

repository.ub.ac.id

**Isolasi Karotenoid Dari *Dunaliella salina* Dan Reduksi  
Grafena Oksida Menggunakan  $\beta$  – karotena**

**SKRIPSI**

oleh:

**TRI VANY LESTARY DEWY**

**145090207111026**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**

repository.ub.ac.id

**Isolasi Karotenoid Dari *Dunaliella salina* Dan Reduksi  
Grafena Oksida Menggunakan  $\beta$  – karotena**

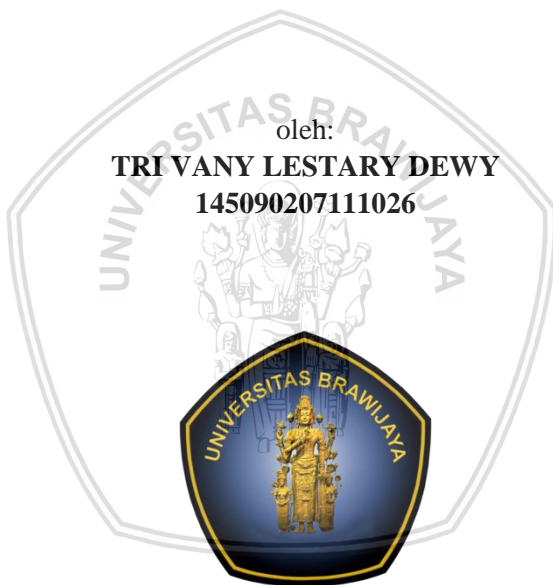
**SKRIPSI**

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang kimia

oleh:

**TRI VANY LESTARY DEWY**

**145090207111026**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2018**



## Isolasi Karotenoid Dari *Dunaliella salina* Dan Reduksi Grafena Oksida Menggunakan $\beta$ – karotena

### ABSTRAK

Isolasi karotena pada mikroalga *Dunaliella salina* dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut campuran heksana:aseton:etanol dengan rasio 2:1:1 (v/v/v) selama 8 jam.  $\beta$ -karotena digunakan sebagai reduktor alami dalam reaksi reduksi grafena oksida menjadi grafena. Pembuatan grafena oksida dilakukan melalui reaksi oksidasi grafit menjadi grafit oksida, dilanjutkan dengan ultrasonikasi pada variasi waktu 30, 60, 90 dan 120 menit menjadi grafena oksida. Selanjutnya dilakukan reaksi reduksi dengan variasi waktu 4 dan 24 jam dengan refluks untuk mengeliminasi atom oksigen dalam gugus epoksi dan karbonil menghasilkan ikatan rangkap C=C. Isolasi mikroalga *Dunaliella salina* menghasilkan padatan karotenoid berwarna kuning dengan rendemen 2,1 %. Analisis HPLC menunjukkan karotenoid yang dihasilkan mengandung senyawa *13-cis- $\beta$ -karotena* dengan kadar sebesar 0,0011%. Hasil reduksi grafena oksida (rGO) menggunakan  $\beta$ -karotena berupa padatan berwarna hitam. Pada variasi waktu reduksi selama 4 jam dihasilkan rGO sebanyak 0,0026 g. Dengan memperpanjang waktu reaksi selama 24 jam meningkatkan massa rGO menjadi 0,005 g.

*Kata kunci:*  $\beta$ -karotena, karotenoid, grafit, grafena oksida, grafen

## Carotenoid Isolation of *Dunaliella salina* and Graphene Oxide Reduction using $\beta$ -Carotene

### ABSTRACT

Carotene isolation of microalga *Dunaliella salina* with maceration was carried out using mixed solvent of hexane:acetone:ethanol in 2:2:2 (v/v/v) for 8 hours.  $\beta$ -Carotene is used as natural reductor for the reduction of graphene oxide into graphene. Graphene oxide was prepared by oxidation of graphite followed by sonication with variation time in 30, 60, 90, and 120 minutes. Reduction reaction is performed at 4 and 24 hours using reflux to eliminate oxygen group clusters, such as epoxy and carbonyl gave C=C bond skeleton. Isolation of *Dunaliella salina* gave yellow solid of carotenoid in 2,1 % yield. The HPLC analysis showed that the obtain carotenoid consist of 13-cis- $\beta$ -carotene in 0.0011% purity. Reduced graphene oxide (rGO) using  $\beta$ -carotene obtain as black solid. The reduction for 4 hours gave rGO in 0.0026 g, whereas prolonged the reduction into 24 hours increased the product into 0.005 g.

*Key word:*  $\beta$ -carotene, carotenoid, graphite, graphene oxide, graphene

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas limpahan kasih sayang, petunjuk serta perlindungan-Nya sehingga skripsi dengan judul “Isolasi Karotenoid dari *Dunaliella salina* dan Reduksi Grafena Oksida menggunakan  $\beta$ -karotena” dapat terselesaikan dengan baik dan lancar. Sholawat serta salam tetap tercurahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat mendapatkan gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan, bantuan, serta dukungan oleh berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Orang tua penulis, Riyanto dan Kodriyah serta adik penulis, Sandy atas doa, cinta, kasih sayang, perhatian, dukungan, motivasi, ilmu dan pelajaran hidup yang telah diberikan tiada henti.
2. Siti Mariyah Ulfa, S.Si., M.Sc., Dr. Sc selaku dosen pembimbing I, serta Andi Kurniawan, S.Pi., M.Eng., D.Sc selaku dosen pembimbing II atas semua saran, waktu, bimbingan, ilmu, doa dan motivasi selama penyusunan proposal penelitian, pelaksanaan penelitian, hingga penulisan skripsi.
3. Dr. Elvina Dhaiaul Iftitah, S.Si., M.Si., selaku dosen penasehat akademik atas segala bimbingan, saran, perhatian, ilmu, doa dan motivasi kepada penulis selama masa studi.
4. Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D selaku Ketua Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Brawijaya, serta staf pengajar dan seluruh karyawan atas ilmu, fasilitas dan bantuan yang telah diberikan kepada penulis selama studi.
5. Sahabat-sahabat tercinta, Nadia Irma Firdausi, Indriani Dwi Rahayu, Domas Indri Lestari, Nadiyah Zuhroh, Ayu Mastura, Nabila atas dukungan, doa, semangat dan selalu ada ketika penulis dalam fasa jatuh bangun.
6. Sahabat-sahabat dan kakak-kakak tercinta bimbingan bu Siti Mariyah Ulfa, Indah N.P., S.Si., M.Sc, Khusnul Khotimah, Sri Wahyuni, Yuni Nanda, Rizki Imani, Tia Aulia, atas

- dukungan semangat, ilmu, kebersamaan, dan kekeluargaan selama penelitian.
7. Sahabat-sahabat anorganik seperjuangan Vivi kartika, tomi setiawan, Teguh andi, Cinta Nur Ihya, Nabila, Ayu Mastura atas dukungan semangat, ilmu, kebersamaan, kekeluargaan sebelum, selama dan setelah penelitian.
  8. Teman-teman Kimia angkatan 2014, atas pengalaman tentang semangat berjuang, kebersamaan dan pelajaran yang akan selalu menjadi cerita tak terlupakan selama masa kuliah penulis.
  9. Semua pihak-pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini yang tidak dapat saya tuliskan satu persatu. Terima kasih atas bantuan, saran dan dukungan yang telah diberikan.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dan keterbatasan dari penulisan dalam penyusunan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kemajuan ilmu dan teknologi, khususnya bagi pihak yang membacanya. Akhir kata, penulis menerima segala kritik dan saran yang dapat membangun untuk kemajuan penulis dalam berinovasi kedepannya.

Malang, Juli 2018

Penulis

# LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Tri Vany Lestary Dewy

NIM : 145090207111026

Jurusan : Kimia

Penulis skripsi berjudul:

**Isolasi Karotenoid dari *Dunaliella salina* dan Reduksi Grafena Oksida menggunakan  $\beta$ -karotena**

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam tugas akhir ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata tugas akhir yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 10 Juli 2018

Yang menyatakan,



(Tri Vany Lestary Dewy)

NIM. 145090207111026

# LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

## Isolasi Karotenoid Dari *Dunaliella salina* Dan Reduksi Grafena Oksida Menggunakan $\beta$ - karotena

oleh:

**TRI VANY LESTARY DEWY**

**145090207111026**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal ..... 16 JUL 2018.....  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I

Pembimbing II



Siti Mariyah Ulfa, S.Si, M.Sc, Dr.Sc  
NIP. 198104062005022009



Andi Kurniawan, S.Pi., M.Eng., D.Sc  
NIP. 197903312005011003

Mengetahui

Ketua Jurusan Kimia  
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya



Masruri, S.Si., M.Si., Ph.D  
NIP. 197310202002121001



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

$\beta$ -Karatena adalah produk alami yang memiliki struktur rantai jenuh hidrokarbon dengan dua kelompok retinil.  $\beta$ -Karatena dapat dimanfaatkan sebagai provitamin A dalam bentuk retinaldehid yang diperoleh melalui reaksi deoksigenasi yang di dalam tubuh.

Salah satu sumber penghasil  $\beta$ -karotena yaitu mikroalga hijau *Dunaliella salina*. *Dunaliella salina* dapat mengakumulasi sejumlah besar  $\beta$ -karotena, sehingga sel akan cenderung berwarna merah jingga saat terkena kondisi stress seperti intensitas cahaya tinggi atau kekurangan nutrisi. *Dunaliella salina* dapat menghasilkan dua stereoisomer  $\beta$ -karotena, yaitu *all trans*- dan 9-*cis*- $\beta$ -caroten yang terakumulasi hingga mencapai 10% dari berat kering sel [1].

Isolasi  $\beta$ -karotena sudah banyak dilakukan dengan berbagai metode seperti *maserasi* [2], *ultrasonikasi* [3], *sentrifugasi* [4,8], *PFE (Pressurized Fluid Extraction)* [5], dan *PLE (Pressurized Liquid Extraction)* [6] dengan pelarut seperti *acetone* [3,5], etanol [6,7], n-heksana [2-4,6] dan petroleum eter [6,8]. Isolasi yang dilakukan bertujuan untuk menghindari pemanasan agar struktur  $\beta$ -karotena tidak terdekomposisi dan tidak terjadi perubahan isomer.

Penelitian Zaid *et al* pada tahun 2015 [7] mencoba menggunakan *trans*  $\beta$ -karotena sebagai reduktor alami untuk sintesis grafena. Grafena merupakan atom karbon monolayer yang memiliki struktur lapisan atom karbon dengan hibridisasi  $sp^2$  yang disusun membentuk kisi segi enam dua dimensi (sarang lebah). Grafena disebut material paling tipis dengan jarak antar layer 0,33 nm dan panjang ikatan karbon-karbonnya 0,142 nm. Grafena merupakan material yang lebih kuat dibanding kristal [9]

Salah satu aplikasi grafena adalah dapat mendeteksi cahaya dengan sangat baik pada gelombang infra merah, dikarenakan mobilitasnya tinggi dan secara alami tidak memiliki gap sehingga cepat merespon optoelektronik dan deteksi. Struktur yang terdiri dari lapisan-lapisan membuat grafena sangat konduktif dengan mobilitas pembawa muatan hingga  $200.000 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$  dan konduktivitas termal hingga  $5.300 \text{ Wm}^{-1}\text{K}^{-1}$  [9,18]

Grafena dapat disintesis menggunakan grafit melalui proses oksidasi menjadi grafit oksida, kemudian lembaran-lembaran grafit

oksida tersebut dikelupas (*exfoliated*) dalam air dibawah gelombang ultrasonik membentuk grafena oksida. Konsentrasi oksigen dalam grafena oksida dapat direduksi hingga meninggalkan lapisan tunggal grafena [10].

