

## Ekstraksi Astasantin dari Tepung Kulit Udad dengan Metode Maserasi untuk Uji Aktivitas Antioksidan

Erriska Rahma Putri<sup>1, a)</sup>, Riskiono Slamet<sup>2, b)</sup>, Erdawati<sup>3, c)</sup>

<sup>1,2,3</sup> Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Jakarta, Jl. Pemuda No.10 Rawamangun Jakarta, Indonesia

<sup>b)</sup> [erriska.r.p@gmail.com](mailto:erriska.r.p@gmail.com)

### Informasi Artikel

Diterima pada tanggal

0/0/19

Direvisi pada tanggal

0/0/19

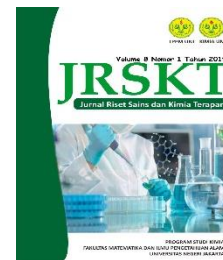
Diupload pada tanggal

0/0/19

### Abstrak

*Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh waktu dan rasio perbandingan antara tepung kulit udang dengan pelarut terhadap banyaknya ekstrak Astasantin yang dihasilkan dan untuk menguji aktivitas antioksidan ekstrak Astasantin. Hasil penelitian menunjukkan waktu optimum untuk ekstraksi Astasantin dari tepung kulit udang dengan metode maserasi yaitu selama 5 hari. Rasio perbandingan optimum antara tepung kulit udang dengan pelarut pada proses maserasi yaitu, sebanyak 1:8 (5 gram tepung kulit udang dalam 40 mL pelarut aseton). Kemudian melakukan karakterisasi ekstrak Astasantin menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan Spektrofotometer Inframerah. Selanjutnya ekstrak diukur konsentrasinya menggunakan KCKT dan diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH panjang gelombang maksimum ekstrak menggunakan Spektrofotometer UV-Vis adalah 468 nm, hal ini menjadi salah satu indikasi bahwa senyawa ekstrak yang dihasilkan berupa senyawa Astasantin. Karakterisasi spektrum inframerah menguatkan indikasi bahwa gugus fungsi yang terkandung dalam ekstrak merupakan gugus fungsi senyawa Astasantin, hal ini didukung dengan munculnya puncak pada bilangan gelombang 3369,64; 2924,09; 1712,79 dan 1620,21  $\text{cm}^{-1}$ . Hasil pengukuran konsentrasi ekstrak Astasantin menggunakan KCKT yaitu sebesar 7,466 ppm, sedangkan uji aktivitas antioksidan ekstrak Astasantin dengan metode DPPH memberikan nilai  $\text{IC}_{50}$  sebesar 338,500 ppm.*

**Kata kunci:** Aktivitas antioksidan, astasantin, DPPH, FTIR, kulit udang, maserasi, UV-Vis .



## **Abstract**

*The research is aimed to determine the effect of time and the ratio of shrimp carapace powder with solvent to the amount of obtained Astaxanthin extract. Beside that, antioxidant activity of obtained Astaxanthin extract is tested. The extract is characterized by UV-Vis spectrophotometer and FTIR. After characterization, concentration of the extract is measured by HPLC. Antioxidant activity of the extract is tested by DPPH method. The optimum time for Astaxanthin extraction from shrimp carapace powder with maceration method is 5 days. The optimum ratio of shrimp carapace powder with solvent in maceration method is 1: 8 (5 grams of shrimp carapace powder in 40 mL acetone). Maximum wavelength of the extract with UV-Vis spectrophotometer is 468 nm, this maximum wavelength is an indicator that the extract contains Astaxanthin. Characterization by infrared spectra indicated that functional groups contained in the extract is the same with Astaxanthin, evidenced by the appearance of peaks at wave number of  $3369.64\text{ cm}^{-1}$ ,  $2924.09$ ;  $1712.79$  and  $1620.21\text{ cm}^{-1}$ . The concentration of the Astaxanthin extract after measurement with HPLC is 7.466 ppm. The result of its antioxidant activity assay with DPPH in  $IC_{50}$  is 338.500 ppm.*

**Keywords:** Antioxidant activity, Astaxanthin, DPPH, FTIR, maceration, shrimp shells, UV-Vis

## **1. Pendahuluan**

Udang adalah komoditas andalan sektor perikanan yang umumnya diekspor dalam bentuk beku. Indonesia merupakan salah satu negara pengekspor udang terbesar di dunia. Pada proses pembekuan udang (*cold storage*) dihasilkan limbah sebanyak 60-70% dari berat udang, dalam bentuk kepala dan kulit udang. Limbah sebanyak ini jika tidak ditangani secara tepat akan menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan.

Selama ini pemanfaatan limbah kulit udang hanya terbatas untuk campuran pakan ternak serta sumber kitin dan kitosan. Salah satu alasan pemanfaatan limbah kulit udang sebagai pakan ternak adalah adanya kandungan karotenoid yang merupakan pigmen Astaxanthin pada kulit udang yang dapat meningkatkan warna kuning telur ayam dan itik serta mencerahkan warna kulit ikan hias.

Penelitian mengenai karotenoid pada kulit udang sebagai pigmen masih jarang ditemukan dan umumnya penelitian terhadap kulit udang lebih difokuskan untuk menghasilkan kitin dan kitosan. Hal ini menyebabkan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pigmen karotenoid yang terdapat pada kulit udang.

