

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga

Mikroalga merupakan mikroorganisme dengan tingkat organisasi sel termasuk dalam tumbuhan tingkat rendah yang dapat ditemukan pada habitat perairan laut (*seawater*) maupun perairan tawar (*freshwater*). Mikroalga memiliki ukuran sel 3-30 μm , dengan bentuk yang beragam seperti bulat, ellips, silinder. Mikroalga tidak memiliki akar, batang dan daun sejati, sehingga mikroalga termasuk dalam filum *Thallophyta*. Sel mikroalga termasuk mikroorganisme eukariotik, yang dikelompokkan ke dalam sembilan divisi yaitu *Glaucophyta*, *Rhodophyta*, *Heterokontophyta*, *Haptophyta*, *Cryptophyta*, *Dinophyta*, *Euglenophyta*, *Chlorarachniophyta*, dan *Chlorophyta* (Barsanti dan Gualtieri, 2006).

Mikroalga memiliki kemampuan melakukan fotosintesis dengan adanya kandungan pigmen klorofil maupun karotenoid di dalam selnya, seperti tumbuhan tingkat tinggi. Sehingga berperan sebagai mikroorganisme autotrof yang mampu menghasilkan biomassa yang mengandung protein 50-60 %, karbohidrat 40-50 %, lipid 6-18 % maupun senyawa bioaktif (Becker, 2004). Secara komersil biomassa mikroalga yang kaya gizi ini dimanfaatkan sebagai sumber pangan potensial untuk larva ikan maupun udang, serta pemanfaatan hidrokarbon digunakan

sebagai alternatif bahan bakar alami (*biofuel*). Selain itu, mikroalga berperan sebagai *bioremediasi* yaitu untuk mengatasi pencemaran lingkungan dengan cara memanfaatkan limbah sebagai media hidupnya, yang mana di dalam media tersebut masih terdapat senyawa-senyawa organik yang menjadi sumber nutriennya (Kawaroe *et al.*, 2010).

Biomassa mikroalga yang melimpah didapat dengan cara mengkultivasi mikroalga tersebut pada kondisi yang sesuai dengan jenisnya. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi kondisi kultivasi mikroalga secara umum yaitu media, derajat keasaman (pH), temperatur, intensitas cahaya, dan salinitas (konsentrasi garam).

1. Media

Media merupakan tempat hidup bagi mikroalga dengan menyediakan sumber nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan. Media ini harus disesuaikan dengan jenis mikroalga yang akan dikultivasi. Dalam suatu media harus memiliki kandungan nutrisi yang sesuai agar kelangsungan hidup mikroalga dapat tumbuh dengan optimal. Nutrisi yang dibutuhkan mikroalga terdiri atas makronutrisi dan mikronutrisi. Unsur makronutrisi seperti karbon (C), fosfor (P), nitrogen (N) dan silikon (Si). Silikon hanya dibutuhkan oleh mikroalga jenis diatom. Sedangkan mikronutrisi seperti Fe, Cu, Zn, Mn, B, dan Mo (Andersen, 2005).

Menurut BBPBL, (2013) beberapa mikrolaga *seawater* dikultivasi pada skala laboratorium menggunakan media *Conwy*. (Tabel 1). Namun, penggunaan zat-zat kimia sebagai sumber nutrisi mikroalga tidak efisien jika bertujuan untuk mendapatkan biomassa yang melimpah. Sehingga diperlukan alternatif media baru yang lebih komersial dan terjangkau, namun tetap memiliki standar unsur-unsur makro maupun mikronutrien yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroalga.

Tabel 1. Formulasi media *Conwy*

No.	Bahan Kimia	Jumlah
1	NaNO ₃ / KNO ₃	11/116 gr
2	Na ₂ EDTA	45 gr
3	FeCl ₃	1,3 gr
4	MnCl	0,36 gr
5	H ₂ BO ₃	33,6 gr
6	Na ₂ HPO ₄	20 gr
7	<i>Trace Metal*</i>	1 mL
8	Vitamin	1 mL
9	Aquadest	hingga 1 Liter

Tabel 2. Kandungan trace metal (cair) pada media *Conwy*

No.	Bahan Kimia	Pupuk <i>Conwy</i> /Wayne
1	ZnCl ₂	2,1 gram
2	CuSO ₄ .5H ₂ O	2,0 gram
3	CoCl ₂ .6H ₂ O	2,0 gram
4	(NH ₄) ₆ .Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,9 gram
5	Aquadest	100 mL

Media pupuk merupakan media alternatif yang dapat digunakan untuk mengkultivasi mikroalga dengan menyediakan unsur-unsur yang dibutuhkan.

Media pupuk terdiri dari Urea (CO(NH₂)₂), TSP (Ca(H₂PO₄)) dan ZA

(NH₄)₂SO₄). Urea dan ZA sebagai sumber nitrogen, TSP sebagai sumber fosfat (Kawaroe *et al.*, 2010). Sedangkan sumber mikronutrien didapat dari mineral dan garam-garam dalam air laut. Sehingga untuk menghemat biaya kultivasi, digunakan media pupuk sebagai sumber nutrisi.

2. Intensitas cahaya

Mikroalga melakukan fotosintesis seperti tumbuhan tingkat tinggi, yaitu mengasimilasi karbon anorganik untuk dikonversi menjadi materi organik. Cahaya menjadi sumber energi yang dibutuhkan mikroalga, baik berupa sinar matahari langsung ataupun dari pencahayaan lampu. Cahaya memiliki pengaruh terhadap sel mikroalga, sebagian besar dalam proses fotosintesis dan *photoadaptation*. Dalam proses ini, sel-sel alga akan mengalami perubahan dinamis dalam komposisi biokimia sel, biofisik maupun sifat fisiologis untuk meningkatkan fotosintesis dan pertumbuhan mikroalga.

Secara umum sel memiliki respon untuk mengurangi intensitas cahaya yang berlebihan dengan cara meningkatkan pigmen klorofil dan pigmen lainnya (seperti klorofil b, klorofil c, karotenoid primer dan fikobiliprotein). Namun di sisi lain dalam menanggapi tingginya intensitas cahaya, yaitu klorofil dan pigmen lain terlibat langsung dalam penurunan fotosintesis, sedangkan karotenoid sekunder (seperti zeaxanthin, b-karoten, astaxanthin), yang berfungsi sebagai *photoprotectiveagen*, meningkat. Karotenoid ini sering terakumulasi dalam tempat khusus, seperti plastoglobuli dari plastida atau lipid sitoplasma tubuh, sehingga

memiliki peran dalam mencegah kelebihan energi cahaya dari proses fotosintesis (Andersen, 2005).

