

Isolasi Senyawa β -Karoten dari Minyak Kelapa Sawit Mentah (*Elaeis guineensis* Jacq.) dengan Metode Kromatografi Kolom Terbuka *Isolation of β -Carotene Compounds from Crude Palm Oil (*Elaeis guineensis* Jacq.) Using Open Column Chromatography Method*

Hendra Wijaya^a, Ning Ima Arie Wardayanie^a, Rizki Maryam Astuti^b
dan Rahmad Arif Lahiya^b

^aBalai Besar Industri Agro (BBIA)
Jl. Ir. H. Juanda No. 11, Bogor 16122

^b Universitas Bakrie
Jl. H.R.Rasuna Said Kav. C-22, Jakarta 12940

faizawijaya@gmail.com

Riwayat Naskah:

Diterima 07, 2018
Direvisi 11, 2018
Disetujui 12, 2018

ABSTRAK: Minyak kelapa sawit mentah dapat dijadikan sebagai sumber β -karoten karena jumlahnya yang melimpah dan tingginya kadar β -karoten. Penelitian ini bertujuan mengisolasi β -karoten minyak sawit mentah (*Elaeis guineensis* Jacq.) dengan metode kromatografi kolom terbuka. Ekstraksi total karotenoid dilakukan dengan metode transesterifikasi-adsorpsi-desorpsi dan metode saponifikasi. Variabel yang diteliti pada metode transesterifikasi-adsorpsi-desorpsi adalah perbandingan kaolin terhadap metal ester-nya yaitu rasio 1:2, 1:3, 1:4 sedangkan variabel pada metode saponifikasi adalah waktu saponifikasi 0, 30 menit dan 60 menit. Hasil ekstrak total karotenoid dari metode yang terbaik dilanjutkan isolasi dengan kromatografi kolom terbuka. Hasil ekstrak dan isolat dikarakterisasi dengan kromatografi lapis tipis, spektrofotometer UV-VIS dan HPLC. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode ekstraksi saponifikasi pada suhu 56 °C selama 60 menit menghasilkan *recovery* β -karoten paling tinggi yaitu sebesar 80.90% dan berbeda secara statistik dengan perlakuan lainnya. Isolasi β -karoten dengan kromatografi kolom terbuka dilakukan dengan eluen heksana, aseton, etil asetat dan metanol (27:4:2:2), isolat yang dihasilkan memiliki Rf yang sama dengan standar dan absorbansi maksimum pada panjang gelombang yang berdekatan dengan standar. Konsentrasi β -karoten yang diperoleh adalah 178.43 \pm 20.37 ppm dengan % *recovery* 78.09%.

Kata kunci: Minyak sawit mentah, β -karoten, kolom kromatografi terbuka

ABSTRACT: Crude palm oil is a source of β -carotene because of its abundant amount and high levels of β -carotene. The aim of this study is to isolate β -carotene from crude palm oil (*Elaeis guineensis* Jacq.) using open column chromatography (OCC). Total carotenoid extraction is carried out using two methods, namely transesterification-adsorption-desorption method and saponification method. The treatments were the ratio of kaolin to the methyl ester, which is 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4 for transesterification-adsorption-desorption method, and saponification time of 0, 30 and 60 minutes for saponification method. Total carotenoid extract from the best method was isolated using OCC. The Extract and isolate were characterized by thin layer chromatography, UV-VIS spectrophotometer and HPLC. The result showed that saponification method at 56 °C for 60 minutes gave the highest β -carotene recovery at 80.90% and it is significantly different from other treatments. Isolation of β -carotene by OCC was carried out using hexane, acetone, ethyl acetate and methanol eluent (27: 4: 2: 2), The isolation product had Rf value similar to β -carotene standard and its maximum absorbance close to the standard wavelength. The β -carotene concentration obtained was 178.43 \pm 20.37 ppm with recovery percentage of 78.09%.

