



Ekstraksi Astaxanthin Kulit Udang *Litopenaeus Vannamei* Pantai Gunungkidul Menggunakan Pelarut Minyak Bunga Matahari Dan Etanol

Aniek Prasetyaningsih^{1*}, Graciela Carina Najohan, Abner Amadeuz Wisaksono³, Djoko Rahardjo⁴
^{1,2,3,4}Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana-Yogyakarta, Indonesia

ABSTRAK

Sebagai negara maritim dengan perairan yang sangat luas Indonesia memiliki banyak peluang untuk memanfaatkan sumber daya kelautan sebagai sumber senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai bahan aktif obat. Salah satu biota laut yang menyimpan potensi senyawa aktif adalah kulit udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang banyak ditemukan sebagai limbah di sepanjang pantai Gunungkidul Yogyakarta. Kulit udang ini memiliki kandungan Astaxanthin yang merupakan sumber antioksidan yang potensial untuk industri kesehatan. Tujuan penelitian ini adalah memabndingkan ekstraksi Astaxanthin dari kulit udang *L. vannamei* menggunakan minyak bunga matahari dan etanol 70%. Ekstraksi Astaxanthin kulit udang digunakan pelarut minyak bunga matahari dan etanol 70% dengan metode maserasi, sedangkan uji fitokimia dan profiling Astaxanthin digunakan *Thin Layer Chromatography* dan Spektrofotometer dengan perhitungan Kelly dan Harmon (1972) [5] serta standar Astaxanthin murni. Hasil pemisahan ekstraksi etanol 70%, dilanjutkan dengan kolom kromatografi menggunakan fase gerak eter: etanol (8:2). Hasil kadar Astaxanthin tertinggi (220 mg/g serbuk udang) didapatkan dari ekstraksi dengan pelarut bunga matahari, sedangkan hasil fraksinasi dengan kolom kromatografi dari ekstrak kasar etanol 70%, memberikan hasil Astaxanthin cukup tinggi yaitu 220,77 mg/ g fraksi. Hasil uji fraksi terhadap persentase kandungan neutrofil menunjukkan bahwa konsentrasi 100% dapat menyebabkan kandungan neutrofil tidak berbeda nyata dengan kontrol positif pada uji statistik taraf kepercayaan 95%. Hasil uji fraksi terhadap neutrofil tikus, persentase penurunan terbaik pada konsentrasi 150 mg/g bb tikus.

Kata kunci: *Astaxanthin, kulit udang Litopenaeus vannamei, minyak bunga matahari, Gunungkidul*

ABSTRACT

As a maritime country with vast waters, Indonesia has many opportunities to utilize marine resources as a source of bioactive compounds that have the potential as active medicinal ingredients. One of the marine biotas that potentially contains the active compounds is the Vannamei shrimp's shell (*Litopenaeus vannamei*), which is commonly found as waste along the coast of Gunungkidul, Yogyakarta. The shrimp's shell contains astaxanthin, a potential source of antioxidants for the health industry. The purpose of this study was to compare the astaxanthin extraction yield from *L. vannamei* shrimp shells using sunflower oil and 70% ethanol. The Astaxanthin extraction used sunflower oil and ethanol 70% as solvents and was done

^{*)} Dra. Aniek Prasetyaningsih, M.Si, Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana, Jln. Dr. Wahidin 5-19C-Indonesia, Yogyakarta, 081328795459, E-mail : aniek@staff.ukdw.ac.id

^{**)} Graciela Carina Najohan, Mahasiswa Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana, Jln. Dr. Wahidin 5-19C-Indonesia, 081325332292. E-mail: 31160014@students.ukdw.ac.id

^{**)} Abner Amadeuz Wisaksono, Mahasiswa Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana, Jln. Dr. Wahidin 5-19C-Indonesia, 087821555211. E-mail: 31160014@students.ukdw.ac.id

^{**)} Drs. Djoko Rahardjo, M.Kes, Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana, Jln. Dr. Wahidin 5-19C-Indonesia, 08122950401. E-mail: djoko@staff.ukdw.ac.id

doi: 10.33474/e-jbst.v7i1.384

Diterima tanggal 24 Januari 2021– Diterbitkan Tanggal 31 Agustus 2021

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>



by maceration method, while the phytochemical test and Astaxanthin profiling used Thin Layer Chromatography and Spectrophotometer with Kelly and Harmon (1972) [5] calculations as well as pure Astaxanthin standards. The extraction yield of the 70% ethanol extraction was further processed by column chromatography using ether: ethanol (8: 2) as mobile phase. The highest Astaxanthin yield (220 mg / g of shrimp powder) was obtained from the extraction with sunflower oil compared to the 70% ethanol solvent, while the fractionation result with a chromatographic column from a crude extract of ethanol 70% showed high astaxanthin yield of 220.77 mg. / g fraction. The results of the fraction on the percentage of neutrophil content showed that the concentration of 100% could cause the neutrophil content to be not significantly different from the positive control on the 95% confidence level statistical test. The results of the fraction test on rat neutrophils, the best percentage reduction was at a concentration of 150 mg / g bw of rats.