3. Temperatur

Temperatur merupakan salah satu faktor lingkungan yang juga mempengaruhi komposisi biokimia dalam sel mikroalga. Temperatur optimal untuk kultivasi mikroalga antara 24-30 °C, namun dapat berubah sesuai dengan jenis mikroalga yang dikultivasi. Sebagian besar mikroalga dapat mentoleransi antara 16-35 °C. Temperatur <16 °C dapat memperlambat pertumbuhan mikroalga. Sedangkan temperatur >35 °C dapat menyebabkan kematian pada beberapa spesies mikroalga tertentu (Andersen, 2005).

4. Salinitas

Salinitas merupakan konsentrasi garam dalam air (%NaCl (w /v)). Salinitas termasuk dalam salah satu faktor yang berpengaruh terhadap mikroalga dalam mempertahankan tekanan osmotik yang baik antara protoplasma organisme dengan air sebagai lingkungan hidupnya. Beberapa jenis mikroalga yang mengalami perubahan salinitas pada media kultivasinya dari lingkungan bersalinitas rendah ke tinggi akan memperlambat laju pertumbuhannya.

Jenis mikroalga ini memiliki kemampuan mengumpulkan molekul kecil sebagai zat *osmoregulatory* atau *osmoticants* dalam menanggapi peningkatan salinitas atau tekanan osmotik lingkungan. *Osmoticants* yang ditemukan dalam mikroalga

yaitu poliol. Dalam mikroalga poliol umumnya meliputi: gliserol, manitol, galactitol, sorbitol, gliserol galactoside, sukrosa dan trehalosa. Kandungan gliserol hingga 50% dari berat kering pada mikroalga *Dunaliella* yang tumbuh pada kondisi salinitas tinggi (Brown & Borowitzka, 1979).

Mikroalga *seawater* mempunyai toleransi yang besar terhadap perubahan salinitas. Salah satu mikroalga yang memiliki kemampuan *halotolerant* untuk hidup pada lingkungan bersalinitas tinggi yaitu mikroalga *Dunaliella sp.*, Mikroalga ini mampu bertahan hidup pada salinitas 10-35 % (w/v) NaCl (Borowitzka dan Borowitzka, 1988). Namun kondisi salinitas optimal untuk pertumbuhan yaitu sekitar 22 % NaCl (Borowitzka *et al.*, 1990).

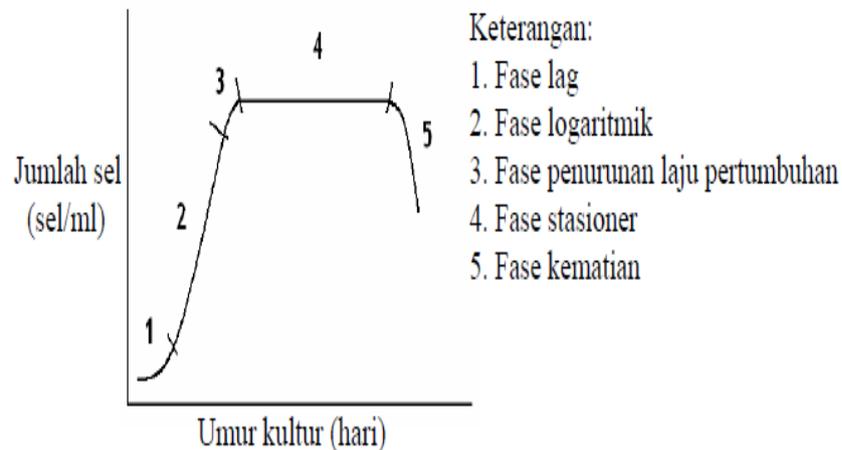
5. Aerasi

Aerasi dibutuhkan untuk mencegah terjadinya sedimentasi pada sistem kultivasi mikroalga. Selain itu, aerasi juga untuk memastikan bahwa semua sel mikroalga mendapatkan cahaya dan nutrisi yang sama. Udara yang terdapat dari aerasi ini merupakan sumber karbon (CO₂) untuk untuk fotosintesis (Kawaroe *et al.*, 2010).

2.2 Pertumbuhan Mikroalga

Pertumbuhan mikroalga dalam kultur dapat ditandai dengan bertambah besarnya ukuran sel atau bertambah banyaknya jumlah sel. Sampai saat ini kepadatan sel digunakan secara luas untuk mengetahui pertumbuhan mikroalga (Isnansetyo dan Kurniastuty 1995). Pertumbuhan mikroalga dibagi dalam lima fase pertumbuhan,

yaitu fase lag, fase logaritmik atau eksponensial, fase penurunan laju pertumbuhan, fase stasioner, dan fase kematian (Fogg, 1975). Kurva pertumbuhan mikroalga dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan mikroalga (Backer, 1994).

1. Fase lag

Fase ini ditandai dengan peningkatan populasi yang tidak signifikan. Fase ini disebut juga sebagai fase adaptasi karena sel mikroalga sedang beradaptasi terhadap media tumbuhnya. Lamanya fase lag tergantung pada umur inokulum yang dimasukkan. Sel-sel yang diinokulasikan pada awal fase log akan mengalami fase lag yang singkat. Inokulum yang berasal dari kultur yang sudah tua akan mengalami fase lag yang lama, karena membutuhkan waktu untuk menyusun enzim-enzim yang tidak aktif. Ukuran sel pada fase lag ini pada umumnya meningkat. Organisme mengalami metabolisme, tetapi belum terjadi pembelahan sel sehingga kepadatan sel belum meningkat.

2. Fase logaritmik atau eksponensial

Fase ini diawali oleh pembelahan sel dan ditandai dengan naiknya laju pertumbuhan hingga kepadatan populasi meningkat. Laju pertumbuhannya

meningkat dengan pesat dan selnya aktif berkembang biak. Ciri metabolisme pada fase ini adalah tingginya aktivitas fotosintesis yang berguna untuk pembentukan protein dan komponen-komponen penyusun plasma sel yang dibutuhkan dalam pertumbuhan.

3. Fase penurunan laju pertumbuhan

Fase ini ditandai dengan penurunan laju pertumbuhan. Selain itu terjadi penurunan pertumbuhan populasi per satuan waktu bila dibandingkan dengan fase eksponensial sehingga fase ini disebut juga fase *decline*.

4. Fase stasioner

Pada fase ini, pertumbuhan mengalami penurunan dibandingkan fase logaritmik. Laju reproduksi sama dengan laju kematian. Dengan demikian penambahan dan pengurangan jumlah mikroalga relatif sama atau seimbang sehingga kepadatannya tetap. Jumlah sel cenderung tetap diakibatkan sel telah mencapai titik jenuh.