Metode sintesis grafena telah banyak dilakukan, tetapi masih banyak kekurangan antara lain pada metode Brodie dihasilkan gas  $\text{ClO}_2$  yang dapat meledak pada suhu  $45^\circ\text{C}$ . Metode Standenmaier, membutuhkan waktu yang lama dan proses yang berbahaya [11]. Pada penelitian Hummer tahun 1958 dalam jurnal penelitian Li pada tahun 2014 [12], metode Hummer adalah metode yang lebih ramah tanpa menghasilkan gas beracun  $\text{ClO}_2$  saat reaksi oksidasi. Selain itu, proses oksidasi dapat berlangsung lebih cepat dengan suhu yang lebih rendah. Produk akhir grafena oksida dari metode Hummer memiliki tingkat oksidasi (rasio C/O) yang lebih tinggi [11,12].

Tahap selanjutnya adalah reduksi grafena oksida (GO) yang mengandung gugus epoksi, karboksil dan hidroksil. Pada kondisi konvensional senyawa ini direduksi menggunakan pelarut hidrazin atau natrium borohidrat. Gugus nukleofil nitrogen akan menyerang cincin epoksi melalui reaksi substitusi nukleofilik (reaksi  $\text{S}_\text{N}^2$ ) sehingga dihasilkan senyawa hidroksil yang kemudian dilepaskan dalam bentuk molekul air menghasilkan  $\text{C}=\text{C}$  ikatan rangkap [13,14]. Senyawa hidrazin sangat beracun dan berpotensi menimbulkan ledakan. Selain itu, senyawa hidrazin dilaporkan hanya mampu mereduksi gugus epoksida. Reduktor lainnya (natrium borohidrat) hanya mampu mereduksi gugus karboksil [13].

Perkembangan yang baru-baru ini dilakukan yaitu reduksi grafena oksida menggunakan senyawa bahan alam. Salah satunya  $\beta$ -karotena, pada penelitian Zaid *et al* pada tahun 2015 [17] digunakan *trans*  $\beta$ -karotena yang dilaporkan mampu menyerang cincin epoksida sekaligus gugus hidroksil. Selain itu, Emiru and Delele (2016) [15] melaporkan penggunaan asam askorbat melalui proses deoksigenasi dengan mekanisme yang mirip dengan penggunaan hidrazin. Asam askorbat mengandung gugus hidroksil yang merupakan nukleofil kuat sehingga mampu membuka cincin epoksi menjadi alkena [16].

Berdasarkan uraian yang telah dijabarkan, maka pada penelitian ini akan dilakukan sintesis grafena melalui metode Hummer dengan menggunakan agen pereduksi  $\beta$ -karotena. Selain itu juga dilakukan ekstraksi senyawa karotenoid dari mikroalga *Dunaliella salina*.

## 1.2 Perumusan Masalah

1. Berapa kadar senyawa  $\beta$ -karotena dalam karotenoid hasil isolasi dari mikroalga *Dunaliella salina*?
2. Berapa massa hasil reduksi grafena oksida menggunakan reduktor  $\beta$ -karotena dengan variasi waktu reduksi 4 dan 24 jam?
3. Bagaimana karakter grafena oksida tereduksi yang dihasilkan?

## 1.3 Batasan Masalah

1.  $\beta$ -Karotena diisolasi dari mikroalga *Dunaliella salina* menggunakan metode maserasi.
2. Sintesis grafena oksida dilakukan dengan metode Hummer.

## 1.4 Tujuan penelitian

1. Mengetahui kadar senyawa  $\beta$ -karotena dalam karotenoid hasil isolasi dari mikroalga *Dunaliella salina*.
2. Mengetahui massa grafena oksida tereduksi yang dihasilkan dengan variasi waktu reduksi.
3. Mengetahui karakter grafena oksida tereduksi.

## 1.5 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai pemanfaatan  $\beta$ -karotena sebagai reduktor alami dalam sintesis grafena.



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Grafena

Grafena adalah material dua dimensi yang terdiri dari satu lapis atom karbon yang tersusun seperti struktur kisi sarang lebah. Panjang ikatan karbon-karbon dalam grafena sekitar 0,142 nm, dan jarak antar lapisan grafena sekitar 0,33 nm. Struktur sarang lebah merupakan dasar alotrop karbon lainnya seperti bentuk tiga dimensi sarang lebah disebut grafit, bentuk dua dimensi disebut grafena, struktur sarang lebah yang digulung membentuk 0 dimensi disebut Fluorene, struktur sarang lebah digulung membentuk 1 dimensi material disebut carbon nanotube (CNT) [9].

Grafena memiliki dua struktur planar yaitu hexagonal dan rhomboidal, struktur hexagonal lebih stabil dimana susunannya dapat membentuk *monolayer*, *bilayer*, dan beberapa lapisan (terdiri dari 3 hingga <10 lapisan). Pada lapisan bilayer, memungkinkan adanya ikatan kovalen diluar bidang yang berinteraksi dengan lapisan yang lain sedangkan pada lapisan *monolayer* tidak terdapat ikatan kovalen hanya ikatan sigma antar atom karbon. Pada struktur *single layer* dan *bilayer* grafena tidak memiliki *bandgap* dan memiliki satu tipe elektron dan *hole* yang termasuk pada struktur hexagonal. Sedangkan pada struktur beberapa lapisan memiliki *bandgap* karena terdapat *overlap* pada ikatan valensi dan beberapa muatan elektron muncul termasuk dalam struktur rhomboidal [18],

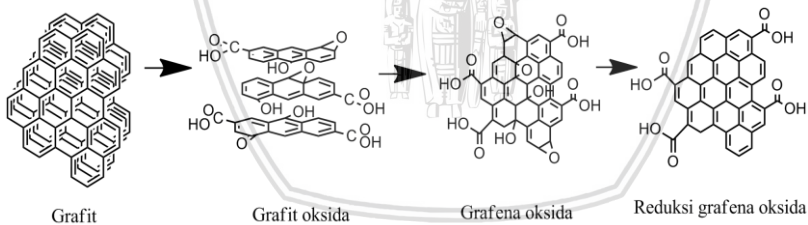
Grafena memiliki sifat kelistrikan, termal, dan mekanik yang luar biasa. Struktur unik dari grafena memberikan peningkatan sifat yang dimiliki, misalnya mobilitas pembawa tinggi ( $\sim 10.000 \text{ cm}^2/\text{V s}$ ), efek Quantum Hall pada temperatur ruangan, transparansi optik yang baik 97.7%, dan luas permukaan spesifik ( $2630 \text{ m}^2/\text{g}$ ). Lapisan grafena memiliki fleksibilitas yang tinggi, dapat ditarik seperti balon bahkan dengan tekanan dan perbedaan atmosfer. Grafena merupakan bahan yang sangat ringan, beratnya hanya sekitar  $0,77 \text{ mg}/\text{m}^2$ , memiliki modulus young ( $1.1 \text{ Tpa}$ ) yang tinggi, dan konduktivitas panas yang tinggi (pada  $27^\circ\text{C}$ )  $\approx 5000 \text{ W}/\text{mK}^{-1}$  hal ini dikarenakan kuatnya ikatan antar karbon-karbon sehingga sangat baik dijadikan konduktor panas [9].

Grafena oksida (GO) mengandung unsur karbon (C), oksigen (O), Sulfur (S) dan kalium (K). Setelah GO dipurifikasi, kadar K

hilang dan kandungan karbon dan oksigennya meningkat. Pada penelitian Syakir, Norman *et al* pada tahun 2015 [10] perbandingan C/O untuk sampel yang belum dipurifikasi adalah 1,5 dan setelah dipurifikasi perbandingan C/O <2,1. Setelah dipurifikasi sisa garam bisa dihilangkan sehingga perbandingan C/O >2,1 yang menunjukkan proses keberhasilan proses oksidasi. Pada penelitian Staudenmaier tahun 1898 dalam jurnal penelitian Li pada tahun 2014 [12] pada metode Briodie didapat rasio oksidasi C/H/O yaitu 2,19/1,00/0,80, sedangkan pada metode Hummer didapat rasio oksidasi yang lebih tinggi yaitu 4.0/3.1.

## 2.2 Sintesis Grafena

Sintesis kimia untuk menghasilkan grafena dimulai dengan oksidasi grafit, diikuti dengan pengelupasan untuk menghasilkan grafena oksida biasanya pengelupasan “kulit” dilakukan dalam pelarut yang sesuai (biasanya air, tetapi juga beberapa pelarut organik polar) dikarenakan terdapat gugus karboksil dan karbonil yang berada di ujung, kemudian grafena oksida di reduksi dengan menggunakan hidrazin, tetapi senyawa ini tidak ramah lingkungan karena sangat beracun dan berpotensi meledak [10,13]



**Gambar 2.1** Skema reduksi grafena oksida [19]

Berbagai cara dikembangkan untuk memperoleh GO, Brodie mengoksidasi grafit dengan menambahkan asam belerang dalam campuran grafit dengan  $KClO_3$ , tetapi reaksi ini menghasilkan gas  $ClO_2$  yang dapat meledak pada suhu  $45^\circ C$ , kemudian Staudenmaier mengembangkan metode Brodie dimana grafit ditambahkan pada campuran nitrat dan asam belerang dalam prosesnya membutuhkan  $KClO_3$  sebagai pengoksidasi, tetapi metode ini membutuhkan waktu yang lama (dalam kurun waktu  $\pm 1$  minggu) dan prosesnya yang

berbahaya. Senyawa  $\text{KClO}_3$  dengan  $\text{NaClO}_3$  dapat membentuk  $\text{KClO}_4$  yang tidak larut dan sulit mengeluarkannya bila hanya dicuci dengan air. Kemudian Hummer mempublikasikan metode oksidasi untuk merubah grafit menjadi Grafena Oksida (GO) dengan cara mereaksikan grafit dengan natrium nitrat ( $\text{NaNO}_3$ ) dalam larutan asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) kemudian ditambahkan kalium permanganat ( $\text{KMnO}_4$ ) pada temperatur  $20^\circ\text{C}$ . Kemudian didiamkan selama 30 menit pada temperatur  $35^\circ\text{C}$ , suspensi kemudian dilarutkan dalam air dimana terjadi kenaikan temperatur hingga  $98^\circ\text{C}$ . Setelah 15 menit campuran ditambahkan air lagi dan residu permanganat dapat dihilangkan dengan penambahan hidrogen peroxide [11]. Metode Hummer dinilai lebih baik daripada dua metode sebelumnya karena memerlukan waktu yang lebih singkat yaitu kurang dari 2 jam dan proses yang aman [19].

Penelitian lain mengatakan penyiapan grafena oksida dengan mudah dan hemat biaya dengan menggunakan serbuk grafit dengan  $\text{KMnO}_4$  dan campuran 9:1 dari  $\text{H}_2\text{SO}_4 / \text{H}_3\text{PO}_4$  terkonsentrasi sebagai oksidan. Selain itu, reduksi Grafena oksida dilakukan dengan menggunakan agen reduktor non-toxic yang memiliki potensi sebagai pengganti hidrazine sebagai agen pereduksi, polifenol [26],  $\beta$ -karotena [17] dan asam askorbat (AA) yang merupakan agen pereduksi yang ramah lingkungan dan tidak menimbulkan efek beracun [15].