Keywords: Astaxanthin, *Litopenaeus vannamei* shrimp shells, sunflower oil, Gunungkidul

Pendahuluan

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione) merupakan pigmen karotenoid seperti zeaxanthin, lutein, dan β -karoten namun secara khusus sebagai pigmen berwarna merah-oranye dan termasuk kelompok xantofil yang memiliki gugus fungsional hidroksil dan karbonil yang menjadikannya sebagai sumber antioksidan yang sangat baik. Senyawa ini dapat ditemukan pada biota laut seperti salmon, udang, udang karang dan mikroalga *Haematococcus pluvialis*. Pada hewan Astaxanthin memiliki fungsi biologis penting bagi hewan laut, yaitu pigmentasi, perlindungan terhadap cahaya ultraviolet (UV), komunikasi, imunitas, meningkatkan kemampuan reproduksi, toleransi terhadap tekanan, dan perlindungan terhadap oksidasi makromolekul. Astaxanthin memiliki efek farmakologis yang potensial, yaitu antikanker, antidiabetik, antioksidan, efek neurologis, kardiovaskular, okular, dan pelindung kulit serta sebagai anti inflamasi (Davinelli *et al.*, 2018) [2].

Indonesia merupakan negara maritim dan memiliki potensi sumberdaya alam hayati kelautan yang tinggi bagi kehidupan masyarakat. Berbagai keanekaragaman hayati laut tersebut dapat memberikan nilai ekonomis yang tinggi dan dapat digunakan untuk pembangunan negara. Dalam beberapa tahun terakhir, para peneliti memfokuskan penelitian terhadap senyawa aktif yang terdapat pada berbagai biota laut, yang memiliki potensi dalam pengembangan di bidang industri maupun kesehatan (Stamatios *et al.*, 2013) [11].

Salah satu biota laut yang menyimpan potensi senyawa bioaktif dan merupakan salah satu komoditas ekspor yang utama dan potensial adalah udang. Kementerian Kelautan dan Perikanan Indonesia menyatakan proyeksi produksi perikanan budidaya udang pada tahun 2020 adalah 18.440.000 ton dan potensi lahan untuk budidaya udang mencapai 2.964.331,24 Ha, selain itu udang merupakan komoditas penting dengan volume produksi nasional sebesar 886.520 ton. Dari proses pembekuan, pengalengan dan pengolahan kerupuk udang menghasilkan limbah berkisar antara 30% - 75% dari berat udang yang berupa kepala, kulit, ekor dan kaki per tahun yang dihasilkan mencapai 1.000 ton (Swastawati *et al.*, 2008) [12] yang potensial mencemari lingkungan.

Ekstraksi karotenoid dari limbah udang *Panaeus indicus* menggunakan pelarut kimia isoprophyl alcohol : hexane (50 : 50) telah dilakukan oleh Shacindra *et al.* (2005) [10] dan menghasilkan karotenoid sebesar 43,9 $\mu\text{g/g}$, sedangkan penggunaan aseton sebagai pelarut dalam proses ekstraksi astaxanthin hanya menghasilkan yield karotenoid sebesar pada 40,6 $\mu\text{g/g}$.

Vaname (*Litopenaeus vannamei*) adalah jenis udang yang paling banyak dibudidayakan di Gunungkidul selain udang windu (*Panaeus monodon*) dan udang putih (*Panaeus merguensis*). Udang Vaname juga merupakan udang favorit para pembudidaya karena memiliki keunggulan antara lain kemampuan dalam beradaptasi terhadap berbagai kondisi lingkungan. Hasil ekstraksi cangkang udang beku *Litopenaeus vannamei* dari Samut-Sakorn Thailand menggunakan pelarut etanol dengan rasio 1: 2 (cangkang : etanol) menghasilkan 20.39 \pm 1.02 mg astaxanthin/g shrimp cangkang (Kuedo *et al.*, 2016) [7]

Metode ekstraksi Astaxanthin telah banyak dilakukan baik secara kimiawi maupun enzimatik dan berbagai pelarut digunakan yaitu aseton dan heksan pada berbagai sampel dan menghasilkan



konsentrasi pigmen sebesar 16,16 $\mu\text{g}/\text{gr}$ pada organ karapas. Babu *et al.*, (2008) [1] juga telah melakukan ekstraksi karotenoid secara enzimatis dengan rendemen 75,7 -96,8 $\mu\text{g}/\text{g}$. Namun demikian hasil ekstraksi sering tidak menghasilkan seperti yang diharapkan, karena kandungan Astaxanthin sangat tergantung dari sampel yang digunakan, Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan usaha untuk ekstraksi Astaxanthin dari kulit udang Vaname dengan berbagai metode dan pelarut dari sampel yang berbeda agar diperoleh Astaxanthin yang tinggi.

Material dan Metode

Bahan dan Alat

Magnetik Stirer, Oven, kertas saring Whatman No.24, *Thin Layer Chromatography* (TLC), Spektrofotometer, Kolom kromatografi, *Laboratory Mixer*, *Rotary Evaporator*, Corong pisah, Mikroskop, Gelas benda, Sonde lambung, Suntik, Tabung reaksi

Kulit udang *Litopenaeus vannamei* dari pantai Gunungkidul-Yogyakarta, Aseton, Petroleum eter, Larutan NaCl, Heksana, Etanol 70%, Kloroform, Pakan standar tikus putih (*Rattus norvegicus*), Standar Astaxanthin (Giffarine Astaxanthin-Thailand) 32 mg, Astaxanthin 5ML0062-SIGMA, Celexocib 18 mg/kgbb, Propilen Glikol 0,5 mg/kgbb.

