

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Spirulina plantesis merupakan sianobakteria yang berbentuk filament yang menghasilkan berbagai senyawa bioaktif yang bernilai tinggi (Tri panji & suharyanto, 2001) memiliki habitat di danau-danau atau perairan dengan kandungan garam yang tinggi dan sangat penting dalam bioteknologi nutrisi, industri, dan lingkungan serta kandungan proteinnya yang cukup tinggi. *Spirulina* banyak dimanfaatkan sebagai bahan tambahan pada makanan, untuk pakan ikan (M. Ahsan et al, 2008), unggas hal ini dikarenakan kandungan beberapa zat yang terkandung didalamnya antara lain protein, mineral, vitamin B₁₂, karotenoida, asam lemak esensial seperti γ -linolenic acid. (R. Henrikson, 2009)

Sekarang industri makanan banyak mengalami peningkatan sejak banyak bahan-bahan makanan yang didapatkan dari hasil ekstraksi dari produk alami. *Spirulina plantesis* merupakan salah satu dari beberapa jenis alga yang banyak menarik perhatian berhubungan dengan manfaatnya sebagai bahan makanan pada manusia. Beberapa studi yang berhubungan dengan *Spirulina plantesis* atau hasil ekstraksinya menunjukkan beberapa keuntungan fisiologis seperti antioksidan, antimicrobial, anti-inflamatory, antiviral, dan antitumoral (Spolaore, Et Al, 2006)

Spirulina plantesis menghasilkan berbagai senyawa bioaktif yang mempunyai nilai ekonomi yang tinggi seperti karotenoida (Tri panji & suharyanto, 2001). Karotenoida merupakan pigmen yang secara alami terdapat pada khromoplast dari tanaman dan beberapa organisme fotosintesis seperti alga dan beberapa tipe dari jamur dan bakteri (www.wikipedia.com). Pengambilan pigmen karotenoida dari alga *Spirulina plantesis* dapat dilakukan dengan metode ekstraksi (Hsieh L. K., et al, 1974). Diperlukan suatu kondisi ekstraksi yang optimum sehingga dapat menghasilkan pigmen karotenoid yang optimum pula.

Parameter yang digunakan sebagai perbandingan dalam ekstraksi pigmen karotenoid ini adalah temperature operasi, jenis solven yang digunakan dalam ekstraksi serta lama waktu operasi ekstraksi. Analisa secara kuantitatif hasil ekstraksi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer (Paul D. Fraser and Peter M. Bramley, 2005)

1.2. Perumusan Masalah

Kebutuhan akan antioksidan (karotenoid), terus meningkat. Sehingga semakin banyak dilakukan penelitian untuk mencari sumber-sumber yang mampu memproduksi karotenoid dalam jumlah banyak. Salah satu sumber karotenoid adalah dari mikroalga *Spirulina plantesis*. Banyak telah dilakukan berbagai penelitian tentang kandungan yang ada dalam *Spirulina plantesis*. Akan tetapi, banyak penelitian terdahulu yang menggunakan berbagai kondisi operasi. Oleh sebab itu, proses ekstraksi pigmen karotenoid dari *Spirulina plantesis* perlu ditentukan kondisi optimumnya

1.3. Tujuan Penelitian

1. Menentukan pengaruh temperatur dalam ekstraksi pigmen karotenoid..
2. Menentukan pengaruh waktu operasi dalam ekstraksi pigmen karotenoid.
3. Mengetahui kondisi optimum proses ekstraksi pigmen karotenoid

1.3. Manfaat Penelitian

Hasil yang diharapkan dari penelitian ini adalah suatu kondisi optimum proses ekstraksi pigmen karotenoid dari *Spirulina plantesis*.

Bagi mahasiswa, penelitian ini mendorong kreativitas untuk meningkatkan kemampuan psikomotorik dan disiplin ilmu yang dipelajari sehingga dapat memberikan kontribusi kepada industri dan masyarakat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

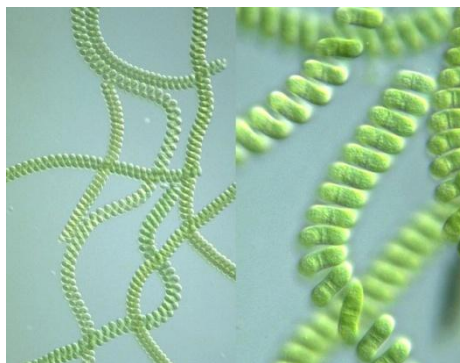
2.1. Pengertian Karotenoid.

Karotenoid merupakan pigmen organik yang terdapat secara alami pada khromoplast dari tanaman, organisme fotosintesis seperti alga (*Spirulina plantesis*, *Dunaliella sp*) serta beberapa tipe dari jamur dan bakteri. Merupakan salah satu jenis pewarna pada makanan dan merupakan kelompok pigmen terbesar yang diproduksi di alam dengan produksi tahunan diperkirakan mencapai 100.000.000 ton. Sebagian besar merupakan fucoxantin yang diproduksi dari alga yang hidup di lautan dan juga tiga pigmen utama yaitu lutein, violaxanthin, dan neoxanthin pada daun hijau. Karotenoida memegang dua peranan penting pada tanaman dan alga yaitu untuk menyerap energi cahaya yang akan digunakan dalam proses fotosintesis dan melindungi klorofil dari fotodamage (Armstrong G.A., Hearst J.E., 1996).

Untuk mendapat karotenoid biasa didapat dari ekstraksi beberapa bahan, seperti wortel, brokoli, kulit citrus, *Spirulina plantesis*, *dunaliella sp*, tomat. Warna dari karotenoida banyak menarik perhatian dari berbagai disiplin ilmu karena bermacam-macam fungsi dan sifat yang penting, warnanya berkisar dari kuning pucat sampai orange yang terkait dengan strukturnya. Karena permintaan yang tinggi dari karotenoid juga memunculkan suatu teknologi sintesis karotenoid (David H. Watson, 2002)

2.2. *Spirulina plantesis* Sebagai Sumber Karotenoid.

Spirulina plantesis merupakan salah satu jenis dari mikroalga yang banyak dimanfaatkan oleh manusia biasa hidup di danau- danau atau perairan dengan kadar garam yang tinggi. Karena memiliki kandungan nutrisi yang cukup tinggi. *Spirulina plantesis* adalah sianobakteria yang berbentuk filamen yang menghasilkan berbagai senyawa bioaktif yang bernilai tinggi antara lain karotenoida (Tri Panji & Suharyanto, 2001).



Gambar 2.1 *Spirulina plantesis* tampak dari mikroskop

Mikro organisme ini juga dapat dimanfaatkan dalam teknologi lingkungan serta memiliki kandungan protein yang cukup tinggi. Untuk analisis dari karotenoid itu sendiri bisa menggunakan HPLC, TLC, ataupun spektrofotometer (A. Pintea, et al, 2003).

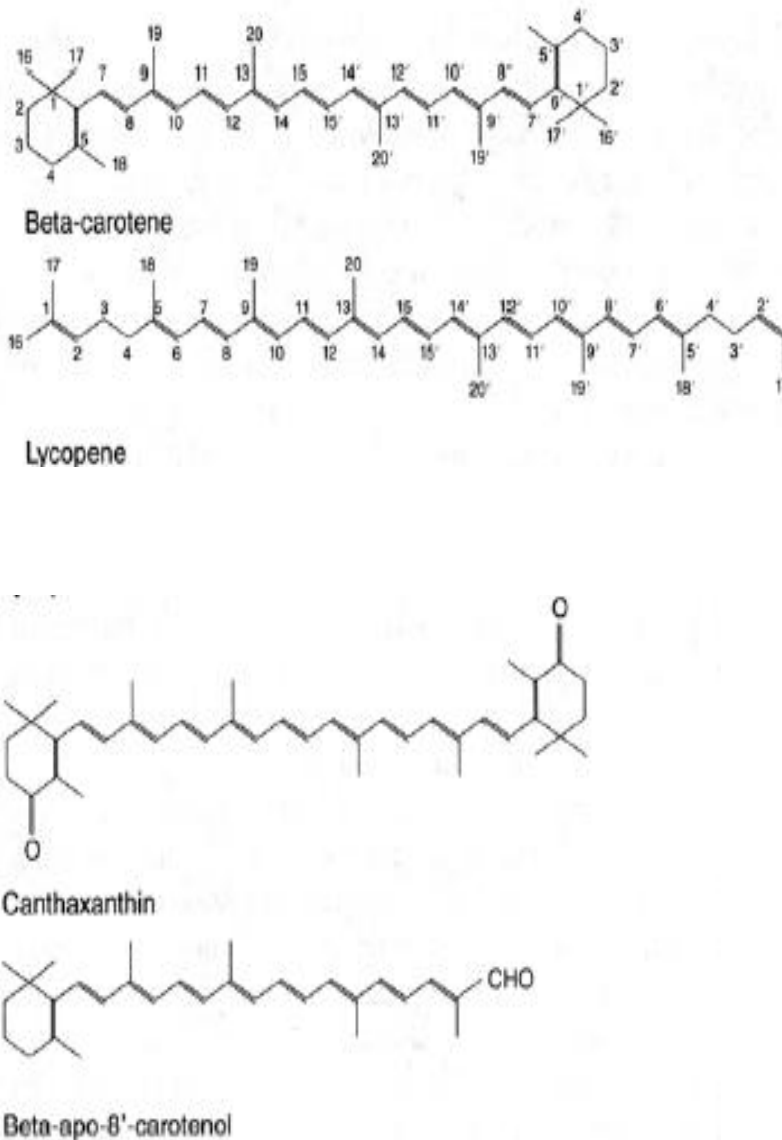
Tabel 2.1 Komponen Karotenoid yang teridentifikasi dalam *Spirulina plantesis*