### 2.3 *Dunaliella salina*

*Dunaliella salina* adalah alga hijau uniseluler, bi-flagel, dan tidak memiliki dinding sel. merupakan sumber alami yang kaya akan kandungan  $\beta$ -karotena dan gliserol. *Dunaliella salina* merupakan salah satu mikroorganisme eukariotik yang paling toleran terhadap lingkungan dengan kadar garam tinggi, biasanya *Dunaliella salina* hidup pada kadar  $\text{NaCl}$  6% hingga 12% dengan suhu berkisar  $<0^\circ\text{C}$  hingga  $>38^\circ\text{C}$ . Toleransi terhadap konsentrasi garam yang tinggi tersebut disebabkan oleh proses osmoregulasi, dimana tekanan osmotik ekstraselluler ditekan oleh produksi gliserol intraseluler dalam *Dunaliella salina* [7]. Kadar  $\beta$ -karotena dalam *Dunaliella salina* dapat ditingkatkan bila tumbuhan dalam kondisi stress seperti intensitas cahaya yang tinggi, kelaparan nutrisi dan kenaikan karbondioksida dalam air dapat menghasilkan dua stereoisomer  $\beta$ -karotena, semua trans dan 9-cis  $\beta$ -caroten yang terakumulasi hingga 10% dari berat kering [1]. Pada Penelitian Al-Muhteseb pada tahun

2015 [7] menghasilkan  $\beta$ -karotena dengan akumulasi dalam bentuk *cis* 30-50%, pada penelitian Chin ho *et al* pada tahun 2008 [20] konsentrasi  $\beta$ -karotena dalam bentuk *trans* menjadi produk utama yang dihasilkan yaitu 138.25 mg/g alga, dalam bentuk 9-*cis*- $\beta$ -caroten sebesar 124.65 mg/g alga, dan 13-*cis*- $\beta$ -caroten sebesar 4.95 mg/g alga.

Kandungan  $\beta$ -karotena dalam alga berperan sebagai tabir surya melindungi klorofil dan DNA sel dari radiasi tinggi sehingga seringkali *Dunaliella salina* tidak berwarna hijau tapi merah [7]. Penurunan kandungan pigmen  $\beta$ -karotena disebabkan karena pengaruh suhu pemanasan sehingga pigmen mengalami kerusakan. Pigmen  $\beta$ -karotena tidak stabil pada suhu tinggi (diatas 60°C). Suhu tinggi akan merusak gugus kromofor yang membuat warna pigmen menjadi pucat, selain itu senyawa  $\beta$ -karotena mudah sekali teroksidasi bila tidak disimpan ditempat yang dialiri gas nitrogen [3].

## 2.4 Karotenoid

Karotenoid disintesis secara alami oleh tanaman dan mikroorganisme, merupakan golongan tetraterpenoid dengan panjang rantai 40 atom karbon. Karotenoid berbentuk rantai hidrokarbon poliena dimana ujungnya terdapat gugus cincin dan mungkin memiliki atom oksigen [29]. Karotenoid yang mengandung ujung polar mencerminkan langkah oksidatif dalam pembentukannya seperti lutein, bixin, zeaxanthin dan capsanthin dinamakan “xanthofil”, sedangkan karotenoid yang tidak mengandung atom oksigen seperti lycopene,  $\beta$ -karoten, dan  $\alpha$ -karotena dinamakan “karotena”. Karotena hanya mengandung karbon dan hidrogen (hidrokarbon), dan merupakan hidrokarbon tak jenuh karena memiliki ikatan rangkap (C=C) [30].

## 2.5 Isolasi Karotenoid

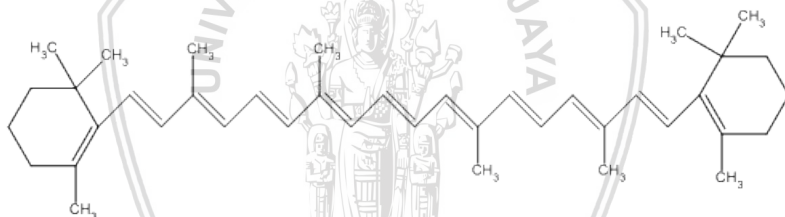
Karotenoid umumnya merupakan pigmen alami yang memiliki peran penting sebagai antioksidan, karotenoid biasanya digunakan sebagai pewarna alami untuk makanan dan kosmetik. Kandungan  $\beta$ -karotena dalam karotenoid berfungsi sebagai provitamin A bagi tubuh manusia, karena manusia tidak dapat mensintesis vitamin A sendiri [31]. Metode untuk ekstrak karotenoid yang paling populer yaitu dengan menggunakan pelarut organik, tapi kebanyakan pelarut yang digunakan bersifat racun dan mahal, pada penelitian mustafa pada



tahun 2012 [32] metode yang digunakan untuk ekstrak karotenoid adalah *Pressurized fluid extraction* (PFE) yang dapat mengatur temperatur dan tekanan, metode ini tidak memerlukan pelarut yang banyak dan waktu yang singkat dan dapat dirangkai dalam keadaan dengan lampu maupun udara terbuka.

## 2.6 $\beta$ -Karotena

$\beta$ -karotena adalah produk alami yang melimpah dapat ditemukan pada buah dan sayuran,  $\beta$ -karotena terdiri dari rantai hidrokarbon jenuh dengan dua kelompok retinil dan memiliki bukti sebagai anti oksidan yang sangat kuat. Anti oksidan ini berfungsi sebagai bahan pencegah serangan radikal bebas dalam tubuh. Kelimpahannya dalam makanan dan sifatnya yang tidak beracun dapat memproduksi grafena dengan biaya produksi yang murah.  $\beta$ -karotena ini memiliki kemampuan deoksigenasi yang mampu mereduksi grafena oksida seperti layaknya hidrazin [17]



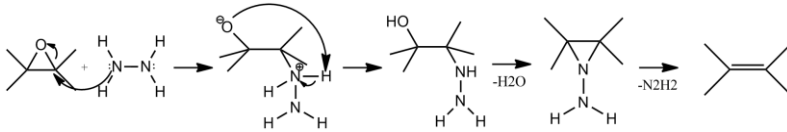
**Gambar 2.2** Struktur senyawa *all-trans- $\beta$ -carotene* [16].

Isolasi  $\beta$ -karotena sudah banyak dilakukan dengan berbagai metode seperti *maserasi* [2], *ultrasonikasi* [3], *sentrifugasi* [4,8], *PFE* (*Pressurized Fluid Extraction*) [5], dan *PLE* (*Pressurized Liquid Extraction*) [6] dengan pelarut seperti *acetone* [3,5], etanol [6,7], *n-hexane* [2,3,4,6] dan petroleum eter [6,8]. Pada penelitian Emeish pada tahun 2012 [4] ekstrak  $\beta$ -karotena dapat dilakukan dengan metode flocculation, centrifugation dan flotation. Metode sentrifugasi lebih efisien karena membutuhkan energi yang rendah dengan pelarut ekstraksi yang terbaik adalah heksana, eter, minyak jojoba atau minyak nabati.

## 2.7 Reduksi dalam Sintesis Grafena

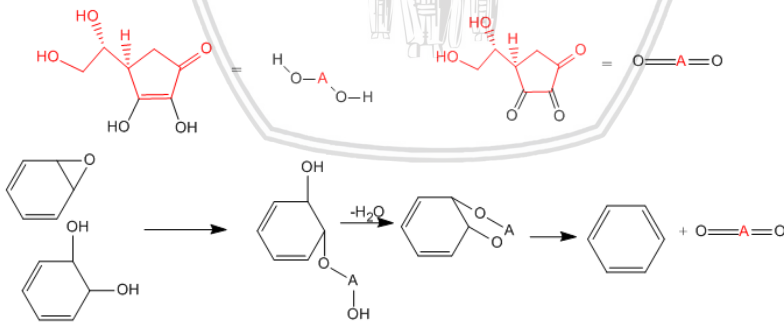
Senyawa hidrazin memiliki nukleofilik dari amina yang memiliki elektron bebas sehingga mampu membuka cincin epoksi

melalui reaksi substitusi nukleofilik (jalan  $S_N^2$ ), sedangkan pada senyawa  $NaBH_4$  dan  $LiBH_4$  memiliki nukleofilik kuat dari hidrida yang bisa mereduksi gugus karboksil dan karbonil [14].



**Gambar 2.3** Reaksi reduksi dengan hidrazin [13]

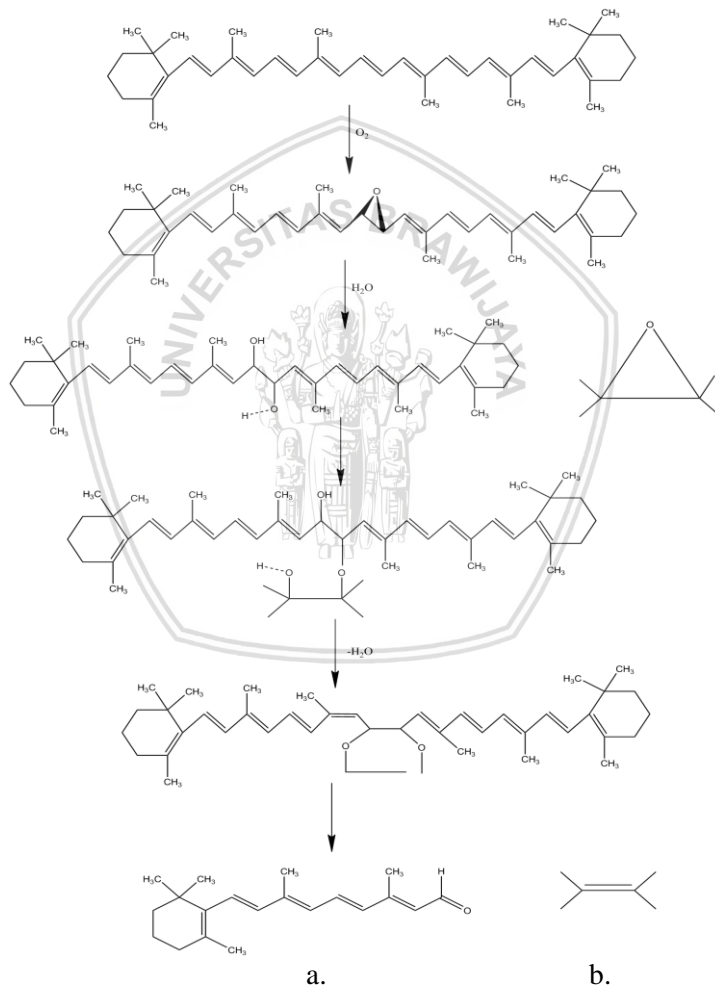
Mekanisme yang terjadi ketika grafena oksida di reduksi dengan agen pereduksi adalah dimana epoksi dari grafena oksida dapat dengan mudah diserang oleh nukleofilik, menghasilkan reaksi substitusi nukleofilik yang kaya akan gugus hidroksil untuk membuka cincin epoksi [13,14,16]. Pada penelitian Emiru and Delele pada tahun 2016 [15] menggunakan asam askorbat sebagai agen pereduksi, proton dan elektron dari asam askorbat akan disumbangkan ke grafena oksida sehingga akan membuka cincin epoksida dan menghilangkan *leaving group* OH sehingga mengalami dehidrasi meninggalkan lembaran grafena. Untuk menghilangkan gugus OH asam askorbat menyumbangkan satu proton ke gugus OH dan akhirnya mengalami dehidrasi dalam bentuk air.



**Gambar 2.4** Reaksi reduksi dengan asam askorbat [13]

Pada penelitian Zaid *et al* pada tahun 2015 [17] mekanisme yang terjadi ketika  $\beta$ -karotena mereduksi senyawa grafena oksida dimulai dengan penambahan molekul oksigen pada ikatan rangkap pusat  $\beta$ -karotena membentuk kelompok epoksida. Epoksida kemudian mengalami hidrolisis yang dihasilkan dalam pembentukan kelompok

diol, karena elektron menyumbangkan efek ikatan rangkap terkonjugasi pada  $\beta$ -karotena, dua proton dari kelompok diol mudah dipisahkan membentuk anion oksigen. Oksigen bertindak sebagai nukleofil dan menyerang epoksida dari grafena oksida (GO) melalui reaksi substitusi nukleofilik (jalan  $S_N^2$ ). Akibatnya, cincin epoksi terbuka dan molekul air tereliminasi untuk menghasilkan aldehida dan *reduced graphene oxide* (rGO) sebagai produk akhir.



