



**EKSTRAKSI ASTAXANTHIN DARI LIMBAH UDANG PUTIH
SECARA AUTOLISIS PADA BERBAGAI pH ASAM**

SKRIPSI

Oleh:

**Alfriyani Feby Syafitri
NIM 141810301040**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2020**



**EKSTRAKSI ASTAXANTHIN DARI LIMBAH UDANG PUTIH
SECARA AUTOLISIS PADA BERBAGAI pH ASAM**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Kimia (S1) dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh:

**Alfriyani Feby Syafitri
141810301040**

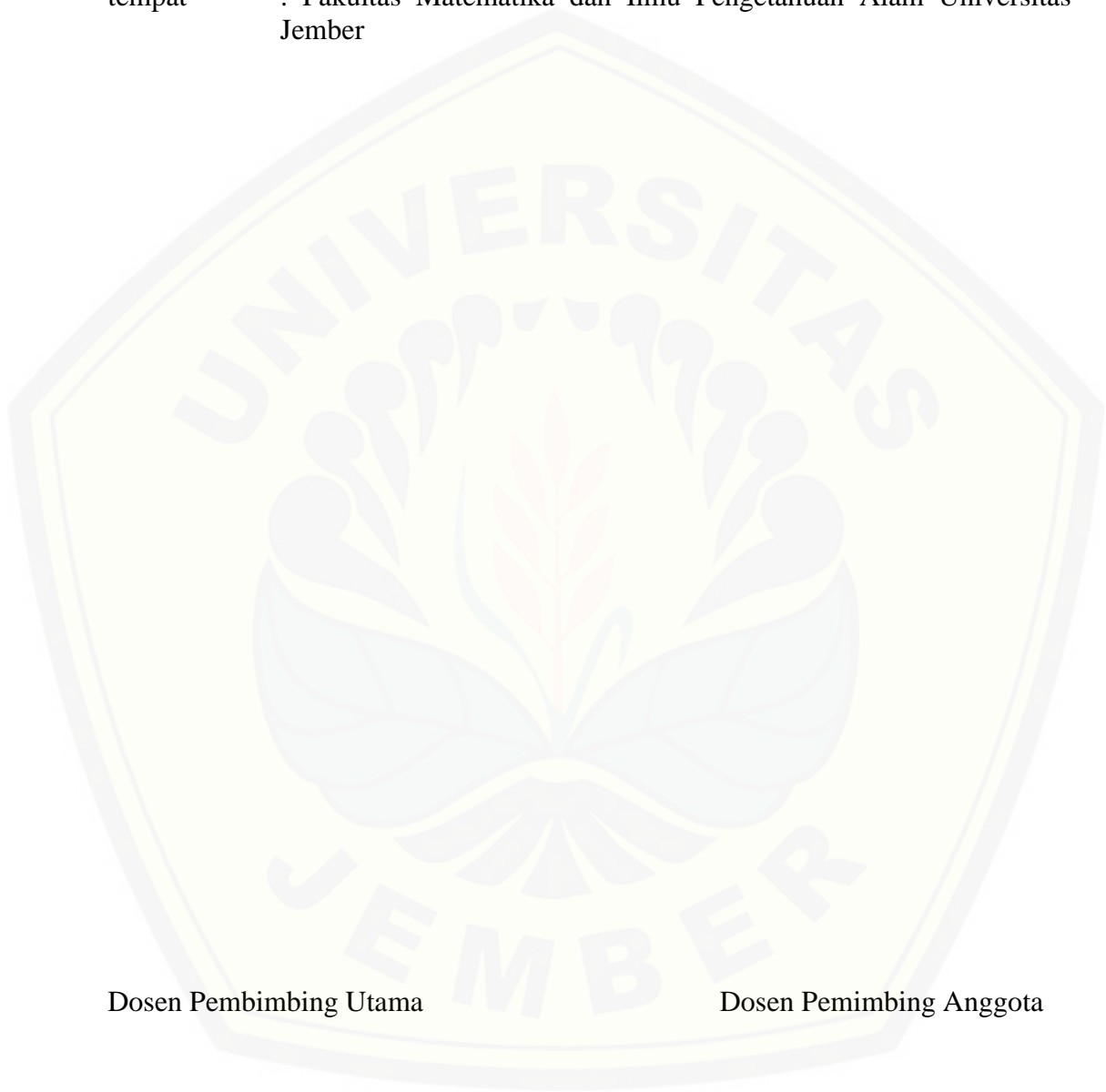
**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2020**

PERSETUJUAN PEMBIMBING

Proposal berjudul “Ekstraksi Astaxanthin Dari Limbah Udang Putih Secara Autolisis pada Berbagai pH Asam” telah disetujui pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember



Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc., Ph.D
NIP 195910091986021001

Dr. Busroni, M.Si
195905151991031007

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah subhanahu wata'ala, skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. kedua orang tua saya yang tercinta dan terhebat, ayah kami Widodo, dan Ibu kami Kunarti yang senantiasa mendukung, memberi motivasi, sabar dalam memahami apa yang saya butuhkan dan pendidik yang hebat dalam mengajarkan kedekatan dengan Allah subhanahu wata'ala serta memahami apa arti hidup.
2. adik-adik saya Galang Dwi Aprilian, Daniel Amrullah Vega Albani, Raja Al Bukhori Salmanu Al farizi, dan Abdullah Zunurrain Al azka yang sudah memberikan kekuatan berupa keceriaan dan semangat kalian belajar disekolah.
3. Teman-teman seperjuangan angkatan 2014 “Majesty” yang sudah menjadi teman terhebat sepanjang masa.
4. Almamater tercinta, jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTTO

“Cukuplah Allah sebagai penolong kami, dan Allah adalah sebaik-baik pelindung”^{*)}
(QS. Al-Imran: 173)^{*)}



* Kementerian Agama RI. 2007. *Al-Qur'an dan Terjemahnya dilengkapi dengan Kajian Usul Fiqih dan Intisari Ayat*. Bandung: PT. Sygma Examedia Arkanleema.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Alfriyani Feby Syafitri

NIM : 141810301040

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Ekstraksi Astaxanthin Dari Limbah Udang Putih Secara Autolisis pada Berbagai pH Asam” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Januari 2020

Yang menyatakan,

Alfriyani Feby S.

NIM 141810301040

SKRIPSI

**EKSTRAKSI ASTAXANTHIN DARI LIMBAH UDANG PUTIH
SECARA AUTOLISIS PADA BERBAGAI pH ASAM**

Oleh

Alfriyani Feby Syafitri
NIM 141810301040

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc., Ph.D.

Dosem Pembimbing Anggota : Dr. Busroni, M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Ekstraksi Astaxanthin Dari Limbah Udang Putih Secara Autolisis pada Berbagai pH Asam” karya Alfriyani Feby Syafitri telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc., Ph.D
NIP 195910091986021001

Dr. Busroni, M.Si
NIP 195905151991031007

Anggota II,

Anggota III,

I Nyoman Adi Winata, S.Si., Msi
NIP 197105011998021002

drh. Wuryanti Handayani, M.Si
NIP 196008221985032002

Mengesahkan

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember,

Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc., Ph.D
NIP 195910091986021001

RINGKASAN

Ekstraksi Astaxanthin Dari Limbah Udang Putih Secara Autolisis pada Berbagai pH Asam; Alfriyani Feby Syafitri, 141810301040; 2020; 62 halaman; Jurusan Kimia Fakultas matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Udang merupakan komoditas ekspor non migas dengan nilai ekonomis yang tinggi. Potensi ekspor udang setiap tahunnya mengalami peningkatan. Udang yang diekspor biasanya dalam bentuk udang bersih kupas tanpa kepala, kulit, dan ekornya. Meningkatnya volume ekspor udang, mengakibatkan limbah udang di Indonesia semakin banyak yang terbuang. Limbah kulit, ekor dan kepala udang yang ada di Indonesia selama ini kurang dimanfaatkan dengan baik. Pemanfaatan limbah udang hanya sebatas untuk campuran pakan ternak dan sebagai produk olahan kitosan. Limbah udang mengandung natural *pigment* atau senyawa berwarna yang bernama *astaxanthin*. Senyawa ini memiliki manfaat yang banyak bagi manusia, seperti sumber antioksidan yang dapat dimanfaatkan sebagai produk kosmetik dan berguna dalam bidang kesehatan.

Metode yang digunakan untuk mengekstrak *astaxanthin* pada limbah udang ini adalah autolisis. Metode ini merupakan metode hidrolisis enzimatis namun, menggunakan enzim yang terdapat pada udang itu sendiri. Enzim yang digunakan adalah enzim protease. Enzim ini berguna untuk memecah ikatan peptida pada protein udang menjadi peptida-peptida pendek. Sehingga, ikatan fisik antara protein dan *astaxanthin* dapat dengan mudah dipisahkan dari matriksnya.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh variasi pH asam dan waktu inkubasi pada proses hidrolisis enzimatis (autolisis) limbah udang terhadap persentase astaxanthin yang dihasilkan. Manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi tentang pengolahan dan pemanfaatan udang seagai sumber *astaxanthin* sehingga mampu meningkatkan nilai komoditi limbah udang. Selain itu,

diharapkan penelitian ini mampu memberikan pengetahuan tentang variasi pH asam dan waktu inkubasi terhadap persentase *astaxanthin* yang didapatkan.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Analitik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Limbah udang yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 1 kg yang di dapatkan dari perusahaan ekspor udang Istana Cipta Sembada (ICS) di Kecamatan Rogojampi Kabupaten Banyuwangi. Penelitian yang dilakukan meliputi proses preparasi sampel limbah udang, proses inkubasi menggunakan enzim pada udang itu sendiri (autolisis), ekstraksi hasil autolisis menggunakan diklorometana dan uji kualitatif serta kuantitatif *astaxanthin*.

Hasil dari penelitian yang telah dilakukan adalah pH dan waktu inkubasi memberikan pengaruh terhadap persentase *astaxanthin* yang terekstrak. Persentase *astaxanthin* yang terekstrak memiliki nilai yang berbeda disetiap kondisi. Hasil persentase *astaxanthin* tertinggi dilakukan pada pH 2 dan waktu inkuasi 48 jam yaitu 0,005702%.. Proses degradasi protein pada penelitian ini terjadi karena adanya aktivitas dari enzim pepsin yang bekerja optimal pada pH 2, yaitu pH paling asam pada penelitian ini. Kesimpulan yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah persentase *astaxanthin* yang terekstrak dipengaruhi oleh pH dan waktu inkubasi. Nilai pH yang menghasilkan persentase *astaxanthin* tertinggi adalah pH 2.

PRAKATA

Puji syukur kepada Allah subhanahu wata'ala tuhan semesta alam, atas segala rahmat, karunia, dan hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul “Ekstraksi Astaxanthin Dari Limbah Udang Putih Secara Autolisis Pada Berbagai pH Asam”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan rasa terima kasih kepada:

1. kedua orang tua saya yang tercinta dan terkasih, ayah kami Widodo, dan Ibu kami Kunarti. Terimakasih sudah menjadi orang tua hebat yang mengajarkan arti bersabar, berjuang, dan bersyukur. Terimakasih atas didikannya selama ini tentang kehidupan, agama dan ilmu pengetahuan. Terimakasih sudah menjadi orang tua yang sangat pengertian dan perhatian. Terimakasih atas motivasi dan semangat yang diberikan selama penulis kuliah. Semoga Allah subhanahu wa ta'ala selalu melindungi kalian.
2. Drs. Achmad Sjaifullah M.Sc., Ph.D, dan Dr. Busroni M.Si selaku Dosen Pembimbing. Terimakasih sudah memberikan ilmu yang sangat bermanfaat. Menjadikan saya sebagai mahasiswa yang memiliki adab dan kaya ilmu. Terimakasih atas kesabaran mendidik saya, memberikan perhatian dan pengertian, kritik serta saran selama saya kuliah dan mengerjakan skripsi ini. Semoga Allah subhanahu wata'ala membalas kebaikan kalian.
3. Bu indarti, Pak Bambang, Bu ika dan seluruh dosen, staff dan karyawan jurusan Kmia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Terimakasih sudah memberikan dukungan moral dan pengetahuan selama ini. Terimakasih sudah menjadi pendidik-pendidik yang hebat yang tidak hanya mengajarkan tentang Ilmu akademik, tetapi juga mengajarkan tentang berperilaku.
4. Sahabat dekat dan saudara-saudara saya Eldiani, Hilda, Ria, Vikri, Farida, Nanda, Ulfa, Vida, Ummu, Ruly. Terimakasih sudah bersedia menjadi tempat

berkeluh kesah dan berbagi syukur. Terimakasih sudah mengajarkan menjadi teman yang peduli dan bersama belajar menguatkan untuk selalu dekat kepada Allah subhanahu wata'ala.

5. Fajar Rizqi Nazlilhaq. Terimakasih sudah memberikan semangat, motivasi, waktu, tenaga dan dukungan selama pengerjaan skripsi ini.
6. Sahabat serta keluarga kedua saya Majesty, semuanya. Terimakasih banyak, karena telah berbagi pengalaman, sedih, suka, cemburu, marah, bahagia. Terimakasih sudah menjadi sahabat yang membantu do'a, tenaga, waktu, ilmu dan bantuan lain selama penulis kuliah.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Januari 2020

Penulis

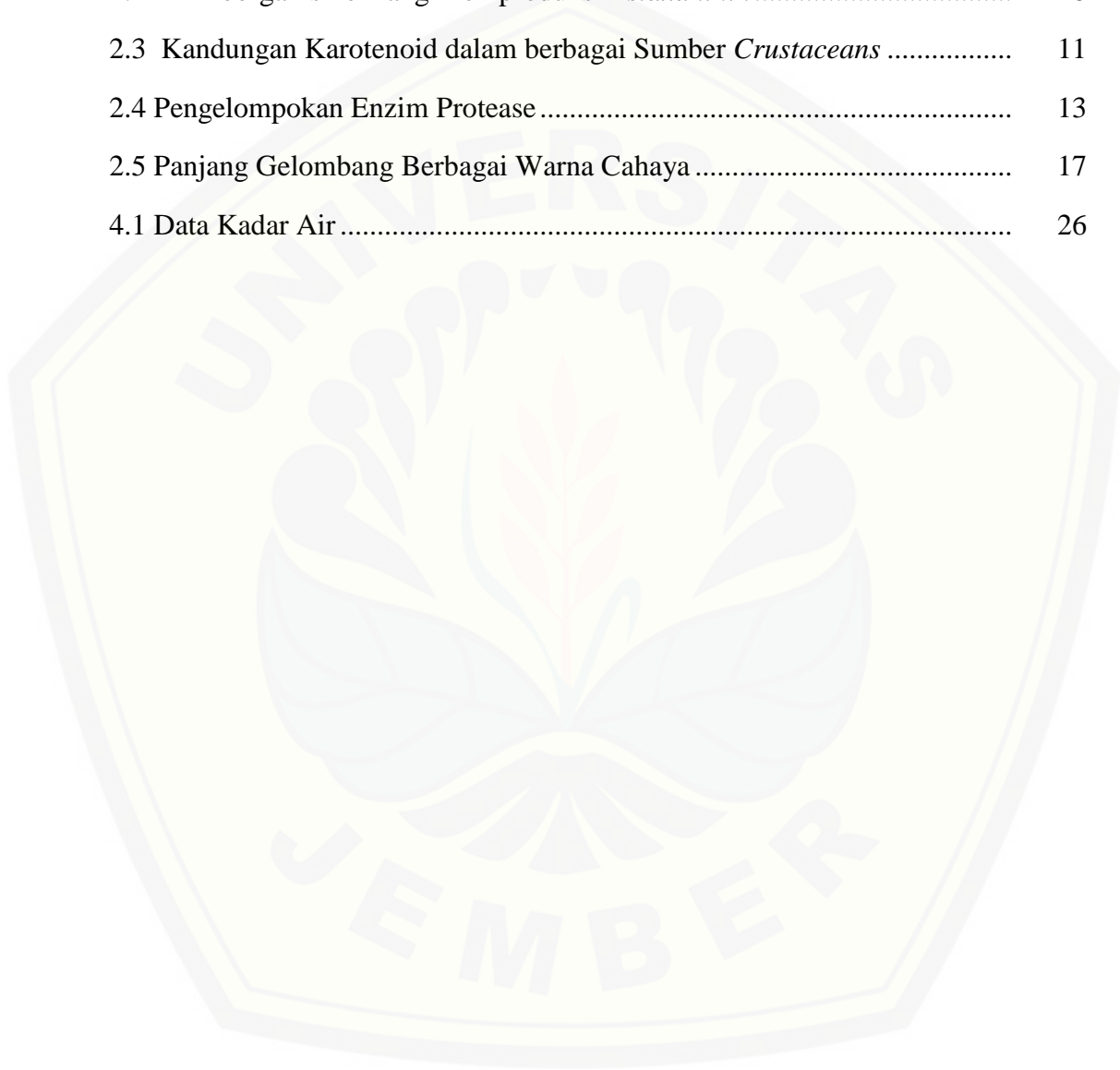
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN SAMPUL	ii
HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iv
HALAMAN MOTTO	v
HALAMAN PERNYATAAN	vi
HALAMAN PEMBIMBING	vii
HALAMAN PENGESAHAN	viii
RINGKASAN	ix
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Batasan Masalah	4
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Udang Vannemei (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	6
2.2 Karotenoid dan <i>Astaxanthin</i>	8
2.3 Ekstraksi <i>Astaxanthin</i>	11
2.4 Enzim Protease	12
2.5 Spektrofotometri <i>Fourier Transform Infrared</i> (FTIR)	15
2.6 Spektrofotometri Visibel	16
BAB 3. METODE PENELITIAN	19
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.2 Alat dan Bahan	19
3.2.1 Alat.....	19
3.2.2 Bahan	19
3.3 Diagram Alir Penelitian	20
3.4 Prosedur Penelitian	21
3.4.1 Preparasi limbah udang.....	21
3.4.2 Analisis kadar air	21