5. Fase kematian

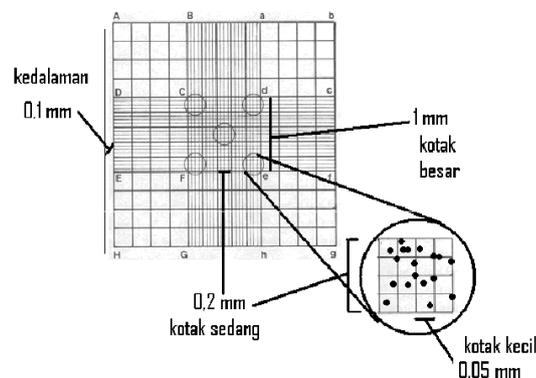
Fase ini ditandai dengan kepadatan populasi selnya yang terus berkurang, dikarenakan sumber nutrisi semakin menipis.

2.3 Penghitungan Mikroalga

Terdapat beberapa cara untuk menghitung kepadatan mikroalga yaitu perhitungan metode plate count dan perhitungan secara keseluruhan, namun yang sering dan mudah dilakukan untuk menghitung mikroalga maupun plankton adalah metode perhitungan keseluruhan. Penghitungan secara langsung dapat dilakukan secara

mikroskopis yaitu dengan menghitung jumlah bakteri dalam satuan isi yang sangat kecil. Alat yang digunakan adalah *Petroff-Hauser* Metode perhitungan keseluruhan *Chamber* atau *Haemocytometer*. Jumlah cairan yang terdapat antara *coverglass* dan alat ini mempunyai volume tertentu sehingga satuan isi yang terdapat dalam satu bujur sangkar juga tertentu.

Ruang hitung terdiri dari 9 kotak besar dengan luas 1 mm². Satu kotak besar di tengah, dibagi menjadi 25 kotak sedang dengan panjang 0,2 mm. Satu kotak sedang dibagi lagi menjadi 16 kotak kecil. Dengan demikian satu kotak besar tersebut berisi 400 kotak kecil. Tebal dari ruang hitung ini adalah 0,1 mm. Sel mikroalga yang tersuspensi akan memenuhi volume ruang hitung tersebut sehingga jumlah bakteri per satuan volume dapat diketahui.



Gambar 2. Kotak dalam *Haemocytometer*.

Cara kerja (digunakan kotak sedang) :

1. Bersihkan *Petroff-Hauser Counting Chamber* atau *Haemocytometer* dengan alkohol 70 % lalu keringkan dengan tissue.
2. Letakkan cover glass di atas alat hitung.

3. Tambahkan $\pm 50 \mu\text{l}$ suspensi sel yeast (kira-kira 1 tetes) dengan cara meneteskan pada parit kaca pada alat hitung. Suspensi sel akan menyebar karena daya kapilaritas.
4. Biarkan sejenak sehingga sel diam di tempat (tidak terkena aliran air dari efek kapilaritas).
5. Letakkan alat hitung pada meja benda kemudian cari fokusnya pada perbesaran 40x10.
6. Lakukan perhitungan secara kasar apakah diperlukan pengenceran atau tidak. Jika dalam satu kotak sedang terdapat sel-sel yang banyak dan bertumpuk maka perhitungan akan tidak akurat dan diperlukan pengenceran dengan perbandingan 1:5 atau 1:10.
7. Hitung sampel, paling tidak sebanyak 5 kotak sedang (lebih banyak lebih baik). Hasil perhitungan dirata-rata kemudian hasil rata-rata dimasukkan rumus untuk kotak sedang. Jika dilakukan pengenceran maka jumlah sel/ml dikalikan faktor pengenceran (Hansen, 2012)

2.4 *Dunaliella* sp.

Secara morfologi, sel *Dunaliella* sp. memiliki ukuran yang bervariasi dengan panjang 5-25 μm dan lebar 3-13 μm , biflagellate (Ben-Amotz, 1980). Memiliki bentuk yang tidak stabil dan bervariasi seperti lonjong, bulat silindris, ellips, dan lain-lain. Hal ini sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan (Isnansetyo, 1995).

Klasifikasi taksonomi *Dunaliella sp.* (Borowitzka dan Siva, 2007) sebagai berikut:

Super kingdom : *Eukaryot*

Kingdom : *Viridiplantae*

Subkingdom : *Phycobionta*

Division : *Chlorophyta*

Class : *Chlorophyceae*

Order : *Dunaliellales*

Family : *Dunaliellaceae*

Genus : *Dunaliella*



Gambar 3. *Dunaliella sp.*.

Menurut kajian yang telah dilakukan oleh Borowitzka dan Siva, (2007) genus *Dunaliella sp.* memiliki 22 spesies antara lain yaitu *Dunaliella salina.*, *Dunaliella Tertiolecta.*, *Dunaliella primolecta.*, *Dunaliella viridis.*, *Dunaliella bioculata.*, *Dunaliella acidophyla.*, *Dunaliella parva.* and *Dunaliella media.*.

Dunaliella sp. ini termasuk dalam *Chlorophyta* (alga hijau) yang memiliki pigmen klorofil a dan b serta pigmen karotenoid. Dominasi karotenoid yang terakumulasi pada *Dunaliella sp.* yaitu β -karoten (Borowitzka, 1988). Dalam kondisi

lingkungan yang stress lebih dari 16% dari berat kering adalah β -karoten (Garc'ia - Gonz'alez *et al.*, 2003). *Dunaliella sp.* termasuk mikroalga *halotolerant*, yaitu memiliki kemampuan bertahan hidup pada kondisi garam yang tinggi (salinitas). Sehingga mikroalga ini dapat ditemukan di perairan laut, danau dengan konsentrasi garam sekitar 10-35 % (w/v) NaCl. Kondisi salinitas yang optimal untuk pertumbuhan mikroalga sekitar 22 % NaCl , sedangkan salinitas optimum untuk akumulasi karotenoid 30 % NaCl (Borowitzka *et al*, 1990). Menurut Pital dan Lele (2005), pada kondisi stress salinitas ini, *Dunaliella sp.* mampu mengakumulasi karotenoid dengan sangat baik. Namun belum diketahui karotenoid apa yang saja yang terakumulasi serta pengaruh salinitas tinggi terhadap struktur karotenoid.