Metode

Preparasi dan ekstraksi

Ekstraksi dengan pelarut minyak bunga matahari

Kulit udang *Litopenaeus vannamei* yang berasal dari pantai Gunungkidul-Yogyakarta, dibersihkan dengan air mengalir dan dikeringkan pada suhu 50°C selama 24 jam. Udang yang sudah kering angin di haluskan menggunakan mixer. Ekstraksi dilakukan dengan metode magnetik stirrer digunakan pelarut minyak bunga matahari dengan perbandingan pelarut dan sampel yaitu 4:1 (v/b) (Dalei dan Sahoo, 2014) [3]. Kulit udang yang sudah haluskan sebanyak 2 gram ditambahkan minyak bunga matahari sebanyak 8 ml, kemudian di stirer pada selama 1 jam. Ekstrak kemudian dipisahkan dari debris dengan disaring menggunakan kertas saring Whatman No.42. Proses ekstraksi diulangi beberapa kali sehingga sampel tidak berwarna. Ekstrak kemudian dimasukkan dalam corong pisah, ditambahkan 62,5ml petroleum eter (BP 40-600C) dan 42 ml 0,73% (b/v) larutan NaCl, setelah pencampuran epifase (filtrat bagian atas) dikumpulkan. Fase bawah ditambahkan dengan aquades dengan volume yang sama, dicampur ditunggu sampai terbentuk larutan epifase, kemudian bagian epifase dikumpulkan, dan diuapkan sampai kering menggunakan rotary evaporator.

Ekstraksi dengan pelarut etanol 70%

Ekstraksi dengan metode maserasi digunakan pelarut etanol 70%. Kulit udang kering yang telah haluskan dicampur dengan etanol 70% dengan perbandingan 1 : 10 (b/v), yaitu 100 gram kulit udang dan 1000 ml etanol dalam stoples selama 3 hari pada suhu kamar. Setelah 3 hari, sisa kulit udang dipisahkan dengan filtrat dengan disaring menggunakan kertas Whatman No.42, selanjutnya di evaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada dengan suhu 40°C hingga terlihat seperti sediaan pasta.

Analisis kualitatif dan kuantitatif Astaxanthin

Uji Terpenoid (Identifikasi Salkowski)

Ditimbang 0,3 gram ekstrak Astaxanthin dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 3 ml kloroform anhidrat. Ditambahkan 1-2 tetes asam sulfat pekat kemudian berubah warna dan terbentuk dua lapisan, warna coklat kemerahan menunjukkan hasil positif adanya terpenoid.

Uji Kuantitatif Astaxanthin Berdasarkan Kelly dan Harmon (1972)



Absorbansi Astaxanthin diukur menggunakan Spektrofotometer dengan panjang gelombang 470 nm kemudian dihitung menggunakan perhitungan Kelly dan Harmon (1972) [5] yaitu :

$$AST (\mu\text{g} / \text{g}) = A \times D \times 106/100 \times G \times d \times E1\text{cm}1\%$$

Keterangan :

- AST : Konsentrasi Astaxanthin dalam $\mu\text{g} / \text{g}$
A : Absorbansi
D : Volume ekstrak dalam heksana
106 : Pengenceran berganda
G : Berat sampel dalam g
d : Lebar cuvette (1cm)
E : Extinction co-efficient, 2100.

Uji Kuantitatif Berdasarkan Standar Astaxanthin

Standar Astaxanthin digunakan Astaxanthin Sigma Aldrich dengan variasi konsentrasi 0; 0,5; 1; 1,5; 2 dan 2,5 ppm dengan absorbansi 477 nm. Pengukuran kadar Astaxanthin pada sampel yang dilarutkan pada aseton di lakukan pada absorbansi 477 nm sesuai dengan standar.

Profiling Astaxanthin menggunakan Thin Layer Chromatography (TLC)

Astaxanthin merupakan golongan Xantophil, oleh karena itu uji yang dilakukan adalah pada golongan asthaxanthin atau pada golongan Xantophil. Ekstrak astaxanthin sebanyak 20 mikroliter serta standar Astaxanthin-Giraffin ditotolkan pada kromatografi lapis tipis dengan fase gerak aseton : heksana (9:1,8:2,7:3,6:4,5:5,1:9,2:8,3:7,4:6,5:5) dan petroleum eter : etanol (9:1,8:2,7:3,6:4,5:5,1:9,2:8,3:7,4:6,5:5). Pita yang terpisah pada plat diidentifikasi menggunakan standar Astaxanthin (Giffarine Astaxanthin) dan referensi berdasarkan Rf nya pada sinar ultra violet.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Analisis HPLC digunakan Shimadzu lab Solution di Universitas Islam Indonesia Yogyakarta dengan volume sebanyak 20 μL

Pemisahan Ekstrak Kasar Kulit Udang dengan Kolom Kromatografi

Pemisahan ekstrak kulit udang digunakan fase gerak petroleum eter (non-polar) : etanol (polar) 8:2 dengan pertimbangan memberikan pemisahan yang paling baik yaitu : 6 fraksi dengan warna jingga hingga warna kuning bening.

Boasaay

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan sebanyak 20 ekor, umur tikus 8-12 minggu dengan berat badan 180-200 gram. Tikus diaklimatisasi terlebih dahulu di lingkungan laboratorium selama 3 hari dan dibagi secara acak menjadi 5 kelompok . Pemberian makanan menggunakan pakan standar dan minum *ad libitum*. tikus kemudian dibagi secara acak menggunakan Randbetween pada Microsoft excel sebelum dibagi dalam kandang kelompok-kelompok perlakuan yaitu: kontrol positif : Obat Celecoxib 18 mg, kontrol negatif : Propilen glikol 1 ml, perlakuan I : ekstrak Astaxanthin kulit udang dengan dosis 50 mg/kgBB, perlakuan II : ekstrak Astaxanthin kulit udang dengan dosis 100 mg/kgBB, perlakuan III : ekstrak Astaxanthin kulit udang dengan dosis 150 mg/kgBB. Ekstrak diberikan secara per oral menggunakan sonde yang dimasukkan sampai ke tenggorokan tikus.