3.4.3 Ekstraksi <i>astaxanthin</i> menggunakan metode autolisis	21
3.4.4 Karakterisasi dengan Spektroskopi FT-IR.....	22
3.4.5 Pembuatan larutan induk <i>astaxanthin</i> 50 ppm.....	22
3.4.6 Pembuatan larutan standar <i>astaxanthin</i>	22
3.4.7 Penentuan panjang gelombang maksimum <i>astaxanthin</i>	23
3.4.8 Pembuatan kurva kalibrasi.....	23
3.4.9 Penentuan persentase <i>astaxanthin</i>	24
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1 Persentase Ekstrak <i>Astaxanthin</i>	26
4.1 Analisis Struktur <i>Astaxanthin</i> menggunakan FT-IR	34
BAB 5. PENUTUP	36
5.1 Kesimpulan	36
5.2 Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	46

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Komposisi Kimia Udang <i>Vannamei</i>	7
2.2 Mikroorganisme Yang Memproduksi <i>Astaxanthin</i>	8
2.3 Kandungan Karotenoid dalam berbagai Sumber <i>Crustaceans</i>	11
2.4 Pengelompokan Enzim Protease	13
2.5 Panjang Gelombang Berbagai Warna Cahaya	17
4.1 Data Kadar Air	26



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Anatomi Udang <i>Vannamei</i>	7
2.2 Struktur Molekul Dari Beberapa Karotenoid.....	10
2.3 Spektra IR <i>Astaxanthin</i>	16
3.1 Diagram Alir Penelitian	20
4.1 Limbah Udang.....	25
4.2 Profil Panjang Gelombang Maksimum <i>Astaxanthin</i> Dengan Pelarut Diklorometana	27
4.3 Profil Kurva Kalibrasi Larutan <i>Astaxanthin</i> Standar Pada Panjang Gelombang 478 nm	27
4.4 Stuktur Protein Beta-Krustasianin	28
4.5 Mekanisme Ikatan <i>Astaxanthin</i> Dengan Protein	29
4.6 Mekanisme Reaksi Pemutusan Ikatan Peptida Oleh Pepsin	30
4.7 Profil Persentase <i>Astaxanthin</i> pada Setiap pH dan Waktu Inkubasi.....	32
4.8 Hasil FT-IR Sampel dan <i>Astaxanthin</i> Pembanding	34

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1.1 Pembuatan Larutan Induk <i>Astaxanthin</i> 50 ppm Seanyak 100 mL.....	46
1.2 Pembuatan Larutan Standart <i>Astaxanthin</i>	46
2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Rentang 10 nm Dan 2 nm...	47
3. Pembuatan Kurva Kalibrasi	48
4. Data Absorbansi <i>Astaxanthin</i> Pada Sampel.....	50
5. Hasil Analisis Konsentrasi Pada Sampel	51
6. Berat <i>Astaxanthin</i> Dalam Sampel	53
7. Persentase <i>Astaxanthin</i>	55
8. Kadar Air.....	58

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara maritim yang memiliki potensi besar sebagai negara penghasil ikan dan *crustacea* seperti udang. Udang merupakan komoditas ekspor non migas dengan nilai ekonomis yang tinggi. Udang yang diekspor biasanya dalam bentuk udang bersih kupas tanpa kepala, kulit, dan ekornya. Menurut data Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP) (2016), ekspor udang sepanjang Januari hingga Agustus 2016 mencapai 136,3 ribu ton dengan nilai 1,13 miliar dolar AS. Potensi ekspor udang setiap tahunnya mengalami peningkatan. Secara volume, ekspor udang naik 6,84 persen dan secara nilai, ekspor udang naik 3,75 persen. Meningkatnya volume ekspor udang, mengakibatkan limbah udang di Indonesia semakin banyak yang terbuang.

Limbah kulit, ekor dan kepala udang yang ada di Indonesia selama ini kurang dimanfaatkan dengan baik. Holanda dan Netto (2006) menyatakan bahwa pemanfaatan limbah udang hanya sebatas untuk campuran pakan ternak dan sebagai produk olahan kitosan. Limbah udang yang terdiri dari kulit, kepala dan ekor udang mengandung beberapa komponen yaitu protein, kitin, enzim, mineral, *natural pigments* dan lain lain (Sjaifullah dan Santoso, 2015). Pigmen yang terdapat dalam limbah udang adalah jenis karotenoid. Rodriguez-Amaya (2006) menyatakan bahwa pigmen karotenoid memiliki beberapa jenis, yaitu seperti likopen, karoten, xantopil, zeaxanthin dan *astaxanthin*. *Astaxanthin* merupakan salah satu pigmen dominan yang terdapat dalam kulit dan kepala udang. *Astaxanthin* akan mengalami perubahan warna dari hijau-biru-coklat menjadi merah keoranyean bila terkena panas. *Astaxanthin* merupakan pigmen golongan karotenoid yang termasuk karoten dan memiliki struktur hidrokarbon serta turunan isoprenoid (Firdaus, 2001).

Ciapara et al. (2006) menunjukkan bahwa karotenoid dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan mencegah infeksi bakteri. Kurashige et al. (1990) dan Shimidzu et al. (1996) juga menyatakan bahwa karotenoid memiliki aktivitas sebagai antioksidan 100 kali lebih kuat dibandingkan dengan vitamin E. Olson

(1999) menyatakan bahwa karotenoid bermanfaat bagi kesehatan manusia dalam hal pencegahan aktivitas kanker paru-paru, kanker prostat dan penyakit jantung.

Di alam, *astaxanthin* tidak didapatkan dalam keadaan bebasnya. *Astaxanthin* dalam keadaan bebas mudah teroksidasi dan bersifat tidak stabil. Oleh karena itu *astaxanthin* dapat diperoleh dengan cara memutus ikatan hidrogen antara *astaxanthin* dengan protein sehingga pigmen yang terdapat dalam limbah udang dapat diekstrak dan diperoleh *astaxanthin* bebas. Terdapat dua metode yang dapat digunakan untuk mendegradasi ikatan peptida pada protein yaitu dengan cara kimiawi dan enzimatis.

Shacindra et al. (2005) telah melakukan ekstraksi karotenoid menggunakan pelarut bahan kimia yaitu aseton dan menghasilkan rendemen sebesar 35,8-153,1 $\mu\text{g/g}$ pada kepala dan 59,8-104,7 $\mu\text{g/g}$ pada kulit udang. Ekstraksi menggunakan pelarut bahan kimia memerlukan jumlah bahan kimia yang banyak sehingga akan menghasilkan banyak limbah cair kimia yang dapat berbahaya bagi lingkungan disekitarnya. Babu (2008) juga telah melakukan penelitian yang menunjukkan bahwa ekstraksi karotenoid menggunakan enzim menghasilkan rendemen sebesar 75,7-96,8 $\mu\text{g/g}$. Ekstraksi karotenoid menggunakan enzim akan memberikan hasil yang lebih banyak dan ramah lingkungan namun penggunaan enzim komersial yang mahal akan memperbesar biaya produksi. Berdasarkan alasan tersebut, perlu adanya alternatif baru untuk menanggulangi penggunaan senyawa kimia yang berdampak buruk pada lingkungan dan mengurangi pemakaian enzim komersial yang mahal. Oleh karena itu dalam penelitian ini dipilih menggunakan metode autolisis yaitu hidrolisis menggunakan enzim yang terkandung dalam udang itu sendiri guna menanggulangi dampak penggunaan bahan kimia dan enzimatik komersial.

Sopiah dan Prayudi (2002) telah melakukan isolasi dan karakterisasi enzim pada limbah udang yang telah mengalami pembusukan selama 15 hari, dan menghasilkan enzim yang mempunyai karakter yang mirip dengan enzim protease. Enzim tersebut optimum dalam mendeproteinasi limbah udang pada suhu 37 °C, meskipun begitu pada suhu 27 °C enzim tersebut masih menunjukkan aktivitasnya. Enzim protease berfungsi untuk memutus ikatan peptida pada

protein menjadi peptida-peptida pendek sehingga *astaxanthin* yang berikatan secara fisik dengan protein bisa didapatkan. Penelitian dari Juniarso (2008) menyatakan bahwa enzim protease yang digunakan menunjukkan aktivitas tinggi pada pH 3 dan 9. Hal ini menunjukkan bahwa protease memiliki aktivitas pada range pH asam hingga sangat basa. Oleh karena itu pada penelitian ini memilih suasana asam dalam proses autolisis enzimatis yaitu antara pH 2,00; 3,00; dan 4,00. pH ini dipilih untuk mengaktifkan enzim yang berasal dari limbah udang serta mencegah terjadinya pembusukan. Timbulnya bau dari pembusukan akan mempengaruhi kualitas pemanfaatan pigmen *astaxanthin* sebagai pewarna makanan alami.

Asam yang digunakan dalam autolisis enzimatis limbah udang ini yaitu asam fosfat, dengan tujuan mengatur pH inkubasi agar tetap pada pH asam yang diinginkan. Penelitian autolisis menggunakan asam fosfat belum pernah peneliti temukan, oleh karena itu penelitian ini menggunakan asam fosfat untuk ekstraksi *astaxanthin* secara autolisis enzimatis. Penggunaan asam fosfat juga direkomendasikan dalam bidang pangan untuk menghasilkan suatu aplikasi produk dari ekstrak *astaxanthin* yang aman untuk dikonsumsi.

Berdasarkan uraian singkat diatas maka dibuatlah penelitian mengenai ekstraksi *astaxanthin* dari limbah udang secara autolisis enzimatis. Proses ekstraksi *astaxanthin* dilakukan secara autolisis enzimatis dalam suasana asam menggunakan H_3PO_4 (asam fosfat) pada suhu ruangan menggunakan enzim protease dari udang itu sendiri. Harapannya dalam penelitian ini, pigmen *astaxanthin* yang terdapat dalam limbah udang dapat terkestrak dengan cara autolisis enzimatis sehingga mengurangi biaya penggunaan enzim komersial serta pencemaran yang dihasilkan dalam penggunaan bahan kimia. Karakterisasi *astaxanthin* dilakukan menggunakan *spektrofotometer* FT-IR dan persentasenya akan diukur menggunakan *spektrofotometer* Visible.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah sesuai dengan latar belakang diatas adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh pH pada autolisis enzimatis limbah udang terhadap persentase *astaxanthin* yang dihasilkan?
2. Bagaimana pengaruh waktu inkubasi autolisis enzimatis limbah udang terhadap persentase *astaxanthin* yang dihasilkan?

1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah diatas, adapun tujuan yang diperoleh dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui pengaruh pH pada autolisis enzimatis limbah udang terhadap persentase *astaxanthin* yang dihasilkan.
2. Mengetahui pengaruh waktu inkubasi autolisis enzimatis limbah udang terhadap persentase *astaxanthin* yang dihasilkan.

1.4 Batasan Masalah

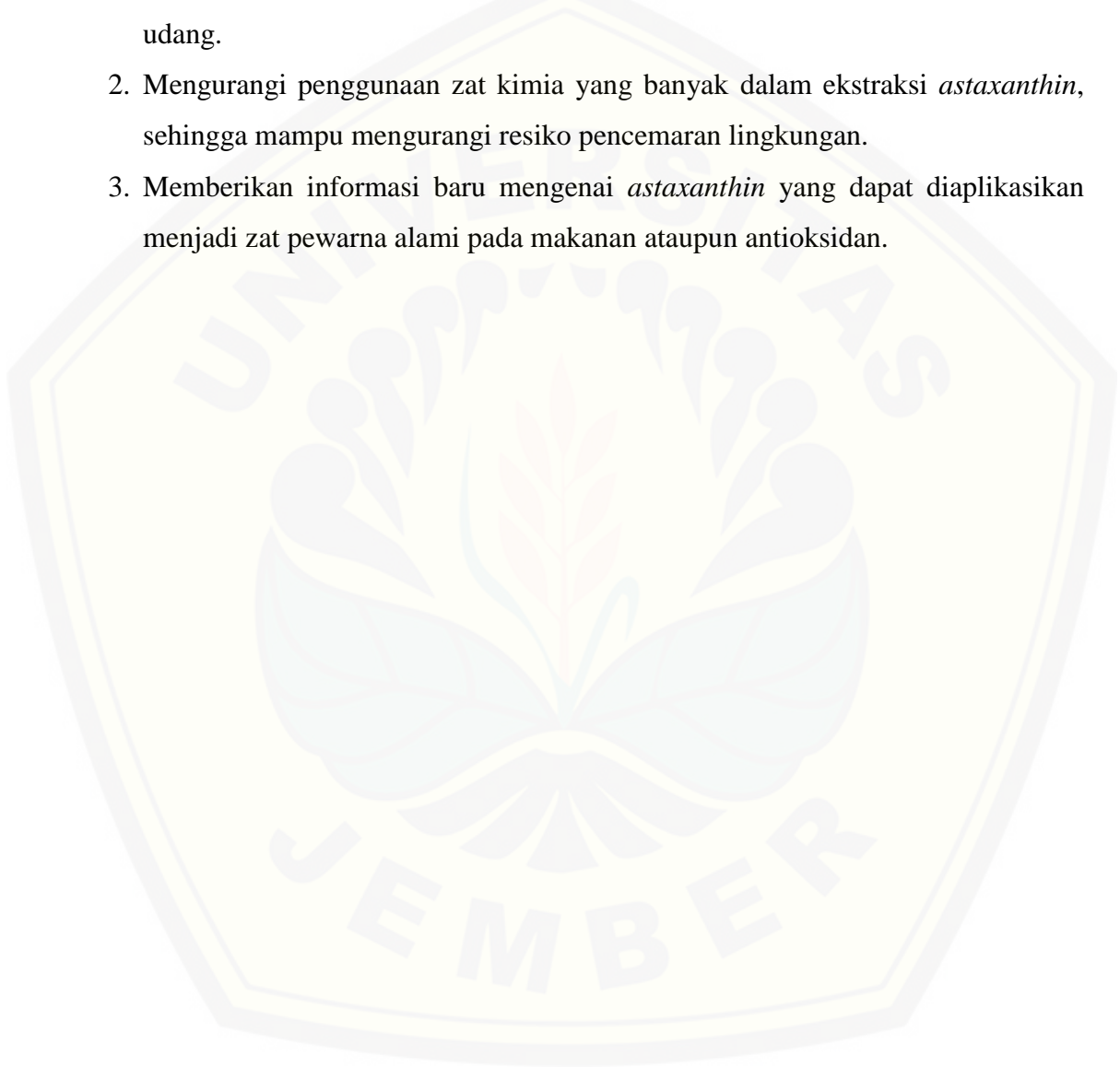
Adapun batasan masalah pada penelitian ini antara lain sebagai berikut:

1. Sampel limbah udang yang digunakan diperoleh dari industri pembekuan udang di PT Istana Cipta Sembada (ICS) Banyuwangi.
2. Enzim yang digunakan adalah enzim protease yang ada pada udang itu sendiri.
3. Uji karakterisasi *astaxanthin* yang dihasilkan dari proses ekstraksi secara autolisis enzimatis yaitu menggunakan uji FT-IR.
4. Metode yang digunakan untuk menghitung rendemen *astaxanthin* adalah menggunakan *spektrofotometer visible*.
5. Variasi pH yang digunakan dalam proses autolisis enzimatis adalah pH $2,00 \pm 0,10$; $3,00 \pm 0,10$; dan $4,00 \pm 0,10$.
6. Variasi waktu yang digunakan dalam proses autolisis enzimatis adalah selama 0, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48, 72, 96, 120, 144 jam
7. Asam yang digunakan dalam proses autolisis enzimatis adalah asam fosfat.
8. Suhu yang digunakan dalam proses autolisis enzimatis adalah pada suhu kamar.
9. Tidak melakukan proses optimalisasi pH.