Karotenoid pada kulit udang berada dalam bentuk kompleks karotenoid protein yang apabila diberi

perlakuan panas dapat menyebabkan renggangnya ikatan karotenoid dengan protein sehingga warna kulit udang dapat mengalami perubahan dari gelap menjadi merah terang [1]. Jenis pigmen karotenoid utama yang terdapat pada kulit udang ialah Astasantin [2] dan Astasantin merupakan kelompok pigmen karotenoid jenis xantofil yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dibandingkan jenis pigmen karotenoid lainnya [2,3].

Salah satu metode untuk mengekstrak Astasantin dari limbah kulit udang adalah maserasi dengan pelarut organik seperti aseton, metanol, etanol, heksana, isopropanol, etil asetat dan petroleum eter [4]. Metode maserasi dengan pelarut aseton akan menghasilkan Astasantin bebas terbanyak diantara jenis pelarut lainnya yaitu  $131 \pm 2 \text{ g g}^{-1}$  ekstrak [5] dan Astasantin bebas memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi [6].

Selain itu metode maserasi dipilih karena tidak membutuhkan suhu tinggi sehingga sesuai dengan sifat pigmen Astasantin yang tidak tahan pada suhu tinggi. Astasantin akan mulai terdegradasi pada suhu di atas  $60^\circ\text{C}$  [7], sehingga pada penelitian ini digunakan suhu maserasi yang tidak melebihi suhu  $60^\circ\text{C}$ .

Beberapa kegunaan Astasantin dalam industri pangan yaitu sebagai pewarna, antioksidan, dan prekursor pembentukan vitamin A [2]. Oleh karena itu penelitian ini juga bertujuan untuk melakukan uji terhadap aktivitas antioksidan pada ekstrak Astasantin dari tepung kulit udang.

## 2. Metodologi Penelitian

Tujuan Operasional Penelitian ini antara lain sebagai berikut:

- (a) mengetahui waktu maserasi yang tepat untuk mendapatkan ekstrak Astasantin yang besar dari tepung kulit udang;
- (b) mengetahui rasio tepung kulit udang dengan pelarut aseton dengan pelarut aseton yang tepat untuk mendapatkan ekstrak Astasantin yang banyak;
- (c) mampu menginterpretasikan senyawa hasil ekstrak yang didapat dengan spektrofotometer infra merah;
- (d) mengetahui konsentrasi ekstrak ekstrak Astasantin menggunakan KCKT;
- (e) menguji aktivitas antioksidan ekstrak;

Astasantin tepung kulit udang dengan menggunakan metode DPPH. Prosedur penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

### 2.1 Pembuatan tepung kulit udang

Kulit udang dicuci kemudian dikukus selama 10 menit pada suhu  $100^\circ\text{C}$ . Hal ini karena karotenoid pada kulit udang berada dalam bentuk kompleks antara karotenoid dan protein, apabila diberi perlakuan panas dapat menyebabkan renggangnya ikatan yang mengikat karotenoid dengan protein sehingga warna udang dapat mengalami perubahan dari gelap menjadi merah terang [2].

Dengan demikian protein akan terdenaturasi yang membentuk koagulasi dengan pengendapan di air. Perlakuan selanjutnya adalah mengeringkan kulit udang pada suhu yang tidak melebihi  $60^\circ\text{C}$ . Pengeringan dilakukan hingga didapatkan massa yang stabil. Lalu kulit udang yang telah kering digiling sampai menjadi tepung.

### 2.2 Pengaruh waktu ekstraksi terhadap jumlah ekstrak Astasantin

Ekstraksi Astasantin dilakukan dengan metode maserasi yaitu sebanyak 5 gram tepung kulit udang dilarutkan dengan 50 mL aseton.

Perendaman dilakukan selama beberapa hari pada suhu ruang. Kemudian ekstrak dipisahkan dengan menggunakan kertas saring. Untuk menghasilkan ekstrak dengan absorbansi ekstrak yang maksimum dilakukan maserasi pada waktu yang berbeda yaitu 3, 5 dan 7 hari.

### 2.3 Pengaruh rasio tepung kulit udang dengan pelarut aseton terhadap jumlah ekstrak Astasantin

Proses optimasi dilakukan dengan mengganti perlakuan waktu maserasi dengan rasio tepung kulit udang dan pelarut aseton. Setelah didapatkan waktu yang optimum pada penelitian sebelumnya, meserasi diulangi dengan mengganti volume pelarut menjadi 40 dan 45 mL aseton. Proses maserasi dilakukan selama waktu optimum.

Ekstrak yang didapatkan kemudian dimurnikan dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum.

### 2.4 Pemurnian astasantin dan penentuan panjang gelombang maksimum

Sebelum dilakukan pengukuran absorbansi, ekstrak dari masing-masing perlakuan maserasi dimurnikan terlebih dahulu [4]. Proses pemurnian dilakukan dengan metode ekstraksi sederhana dengan menggunakan corong pisah. Mula-mula ekstrak dimurnikan dengan petroleum eter.