Keywords: *Crude palm oil, β -carotene, open column chromatography*

1. Pendahuluan

Karotenoid merupakan senyawa pigmen yang terbentuk secara alami pada tanaman algae dan bakteri fotosintesis. Manusia dan hewan tidak dapat mensintesis karotenoid (Eggersdorfer & Wyss, 2018). Terdapat lebih dari 700 karotenoid telah ditemukan termasuk β -karoten, α -karoten, β -*cryptoxanthin*, lutein dan *zeaxanthin* yang banyak terdapat dalam buah-buahan berwarna kuning dan jingga, sayuran hijau serta biji-bijian. Karotenoid memiliki dampak yang positif untuk kesehatan manusia diantaranya sebagai sumber vitamin A (fungsi pro-vitamin A) untuk kesehatan mata, pertumbuhan dan perkembangan embrio (Mba *et al.*, 2015), antioksidan (Zeb & Murkovic, 2010; Gunstone, 2011) serta memperbaiki respon imun dan penetralan radikal bebas yang berpotensi mengakibatkan penyakit kanker (Eldahshan & Singab, 2013).

Senyawa karotenoid digunakan dalam industri farmasi, kosmetik dan sebagai ingredient untuk pangan fungsional kaitannya dengan sifat antioksidan, dampak bagi kesehatan serta kemampuan sebagai pewarna pangan (Enriquez *et al.*, 2013). Berbagai fungsi ini mendorong industri untuk memproduksi senyawa karotenoid secara komersial dengan berbagai metode baik secara sintesis kimia, fermentasi dan isolasi dari bahan alam (Jaswir, 2011).

Produksi senyawa karotenoid sintetik umumnya dilakukan atas pertimbangan keterbatasanediaan bahan alami dan alasan ekonomi (Liu, 2012). Umumnya β -karoten diperoleh melalui sintesis kimiawi dari β -ionone dan secara teori tidak mengakibatkan masalah tertentu karena secara struktur sama dengan karotenoid yang ada di alam serta tidak berbeda secara signifikan tingkat penyerapannya dalam tubuh manusia (Liu, 2012). Namun dikarenakan meningkatnya kesadaran dan gaya hidup konsumen yang menuntut segala sesuatu harus serba alamiah, mendorong perlu diadakannya penelitian lebih lanjut mengenai kemungkinan-kemungkinan metode yang lebih optimal untuk mengekstraksi senyawa karotenoid dari bahan alam. Fakta lainnya adalah senyawa karotenoid yang umum digunakan saat ini merupakan produk impor yang seharusnya bisa menjadi peluang jika dikaitkan dengan potensi alam di Indonesia.

Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi β -karoten dari kelapa sawit mentah (*crude palm oil*). Alasan pemilihan bahan baku tersebut dikarenakan kandungan β -karoten dalam minyak kelapa sawit mentah serta tingginya jumlah produksi minyak kelapa sawit mentah di Indonesia. Angka produksi kelapa sawit di Indonesia mencapai 29.278.189 ton pada tahun 2014 dan proyeksi peningkatan

mencapai 32.284.306 ton pada tahun 2015 (BPS, 2015). Selain itu, pemilihan minyak kelapa sawit mentah sebagai bahan baku isolasi adalah karena kandungan β -karoten yang jauh lebih tinggi daripada tomat dan wortel yang sudah populer kandungan karotenoidnya (Schweiggert *et al.*, 2014). Kandungan karotenoid pada minyak kelapa sawit mentah berkisar pada 500 – 700 ppm dengan proporsi α -karoten dan β -karoten masing-masing 36,2% dan 54,4% (Sundram *et al.*, 2003, Ng *et al.*, 2012, Zou *et al.*, 2012).

Jumlah kandungan karotenoid yang tinggi serta melimpahnya bahan baku menjadi faktor pendorong dilakukannya sejumlah penelitian untuk menganalisis serta mengisolasi senyawa karotenoid dari minyak sawit. Metode isolasi karotenoid yang telah berhasil dilakukan antara lain ekstraksi dengan saponifikasi, adsorpsi-desorpsi, presipitasi, ekstraksi pelarut selektif, distilasi molekuler, transesterifikasi serta kombinasi metode-metode tersebut (Othman *et al.*, 2010; Damayanti *et al.*, 2014).

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa β -karoten melalui metode transesterifikasi-adsorpsi-desorpsi dan ekstraksi-saponifikasi dari minyak kelapa sawit mentah. Dua metode ekstraksi ini bertujuan untuk mengekstrak total karotenoid dalam minyak kelapa sawit mentah. Metode transesterifikasi-adsorpsi-desorpsi menggabungkan proses transesterifikasi dengan proses adsorpsi menggunakan kaolin dan desorpsi. Penggabungan cara ini diharapkan menghasilkan rendemen dan kemurnian karotenoid yang lebih baik. Metode ekstraksi-saponifikasi menggunakan pelarut HAET yang telah digunakan pada analisis total karotenoid dalam minyak buah merah. Penggunaan pelarut HAET bertujuan untuk mengekstrak total karotenoid lebih banyak.