1.5 Manfaat

Manfaat yang akan didapatkan dalam penelitian ini diantaranya adalah sebagai berikut:

1. Sebagai informasi pemanfaatan limbah udang untuk diolah menjadi produk yang bernilai ekonomis, sehingga dapat meningkatkan nilai jual dari limbah udang.
2. Mengurangi penggunaan zat kimia yang banyak dalam ekstraksi *astaxanthin*, sehingga mampu mengurangi resiko pencemaran lingkungan.
3. Memberikan informasi baru mengenai *astaxanthin* yang dapat diaplikasikan menjadi zat pewarna alami pada makanan ataupun antioksidan.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Udang *Vannamei* (*Litopenaeus vannamei*)

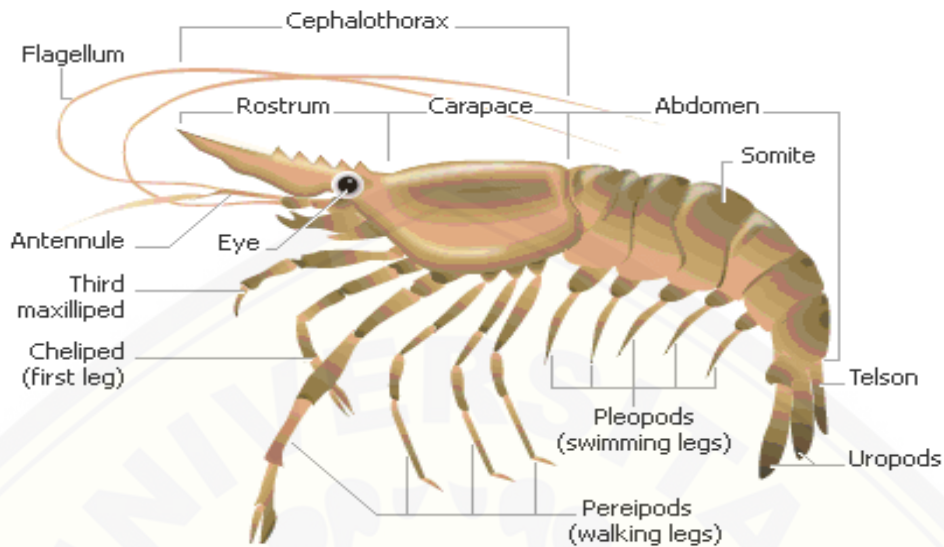
Udang *vannamei* (*Litopenaeus vannamei*) berasal dari daerah subtropis pantai barat Amerika, mulai dari Teluk California di Mexico bagian utara sampai pantai barat Guatemala di Amerika Tengah hingga ke Peru di Amerika Selatan (Tim Perikanan WWF, 2014). Menurut Haliman dan Adijaya (2005), klasifikasi udang *vannamei* (*Litopenaeus vannamei*) sebagai berikut :

Kingdom : Animalia
Filum : Anthropoda
Subfilum : Crustacea
Kelas : Malascostraca
Subkelas : Eumalacostraca
Ordo : Decapoda
Subordo : Dendrobrachiata
Famili : Penaeidae
Genus : *Litopenaeus*
Spesies : *Litopenaeus vannamei*

Habitat udang *vannamei* adalah pada kedalaman kurang lebih 70 meter dari permukaan laut dan daerah dengan dasar yang berpasir. Udang *vannamei* memiliki nama umum *pacific white shrimp*, *camaron blanco*, dan *longostino*. Udang *vannamei* memiliki tubuh dengan bentuk berbuku-buku dan mengalami aktivitas pergantian kulit luar atau eksoskeleton secara periodik (*moulting*). Bagian tubuh udang *vannamei* terdiri dari kepala yang bergabung dengan dada atau *chepalothorax* dan perut atau *abdomen* (Haliman dan Adijaya, 2004). Kordi (2007) menjelaskan bahwa kepala udang kaki putih terdiri dari antena, *antenula*, *mdanibula*, 5 pasang kaki berjalan dan 3 pasang *maxilliped*. Menurut Haliman dan Adijaya (2004), bagian tubuh udang *vannamei* sudah mengalami modifikasi, sehingga dapat digunakan untuk keperluan sebagai berikut:

1. Makan, bergerak dan membenamkan diri ke dalam lumpur
2. Menopang insang karena struktur insang udang mirip bulu unggas
3. Organ sensor, seperti pada antena dan antenula

Anatomi tubuh udang *vannamei* dapat ditunjukkan pada gambar 2.1.



Gambar 2.1 Anatomi udang *vannamei* (Pustekom, 2005)

Udang *vannamei* bersifat *nocturnal*, yaitu aktif mencari makan pada malam hari. Sepasang udang *vannamei* yang berukuran 30-45 gram dapat menghasilkan telur sebanyak 100.000 sampai 250.000 butir (Dinas Kelautan dan Perikanan Daerah, 2008). Ukuran rata-rata berat per ekor udang putih siap konsumsi adalah 15 g dengan uraian sebagai berikut: bobot daging 8,67 g, bobot kepala sebesar 4,33 g dan bobot kulit sebesar 2 g. Komposisi rendemen rata-rata per ekor udang putih adalah pada daging sebesar 58%, pada kepala 29% dan pada kulit sebesar 13% (Hafiz, 2009). Komposisi kimia pada udang *vanname* (*Litopenaeus vannamei*) dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Komposisi kimia udang *vanname*

Parameter	Jumlah (%)
Protein	18,1
Lemak	0,8
Air	78,2
Abu	1,5
Karbohidrat	1,4

Sumber : Hafiz (2009)

2.2 Karotenoid dan Astaxanthin

Karotenoid merupakan pigmen alami yang disintesis oleh tanaman, alga, jamur, kapang dan bakteri. Karotenoid juga dapat ditemukan dalam ikan (salmon, kakap merah), dan *crustacea* (lobster, kepiting, udang). Pigmen *astaxanthin* tidak diproduksi sendiri oleh hewan-hewan tersebut, melainkan diperoleh dari makanannya, yaitu alga (Gimeno *et al.*, 2007).

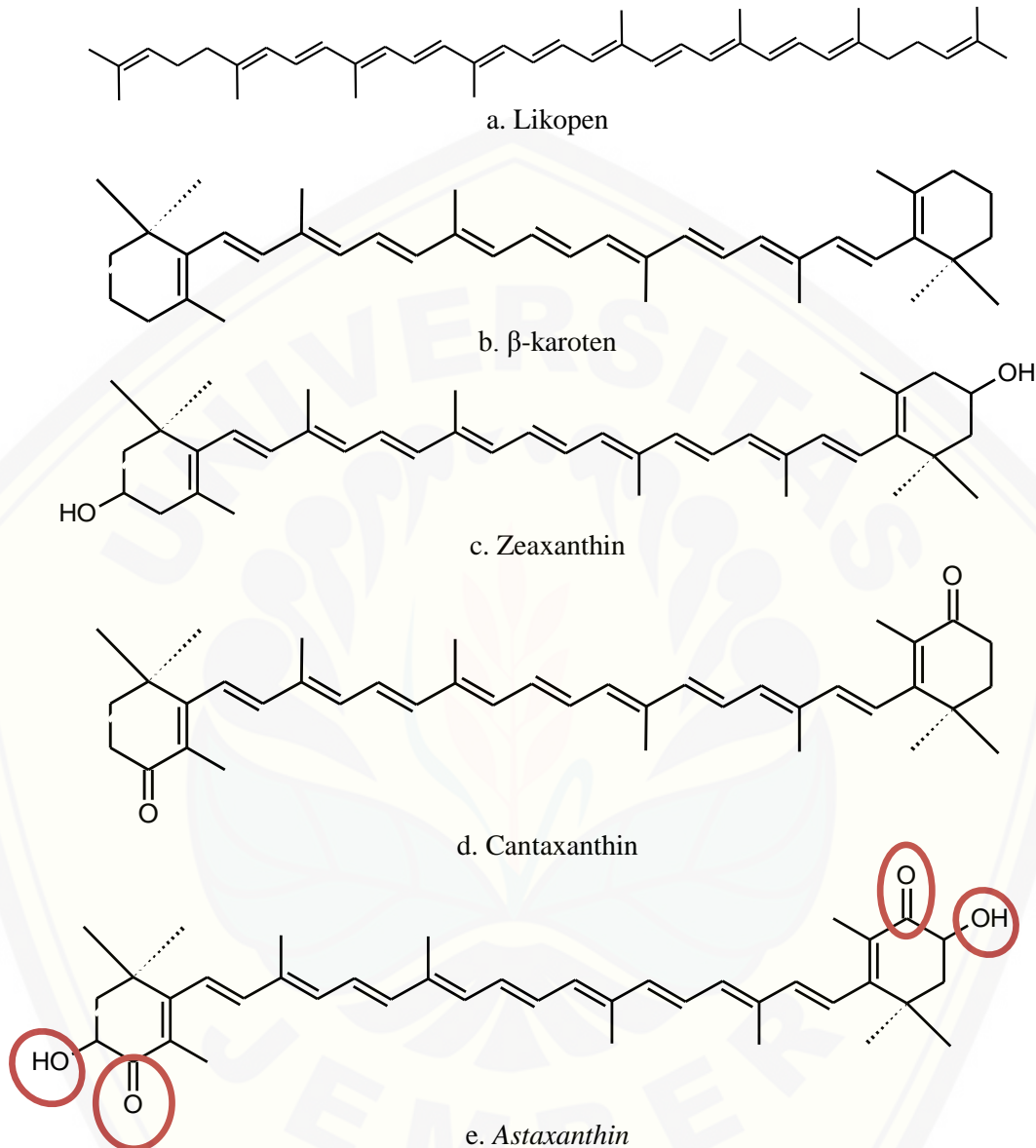
Tabel 2.2. Mikroorganisme yang memproduksi *Astaxanthin*

Sumber Mikroorganisme	Berat Kering <i>Astaxanthin</i> (%)	Referensi
Chlorophyceae		
<i>Haematococcus pluvialis</i>	3.8	Ranga, R. <i>et al.</i> , 2010
<i>Haematococcus pluvialis</i> (AQSE002)	3.4	Olaizola, M, 2000
<i>Haematococcus pluvialis</i> (K-0084)	2.7	Wang, J., <i>et al.</i> , 2013
<i>Chlorella zofingiensis</i>	0.001	Wang, Y dan Peng, J., 2008
Ulvophyceae		
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	0.02	Banerjee, K., <i>et al.</i> , 2009
<i>Ulva lactuca</i>	0.01	Banerjee, K., <i>et al.</i> , 2009
Florideophyceae		
<i>Catenella repens</i>	0.02	Banerjee, K., <i>et al.</i> , 2009
Alphaproteobacteria		
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	0.01	Yokoyama, A., <i>et al.</i> , 1995
<i>Paracoccus carotinifaciens</i> (NITE SD 00017)	2.2	EFSA, 2007
Tremellomycetes		
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> (JH)	0.5	Kim, J.H., <i>et al.</i> , 2005
Labyrinthulomycetes		
<i>Thraustochytrium</i> sp. CHN-3 (FERM P-18556)	0.2	Yamaoka, Y., 2008
Malacostraca		
<i>Pandalus borealis</i>	0.12	EFSA, 2005
<i>Pandalus clarkia</i>	0.015	Meyers, S.P dan Bligh, D., 1981

Karotenoid dapat mengalami reaksi kimia yang menghasilkan turunannya dengan sifat kimia yang masih sama, salah satu turunannya ialah *astaxanthin* yang merupakan pigmen utama dalam *crustacean* (Rodriguez-Amaya et al., 2006). *Astaxanthin* merupakan turunan dari likopen, yang mengandung gugus hidroksil dan gugus keton. *Astaxanthin* terdiri dari 40 atom C dengan dua cincin di bagian ujungnya. Cincin yang terdapat pada *astaxanthin* dihubungkan oleh atom C yang terkonjugasi atau sistem poliena. Ikatan ganda yang terdapat dalam karotenoid dan turunannya merupakan gugus kromofor yang memberikan warna (Ciapara et al., 2006). Gugus hidroksil dan keton yang dimiliki *astaxanthin* mengindikasikan bahwa senyawa tersebut lebih polar dibandingkan dengan jenis karotenoid lainnya dan memiliki aktivitas antioksidan yang sangat tinggi. *Astaxanthin* merupakan pigmen yang memiliki warna merah-oranye yang larut dalam lemak dan banyak ditemukan dalam mikroalga, *crustacean*, ragi, salmon dan lain sebagainya. *Astaxanthin* ini merupakan pigmen yang memberikan warna merah pada daging salmon dan udang ketika dimasak. *Astaxanthin* tidak seperti beberapa karotenoid lainnya yang dapat dikonversi menjadi vitamin A (retinol) di dalam tubuh manusia. *Food dan Drug Administration* (FDA) telah menyetujui *astaxanthin* sebagai zat aditif pewarna makanan untuk keperluan tertentu pada hewan dan makanan ikan. Komisi Eropa menganggap pewarna makanan yang mengandung *astaxanthin* termasuk GRAS atau *generally recognize as safe* (Gimeno et al., 2007).

Struktur dari jenis-jenis karotenoid pada Gambar 2 memiliki perbedaan pada gugus fungsi yang dimilikinya. Perbedaan gugus fungsi ini akan memberikan nilai panjang gelombang maksimum yang berbeda-beda. Panjang gelombang maksimum dari likopen adalah 472 nm (Mu'nisa, 2012). Panjang gelombang maksimum dari β -caroten adalah 452 nm (Octaviani, et al, 2014) dan berwarna oranye-kuning. Panjang gelombang maksimum dari *astaxanthin* adalah 478 nm (Agustini, 2014).

Struktur pigmen karotenoid dan beberapa jenisnya dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Struktur molekul dari beberapa karotenoid (Urich, 1994)

Crustacean mengandung garam mineral (15-35%), protein (25-50%), kitin(25-35%), lipid, dan pigmen (Lee dan Peniston, 1982). Pigmen karotenoid yang terkandung di dalam *Crustacean* telah dilakukan penelitiannya dan menghasilkan data pada tael 2.3:

Tabel 2.3. Kandungan Karotenoid Dalam Berbagai Sumber Limbah *Crustaceans*

Sumber	Total <i>astaxanthin</i> <i>n</i> ($\mu\text{g/g}$)	<i>Astaxanthin</i> (%)			Karotenoid lain yang terkandung	Referensi
		Free	Monoester	Diester		
Shrimp (<i>P. borealis</i>)	14,77	3,95	19,72	74,29	Zeaxanthin	Shahidi dan Synowiecki, 1991
Shrimp (<i>P. borealis</i>)	4,97 ^a	8	22,5	69,5	-	Torrisen <i>et al.</i> , 1981
Shrimp (<i>P. borealis</i>)	3,09 ^a	5,6	18,5	75,9	-	Guillou <i>et al.</i> , 1995
Backs snow crab (<i>Ch. Opilio</i>)	11,96	21,16	5,11	56,57	Lutein, zeaxanthin, astacene	Shahidi dan Synowiecki, 1991

^a $\mu\text{g/g}$ wet basis

Jumlah karotenoid yang terkandung dalam udang dan kepiting antara 119 dan 148 $\mu\text{g/g}$. Udang dan kepiting juga mengandung sejumlah kecil jenis karotenoid lain yaitu lutein, zeaxanthin dan astacene (Shahidi dan Botta, 1994).