Penggunaan petroleum eter berfungsi untuk menarik pelarut (aseton) dari ekstrak yang dihasilkan. Untuk menghilangkan sisa aseton, ekstrak Astasantin kembali diekstraksi dengan larutan garam NaCl 1% kemudian ekstrak yang telah dipisahkan dari larutan garam ditambahkan dengan padatan natrium sulfat anhidrat. Lalu filtrat disaring dan dialirkan gas nitrogen selama 5 menit. Untuk mendapatkan ekstrak murni Astasantin kemudian ekstrak dipekatkan dengan menggunakan alat rotary evaporator pada suhu 40°C [4]. Ekstrak yang telah bebas dari pelarut kemudian diukur absorbansinya dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. Pengukuran absorbansi dilakukan pada kisaran panjang gelombang Astasantin yaitu 460-490 nm[8]. Pada Tabel 1 menunjukkan nilai panjang gelombang maksimum terhadap pelarut yang digunakan untuk mengukur absorbansi ekstrak Astasantin.

TABEL 1. Panjang Gelombang Maksimum Pelarut untuk Ekstraksi Astasantin

| Pelarut            | Panjang Gelombang Maksimum (nm) <sup>a</sup> |
|--------------------|----------------------------------------------|
| Aseton             | 480                                          |
| Benzena, Kloroform | 485                                          |
| Etanol             | 478                                          |
| Petroleum Eter     | 468                                          |

<sup>a</sup> Ref. [8]

### 2.5 Karakterisasi ekstrak astasantin dengan spektrofotometer inframerah

Karakterisasi senyawa yang terkandung dalam ekstrak yang dihasilkan dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer Inframerah. Pada penelitian Spektrofotometer Inframerah yang digunakan ialah Shimadzu IR untuk sampel berupa cairan, dengan tipe wadah sampel ATR- 8200 H/8200 HA. Data yang diperoleh dari hasil spektrum inframerah berupa informasi gugus- gugus fungsional yang menyusun suatu senyawa.

### 2.6 Pengujian konsentrasi ekstrak astasantin dengan KCKT

Penggunaan instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi juga dapat digunakan untuk menghitung konsentrasi Astasantin yang terdapat dalam ekstrak limbah kulit udang [5]. Proses pengujian kadar Astasantin menggunakan KCKT dilakukan dengan mula-mula sampel ekstrak Astasantin yang sudah dimurnikan diencerkan dengan 2 mL pelarut n-heksana, lalu dilakukan penghomogenisasian menggunakan homogeniser selama 5 menit. Tahapan selanjutnya sebanyak 5 mL ekstrak Astasantin diinjeksikan ke dalam KCKT [9]. Pengoperasian KCKT dilakukan pada suhu kolom 40°C. Kolom yang digunakan pada proses pemisahan yaitu kolom fasa balik C18.

Fasa gerak yang digunakan pada pengujian yaitu campuran antara asetonitril dengan metanol

(90:10, v/v). Laju alir pada pengujian diatur menjadi 0,8 mL/menit. Pengujian dilakukan dengan pengulangan sebanyak 3 kali (triplicate).

## 2.7 Uji aktivitas antioksidan dengan DPPH

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (1,1-difenil pikrilhidrazil). Parameter hasil pengujian dengan metode DPPH adalah dengan IC (Inhibition Concentration), yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas. Radikal DPPH merupakan senyawa organik yang memiliki kandungan nitrogen yang tidak stabil dengan nilai absorbansi yang kuat pada panjang gelombang 517 nm dan memiliki warna ungu gelap. Warna ungu pada DPPH akan tereduksi menjadi warna kuning apabila bereaksi dengan senyawa antioksidan. Besarnya tingkat perubahan warna yang terjadi diukur dengan menggunakan spektrofotometer [10].

Mula-mula dilakukan proses pembuatan larutan DPPH 0,4 mM yaitu dengan cara melarutkan DPPH sebanyak 7,4 mg (BM 394,32 g/mol) dan melarutkannya dalam methanol pro analisis.

Larutan kemudian dipindahkan ke labu ukur 50 mL dan diencerkan sampai tanda batas. Sampel dibuat menjadi larutan dengan berbagai variasi konsentrasi yaitu 5, 10, 25, 50 dan 100 µg mL<sup>-1</sup>. Kontrol positif yang digunakan pada penelitian adalah larutan vitamin C. Perlakuan yang sama dilakukan pada kontrol pun yaitu dibuat menjadi larutan dengan berbagai variasi konsentrasi yaitu 3, 6, 9, 12 dan 15 µg mL<sup>-1</sup>. Masing-masing larutan sampel dan standar dengan berbagai konsentrasi tersebut kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dicampurkan dengan 1 mL larutan DPPH. Setelah dicampurkan, larutan tersebut diinkubasi dalam penangas air pada 37 ° C selama 30 menit. Serapan larutan diukur pada panjang gelombang 515 nm menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Persentase inhibisi dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Hambatan (inhibisi)} = \frac{\text{serapan blanko-serapan sampel}}{\text{serapan blanko}} \times 100\%$$