Penelitian ini akan membandingkan dua metode ekstraksi total karotenoid.

Hasil konsentrat karotenoid dari kondisi ekstraksi optimum terpilih kemudian diisolasi dengan menggunakan kolom kromatografi terbuka serta dikarakterisasi dengan kromatografi lapis tipis dan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi alternatif metode isolasi karotenoid dari minyak sawit mentah untuk menghasilkan produk isolat β -karoten yang berasal dari bahan alam, terjangkau serta dapat mengurangi ketergantungan pada senyawa karoten impor. Isolat β -karoten yang dihasilkan dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan alternatif sumber sediaan β -karoten sebagai BTP pewarna alami (INS. 160a(ii)) sebagaimana tercantum dalam Permenkes No. 33 tahun 2012. Selain itu, dengan penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi dalam hal

penguatan dan peningkatan daya saing industri kelapa sawit di Indonesia kaitannya dengan pengembangan teknologi hilir untuk memperoleh produk-produk dengan nilai tambah tinggi.

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah minyak kelapa sawit dari PT. Nutri Palma Nabati (Bogor, Indonesia); heksana, etanol, etil asetat, asetonitril, aseton, toluen, kloroform, petroleum eter, natrium hidroksida, lempeng KLT (gel silika G 60 F 254 Merck), potasium hidroksida, gel silika (Wako), *sea sand*, senyawa standar β -karoten (Sigma-Aldrich), standar α -karoten (Wako), standar β -cryptoxanthin (Extrasynthese), *anhydrous* natrium sulfat dan akuades.

2.2. Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah set alat kromatografi kolom terbuka, set alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Waters®, kolom C-18), set alat refluks (labu dasar bulat 100 ml, heat mantel, tabung refluks), termometer, *chamber* KLT, corong pisah 500 ml, spektrofotometer UV-VIS (Varian®), buret, sonikator, *water bath*, timbangan analitik, pipet volumetrik, desikator, oven pengering, wadah porselen, mikropipet, *magnetic stirrer*, *rotary evaporator*, kertas saring (Whatmann® No. 40), gelas ukur, botol amber, erlenmeyer, labu volumetrik dan gelas kimia.

2.3. Metode

2.3.1. Karakterisasi bahan baku

Karakterisasi minyak sawit mentah meliputi penentuan kadar air, analisis total karotenoid dan kadar β -karoten. Tahapan ini bertujuan untuk mengetahui sifat dan kelayakan minyak sawit mentah (*crude palm oil*) untuk digunakan sebagai bahan baku isolasi senyawa β -karoten.

2.3.2. Ekstraksi dengan metode transesterifikasi-adsorpsi-desorpsi (Damayanti et al., 2014)

Sampel minyak kelapa sawit mentah ditimbang sebanyak 50 g dan dimasukkan ke dalam labu dasar bulat 250 ml bersamaan dengan 0,25 g H_2SO_4 dalam 9,45 g metanol, diaduk pada kecepatan 300 rpm dan dipanaskan pada suhu 60 °C selama 1 jam. Kemudian ke dalam labu tersebut ditambahkan 0.5 g NaOH dalam 9,45 g metanol, diaduk pada kecepatan 300 rpm dan dipanaskan pada suhu 60°C selama 1 jam. Hasil larutan tersebut kemudian

dimasukkan ke sentrifugasi (1500 rpm, 30 menit) untuk memisahkan fraksi metanol, metil ester kasar dan fase polar hasil reaksi transesterifikasi. Akuades kemudian ditambahkan untuk memisahkan fasa polar dan metil ester kasar. Metil ester kasar yang sudah dicuci kemudian dicuci kembali dengan akuades untuk menghilangkan fasa polar yang masih tersisa serta mengatur pH menjadi netral akibat pengaruh katalis pada transesterifikasi.