Karotenoid dan turunannya bermanfaat bagi kesehatan manusia. Karotenoid dapat mencegah aktivitas kanker paru-paru, penyakit jantung dan katarak. *Astaxanthin* dapat mencegah aktivitas kanker karena dapat menekan pertumbuhan kanker dan meningkatkan daya tahan tubuh untuk melawan antigen. *Astaxanthin* 0,1% dan 0,4% dapat mencegah kanker payudara pada tikus. *Astaxanthin* dapat mencegah oksidasi *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang merupakan kolesterol jahat penyebab *arteriosclerosis* sehingga dapat juga mencegah penyakit jantung (Olson, 1999). Menurut Wadstron dan Alujeng (2001), *astaxanthin* dapat berfungsinya sebagai antibakteri dari *Helicobacter pylori* penyebab kanker usus. Koloni *H. Pylori* di lapisan mukosa usus dihambat karena adanya *astaxanthin* yang berada pada lapisan mukosa usus tersebut.

2.3 Ekstraksi *Astaxanthin*

Ekstraksi *astaxanthin* merupakan suatu proses untuk memperoleh *astaxanthin* dari bahan yang diduga mengandung *astaxanthin*, seperti limbah udang. *Astaxanthin* dalam limbah udang merupakan senyawa kompleks yang berikatan secara nonkovalen dengan protein (Gimeno et al., 2007). Ekstraksi *astaxanthin*

telah banyak dilakukan dengan berbagai metode, yaitu menggunakan pelarut kimia, minyak dan enzim. Ekstraksi *astaxanthin* menggunakan pelarut kimia diantaranya menggunakan pelarut aseton, metanol dan etanol. Ekstraksi *astaxanthin* menggunakan pelarut kimia memang efektif akan tetapi memiliki beberapa kekurangan, yaitu proses pemisahan *astaxanthin* dan pelarut kimia sangat sulit sehingga dapat mendegradasi *astaxanthin* dan hasil ekstraksinya tidak aman bagi kesehatan. Ekstraksi *astaxanthin* menggunakan pelarut minyak tidak dapat dijadikan sebagai aplikasi produk suplemen kesehatan karena kandungan asam lemak tak jenuhnya sangat tinggi sehingga tidak baik untuk kesehatan (Lee et al., 1999). Chakrabarti (2002) telah melakukan penelitian ekstraksi karotenoid menggunakan enzim protease dan rendemen yang dihasilkan sebesar 30 – 40 ppm. Penggunaan enzim protease berguna untuk memutus ikatan hidrogen antara protein dengan karotenoid sehingga diperoleh karotenoid bebas. Metode ini juga dapat dilakukan pada *astaxanthin*. Penggunaan enzim dalam ekstraksi karotenoid tidak menghasilkan residu yang berbahaya bagi tubuh dan lingkungan.

Ekstraksi dengan metode menggunakan enzim memiliki kekurangan yaitu besarnya biaya enzim komersial yang digunakan. Ekstraksi *astaxanthin* dapat dilakukan dengan cara autolisis yaitu proses hidrolisis yang dilakukan oleh enzim dari dalam udang itu sendiri. Penggunaan metode autolisis untuk ekstraksi *astaxanthin* akan mengurangi biaya pembelian enzim komersial dan memiliki kelebihan yang sama dengan menggunakan enzim komersial.

2.4 Enzim Protease

Enzim merupakan suatu kelompok protein yang berperan sangat penting dalam proses aktivitas biologis. Enzim berperan sebagai katalisator pada sel dan sifatnya sangat khas karena enzim hanya bekerja pada substrat tertentu dan dengan jenis reaksi tertentu (Lehninger, 1995). Kelebihan enzim sebagai katalisator dibandingkan dengan bahan-bahan kimia lainnya adalah memiliki sifat spesifitas yang tinggi. Enzim hanya mengkatalisis substrat tertentu, tidak terbentuk produk samping yang tidak diinginkan, mempunyai produktivitas yang tinggi sehingga dapat mengurangi biaya. Produk akhir pada umumnya tidak

terkontaminasi sehingga mengurangi biaya purifikasi dan mengurangi efek kerusakan terhadap lingkungan (Chaplin dan Burke, 1990). Protease adalah enzim yang mengkatalisasi pemecahan ikatan peptide dalam peptide, polipeptida, dan protein dengan menggunakan reaksi hidrolisis menjadi molekul-molekul yang lebih sederhana seperti peptide rantai pendek dan asam amino (Naiola & Widyastuti, 2007). Aktivitas enzim ini membutuhkan air sehingga dikelompokkan dalam kelas hidrolase. Aktivitas enzim dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain suhu dan pH. Suhu yang semakin tinggi dapat mempercepat terjadinya reaksi kimia dan juga mempercepat reaksi yang dikatalisis enzim, tetapi kenaikan suhu dapat mempengaruhi struktur enzim sehingga terjadi inaktivasi (Reed, 1975).

Enzim protease dapat bersumber dari hewan, tumbuhan dan mikroorganisme. Enzim protease yang bersumber dari hewan antara lain adalah pepsin, renin, kolagenase hewan, tripsin dan kimotripsin. Enzim protease yang bersumber dari tumbuhan yaitu papain, fisin dan bromelin. Enzim protease yang bersumber dari mikroorganisme antara lain yaitu keratinase, subtilisin dan rennet mikroba. Enzim protease dapat dibagi menjadi empat golongan, yang disajikan pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4. Pengelompokan enzim protease

Pengelompokan	Jenis Enzim	Keterangan	Contoh
Golongan pertama	Enzim protease serin	Sisi aktifnya adalah residu serin	Trupsin, kimotripsin, elastase, subtilin
Golongan kedua	Enzim protease sulfhidril	Sisi aktifnya adalah residu sulfhidril	Papain, fisin, bromelin
Golongan ketiga	Enzim protease metal	Sisi aktifnya tergantung pada adanya hubungan metal	Karboksipeptidase A
Golongan keempat	Protease asam	Pada sisi aktifnya terdapat dua gugus karbonil	Pepsin, renin

Sumber: Winarno (1986)

1. Pepsin:

Merupakan salah satu jenis enzim protease asam yang dapat memotong ikatan peptida dibagian tengah rantai polipeptida protein (endopeptidase) dan tergolong protease aspartil yaitu memiliki residu asam aspartate pada sisi aktifnya. Pepsin termasuk enzim hidrolase yang dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis suatu substrat dengan pertolongan molekul air (Winarno, 1986). Pepsin dapat memecah protein menjadi fragmen-fragmen yang lebih kecil. Pepsin merupakan enzim pencernaan yang dibentuk di dalam mukosa lapis lambung dalam bentuk pepsinogen. Keasaman isi lambung yang tinggi akan membantu perubahan pepsinogen menjadi pepsin yang aktif secara autokatalitik (De Man, 1997). Enzim pepsin akan menghidrolisis ikatan peptida antara asam amino seperti -Leu-Val-; -Glu-Ala-; -Ala-Leu- (Bergemeyer, 1983). Pepsin sangat aktif pada pH yang rendah (pH 1,0). Pepsinogen akan terpecah dan terbentuk pepsin aktif pada pH di bawah 5. Berat molekul pepsin adalah 33.000 kDa dan mempunyai 321 residu asam amino. Pepsin stabil pada pH 5-5,3, dan aktif pada pH 1-4 dengan keaktifan optimum pada pH 1,8 (Winarno, 1986). Enzim pepsin mempunyai daya katalitik yang lebih tinggi pada keasaman yang tinggi sehingga dapat mencegah kontaminasi bakteri dan terjadinya pembusukan (Mahdi dan Aulannia'am, 2001).

2. Tripsin:

Merupakan salah satu enzim ensopeptidase yang tergolong dalam protease serin. Tripsinogen diaktifkan dalam duodenum atau sistem pencernaan oleh enzim lain dan memiliki pH optimum 7,8-8,7 (Whittaker, 2003).

3. Kimotripsin:

Terdapat dalam sistem pencernaan dari hasil pengaktifan kimotripsin oleh aktivitas tripsin. Enzim ini tergolong dalam enzim protease serin dan berfungsi sebagai penghidrolisis rantai polipeptida pada bagian tengah rantai (Whittaker, 2003).

4. Papain:

Merupakan enzim protease sulfhidril yang memiliki aplikasi cukup luas, mulai dari bahan pelunak daging hingga berbagai industri pangan, minuman, kosmetika, dan industri biologi lainnya (Winarno, 1986). Papain stabil pada suhu tinggi dan

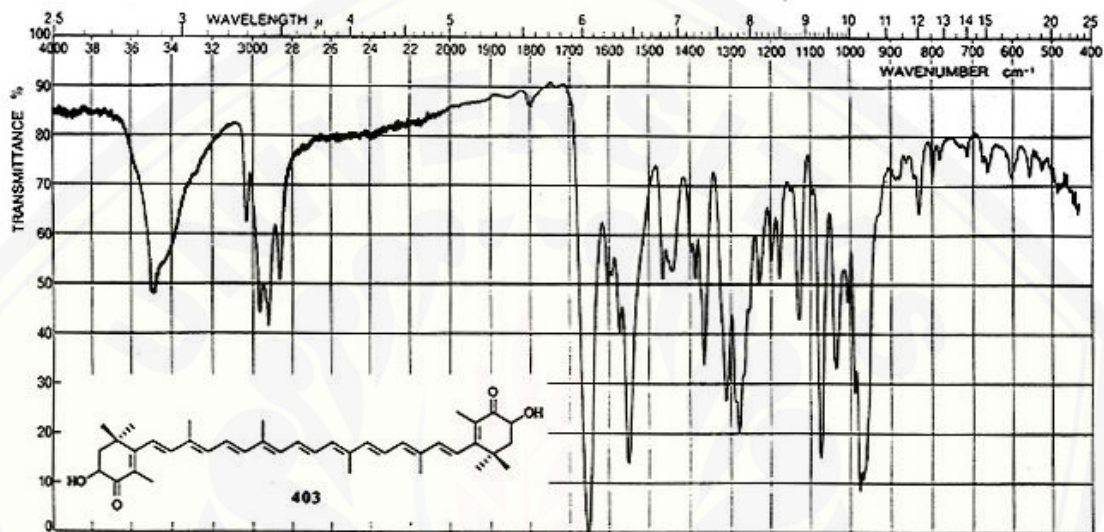
pada pH netral. Papain akan cepat menjadi inaktif pada pH asam (kurang dari pH 4) dan inaktivasi akan sangat cepat bahkan terjadi pada suhu 25 °C ketika berada pada pH sangat asam (kurang dari 2). Papain memiliki pH optimum pada substrat yang berbeda-beda. Papain optimum pada pH 7,2 menggunakan substrat Benzoil Arginil Etil Ester (BAEE), pH 6,5 pada substrat kasein, pH 7,0 pada albumin, dan pH 5,0 pada substrat gelatin (Muchtadi et al., 1992).

2.5 Spektrofotometri *Fourier Transform Infrared* (FTIR)

Spektroskopi inframerah merupakan teknik yang sering digunakan untuk menentukan struktur kimia suatu senyawa. Metode ini berdasarkan pada pengukuran frekuensi vibrasi dalam molekul dan digunakan untuk menentukan gugus fungsi dalam suatu senyawa. Frekuensi vibrasi suatu molekul tergantung dari massa atom dan kekuatan ikatan serta geometri molekul. Ikatan rangkap tiga memiliki frekuensi yang lebih kuat dari pada ikatan rangkap dua dan begitu seterusnya. Terdapat hal-hal yang mempengaruhi serapan IR, yaitu interaksi ikatan molekular, kepolaran senyawa melalui interaksi dipol-dipol. Apabila terdapat senyawa yang simetrik dan memiliki momen dipol yang kecil, maka vibrasi yang dihasilkan juga kecil, sehingga spektrum yang dihasilkan kecil atau bahkan hampir tidak nampak (Wade, 2010).

Spektra inframerah suatu senyawa dapat memberikan gambaran dan struktur molekul senyawa tersebut. Spektra IR dapat dihasilkan dengan mengukur absorpsi radiasi, refleksi atau emisi di daerah IR. Daerah inframerah pada spektrum gelombang elektromagnetik mencakup bilangan gelombang 14.000 cm^{-1} hingga 10 cm^{-1} . Daerah inframerah sedang (4000-400 cm^{-1}) berkaitan dengan transisi energi vibrasi dari molekul yang memberikan informasi mengenai gugus-gugus fungsi dalam molekul tersebut. Daerah inframerah jauh (400-10 cm^{-1}) bermanfaat untuk menganalisis molekul yang mengandung atom-atom berat seperti senyawa anorganik, namun membutuhkan teknik khusus yang lebih baik. Daerah inframerah dekat adalah pada bilangan gelombang 12.500-4000 cm^{-1} (Schechter, 1971).

Prinsip kerja spektrofotometer FT-IR didasarkan pada besarnya frekuensi sinar infra merah yang diserap dengan tingkat energi tertentu. Molekul senyawa kompleks yang ditembak dengan energi dari sinar yang akan menyebabkan molekul tersebut mengalami vibrasi. Besarnya energi vibrasi tiap atom atau molekul berbeda tergantung pada atom-atom dan kekuatan ikatan sehingga dihasilkan frekuensi yang berbeda pula (Suseno dan Firdausi, 2008).



Gambar 2.3. Spektra IR *astaxanthin* (Bernhard et al., 1990)

Struktur kimia *astaxanthin* memiliki beberapa gugus fungsi seperti hidroksida (-OH), karbonil (C=O), dan ikatan rangkap konjugasi serta ikatan rantai C-C aromatik. Gugus fungsi ini nantinya akan memberikan serapan yang berbeda-beda pada panjang gelombang tertentu. Berdasarkan gambar 2.4, dapat dilihat bahwa spektra tersebut menunjukkan *peak* pada bilangan gelombang sekitar 3400 cm^{-1} yang mendandakan gugus -OH, daerah 1650 cm^{-1} mewakili gugus C=O (gugus fungsi keton) (Bernhard et al., 1990).

2.6 Spektrofotometri *Visibel*

Spektrofotometri *visible* adalah teknik analisis spektroskopik yang memakai sumber REM (radiasi elektromagnetik) sinar tampak (380-780 nm) dengan memakai instrumen spektrofotometer. Spektrofotometri *visible* melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometri *visible* lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif

dibandingkan kualitatif. Absorbansi cahaya *visible* mengakibatkan transisi elektronik, yaitu promosi elektron-elektron dari orbital keadaan dasar yang berenergi rendah ke orbital keadaan tereksitasi berenergi lebih tinggi. Energi yang terserap kemudian terbangun sebagai cahaya atau tersalurkan dalam reaksi kimia. Spektrofotometri *visible* disebut juga spektrofotometri sinar tampak atau sinar yang dapat dilihat oleh mata (Day dan Underwood, 2002). Panjang gelombang dari berbagai warna adalah sebagai berikut:

Tabel 2.5. Panjang gelombang berbagai warna cahaya

λ (nm)	Warna yang teradsorpsi	Warna tertransmisi (komplemen)
400-435	Violet	Hijau-Kuning
435-480	Biru	Kuning
480-490	Biru-Hijau	Oranye
490-500	Hijau-Biru	Merah
500-560	Hijau	Ungu
560-580	Hijau-Kuning	Violet
580-595	Kuning	Biru
595-650	Oranye	Biru-Hijau
650-760	Merah	Hijau-Biru

Sumber: Day dan Underwood, 2002

Menurut hukum Lambert, serapan berbdaning lurus terhadap ketebalan sel yang disinari, dengan bertambahnya ketebalan sel maka serapan akan bertambah sehingga didapatkan persamaan sebagai berikut:

$$A = k.b \quad (2.1)$$

Menurut hukum Beer, serapan berbdaning lurus dengan konsentrasi, jika konsentrasi bertambah maka jumlah molekul yang dilalui berkas sinar akan bertambah, sehingga serapan juga akan bertambah. Persamaan yang didapat adalah sebagai berikut:

$$A = k.c \quad (2.2)$$

Berdasarkan teori dari Lambert dan Beer dapat disimpulkan bahwa serapan berbdaning lurus dengan konsentrasi dan ketebalan sel. Persamaannya dapat ditulis sebagai berikut:

$$A = k.c.b \quad (2.3)$$

Nilai tetapan (k) dalam hukum Lambert-Beer tergantung pada sistem konsentrasi yang digunakan. Bila konsentrasi dalam satuan gram per liter, tetapan (k) disebut

dengan absorptivitas (s) dan bila satuan konsentrasi dalam mol per liter, tetapan tersebut adalah absorptivitas molar (ϵ). Hukum Lambert-Beer dapat dinyatakan dalam rumus berikut:

$$A = a.b.c \text{ (g/liter) atau } A = \epsilon.b.c \text{ (mol/liter)} \quad (2.4)$$

Keterangan:

A = serapan

a = absorptivitas

b = ketebalan sel

c = konsentrasi

ϵ = absorptivitas molar

(Day dan Underwood, 2002).

