac{X}{893,5} \times \frac{1000}{10000}$$

$$2,832 \times 10^{-5} = \frac{X}{8935}$$

$$X = 8935 \times 2,832 \times 10^{-6}$$

$$X = 0,253 \text{ gr}$$

Ulangan 3

$$A = \epsilon bc$$

$$0,463 = 78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$C = \frac{0,463}{78,75 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$C = 5,879 \times 10^{-6} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari Massa:

$$\text{Mol} = \frac{\text{gr}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{V (\text{ml})}$$

$$5,879 \times 10^{-6} = \frac{X}{893,5} \times \frac{1000}{10000}$$

$$5,879 \times 10^{-6} = \frac{X}{8935}$$

$$X = 8935 \times 5,879 \times 10^{-6}$$

$$X = 0,052 \text{ gr}$$

• Fukosantin

Ulangan 1

$$A = \epsilon bc$$

$$0,176 = 109 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$C = \frac{0,176}{109 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$C = 161,4 \times 10^{-5} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Ulangan 2

$$A = \epsilon bc$$

$$0,128 = 109 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm} \times c$$

$$C = \frac{0,128}{109 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$C = 117,4 \times 10^{-5} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari massa:

$$\text{Mol} = \frac{\text{gr}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{V (\text{ml})}$$

$$161,4 \times 10^{-5} = \frac{X}{658,92} \times \frac{1000}{10000}$$

$$161,4 \times 10^{-5} = \frac{X}{6589,2}$$

$$X = 6589,2 \times 161,4 \times 10^{-5}$$

$$X = 0,106 \text{ gram}$$

Mencari massa:

$$\text{Mol} = \frac{\text{gr}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{V (\text{ml})}$$

$$117,4 \times 10^{-5} = \frac{X}{658,92} \times \frac{1000}{10000}$$

$$117,4 \times 10^{-5} = \frac{X}{6589,2}$$

$$X = 6589,2 \times 117,4 \times 10^{-5}$$

$$X = 0,773 \text{ gram}$$



Ulangan 3

$$A = \epsilon bc$$

$$0,657 \text{ cm} \times c = 109 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \times 1$$

$$C = \frac{0,657}{109 \times 10^3 (1 \text{ mol}^{-1})}$$

$$C = 602,7 \times 10^{-5} (1 \text{ mol}^{-1})$$

Mencari massa:

$$\text{Mol} = \frac{\text{gr}}{\text{Mr}} \times \frac{1000}{V \text{ (ml)}}$$

$$602,7 \times 10^{-5} = \frac{X}{658,92} \times \frac{1000}{10000}$$

$$602,7 \times 10^{-5} = \frac{X}{6589,2}$$

$$X = 6589,2 \times 602,7 \times 10^{-5}$$

$$X = 0,397 \text{ gram}$$

Lampiran 14. Perhitungan Kadar Rendemen Pigmen

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

➤ **B-karoten**

Ulangan 1

$$\frac{0,081}{100 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$= 0,081 \%$$

Ulangan 2

$$\frac{0,018}{100 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$= 0,018 \%$$

Ulangan 3

$$\frac{0,014}{100 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$\text{Rata-rata Rendemen } (\bar{x}) = \frac{0,081 + 0,018 + 0,014}{3}$$

$$= 0,037 \%$$

Standar Deviasi

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

$$= \frac{(0,081 - 0,037)^2 + (0,018 - 0,037)^2 + (0,014 - 0,037)^2}{3-1}$$

$$S = \frac{1,93 \times 10^{-3} + 3,61 \times 10^{-4} + 5,29 \times 10^{-4}}{2}$$



$$S = 0,001413$$

$$\text{Nilai rendemen } \beta\text{-karoten} = 0,037 \% \pm 0,001413$$

➤ **Klorofil a**

Ulangan 1

$$\frac{0,005}{100 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$= 0,005\%$$

Ulangan 2

$$\frac{0,048}{100 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$= 0,048 \%$$

Ulangan 3

$$\frac{0,291}{100 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$= 0,291 \%$$

$$\text{Rata-rata Rendemen } (\bar{x}) = \frac{0,005 + 0,048 + 0,291}{3}$$

$$= 0,114 \%$$

Standar Deviasi

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

$$= \frac{(0,005 - 0,114)^2 + (0,048 - 0,114)^2 + (0,291 - 0,114)^2}{3-1}$$

$$S = \frac{1,18 \times 10^{-2} + 4,35 \times 10^{-3} + 3,13 \times 10^{-2}}{2}$$

$$= 0,026825$$

$$\text{Nilai rendemen Klorofil a} = 0,114 \% \pm 0,026825$$

➤ **Klorofil b**

Ulangan 1

$$\frac{0,047}{100 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$= 0,047 \%$$

Ulangan 2

$$\frac{0,253}{100 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$= 0,253 \%$$

Ulangan 3

$$\frac{0,052}{100 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$= 0,052 \%$$

$$\text{Rata-rata Rendemen } (\bar{x}) = \frac{0,047 + 0,253 + 0,052}{3}$$

$$= 0,117 \%$$

Standar Deviasi

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

$$= \frac{(0,047 - 0,117)^2 + (0,253 - 0,117)^2 + (0,052 - 0,117)^2}{3-1}$$

$$S = \frac{4,9 \times 10^{-3} + 1,84 \times 10^{-2} + 4,22 \times 10^{-2}}{2}$$

$$= 0,03275$$

Nilai rendemen Klorofil a = 0,117 % ± 0,03275

➤ Fukosantin**Ulangan 1**

$$\frac{0,106}{100 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$= 0,106 \%$$

Ulangan 2

$$\frac{0,773}{100 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$= 0,773 \%$$

Ulangan 3

$$\frac{0,397}{100 \text{ gram}} \times 100\%$$

$$\text{Rata-rata Rendemen } (\bar{x}) = \frac{0,106 + 0,773 + 0,397}{3}$$

$$= 0,425 \%$$

Standar Deviasi

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

$$= \frac{(0,106 - 0,425)^2 + (0,773 - 0,425)^2 + (0,397 - 0,425)^2}{3-1}$$

$$S = \frac{3,93 \times 10^{-1} + 1,21 \times 10^{-1} + 7,84 \times 10^{-3}}{2}$$

$$= 0,26092$$

Nilai rendemen Fukosantin = 0,425 % ± 0,2609