Nilai IC<sub>50</sub> (Inhibition Concentration 50) adalah konsentrasi antioksidan (g/mL) yang mampu menghambat 50% radikal bebas. Nilai IC<sub>50</sub> diperoleh dari perpotongan garis antara 50% daya hambat dengan sumbu konsentrasi, kemudian dimasukkan ke dalam persamaan:

$$Y = a + bX$$

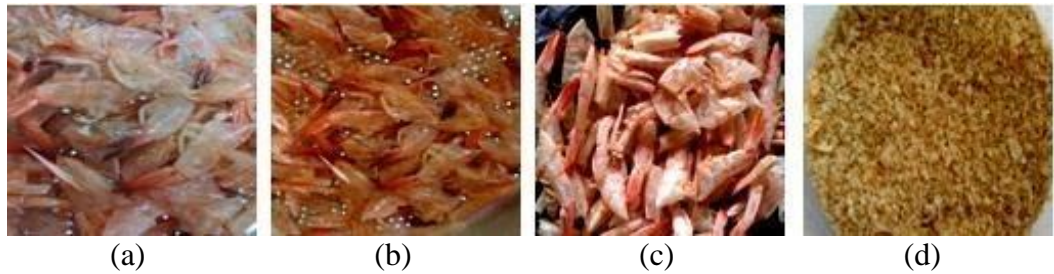
Berdasarkan literatur Y bernilai 50, sehingga nilai X yang menunjukkan besarnya IC<sub>50</sub> dapat diketahui. Ekstrak yang dinyatakan aktif dalam menangkal radikal bebas yaitu bila nilai IC<sub>50</sub> kurang dari 100 g/ml.

Nilai IC<sub>50</sub> didefinisikan sebagai konsentrasi dari senyawa antioksidan yang dapat menyebabkan hilangnya 50% aktivitas DPPH dan pada umumnya dinyatakan dalam satuan ppm. Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> maka aktivitas antioksidan dari sampel tersebut semakin baik.

## 3. Hasil dan Pembahasan

### 3.1 Preparasi sampel

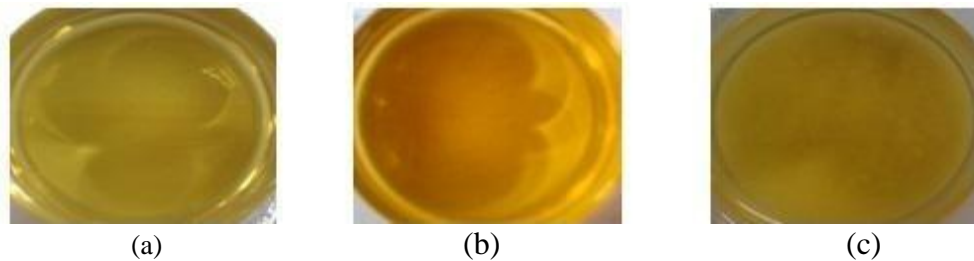
Limbah kulit udang yang telah dibersihkan, dikukus, dan dikeringkan kemudian digiling. Hasil proses preparasi sampel ditunjukkan pada Gambar 1. Warna kulit udang setelah proses pengukusan menjadi merah terang, hal ini dikarenakan renggangnya ikatan yang mengikat karotenoid dengan protein. Protein yang telah terlepas dari karotenoid tersebut akan terdenaturasi membentuk koagulasi dan mengendap pada air.



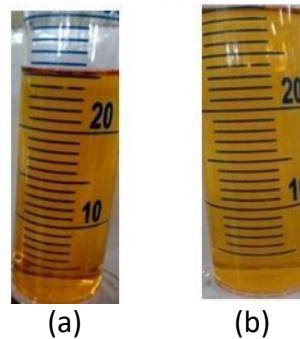
**GAMBAR 1.** Pembuatan tepung kulit udang. (a) Limbah kulit udang yang telah bersih, (b) Kulit udang setelah dikukus, (c) Kulit udang setelah dikeringkan, dan (d) Kulit udang digiling hingga menjadi tepung.

### 3.2 Ekstraksi sampel dan pemurnian sampel

Tepung kulit udang dimaserasi menggunakan pelarut aseton dengan masing-masing perlakuan. Hasil ekstraksi tepung kulit udang dengan pelarut aseton dapat dilihat pada Gambar 2 dan Gambar 3. Berdasarkan Gambar 2 terlihat bahwa warna ekstrak hasil maserasi berbeda pada masing-masing waktu maserasi. Pada waktu maserasi 5 hari terlihat warnanya paling cerah daripada warna ekstrak lainnya. Sedangkan pada Gambar 3 terlihat warna ekstrak dengan volume aseton 40 mL lebih pekat, daripada warna ekstrak dengan volume aseton 45 mL.

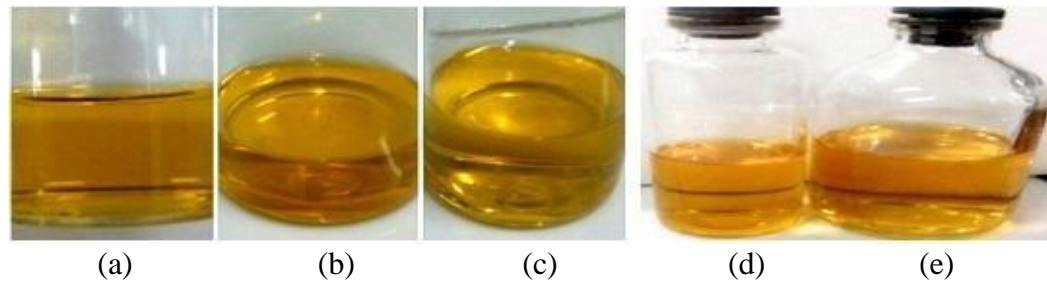


**GAMBAR 2.** Ekstrak Astasantin hasil maserasi dengan 50 mL aseton terhadap waktu maserasi. (a) Waktu maserasi 3 hari, (b) Waktu maserasi 5 hari, dan (c) Waktu maserasi 7 hari.