No	Kandungan yang teridentifikasi	Kadar % karotenoid dalam spirulina
1	Neoxanthin	1,96
2	Violaxanthin	1,19
3	Canthaxanthin	1,21
4	Echinenone	13,49
5	Myxoxanthophyll	17,20
6	Zeaxanthin	8,70
7	Lutein	3,51
8	Phytofluence	2,84
9	Phytoene	2,84
10	β -Cryptoxanthin	20,32
11	β -Carotene	26,74

(Sethu, Priya K.M & Prabha, T N, 1996)



Gambar 2.2 *Spirulina plantesis* kering bentuk flakes



Gambar 2.4 Struktur molekul Karotenoid

Sekitar 600 senyawa karotenoid telah diketemukan.. Kemungkinan karotenoid yang terkenal terdapat pada kelompok kedua yaitu carotene yang ditemukan didalam wortel yang berwarna orange cerah. Palm oil memiliki konsentrasi karotenoid yang tinggi dimana yang paling besar adalah beta-carotene dan sisanya 20 jenis lainnya (Puah Chiew Wei, et al., 2005). Xanthophyll biasanya berwarna kuning. Ikatan karbon-karbon rangkap berinteraksi satu sama lain dalam suatu proses yang dikenal dengan konjugasi. Dimana elektron dalam molekul dapat bergerak bebas dalam area didalam molekul. Sejumlah dari ikatan rangkap yang meningkat, elektron yang ikut dalam system konjugasi mempunyai ruang yang lebih untuk bergerak. Serta membutuhkan energi yang lebih sedikit untuk merubah keadaan. Ini menyebabkan kisaran energi dari cahaya yang

diserap molekul menurun. Semakin seringnya cahaya yang diserap secara singkat dari spektrum yang terlihat, Senyawa memperoleh peningkatan dalam penampakan merah.

Sekarang ini juga mulai dikembangkan karotenoid sintesis. Beberapa memiliki struktur yang sama seperti yang terkandung dalam ekstrak karotenoid dari sumber alami. Beberapa lagi dengan modifikasi untuk meningkatkan sifatnya. Sebagai contoh yellow beta carotene disintesis pada tahun 1950 yang kemudian diikuti dengan orange beta-8-carotenal pada 1962 dan red xanthaxanthin pada 1964. Contoh dari karotenoida sintesis yang lain adalah methyl dan ethyl ester dari asam caratenoic, citraxanthin, zeaxanthin, asthaxanthin. The Hoffman LaRoche firm merupakan pioneer dari proses produksi secara komersial pewarna karotenoid synthesis

2.4. Sifat – Sifat Karotenoid.

Karotenoid mempunyai sifat yang spesial dimana tidak dimiliki oleh zat kimia yang lain. Fungsi dari karotenoid tergantung dari sifat spesial ini Sifat ini ditentukan oleh struktur molekulnya. Ciri –ciri struktural merupakan hal yang sangat penting dalam menentukan peran biologis dari karotenoid. Secara keseluruhan geometri molekul (ukuran, pola tiga dimensi, dan adanya fungsional group) adalah sangat penting untuk memastikan bahwa karotenoid sesuai dengan cellular, sub-cellular, struktur molekul pada lokasi yang tepat dan orientasinya untuk memungkinkan ini sesuai dengan fungsinya. Kemudahan system ikatan rangkap konjugasi menentukan sifat absorpsi cahaya dan kereaktifannya .

1. Bentuk tiga dimensi

Karotenoid bukanlah struktur dua dimensi datar yang sederhana. Mereka mempunyai bentuk tiga dimensi yang seksama yang sangat penting untuk menentukan fungsinya, beberapa perbedaan faktor stereo kimia memberikan kontribusi kedalam bentuk dari molekul dan harus mempertimbangkan ketika mendeskripsikan dan melukiskan struktur tiga dimensinya

a) Konfigurasi : Geometrical isomer

Beberapa karotenoid dapat ada dalam beberapa bentuk isomer geometrik. Sekarang ini banyak minat pada bentuk isomer cis, kelarutan, dan stabilitas dibandingkan dengan isomer linear all-trans memberikan kenaikan kepada perbedaan sifat biologis.

b) Konfigurasi absolute: Keulinan (*chirality*)

Kebanyakan dari karotenoid yang diketahui memiliki struktur sekurang-kurangnya satu pusat chiral atau axis. Serta tampak sebagai isomer optik yang berbeda, termasuk didalamnya enantiomer. Aksi biologi mungkin spesifik untuk satu enantiomer.

c) Penyesuaian

Pada prinsipnya rotasi memungkinan kira – kira untuk beberapa ikatan tunggal C – C. Aplikasi dari metode x-ray crystallography untuk menentukan penyesuaian meluas linear dari rantai polyene kaku, bentuk cincin, dan sudut yang diinginkan berliku – liku kira- kira C6 sampai C7 dari ikatan tunggal pada karotenoid yang berakhir dengan ikatan cincin.

2. Sistem Ikatan Rangkap Konjugasi

Karakterisasi pada bagian pusat dari struktur merupakan kunci dari banyak sifat penting karotenoid.

a) Sifat photochemical dan penyerapan cahaya.

Energi dibutuhkan untuk membawa transisi secara komparatif keadaan eksitasi energi rendah adalah relatif kecil dan kecocokan untuk cahaya pada daerah visibel pada jarak gelombang 400 – 500 nm. Ini memberikan peningkatan pada warna kuning, merah dan orange. Yang secara umum terkait dengan karotenoid. Tingkat energi dari karotenoid pada keadaan singlet atau triplet diposisikan pada karotenoid untuk berpartisipasi dalam proses transfer energi. Transfer energi singlet-singlet dan triplet-triplet ini merupakan dasar untuk peran pemanenan cahaya dan peran photophysic pada karotenoid. Dasar fundamental dari photochemistry dan photophysic karotenoid adalah peran mereka dalam proses transfer energi

b) Kereaktifan

Oksidasi merupakan implikasi praktis yang penting. Karotenoid dapat rusak jika disimpan pada tempat yang terdapat oksigen. Perawatan yang baik harus dilakukan untuk memastikan bahwa sample yang digunakan seperti untuk investigasi bebas dari peroksida dan produk degradasi lainnya.

c) Karotenoid radikal

Karotenoid radikal dan ion radikal stabil dengan adanya delokalisasi dari elektron yang tidak berpasangan sepanjang rantai polyene dan mempunyai sifat khusus yang berkaitan dengan fungsi dari karotenoid. Misalnya pada fotosintesis dan anti-oksidan atau pro-oksidan.

3. Interaksi Molekuler

Sifat fisik dan kimia dari karotenoid dipengaruhi oleh interaksi dengan molekul lainnya, seperti lemak dan protein. Karotenoid dapat mempengaruhi struktur, sifat matrik dari molekul yang berada disekitarnya.

a) Aggregation.

Karena hidrofobik yang sangat tinggi, karotenoid menunjukkan kecenderungan untuk mengalami aggregasi dan kristalisasi. Aggregation mengubah sifat dari karotenoid seperti penyerapan cahaya dan kereaktifan kimia.

b) Karotenoid pada membran.