Hukum Lambert-Beer ini menjadi dasar aspek kuantitatif spektrofotometri dimana konsentrasi dapat dihitung menggunakan persamaan (2.4). Konsentrasi suatu sampel dapat diketahui melalui spektroskopi *visible* ini dengan cara membuat larutan baku pembandingan terlebih dahulu. Melalui hukum lambert-beer akan didapatkan kurva hubungan antara konsentrasi larutan baku dan luas puncak (absorbansi) dari suatu sampel. Konsentrasi sampel kemudian diukur dengan spektrofotometer *visible* pada panjang gelombang yang sebelumnya sudah di *scanning*. Absorbansi sampel yang didapatkan hasil pengukuran kemudian dimasukkan dalam persamaan garis linier yang didapatkan saat pembuatan kurva larutan baku sehingga konsentrasi sampel dapat diketahui.

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel limbah udang dilakukan di daerah Banyuwangi Jawa Timur. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik dan Kimia Analitik, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember. Karakterisasi Uji FTIR dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Pelaksanaan mulai dari bulan Januari 2018 sampai selesai.

3.2 Alat dan Bahan

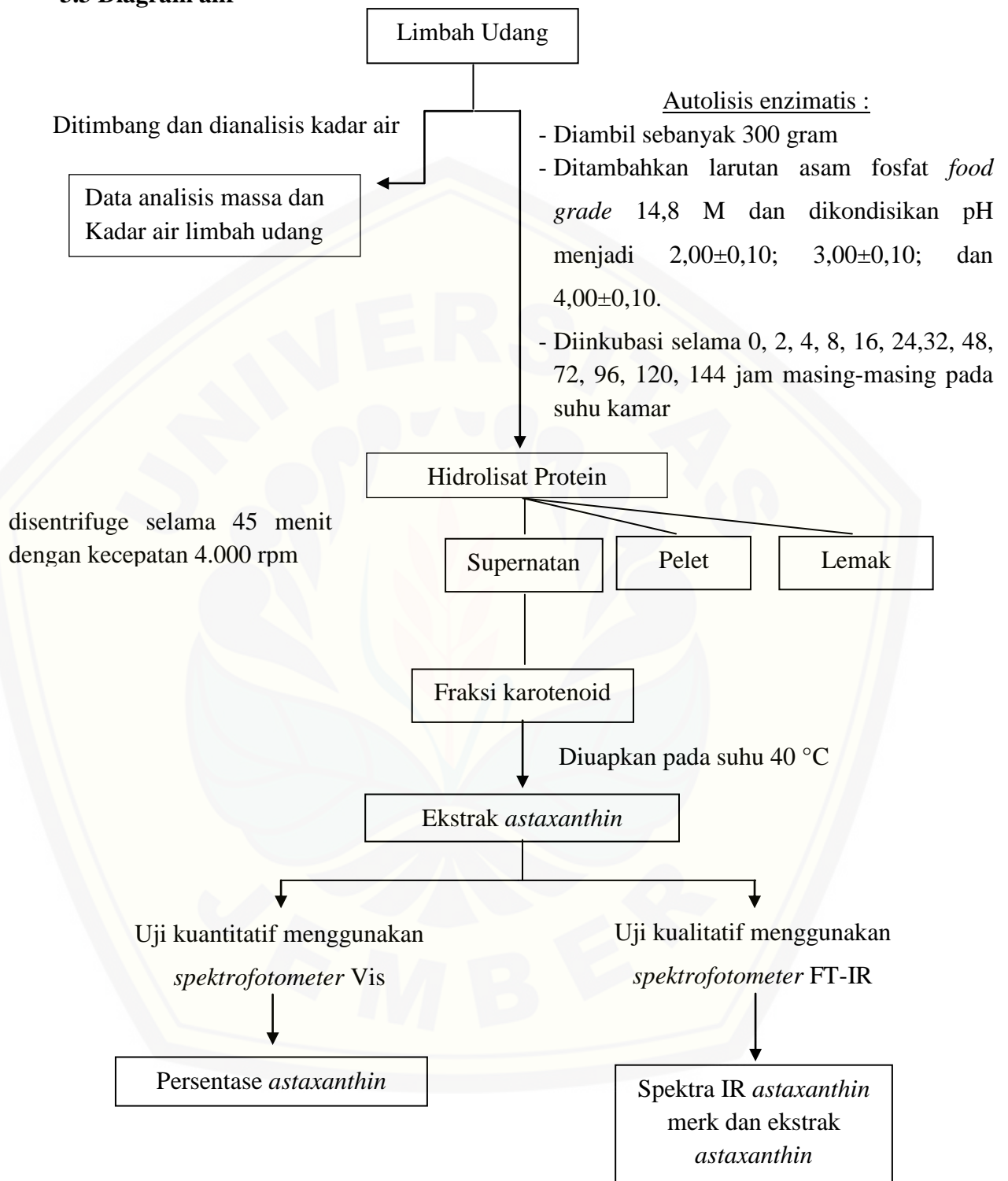
3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam ekstraksi *astaxanthin* ini antara lain: *sentrifuge* dan tube, sendok, blender, *chamber*, gelas beaker, batang pengaduk, gelas arloji, labu ukur 100 mL, pipet tetes, botol semprot, pipet mohr, pH meter, neraca analitis, desikator, oven. Alat-alat yang digunakan dalam analisis adalah *spektrofotometer visible* (Shimadzu) dan *spektrofotometer FT-IR*.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi limbah udang (kepala, kulit, ekor) yang diperoleh dari industri pembekuan udang di PT. Istana Cipta Sembada Banyuwangi. Bahan lain yang digunakan dalam proses ekstraksi adalah asam fosfat, diklorometana dan akuades, tisu, kertas label. Bahan yang digunakan untuk analisis adalah *astaxanthin* komersial merk.

3.3 Diagram alir



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

(Li et al., 2002)

3.4 Prosedur Penelitian

Tahapan penelitian dilakukan berdasarkan uraian rumusan masalah serta tujuan, meliputi:

3.4.1 Preparasi limbah udang

Limbah udang mentah digiling lalu ditimbang 300 gram sebanyak 3 kali untuk 3 kali pengulangan per pH. Total limbah udang yang digunakan untuk 3 pH ($2,00 \pm 0,10$; $3,00 \pm 0,10$; dan $4,00 \pm 0,10$) adalah sebesar 2700 gram. Limbah udang yang sudah ditimbang tersebut kemudian dihaluskan menggunakan blender. Limbah udang yang sudah halus masing-masing dimasukkan dalam toples yang sudah diberi tanda 1,2, dan 3 setiap pH untuk 3 kali pengulangan.

3.4.2 Analisis kadar air

Sampel yang sudah halus ditimbang 3 g dan diletakkan dalam cawan kosong yang sudah ditimbang beratnya, cawan dan tutupnya sudah dikeringkan di dalam oven ($105\text{ }^{\circ}\text{C}$) serta didinginkan di dalam desikator. Cawan yang berisi sampel kemudian ditutup dan dimasukkan ke dalam oven dengan suhu $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 3 jam atau sampai beratnya konstan. Cawan lalu didinginkan di dalam desikator dan setelah dingin cawan ditimbang. Perlakuan diulang sampai berat konstan. Kadar air dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar air (wet basis) (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

Keterangan:

A = berat sampel awal (g)

B = berat sampel setelah dikeringkan (g)

(AOAC, 1999)

3.4.3 Ekstraksi *astaxanthin* menggunakan metode autolisis enzimatis

Metode ini pernah dilakukan Li et al., 2002. Limbah udang yang sudah dimasukkan ke dalam *chamber* ditambahkan larutan H_3PO_4 14,8 M sedikit demi sedikit hingga pH mencapai $2,00 \pm 0,10$ kemudian *chamber* ditutup rapat. Limbah udang yang telah direndam dibiarkan dan tetap dilakukan pengontrolan pH pada

waktu 0, 2, 4, 8, 16, 24, 32, 48, 72, 96, 120, 144 jam serta supernatannya diambil untuk dianalisis ekstrak *astaxanthin*nya. Proses autolisis enzimatis di atas masing-masing dilakukan pada suhu kamar. Supernatan hasil autolisis kemudian ditambahkan dengan diklorometana, lalu disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 4.000 rpm. Diambil fraksi karotenoid yang merupakan *astaxanthin* dan diuapkan pada suhu 40 °C kemudian didapatkan ekstrak *astaxanthin*.

3.4.4 Karakterisasi dengan Spektroskopi FT-IR

Karakterisasi menggunakan FT-IR ditujukan untuk mengetahui apakah benar ekstrak yang didapatkan pada proses ekstraksi autolisis enzimatis limbah udang adalah *astaxanthin*. Uji FT-IR dilakukan pada sampel dan *astaxanthin* merk.

3.4.5 Pembuatan larutan induk *astaxanthin* 50 ppm

Pembuatan larutan induk *astaxanthin* 50 ppm dilakukan dengan cara melarutkan padatan *astaxanthin* komersial sebanyak 0,005 g ke dalam diklorometana menggunakan labu ukur 100 mL. Penimbangan padatan *astaxanthin* komersial sebanyak 0,005 g berdasarkan perhitungan sebagai berikut:

$$Mr \text{ Astaxanthin} = 596,841 \text{ g/mol}$$

$$50 \text{ ppm} = 50 \text{ mg/L} = 0,05 \text{ g/L}$$

$$M = (0,05 \text{ g/L}) / (596,841 \text{ g/mol}) = 0,00008 \text{ mol/L}$$

Larutan dibuat dalam 100 mL

$$M = (\text{mol}) / v$$

$$\text{Mol} = 0,00008 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} = 0,000008 \text{ mol}$$

$$\text{Mol} = (\text{gram}) / Mr$$

$$0,000008 \text{ mol} \times 596,841 \text{ g/mol} = 0,005 \text{ gram}$$

Jadi sebanyak 0,005 gram padatan *astaxanthin* dilarutkan dengan diklorometana hingga 100 mL

3.4.6 Pembuatan larutan standar *astaxanthin*

Larutan induk 50 ppm diencerkan menjadi 30, 25, 20, 15, 10, 5 ppm sebanyak 50 mL sebagai larutan standar, menggunakan rumus berikut:

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

dengan:

V_1 = volume larutan sebelum pengenceran

M_1 = konsentrasi larutan sebelum pengenceran

V_2 = volume larutan setelah pengenceran

M_2 = konsentrasi larutan setelah pengenceran

a. Larutan 5,0 ppm sebanyak 50 mL

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_2 = \frac{V_1 \cdot M_1}{M_2}$$

$$V_2 = \frac{50 \cdot 5,0}{50}$$

$$V_2 = 5,0 \text{ mL}$$

Larutan induk 50 ppm diambil sebanyak 5 mL dan diencerkan pada labu ukur 50 mL menggunakan diklorometana sampai tanda batas. Perhitungan ini analog untuk larutan standar 30, 25, 20, 15 dan 10 ppm.

3.4.7 Penentuan panjang gelombang maksimum *astaxanthin*

Penentuan panjang gelombang maksimum diperlukan untuk memperoleh hasil absorbansi yang maksimum pada pengukuran kadar *astaxanthin* menggunakan spektrofotometri visibel. Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan dengan menggunakan larutan standar *astaxanthin* 20 ppm. Larutan tersebut kemudian diukur dengan panjang gelombang antara 400-550 nm dengan interval 10 nm. Setelah diperoleh panjang gelombang maksimum maka rentangnya diperkecil menjadi 2 nm. Percobaan dilakukan sebanyak 3 kali sehingga dihasilkan panjang gelombang maksimum rata-rata.

3.4.8 Pembuatan kurva kalibrasi

Pembuatan kurva kalibrasi dibuat dengan cara melakukan pengukuran absorbansi larutan standar *astaxanthin* 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, dan 30 ppm pada panjang gelombang maksimum yang telah dilakukan melalui *scanning* sebelumnya. Nilai absorbansi yang telah diperoleh kemudian

digunakan untuk membuat kurva kalibrasi antara konsentrasi larutan standart dengan absorbansi. Kurva kalibrasi yang diperoleh akan menghasilkan persamaan regresi ($y = mx + c$) yang akan digunakan sebagai penentuan kadar *astaxanthin* dalam sampel

3.4.9 Penentuan persentase *astaxanthin*

Ekstrak *astaxanthin* yang sudah didapatkan dari hasil ekstraksi kemudian ditambahkan pelarut diklorometana dan diukur serapannya pada panjang gelombang hasil scanning menggunakan *spektrofotometer visible*. Nilai absorbansi ekstrak *astaxanthin* kemudian dimasukkan ke persamaan regresi linier yang dihasilkan dari kurva kalibrasi untuk digunakan mencari konsentrasi dari ekstrak *astaxanthin*. Nilai konsentrasi yang dihasilkan dapat digunakan untuk mencari massa dari ekstrak *astaxanthin*. Persentase *astaxanthin* dapat dihasilkan dari hasil perhitungan persamaan berikut:

$$\% \text{ Astaxanthin} = \frac{\text{B.Axt dalam sampel}}{\frac{\text{BUK}}{\text{Sampling}}} \times 100 \%$$

Keterangan:

BUK : Berat Udang Kering

B.Axt : Berat *Astaxanthin*

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

Persentase *astaxanthin* yang dapat diekstrak selama hidrolisis secara enzimatis pada limbah udang menggunakan protease dari udang dipengaruhi oleh pH dan waktu inkubasi. pH yang paling asam pada penelitian ini memberikan hasil persentase *astaxanthin* yang optimum. Persentase *astaxanthin* yang optimum ditunjukkan pada pH $2,0 \pm 0,01$ dan waktu inkubasi 48 jam yaitu 0,005702%.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, perlu adanya penelitian lebih lanjut tentang variasi pelarut yang digunakan dalam ekstraksi hasil autolisis serta metode pemisahan lain saat ekstraksi. Hal lain yang perlu dikaji adalah variasi pH asam yang lebih banyak (kurang dari pH 2 atau lebih dari pH 4).

DAFTAR PUSTAKA

- Aflalo, C., Y. Meshulam., A. Zarka, dan S. Boussiba. 2007. *On the relative efficiency of two- vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga Haematococcus pluvialis*. Biotechnol. Bioeng. 98, 300–305
- Agustini, N. W. S. 2014. *Kdanungan Pigmen Astaxanthin Dari Mikroalga Botryococcus Braunnii pada Berbagai Penambahan Nitrogen dan Phosphor*. Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI.
- Aida, U. dan H. Albu. 2007. *Chemical Composition Of Carotenoprotein From Penaeus sp.* Rumania: Institutul de Igiena si Sanatate Publică Veterinară, Institute of Hygiene dan Public Veterinary Health 5 Campul Mosilor, Bucharest 2.
- AOAC. 1999. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist*. Association of Official Analytical Chemist. Washington, USA.
- Ayudiarti, D. L. 2011. *Ekstraksi Karotenoid Dari Kepala Udang Secara Enzimatis Dan Karakterisasi Profil Karotenoid Sebagai Antioksidan*. Tesis. Bogor: IPB.
- Babu, C. M., R. Chakrabarti, dan K. R. S. Sambasivarao. 2008. *Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste dan its use as a source of carotenoids*. Swiss Soc of Food Sci dan Technol. 41: 227–235.
- Banerjee, K., R. Ghosh, S., Homechaudhuri., A. Mitra. 2009. *Biochemical composition of marine macroalgae from gangetic delta at the apex of Bay of Bengal*. Afr. J. Basic Appl. Sci. 1, 96–104.
- Baron, M., R. Socola., A. Kaas., J. Arhaliass., K. Rodriguez., Le Roux, C. Donnay-Moreno, J.P. Bergé. 2017. *Elements for optimizing a one-step enzymatic bio-refinery process of shrimp cuticles: Focus on enzymatic proteolysis screening*. France: Univercity de Nantes.