Metil ester kasar kemudian ditambahkan dengan adsorben kaolin masing-masing dengan perbandingan berat kaolin : metil ester kasar sebesar 1:2, 1:3 dan 1:4. Campuran adsorben kaolin dan metil ester kasar diaduk dengan pengaduk magnetis pada kecepatan 200-300 rpm selama 60 menit pada suhu 60 °C. Hasil pengadukan campuran adsorben dan metil ester kasar disaring menggunakan kertas saring (Whatmann® No. 40) dengan bantuan pompa vakum. Filtrat yang lolos melalui kertas saring dilakukan penyaringan ulang dengan kertas saring hingga filtrat berwarna jernih. Residu yang tertinggal pada kertas saring kemudian dikumpulkan dan didesorpsi menggunakan pelarut heksana dengan metode maserasi selama 24 jam dengan bantuan pengadukan.

Hasil maserasi proses desorpsi kemudian didekantasi, dipindahkan pada labu dasar bulat dan diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu 35 °C kondisi vakum. Residu pada labu dasar bulat kemudian dilarutkan kembali dengan 5 ml heksana sehingga menjadi konsentrat untuk kemudian disimpan dalam botol amber gelap. Perhitungan konsentrasi karotenoid dihitung berdasarkan metode analisis total karotenoid.

2.3.3. Ekstraksi dengan metode ekstraksi-saponifikasi (Parker, 1992)

Sampel minyak kelapa sawit mentah ditimbang 10 g dalam ke labu takar gelap 100 ml menggunakan timbangan analitik. Masing-masing sampel ditambahkan dengan 30 ml campuran pelarut HAET (heksana, aseton, etanol dan toluen dengan perbandingan 10:7:6:7), disonikasi selama 2 menit, ditambahkan pelarut hingga batas tera pada labu takar tepat 100 ml kemudian dikocok hingga homogen. Tahapan selanjutnya adalah saponifikasi dengan cara 10 ml larutan diambil dan dipindahkan ke labu takar gelap yang sudah berisi 20 ml pelarut HAET, 1 ml air, 4 ml KOH dalam metanol (40% w/v) dan dimasukkan ke dalam penangas air pada suhu 56 °C dengan variasi waktu reaksi 0 menit, 30 menit dan 60 menit.

Hasil saponifikasi kemudian dipindahkan ke dalam corong pisah gelap dan ditambahkan 40 ml pelarut HAET, 40 ml Na_2SO_4 anhidrat (3% w/v) dan 50 ml akuades, dikocok dan didiamkan hingga

terpisah menjadi dua fasa, fase terbawah diambil. Pengulangan dilakukan dengan cara menambahkan 50 ml akuades pada corong pisah, dikocok kemudian dipisahkan. Fasa teratas dikumpulkan pada labu dasar bulat untuk dievaporasi dengan rotary evaporator pada suhu 35 °C kondisi vakum. Residu pada labu dasar bulat dilarutkan dengan etanol absolut sebanyak 5 ml. Perhitungan konsentrasi karotenoid dihitung berdasarkan metode analisis total karotenoid.

2.3.4. Analisis hasil ekstraksi dengan kromatografi lapis tipis (Zeb & Murkovic, 2010)

Konsentrat yang dihasilkan dari proses ekstraksi diuji menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). KLT yang digunakan adalah KLT fase normal, yaitu fase diam bersifat polar dan eluen yang digunakan bersifat non-polar. Adsorbent yang digunakan adalah gel silika (G 60 F 254 Mercks®) dan eluen yang digunakan adalah campuran pelarut organik seperti pada Tabel 1.

Tabel 1

Kombinasi pelarut organik yang digunakan sebagai eluen pada analisis menggunakan KLT

Eluen	Komposisi pelarut	Perbandingan volume	Referensi
1	Petroleum eter : aseton : heksana	2 : 1 : 1	Zeb & Murkovic, 2010
2	Heksana : Aseton	7 : 3	Rao <i>et al.</i> , 2007
3	Kloroform : Heksana : Metanol	20 : 70 : 5	Vagueresse <i>et al.</i> , 1991
4	Heksana : aseton : etil asetat : methanol	27 : 4 : 2 : 2	Ren & Zhang, 2008
5	Kloroform : heksana	6 : 4	Damayanti <i>et al.</i> , 2014

Sejumlah kecil konsentrat (0.05-0.1 μ l) ditotolkan pada fase diam gel silika secara perlahan dan berulang. Hal yang sama dilakukan pada standar senyawa α -karoten, β -karoten dan β -kriptosantin. Kombinasi campuran pelarut (sebagai eluen) dimasukkan ke dalam chamber KLT untuk dijenuhkan selama 60 – 120 menit. Setelah fase gerak jenuh, fase diam yang telah dibubuhkan contoh konsentrat dan senyawa standar dimasukkan ke dalam chamber KLT, didiamkan hingga fase gerak mencapai batas atas yang telah ditentukan. Nilai Rf senyawa standar dibandingkan dengan nilai Rf contoh konsentrat.