**GAMBAR 3.** Ekstrak Astasantin terhadap volume pelarut aseton waktu maserasi 5 hari. (a) Volume aseton 40 mL, (b) Volume aseton 45 mL.

Ekstrak yang dihasilkan kemudian dimurnikan. Hasil pemurnian ekstrak dapat dilihat pada Gambar 4 yang menunjukkan perbedaan warna masing-masing ekstrak setelah dimurnikan. Pada ekstraksi dengan pengaruh waktu, terlihat bahwa warna ekstrak hasil maserasi selama 5 hari lebih pekat daripada ekstrak lainnya. Untuk warna yang dimunculkan pada ekstraksi pengaruh rasio terlihat sama antara ekstrak dengan volume aseton 40 mL maupun 45 mL.



**GAMBAR 4.** Pemurnian ekstrak Astasantin. (a) Waktu maserasi 3 hari, (b) Waktu maserasi 5 hari, (c) Waktu maserasi 7 hari, (d) Volume aseton 40 mL, dan (e) Volume aseton 45 mL.

Warna ekstrak setelah proses pemurnian terlihat lebih pekat daripada sebelum dimurnikan. Hal tersebut dapat dikarenakan ekstrak sudah bebas dari pelarut. Berkurangnya volume ekstrak setelah dimurnikan juga menguatkan dugaan bahwa pelarut pada ekstrak telah menguap.

### 3.3 Penentuan panjang gelombang maksimum

Untuk mengetahui hasil ekstrak terbanyak dari masing-masing perlakuan, dilakukan pengukuran absorbansi dari tiap ekstrak pada panjang gelombang maksimum. Pengukuran absorbansi ekstrak menggunakan Spektrofotometer UV- Vis dengan rentang panjang gelombang 700 – 300 nm. Berdasarkan pengukuran absorbansi ekstrak didapatkan panjang gelombang maksimum pada 468 nm. Panjang gelombang tersebut sesuai dengan panjang gelombang maksimum untuk pengukuran Astasantin dengan pelarut petroleum eter [8]. Hal ini dikarenakan pelarut aseton telah habis terekstrak oleh petroleum eter.

### 3.4 Hasil pengaruh waktu maserasi

Parameter yang diuji pada penelitian ini adalah nilai absorbansi dari ekstrak Astasantin tepung kulit udang. Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 468 nm. Data hasil pengaruh waktu terhadap nilai absorbansi disajikan pada Tabel 2 dan Gambar 5.

**TABEL 2.** Hasil Absorbansi Ekstrak Astasantin dari Perlakuan Waktu Maserasi

| Waktu Maserasi | Absorbansi |
|----------------|------------|
| 3 hari         | 0,819      |
| 5 hari         | 0,919      |
| 7 hari         | 0,438      |

Gambar 5 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan nilai absorbansi pada hari ke- 5. Hal ini dikarenakan selama berlangsungnya maserasi terjadi pemecahan membran sel bahan akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel, sehingga senyawa yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik. Semakin lama waktu maserasi terhadap bahan, maka semakin banyak pula membran sel yang pecah sehingga semakin banyak Astasantin bebas.

Pada proses maserasi selama 7 hari terjadi penurunan nilai absorbansi. Hal ini disebabkan karena pelarut aseton yang higroskopis sehingga mempengaruhi kejenuhan pelarut terhadap sampel. Aseton merupakan pelarut yang mudah menguap dimana titik didihnya mencapai 56,2 °C. Hal ini menunjukkan bahwa waktu optimal untuk melakukan maserasi Astasantin dari tepung kulit udang pada suhu ruang adalah selama 5 hari, hasil serupa ditunjukkan pula pada penelitian Mezzomo [5].

### 3.5 Hasil pengaruh rasio tepung kulit udang dengan pelarut aseton

Setelah didapatkan waktu optimum maserasi, kemudian proses optimasi dilanjutkan untuk



mengetahui rasio tepung kulit udang dengan pelarut. Pada penelitian ini proses maserasi dilakukan selama waktu optimum yaitu selama 5 hari dan dilakukan pada suhu ruang. Selanjutnya untuk pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang maksimum 468 nm. Hasil yang didapatkan pada proses optimasi kedua ini disajikan pada Tabel 3 dan Gambar 6.

Nilai absorbansi maksimum dari grafik rasio pelarut ditunjukkan pada rasio 1:8 yaitu sebanyak 5 gram tepung kulit udang dimaserasi dengan 40 mL pelarut aseton. Berdasarkan hukum Lambert-Beer dapat diketahui bahwa nilai absorbansi akan berbanding lurus dengan konsentrasi sedangkan nilai konsentrasi akan berbanding terbalik dengan volume pelarut. Nilai absorbansi pun akan berbanding terbalik dengan volume pelarut, sehingga jika volume pelarut semakin kecil maka nilai absorbansi akan semakin besar.