Karotenoid merupakan senyawa kimia yang sangat hidrofobik, sehingga akan diasosiasikan dengan lemak atau struktur hidrofobik atau membran. Molekul hidrofobik sering dilokasikan ke membran alami dan merupakan bagian integral struktur membran kompleks.

c) Interaksi protein-karotenoid

Interaksi antara karotenoid dan protein terjadi pada semua jenis organisme hidup. Interaksinya dapat merubah sifat fisik dan kimia dari karotenoid (G Britton, S Liaaen Jensen, H Pfander, 2008)

2.5. Manfaat Karotenoid.

Karotenoid banyak dikonsumsi orang dari makanan alami seperti buah dan sayur-sayuran karena lebih sehat serta memiliki angka kematian yang rendah dari beberapa penyakit kronis. Pada manusia karotenoid seperti β -carotene sangat berperan sebagai prekursor dari vitamin A, suatu pigmen yang sangat penting untuk proses penglihatan, karotenoid juga berperan sebagai anti oksidan dalam tubuh (M. Ravi, et al., 2010). Karotenoid merupakan scavenger yang efisien untuk radikal bebas serta dapat secara signifikan mengurangi resiko dari penyakit kanker (R. Henrikson, 2009).

Selain itu karotenoid juga banyak digunakan sebagai bahan tambahan pada makanan yaitu sebagai pewarna makanan (Alan Mortensen, 2006), seperti ekstrak dari

kulit citrus digunakan sebagai pewarna pada orange jus sejak meningkatnya harga pewarna jus. Safron banyak dimanfaatkan sebagai bumbu masakan karena rasanya dan warna yang di inginkan. Anato berperan selain sebagai pewarna makanan juga dimanfaatkan sebagai pewarna pada industri textile dan kosmetik, Astaxathin merupakan suatu pewarna pada trout dan salmon (R. Henrikson,2009). Preparasi dari tomat telah digunakan secara luas untuk menyediakan pewarna pada bahan-bahan makanan (David H Watson, 2008)

Pada organisme fotosintesis, khususnya tanaman, karotenoid memegang peranan yang sangat penting dalam reaksi utama fotosintesis karena berpartisipasi dalam proses transfer energi, atau melindungi reaksi utama dari auto-oxidation (R. J. Cogdell and others, 2000). Pada organisme non-fotosintesis, khususnya manusia karotenoid berhubungan dengan mekanisme pencegahan oksidasi. Produk dari degradasi karotenoida seperti ionones, damascones, dan damascenones juga sangat penting dalam zat pewangi kimia sehingga sangat sering digunakan dalam industri parfum dan wewangian. Beta-damascenones dan beta-ionone meskipun dalam konsentrasi yang rendah pada distilasi bunga mawar, merupakan senyawa kunci yang memberikan kontribusi wangi (Xiaofen Du, 2009). Secara nyata bau harum bunga yang muncul pada the hitam, tembakau tua, anggur, dan banyak buah berhubungan dengan senyawa aromatis hasil dari perusakan karotenoid.

2.6. Ekstraksi.

Dalam suatu proses kimia akan melibatkan suatu proses pemisahan, proses pemisahan tersebut terdapat beberapa jenis antara lain. distilasi, absorpsi, desorpsi, kristalisasi, adsorpsi, leaching, membrane.

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan dari bahan padat maupun cair dengan bantuan pelarut. Pelarut yang digunakan harus dapat mengekstrak substansi yang diinginkan tanpa melarutkan material lainnya

Ekstraksi padat cair atau leaching adalah transfer difusi komponen terlarut dari padatan inert ke dalam pelarutnya. Proses ini merupakan proses yang bersifat fisik karena komponen terlarut kemudian dikembalikan lagi ke keadaan semula tanpa mengalami perubahan kimiawi. Ekstraksi dari bahan padat dapat dilakukan jika bahan yang diinginkan dapat larut dalam solven pengekstraksi. Ekstraksi berkelanjutan

diperlukan apabila padatan hanya sedikit larut dalam pelarut. Namun sering juga digunakan pada padatan yang larut karena efektivitasnya

Proses pemisahan secara ekstraksi dilakukan jika campuran yang akan dipisahkan berupa larutan homogen (cair-cair) dimana titik didih komponennya hampir sama atau berdekatan. Proses pemisahan dari campuran melibatkan tiga langkah yaitu:

- Langkah pencampuran
- Langkah pembentukan fase kedua yang kemudian diikuti dengan terwujudnya keadaan kesetimbangan.
- Langkah pemisahan

Pada ekstraksi fase cairan kedua akan segera terbentuk ketika sejumlah solven (Mass Separating Agent) ditambahkan kedalam fase campuran atau cairan satu. Kontak antara fase cairan satu dan fase cairan kedua dipertahankan sehingga akan terjadi suatu kesetimbangan.

Faktor-faktor yang mempengaruhi laju ekstraksi adalah:

- Tipe persiapan sampel
- Waktu ekstraksi
- Kuantitas pelarut
- Suhu pelarut
- Tipe pelarut

Sebagai tenaga pemisah digunakan solven. Beberapa solven yang biasa digunakan antara lain : Caustic soda, Propan, furfural, naptha, amyl acetate, butanol, ethyl acetate, ammonia, benzene, nitrobenzen , tri butyl phosphate, hexane, methanol, ethanol, petroleum eter. Solven sebagai tenaga pemisah dalam operasi ekstraksi juga memiliki persyaratan sebagai berikut:

- Daya larut terhadap solute cukup besar.
- Sama sekali tidak melarutkan diluen atau hanya sedikit melarutkan diluen.
- Antar solven dengan diluen harus mempunyai perbedaan density yang cukup.
- Antara solven dengan solute harus mempunyai perbedaan titik didih atau tekanan uap murni yang cukup.
- Tidak beracun.
- Tidak bereaksi baik terhadap solute maupun diluen.
- Murah.
- Mudah didapat.

(Hery Santosa, 2002)

Dalam percobaan yang akan dilakukan digunakan solven n heksane. Alasan pemilihan solven dikarenakan telah memenuhi syarat seperti tersebut diatas serta daya larut terhadap karotenoid yang cukup baik (N. Othman et al, 2010)

2.7. Spektrofotometri.

Spektrofotometer merupakan suatu alat untuk mengukur transmitansi atau absorbansi suatu contoh sebagai fungsi dari panjang gelombang dan salah satu cabang analisis instrumental yang membahas segala sesuatu tentang iteraksi sinar dengan molekul adalah spektrofotometri. Unsur-unsur yang terdapat pada spektrofotometer antara lain :

- Sumber energi radiasi: kontinyu dan dan meliputi daerah spektrum yang sesuai.
- Monokromator: Alat untuk mengisolasi suatu berkas sempit dari panjang gelombang yang mempunyai spektrum yang luas dari suatu sumber.
- Wadah untuk contoh : Biasa disebut cuvert
- Detektor : Tranducer yang mengubah energi radiasi menjadi isyarat listrik
- Penguat : Membuat isyarat listrik menjadi cocok untuk diamati.
- Sistem pembacaan : Dapat mempertujukan besarnya isyarat listrik.



Gambar 2.5 Spektrofotometer UV-Vis

Penerapan spektrofotometrik

Hukum Beer :

Absorbans, $\log (P_0/P)$, radiasi monokromatik berbanding lurus dengan konsentrasi satu spesies penyerap dalam larutan.

Hukum Bouguer (Lambert) :

Bayangkan suatu medium penyerap yang homogen dalam lapisan-lapisan yang sama tebal. Tiap lapisan menyerap radiasi monokromatik yang memasuki lapisan itu dalam fraksi yang sama seperti lapisan-lapisan lain. Dengan semuanya yang lain sama, maka absorbans itu berbanding lurus dengan panjang jalan yang melewati medium

Prinsip analisis kuantitatif dengan spektrofotometri UV / sinar tampak berdasarkan persamaan **Lambert – Beer**:

$$A = \lambda b c$$

A : Absorbans

λ : Absortivitas molar larutan

b : Lebar sel yang dilewati sinar

c : Konsentrasi analit

Hubungan antara warna dengan panjang gelombang sinar tampak.:

Panjang gelombang warna yang diserap warna komplementer

400-435 nm → ungu (lembayung) hijau kekuningan

450-480 nm → biru kuning

480-490 nm → biru kehijauan orange

490-500 nm → hijau kebiruan merah

500-560 nm → hijau merah anggur

560-580 nm → hijau kekuningan ungu (lembayung)

580-595 nm → kuning biru

595-610 nm → orange biru kekuningan

610-750 nm → merah hijau kebiruan

Penentuan kadar merupakan hubungan antara absorbansi dan konsentrasi.