2.3.5. Pemisahan fraksi dengan kromatografi kolom terbuka (Damayanti *et al.*, 2014 dengan modifikasi)

Penggunaan fase diam dan teknik kromatografi kolom didasarkan pada penelitian isolasi beta karoten yang dilakukan oleh Damayanti *et al* (2014) dengan modifikasi pada jumlah volume

konsentrat yang dimasukkan ke dalam kolom. Fase diam gel silika (Wakosil® C-200, ukuran partikel 64-210 μ m) dimasukkan kedalam kolom kromatografi (Pyrex®, panjang kolom 300 mm, diameter 24,5 mm). Sebanyak 250 μ l dari konsentrat hasil ekstraksi paling optimum dipipet ke dalam kolom dengan fase diam gel silika dan fase gerak pelarut optimum hasil uji coba pada analisis KLT. Keran kolom dibuka dan kecepatan alir diatur sehingga konsisten pada kecepatan 1 ml/menit. Kecepatan aliran fraksi perlu diatur untuk menyeragamkan kepadatan gel silika di dalam kolom yang dipengaruhi oleh dimensi ukuran, partikel gel silika, dimensi kolom, viskositas cairan dan tekanan yang dipakai untuk mengalirkan zat pelarut. Eluat hasil kromatografi dikumpulkan dalam wadah botol amber gelap setiap 3 menit. Hasil eluat tersebut diukur absorbansi maksimumnya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada rentang panjang gelombang 350 – 800 nm. Eluat digabung menjadi kelompok berdasarkan kesamaan nilai absorbansi.

2.3.6. Karakterisasi dan kuantifikasi fraksi mengandung β -karoten (Karnjanawipagul, 2010; Zeb & Murkovic, 2010)

Masing-masing kelompok eluat yang telah dikumpulkan dikarakterisasi melalui KLT dengan cara membandingkan nilai Rf yang didapat dengan senyawa standar. Fase diam yang digunakan adalah gel silika (G-60 F 254 Mercks®). Fraksi yang telah dikumpulkan dikarakterisasi dengan cara diukur panjang gelombang maksimumnya menggunakan spektrofotometer UV-VIS.

Tabel 2.

Rancangan acak lengkap modifikasi faktor tahapan ekstraksi minyak kelapa sawit mentah

Ulangan	Perlakuan*					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	A ₁₁	A ₁₂	A ₁₃	A ₁₄	A ₁₅	A ₁₆
2	A ₂₁	A ₂₂	A ₂₃	A ₂₄	A ₂₅	A ₂₆
3	A ₃₁	A ₃₂	A ₃₃	A ₃₄	A ₃₅	A ₃₆

*) P1,P2,P3 adalah perlakuan waktu reaksi metode ekstraksi-saponifikasi (P1=0 menit, P2=30 menit, P3=60 menit) dan P4,P5,P6 adalah perlakuan rasio metil ester kasar:adsorben (P4=2:1, P5=3:1, P6=4:1)

Konsentrasi kelompok eluat yang mengandung senyawa β -karoten dihitung dengan instrumen spektrofotometer UV-VIS berdasarkan perhitungan dari rumus regresi standar β -karoten pada konsentrasi 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 2,0, 3,0, 4,0 dan 5,0 ppm. Persentase *recovery* perolehan β -karoten dihitung dengan cara membandingkan konsentrasi β -karoten senyawa setelah diisolasi dengan konsentrasi β -karoten bahan baku sebelum diekstraksi dan diisolasi. Persentase *recovery* dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\%recovery = \frac{\text{beta karoten hasil isolasi}}{\text{beta karoten bahan baku}} \times 100\%$$