**Gambar 2.5** Mekanisme reduksi menggunakan *all-trans*- $\beta$ -karotena. (a) Retinal, (b) rGO [17]

## 2.8 Karakterisasi UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis merupakan salah satu metode dalam kimia analisis yang digunakan untuk menentukan komposisi suatu sampel baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Spektrofotometri UV-Vis merupakan salah satu teknik analisis spektroskopi yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat pada panjang gelombang (200-400 nm) dan sinar tampak pada panjang gelombang (400-800 nm) dengan memakai instrumen spektrofotometer. Prinsip dari UV-Vis dimana terjadi interaksi antara gelombang elektromagnetik dan elektron valensi (elektron  $\phi$  dan  $\sigma$ ) yang ditransfer pada molekul, elektron valensi akan tereksitasi pada energi tertinggi ketika menyerap radiasi. Perbedaan intensitas disebabkan oleh perbedaan transisi untuk satu transisi, intensitas ditunjukkan oleh koefisien molar  $\epsilon$  ( $1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [22].

Pada penelitian Zaid *et al* pada tahun 2015 [17] menggunakan spektroskopi UV-Vis pada senyawa grafena oksida dihasilkan puncak 230 nm, sedangkan pada senyawa grafena puncak bergeser menjadi 270 nm karena adanya konjugasi elektron selama proses reduksi. Pada penelitian Emiru and Delele pada tahun 2016 [15] dihasilkan puncak spektra UV-Vis pada senyawa grafena oksida 226 nm. Setelah dilakukan reduksi dengan menggunakan asam askorbat, puncak yang diamati bergeser menjadi 262 nm. Hal ini dimungkinkan karena adanya konjugasi elektron yang meningkat. Pada penelitian Emeish (2012) menggunakan spektroskopi UV-Vis pada senyawa  $\beta$ -karotena dihasilkan puncak 440 nm.

## 2.9 Karakterisasi FTIR

Spektrofotometri inframerah adalah suatu metode analisis yang didasarkan pada penyerapan sinar inframerah. Fungsi utama dari spektroskopi inframerah adalah untuk mengenal struktur molekul (gugus fungsional), ketika radiasi elektromagnetik terserap maka energi molekul akan naik sehingga dapat menyebabkan vibrasi dan rotasi pada molekul. Frekuensi molekul serapan IR dapat menentukan tipe atom, tipe ikatan yang terbentuk, lokasi ikatan dan atom dalam molekul dan interaksi dalam molekul. Vibrasi *stretching* menunjukkan muatan dalam panjang ikatan, *stretching* dapat berupa *symmetric* atau *asymmetric*, Vibrasi *bending* menunjukkan muatan dalam sudut antara dua ikatan. Beberapa daerah serapan gugus fungsi ditunjukkan pada **Tabel 2.9**, prinsipnya jika sinar inframerah dilewatkan melalui sampel

senyawa organik, maka terdapat sejumlah frekuensi yang diserap dan ada yang diteruskan atau ditransmisikan tanpa diserap. Serapan cahaya oleh molekul tergantung pada struktur elektronik dari molekul tersebut. Molekul yang menyerap energi tersebut terjadi perubahan vibrasi dan perubahan tingkat energi rotasi [26]

**Tabel 2.1** Daerah Serapan Inframerah beberapa gugus fungsi [36]

Daerah Spektra (cm <sup>-1</sup> )	Jenis Ikatan
3400 – 3200	Regangan O-H (alkohol)
3500 – 3000	Regangan O-H (as.karboksilat)
3000 – 2800	Regangan C-H (Sp <sup>3</sup> )
3000 – 3100	Regangan C-H (Sp <sup>2</sup> )
1740 – 1725	Regangan C=O (aldehid)
1720 – 1705	Regangan C=O (keton, as.karboksilat), ciri-ciri terdapat overtone pada serapan di daerah (3400 nm <sup>-1</sup> )
1675 – 1500	Regangan C=C (alifatik dan aromatik)
1470 – 1450	Bengkokan C-C (metylen)
1460 – 1390	Bengkokan C-C
1200 – 1050	Bengkokan C-O (alkohol), primer (1075–1000), sekunder (1075–1150), tersier (1100–1200)
1220 – 1260	Regangan eter aromatik, alifatik (1120)
1150 – 1050	Bengkokan C-O (eter)

## 2.10 Karakterisasi HPLC

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) adalah metode pilihan untuk menentukan kemurnian, memantau perubahan reaksi dalam prosedur sintesis atau skala. HPLC memiliki kemampuan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan mengukur senyawa yang ada dalam sampel yang dapat diarutkan dalam cairan. Prinsip HPLC adalah larutan sampel yang disuntikan ke dalam kolom bahan berpori (fase diam) dan fasa cair (fase gerak) dipompa pada tekanan yang lebih tinggi melalui kolom. Prinsip pemisahan adalah adsorpsi zat terlarut pada fase diam berdasarkan afinitasnya terhadap fase diam [24].

Pada penelitian Hu *et al* pada tahun 2008 [20] hasil pemisahan senyawa karotenoid dalam mikroalga *Dunaliella salina* menggunakan HPLC menghasilkan tujuh senyawa dengan waktu retensi yang berbeda-beda, dimana *all-trans-lutein* 6.6 min, *all-trans-zeaxanthin*

7.6 min, 13-or 13'-*cis*-  $\beta$ -caroten 19.1 min, *all-trans*-alfa-caroten 21.1 min, 9-or 9'-*cis*-alfa-caroten 21.9 min, *all-trans*-  $\beta$ -caroten 26.9 min, 9-or 9'-*cis*-  $\beta$  -caroten 29.7 min. Total kandungan carotenoid mikroalga yaitu 290.77 mg/g dimana dominan kandungannya yaitu *all-trans*-  $\beta$ -caroten 138.25 mg/g dan 9-or 9'-*cis*-  $\beta$ -caroten 124.65 mg/g setara dengan 90.42% dari total karotenoid.

## 2.11 Karakterisasi XRD

XRD diproduksi sebagai refleksi pada sudut yang didefinisikan dengan baik. Setiap fase kristal memiliki citra difraksi tersendiri. Citra difraksi mengandung sejumlah kecil titik maksimum yang tidak dimiliki bidang kristalografi yang lain. Pada sistem difraksi sampel diputar pada sudut difraksi " $\theta$ ", sementara detektor berputar pada sudut  $2\theta$  pada absis, dimana " $\theta$ " adalah sudut Bragg, yang diukur dalam derajat. Identifikasi fase kristal dapat dilakukan dengan metode difraksi sinar X jika fasa masing-masing mewakili lebih dari 3-4% massa. Identifikasi dapat dilakukan dengan perhitungan dengan hubungan Bragg atau berbasis komputer, dengan menggunakan perangkat lunak Match, XpertScore dalam database PDF [23].

Pada penelitian Zaid *et al* pada tahun 2015 [17] hasil analisis XRD pada senyawa grafena oksida dan senyawa grafena dengan menggunakan  $\beta$ -karotena sebagai reduktor, senyawa grafena oksida menunjukkan puncak difraksi intens (002) pada sudut  $10.3^\circ$  yang sesuai dengan jarak antar layer pada 0.862 nm. Setelah dilakukan proses reduksi menjadi senyawa grafena puncak difraksi intens (002) menurun dan melebar diakibatkan susunan lapisan grafena. Selain itu sinyal juga bergeser menjadi  $23.13^\circ$  dengan jarak antar layer 0.392 nm. Penurunan jarak antar layer ini disebabkan oleh hilangnya gugus oksigen dan molekul air dalam lembaran grafena oksida.

## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik dan UPT Instrumen Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya. Analisis menggunakan XRD dilakukan di Universitas Ritsumeikan, Jepang. Penelitian dilaksanakan pada Bulan Februari-Mei 2018.

### 3.2 Alat dan Bahan penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain seperangkat alat refluks, spektrofotometer UV-Vis spektrofotometer-1601, FT-IR spektrofotometer-8400S, HPLC shimadzu, *ice bath*, XRD, timbangan-O HAUSS, seperangkat alat gelas, sentrifugasi-ECCO, Rotary Evaporator-BUCHI, Sonikasi-210 BRANSON, Oven-MEMMERT, Hot Plate stirer-PMC.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu serbuk grafit, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% (Sigma Alderich), KMnO<sub>4</sub> (Merck), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Merck), aquades, HCl 37% (Smart Lab Indonesia), kultur alga *Dunaliella salina*, β-karotena (sigma), n-heksana (Smart Lab Indonesia), etanol (Merck), aseton (Smart Lab Indonesia), KOH (Merck), metanol (Merck), Dikloromethane (Merck), Asetonitril (Merck).

### 3.3 Tahapan penelitian

1. Pemisahan kultur mikroalga *Dunaliella salina* dari media.
2. Ekstraksi karotenoid dari *Dunaliella salina*.
3. Oksidasi grafit menjadi grafena oksida.
4. Reduksi grafena oksida menjadi grafena oksida tereduksi (rGO).
5. Karakterisasi produk dan analisis data.

### 3.4 Prosedur Kerja

#### 3.4.1 Pemisahan kultur mikroalga *Dunaliella salina* dari media

Sebanyak 7,2 L kultur mikroalga *Dunaliella salina* dimasukkan kedalam tabung sentrifus (kapasitas 14 mL) kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 800 rpm selama 30 menit. Pemisahan dilakukan sampai semua kultur mikroalga. Pelet yang terbentuk dipisahkan dari supernatan, dikumpulkan dan dicuci dengan aquades dan di sentrifugasi lagi untuk mengendapkan alga. Pelet yang didapat

dikeringkan dengan metode *freeze dry* dan ditimbang. Dihilangkan 0,48 g mikroalga kering

### 3.4.2 Ekstraksi karotenoid dari mikroalga *Dunaliella salina*

Sebanyak 0,48 g padatan kering *Dunaliella salina* diekstrak dalam 15 mL heksana/aseton/EtOH (2/1/1 v/v/v) dengan dialiri gas nitrogen (laju alir 20 mL.min<sup>-1</sup>) selama 9 jam pada temperatur ruang. Ditambahkan 0,7 mL larutan KOH dalam metanol 40% dan didiamkan pada temperatur ruang selama 2 jam. Setelah itu ekstrak disaring dan dipisahkan dari sisa padatan alga. Ekstrak hasil penyaringan dipindahkan dalam corong pisah dan dicuci dengan aquades 15 mL sebanyak 3 kali. Fase organik (karotenoid dalam fase heksana) dipisahkan dan dipekatkan dengan aliran gas nitrogen. Produk yang didapat berupa padatan karotenoid berwarna kuning sebanyak 0,01 g dan disimpan dalam kulkas dengan suhu -20°C sampai pemakaian berikutnya.

### 3.4.3 Oksidasi grafit menjadi grafena oksida

Proses pembuatan grafena oksida dilakukan dengan oksidasi grafit menggunakan metode Hummer. Sebanyak 4 g serbuk grafit dicampur dan distirer dengan 92 mL larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% diikuti dengan penambahan 12 g KMnO<sub>4</sub> sedikit demi sedikit pada temperatur 20 °C selama 2 jam. Campuran kemudian diaduk pada suhu 35 °C selama 2 jam sebelum ditambahkan aquades sebanyak 200 mL. Pengadukan dilakukan kembali selama 15 menit dan diikuti dengan penambahan 600 mL aquades dan 10 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ke dalam campuran. Campuran kemudian di saring dan dicuci dengan 20 mL pelarut aquades:HCl 37% (0.2:2 v/v), dicuci dengan aquades hingga pH aquades. Padatan dikeringkan semalam pada suhu 60°C dan didapatkan grafit oksida kering sebanyak 4,22 g [17].