2.5 Karotenoid

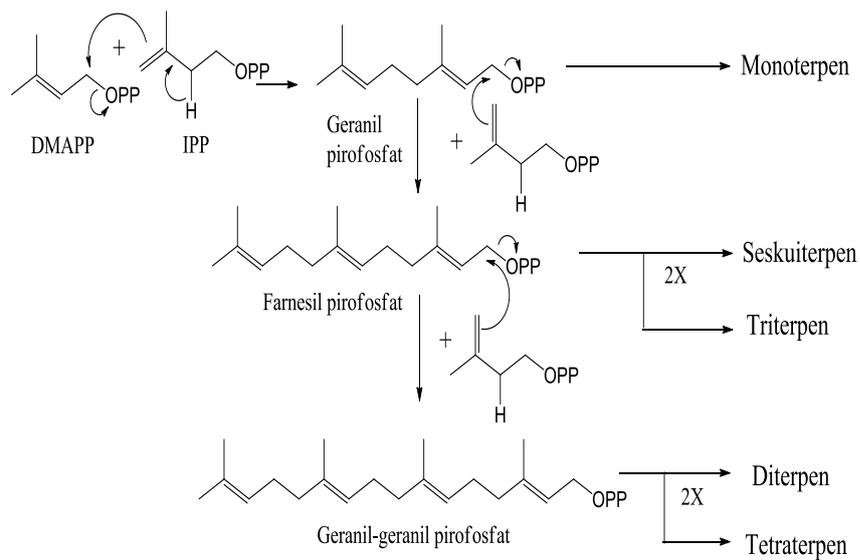
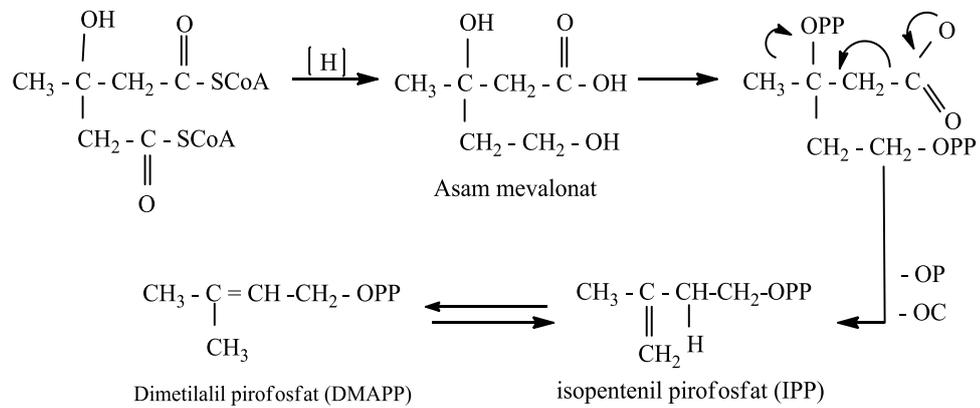
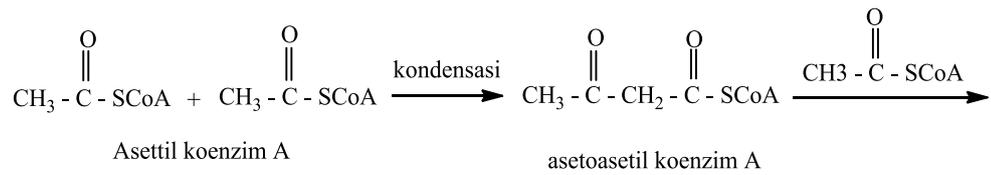
Karotenoid telah ditemukan di alam yaitu lebih dari 650, yang dimanfaatkan sebagai pewarna alami. Karotenoid dapat disintesis oleh tanaman, alga, jamur maupun bakteri. Secara komersil, pemanfaatan bioaktif ini pada mikroalga yaitu mikroalga yang termasuk dalam divisi *Chlorophyta* (alga hijau) seperti mikroalga *Chlamydomonas*, *Muriellopsis*, *Chlorella sp.*, *Dunaliella sp.* dan *Haemotococcus sp.*.

Di dalam sel mikroalga, karotenoid berperan sebagai pigmen yang membantu klorofil dalam penyerapan cahaya yang dibutuhkan untuk proses fotosintesis. Selain itu, berkontribusi melindungi sel dari serangan radikal bebas seperti spesies oksigen reaktif yang dihasilkan dari proses metabolisme maupun dari lingkungan

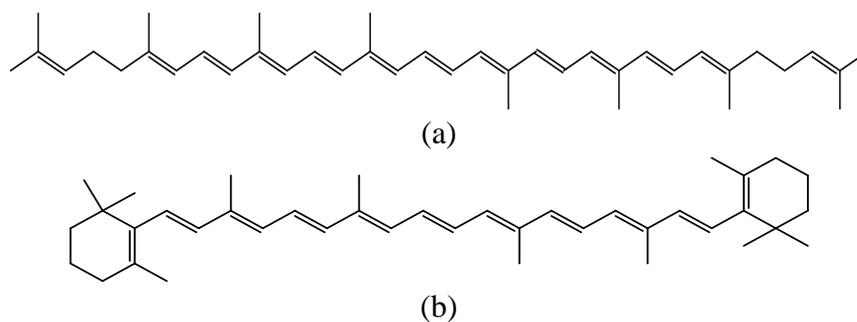
(Adams, 2002). Aktivitas antioksidan intrinsik karotenoid merupakan dasar tindakan protektif melawan stres oksidatif, namun tidak semua aktivitas biologis yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menonaktifkan radikal bebas dan spesies oksigen reaktif diklaim sebagai karotenoid.

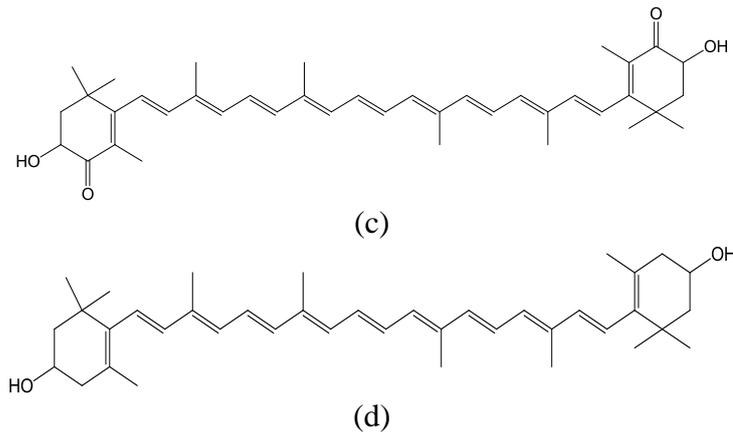
Senyawa karotenoid banyak digunakan sebagai antioksidan pada industri farmasi maupun industri kosmetik (Pluz dan Gross, 2004). Menurut kajian yang telah dilakukan oleh Guedes *et al* (2011), karotenoid yang terakumulasi pada mikroalga *Chlorella sp.* dan *Muriellopsis* yaitu lutein, sedangkan Astaxanthin diproduksi oleh *Haemotococcus.*, dan *Dunaliella sp.* mengakumulasi β -karoten. Selain itu, dimanfaatkan sebagai pewarna makanan, sebagai agen antikanker dan ada yang mengklaim sebagai antibakteri.