Penghitungan Neutrofil

Neutrofil diamati pada jam ke-0, ke-4 dan ke-8. Pengambilan darah dilakukan melalui ujung ekor tikus. Darah yang keluar diteteskan pada gelas objek dan dibuat preparat apus darah. Setelah 1 jam



kemudian baru diinjeksi karagenin 1% sebanyak 0,1 ml pada sub-plantar kaki tikus. Pengamatan neutrofil dan limfosit diamati dilakukan dengan menghitung per 100 sel menggunakan *hand counter*

Analisis data

Analisis statistik data dilakukan terhadap uji awal hasil fraksi terhadap persentase neutrofil dan penurunan neutrofil. Analisis dilakukan menggunakan program SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) *One Way ANOVA* dilanjutkan dengan *Post Hoc Test LSD (Least Significant Difference)* pada taraf kepercayaan 95%.

Hasil Dan Diskusi

Kandungan Astaxanthin Kulit Udang

Astaxanthin merupakan salah satu metabolit sekunder yang merupakan kelompok Xantofil, yang mengandung karbon, hidrogen dan atom oksigen. Umumnya adanya Astaxanthin ditandai dengan warna merah yang disebabkan oleh ikatan rangkap terkonjugasi ditengah molekul dan memiliki Antioksidan yang kuat karena jenis ikatan rangkap terkonjugasi yang menyumbangkan elektron dan bereaksi dengan radikal bebas akan mengubahnya menjadi lebih stabil serta menghentikan reaksi radikal bebas (Guerin, *et al.*, 2003) [4]. Dalam penelitian ini dilakukan usaha untuk mendapatkan astaxanthin dari kulit udang *L. vannamei* menggunakan 3 metode yaitu : pelarut minyak bunga matahari magnetic stirrer dengan dan metode pemanasan serta maserasi dengan pelarut etanol 7% yang dilanjutkan dengan fraksinasi pada kolom kromatografi.

Ekstraksi Astaxanthin Kulit Udang Vaname

Dalam ekstraksi Astaxanthin dilakukan dengan 3 metode yaitu menggunakan pelarut minyak bunga matahari yang dengan stirrer dan pemanasan serta dengan maserasi etanol 70%.

Ekstraksi Astaxanthin Kulit Udang Vaname dengan Metode Magnetic Stirrer

Ekstraksi dengan metode *magnetic stirrer* digunakan pelarut minyak bunga matahari dengan perbandingan pelarut dan sampel yaitu 4:1 (v/b), mengacu pada Dalei dan Sahoo (2014) [3]. Proses ekstraksi diulangi beberapa kali sehingga sampel tidak berwarna, selain itu dilakukan juga ekstraksi yang dengan pelarut yang sama namun dilakukan pemanasan menggunakan *waterbath* pada suhu 70°C.

Berdasarkan hasil pengukuran secara kuantitatif, Spektrofotometer UV – Vis dengan menggunakan panjang gelombang 470 nm dan rumus Kelley – Harmon (1972) [5], metode magnetic stirrer diperoleh hasil astaxanthin yaitu sebesar 0,11 µg/g astaxanthin/ berat ekstrak, sedangkan penggunaan pemanasan *waterbath* 70°C hasil astaxanthin yaitu sebesar 0,05 µg/g. Hal ini dimungkinkan karena pemanasan selama 1 jam pada suhu 70 °C dapat merusak astaxanthin, sehingga jumlah astaxanthin yang dihasilkan lebih rendah.

Ekstraksi Astaxanthin Kulit Udang Vaname dengan Etanol 70 %

Hasil uji secara kualitatif dan kuantitatif ekstrak Astaxanthin dengan menggunakan metode *magnetic stirrer* dan pemanasan dengan pelarut minyak bunga matahari dirasa kurang baik hasilnya, hal ini adalah bahwa penggunaan minyak bunga matahari akan menyebabkan bias pada hasil penelitian, karena minyak bunga matahari mengandung flavonoid yang berfungsi sebagai antiradikal bebas. Untuk mendapatkan hasil yang diharapkan maka dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Kulit udang kering yang telah dihaluskan dicampur dengan etanol 70% dengan perbandingan 1 : 10 (b/v), yaitu 100 gram kulit udang dan 1000 ml etanol yang dilakukan di dalam toples.



Maserasi dilakukan selama 3 hari pada suhu kamar. Sisa kulit udang dipisahkan dengan ekstrak yang diperoleh dengan menggunakan kertas saring untuk menghilangkan ampas kulit udang yang masih tersisa. Pelarut dihilangkan dengan *rotary evaporator* dan oven pada suhu 40°C hingga menjadi sediaan pasta.

Hasil uji kuantitatif dengan rumus Kelley-Harmon (1972) [5], dihasilkan rata-rata kandungan Astaxanthin sebesar = 0,700 µg astaxanthin / 1 gram berat ekstrak. Hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan penggunaan pelarut minyak bunga matahari.

Hasil Uji Terpenoid

Ekstrak kasar kulit udang diambil 0,3 gram untuk pengujian terpenoid. Tujuannya adalah untuk melihat secara kualitatif ekstrak kulit udang apakah terdapat senyawa terpenoid, hal ini karena Astaxanthin merupakan karotenoid yang termasuk dalam jenis xantofil dan termasuk dalam golongan terpenoid (tetraterpenoid) yang dibentuk dari delapan unit isopren dan jumlah atom C40. Ketiga hasil ekstraksi kulit udang yang diberikan kloroform dan asam sulfat pekat membentuk dua lapisan, dan warna coklat kemerahan yang menunjukkan hasil positif adanya terpenoid.