Pengukuran larutan sampel dapat dilakukan sebagai berikut :

- Ambil larutan sampel
- Asamkan dengan HCl sampai ph 1
- Encerkan dengan aquadest
- Mengukur T pada λ tertentu
- Menghitung konsentrasi

Cara analisis yang biasa digunakan :

1. Cara langsung

Keterangan:

$$\text{Jumlah kuadrat regresi (SSR)} = \sum (Y_p - Y_{\text{rata-rata}})^2$$

$$\text{Jumlah kuadrat error (SSE)} = \sum (Y_o - Y_p)^2$$

$$\text{Jumlah kuadrat total (SST)} = \sum (Y_o - Y_{\text{rata-rata}})^2$$

Y_p = Harga prediksi dari persamaan model matematik

Y_o = Harga hasil percobaan

$Y_{\text{rata-rata}}$ = Harga rata-rata dari hasil percobaan

p = Jumlah suku dalam persamaan matematik

N = Jumlah data pengamatan/run

Jika harga F hitung $>$ F tabel maka hipotesa H_o ditolak sehingga dapat disimpulkan harga koefisien dalam persamaan model matematik tidak semuanya nol.

2.10 Sifat fisis dan Kimia Reagent

Hexane

MSDS Name: Hexane

Generic ID: n-Hexane, Hexyl-hydride, Dipropyl, normal-Hexane, Hex

Sifat fisis :

- bentuk: Cair
- Berat molekul 86.18 g/mol
- Cairan tidak berwarna
- Densitas 0.6548 g/ml, liquid
- Titik leleh -95 °C (178 K)
- Titik didih 69 °C (342 K)
- Viskositas 0.294 cp pada 25 °C

Sifat kimia :

- Mudah terbakar
- Rumus Kimia : C_6H_{14}

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Kondisi Operasi

Untuk mencapai tujuan penelitian seperti yang disebutkan pada sub-bab tujuan penelitian perlu dilakukan percobaan dengan variabel-variabel sebagai berikut:

- a) Variabel tetap.
 - massa Spirulina : 9 gram
 - Volume solvent : 270 ml
 - Jenis solvent : n-hexane
- b) Variabel berubah
 - Temperatur : 30 ; 40 ; 50 ; 60°C
 - Waktu Ekstraksi : 1 ; 2 ; 3 ; 4 jam
 - Pretreatment bahan : serbuk dan flakes

3.2 Parameter yang diamati/respon yang diambil

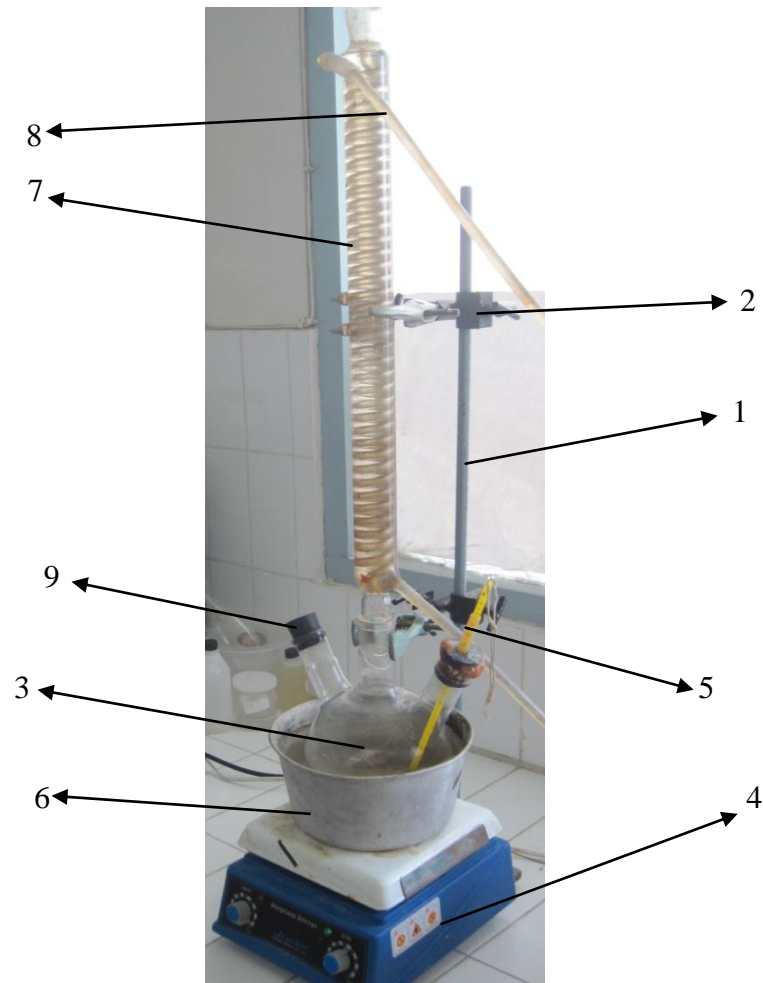
Dengan menggunakan Spektrofotometer, mengukur Absorbansi pada λ 480, 645, 663, dan di hitung besarnya konsentrasi sampel.

3.3 Alat dan Bahan

1. Alat yang digunakan.

- a. Alat utama Ekstraksi

Alat utama yang digunakan adalah rangkaian alat ekstraksi. Alat ini terdiri dari labu leher tiga, pendingin balik, statif, klem, termometer, magnetic stirer, pemanas, dan bak pemanas. Pada leher labu kanan dan kiri, dipasang sumbat untuk mencegah terjadinya penguapan solvent yang sifatnya udah menguap. Akan tetapi, salah satunya di lubangi untuk tempat memasang termometer sebagai indikator suhu operasi. Leher bagian tengah disambungkan dengan pendingin balik.



Gambar 3.1 Alat Utama Ekstraksi

Keterangan:

- | | |
|--|----------|
| 1. Statif | : 1 buah |
| 2. Klem | : 2 buah |
| 3. Labu leher tiga 500 ml | : 1 buah |
| 4. Magnetic stirrer + pemanas | : 1 buah |
| 5. Termometer | : 1 buah |
| 6. Bak pemanas | : 1 buah |
| 7. Pendingin balik | : 1 buah |
| 8. Selang kecil berdiameter 4 mm dengan panjang 1 meter sebanyak 2 buah. | |
| 9. Sumbat gabus | : 2 buah |

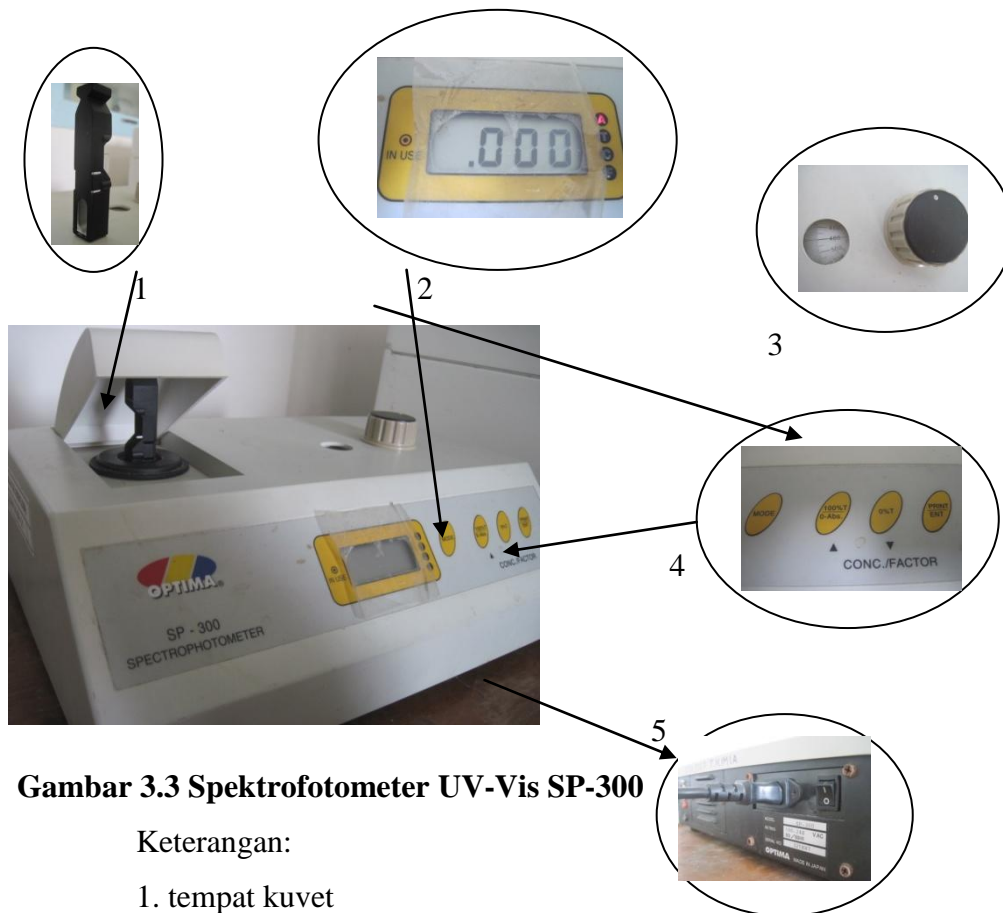


Gambar 3.2 Magnetic stirrer

Keterangan:

1. papan magnetic + papan pemanas
 2. indikator stirrer
 3. pengatur kecepatan stirrer
 4. indikator panas
 5. pengatur panas
- b. Alat analisa Spektrofotometer

Untuk menganalisa sampel, digunakan spektrofotometer Type SP-300



Gambar 3.3 Spektrofotometer UV-Vis SP-300

Keterangan:

1. tempat kuvet
2. layar pengamatan

3. pengatur λ
4. tombol konfigurasi
5. bagian belakang, tombol power

c. Alat tambahan

- 1). Beaker glass : 1 buah
- 2). Pipet ukur : 1 buah
- 3). Botol sampel : 32 buah
- 4). Corong : 1 buah
- 5). Pipet tetes : 1 buah
- 6). Kertas saring Whatman : 1 x 1 meter
- 7). Karet penghisap : 1 buah

2. Bahan yang digunakan.

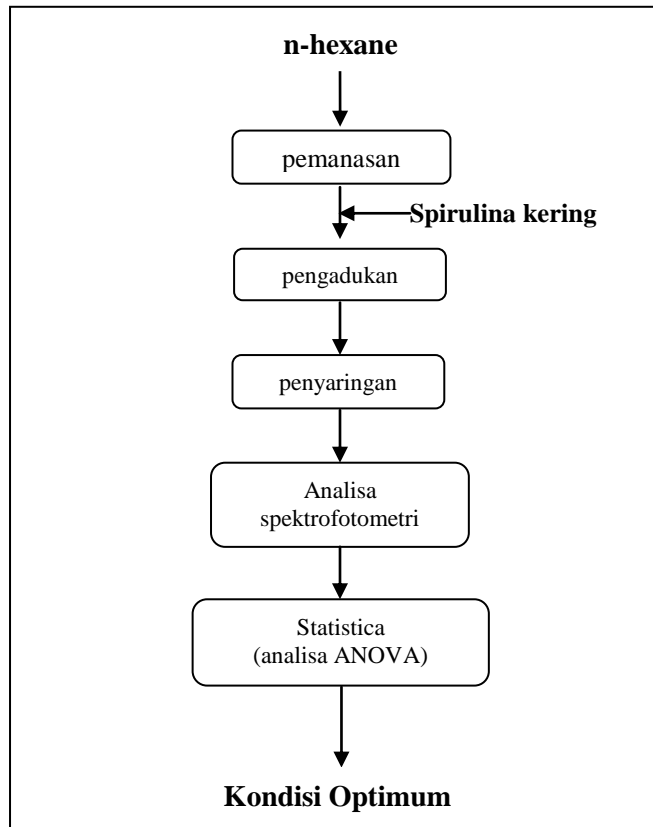
- *Spirulina plantesis*

Bahan ini didapat dari Balai Besar Penelitian Air Payau (BBPAP) Jepara.

- n-Hexane

3.4 Langkah Kerja

Gambaran umum penelitian:



Gambar 3.4 Diagram alir proses ekstraksi karotenoid dari *Spirulina plantesis*

Proses ekstraksi:

- 1 Rangkai alat utama ekstraksi.
- 2 Masukkan 270 ml n-hexane ke dala labu leher tiga.
- 3 Nyalakan pemanas, atur hingga suhu 30 °C.
- 4 Tambahkan *Spirulina plantesis* sebanyak 9 gram.
- 5 Nyalakan pengaduk pada kecepatan konstan.
- 6 Amati dan mulai hitung waktu ekstraksi.
- 7 Ambil sampel sebanyak 5 ml untuk di analisa setiap 1 jam sekali, selama 4 jam.
- 8 Simpan dalam wadah tertutup dan terlindung dari sinar matahari.
- 9 Ulangi langkah 2 sampai 8 pada suhu 40, 50, dan 60°C.

3.5 Teknik Pengumpulan Data dan Analisis Data

1. Metode Pengumpulan Data

Parameter yang dianalisis adalah nilai Absorbansi. Untuk memperoleh data, sampel dianalisa dengan Spektrofotometer.

2. Metode Analisis Data

Analisis yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis ANOVA dengan bantuan program STATISTICA 6

3.6 Hipotesis

Semakin lama waktu dan suhu operasi maka konsentrasi karotenoid yang terambil akan semakin besar.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4. 1. Hasil Percobaan Ekstraksi Pigmen Karotenoid.

Tabel 4.1 Hasil Percobaan Ekstraksi Pigmen Karotenoid dari *Spirulina plantesis*

Suhu (°C)	Waktu (Jam)	Kadar Variabel Flakes (mg/100gr)	Kadar Variabel Serbuk (mg/100gr)
30	1	25,70	78,07
30	2	26,68	79,36
30	3	27,54	80,25
30	4	28,48	80,49
40	1	32,91	84,84
40	2	33,41	86,95
40	3	33,61	87,86
40	4	33,96	88,34
50	1	32,98	89,02
50	2	33,97	90,12
50	3	34,63	90,61
50	4	33,99	91,27
60	1	31,62	89,63
60	2	31,60	89,33
60	3	31,09	89,13
60	4	30,83	88,76

Tabel diatas menunjukkan hasil dari ekstraksi pigmen karotenoid, pada penelitian optimasi ini digunakan tiga variabel berubah yaitu suhu, waktu dan bentuk dari sample (bentuk kepingan/flakes dan bentuk serbuk). Respon yang diamati adalah kadar karotenoid hasil ekstraksi. Data tersebut kemudian diolah dengan bantuan software Statistica.6. untuk mengetahui kondisi optimum dari data percobaan tersebut.

4.2. Pembahasan Untuk Variabel Bentuk Sampel Serpihan / Flakes

Dengan menggunakan bantuan program Statistika 6 akan didapat estimasi efek utama kuadrat dan linear, interaksi dan juga harga koefisien persamaan model, sehingga akan didapat persamaan matematika.

Tabel 4.2. Hasil Analisa Koefisien Regresi Variabel Bentuk Sampel Flakes

Faktor	Koefisien Regresi
Mean/ interc	-22,5737
(1)Temperatur (L)	2,2400
Temperatur (Q)	-0,0224
(2)Waktu (L)	2,5932
Waktu (Q)	-0,1287
1L by 2L	-0,0358

(L)=Linear ; (Q)=Kuadrat

Harga estimasi efek pada tabel 4.2 menunjukkan besarnya pengaruh masing-masing variabel terhadap kadar karotenoid yang berhasil di ekstraksi. Semakin besar harga efek estimasi suatu variabel menunjukkan semakin besar pengaruh variabel tersebut kadar karotenoid yang berhasil di ekstraksi. Variabel linear suhu dan variabel linear waktu memberikan efek positif terhadap kadar karotenoid yang berhasil di ekstraksi. Sedangkan variabel kuadrat suhu, kuadrat waktu, dan interaksi antara suhu linear dengan waktu linear memberikan efek negatif terhadap kadar karotenoid yang berhasil di ekstraksi. Dengan demikian Variabel linear suhu dan variabel linear waktu akan memberikan pengaruh terhadap bertambahnya jumlah karotenoid yang berhasil di ekstraksi pada hasil prediksi. Sedangkan variabel kuadrat suhu, kuadrat waktu, dan interaksi antara suhu linear dengan waktu linear akan memberikan pengaruh terhadap berkurangnya jumlah karotenoid yang berhasil di ekstraksi pada hasil prediksi.