Grafit oksida diubah menjadi grafena oksida melalui proses pengelupasan lapisan grafit oksida menjadi lembaran-lembaran dengan ultrasonikasi. Sebanyak 0,014 g grafit oksida ditambahkan 7 mL aquades kemudian diberi gelombang ultrasonik dengan variasi lama waktu sonikasi 30, 60, 90 dan 120 menit. Grafit oksida yang tidak terkelupas diendapkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 30 menit. Grafena oksida terkelupas berada dalam supernatan membentuk larutan berwarna kecoklatan.



### 3.4.4 Reduksi Grafena Oksida

Sebanyak 0,1 g grafit oksida dilarutkan dalam 50 mL aquades kemudian diberi gelombang ultrasonik selama 120 menit. Grafit oksida yang tidak terkelupas diendapkan dengan sentrifugasi seperti dalam **sub bab 3.4.3**. Grafena oksida terkelupas (dalam supernatan) kemudian dimasukkan dalam labu alas bulat, ditambahkan dengan 0,1 g  $\beta$ -karotena dan di refluks pada suhu  $95^{\circ}\text{C}$  dengan variasi waktu 4 jam dan 24 jam. Setelah refluks, suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm [17]. Pelet yang didapatkan merupakan grafena oksida yang tereduksi (rGO), di cuci dengan aseton hingga filtrat bening. Padatan berwarna hitam pada kertas saring di keringkan dalam oven pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  dan ditimbang hingga berat konstan.

### 3.5 Karakterisasi UV-VIS

Ekstrak kering karotenoid diambil 0,0012 g dilarutkan dalam 3 mL etanol, dimasukkan dalam kuvet. Spektrofotometer UV-Vis dikalibrasi terlebih dahulu dengan blanko yang digunakan yaitu etanol. Sampel dimasukkan dalam spektrofotometer UV-Vis dan diamati serapannya pada panjang gelombang 400-800 nm.

Sebanyak 6 mL larutan senyawa grafena oksida dimasukkan dalam 10 mL labu ukur, ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dimasukkan dalam kuvet. Spektrofotometer UV-Vis dikalibrasi terlebih dahulu dengan blanko yang digunakan yaitu aquades. Sampel dimasukkan dalam spektrofotometer UV-Vis dan diamati serapannya pada panjang gelombang 200-400 nm.

### 3.6 Karakterisasi HPLC

Karakterisasi HPLC menggunakan  $\text{C}_{18}$  silika gel kromatografi kolom (10  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm  $\times$  25 cm). Fase gerak yang digunakan terdiri dari metanol:asetonitril:aquades (84/14/2, v/v/v), laju alir 0,25 mL/min, detektor diatur pada panjang gelombang 450 nm, sampel diinjeksikan sebanyak 2  $\mu\text{L}$  dimana senyawa karotenoid hasil isolasi diambil 1 mg dilarutkan dalam 0,5 mL metanol/diklorometana (1/1, v/v). Sedangkan untuk  $\beta$ -karotena standar diambil 1 mg dilarutkan dalam 8 mL metanol/diklorometana (1/1, v/v).

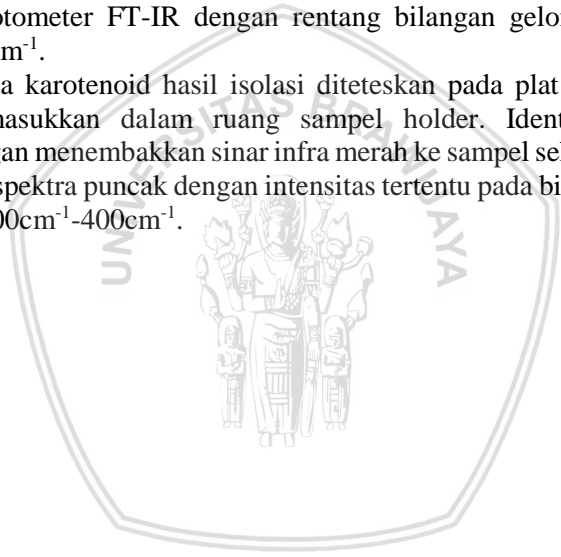
### 3.7 Karakterisasi XRD

Senyawa Grafena oksida dan senyawa Grafena dianalisis kristanilitasnya dengan XRD pada range  $2\theta$  sudut  $10^\circ - 80^\circ$ , dengan radiasi  $Cu K_\alpha$  ( $\lambda = 1.54187 \text{ \AA}$ ).

### 3.8 Karakterisasi FT-IR

Grafit, grafit oksida dan grafena oksida dianalisis dengan menggunakan spektrofotometri infra merah dalam pellet KBr. *Background* dibuat menggunakan pellet KBr tanpa sampel. Sebanyak 0,01 g produk dicampurkan dengan KBr, dihaluskan, dan dibentuk menjadi pellet. Pellet campuran dimasukkan ke dalam tempat sampel pada spektrofotometer FT-IR dengan rentang bilangan gelombang  $4000\text{cm}^{-1}$ - $400\text{cm}^{-1}$ .

Senyawa karotenoid hasil isolasi ditetaskan pada plat NaCl, kemudian dimasukkan dalam ruang sampel holder. Identifikasi dilakukan dengan menembakkan sinar infra merah ke sampel sehingga menghasilkan spektra puncak dengan intensitas tertentu pada bilangan gelombang  $4000\text{cm}^{-1}$ - $400\text{cm}^{-1}$ .



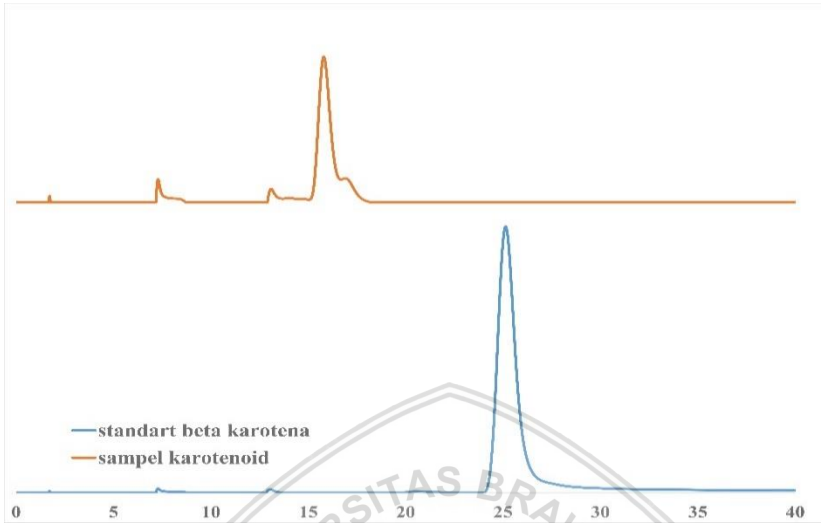
## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Ekstraksi dan Karakterisasi Karotenoid dari Mikroalga *Dunaliella salina*

Pellet kering mikroalga *Dunaliella salina* diisolasi dengan metode maserasi menggunakan campuran pelarut n-heksana:aseton:etanol (2:1:1, v/v/v) dengan dialiri gas nitrogen. Fungsi penggunaan gas nitrogen saat ekstraksi untuk menjaga agar senyawa karotenoid tidak teroksidasi oleh udara [3]. Oleh karena senyawa karotenoid mudah larut dalam lemak, langkah selanjutnya adalah reaksi saponifikasi untuk mendapatkan senyawa karotenoid murni. Ekstrak yang dihasilkan ditambahkan dengan larutan 40% KOH dalam metanol agar lemak (senyawa trigliserida) diubah menjadi sabun [5]. Keberhasilan reaksi saponifikasi ditunjukkan dengan terbentuknya buih. Produk yang terbentuk diekstrak dalam corong pisah dengan penambahan aquades agar pelarut etanol dan aseton larut sebagai fase air. Senyawa karotenoid terlarut dalam heksana sebagai fasa organik. Fase organik dipisahkan dengan mengalirkan gas nitrogen untuk menghilangkan pelarut n-heksana. Produk disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  agar senyawa karotenoid tidak mudah teroksidasi [3]. Analisis karotenoid dilakukan dengan FT-IR, HPLC dan UV-Vis.

#### 4.1.1 Karakterisasi senyawa karotenoid

Hasil isolasi senyawa karotenoid berwujud padatan berwarna kuning dengan massa 0,01 g yang ditunjukkan pada **Lampiran D.3**. Analisis karotenoid dilakukan dengan HPLC dan kadar  $\beta$ -karotena yang terbentuk dihitung menggunakan  $\beta$ -karotena standar (**Gambar 4.1**). Pemilihan panjang gelombang maksimum 450 nm dan campuran larutan pada fase gerak didasarkan pada penelitian Hu, *et al.* (2008) [20].



**Gambar 4.1** Kromatogram HPLC perbandingan  $\beta$ -karotena standar dan senyawa karotenoid hasil isolasi

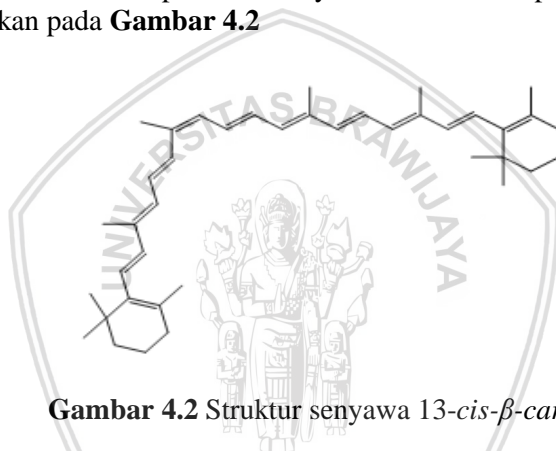
Pada kromatogram karotenoid terbentuk tiga puncak di waktu retensi 7,289 menit; 11,100 menit; dan puncak tertinggi pada waktu retensi 15,774 menit. Menurut penelitian Hu, *et al* (2008) diprediksikan bahwa senyawa yang terelusi pada waktu retensi antara 12-17 menit adalah *13-cis- $\beta$ -carotene*. Pada kondisi pengukuran yang sama,  $\beta$ -karotena standar (*15-15' trans- $\beta$ -karotena*) terelusi pada waktu retensi 25,135 menit. Berdasarkan perhitungan yang dilakukan (**Lampiran B**) didapatkan kadar  $\beta$ -karotena seperti yang ditunjukkan pada **Tabel 4.1**

**Tabel 4.1** Hasil Uji HPLC pada senyawa  $\beta$ -karotena

Waktu Retensi	Prediksi	Kadar (%)	Refrensi
15,774	<i>13-cis-<math>\beta</math>-carotene</i>	0,0011	[Hu, <i>et al</i> ,2008] [Lin and Chen,2003]
25,135	<i>all-trans-<math>\beta</math>-carotene</i>	99,8	

Kadar  $\beta$ -karotena yang kecil diakibatkan oleh kondisi kultur mikroalga *Dunaliella salina* masih dalam tahap pertumbuhan. Kandungan  $\beta$ -karotena dalam mikroalga akan banyak terakumulasi pada kondisi stress, seperti lingkungan dengan salinitas yang tinggi, dan intensitas cahaya yang tinggi [1]. Hasil Isolasi menunjukkan karotenoid yang didapatkan tidak mengandung senyawa *all-trans- $\beta$ -carotene*. Pada penelitian Lin dan Chen pada tahun 2003 umumnya kandungan karotenoid didalam tumbuhan dalam bentuk *trans-*, sedangkan isomer *cis-* dimungkinkan terbentuk diakibatkan karena proses isolasinya [27].