Hasil Uji Kualitatif Ekstrak

Uji pendahuluan pemisahan menggunakan KLT untuk mengidentifikasi senyawa yang terdapat pada ekstrak dan untuk mengetahui mendapatkan fase gerak yang baik untuk pemisahan digunakan pelarut Aseton : Heksana (1 : 3) dan Metanol : Kloroform (1 : 1), namun hasilnya tidak menunjukkan pemisahan yang baik. Hasil ini dapat disebabkan dikarenakan perbedaan polaritas dari pelarut dan sampel. Aseton memiliki polaritas yang lebih kecil dibandingkan Metanol. Heksana memiliki polaritas yang lebih kecil dibandingkan Kloroform. Sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin bersifat non – polar, maka pemisahan akan lebih baik. Pemisahan lebih baik dikarenakan KLT menggunakan prinsip ikatan polar, sehingga sampel dengan sifat polar akan lebih mudah terikat pelarut yang bersifat polar, demikian juga untuk sampel yang bersifat non – polar, akan lebih mudah terikat dengan pelarut yang non – polar. Dalam penelitian ini, Astaxanthin bersifat non– polar, sehingga akan lebih mudah larut dengan pelarut yang bersifat non – polar. Uji berikutnya adalah menggunakan 3 komposisi yaitu benzene : etil asetat (1:1), aseton : heksana (3:7) dan etil asetat : heksana (2,5 : 1), namun tidak menunjukkan adanya pemisahan.

Tidak adanya pemisahan pada identifikasi KLT kemungkinan karena fase gerak yang digunakan dan perbandingan komposisi yang belum tepat untuk memisahkan senyawa pada ekstrak kulit udang.

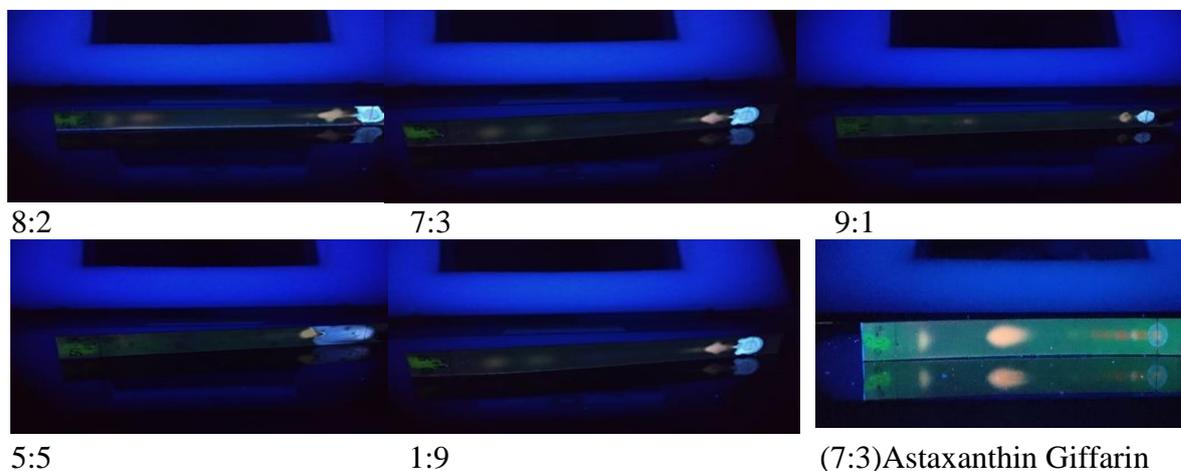
Penelitian lebih lanjut dilakukan dengan perbandingan fase gerak yang lebih banyak seperti yang pada Tabel (1)

Tabel 1. Hasil identifikasi pemisahan dengan berbagai variasi pelarut

Komposisi Fase Gerak	Hasil Identifikasi		Keterangan
	anisaldehide	ninhidrin	
fase gerak acetone : heksana dengan perbandingan (9:1,8:2,7:3,6:4,5:5,1:9,2:8,3:7,4:6,5:5).	6:4, 9:1, 8:2, 5:5, 7:3, 4:6	-	Ditemukan noda astaxantin
Fase gerak petroleum eter : etanol (9:1,8:2,7:3,6:4,5:5,1:9,2:8,3:7,4:6,5:5)	8:2, 7:3, 9:1, 5:5, dan 1: 9	-	Ditemukan noda astaxantin

Hasil lempeng KLT menunjukkan senyawa yang bergerak naik dan adanya pemisahan terlihat pada perbandingan 6:4, 9:1, 8:2, 5:5, 7:3, 4:6. namun hasil tersebut belum dapat dipastikan sebagai senyawa astaxanthin karena pewarna yang digunakan adalah ninhidrin yang digunakan untuk identifikasi senyawa asam amino, amina dan pada alkaloid. Oleh karena itu spot yang terbentuk adalah alkaloid atau asam amino atau amina.

Hasil KLT menunjukkan bahwa fase gerak yang digunakan sudah cukup baik dalam memisahkan senyawa pada ekstrak kasar kulit udang, hasil ini dimungkinkan karena perbandingan pelarut yang digunakan antara petroleum eter (non-polar) dan etanol (polar) mampu untuk mendorong senyawa untuk naik serta memisahkan senyawa yang ada pada ekstrak. Hasil KLT dengan pewarna anisaldehyd (Gambar 1) dapat mendeteksi banyak senyawa yang terdapat pada ekstrak kulit udang yaitu terpenoid, fenol, dan juga steroid.



Gambar 1. KLT dengan fase gerak petroleum eter : etanol dan pewarnaan anisaldehyde

Hasil tersebut kemudian dihitung nilai Rf, untuk dibandingkan dengan nilai Rf standar astaxanthin (Giffarine Astaxanthin) dan berdasarkan referensi. Menurut Kobayashi dan Sakamoto (1999) [5], nilai Rf Astaxanthin diester berkisar 0,75-0,85, sedangkan Astaxanthin monoester adalah 0,60, sedangkan menurut Lorenz (1998) [6] Astaxanthin diester mempunyai nilai Rf 0,75, Astaxanthin monoester 0,50, sedangkan Astaxanthin bebas memiliki nilai Rf 0,33.