Hasil yang didapatkan dari pengaruh waktu maserasi dan rasio volume aseton pada kondisi optimum terhadap banyak ekstrak Astasantin yang dihasilkan Adalah pada waktu maserasi selama 5 hari dan rasio perbandingan tepung kulit udang dengan pelarut aseton sebesar 1:8.

Parameter banyak atau sedikit ekstrak yang dihasilkan yaitu nilai absorbansi masing-masing sampel saat diukur dengan spektrofotometer UV- Vis. Pada pengukuran absorbansi didapatkan nilai panjang gelombang maksimum pada 468 nm.

Nilai panjang gelombang tersebut sesuai dengan panjang gelombang ekstraksi Astasantin dengan pelarut petroleum eter.

### **3.6 Karakterisasi ekstrak astasantin dengan FTIR**

Karakterisasi ekstrak Astasantin dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer Inframerah, sehingga dapat diketahui gugus fungsi yang terdapat pada ekstrak. Hasil yang didapat dari pengukuran panjang gelombang maksimum pada spektrofotometri UV-Vis didukung dengan spektrum FTIR ekstrak Astasantin ditunjukkan pada Gambar 7. Interpretasi gugus fungsi yang terdapat pada ekstrak disajikan pada Tabel 4.

Hasil analisis pola serapan FTIR yang didapatkan dari penelitian ini menunjukkan adanya vibrasi ulur O-H dari ikatan hidrogen intermolekuler pada daerah panjang gelombang 3369,64  $\text{cm}^{-1}$ . Vibrasi ulur C-H asimetris dari aromatik  $\text{CH}_3$  memberikan serapan pada bilangan gelombang 2924,09  $\text{cm}^{-1}$ . Vibrasi ulur C=O ditunjukkan dengan adanya serapan pada 1712,79  $\text{cm}^{-1}$  dan vibrasi ulur C=C dari alkena ditunjukkan oleh serapan pada daerah 1620,21  $\text{cm}^{-1}$ . Adanya serapan sedang ditunjukkan pada bilangan gelombang 1463,97 dan 1377,17  $\text{cm}^{-1}$  akibat dari vibrasi lentur C-H dan serapan lemah pada bilangan gelombang 1220,94  $\text{cm}^{-1}$  merupakan akibat dari vibrasi tekuk C-H. Serapan sedang-kuat pada bilangan gelombang 1170,79  $\text{cm}^{-1}$  merupakan akibat dari vibrasi uluran C=C dari alkena. Serapan kuat pada bilangan gelombang 1049,28  $\text{cm}^{-1}$  merupakan akibat dari vibrasi uluran C-O dari alkohol dan serapan lemah ditunjukkan pada bilangan gelombang 960,55; 916,19; dan 840,96  $\text{cm}^{-1}$  merupakan vibrasi tekukan CH kibusan dari  $-\text{CH}=\text{CH}_2$ .

Berdasarkan hasil pengamatan spektrum FTIR dapat diketahui bahwa gugus fungsi yang terdapat pada ekstrak adalah gugus O-H dari ikatan hidrogen intermolekuler, C-H dari alifatik  $\text{CH}_3$ , CH simetris dari  $\text{CH}_2$ , C=C dari alkena,  $\text{CH}_2$  dan C-O dari alkohol. Hasil yang didapatkan ini sesuai dengan komponen penyusun Astasantin dan dengan spektrum infra merah Astasantin yang dipaparkan oleh Widmer [11] pada Gambar 8.

### **3.7 Penentuan konsentrasi ekstrak astasantin dengan KCKT**

Pengujian konsentrasi ekstrak Astasantin dilakukan dengan instrumen kromatografi cair kinerja tinggi. Pengujian konsentrasi ekstrak Astasantin dengan instrumen KCKT dilakukan di Laboratorium Pengujian Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pengolahan Produk dan



Bioteknologi Kelautan dan Perikanan- Badan Penelitian Pengembangan Kelautan dan Perikanan, Kementerian Kelautan dan Perikanan. Hasil analisis menggunakan KCKT disajikan pada Gambar 9 dan Gambar 10. Berdasarkan grafik didapatkan puncak standar dan puncak sampel yang muncul pada panjang gelombang 460 nm.

Panjang gelombang yang dihasilkan sesuai dengan kisaran panjang gelombang ekstrak Astasantin dengan pelarut petroleum eter. Puncak standar muncul pada pada menit ke 13,624 dengan luas area sebesar 29,080. Sedangkan puncak sampel muncul pada menit ke 13,280 dengan luas area sebesar 29,080.

Berdasarkan hasil perhitungan konsentrasi ekstrak Astasantin yaitu sebesar 7,466 ppm. Pada pengujian KCKT, konsentrasi standar yang digunakan sebesar 13,5 ppm. Nilai konsentrasi sampel yang rendah dapat dikarenakan proses pemurnian sampel yang belum maksimal, sehingga masih ada pelarut yang tertinggal pada sampel.