Karotenoid merupakan senyawa metabolit sekunder golongan terpenoid yang tersusun dari senyawa isoprenoid, dengan jalur sintesis seperti pada (Gambar 3) yaitu melalui tail-to-tail dari 2 molekul geranil-geranil diphosphate yang kemudian membentuk kerangka karbon dasar (C-40). Karotenoid dibedakan menjadi 2 kelompok yaitu kelompok karoten dan xantofil. Karoten memiliki kerangka dasar rantai lurus panjang dengan 11 ikatan rangkap terkonjugasinya seperti pada gambar (5a dan 5b). Sedangkan xantofil merupakan turunan dari β -karoten, yang mengandung satu atau lebih gugus oksigen lebih (Gambar 6c dan 5d) (Tania *et al*, 2012).



Gambar 4. Biosintesis terpenoid (Achmad, 1986).

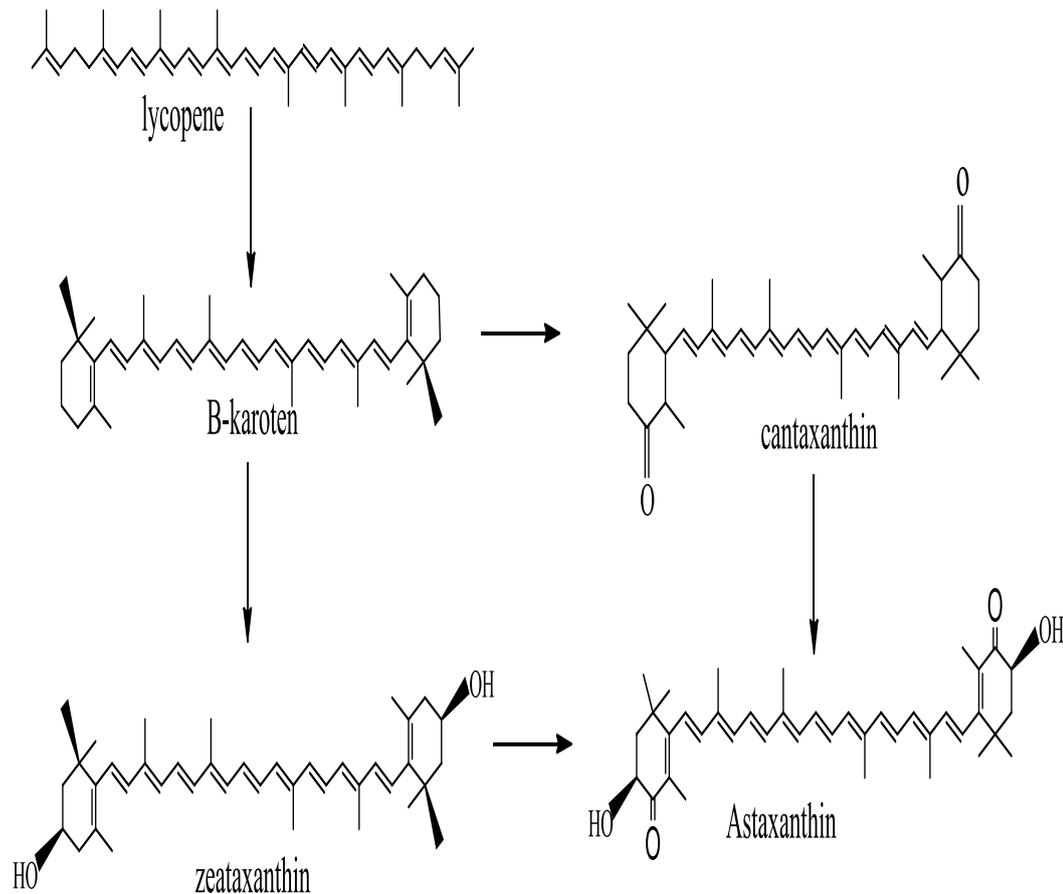




Gambar 5. Derivat karotenoid : (a) likopen, (b) β -karoten, (c) astaxanthin dan (d) lutein.

Di alam, senyawa karotenoid berwarna merah-orange, seperti tampak pada buah tomat yang kaya akan karotenoid (likopen). Beberapa dari karotenoid ini telah dikonsumsi oleh tubuh manusia yaitu β -karoten (Gambar 5b) sebagai pro-vitamin A dan likopen (gambar 5a) yang keduanya berperan sebagai antioksidan.

Dalam proses carotenogenesis, β -karoten merupakan kerangka dasar untuk terbentuknya derivat senyawa xantofil seperti astaxanthin, zeaxanthin, violaxanthin, canthaxanthin dan neoxanthin. Senyawa xantofil dikenal sebagai β -karoten teroksidasi, dikarenakan adanya tambahan gugus aktif epoksi, hidroksil, keton maupun karboksilat pada struktur β -karoten (Lee dan Ding, 1994).



Gambar 6. Bagan proses carotenogenesis (Fraser. 1997)

2.6 Ekstraksi dan Kromatografi

2.6.1 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penarikan komponen/zat aktif suatu simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu. Prinsip ekstraksi didasarkan pada distribusi zat terlarut dengan perbandingan tertentu antara dua pelarut yang tidak saling bercampur (Khopkar, 2002). Ekstraksi digolongkan ke dalam dua bagian besar berdasarkan bentuk fasa yang diekstraksi yaitu ekstraksi cair-cair dan ekstraksi cair-padat. Untuk ekstraksi cair-cair dapat menggunakan corong pisah, sedangkan

ekstraksi cair-padat terdiri dari beberapa cara yaitu maserasi, perkolasi dan sokletasi (Harborne, 1996). Metode ekstraksi yang umum digunakan antara lain maserasi, sokletasi, refluks, ekstraksi cair-cair (partisi) dan ekstraksi ultrasonik.