Tabel 2. Nilai Rf hasil KLT ekstrak kasar kulit udang vaname.

Perbandingan	Nilai Rf
9 : 1	0,56; 0,68 dan 0,93
8 : 2	0,43; 0,56; 0,75; 0,85 dan 0,93
7 : 3	0,75; 0,80 dan 0,93
6 : 4	0,31; 0,87 dan 0,93
5 : 5	0,37; 0,80 dan 0,93
1 : 9	Tidak ada
2 : 8	Tidak ada
3 : 7	0,93
4 : 6	0,31; 0,87 dan 0,93
5 : 5	0,25; 0,31, 0,50; 0,87 dan 0,93

Berdasarkan pada hasil pengukuran Rf sampel ekstrak kulit udang Vaname maka dihasilkan spot pada KLT yang mendekati nilai Rf berdasarkan pustaka yaitu 0,75-0,85 yang merupakan Astaxanthin diester, 0,50-0,56 merupakan Astaxanthin monoester dan 0,31 merupakan Astaxanthin bebas.

Fraksinasi Ekstrak Etanol Kulit Udang Vaname Menggunakan Kolom Kromatografi



Kolom kromatografi dilakukan untuk memisahkan Astaxanthin dari senyawa-senyawa lain yang terdapat pada ekstrak kulit udang Vaname. Pada penelitian ini kolom kromatografi menggunakan fase diam *silica gel* sedangkan fase gerak yang digunakan adalah petroleum eter : etanol sesuai uji KLT yaitu perbandingan 9 : 1 dan 8 : 2 .

Hasil fraksinasi pada kolom kromatografi dengan perbandingan 9:1 diperoleh 4 fraksi, sedangkan 8:2 diperoleh 6 fraksi. Perbandingan dengan hasil fraksi terbanyak dan dipilih untuk kolom selanjutnya yaitu 8:2. Hasil menunjukkan terdapat 6 fraksi dengan warna jingga hingga warna kuning bening.

Hasil fraksi kemudian diidentifikasi lagi untuk mengetahui fraksi yang mengandung Astaxanthin. Hasil KLT menunjukkan adanya pemisahan Hasil tersebut kemudian dihitung nilai Rfnya untuk dibandingkan dengan nilai Rf standar (Giffarine Astaxanthin) dan nilai Rf berdasarkan pustaka.

Nilai Rf fraksi hasil kolom ketika dibandingkan dengan nilai Rf standar, menunjukkan hasil yang konsisten, yaitu adanya pemisahan nilai Rf pada kisaran 0,5-0,81 yaitu fraksi 6 nilai Rf 0.81 dan fraksi 5 dengan nilai Rf 0.56 dan 0.62 hal ini sesuai dengan Kobayashi dan Sakamoto, (1999) [6] dan Lorenz, (1998) [8], meskipun tidak persis sama nilainya namun masih berada dalam rentang tersebut. Fraksi lainnya memiliki nilai Rf 0,18; 0,25; 0,43, dan 0,93 yang kemungkinan masing-masing merujuk pada nilai Rf 0,25 untuk lutein, 0,40 untuk Canthaxanthin dan 0,99 untuk B-carotene. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa dari hasil KLT terdapat senyawa Astaxanthin, baik Astaxanthin diester maupun monoester terdapat dalam fraksi hasil purifikasi kolom.

Tabel 3. Nilai Rf hasil KLT Dari Fase Gerak Petroleum Eter : Etanol (8:2)

Fraksi Kolom	Nilai Rf
Fraksi 1	Tidak ada
Fraksi 2	Tidak ada
Fraksi 3	0,18 dan 0,25
Fraksi 4	0,18 dan 0,25
Fraksi 5	0,18; 0,25; 0,43; 0,55; 0,62; 0,75; 0,81 dan 0,93

Uji Kuantitatif Astaxanthin Dengan Standar Astaxanthin

Kuantifikasi Astaxanthin kemudian dilakukan kembali dengan menggunakan standar Astaxanthin. Pengukuran dilakukan pada beberapa sampel hasil fraksi, beberapa fraksi menunjukkan adanya kadar Astaxanthin, hasil dari pengukuran adalah seperti pada Tabel 4

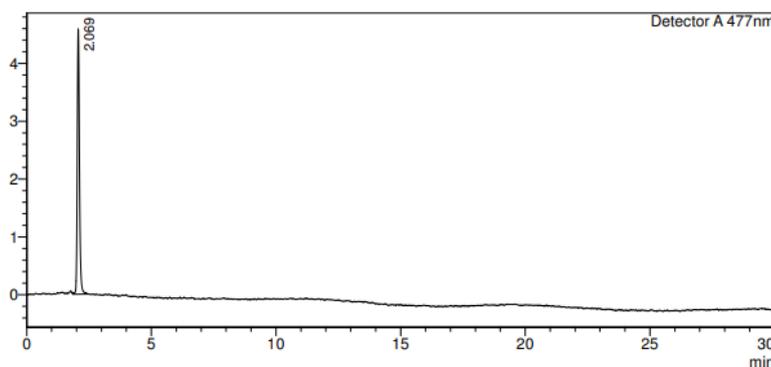
Tabel 4. Hasil spektrofotometer astaxanthin pada ekstrak kasar dan hasil fraksi

No.	Metode ekstraksi	Bentuk	Kandungan Astaxanthin mg/g
01	Bunga matahari dan magnetic strirer	Ektrak kasar	220 mg/g berat serbuk
02	Etanol 70%, maserasi	Ektrak kasar	190 mg/g berat serbuk
03	Hasil Kolom kromatografi eter: etanol (8:2)	Fraksi	220,77 mg/g Fraksi