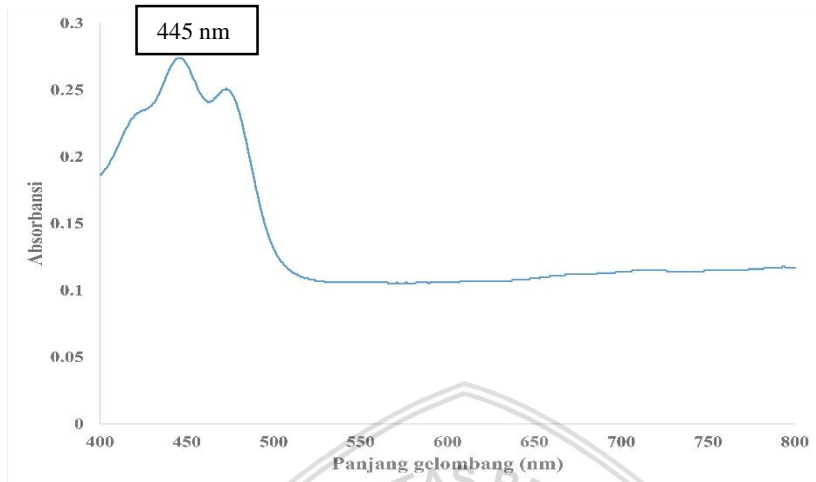
Struktur hasil prediksi senyawa dalam sampel karotenoid ditunjukkan pada **Gambar 4.2**



**Gambar 4.2** Struktur senyawa 13-*cis- $\beta$ -carotene*

#### 4.1.2 Karakterisasi FTIR dan UV-Vis senyawa karotenoid

Analisis menggunakan UV-Vis digunakan untuk mengetahui panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{\text{maks}}$ ) dari senyawa karotenoid. Nilai  $\lambda_{\text{maks}}$  yang didapat sebesar 445 nm dengan menggunakan pelarut etanol. Karotenoid merupakan senyawa berwarna sehingga terdeteksi di daerah visible. Pada data hasil analisis, nilai  $\lambda_{\text{maks}}$  senyawa karotenoid sesuai dengan penelitian Lichtenthaler and Calus (2001) [28], yaitu senyawa karotenoid terdeteksi pada daerah serapan 400-500 nm dengan menggunakan pelarut etanol. Transisi elektron yang terjadi yaitu dari  $\pi$ - $\pi^*$  yang terjadi akibat transisi elektronik gugus fungsi C=C. Spektrum UV-Vis senyawa karotenoid ditunjukkan pada **Gambar 4.3**



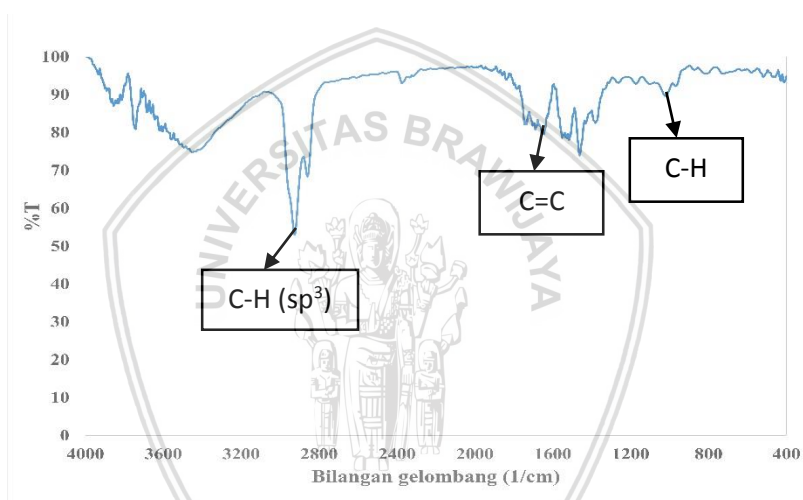
**Gambar 4.3** Spektrum UV-Vis senyawa karotenoid menggunakan pelarut etanol

Karakterisasi FT-IR digunakan untuk mengetahui gugus fungsi senyawa karotenoid (**Gambar 4.4**). Berdasarkan spektra tersebut kandungan  $\beta$ -karotena dalam senyawa karotenoid ditunjukkan adanya puncak didaerah serapan  $2924,65\text{ cm}^{-1}$  yang merupakan gugus fungsi C-H  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{sp}^3$ ) gugus fungsi ini diperkuat dengan adanya serapan didaerah *finger print* yaitu  $968,96$  merupakan gugus C-H  $\text{cm}^{-1}$  (*bending*), kemudian terdapat puncak didaerah serapan  $1644$  yang merupakan gugus C=C  $\text{cm}^{-1}$  (isomer *cis*). Hal ini sesuai dengan penelitian Masek, *et al* pada tahun 2015 [33] adanya puncak pada daerah serapan  $2970\text{-}2830\text{ cm}^{-1}$  yaitu *stretching*  $\text{-CH}_3$ , absorpsi pada serapan daerah  $1665\text{-}1635\text{ cm}^{-1}$  mengindikasikan gugus fungsi C=C (*cis* isomer). Serapan gugus fungsi yang lain ditunjukkan pada **Tabel 4.2**.

**Tabel 4.2** Hasil Intepretasi spektra FT-IR senyawa karotenoid

No	Bilangan gelombang $\text{cm}^{-1}$	Gugus Fungsi
1	3418,39	O-H (alkohol)
2	2924,65;2859,07	C-H ( $\text{sp}^3$ )
3	1744,29	C-O

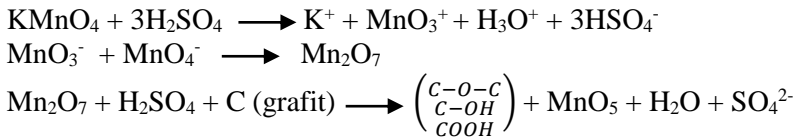
No	Bilangan gelombang $\text{cm}^{-1}$	Gugus Fungsi
4	1690,29; 1644,00;	C=C
5	1462,70	C-H (metilen)
6	1379,77	C-H (bending symetris)
7	1021,04	O-H (alkohol primer)
8	968,96	C-H (bending)



Gambar 4.4 Spektra FT-IR senyawa karotenoid.

## 4.2 Pembuatan Grafena Oksida

Grafena oksida (GO) dibuat dengan menggunakan metode Hummer. Sebanyak empat gram serbuk grafit dilarutkan dalam 92 mL larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  98% kemudian ditambahkan 12 g  $\text{KMnO}_4$  pada temperatur  $20^0$  C dan diaduk selama 2 jam. Penambahan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  sebagai untuk memberikan suasana asam dalam reaksi oksidasi grafit dengan terbentuknya agen oksidator  $\text{Mn}_2\text{O}_7$ , yang ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi hijau tua. Reaksi oksidasi grafit ditunjukkan pada **Gambar 4.5**.



**Gambar 4.5** Reaksi oksidasi grafit [15]

Reaksi dilanjutkan dengan penambahan aquades sebanyak 200 mL pada temperatur 35<sup>0</sup> C terjadi perubahan warna menjadi ungu tua. Dilanjutkan dengan pengadukan kembali selama 15 menit dan diikuti dengan penambahan 600 mL aquades dan 10 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ke dalam campuran. Penambahan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> berfungsi untuk menghentikan reaksi oksidasi pada grafit yang ditandai dengan perubahan warna dari ungu tua menjadi hitam. Penyaringan dan pencucian dilakukan dengan menggunakan 20 mL larutan campuran HCl 37%: aquades (2:0.2, v/v) untuk menghilangkan pengotor. Dilakukan pencucian kembali dengan menggunakan aquades pada endapan hingga pH sama dengan aquades. Padatan disaring dan dikeringkan dalam oven pada temperatur 60<sup>0</sup> C selama 12 jam.

Grafit oksida yang terbentuk ditimbang sebanyak 0,014 g dan dilarutkan dalam 7 mL aquades, kemudian diberi gelombang ultrasonik dengan variasi lama waktu 30 menit (GO-30'), 60 menit (GO-60'), 90 menit (GO-90') dan 120 menit (GO-120'). Struktur grafit oksida akan terkelupas menjadi lembaran-lembaran yang kemudian disebut dengan grafena oksida. Grafena oksida yang terbentuk dianalisis dengan FTIR, UV-Vis, dan XRD.

#### 4.2.1 Karakterisasi Grafena Oksida

Grafit oksida berwujud padatan berwarna hitam dengan massa sebesar 4,22 g.

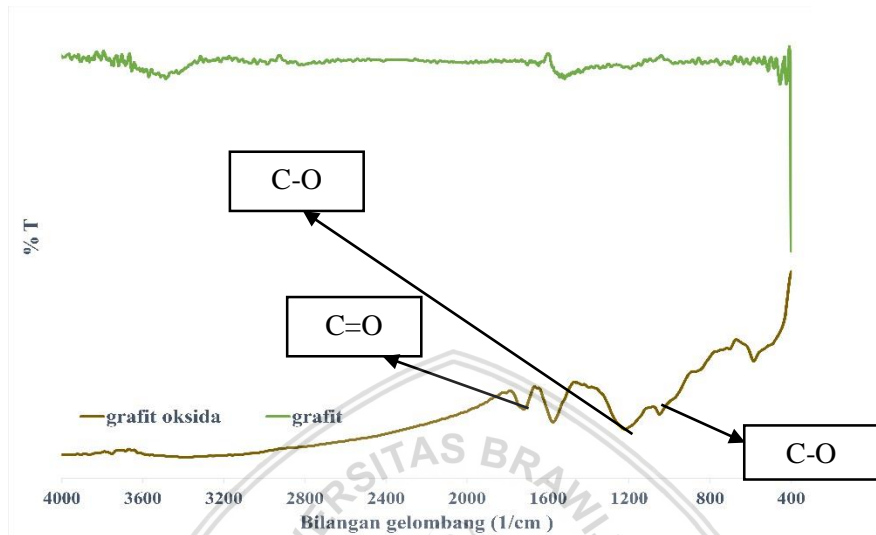




(a) (b)  
**Gambar 4.6** (a) Produk Grafit Oksida, (b) GO 30', GO 60', GO 90', GO 120' (dari sebelah kiri)

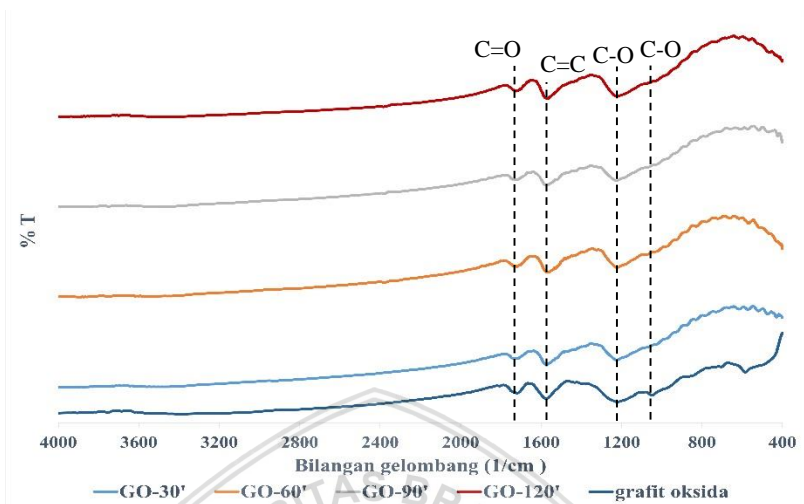
Proses oksidasi pada grafit tidak menyebabkan perubahan warna tetapi pertambahan massa karena adanya pertambahan atom oksigen dalam grafit oksida.