Persamaan matematika yang diperoleh adalah:

$$Y = -22,57 + 2,24x_1 + 2,59x_2 - 0,02x_1^2 - 0,13x_2^2 - 0,04x_1x_2 \quad (1)$$

$$\text{dengan } x_1 = \frac{X_1 - 45}{15} \quad x_2 = \frac{X_2 - 2,5}{1,5}$$

Keterangan :

x_1 : variabel tak berdimensi suhu

X_1 : variabel suhu ($^{\circ}\text{C}$)

- x_2 : variabel tak berdimensi waktu
- X_2 : variabel waktu (jam)
- Y : kadar hasil ekstraksi, (mg/100gr)

Untuk menguji signifikansi persamaan model regresi/matematika pada persamaan (1) digunakan hipotesa H_0 dan H_1 serta tabel analisa varian (tabel 4.3).

H_0 : semua parameter/ koefisien regresi mempunyai harga 0 (kecuali β_0).

H_1 : paling sedikit 1 parameter/koefisien regresi tidak mempunyai harga 0

Tabel 4.3 Hasil Analisa Varian untuk Variabel Bentuk Sampel Flakes

Sumber variasi	Jumlah kuadrat	Derajat kebebasan	Rata-rata kuadrat	Nilai F	$F_{\alpha=1\%}$
Regresi	120,06715	5	24,0134	91,04618	5,64
Residu	2,6375	10	0,26375		
Total	122,6815	15			

Harga F perhitungan adalah 91,04618. Sedangkan harga $F_{5,10}$ ($F_{p-1, N-p}$) pada tabel distribusi F (Lampiran 4) dengan tingkat kepercayaan $\alpha = 1\%$ adalah 5,64. H_0 dinyatakan ditolak jika $F > F_{5,10}$. Ternyata F perhitungan lebih besar daripada F tabel sehingga H_0 dinyatakan ditolak yang berarti bahwa semua parameter/koefisien regresi tidak berharga 0.

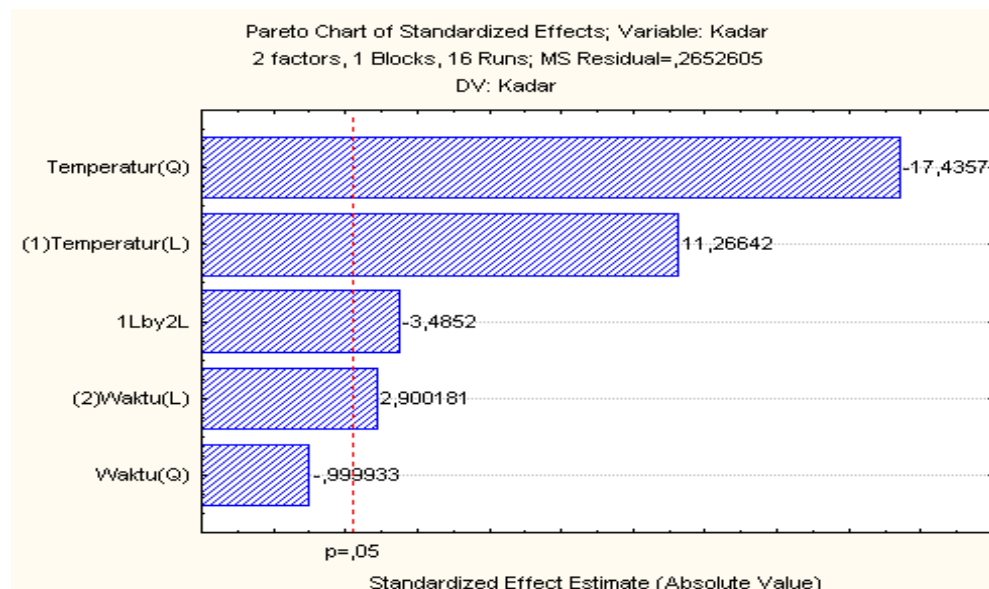
Dari data tersebut juga diperoleh $R^2 = 0,97838$ nilai tersebut mendekati satu sehingga dapat disimpulkan bahwa model matematika yang didapat signifikan dengan data percobaan. Untuk selanjutnya akan ditampilkan perbandingan antara hasil pengamatan dan prediksi.

Tabel 4.4 Hasil Observasi dan Prediksi Untuk Variabel Bentuk sampel Flakes

Run	Observasi	Prediksi
1	25,70	25,81
2	26,68	26,94
3	27,54	27,81
4	28,48	28,43
5	32,91	32,14
6	33,41	32,91

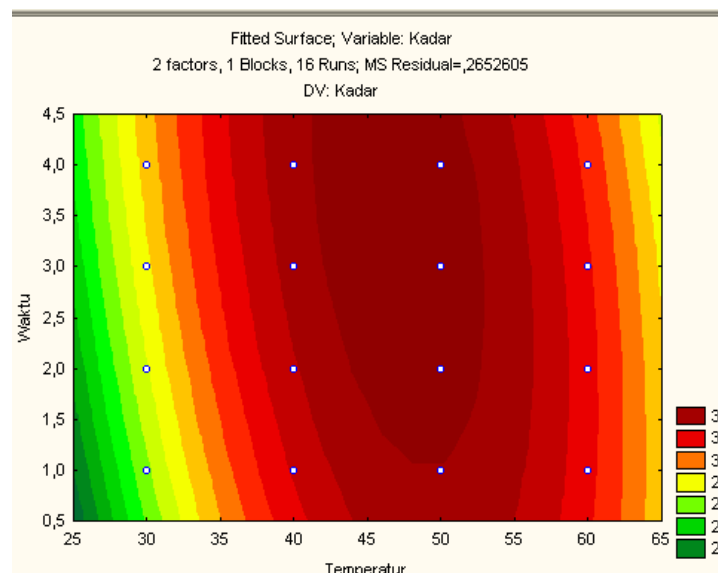
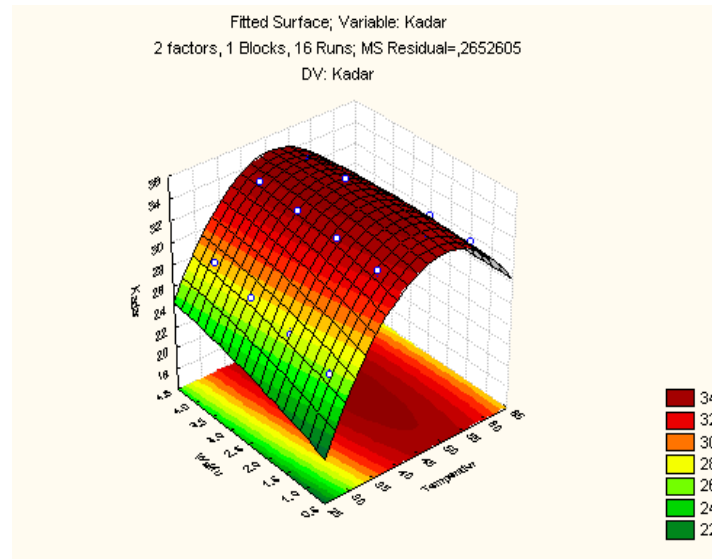
7	33,61	33,42
8	33,96	33,68
9	32,98	33,97
10	33,97	34,38
11	34,63	34,54
12	33,99	34,44
13	31,62	31,32
14	31,60	31,37
15	31,09	31,17
16	30,83	30,70

Selanjutnya dari koefisien regresi diatas akan dapat diperjelas dalam Pareto Chart pada Gambar 4.1 untuk setiap variabel tersebut.



Gambar 4.1. Pareto Chart Variabel Bentuk Sample Flakes

Gambar menunjukkan bahwa variabel yang paling berpengaruh adalah temperatur dalam model kuadrat (Q), sedangkan interaksi kedua variabel (1L by 2L) menunjukkan efek yang cukup besar sehingga pengaruh suatu variabel dipengaruhi variabel yang lain.



Gambar 4.2 Profil Response Fitted Surface dan Fitted Response Profile dengan Response Kadar Karotenoid Hasil Ekstraksi Untuk Variabel Bentuk Sample Flakes

Grafik response fitted surface yang dihasilkan menyerupai bentuk dari parabola dan Fitted Response Profile berbentuk oval. Hal ini menunjukkan bahwa jenis optimasi proses adalah maksimasi. Untuk nilai dari optimasinya adalah sebagai berikut.

Tabel 4.5 Nilai Kritis Untuk Variabel Bentuk Sampel Flakes

Faktor	Observed Minimum	Critical Value	Observed Maximum
Temperatur (°C)	30	47,1	60
Waktu (jam)	1	3,5	4

Dapat disimpulkan bahwa nilai maksimum untuk temperatur adalah 47,1°C dan waktunya adalah 3,5 jam.