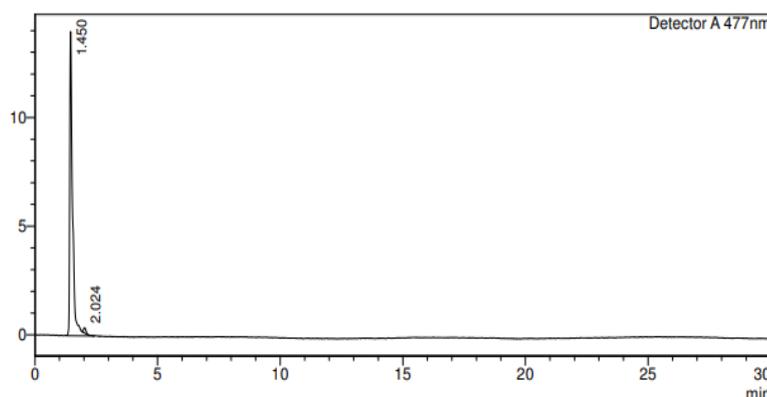
Hasil Tabel 4 merupakan pengukuran dengan standar Astaxanthin murni pada panjang gelombang 477nm, menunjukkan bahwa hasil ekstraksi pada udang Vaname dengan menggunakan minyak bunga matahari memberikan nilai yang lebih tinggi 220 mg/g berat serbuk dibandingkan dengan Etanol 190 mg/g berat serbuk. Hasil pemisahan kolom kromatografi dari ekstrak etanol memberikan hasil Astaxanthin 220,77 mg/g fraksi.

Uji High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Fraksi Astaxanthin

Hasil HPLC untuk astaxanthin standar Sigma-Aldrich hanya terdapat satu peak dengan waktu retensi 2.069 menit yang juga menunjukkan bahwa astaxanthin memiliki waktu retensi 2.069, sedangkan untuk hasil HPLC sampel fraksi terdapat dua peak dengan waktu retensi 1.450 dan 2.024 dan ketika dibandingkan dengan hasil HPLC standar waktu retensi 2.024 menit paling mendekati waktu retensi pada standard. Namun, belum bisa dipastikan apakah senyawa yang memiliki waktu retensi yang mendekati standar merupakan astaxanthin.



Gambar 2. Hasil HPLC Standar astaxanthin dengan waktu retensi (tR) 2.069 dan



Gambar 3. Hasil HPLC fraksi dengan waktu retensi (tR) 1.450 dan 2.024 dan peak area 111180

Berdasarkan hasil HPLC, sampel fraksi masih mengandung senyawa-senyawa yang lain, hal tersebut juga karena proses purifikasi menggunakan kolom kromatografi belum dapat sepenuhnya memurnikan astxanthin dari senyawa-senyawa yang lain, sehingga perlu dilakukan proses lebih lanjut untuk mendapatkan astaxanthin yang lebih murni.

Hasil Uji Fraksi Terhadap Penurunan Neutrofil.

Uji preklinis petroleum eter : etanol (8:2) dilakukan dengan 5 perlakuan yaitu : kontrol positif dengan menggunakan obat anti inflamasi celexocib 18 mg/kgbb, kontrol negatif menggunakan propilen glikol 0,5 mg/kgbb dan ekstrak astaxanthin dengan dosis 50; 100 dan 150 mg/kgbb tikus.

Peradangan atau inflamasi menyebabkan perubahan visual serta rasa panas dan peningkatan kemerahan karena jumlah eritrosit yang melewati daerah tersebut. Peningkatan kadar neutrofil pada apusan darah tepi merupakan salah satu penanda terjadinya suatu inflamasi, jika kadar tersebut berada diatas ambang batas normal (nilai normal neutrofil 12-37%, Masir *et al*, 2012 [9]), oleh karena itu dalam



penelitian ini, untuk mengindikasikan terjadinya inflamasi dilakukan pengamatan penurunan kadar Neutrofil pada jam ke 0, 4 dan 8 setelah perlakuan.

Hasil analisis statistik menunjukkan adanya perbedaan nyata perlakuan 50, 100 dan 150 mg/kgbb pada jam ke 4, sedangkan pada pengamatan jam ke 8 yang menunjukkan perbedaan nyata adalah perlakuan 100 g/kgbb, dibandingkan 50 dan 150 mg/kgbb, namun tidak menunjukkan beda nyata dengan kontrol positif (Tabel 5). Hasil ini menunjukkan kemampuan dari ekstrak 100% tidak berbeda pengaruhnya apabila dibanding dengan kontrol positif (Celexocib). Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi 100% pada jam ke-4 memberikan jumlah neutrofil yang tidak berbeda dengan kontrol positif. Hasil Analisis data terhadap penurunan neutrofil pada 4 jam ke-1 dan ke-2 tidak memberikan hasil yang signifikan pada semua perlakuan pada taraf kepercayaan 95% (Tabel 5). Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak fraksi yang digunakan belum mampu memberikan persentase penurunan neutrofil seperti yang diharapkan. Namun demikian apabila dilihat dari penurunan neutrofil yang terjadi pada perlakuan 150 mg/kgbb, menunjukkan hasil bahwa peradangan berlanjut sampai jam ke 4, namun pada jam ke 8 menunjukkan penurunan persentase neutrofil. Penurunan neutrofil ini mengindikasikan adanya proses penyembuhan karena dapat mengurangi adanya inflamasi pada endema tikus yang disebabkan oleh karagenin.