Spektra FT-IR grafit dan grafit oksida ditunjukkan pada **Gambar 4.7**. Berdasarkan spektra tersebut terdapat perbedaan yang sangat signifikan yaitu munculnya puncak-puncak baru pada bilangan gelombang  $1717,29\text{ cm}^{-1}$  yang merupakan serapan pada gugus C=O karbonil, khususnya yaitu keton dengan puncak yang tajam. Hal ini sesuai dengan penelitian Noebe, *et al* (2014) [34]. Puncak pada bilangan gelombang  $1221,62\text{ cm}^{-1}$  yang merupakan serapan pada gugus C-O (epoksida) dengan puncak yang cukup lebar dan puncak pada bilangan gelombang  $1049,97\text{ cm}^{-1}$  yang merupakan serapan pada gugus C-O (alkohol primer). Hal ini sesuai dengan penelitian Rattana, *et al* (2012) [35]. Puncak yang muncul didaerah serapan  $3400\text{ cm}^{-1}$  yaitu *stretching* dari gugus fungsi O-H dengan intensitas yang kecil. Interpretasi gugus fungsi grafit dan grafit oksida ditunjukkan pada **Tabel 4.3**.



**Gambar 4.7** Spektra FT-IR senyawa grafit dan grafit oksida

Spektra FT-IR senyawa grafena oksida ditunjukkan pada **Gambar 4.8**. Berdasarkan spektra tersebut terjadi pergeseran puncak gugus fungsi C=O (karbonil, keton) pada senyawa GO 30' dan GO 120'. Hal ini mengindikasikan terjadi perubahan dari grafit oksida menjadi grafena oksida. Pada spektra grafena oksida, puncak pada bilangan gelombang 1049,97  $\text{cm}^{-1}$  yang diduga gugus fungsi C-O (alkohol primer) tidak terbentuk. Hal ini dilaporkan oleh Dimiev, *et al* (2017) bahwa reaksi antara air sebagai nukleofil akan memprotonasi hidrogen dan melepaskan molekul  $\text{H}_3\text{O}^+$  sehingga merusak ikatan C-C pada GO membentuk keton dan enol pada ujung rantai [11] mekanisme reaksi ditunjukkan pada **Lampiran C.4**. Serapan gugus fungsi yang lainnya ditunjukkan pada **Tabel 4.3**. Pada GO 120' memiliki puncak-puncak dengan intensitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan GO lainnya. Proses pengelupasan dengan gelombang ultrasonik untuk mengubah struktur senyawa grafit oksida menjadi lembaran-lembaran grafena oksida dengan memutuskan ikatan *Van der Walls* yang menghubungkan lembaran-lembaran grafit oksida. Semakin lama proses sonikasi yang dilakukan maka semakin banyak lembaran-lembaran senyawa grafena oksida yang terbentuk [9].



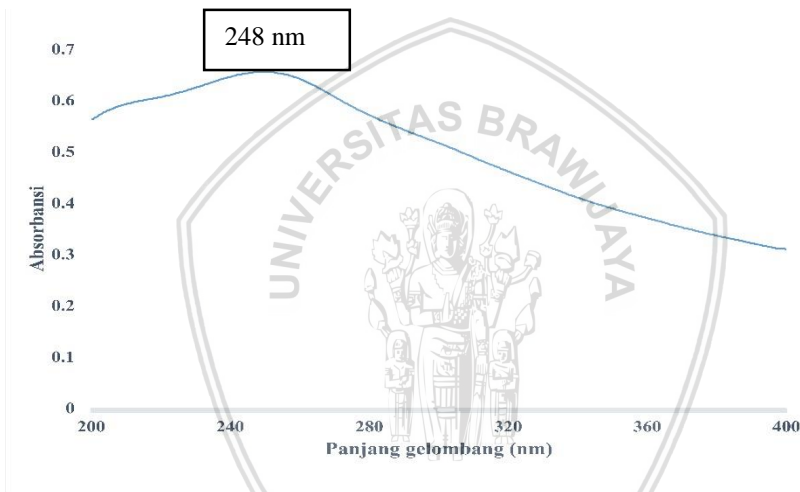
**Gambar 4.8** Spektra FT-IR senyawa grafit oksida dan GO 30', GO 60', GO 90' dan GO 120'.

**Tabel 4.3** Interpretasi gugus fungsi spektrum FTIR grafit, grafit oksida dan grafena oksida

Bilangan Gelombang						Gugus Fungsi
Grafit cm <sup>-1</sup>	Grafit oksida cm <sup>-1</sup>	GO 30' cm <sup>-1</sup>	GO 60' cm <sup>-1</sup>	GO 90' cm <sup>-1</sup>	GO 120' cm <sup>-1</sup>	
3487,82						O—H
	1717,29	1734,65	1721,15	1725,01	1726,93	C=O (keton)
1518,64	1574,57	1574,57	1574,57	1572,64	1570,71	C=C
	1221,62	1223,55	1221,62	1225,48	1221,62	C—O strech (eter sikliks)
	1049,97					C—O (alkohol primer)

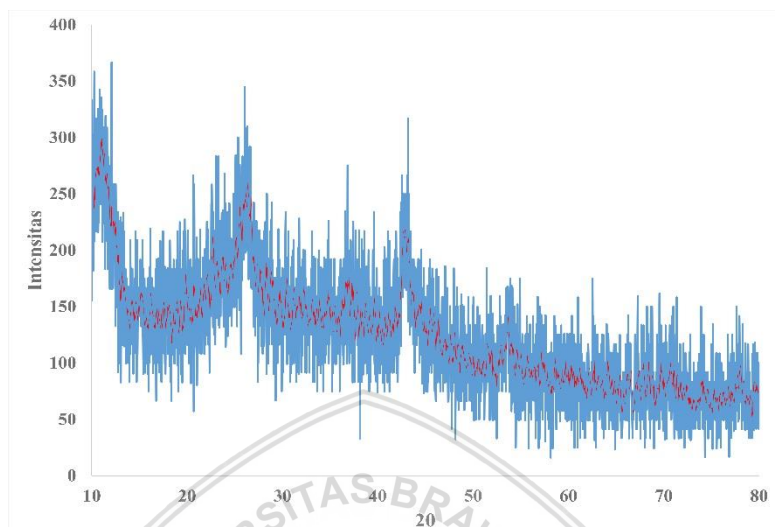


Kemudian dilakukan analisis dengan UV-Vis pada produk grafena oksida untuk mengetahui panjang gelombang maksimumnya. Nilai  $\lambda_{\text{maks}}$  grafena oksida sebesar 248 nm dengan menggunakan pelarut aquades. Data yang didapat sesuai dengan penelitian Emiru dan Delele (2017) [15], mendeteksi nilai  $\lambda_{\text{maks}}$  senyawa grafena oksida yaitu 230-310 nm dengan menggunakan pelarut aquades. Transisi yang terjadi yaitu dari  $\pi-\pi^*$  yang dihasilkan oleh gugus fungsi C=C. Spektrum UV-Vis grafena oksida ditunjukkan pada **Gambar 4.9**.



**Gambar 4.9** Spektrum UV-Vis GO 120' menggunakan pelarut aquades.

Analisis dengan XRD pada produk grafena oksida untuk mengetahui kristanilitasnya. Pola XRD senyawa grafena oksida ditunjukkan pada **Gambar 4.10**



**Gambar 4.10** Pola difraksi X-Ray senyawa GO 120’.

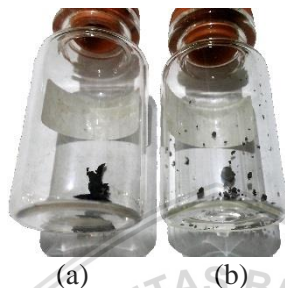
Berdasarkan pola di atas senyawa grafena oksida terbentuk puncak di sudut  $2\theta = 10,26^\circ$  dimana jarak antar layernya  $d = 0,8622$  nm. Data ini sesuai dengan penelitian Zaid *et al* (2015) [17] dimana terbentuk puncak disudut  $10,3^\circ$  dengan nilai  $d = 0,862$  nm. Pada senyawa grafena oksida jarak antar layer meningkat disebabkan adanya atom oksigen yang membentuk gugus-gugus fungsi oksigen yang diidentifikasi dengan sudut yang kecil [9]. Hal ini menunjukkan proses oksidasi berhasil dilakukan.

### 4.3 Reduksi Grafena Oksida

Sebanyak 0,1 g grafit oksida dilarutkan dalam 50 mL aquades dan diberi gelombang ultrasonik selama 120 menit, kemudian ditambahkan  $\beta$ -karotena sebanyak 0,1 g yang berfungsi sebagai reduktor alami. Reaksi dilanjutkan dengan refluks pada temperatur  $95^0$  C selama 4 jam dan 24 jam. Selama reaksi dialirkan gas oksigen untuk menginisiasi reaksi oksidasi pada  $\beta$ -karotena dengan terbentuknya diol pada rantai  $C=C$  15-15’. Gugus fungsi hidroksil mampu mereduksi gugus-gugus karbonil dan epoksida pada senyawa grafena oksida [17]. Endapan hasil reduksi dicuci dengan aseton untuk mengilangkan sisa  $\beta$ -karotena sampai filtrat tidak berwarna. Keberhasilan reaksi dianalisis dengan menggunakan FT-IR.

### 4.3.1 Karakterisasi Produk Reduksi Grafena Oksida

Hasil reduksi grafena oksida (rGO) berbentuk padatan berwarna hitam. Massa reduksi grafena oksida dengan lama variasi waktu 4 jam sebesar 0,0026 g, sedangkan pada lama variasi waktu 24 jam sebesar 0,005 g.

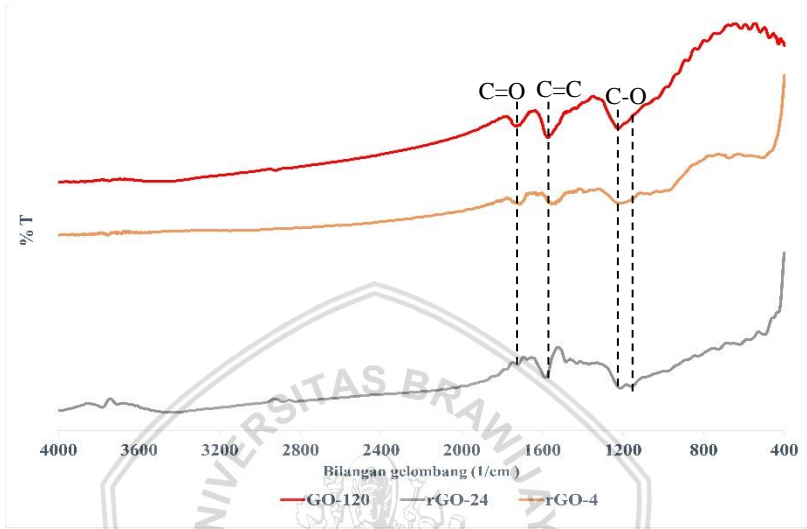


**Gambar 4.11** (a) Produk rGO lama variasi waktu 24 jam (rGO-24), (b) Produk rGO lama variasi waktu 4 jam (rGO-4).

Spektra FT-IR senyawa rGO ditunjukkan pada **Gambar 4.12**. Berdasarkan spektra tersebut terdapat perbedaan yang sangat signifikan dari GO menjadi rGO. Pada rGO-4, intensitas gugus fungsi C=O  $1717,29\text{ cm}^{-1}$  dan gugus fungsi C-O  $1215,83\text{ cm}^{-1}$  lebih rendah dibanding pada spektra GO. Pada spektra rGO-24, gugus fungsi C=O tidak terbentuk kembali serta intensitas gugus fungsi C-O  $1213,90\text{ cm}^{-1}$  lebih kecil dibanding dengan spektra GO dan spektra rGO-4. Hal ini mengindikasikan bahwa reduktor alami  $\beta$ -karotena mampu mereduksi oksigen dalam senyawa GO. Serapan gugus fungsi yang lain ditunjukkan pada **Tabel 4.4**

Pada proses reduksi yang sudah dilakukan semakin lama waktu reduksi maka gugus fungsi yang mengandung oksigen semakin berkurang yang ditandai dengan bertambahnya gugus fungsi C=C pada  $1584,21\text{ cm}^{-1}$ . Terbentuk gugus fungsi C-O (alkohol tersier) pada  $1159,90\text{ cm}^{-1}$  (rGO-24). Data ini didukung dengan adanya puncak yang muncul didaerah serapan  $3400\text{ cm}^{-1}$  yaitu *stretching* dari gugus fungsi O-H dengan intensitas kecil. Adanya gugus fungsi O-H ini dilaporkan oleh Dimiev et al. (2017) sebagai gugus hidroksil tersier yang terikat pada sisi yang rusak dari grafena oksida. Ikatan C-O akan terputus ketika reaksi reduksi berlangsung dan menghasilkan elektron  $\pi$  terkonjugasi pada kerangka atom karbon (C=C). Regenerasi konjugasi elektron  $\pi$  mendorong terputusnya ikatan C-O dan gugus

fungsi pada sisi yang rusak menjadi lebih resisten terhadap reaksi reduksi [11]

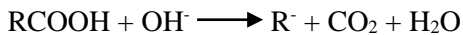


**Gambar 4.12** Spektre FT-IR senyawa grafena oksida dan reduksi grafena oksida pada lama variasi waktu 4 jam dan 24 jam.