2.3.7. Analisis data

Analisis statistik digunakan untuk menentukan metode ekstraksi terbaik dari modifikasi perlakuan pada metode transesterifikasi-adsorpsi-desorpsi dan ekstraksi-saponifikasi. Dalam penelitian ini digunakan metode rancangan acak lengkap (RAL) dengan faktor modifikasi tahapan ekstraksi dari minyak sawit dan respon analisis total karotenoid. Hasil penelitian diolah secara statistik dengan menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA), yang dilanjutkan dengan uji Duncan pada taraf signifikansi 5% apabila hasil yang diperoleh berbeda nyata antar sampel dengan menggunakan software SPSS 22.0. Tabel 2 menunjukkan rancangan acak lengkap untuk modifikasi faktor tahapan ekstraksi minyak kelapa sawit mentah.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Karakterisasi bahan baku

Karakterisasi bahan baku merupakan tahap penelitian awal yang bertujuan untuk mengetahui sifat serta kelayakan minyak sawit mentah (*crude palm oil*) untuk digunakan sebagai bahan baku isolasi senyawa β -karoten. Tahapan penentuan sifat dan kelayakan bahan baku diketahui melalui parameter kadar air, total karotenoid dan kandungan senyawa β -karoten yang dinilai sebagai parameter yang dapat mempengaruhi keberhasilan tahapan isolasi β -karoten. Tabel 3 menunjukkan hasil analisis karakteristik bahan baku minyak sawit mentah.

Tabel 3.
 Hasil Analisis Karakteristik Bahan Baku Minyak Sawit Mentah

Parameter uji	Hasil analisis
Kadar air*	0.02 ± 0.00 %
Total karotenoid**	627.75 ± 30.30 $\mu\text{g/g}$
Kandungan β -karoten*	228.50 ± 7.78 $\mu\text{g/g}$

Ket : *) jumlah pengulangan = 2; **) jumlah pengulangan = 3

Kadar air bahan baku minyak sawit mentah yang digunakan masih sesuai dengan persyaratan yang ditetapkan dalam SNI 01-2901-2006 dengan persyaratan kadar air maksimum 0.5 %. Semakin tinggi kadar air minyak sawit mentah maka akan semakin rendah mutunya. Hasil perhitungan total karotenoid yang didapat adalah sebesar 627,75 $\mu\text{g/g}$ sebagaimana data literatur komponen karotenoid pada minyak sawit mentah yang berada pada kisaran 500 – 700 ppm (Sundram *et al.*, 2003).

Karotenoid termasuk dalam 1% komponen minor yang terkandung dalam minyak sawit mentah selain komponen mayor seperti trigliserida, gliserol dan asam lemak. Komponen minor pada minyak sawit mentah terdiri dari komponen senyawa karotenoid, tokoferol, tokotrienol, sterol-sterol, fosfolipid, glikolipid, terpen dan gugus alifatik, serta elemen sisa (*trace element*) lainnya. Komponen terbesar karotenoid dalam minyak sawit mentah adalah β -karoten dan α -karoten (Sundram *et al.*, 2003). Berdasarkan Tabel 3, terdapat 36.40 % senyawa β -karoten dari keseluruhan total karotenoid pada contoh minyak sawit. Hasil analisis kandungan β -karoten yang didapat menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah sebesar 228.50 ± 7.78 $\mu\text{g/g}$.

3.2. Perlakuan terbaik tahapan ekstraksi karotenoid

Perlakuan ekstraksi yang dilakukan terbagi dalam dua kelompok yaitu kelompok pertama melalui metode transesterifikasi-adsorpsi-desorpsi dengan variabel rasio penggunaan adsorben kaolin dan fase metil ester kasar (hasil transesterifikasi). Kelompok kedua melalui metode ekstraksi-saponifikasi dengan variabel waktu reaksi saponifikasi. Gambar 1 menunjukkan perbandingan tingkat konsentrasi karotenoid hasil dua metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini. Perlakuan 1, 2 dan 3 pada Gambar 1 merupakan metode ekstraksi transesterifikasi-adsorpsi-desorpsi.