### 3.8 Uji antioksidan dengan metode DPPH

Nilai inhibisi terhadap konsentrasi pada uji antioksidan dapat dilihat pada Tabel 5. Berdasarkan tabel tersebut diketahui bahwa adanya peningkatan konsentrasi menyebabkan nilai absorbansi akan semakin rendah. Absorbansi yang rendah dari campuran reaksi mengindikasikan penangkapan aktivitas radikal yang tinggi [12]. Penurunan nilai absorbansi terjadi karena adanya donasi atom hidrogen dari sampel ke DPPH (reduksi DPPH). Donasi proton ini menyebabkan DPPH yang bersifat radikal tereduksi menjadi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin yang bersifat non radikal, sedangkan sampel yang bereaksi dengan radikal DPPH diubah menjadi suatu senyawa baru yang bersifat stabil.

Terlihat pula pada Tabel 5 hubungan antara konsentrasi dengan nilai inhibisi adalah berbanding lurus. Semakin besar konsentrasi sampel yang ditambahkan maka semakin besar nilai inhibisinya pula. Berdasarkan tabel tersebut menunjukkan larutan kontrol positif asam askorbat memiliki nilai inhibisi (aktivitas antioksidan) yang tinggi, sedangkan pada sampel yang diujikan memiliki aktivitas antioksidan yang kurang baik.

Parameter yang dipakai untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah dengan menentukan harga  $IC_{50}$  yang merupakan konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikalnya. Zat yang mempunyai aktivitas antioksidan tinggi, akan mempunyai harga  $IC_{50}$  yang rendah [13]. Nilai  $IC_{50}$  dapat digunakan untuk menyimpulkan seberapa besar sampel berpotensi sebagai antioksidan. Range terkait kuat atau lemahnya potensi antioksidan berdasarkan nilai  $IC_{50}$  disajikan pada Tabel 6.

Penentuan harga  $IC_{50}$  dapat dilakukan dengan mencari persamaan regresi hubungan persentase inhibisi dengan konsentrasi. Persamaan regresi sampel dan kontrol dapat dilihat pada Gambar 11. Berdasarkan persamaan regresi dari Gambar 11 dapat diketahui nilai  $IC_{50}$  dari larutan kontrol dan ekstrak Astasantin. Nilai  $IC_{50}$  ini diketahui dengan cara menetapkan nilai 50 pada Y, sehingga x (nilai  $IC_{50}$ ) akan didapatkan. Pada larutan kontrol asam askorbat nilai  $IC_{50}$  yang didapat yaitu 2,797 ppm. Hal ini membuktikan bahwa larutan asam askorbat memiliki potensi yang sangat kuat sebagai antioksidan. Dilihat dari nilai  $IC_{50}$  yang didapat < 50 yaitu 2,797 ppm dengan kata lain, asam askorbat dikatakan sangat aktif sebagai antioksidan karena hanya memerlukan konsentrasi sebesar 2,797 ppm untuk mampu meredam 50% radikal bebas [14]. Vitamin C memiliki aktivitas antioksidan yang cukup tinggi karena vitamin C memiliki 4 gugus hidroksil. Vitamin C sebagai antioksidan dapat memberikan satu atau dua elektronnya untuk menstabilkan radikal bebas [15].

Selanjutnya dari grafik hubungan persentase inhibisi dengan konsentrasi pada ekstrak Astasantin, didapatkan nilai  $IC_{50}$  sebesar 338,500 ppm. Nilai  $IC_{50}$  pada senyawa Astasantin

menunjukkan bahwa Astasantin tidak berpotensi sebagai antioksidan jika ditinjau dari pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Hal ini dapat dikarenakan ikatan ganda terkonjugasi Astasantin yang tidak mampu mempengaruhi kation radikal dari senyawa DPPH, sehingga tidak terjadi interaksi penyumbangan proton atau elektron kepada radikal DPPH. Dengan kata lain tidak terjadi reduksi radikal DPPH menjadi DPPH-H. Astasantin dapat menangkap radikal bebas dengan baik jika pengujian antioksidan dilakukan dengan metode ABTS radical-scavenging assay [16]. Uji aktivitas antioksidan Astasantin juga baik dilakukan dengan menggunakan metode bleaching terhadap  $\beta$ -karoten, dimana pada metode tersebut  $\beta$ -karoten akan mengalami destruksi oleh produk degradasi asam linoleat [17]. Namun nilai  $IC_{50}$  yang didapatkan pada pengujian antioksidan dengan metode Astasantin ini lebih baik dari penelitian Hartono [18], dimana nilai  $IC_{50}$  terbaik yang didupatkannya mencapai 2,963 ppm. Hal tersebut dikarenakan pemilihan pelarut yang tepat juga sangat penting. Pada penelitian Hartono [18] digunakan pelarut untuk maserasi adalah n- heksana, isopropanol dan campuran keduanya, sedangkan pada penelitian ini digunakan pelarut aseton. Pemilihan pelarut aseton dikarenakan hasil ekstrak yang didapat merupakan Astasantin dalam bentuk bebas. Ketidakstabilan Astasantin bebas terhadap cahaya, oksigen, kadar asam dan suhu tinggi membuat Astasantin bebas ini mudah teroksidasi, degradasi dan isomerisasi, sehingga kemampuan Astasantin bebas sebagai antioksidan dalam menangkap radikal bebas semakin meningkat [6].