Berdasarkan analisis data FTIR, dapat dilihat bahwa  $\beta$ -karotena dapat mereduksi lebih dari satu macam gugus fungsi yaitu C-O dari epoksida dan C=O karbonil (keton). Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Dimiev (2017) [11]. Proses reduksi ini disebut reaksi deoksigenasi, seperti persamaan reaksi berikut:



Nukleofil  $OH^-$  menyerang gugus karbonil sehingga ikatan C-C pada senyawa grafena oksida terputus dan membentuk gugus karboksil. Hal ini dapat terjadi dengan kondisi konsentrasi basa yang tinggi dan temperatur yang tinggi sehingga reaksi dekarboksilasi dapat terjadi.



Muatan negatif karbanion dapat terdelokalisasi dalam senyawa grafena oksida. Mekanisme reaksi ditunjukkan pada **Lampiran C**

**Tabel 4.4** Interpretasi gugus fungsi spektrum FT-IR senyawa GO 120', rGO-4 dan rGO-24 jam.

Bilangan gelombang $\text{cm}^{-1}$			Gugus Fungsi
Grafena oksida 120 menit	Reduksi grafena oksida 4 jam	Reduksi grafena oksida 24 jam	
1726,93	1717,29		C=O
1570,71	1561,07	1584,21	C=C (aromatik)
1221,62	1215,83	1213,90	C—O strech (eter sikliks)
		1159,90	C—O (alkohol tersier)





## BAB V KESIMPULAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Kadar  $\beta$ -karotena dalam senyawa karotenoid sebesar 0,0011% yang didapat berdasarkan hasil karakterisasi dengan HPLC.
2. Massa yang didapat dari produk reduksi grafena oksida pada lama variasi waktu 4 jam yaitu 0,0026 g sedangkan pada variasi lama waktu 24 jam yaitu 0,005 g.
3. Karakterisasi menggunakan FT-IR menunjukkan terbentuknya produk reduksi grafena oksida, keberhasilan reaksi ditunjukkan dengan berkurangnya gugus yang mengandung oksigen dan semakin banyak gugus C=C yang terbentuk.

### 5.2 Saran

Sebaiknya dilakukan karakterisasi lebih banyak pada senyawa reduksi grafena oksida agar dapat mendukung data yang ada, serta dilakukan lebih banyak variasi pada reduksi agar didapat data yang lebih spesifik. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai *Dunaliella salina* dan mengoptimalkan kultur *Dunaliella salina*.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] García-González, M., Moreno, J., Manzano, J. C., Florencio, F. J., & Guerrero, M. G, 2008, **Production of Dunaliella salina biomass rich in 9-cis- $\beta$ -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor**, *Journal of Biotechnology*, Vol. 115(1), No. 81–90.
- [2] Oktora, R. A., W, F. Ma'aruf., & T, W. Agusti, 2016, **Pengaruh Penggunaan Senyawa Fiksator Terhadap Stabilitas Ekstrak Kasar Pigmen  $\beta$ -carotene**, Vol. 19(3), No. 206-213.
- [3] Wahyuni, D. T., & S, B. Widjarnoko., 2015, **Pengaruh Jenis Pelarut dan Lama Ekstraksi Terhadap Ekstrak Karotenoid Labu Kuning Dengan Metode Gelombang Ultrasonikasi**, *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, Vol. 3(2), No. 390-401.
- [4] Emeish, S, 2012, **Production of Natural  $\beta$ -carotene from Dunaliella Living in The Dead Sea**, *Journal of Earth Enviromental Sciences*, Vol. 4(2), No.23-27
- [5] Abu-Rezq, T., S, Al-Hooti., D, Jacob., M, Al-Shamali., A, Ahmed., & N, Ahmed., 2010, **Induction and Extraction of  $\beta$ -carotene from The Locally Isolated Dunaliella salina**, Vol. 1 (4), No. 58-38.
- [6] Taucher, J., S, Baer, P, Schwerna., D, Hofmann., M, Hummer., R, Buchholz., & A, Becker., 2016, **Cell Disruption and Pressurized Liquid Ekstraktion of Carotenoids from Microalga**, *Research Article*, Vol. 7(1), No.2-7.
- [7] Al-Muhteseb, S, 2015, **Producing Natural Mixed Carotenoid from Dunaliella salina**. *Journal of Natural Sciences Research*, Vol. 5(10). No. 53-59.
- [8] de Carvalho, L. M. J., Gomes, P. B., Godoy, R. L. de O., Pacheco, S., do Monte, P. H. F., de Carvalho, J. L. V., ... Ramos, S. R. R, 2012, **Total carotenoid content,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study**, *Food Research International*, Vol. 47(2), No. 337–340.

- [9] Sharon, M., & Sharon, M, 2015, **Graphene: an introduction to the fundamentals and industrial applications**. Hoboken, New Jersey: Wiley.
- [10] Syakir, N., R. Nurlina., S, Anam., A, Aprillia., S, Hidayat., & Fitrilawati., 2015, **Kajian Pembuatan Oksida Grafit untuk Produksi Oksida Grafena dalam Jumlah Besar**. Vol. 19(55). No. 26-29.
- [11] Eigler, S. (Ed.), 2017, **Graphene oxide: fundamentals and applications**, Chichester, West Sussex, United Kingdom: Wiley.
- [12] Li, J., Zeng, X., Ren, T., & van der Heide, E, 2014, **The Preparation of Graphene Oxide and Its Derivatives and Their Application in Bio-Tribological Systems**, *Lubricants*, Vol. 2(4), No. 137–161.
- [13] Khan, Z. H, 2017, **Recent Trends in Nanomaterials: Synthesis and Properties**, Springer.
- [14] Zhao, J., Liu, L., & Li, F, 2014, **Graphene Oxide: Physics and Applications**. Springer.
- [15] Emiru, T. F., & Ayele, D. W, 2017, **Controlled synthesis, characterization and reduction of graphene oxide: A convenient method for large scale production**, *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, Vol. 4(1), No. 74–79.
- [16] Kiang Chua, C., & Pumera, M, 2014, **Chemical reduction of graphene oxide: a synthetic chemistry viewpoint**, *Chemical Society Reviews*, Vol. 43(1), No. 291–312.
- [17] Zaid, R. M., Chong, F. C., Teo, E. Y. L., Ng, E.-P., & Chong, K. F, 2015, **Reduction of graphene oxide nanosheets by natural beta carotene and its potential use as supercapacitor electrode**, *Arabian Journal of Chemistry*, Vol. 8(4), No. 560–569.
- [18] Warner, J. H, 2013, **Introduction (pp. 1–4)**, Elsevier.
- [19] Zhu, Y.; Mural, S.; Cai, W.; Li, X.; Suk, J.W.; Potts, J.R.; Ruoff, R.S., 2010, **Graphene and graphene oxide: Synthesis,**

- properties, and applications**, *Adv. Mater.* Vol. 22, No. 3906–3924.
- [20] Hu, C.-C., Lin, J.-T., Lu, F.-J., Chou, F.-P., & Yang, D.-J, 2008, **Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract**, *Food Chemistry*, Vol. 109(2), No. 439–446.
- [22] Koch, H. K., 2009, **Process Analytical Chemistry Control, Optimazation, Quality, Economy**, Germani. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [23] Elena, J., & M, D. Lucia., 2012, **Application of X Ray Diffraction (XRD) And Scanning Electron Microscopy (SEM) Methods to The Portland Cement Hydration Processe**, Vol. 2(15), No. 35-42.
- [24] M.S. Charde, A.S. Welankiwar, J. Kumar., 2014, **Method development by liquid chromatography with validation**, *International Journal of Pharmaceutical Chemistry*, Vol. 4(02), No. 57-61.
- [25] Bhattacharya, G., Sas, S., Wadhwa, S., Mathur, A., McLaughlin, J., & Roy, S. S, 2017, **Aloe vera assisted facile green synthesis of reduced graphene oxide for electrochemical and dye removal applications**, *RSC Advances*, Vol. 7(43), No. 26680–26688.
- [26] Down, R. D., & Lehr, J. H. (Eds.), 2008, **Environmental instrumentation and analysis handbook**, Hoboken, N.J: Wiley-Interscience.
- [27] Lin, C.H., dan B.H. Chen, 2003, **Determination Of Carotenoids In Tomato Juice By Liquid Chromatography**, *Journal of chromatography*, Vol. 1012, No. 103-109.
- [28] Lichtenthaler, K. H., & C, Buschmann, 2001, **Current Protocols In Food Analytical Chemistry**, John Wiley & Sons, New Jersey.
- [29] Varzakas, T., dan S, Kiokias, 2016, **HPLC Analysis and Determination of Carotenoid Pigment in Commercially**

**Available Plant Extracts**, *Nutrition and Food Science*, Vol. 4, No. 01-14

- [30] Rodriguez C, M., and Stange, 2013, **C. Biosynthesis of carotenoids in carrot: An underground story comes to light.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 539, No. 110-116.
- [31] Zakyntinos, G., dan T, Varzakas, 2016, **Carotenoid: From Plants to Food Industry**, *Nutrition and Food Science*, Vol. 4, No. 38-51
- [32] Mustafa, A., L, Mijangos., & C, Turner, 2012, **Pressure Hot Ethanol Extraction of Carotenoids from Carrot By-Products**, *molecules*, Vol. 17, No. 1809-1818.
- [33] Mase, A., E, Chrzescijanska., K, Diakowska., & M, Zaborski, 2015, **Application of  $\beta$ -carotene, a Natural Flavonoid Dye, to Polymeric Materials as a Natural Antioxidant and Determination of Its Characteristic Using Cyclic Voltammetry and FTIR Spectroscopy**, *International Electrochemical Science*, Vol. 10, No. 3372-3386.
- [34] Noebe, M., J, Wang., A, Amini., H, Khyyam., N, Hameed., Lu, Hua Li., Ying, Chen., dan Browyn Fox, 2014, **Mechanical Property and Structure of Covalent Functionalised Graphene/ Epoxy Nanocomposites**, *scientific reports*, Vol. 4, No. 4375.
- [35] Rattana, T., S, Chaiyakun., N, Witit-anun., N, Nuntawong., P, Chindaudom., S, Oaew., C, Kedkeaw., dan P, Limsuwan, 2012, **Preparation and Characterization of Graphene Oxide Nanosheet**, *procedia engineering*, Vol. 32, No. 759-764.
- [36] Ham., M, Bryan., dan Aihui, Maham, 2016, **Analytical Chemistry A Chemist and Laboratory Technician's Toolkit**, John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.