untuk mengubah trigliserida menjadi metil ester. Senyawa karotenoid lebih mudah larut dalam metil ester dibandingkan pada trigliserida (Damayanti *et al.*, 2014). Transesterifikasi yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan minyak sawit mentah ditambahkan dengan metanol dengan perbandingan mol 1:10. Secara stokiometri reaksi metanolisis hanya memerlukan tiga mol metanol untuk satu mol trigliserida. Pemakaian metanol dalam jumlah berlebih diharapkan mendorong reaksi bergeser ke kanan sehingga menghasilkan rendemen metil ester yang tinggi (Widayanto, 2007). Metanol dipilih sebagai pereaksi karena telah banyak studi yang menunjukkan metanol lebih unggul dalam menghasilkan rendemen metil ester dibanding jika menggunakan pereaksi alkohol lain seperti etanol (Ali & Isis, 2013). Selain itu berdasarkan EU Directive No. 231/2012 untuk produk bahan tambahan pangan terutama E 160 a (ii) *plant carotene*, dinyatakan bahwa metanol adalah salah satu jenis pelarut yang dapat digunakan untuk ekstraksi, disamping pelarut lainnya seperti aseton, metil etil keton, etanol, propan-2-ol, heksan dan diklorometan (EU Regulation 231, E.C, 2012). Metanol yang digunakan adalah metanol absolut dikarenakan

penggunaan metanol lebih rendah dari 98% dapat menurunkan rendemen metil ester dan memperpanjang waktu reaksi (Zulkipli, 2007).

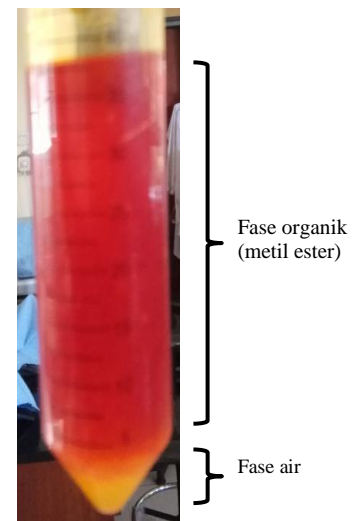
Kondisi proses transesterifikasi optimum adalah pada suhu 60 °C, waktu proses 1-2 jam yang diikuti dengan pengadukan dan reaksi dibantu oleh katalis basa 1% (w/w) terlarut dalam metanol (Damayanti *et al.*, 2014; Widayanto, 2007). Semakin tinggi suhu reaksi yang digunakan akan menghasilkan lebih banyak metil ester akibat peningkatan kontak (tumbukan) dengan orientasi yang tepat disertai dengan energi yang cukup (melebihi energi aktivasi reaksi). Namun, dalam penelitian yang dilakukan pembatasan suhu reaksi di kisaran 60 °C dikarenakan pada suhu tersebut telah dicapai titik didih metanol. Penggunaan suhu yang tepat diharapkan dapat mengoptimalkan reaksi pembentukan metil ester namun masih dalam kisaran suhu yang tidak mengganggu stabilitas karotenoid yang dapat berkurang hingga 5% pada suhu 70 °C (Fratianni *et al.*, 2010).

Hasil transesterifikasi kemudian dicuci dengan air (secara berulang) yang bertujuan untuk mempermudah pemisahan fase organik, melarutkan fase-fase polar yang terlarut dalam air dan mengatur pH pada rentang netral setelah penggunaan katalis dalam reaksi. Pemisahan fase organik dilakukan menggunakan bantuan *sentrifuge* pada kecepatan 1250 rpm selama 5 menit (Sulaswatty, 1998). Lapisan atas yang berwarna merah merupakan fase organik metil ester dengan karotenoid di dalamnya dan lapisan bawah adalah fase air (dapat dilihat pada Gambar 2). Lapisan fase organik metil ester kemudian dicampurkan dengan adsorben kaolin yang mampu menyerap senyawa β -karoten pada suhu optimal yaitu 60 °C (Damayanti *et al.*, 2014). Mekanisme adsorpsi senyawa karotenoid pada permukaan kaolin terjadi karena adanya interaksi hidrofobik dan interaksi elektrostatik antara kaolin dengan senyawa karotenoid (Sastri *et al.*, 1995). Pemilihan kaolin karena jumlahnya melimpah sehingga untuk proses *scale-up* lebih mudah (Damayanti *et al.*, 2014). Hasil campuran kemudian dilanjutkan dengan perlakuan desorpsi melalui tahapan maserasi selama 12 jam. Tahapan maserasi dinilai lebih baik dalam hal perolehan kembali (*recovery*) karotenoid dibandingkan metode soxhlet berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Damayanti *et al.* (2014).