- Begum. 2015. *On the origin dan variation of colors in lobster carapace*. Phys. Chem. Chem. Phys., vol. 17, no. 26, pp. 16723–16732.
- Bergmeyer, H. U. 1983. *Methods of enzymic analysis*. Vol 2. Florida, Verlag chemie.Florida.
- Britton, G. 1995. *Structure dan properties of carotenoids in relation to function*. The FASEB Journal., 9:1551–1558.
- Chakrabarti, R. 2002. *Carotenoprotein from tropical brown shrimp shell waste by enzymatic process*. J Food Biotech. 16(1):81-90.
- Chaplin, M., F. Burke. 1990. *Enzyme Technology*. Cambridge, Great Britain: Cambridge University Press.
- Ciapara H., F. Vanezuela, dan F. M Goycoolea. 2006. *Astaxanthin: A review of its chemistry dan applications*. Critc Rev in Food Sci dan Nutr. 46:185–196.
- Dachriyanus. 2004. *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi*. Padang: Universitas Danalas
- Day, R. A. dan A. L. Underwood. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif. Edisi Keenam*. Jakarta: Penerbit Erlangga. Hal 394, 396-404.
- De la Fuente, J.L.; Rodríguez-Sáiz, M.; Schleissner, C.; Díez, B.; Peiro, E.; Barredo, J.L.2010. *High-titer production of astaxanthin by the semi-industrial fermentation of Xanthophyllomyces dendrorhous*. J. Biotechnol. 148, 144–146.
- De Man. 1997. *Kimia Makanan*. Padmawinata K, penerjemah. Bdanung: ITB. Terjemahan dari: *Food Chemistry*.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2005.*Opinion of the scientific panel on additives dan products or substances used in animal feed on the request*

from the European commission on the safety of use of colouring agents in animal human nutrition. EFSA J. 291, 1–40.

EFSA (European Food Safety Authority). 2007. *Safety dan efficacy of panaferd-AX (red carotenoid rich bacterium Paracoccus carotinifaciens as feed additive for salmon dan trout. EFSA J. 546, 1–30.*

Firdaus, M. 2001. *Astaxanthin Penentu Mutu dan Kesegaran Udang. Neptunus. 8:42-49.*

Gamiz, I. N., R. Angelova., D. Send., Sundholm, dan V. R. I. Kaila. 2015. *Protein-Induced Color Shift of Carotenoids in β -Crustacyanin. Angew. Chem. Int. Ed., vol. 54, no. 39, pp. 11564–11566.*

Garrett, R. H dan C. M Grisham. 1997. *Biochemistry 2nd edition. Brooks/Cole 20 Channel Center Street Boston: USA.*

Gimeno M, Herndanez JY, Ibarra CM, Pacheco N, Arrazola R, Barzana E, Shirai K. 2007. *One solvent extraction of astaxanthin from lactic acid fermented shrimp waste. J Agri Food Chem. 55:10345-10350.*

Guillou, A., Khalil, M., dan Adambounou, L., 1995. *Effects of silage preservation on astaxanthin forms dan fatty acid profiles of processed shrimp (Pandalus borealis) waste. Aquaculture., 130:351–360.*

Hafiz, M. 2009. *Karakteristik dan Bentuk Olahan Udang Vannamei [Laporan Penelitian]. Bogor: IPB.*

Haliman, R.W. dan D. Adijaya. 2005. *Udang Vannamei. Jakarta: Penebar Swadaya.*

Harrow, B., A. Mazur. 1961. *Textbook of Biochemistry. USA: W.B. Saunders Company.*

Holdana dan Netto. 2006. *Recovery of Components from Shrimp (Xiphopenaeus kroyeri) Processing Waste by Enzymatic Hydrolysis. Brazil: Univ.*

Federal da Para'iba.

Hussein G, Sankawa U, Goto H, Matsumoto K, Watanabe H. 2006. *Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health dan nutrition*. J Nat Product. 69:443-449.

Juniarso, T. E. 2008. *Pemanfaatan Ekstrak Kasar Protease dari Isi Perut Ikan Lemuru (Sardinella Sp.) Untuk Deproteinasi Limbah Udang Secara Enzimatik Dalam Proses Produksi Kitosan*. Skripsi. Jember: Fakultas MIPA Universitas Jember.

Khopkar, S. M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI-Press.

Kim, J.H.; Kang, S.W.; Kim, S.W.; Chang, H.I. 2005. *High-level production of astaxanthin by Xanthophyllomyces dendrorhous mutant JH1 using statistical experimental designs*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69, 1743–1748.

Kementrian Kelautan dan Perikanan. 2016. *Data Indikator Kinerja Umum Kelautan Dan Perikanan Tahun 2016*. Jakarta

Kordi, M. G. H. K., dan A. B. Tancung. 2007. *Pengelolaan Kualitas Air dalam Budidaya Perairan*. Jakarta: Rineka Cipta. 210 hlm.

Kurashige M, Okimasu E, Inoue M, Utsumi K. 1990. *Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin*. Physiol Chem Phy Med NMR. 22:27-38.

Lee SH, Roh SK, Park KH, Yoon KR. 1999. *Effective extraction of astaxanthin pigment from shrimp using proteolytic enzymes*. Biotech Bio Eng. 4:199-204.

Lee, J dan Peniston Q.P. 1982. *Utilization of Shellfish Wastes for Production of Chitin dan Chitosan*. Chemistry dan Biochemistry of Marine Food Product. AVI Publishing Company. Westport.

- Lehninger AL. 1995. *Dasar-Dasar Biokimia. Jilid 1*. M. Thenawidjaja, penerjemah. Jakarta: Erlangga. Terjemahan dari: Principle of Biochemistry.
- Li, H.B.; Chen, F.; Jiang, Y. 2002. *Isolation dan Purification of Lutein from the Microalga Chlorella vulgaris by Extraction after Saponification*, 1070-1072. (Road dan Kong, 2002)
- Mahdi, C. A. 2001. *Isolasi dan uji aktivitas enzim pepsin dari lambung sapi kambing dan domba*. *J Nat.* 1:63-71.
- Masidi, T., Herdyastuti, N. 2017. *Karakterisasi Kitosan Dari Cangkang Kerang Darah (Anadara Granosa)*. *UNESA Journal Of Chemistry.* 6(3), 137-142.
- Meyers, S.P., dan Bligh, D. 1981. *Characterization of astaxanthin pigments from heat processed crawfish waste*. *J. Agric. Food Chem.*, 3:505–508.
- Muchtadi, D., Palupi N. S, Astawan M. 1992. *Bahan Kuliah Enzim dalam Industri Pangan*. Bogor : IPB.
- Naiola, E dan N. Widhyastuti. 2002. *Semi purifikasi dan karakterisasi enzim protease Bacillis Sp.* Berk Penel Hayati. 13: 51-56.
- Olson, J. A. 1999. *Carotenoids dan human health*. *Arc Lat Am de Nutr.* 49(1):7-11.
- Olaizola, M. 2000. *Commercial production of astaxanthin from Haematococcus pluvialis using 25,000-liter outdoor photobioreactors*. *J. Appl. Phycol.* 12, 499–506.
- Orosa, M.; Torres, E.; Fidalgo, P.; Abalde, J. 2000. *Production dan analysis of secondary carotenoids in green algae*. *J. Appl. Phycol.* 12, 553–556.
- Osterlie, M., Bjerkgeng, B., dan Liaaen-Jensen, S. 1999. *Accumulation of astaxanthin all E, 9z dan 13z geometrical isomers dan 3 dan 3_ optical isomers in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) is selective*. *Journal of Nutrition.*, 2:391–398.

Parajo, J.C., Santos, V., dan Vazquez, M. 1996. *Producción biotecnológica de astaxantina por Phaffia rhodozyma*. Alimentación, Equipos y Tecnología, Ene/feb.153–160.

Pustekom. 2005. *Arthropoda*. <http://www.e-dukasi.net>. [20 oktober 2017].

Ranga Rao, A.; Sarada, R.; Baskaran, V.; Ravishankar, G.A. 2009. *Identification of carotenoids from green alga Haematococcus pluvialis by HPLC dan LC-MS (APCI) dan their antioxidant properties*. J. Microbiol. Biotechnol, 19, 1333–1341.

Ranga Rao, A.; Raghunath Reddy, R.L.; Baskaran, V.; Sarada, R.; Ravishankar, G.A. 2010. *Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry dan their bioavailability dan antioxidant properties elucidated in rat model*. J. Agric. Food Chem, 58, 8553–8559.

Reed G. 1975. *Enzyme in Food Processing. Second ed.* New York: Academic Press.

Road, P., dan Kong, H. 2002. *Isolation dan Purification of Lutein from the Microalga Chlorella vulgaris by Extraction after Saponification*, 1070–1072.

Rodriguez, E. B., F. A. Amaya. 2006. *Advances in food carotenoid research: chemical dan technological aspects, implications in human health*. J Nutr. 12(1): 101-121.

Schechter, M. 1971. *Principles of Functional Analysis*. New York: Academic Press.

Sachindra, N. M., Bhaskar, N., dan Mahendrakar, N. S. 2005. *Carotenoids in different body components of Indian shrimps*. 172(October 2004). 167–172.

Sachdev, G. dan Fruton, J. 1975. *Kinetics of Action of Pepsin on Fluorescent Peptide Substrates*. National Academy of Science, USA, Vol. 72, No.9, pp. 3424-3427.

- Santoso J, Nurjanah, Irawan A. 2008. *Kdanungan dan kelarutan mineral pada cumi-cumi loligo sp dan udang vannamei L. vannamei*. Jurnal Ilmu-ilmu Perairan dan Perikanan Indonesia. 15(1): 7-12.
- Shahidi, F., dan Synowiecki, J. 1991. *Isolation dan Characterization of nutrients dan value-added products from snow crab (Chionoectes opilio) dan shrimp (Pandalus borealis) processing discards*. J. Agric. Food Chem. 39:1527–1532.
- Shahidi, F., dan Botta, F.R. Eds. 1994. *Seafoods: Chemistry, processing, technology dan quality*. Chapman dan Hall. Londres.
- Shimidzu N, Goto M, Miki W. 1996. *Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms*. Fish Sci. 62:134-7.
- Sjaifullah, A., dan A. B. Santoso., 2015. *Autolytic Isolation of Chitin from White Shrimp (Penaeus vannamei) Waste*, 18(Mcls 2015), 49–52.
- Sopiah, N. dan Prayudi, T. 2002. *Uji Aktivitas Proteolitik Mikroba dari Limbah Cangkang Udang Pada Proses Pembuatan Chitin*. Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi Lingkungan.
- Sriket P., Benjakul S., Visessanguan W., Kijroongrojana K. 2006. *Comparative studies on chemical composition dan thermal properties of black tiger shrimp (Penaeus monodon) dan white shrimp (Penaeus vannamei) meats*. Food Chemistry. 103: 1119-1207
- Suseno, J., E., dan Firdausi, K., S. 2008. *Rancang Bangun Spektroskopi FTIR (Fourier Transform Infrared) untuk penentuan kualitas susu sapi*. Berkala Fisika, 11 (1):23-28.
- Tim Perikanan WWF - Indonesia. 2014 versi 1. *Budidaya Udang Vannameii Tambak Semi Intensif dengan Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL)*. Jakarta.
- Torrison, O., Tidemann, E., Hansen, F., dan Raa, J. 1981. *Ensiling in acid. A method to stabilize astaxanthin in shrimp processing by-products dan*

improve uptake of this pigment by rainbow trout (Salmo gairdneri). Aquaculture., 26:77–83.

Torzillo, G.; Goksan, T.; Faraloni, C.; Kopecky, J.; Masojídek, J. 2003. *Interplay between photochemical activities dan pigment composition in an outdoor culture of Haematococcus pluvialis during the shift from the green to red stage.* J. Appl. Phycol.15, 127–136.

Turujman, S.A., Wamer, W.G., dan Wei, R.R. et al. 1997. *Rapid liquid Chromatographic method to distinguish wild salmon from aquacultured salmon fed synthetic astaxanthin.* Journal of AOAC International., 3:622–632.

Urich, K. 1994. *Comparative Animal Biochemistry.* Springer Verlag. Germany.

Wadstrom, T., Alejung P. 2001. *Oral preparation for the prophylactic dan Therapeutic treatment of Helicobacter sp. infection.* Patent US6262316.

Wade, L.G. 2006. *Organic Chemistry.* Sixth edition. New Jersey: Pearson Education International.

Wang, Y.; Peng, J. 2008. *Growth associated biosynthesis of astaxanthin in heterotrophic Chlorella zofingiensis (Chlorophyta).* World J. Microbiol. Biotechnol, 24, 1915–1922

Wang, J.; Han, D.; Sommerfeld, M.R.; Lu, C.; Hu, Q. 2013. *Effect of initial biomass density on growth dan astaxanthin production of Haematococcus pluvialis in an outdoor photobioreactor.* J. Appl. Phycol, 25, 253–260.

Winarno, F. G. 1986. *Enzim Pangan.* Jakarta : Gedia.

Wijaya, M.G. 2015. *Karakteristik Kdanungan Gizi Udang Vannamei(Litopenaeus Vannamei) Dari Sistem Budidaya Yang Berbeda.* Skripsi. Bogor: IPB

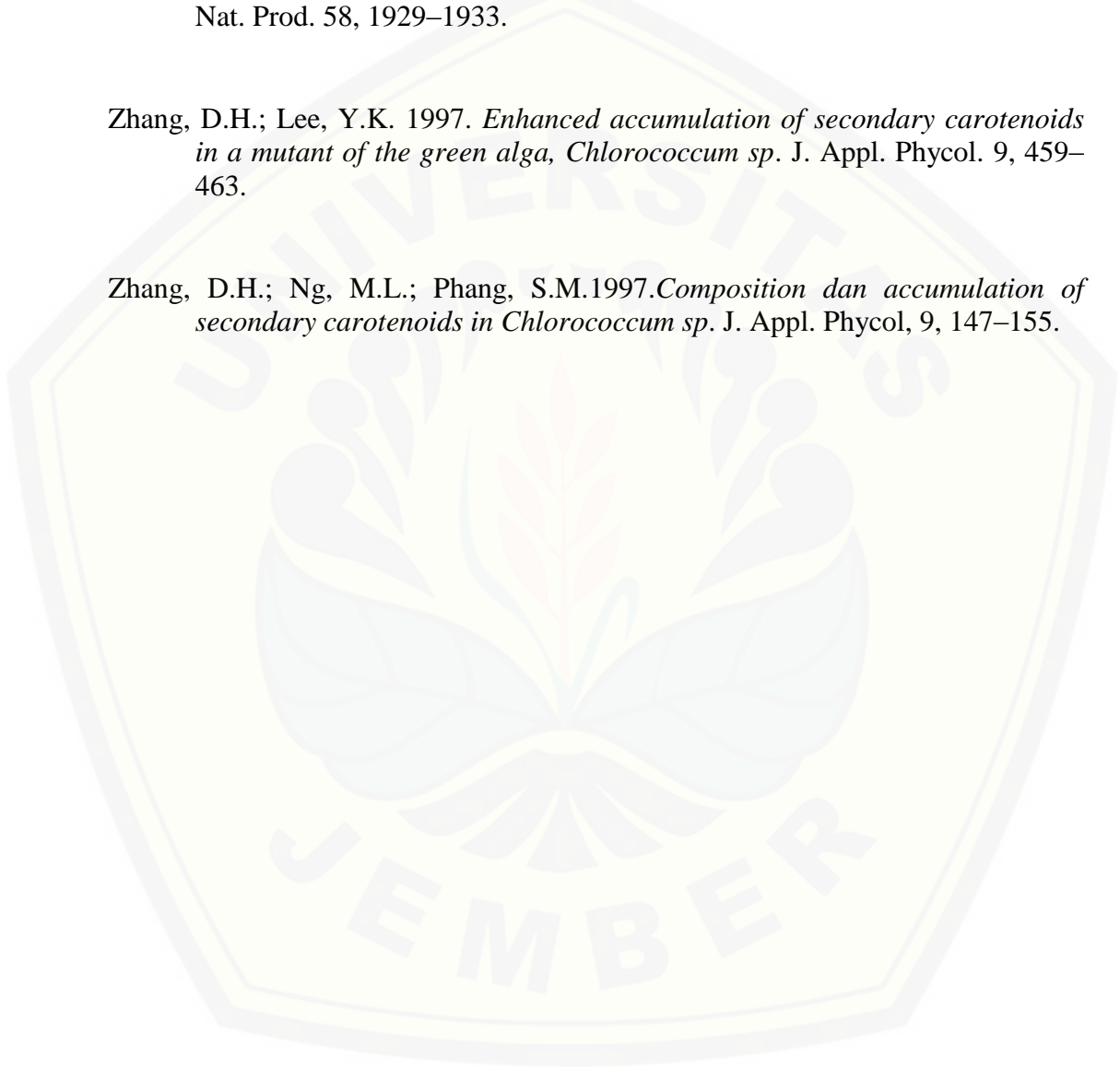
Whittaker, J.R, Voragen, A.G.J, Wong, D.W.S. 2003. *Hdanbook Of Food Enzymology.* New York: Marcel Dekker, INC.