#### 4. Kesimpulan

Pada penelitian ini didapatkan kesimpulan sebagai berikut:

1. Waktu maserasi untuk mendapatkan ekstrak Astasantin dengan jumlah terbanyak adalah selama 5 hari.
2. Rasio perbandingan tepung kulit udang dan pelarut aseton terbaik adalah sebanyak 1:8.
3. Panjang gelombang maksimum pada pengukuran absorbansi ekstrak Astasantin dalam pelarut petroleum eter yang didapatkan yaitu sebesar 468 nm.
4. Spektrum inframerah ekstrak yang didapatkan mirip dengan spektrum infra merah senyawa Astasantin dari penelitian Widmer et al., (1981), hal ini membuktikan bahwa senyawa yang terdapat pada ekstrak yang dihasilkan merupakan senyawa Astasantin.
5. Pengukuran konsentrasi ekstrak Astasantin menggunakan KCKT yaitu sebesar 7,466 ppm, konsentrasi ekstrak tersebut lebih kecil daripada konsentrasi Astasantin standar yang digunakan.
6. Nilai  $IC_{50}$  dari uji aktivitas antioksidan ekstrak Astasantin menggunakan metode DPPH adalah 338,500 ppm yang menunjukkan bahwa Astasantin tidak efektif dalam menangkak radikal bebas DPPH.

#### Ucapan Terima Kasih

Terimakasih kepada Dr. Yusmaniar, M.Si selaku dosen pembimbing dan koordinator program studi kimia, Prof. Erdawati, M.Sc selaku dosen pembimbing, dan semua pihak yang telah membantu dalam penelitian.

#### Daftar Pustaka

- [1] Khanafari A, Saberi A, Azar M, Vosooghi G, Jamili S, Sabbaghzadeh B. Extraction of astaxanthin esters from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*. 2007;4(2):93-8.
- [2] Hendry GA, Houghton JD, editors. *Natural food colorants*. Springer Science & Business Media; 1996.
- [3] Astawan M. *Khasiat warna-warni makanan*. Gramedia Pustaka Utama; 2008.
- [4] Sachindra NM, Bhaskar N, Mahendrakar NS. Recovery of carotenoids from shrimp waste in

organic solvents. *Waste Management*. 2006 Jan 1;26(10):1092-8.

- [5] Mezzomo N, Maestri B, dos Santos RL, Maraschin M, Ferreira SR. Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: Influence of extraction method on carotenoid concentration. *Talanta*. 2011 Sep 15;85(3):1383-91.
- [6] Asker D, Awad TS, Beppu T, Ueda K. Isolation, characterization, and diversity of novel radiotolerant carotenoid-producing bacteria. In *Microbial Carotenoids from Bacteria and Microalgae 2012* (pp. 21-60). Humana Press, Totowa, NJ.
- [7] Jing P, Ruan SY, Dong Y, Zhang XG, Yue J, Kan JQ, Slavin M, Yu LL. Optimization of purification conditions of radish (*Raphanus sativus* L.) anthocyanin- rich extracts using chitosan. *LWT-Food Science and Technology*. 2011 Dec 1;44(10):2097-103.
- [8] Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. Washington: International Food Policy Research Institute (IFPRI); 2004.
- [9] Mezzomo N, Martínez J, Maraschin M, Ferreira SR. Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: supercritical fluid extraction of carotenoid fraction. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2013 Feb 1;74:22-33.
- [10] Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 2004 Mar;26(2):211-9.
- [11] Widmer, E. Widmer, E., Zell, R., Lukác, T., Casadei, M., Schönholzer, P., dan Broger, E.A. 1981. Technische Verfahren zur Synthese von Carotinoiden und verwandten Verbindungen aus Oxoisophoron. I. Modifizierung der Kienzle- Mayer-Synthese von (3S,3'S)-Astaxanthin. *Jornal of Helv, Chim-Acta*. Vol. 64, 2405- 2418
- [12] Gülçin I, Büyükkuroğlu ME, Oktay M, Küfrevioğlu Öİ. Antioxidant and analgesic activities of turpentine of *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallsiana* (Lamb.) Holmboe. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003 May 1;86(1):51-8.
- [13] Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset CL. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*. 1995 Jan 1;28(1):25-30.
- [14] Darmanto W. Pemanfaatan Polysaccharide Krestine (PSK) Dalam Menurunkan Radikal Bebas Pada Darah Mencit Akibat Induksi 2-Methoxyethanol. *Jurnal ILMU DASAR*. 2005;6(2):96-102.
- [15] May JM. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane?. *The FASEB journal*. 1999 Jun;13(9):995-1006.
- [16] Sowmya R, Sachindra NM. Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing byproducts by in vitro assays and in membrane model system. *Food Chemistry*. 2012 Sep 1;134(1):308-14.
- [17] Saleha, S. dan Kurniawan. 2009. Aktivitas Antioksidan dan Astaxanthin dari Limbah Kulit Udang. Aceh : Universitas Syiah Kuala.
- [18] Hartono, Gary. 2011. Karakterisasi Aktivitas Antioksidan Ekstrak Karotenoid dari Cangkang Udang Windu (*Peneaus monodon* Fab.) Karawaci :Universitas Pelita Harapan.