Karotenoid bersifat tidak larut dalam air dan larut dalam pelarut organik. Berbagai pelarut organik, misalnya aseton, tetrahidrofuran (THF), n-heksana, pentana, petroleum eter, metanol, dan etanol, dan campuran dari pelarut ini dapat digunakan untuk ekstraksi karotenoid. Untuk mengekstraksi karotenoid dari mikroorganisme menggunakan pelarut aseton, atau campuran heksana dengan petroleum eter dan etanol. Ekstraksi karotenoid harus dilakukan dengan sangat cepat, menghindari paparan cahaya, oksigen, suhu tinggi, dan prooksidan logam (besi, tembaga) untuk meminimalkan autooksidasi dan isomerisasi.

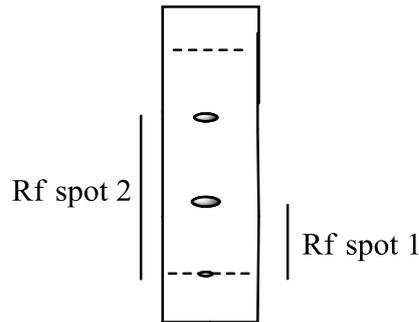
2.6.2 Kromatografi

Menurut IUPAC (1993), kromatografi merupakan suatu metode pemisahan suatu komponen dari campuran berdasarkan perbedaan distribusi komponen di dalam fase gerak dan fase diam. Tahapan kromatografi dapat dibedakan berdasarkan mekanisme kerjanya yaitu adsorpsi misalnya oleh silika gel, partisi misalnya C_{18} , penukar ion misalnya diaion, dan berat molekul misalnya sephadex. Teknik kromatografi dibedakan menjadi padat-cair, padat-gas, cair-cair, cair-gas. Salah satu metode kromatografi padat-cair yang sering digunakan adalah kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kolom (Khopkar, 2002).

2.6.2.1 Kromatografi lapis tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu komponen senyawa dalam campuran, yang diketahui maupun yang tidak diketahui. Selain itu juga dapat digunakan dalam teknik preparatif yaitu mengisolasi senyawa organik dalam jumlah yang sedikit. Sehingga KLT merupakan salah satu langkah awal dalam teknik pemurnian suatu senyawa dari *crude* ekstrak kasar suatu sampel (Hajnos *et al.*, 2008). Metode KLT ini digunakan untuk memilih komposisi eluen yang memberikan pola pemisahan senyawa yang paling baik. Hasil dari KLT mengarahkan dilakukannya fraksinasi untuk memisahkan senyawa dari campurannya yang terkandung dalam sampel.

Plat KLT yang digunakan untuk tujuan preparatif memiliki ukuran tebal 5mm sedangkan plat KLT yang digunakan untuk analisis kualitatif memiliki tebal 2 mm. Kapasitas KLT bila dibandingkan dengan kromatografi kolom yaitu 1:50, dengan demikian KLT kurang efisien jika digunakan untuk memisahkan komponen dari campuran dalam jumlah yang cukup banyak. Karena jarak elusi suatu substansi relatif terhadap jarak elusi pelarut, tergantung pada struktur molekul substansi. Hubungan antara jarak elusi sampel dan jarak pelarut yang terelusi dapat dinyatakan dengan R_f (*Retention factor*). Harga R_f ini bergantung pada beberapa parameter yaitu sistem pelarut, adsorben (ukuran butir, kandungan air, ketebalan), jumlah bahan yang ditotolkan pada plat dan suhu (Khopkar, 2002).



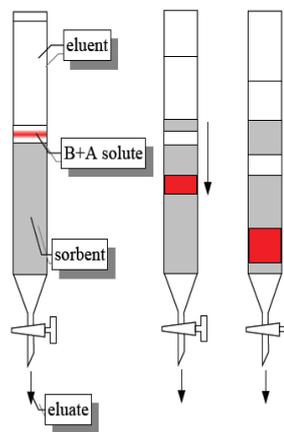
Gambar 7. Penampang kromatogram lapis tipis

Cara kerja kromatografi lapis tipis yaitu dengan menotolkan larutan cuplikan atau sampel pada plat dengan pipet mikro atau injektor pada jarak 1 – 2 cm dari batas plat. Setelah kering, plat siap untuk dikembangkan dengan fasa gerak sampai pada batas tertentu. Proses pengembangan (elusi) dikerjakan dalam wadah tertutup yang diisi dengan eluen yang tepat dan telah dijenuhi uap eluen agar dihasilkan pemisahan yang baik (Gambar 5). Untuk mengidentifikasi senyawa dalam plat KLT dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu: pengamatan langsung (untuk noda/bercak yang tampak), dengan lampu ultraviolet, atau dengan pereaksi semprot penimbul warna (Anwar *et al.*, 1994).

2.6.2.2 Kromatografi kolom

Kromatografi kolom merupakan salah satu teknik pemisahan lebih lanjut setelah metoda KLT, dimana pemisahan suatu komponen dari campuran senyawa dilakukan dengan mengalirkan eluen (fasa gerak) yang sesuai terhadap sampel dalam suatu kolom kaca vertikal yang berisi adsorben (fasa diam) hingga cairan eluen mengalir melalui kolom akibat gaya gravitasi. Adsorben yang paling sering digunakan yaitu *silica gel* dan alumina dimana keduanya juga digunakan sebagai

fase diam dalam KLT. Sampel dilarutkan dalam sedikit pelarut kemudian dituangkan ke dalam kolom sedikit demi sedikit dengan menggunakan pipet tetes agar merata pada permukaan fase diam. Berdasarkan gaya gravitasi, pelarut mengalir turun dalam kolom dan memenuhi adsorben, prinsip ini berbeda dengan KLT, dalam KLT berdasarkan pada sifat kapilaritas dari adsorben sehingga pelarut dapat merambat naik memenuhi adsorben.



Gambar 8. Penampang Kromatografi Kolom

Ukuran partikel fasa diam akan mempengaruhi aliran pelarut melewati kolom. Fasa diam dengan ukuran partikel lebih kecil digunakan dalam kromatografi *flash*, sedangkan yang berukuran partikel besar digunakan dalam kromatografi kolom grafitasi. Fasa diam yang sering digunakan adalah silika gel ($\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$). Silika gel berukuran partikel 70-230 mesh sering digunakan untuk kolom *flash* dan yang berukuran 230-430 untuk kolom grafitasi (Heftmann, 1983). Kromatografi kolom biasanya digunakan untuk teknik pemurnian, yaitu mengisolasi suatu senyawa dari campurannya (Johnson dan Stevenson, 1991). Berdasarkan kepolaran relatif fasa diam dan fasa gerak (Dekker, 1995), kromatografi kolom dapat dibedakan menjadi 2 tipe, yaitu:

(1). Kromatografi kolom fasa normal

Pada kromatografi ini, fasa diam bersifat polar dan fasa gerak relative bersifat nonpolar, sehingga komponen yang kepolarannya paling rendah terelusi lebih dulu.