Yamaoka, Y. 2008. *Microorganism dan production of carotenoid compounds*. U.S. Patent 7,374,908 B2

Yokoyama, A.; Adachi, K.; Shizuri, Y.1995. *New carotenoid glucosides, astaxanthin glucoside dan adonimxanthin glucoside, isolated from the astaxanthin producing marine bacterium, Agrobacterium aurantiacum*. J. Nat. Prod. 58, 1929–1933.

Zhang, D.H.; Lee, Y.K. 1997. *Enhanced accumulation of secondary carotenoids in a mutant of the green alga, Chlorococcum sp.* J. Appl. Phycol. 9, 459–463.

Zhang, D.H.; Ng, M.L.; Phang, S.M.1997.*Composition dan accumulation of secondary carotenoids in Chlorococcum sp.* J. Appl. Phycol, 9, 147–155.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Preparasi Larutan untuk Penentuan Konsentrasi *Astaxanthin*1.1 Pembuatan Larutan Induk *Astaxanthin* 50 ppm sebanyak 100 mL

$$Mr \text{ Astaxanthin} = 596,841 \text{ g/mol}$$

$$50 \text{ ppm} = 50 \text{ mg/L} = 0,05 \text{ g/L}$$

$$M = \frac{0,05 \text{ g/L}}{596,841 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 0,00008 \text{ mol/L}$$

Larutan dibuat dalam 100 mL

$$M = \frac{\text{mol}}{v}$$

$$\text{Mol} = 0,00008 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} = 0,000008 \text{ mol}$$

$$\text{Mol} = \frac{\text{gram}}{Mr}$$

$$0,000008 \text{ mol} \times 596,841 \text{ g/mol} = 0,005 \text{ gram}$$

Jadi sebanyak 0,005 gram padatan *astaxanthin* dilarutkan dengan diklorometana hingga 100 mL

1.2 Pembuatan Larutan Standar *Astaxanthin*

Larutan standar dibuat dari larutan induk 50 ppm yang diencerkan menjadi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm, 35 ppm, dan 40 ppm sebanyak 50 mL.

Konsentrasi larutan (ppm) (mg/kg)	Volume Larutan Induk <i>Astaxanthin</i> (mL)
5,0	5,0
10	10
15	15
20	20
25	25
30	30
35	35
40	40

Diketahui :

V_1 = volume larutan pengenceran

V_2 = volume larutan standar yang diencerkan

M_1 = konsentrasi larutan pengenceran

M_2 = konsentrasi larutan yang diencerkan

Contoh perhitungan larutan standart adalah sebagai berikut:

Larutan standar 5,0 ppm

Larutan induk 50 ppm yang diencerkan menjadi 5,0 ppm sebanyak 50 mL.

$$\begin{aligned} M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\ 5,0 \text{ ppm} \times 50 \text{ mL} &= 50 \text{ ppm} \times V_2 \\ V_2 &= 5,0 \text{ mL} \end{aligned}$$

Larutan induk 50 ppm diambil sebanyak 5 mL dan diencerkan pada labu takar 50 mL menggunakan diklorometana sampai tanda batas.

Lampiran 2. Scanning Panjang Gelombang

2.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dengan Rentang 10 nm dan 2 nm

Panjang gelombang (nm)	Absorbansi			Rata-rata
	U1	U2	U3	
400	0,052	0,050	0,051	0,051
410	0,052	0,050	0,051	0,052
420	0,054	0,051	0,052	0,053
430	0,056	0,052	0,053	0,054
440	0,056	0,053	0,053	0,054
450	0,057	0,054	0,054	0,055
460	0,058	0,056	0,055	0,056
470	0,059	0,058	0,056	0,058
480	0,060	0,059	0,059	0,059
490	0,059	0,058	0,058	0,058
500	0,059	0,058	0,057	0,058
510	0,058	0,057	0,057	0,057
520	0,056	0,054	0,057	0,056
530	0,055	0,052	0,056	0,054
540	0,054	0,051	0,056	0,053
550	0,054	0,051	0,054	0,051

Tabel 2.1.a Data penentuan panjang gelombang maksimum dengan rentang 10 nm

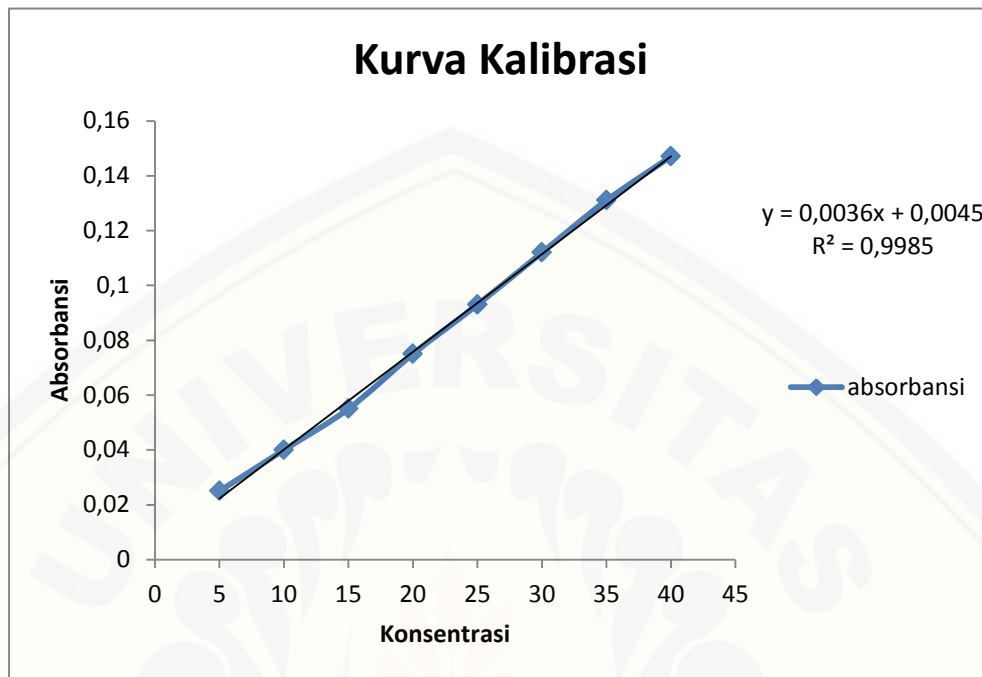
Panjang gelombang (nm)	Absorbansi			Rata-rata
	U1	U2	U3	
470	0,058	0,058	0,056	0,057
472	0,058	0,058	0,056	0,057
474	0,058	0,058	0,056	0,057
476	0,059	0,058	0,057	0,058
478	0,060	0,059	0,059	0,059
480	0,059	0,058	0,058	0,058
482	0,059	0,058	0,058	0,058
484	0,059	0,058	0,058	0,058
486	0,058	0,058	0,058	0,058
488	0,058	0,057	0,058	0,057
490	0,058	0,057	0,057	0,057

Tabel 2.1.b Data penentuan panjang gelombang maksimum dengan rentang 2 nm

Lampiran 3. Pembuatan Kurva Kalibrasi

Tabel 3.1 Data Absorbansi Larutan Standar *Astaxanthin*

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi			Rata-rata
	U1	U2	U3	
0,0	0,000	0,000	0,000	0,000
5,0	0,030	0,019	0,025	0,025
10	0,048	0,036	0,036	0,040
15	0,064	0,050	0,052	0,055
20	0,088	0,068	0,068	0,075
25	0,109	0,083	0,088	0,093
30	0,131	0,101	0,103	0,112
35	0,140	0,121	0,128	0,131
40	0,158	0,139	0,143	0,147

Gambar 3.1 Profil Kurva Kalibrasi Larutan Standart *Astaxanthin*

Lampiran 4. Data Absorbansi *Astaxanthin* pada sampel

pH	Waktu Inkubasi (jam)	Absorbansi <i>Astaxanthin</i>				SD
		U1	U2	U3	U	
2,0 ± 0,1	0	0	0	0	0	0,0000000
	2	0,009	0,009	0,009	0,009	0,0000000
	4	0,010	0,010	0,010	0,010	0,0000000
	8	0,017	0,017	0,016	0,017	0,00057735
	16	0,018	0,018	0,017	0,018	0,00057735
	24	0,019	0,019	0,019	0,019	0,0000000
	32	0,020	0,021	0,020	0,020	0,00057735
	48	0,025	0,025	0,026	0,025	0,00057735
	72	0,024	0,024	0,025	0,024	0,00057735
	96	0,024	0,023	0,024	0,024	0,00057735
	120					$4,2492 \times 10^{-18}$
	144	0,023	0,023	0,023	0,023	0,00057735
	144	0,023	0,022	0,023	0,023	0,00057735
	3,0 ± 0,1	0	0	0	0	0
2		0,005	0,005	0,005	0,005	0,0000000
4						$1,0623 \times 10^{-18}$
8		0,006	0,006	0,006	0,006	0,00057735
16		0,008	0,007	0,008	0,008	0,00057735
24		0,010	0,009	0,009	0,009	0,00057735
32						$2,1246 \times 10^{-18}$
32		0,012	0,012	0,012	0,012	0,00057735
48		0,014	0,014	0,013	0,014	0,00057735
48		0,018	0,018	0,018	0,018	0,0000000
72		0,017	0,017	0,017	0,017	0,0000000
96		0,017	0,017	0,016	0,017	0,00057735
120		0,017	0,016	0,016	0,016	0,00057735
144		0,016	0,016	0,016	0,016	0,0000000
4,0 ± 0,1	0	0	0	0	0	0,0000000
	2	0,005	0,005	0,005	0,005	0,0000000
	4	0,005	0,005	0,005	0,005	0,0000000
	8					$1,0623 \times 10^{-18}$
	8	0,006	0,006	0,006	0,006	0,00057735
	16	0,006	0,007	0,006	0,006	0,00057735
	24	0,007	0,008	0,007	0,007	0,00057735
	32	0,008	0,008	0,008	0,008	0,0000000
	48	0,012	0,013	0,012	0,012	0,00057735
	72	0,010	0,011	0,010	0,010	0,00057735
	96	0,010	0,010	0,010	0,010	0,0000000
	120	0,009	0,009	0,009	0,009	0,0000000
	144	0,008	0,009	0,009	0,009	0,00057735

Lampiran 5. Hasil Analisis Konsentrasi *Astaxanthin*Tabel 5.1 Hasil analisis konsentrasi *astaxanthin* pada sampel

pH	Waktu Inkubasi (jam)	Konsentrasi <i>Astaxanthin</i> (ppm)				SD
		U1	U2	U3	U	
2,0 ± 0,1	0	0,667	0,667	0,667	0,667	$1,3597 \times 10^{-18}$
	2	1,667	1,667	1,667	1,667	0,00000000
	4	2,000	2,000	2,000	2,000	0,00000000
	8	4,333	4,333	4,000	4,222	0,19225764
	16	4,667	4,667	4,333	4,556	0,19283499
	24	5,000	5,000	5,000	5,000	0,00000000
	32	5,333	5,667	5,333	5,444	0,19283499
	48	7,000	7,000	7,333	7,111	0,19225764
	72	6,667	6,667	7,000	6,778	0,19225764
	96	6,667	6,333	6,667	6,556	0,19283499
	120					$1,0878 \times 10^{-15}$
144	6,333	6,333	6,333	6,333	0,19225764	
3,0 ± 0,1	0	0,333	0,333	0,333	0,333	0,00000000
	2	0,333	0,333	0,333	0,333	0,00000000
	4	0,667	0,667	0,667	0,667	$1,3597 \times 10^{-15}$
	8	1,333	1,000	1,333	1,222	0,19225764
	16	2,000	1,667	1,667	1,778	0,19225764
	24	2,667	2,667	2,667	2,667	0,00000000
	32	3,333	3,333	3,000	3,222	0,19225764
	48	4,667	4,667	4,667	4,667	0,00000000
	72	4,333	4,333	4,333	4,333	0,00000000
	96	4,333	4,333	4,000	4,222	0,19225764
	120	4,333	4,000	4,000	4,111	0,19225764
144	4,000	4,000	4,000	4,000	0,00000000	
4,0 ± 0,1	0	0,333	0,333	0,333	0,333	0,00000000
	2	0,333	0,333	0,333	0,333	0,00000000
	4	0,333	0,333	0,333	0,333	0,00000000
	8	0,667	0,667	0,667	0,667	$1,3597 \times 10^{-15}$
	16	0,667	1,000	0,667	0,778	0,19225764
	24	1,000	1,333	1,000	1,111	0,19225764
	32	1,333	1,333	1,333	1,333	0,00000000
	48	2,667	3,000	2,667	2,778	0,19225764
	72	2,000	2,333	2,000	2,111	0,19225764
	96	2,000	2,000	2,000	2,000	0,00000000
	120	1,667	1,667	1,667	1,667	0,00000000
144	1,333	1,667	1,667	1,556	0,19283499	

Contoh Perhitungan Konsentrasi *Astaxanthin*

1. pH 2,0 ± 0,1 pada 0 jam

a. U1

$$y = 0,003x + 0,004$$

$$x = \frac{0,006 - 0,004}{0,003}$$

$$= 0,667 \text{ ppm}$$

b. U2

$$y = 0,003x + 0,004$$

$$x = \frac{0,006 - 0,004}{0,003}$$

$$= 0,667 \text{ ppm}$$

c. U3

$$y = 0,003x + 0,004$$

$$x = \frac{0,006 - 0,004}{0,003}$$

$$= 0,667 \text{ ppm}$$

d. Rata-rata (U) :

$$U = \frac{0,667+0,667+0,667}{3} = 0,667$$

Lampiran 6. Berat *Astaxanthin*Tabel 6.1 Berat *astaxanthin* dalam sampel

pH	Waktu Inkubasi (jam)	Berat <i>Astaxanthin</i> dalam Larutan (g)				SD
		U1	U2	U3	U	
2,0 ± 0,1	0	0,0000036	0,0000036	0,0000036	0,0000036	0,0000000
	2	0,0000090	0,0000090	0,0000090	0,0000090	0,0000000
	4	0,0000108	0,0000108	0,0000108	0,0000108	0,0000000
	8	0,0000234	0,0000234	0,0000216	0,0000228	1,039×10 ⁻⁶
	16	0,0000252	0,0000252	0,0000234	0,0000246	1,039×10 ⁻⁶
	24	0,0000270	0,0000270	0,0000270	0,0000270	4,149×10 ⁻²¹
	32	0,0000288	0,0000306	0,0000288	0,0000294	1,039×10 ⁻⁶
	48	0,0000378	0,0000378	0,0000396	0,0000384	1,039×10 ⁻⁶
	72	0,0000360	0,0000360	0,0000378	0,0000366	1,039×10 ⁻⁶
	96	0,0000360	0,0000342	0,0000360	0,0000354	1,039×10 ⁻⁶
	120	0,0000342	0,0000342	0,0000342	0,0000342	0,0000000
	144	0,0000342	0,0000324	0,0000342	0,0000342	1,039×10 ⁻⁶
	3,0 ± 0,1	0	0,0000018	0,0000018	0,0000018	0,0000018
2		0,0000018	0,0000018	0,0000018	0,0000018	0,0000000
4		0,0000036	0,0000036	0,0000036	0,0000036	0,0000000
8		0,0000072	0,0000054	0,0000072	0,0000066	1,039×10 ⁻⁶
16		0,0000108	0,0000090	0,0000090	0,0000096	1,039×10 ⁻⁶
24		0,0000144	0,0000144	0,0000144	0,0000144	0,0000000
32		0,0000180	0,0000180	0,0000162	0,0000174	1,039×10 ⁻⁶
48		0,0000252	0,0000252	0,0000252	0,0000252	0,0000000
72		0,0000234	0,0000234	0,0000234	0,0000234	0,0000000
96		0,0000234	0,0000234	0,0000216	0,0000228	1,039×10 ⁻⁶
120		0,0000234	0,0000216	0,0000216	0,0000222	1,039×10 ⁻⁶
144		0,0000216	0,0000216	0,0000216	0,0000216	0,0000000
4,0 ± 0,1		0	0,0000018	0,0000018	0,0000018	0,0000018
	2	0,0000018	0,0000018	0,0000018	0,0000018	0,0000000
	4	0,0000018	0,0000018	0,0000018	0,0000018	0,0000000
	8	0,0000036	0,0000036	0,0000036	0,0000036	0,0000000
	16	0,0000036	0,0000054	0,0000036	0,0000042	1,039×10 ⁻⁶
	24	0,0000054	0,0000072	0,0000054	0,0000060	1,039×10 ⁻⁶
	32	0,0000072	0,0000072	0,0000072	0,0000072	0,0000000
	48	0,0000144	0,0000162	0,0000144	0,0000150	1,039×10 ⁻⁶
	72	0,0000108	0,0000126	0,0000108	0,0000114	1,039×10 ⁻⁶
	96	0,0000108	0,0000108	0,0000108	0,0000108	0,0000000
	120	0,0000090	0,0000090	0,0000090	0,0000090	0,0000000
	144	0,0000072	0,0000090	0,0000090	0,0000084	1,039×10 ⁻⁶