4.3. Pembahasan Untuk Variabel Bentuk Sampel Serbuk

Sama seperti pada variabel sampel bentuk flakes, maka untuk variabel bentuk serbuk dilakukan olah data dengan menggunakan program Statistica 6, sehingga didapat hasil seperti berikut:

Tabel 4.6 Hasil Analisa Koefisien Regresi Variabel Bentuk Sampel Serbuk

Faktor	Koefisien Regresi
Mean/ interc	24,9540
(3)Temperatur (L)	2,3272
Temperatur (Q)	-0,0212
(4)Waktu (L)	3,2639
Waktu (Q)	-0,1994
1L by 2L	-0,0370

(L)=Linear ; (Q)=Kuadrat

Harga estimasi efek pada tabel 4.6 menunjukkan besarnya pengaruh masing-masing variabel terhadap kadar karotenoid yang berhasil di ekstraksi. Semakin besar harga efek estimasi suatu variabel menunjukkan semakin besar pengaruh variabel tersebut kadar karotenoid yang berhasil di ekstraksi. Variabel linear suhu dan variabel linear waktu memberikan efek positif terhadap kadar karotenoid yang berhasil di ekstraksi. Sedangkan variabel kuadrat suhu, kuadrat waktu, dan interaksi antara suhu linear dengan waktu linear memberikan efek negatif terhadap kadar karotenoid yang berhasil di ekstraksi. Dengan demikian Variabel linear suhu dan variabel linear waktu akan memberikan pengaruh terhadap bertambahnya jumlah karotenoid yang berhasil di ekstraksi pada hasil prediksi. Sedangkan variabel kuadrat suhu, kuadrat waktu, dan interaksi antara suhu linear dengan waktu linear akan memberikan pengaruh terhadap berkurangnya jumlah karotenoid yang berhasil di ekstraksi pada hasil prediksi.

Sehingga di dapat model persamaan matematika:

$$Y=24,95 + 2,33 x_1 + 3,26 x_2 - 0,02 x_1^2 - 0,199x_2^2 - 0,04 x_1x_2 \quad (2)$$

$$x_1 = \frac{X_1-45}{15} \quad x_2 = \frac{X_2-2,5}{1,5}$$

Untuk menguji signifikansi persamaan model regresi/matematika pada persamaan (2) digunakan hipotesa H_0 dan H_1 serta tabel analisa varian (tabel 4.7).

H_0 : semua parameter/ koefisien regresi mempunyai harga 0 (kecuali β_0).

H_1 : paling sedikit 1 parameter/koefisien regresi tidak mempunyai harga 0

Tabel 4.7 Hasil Analisa Varian untuk Variabel Bentuk Sampel Serbuk

Sumber variasi	Jumlah kuadrat	Derajat kebebasan	Rata-rata kuadrat	Nilai F	$F_{\alpha=1\%}$
Regresi	291,5003	5	58,3001	220,80847	5,64
Residu	2,6403	10	0,26403		
Total	294,35044	15			

Harga F perhitungan adalah 220,80847. Sedangkan harga $F_{5,10}$ ($F_{p-1,N-p}$) pada tabel distribusi F (Lampiran D) dengan tingkat kepercayaan $\alpha = 1\%$ adalah 5,64. H_0 dinyatakan ditolak jika $F > F_{5,10}$. Ternyata F perhitungan lebih besar daripada F tabel sehingga H_0 dinyatakan ditolak yang berarti bahwa semua parameter/koefisien regresi tidak berharga 0.

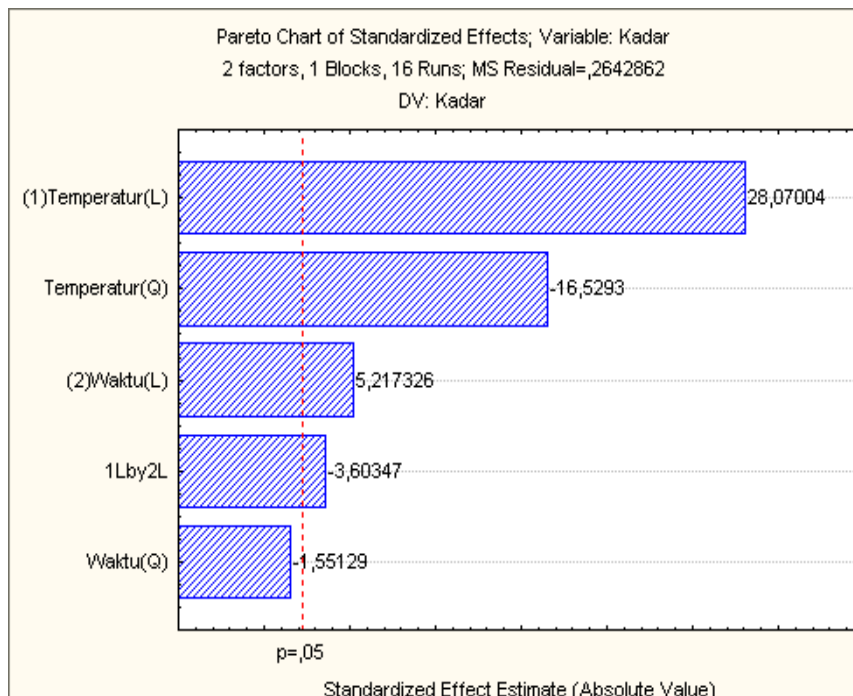
Dari data tersebut didapat nilai $R^2=0,99102$, nilai tersebut mendekati satu yang menunjukkan bahwa model matematika yang diperoleh signifikan dengan data hasil percobaan, untuk perbandingan antara hasil prediksi dan observasi dapat dilihat pada Tabel 4.8 sebagai berikut:

Tabel 4.8 Hasil Observasi dan Prediksi Untuk Variabel Bentuk Sampel Serbuk

Run	Observasi	Prediksi
1	78,07	77,61
2	79,36	79,16
3	80,25	80,32
4	80,49	81,07
5	84,84	85,64
6	86,95	86,82
7	87,86	87,61
8	88,34	87,99
9	89,02	89,42

10	90,12	90,23
11	90,61	90,65
12	91,27	90,66
13	89,63	88,95
14	89,33	89,40
15	89,13	89,43
16	88,76	89,08

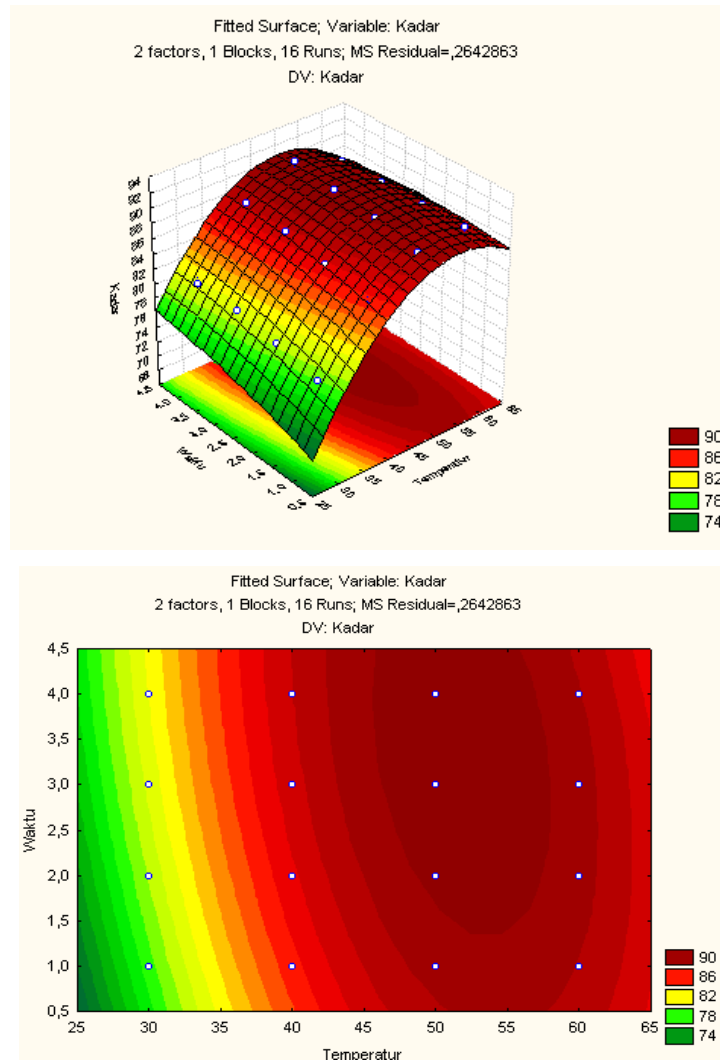
Selanjutnya dari koefisien regresi diatas akan dapat diperjelas menggunakan Pareto chart pada Gambar 4.3 berikut:



Gambar 4.3. Pareto Chart Variabel Bentuk Sample Serbuk

Dapat disimpulkan dari pareto chart diatas bahwa variabel yang mempunyai pengaruh paling besar adalah temperatur dengan model linear (L), untuk interaksi kedua variabel (1L by 2L)menunjukkan hasil yang besar pula sehingga pengaruh suatu variabel dipengaruhi variabel yang lain.