(2). Kromatografi kolom fasa terbalik

Pada kromatografi ini, fasa diam bersifat nonpolar dan fasa gerak relative bersifat polar sehingga komponen yang kepolarannya tinggi akan terelusi lebih dulu.

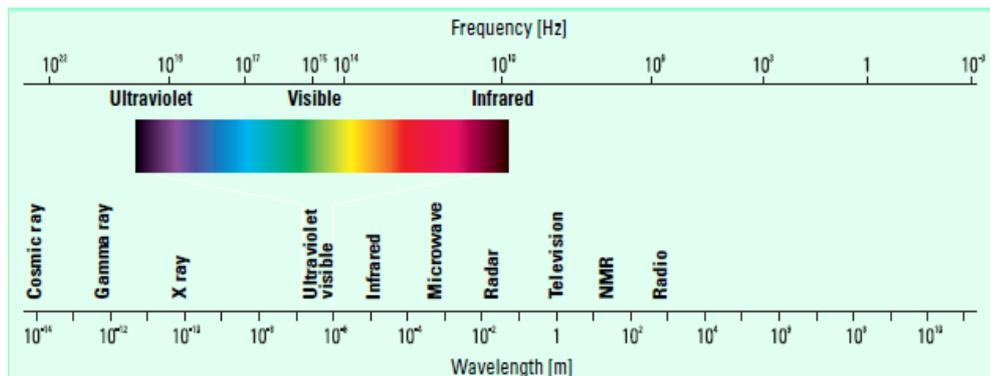
Menurut Sastrohamidjojo (2001) bila pelarut dibiarkan mengalir melalui kolom, maka pelarut tersebut akan mengangkut senyawa-senyawa yang merupakan komponen dari campuran. Kecepatan bergerak suatu komponen bergantung pada seberapa besarnya ia terhambat atau tertahan oleh penjerap di dalam kolom. Jika perbedaan dalam serapan cukup besar maka akan terjadi pemisahan yang sempurna.

Beberapa faktor yang mempengaruhi efisiensi dari pemisahan suatu kromatografi antara lain adsorben dan eluen. Dalam pemisahannya adsorben harus menunjukkan selektivitas maksimum untuk memisahkan suatu sampel sehingga elusi akan menunjukkan perbedaan R_f (Sherma, 2003).

2.7 Karakterisasi

2.7.1 Spektroskopi Ultraviolet-Visible (UV-Vis)

Radiasi ultraviolet merupakan bagian dari spektrum elektromagnetik yang meliputi radiasi radio, inframerah (IR), kosmik dan sinar X (Gambar 9). Spektrum elektromagnetik untuk daerah UV-Vis diasosiasikan dengan energi kinetik, energi tersebut diabsorpsi oleh molekul yang terdapat dalam sampel. Absorpsi energi ini dapat mempengaruhi tingkatan energi dari elektron-elektronnya, sehingga menyebabkan eksitasi elektron ke orbital molekul yang lebih tinggi.



Gambar 9. Rentang radiasi elektromagnetik

Energi yang terkait dengan radiasi elektromagnetik didefinisikan dalam persamaan berikut :

$$E = h \nu$$

Keterangan : E : energi (j)
 h : konstanta planck (6.62×10^{-34} js)
 ν : frekuensi (s)

Radiasi elektromagnetik ini dapat dianggap sebagai kombinasi antara medan listrik dan medan magnet yang bertemu melalui ruang dengan gerakan

gelombang. Karena sifat radiasi sebagai gelombang, maka diklasifikasikan menjadi panjang gelombang (nm) atau frekuensi, menurut persamaan berikut :

$$\nu = c/\lambda$$

Keterangan : ν : frekuensi (s)
 c : kecepatan cahaya ($3 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$)
 λ : panjang gelombang (m)

Ketika radiasi berinteraksi dengan materi, maka akan terjadi beberapa proses yang akan terjadi, yaitu refleksi, hamburan, absorpsi, fluoresensi dan reaksi fotokimia. Namun, secara umum yang ingin didapat dari spektra uv-vis ini adalah absorpsinya. Karena cahaya adalah suatu bentuk energi, maka penyerapan cahaya oleh materi menyebabkan kandungan energi dalam materi (molekul atau atom) meningkat. Total energi potensial umumnya direpresentasikan sebagai penjumlahan dari energi elektronik, energi vibrational (getaran) dan energi rotasi.

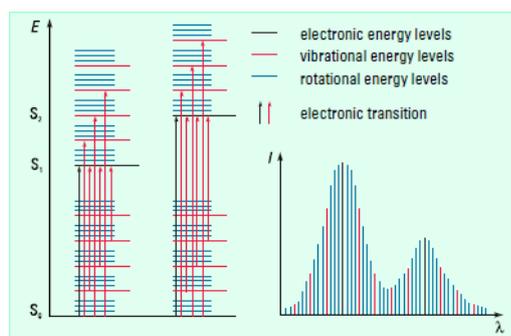
$$E_{total} = E_{electronic} + E_{vibrational} + E_{rotational}$$

$$E_{elektronik} > E_{vibrational} > E_{rotational}$$

Dalam setiap molekul atau atom, foton dari cahaya UV dan visible memiliki energi untuk menyebabkan transisi antara tingkat energi elektronik yang berbeda. Panjang gelombang dari cahaya yang diserap yaitu mampu memindahkan elektron dari tingkat energi rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi, disebut sebagai proses eksitasi elektron (Owen, 2000).

Spektrum sinar uv terentang pada panjang gelombang 100-400 nm, sedangkan untuk spektrum visible pada panjang gelombang 400 nm (ungu) hingga 750 nm (merah). Hasil spektrum suatu molekul bergantung pada mudahnya mengalami

promosi (eksitasi) elektron. Sehingga molekul-molekul yang memerlukan lebih banyak energi untuk promosi elektron akan menyerap panjang gelombang yang lebih pendek. Sedangkan molekul yang hanya memerlukan energi lebih sedikit akan menyerap panjang gelombang yang lebih panjang.



Gambar 10. Transisi elektronik dan spektra UV-Vis dalam suatu molekul

Secara umum, dalam spektrum UV-Vis menunjukkan beberapa pita absorbansi. Dibandingkan dengan teknik spektroskopi inframerah yang menghasilkan banyak pita sempit, spektroskopi UV-Vis memerlukan informasi kualitatif yang terbatas. Seperti kebanyakan penyerapan oleh senyawa organik dikarenakan adanya ikatan π (tak jenuh). Ikatan π ini biasanya terdapat didalam beberapa gugus kromofor, yang dapat menghasilkan penyerapan antara 185-1000 nm.