Perhitungan Berat *Astaxanthin* dalam Larutan Diklorometana

Konsentrasi (ppm) = mg/kg

Konversi = g/kg

= g/g

Konsentrasi *astaxanthin* pH 2,0 ± 0,1 pada 0 jam

0,667 ppm = 0,667 mg/kg

= 0,667 x 10⁻³ g/kg

= 0,667 x 10⁻⁶ g/g

Berat diklorometana yang digunakan 5,4 gram

Udang

1. 0 jam

a. U1 :

$$C = \frac{\text{massa}}{\text{Berat diklorometana}}$$

$$(0,667 \times 10^{-6} \text{ g/g}) = \frac{\text{massa}}{5,4 \text{ gram}}$$

0,0000036 gram

b. U2 :

$$C = \frac{\text{massa}}{\text{Berat diklorometana}}$$

$$(0,667 \times 10^{-6} \text{ g/g}) = \frac{\text{massa}}{5,4 \text{ gram}}$$

0,0000036 gram

c. U3 :

$$C = \frac{\text{massa}}{\text{Berat diklorometana}}$$

$$(0,667 \times 10^{-6} \text{ g/g}) = \frac{\text{massa}}{5,4 \text{ gram}}$$

0,0000036 gram

d. Rata-Rata (U) :

$$U = \frac{U1+U2+U3}{3} = \frac{0,0000036 + 0,0000036 + 0,0000036}{3} = 0,0000036 \text{ g}$$

Lampiran 7. Persentase *astaxanthin*Tabel 7.1 Persentase *astaxanthin* pada pH $2,0 \pm 0,1$

No.	Waktu inkubasi (jam)	% <i>Astaxanthin</i> ($\times 10^{-4}$) (%)				SD
		U1	U2	U3	U	
1.	0	4,93	4,85	4,94	4,91	0,00000493
2.	2	13,89	13,69	13,43	13,67	0,00002306
3.	4	16,79	16,64	16,86	16,76	0,00001124
4.	8	36,09	35,96	33,46	35,17	0,00014823
5.	16	38,60	38,25	35,92	37,59	0,00014568
6.	24	41,18	40,72	41,24	41,05	0,00002845
7.	32	43,56	45,83	43,70	44,36	0,00012721
8.	48	56,41	55,09	59,57	57,02	0,00023021
9.	72	53,06	51,78	56,04	53,63	0,00021858
10.	96	52,38	48,63	52,66	51,22	0,00022503
11.	120	49,10	48,19	49,42	48,90	0,00006381
12.	144	48,32	45,13	48,91	47,45	0,00020336

Tabel 7.2 Persentase *astaxanthin* pada pH $3,0 \pm 0,1$

No.	Waktu inkubasi (jam)	% <i>Astaxanthin</i> ($\times 10^{-4}$) (%)				SD
		U1	U2	U3	U	
1.	0	2,04	2,06	2,03	2,04	0,00000153
2.	2	2,20	2,29	2,24	2,24	0,00000451
3.	4	4,42	4,62	4,60	4,55	0,00001101
4.	8	8,91	6,97	9,23	8,37	0,00012229
5.	16	13,23	11,53	11,44	12,07	0,00010085
6.	24	17,47	18,27	18,09	17,94	0,00004196
7.	32	21,57	22,64	20,15	21,45	0,00012491
8.	48	29,88	31,35	31,07	30,77	0,00007805
9.	72	27,30	28,71	28,29	28,10	0,00007239
10.	96	26,89	28,52	25,73	27,05	0,00014016
11.	120	26,48	25,79	25,25	25,84	0,00006165
12.	144	24,06	25,45	24,84	24,78	0,00006967

Tabel 7.3 Persentase *astaxanthin* yang terekstrak dalam sampel udang pada pH $4,0 \pm 0,1$

No.	Waktu inkubasi (jam)	% <i>Astaxanthin</i> ($\times 10^{-4}$) (%)				SD
		U1	U2	U3	U	
1.	0	1,72	1,72	1,74	1,73	0,00000115
2.	2	1,79	1,75	1,77	1,77	0,00000200
3.	4	1,83	1,78	1,79	1,80	0,00000264
4.	8	3,68	3,59	3,62	3,63	0,00000458
5.	16	3,61	5,34	3,58	4,18	0,00010076
6.	24	5,31	6,99	5,25	5,85	0,00000988
7.	32	6,93	6,88	6,91	6,91	0,00002516
8.	48	13,54	15,21	13,62	14,12	0,00009422
9.	72	9,96	11,60	10,07	10,54	0,00009167
10.	96	9,73	9,77	9,80	9,77	0,00000351
11.	120	7,93	7,90	8,01	7,95	0,00000568
12.	144	6,15	7,71	7,81	7,22	0,00009308

Contoh Perhitungan Persentase *Astaxanthin* yang Terekstrak

- **Berat yang digunakan**

a. Udang = 300 gram

- **Berat Udang Kering**

a. Kadar air udang = 82,13%

b. Berat air = $\frac{82,13}{100} \times 300 = 246,39$ gram

c. BUK = Berat udang – Berat Air
 = 300 gram – 246,39 gram
 = 53,61 gram

- **Berat per-chamber sampel udang**

a. pH $2,0 \pm 0,1$ = 300 gram

b. pH $3,0 \pm 0,1$ = 300 gram

c. pH $4,0 \pm 0,1$ = 300 gram

- **Berat chamber + asam fosfat**

a. pH $2,0 \pm 0,1$ = 550,50 gram

b. pH $3,0 \pm 0,1$ = 455,50 gram

c. pH $4,0 \pm 0,1$ = 383,10 gram

- **Berat per-sampling dari udang:**

Berat sampling = 7,50 gram

- **BUK/sampling (U1)**

$$\begin{aligned} \text{pH } 2,0 \pm 0,1 \text{ (2 jam)} &= \frac{BUK}{(\text{Berat Chamber} + \text{as.fosfat})} \times 7,50 \text{ gram} \\ &= \frac{53,61 \text{ gram}}{620,50 \text{ gram}} \times 7,50 \text{ gram} \\ &= 0,65 \text{ gram} \end{aligned}$$

- **% Astaxanthin**

$$\begin{aligned} \% \text{ Astaxanthin} &= \frac{\text{B.Axt dalam sampel}}{\frac{BUK}{\text{Sampling}}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,00000900 \text{ gram}}{0,65 \text{ gram}} \times 100 \% \\ &= 0,00138 \% \end{aligned}$$

- **BUK/sampling (U2)**

$$\begin{aligned} \text{pH } 2,0 \pm 0,1 \text{ (2 jam)} &= \frac{BUK}{(\text{Berat Chamber} + \text{as.fosfat})} \times 7,50 \text{ gram} \\ &= \frac{53,61 \text{ gram}}{611,40 \text{ gram}} \times 7,50 \text{ gram} \\ &= 0,66 \text{ gram} \end{aligned}$$

- **% Astaxanthin**

$$\begin{aligned} \% \text{ Astaxanthin} &= \frac{\text{B.Axt dalam sampel}}{\frac{BUK}{\text{Sampling}}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,00000900 \text{ gram}}{0,66 \text{ gram}} \times 100 \% \\ &= 0,00136 \% \end{aligned}$$

- **BUK/sampling (U3)**

$$\begin{aligned} \text{pH } 2,0 \pm 0,1 \text{ (2 jam)} &= \frac{BUK}{(\text{Berat Chamber} + \text{as.fosfat})} \times 7,50 \text{ gram} \\ &= \frac{53,61 \text{ gram}}{600 \text{ gram}} \times 7,50 \text{ gram} \\ &= 0,67 \text{ gram} \end{aligned}$$

- % *Astaxanthin*

$$\begin{aligned} \% \text{ Astaxanthin} &= \frac{B.Axt \text{ dalam sampel}}{\frac{BUK}{\text{Sampling}}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,00000900 \text{ gram}}{0,67 \text{ gram}} \times 100 \% \\ &= 0,00134 \% \end{aligned}$$

Lampiran 8. Kadar Air

Tabel 8.1 Data Kadar Air Udang

Pengulangan	Massa Cawan Kosong (g)	Massa Udang Awal (g)	Massa Cawan + Udang Awal (g)	Massa Cawan + Udang Kering (g)	Kadar Air (%)	SD
U1	14,35	3,06	17,41	14,80	85,29	0,028
U2	19,92	3,06	22,98	20,50	81,05	
U3	21,30	3,06	24,36	21,91	80,06	
Kadar air rata-rata					82,13	

Kadar Air Udang

$$\text{Kadar air \%} = \frac{B-C}{A} \times 100\%$$

Keterangan:

A = massa udang awal

B = Cawan + sampel awal

C = Cawan + sampel kering

a. Pengulangan 1 (U1)

$$\begin{aligned} \text{Kadar air \%} &= \frac{B-C}{A} \times 100\% \\ &= \frac{17,41-14,80}{3,06} \times 100\% \\ &= 85,29\% \end{aligned}$$

b. Pengulangan 2 (U2)

$$\begin{aligned} \text{Kadar air \%} &= \frac{B-C}{A} \times 100\% \\ &= \frac{22,98-20,50}{3,06} \times 100\% \end{aligned}$$

$$= 81,05\%$$

c. Pengulangan 3 (U3)

$$\text{Kadar air \%} = \frac{B-C}{A} \times 100\%$$

$$= \frac{24,36-21,91}{3,06} \times 100\%$$

$$= 80,06\%$$

d. Rata-Rata (U) = $\frac{85,29\%+81,05\%+80,06\%}{3} = 82,13\%$

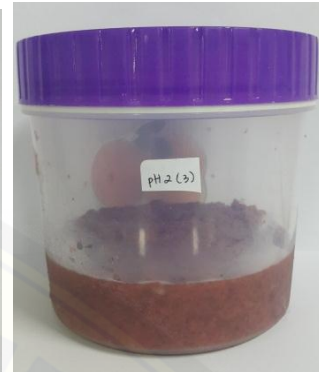


LAMPIRAN GAMBAR**Lampiran Gambar 1. Sampel pada Chamber**

pH 2 (1)



pH 2 (2)



pH 2 (3)



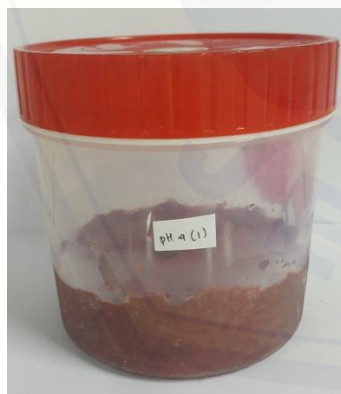
pH 3 (1)



pH 3 (2)



pH 3 (3)



pH 4 (1)

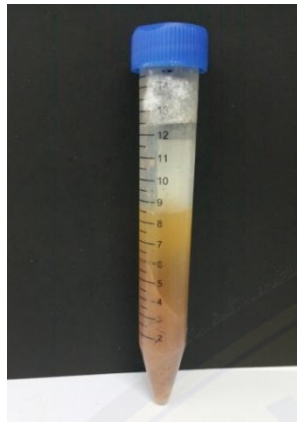


pH 4 (2)



pH 4 (3)

Lampiran Gambar 2. Hidrolisat setelah di Sentrifuge



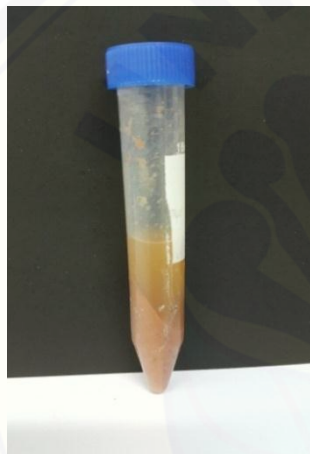
pH 2 (2 jam)



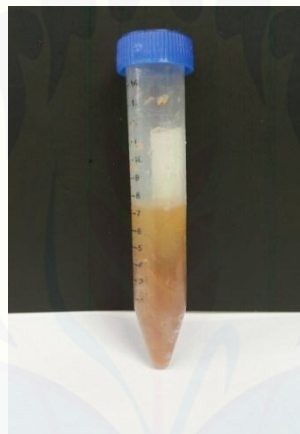
pH 2 (48 jam)



pH 2 (120 jam)



pH 3 (2 jam)



pH 3 (48 jam)



pH 3 (120 jam)



pH 4 (2 jam)



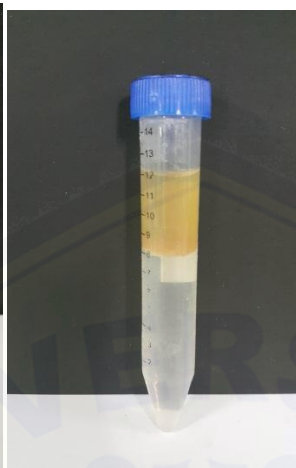
pH 4 (48 jam)



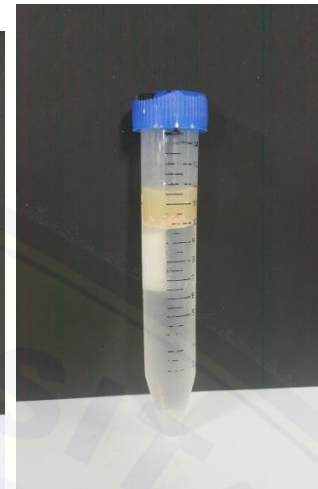
pH 4 (120 jam)

Lampiran Gambar 3. Supernatan yang Ditambahkan dengan Diklorometana

pH 2 (2 jam)



pH 2 (48 jam)



pH 2 (120 jam)



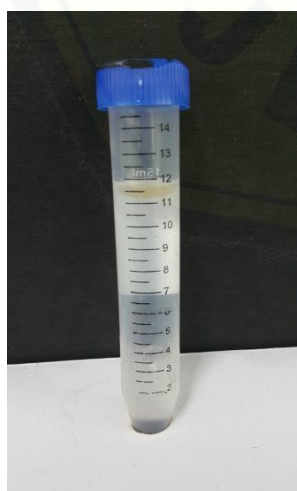
pH 3 (2 jam)



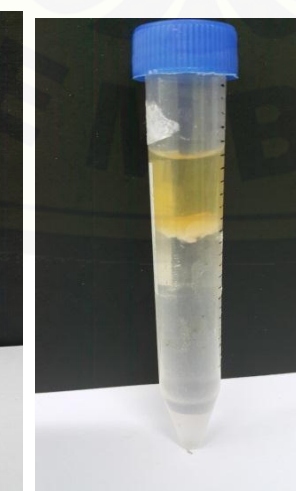
pH 3 (48 jam)



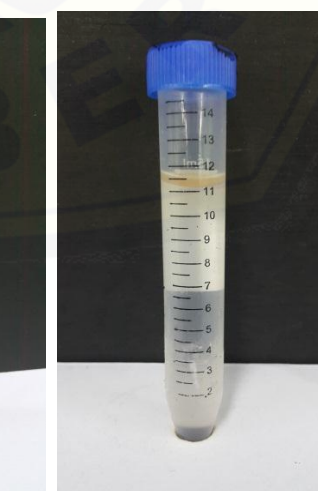
pH 3 (120 jam)



pH 4 (2 jam)



pH 4 (48 jam)



pH 4 (120 jam)

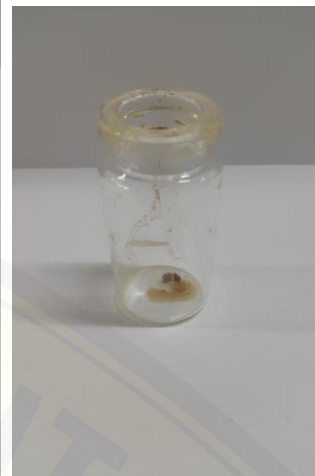
Lampiran Gambar 4. Ekstrak *astaxanthin* setelah diuapkan



pH 2 (2 jam)



pH 2 (48 jam)



pH 2 (120 jam)



pH 3 (2 jam)



pH 3 (48 jam)



pH 3 (120 jam)



pH 4 (2 jam)



pH 4 (48 jam)



pH 4 (120 jam)