Profil Estimasi Proses.



Gambar 4.4 Profil Response Fitted Surface dan Fitted Response Profile dengan Response Kadar Pigmen Hasil Ekstraksi Variabel Bentuk Sample Serbuk

Karena didapat profil response fitted surface menyerupai bentuk parabola dan profil fitted response profile berbentuk oval sehingga diperoleh jenis optimasi maksimasi, dengan nilai maksimum :

Tabel 4.9 Nilai Kritis Untuk Variabel Bentuk Sampel Serbuk.

Faktor	Observed Minimum	Critical Value	Observed Maximum
Temperatur (°C)	30	51,9	60
Waktu (jam)	1	3,4	4

Maka nilai maksimum untuk variabel spirulina bentuk serbuk didapat pada temperature 51,9°C dan waktu ekstraksi selama 3,4 jam.

4.4. Perbandingan Antara Kadar yang diperoleh pada Variabel Bentuk Sample Flakes dan Serbuk

Melihat data seperti yang disajikan pada table IV.1 dapat disimpulkan bahwa variabel bentuk sample serbuk akan menghasilkan kadar yang lebih tinggi apabila dibandingkan dengan bentuk sample flakes. Hal ini terkait dengan luas permukaan serbuk lebih besar jika dibanding dengan flakes, semakin luas permukaan sentuh antara solvent dengan sample maka proses ekstraksi berjalan semakin baik dan menandakan transfer masa pigmen karotenoid dari spirulina ke dalam solven semakin banyak, sehingga kadar yang diperoleh dalam bentuk sample serbuk juga semakin besar.

Pada kedua variabel bentuk sampel terlihat kadar akan meningkat seiring dengan meningkatnya temperature, akan tetapi setelah mencapai titik tertentu akan terjadi penurunan. Hal ini dikarenakan laju reaksi akan meningkat dengan naiknya temperature reaksi, namun apabila temperature reaksi terlalu tinggi maka karotenoid akan rusak. Karotenoid akan mudah terdegradasi pada suhu yang terlalu tinggi (Delia B. Rodriguez-Amaya and Mieko Kimura, 2004). Pada saat ekstraksi mencapai titik optimum menandakan bahwa pada saat tersebut karotenoid telah banyak dipisahkan dari struktur sel spirulina, perubahan suhu pada proses ekstraksi telah optimal untuk dapat melepaskan karotenoid dari struktur sel tersebut.

Peningkatan kadar karotenoid pada kedua variabel bentuk sampel juga terjadi pada saat peningkatan waktu ekstraksi, Hal ini disebabkan karena semakin lama waktu ekstraksi maka kontak antara sampel dan pelarut akan semakin lama. Apabila waktu kontak semakin lama maka proses pelarutan karotenoid dari spirulina akan terjadi sampai pelarut jenuh terhadap karotenoid.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Kadar optimum pada proses ekstraksi pigmen karotenoid dari spirulina untuk bentuk sampel flakes diperoleh pada kondisi temperatur 47,1°C dan waktu 3,5 jam.
2. Kadar optimum pada proses ekstraksi pigmen karotenoid dari spirulina untuk bentuk sampel serbuk diperoleh pada kondisi temperatur 51,9°C dan waktu 3,4 jam.
3. Kadar karotenoid yang diperoleh pada ekstraksi bentuk sampel flakes lebih tinggi dibandingkan dengan bentuk sampel serbuk.

5.2. Saran

1. Selama proses ekstraksi berlangsung, suhu operasi selalu dijaga konstan dan jangan terlalu tinggi karena dapat merusak senyawa karotenoid.
2. Karena karotenoid sangat sensitive terhadap cahaya, maka dalam proses ekstraksi maupun penyimpanan dilakukan dalam tempat yang redup/kurang cahaya atau bahkan tempat yang gelap.
3. Untuk penelitian lebih lanjut, bila dimungkinkan dalam keadaan vakum, karena sifatnya yang mudah teroksidasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahsan, M., Habiba, B., and Parvin, Mashuda (2008), "A Review On Culture, Production And Use Of *Spirulina* As Food For Humans And Feeds For Domestic Animals And Fish", FAO Fisheries and Aquaculture Circular, Rome.
- Armstrong G.A., Hearst J.E., (1996) "Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis". *Faseb J.*, 10 (2), 228–37
- Button, G., Liaaen-Jensen, S., and Fanden, H.P., 2008, *Carotenoids*, volume 4, Birkhäuser, Berlin.
- Cogdell, Richard J., Howard Tina D., Bittl, R., Schlodder, E., Geisenheimer, I., and Lubitz, Wolfgang., (2000), "How carotenoids protect bacterial Photosynthesis", *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 355, pp. 1345-1349
- Day, R.A dan Underwood, A.L., 1992, *Analisis Kimia Kuantitatif*, edisi 5, Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Du, Xiaofen, (2009), "Aroma Investigation Of 'Marion' And Thornless Blackberries In Pacific Northwest Of America", Dissertation Doctoral, Oregon State University, USA.
- Fraser, Paul D., and Bramley, Peter M., (2005) , "Methodologies for the Analysis of Fungal Carotenoids", DOI, Vol. 18, pp. 273-282.
- Hendry, G.A.F. and Grime, J.P., (1993), "Methods on Comparative Plant Ecology, A Laboratory Manual", Chapman and Hill, London.
- Henrikson, R, (2009), "Earth Food *Spirulina* How this remarkable blue-green algae can transform your health and our planet", Ronore Enterprises, Inc. , Hawaii, USA.
- Hsieh, L. K., Tung-Ching Lee, Chichester, C. O., And Simpson, K. L., (1974), "Biosynthesis of Carotenoids in *Brevibacterium* sp. KY-43131", *Journal Of Bacteriology*, Vol. 118, pp. 385-393
- Khachik, F., Beecher, G.R., Wittaker, N.F., (1986), "*J. Agric. Food Chem.*", 34, pp. 603- 616
- Mortensen A., (2006), "Carotenoids and other pigments as natural Colorants", *Pure Appl. Chem.*, Vol. 78, No. 8, pp. 1477–1491.
- Othman, N., Manan, Z. A., Wan Alwi, S. R., Sarmidi, M. R., (2010), " A Review of Extraction Technology for Carotenoids and Vitamin E Recovery from Palm Oil", *Jurnal of Applied Sciences*, 10 (12): 1187-1191, Denmark.

- Pintea, A., Bele, C., Andrei, S., Socaciu, C., (2003), "HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers", *Acta Biologica Szegediensis*, Volume 47(1-4), pp. 37-40.
- Ravi, M., De, Sai L., Azharuddin, S., Paul, Solomon F. D., (2010), "The beneficial effects of spirulina focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties", *Nutrition and Dietary Supplements 2010*, 2, pp. 73–83, Dove Medical Press Ltd.
- Rodriguez-Amaya, Delia B., Kimura, Mieko., (2004), "*HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*", IFPRI and CIAT, pg 21-22, Washington.
- Santosa, Hery, 2002, *Operasi Teknik Kimia III*.
- Spolaore, P., Joanis-Casson, C., Duran, E., Isant, A., "Comercial Application of Micro Alga". Volume 101, journal of bioscience and bioenggenering
- Tripanji dan Suharyanto, 2001, *Optimization Media from Low-COH Nutrient Sources for Growing Spirulina plantesis and Carotenoid Production*", Menara Perkebunan.
- van Breemen, Richard B., (2001), "*Current Protocols in Food Analytical Chemistry*", John Wiley & Sons, Inc.
- Wei, Puah C., May, Choo Y., Ngan, Ma A., and Hock, Chuah C., (2005), "Supercritical Fluid Extraction of Palm Carotenoids", *American Journal of Environmental Sciences*, 1 (4),pp. 264-269.