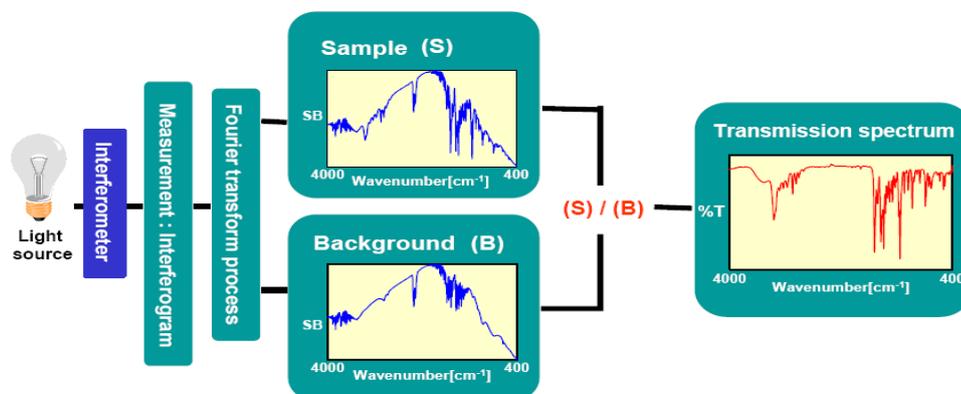
Tabel 3. Kromofor

Gugus Kromofor	Rumus	Contoh	λ (nm)
Karbonil (Keton)	RR'CO	Aseton	271
Karbonil (Aldehida)	RH'CO	asetaldehida	293
Karboksil	RCOOH	Asam asetat	204
Amida	RCONH ₂	Asetamida	208
Etilena	RCH=CHR	Etilena	193
Asetilena	RC=CR	Asetilena	173
Nitril	RC=N	Asetonitril	<160
Nitro	RNO ₂	Nitrometana	271

Kehadiran pita absorpsi pada panjang gelombang tertentu merupakan suatu indikator penting dari adanya gugus kromofor. Namun, posisi absorpsi maksimum dipengaruhi oleh lingkungan kromofor (pH dan suhu) dan pelarut yang digunakan. Untuk beberapa molekul yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi seperti karotenoid, ikatan rangkap terkonjugasi ini mempengaruhi peningkatan intensitas dan panjang gelombang pita absorpsi (Owen, 2000).

2.7.2 Spektroskopi Infra merah

Saat ini, spektroskopi inframerah merupakan salah satu teknik analisis yang penting dalam ilmu kimia. Alat yang digunakan disebut dengan spektrometer IR. Spektrum yang diperoleh menginformasikan tentang gugus fungsi pada struktur molekul dan dapat digunakan untuk menguji kemurnian suatu senyawa. Dalam spektroskopi ini yaitu hampir semua sampel dapat dianalisis, seperti cairan, padatan, gas, pasta, bubuk dan serat. Analisisnya yang mudah dan cepat, sehingga memberikan keuntungan biaya yang lebih efisien dalam melakukan analisis untuk mengidentifikasi struktur senyawa.



Gambar 11. Skema analisis spektroskopi inframerah

Prinsip dasar pengukuran dengan menggunakan spektroskopi inframerah yaitu apabila suatu sampel menyerap radiasi elektromagnetik di daerah inframerah ($7,8 \times 10^{-5}$ sampai 3×10^{-2} cm) akan mengakibatkan terjadinya vibrasi ikatan kovalen yang terdapat dalam struktur suatu molekul dalam sampel. Hasil pengukuran akan diperoleh spektrum inframerah berupa data grafik antara persen transmisi (%T) dengan bilangan gelombang (cm^{-1}). Spektrum inframerah tersebut terbentuk oleh adanya absorpsi radiasi elektromagnetik pada frekuensi yang sama dengan vibrasi spesifik dari ikatan kimia dari suatu molekul dalam sampel.

Pada umumnya spektrum IR dibedakan menjadi tiga daerah. Daerah bilangan gelombang tinggi antara $4000\text{-}1300 \text{ cm}^{-1}$ ($2\text{-}7,7 \mu\text{m}$) yang disebut *daerah gugus fungsi* karakteristik frekuensi tarik untuk gugus fungsi penting seperti C=C, C=O, OH, dan NH termasuk dalam daerah ini. Daerah frekuensi menengah, yakni antara $1300\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$ ($7\text{-}11 \mu\text{m}$) yang diketahui sebagai daerah *fingerprint*, yang mengabsorpsi secara lengkap dan umumnya kombinasi dari interaksi vibrasi, setiap molekul memberikan *fingerprint* yang unik. Daerah antara $900\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$ ($11\text{-}15 \mu\text{m}$) menunjukkan klasifikasi umum dari molekul yang terbentuk dari absorbansi, contohnya cincin benzen tersubstitusi. Adanya absorbansi pada *daerah bilangan gelombang rendah* dapat memberikan data yang baik akan adanya senyawa aromatik. Selain itu adanya intensitas absorbansi di daerah frekuensi rendah juga menunjukkan adanya karakteristik senyawa dimer karboksilat, amina, atau amida (Coates *et al.*, 2000).

Karakteristik gugus fungsi yang terdapat pada setiap senyawa karotenoid yaitu memiliki ikatan rangkap terkonjugasi ($-C=C-C=C-$) yang menyerap pada bilangan gelombang 1600 cm^{-1} ($C=C$), hanya saja yang membedakan antara kelompok karoten dengan xantofil yaitu adanya gugus $-OH$ dan $C=O$. Sehingga akan terdapat perbedaan spektrum IR dari kedua kelompok ini, yaitu pada bilangan gelombang 3600 cm^{-1} ($-OH$), 1700 cm^{-1} ($-C=O$) dan 1050 cm^{-1} ($-C-O$).

Tabel 4. Karakteristik frekuensi uluran beberapa gugus fungsi

Gugus	Serapan (cm^{-1})	Gugus	Serapan(cm^{-1})
$-\text{OH}$	3600	$-\text{CH}_2-$	2930
$-\text{NH}_2$	3400		2860
$\equiv\text{CH}$	3300		1470
Ar $-\text{H}$	3060	$-\text{C}-\text{O}-$	1200-1000
	3030	$\text{C}=\text{C}$	1650
	2870		
$=\text{CH}_2$	1460	$\text{C}=\text{N}$	1600
	1375		
$-\text{C}-\text{N}$	1200-1000	$-\text{C}-\text{C}-$	1200-1000
$\text{C}=\text{O}$	1750-1600		