Tabel 5. Penurunan persentase neutrofil tikus pada 4 jam pertama dan kedua setelah Perlakuan

Dosis Perlakuan ekstrak fraksi	Rerata kandungan neutrofil (%) pada pengamatan jam ke			Penurunan neutrofil (%)	
	0	4	8	4 jam pertama	4 jam kedua
50 mg/kgbb	13 ^a	16 ^a	20,25 ^a	3 ^a	4,25 ^a
100 mg/kgbb	25,75 ^a	34 ^b	38,25 ^b	8,25 ^a	4,25 ^a
150 mg/kgbb	17 ^a	24,2 ^{cd}	19 ^a	7,25 ^a	-5,25 ^a
Kontrol (+)	19,75 ^a	22,5 ^{cd}	30,25 ^{ab}	2,75 ^a	7,75 ^a
Kontrol (-)	19,75 ^a	23,2 ^d	28 ^a	3,5 ^a	4,75 ^a

Kontrol (+) Obat Celexocib 18 mg, kontrol negatif (-): Propilen glikol 1 ml

Analisis data digunakan *One Way ANOVA* dilanjutkan dengan *Post Hoc Test LSD (Least Significant Difference)* pada taraf kepercayaan 95%.

Kesimpulan

Berdasarkan pengukuran Astaxanthin menggunakan standar murni Astaxanthin, maka pelarut minyak bunga matahari dengan metode *magnetic stirrer* memberikan hasil yang lebih baik (220 mg/g astaxanthin/ berat ekstrak) dibandingkan dengan metode ekstraksi kulit udang menggunakan metode maserasi dengan etanol 70% yang memberikan rerata hasil = 190 mg/g Astaxanthin /gram berat ekstrak. Hasil fraksinasi pada kolom kromatografi, menggunakan pelarut petroleum eter : etanol (8:2) memberikan pemisahan senyawa yang baik dibandingkan dengan komposisi yang lain. Hasil yang menunjukkan adanya Astaxanthin tinggi adalah fraksi 5 dengan hasil rata-rata 220,77 mg/g fraksi kulit udang Vaname. Hasil uji fraksi terhadap persentase kandungan neutrofil menunjukkan bahwa konsentrasi 100% dapat menyebabkan kandungan neutrofil tidak berbeda nyata dengan kontrol positif pada uji statistik taraf kepercayaan 95%. Hasil uji fraksi terhadap neutrofil tikus, persentase penurunan terbaik pada konsentrasi 150 mg/g bb tikus.

Ucapan Terima Kasih



Terima kasih disampaikan kepada Lembaga Pengabdian Masyarakat dan Fakultas Bioteknologi Universitas Kristen Duta Wacana Yogyakarta yang telah memberikan dukungan dana untuk pelaksanaan penelitian ini.

Daftar Pustaka

- [1] Babu, C. M., Chakrabarti, R., & Sambasivarao, K. R. S. (2008). Enzymatic isolation of carotenoid-protein complex from shrimp head waste and its use as a source of carotenoids. *LWT-Food Science and Technology*, 41(2), 227-235.
- [2] Davinelli S., Nielsen E. M., Scapagnini G. (2018). Astaxanthin in Skin Health, Repair, and Disease: A Comprehensive Review. *Nutrients*, 10:4 522; doi:10.3390/nu10040522.
- [3] Dalei J. and D. Sahoo. (2014). Extraction And Characterization Of Astaxanthin From The Crustacean Shell Waste From Shrimp Processing Industries. *IJPSR*, 2015; Vol. 6(6): 2532-2537.
- [4] Guerin, M., M. E. Huntley, dan M. Olaizola. 2003. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*. 21(5) : 210–216
- [5] Kelley, C.E.; Harmon, A.W, 1972. Method of Determining Carotenoid Contents Of Alaska Pink Shrimp And Representative Values For Several Shrimp Products. *Fish. Bull.*, 11-17.
- [6] Kobayashi, M. and Sakamoto, Y. 1999. Singlet oxygen quenching ability of astaxanthin esters from the green algae *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters*, 21: 265–269
- [7] Kuedo Z., A. Sangsuriyawong, W. Klaypradit, V. Tipmanee, P. Chonpathompikunlert 2016. Effects of Astaxanthin from *Litopenaeus Vannamei* on Carrageenan-Induced Edema and Pain Behavior in Mice. *J. Molecules*. Mar; 21(3): 382. Published online 2016 Mar 19. doi: [10.3390/molecules21030382](https://doi.org/10.3390/molecules21030382)
- [8] Lorenz T. R., 1998. Thin Layer Chromatography (TLC) System For Natu Rose Carotenoids. *Technol. Bulletin* 003: 1-3
- [9] Masir O., Menkher M., Andani E.P., Salmiah A. 2012. Pengaruh Cairan Kultur Filtrate Fibroblast (CFF) Terhadap Penyembuhan Luka; Penelitian eksperimental pada *Rattus Norvegicus* Galur Wistar. *Jurnal Kesehatan Andalas* DOI: [10.25077/jka.v1i3.78](https://doi.org/10.25077/jka.v1i3.78)
- [10] Sachindra, N. M., & Mahendrakar, N. S. (2005). Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. *Bioresource Technology*, 96(10), 1195- 1200
- [11] Stamatios P., Thomais V., Athanasios V. 2013. *Bioactive Natural Substances from Marine Sponges: New Developments and Prospects for Future Pharmaceuticals*. University of Athens, Greece.
- [12] Swastawati F., I. Wijayanti, E. Susanto (2008). Pemanfaatan Limbah Kulit Udang Menjadi Edible Coating untuk Mengurangi Pencemaran Lingkungan. puslit2.petra.ac.id/ejournal/index.php/jtl/article/viewFile/17554/17469.4:101-106