Berdasarkan analisis statistik dapat disimpulkan bahwa semakin banyak penggunaan kaolin akan meningkatkan jumlah karotenoid dalam *crude* hasil ekstraksi. Penggunaan rasio kaolin : fase metil ester dalam ekstraksi transesterifikasi-adsorpsi-desorpsi berpengaruh terhadap konsentrasi karotenoid yang dihasilkan.

Perlakuan 4, 5 dan 6 yang ditampilkan pada Gambar 1 merupakan metode ekstraksi-saponifikasi. Metode ekstraksi dengan pelarut organik umumnya dilakukan untuk memisahkan senyawa karotenoid dari matriks bahan pangan seperti buah dan sayuran. Ekstraksi dengan pelarut organik merupakan perlakuan transfer masa berdasarkan kemampuan kelarutan dan preferensi afinitas karotenoid dan senyawa lainnya dalam minyak sawit terhadap pelarut yang digunakan (Othman *et al.*, 2010). Pelarut yang digunakan adalah kombinasi antara heksana, aseton, etanol dan toluen (pelarut HAET) dengan rasio 10:7:6:7 (v/v).

Setelah dilakukan ekstraksi dengan pelarut organik, contoh minyak sawit mentah kemudian disaponifikasi. Tujuan reaksi saponifikasi adalah untuk memisahkan asam lemak yang terikat dengan karoten. Asam lemak tersebut diharapkan membentuk senyawa sabun dengan basa yang ditambahkan sehingga dapat terlepas dari karoten. Penambahan pelarut HAET bertujuan untuk melarutkan karotenoid dan senyawa hidrofobik lainnya. Senyawa sabun, air dan senyawa hidrofobik lainnya akan terlarut pada air yang ditambahkan. (Widayanto, 2007). Fase organik dan fase air kemudian dipisah menggunakan corong pisah.



Gambar 2. Pemisahan fase organik

Secara statistik waktu reaksi ekstraksi-saponifikasi tidak berpengaruh secara signifikan terhadap konsentrasi karotenoid yang dihasilkan. Namun terdapat kecenderungan peningkatan konsentrasi karotenoid seiring dengan penambahan waktu reaksi. Waktu reaksi yang lebih lama dapat memutus ikatan asam lemak yang membentuk ester dengan senyawa karotenoid karena pada umumnya senyawa karotenoid di alam

dalam bentuk senyawa teresterifikasi (Breithaupt & Bamedi, 2001).

Analisis statistik menunjukkan bahwa perbedaan perlakuan ekstraksi memberikan pengaruh terhadap konsentrasi karotenoid yang dihasilkan. Berdasarkan hasil tersebut maka dilakukan uji statistik lanjutan (uji Duncan) untuk melihat kecenderungan pengelompokan data. Hasil pengelompokan data dapat dilihat pada keterangan huruf diatas diagram batang pada Gambar 1. Perlakuan 6 (ekstraksi-saponifikasi pada waktu reaksi 60 menit) merupakan perlakuan ekstraksi terbaik dengan perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) dengan perlakuan 1 – 4 dan tidak berbeda secara signifikan ($p > 0.05$) dengan perlakuan 5. Pemilihan perlakuan 6 sebagai perlakuan ekstraksi terbaik juga didasarkan pada kecenderungan peningkatan konsentrasi karotenoid yang terekstrak bersamaan dengan peningkatan waktu reaksi. Hasil uji ini menunjukkan bahwa metode ekstraksi-saponifikasi dapat menghasilkan jumlah senyawa karotenoid yang lebih banyak dibandingkan metode transesterifikasi-adsorpsi-desorpsi

Tabel 4.

Recovery kandungan β -karoten hasil ekstraksi terhadap bahan baku

Jenis contoh	Konsentrasi β -karoten ($\mu\text{g per g}$ bahan baku)	% Recovery
Bahan baku	228,48 \pm 7,78	
Hasil ekstraksi-saponifikasi pada suhu 56 °C, 60 menit	184,86 \pm 23,14	80,90

Hasil dari ekstraksi karotenoid dari metode terbaik kemudian dihitung konsentrasi β -karotennya dengan instrumen spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 451 nm menggunakan deret standar senyawa β -karoten. Hasil konsentrasi β -karoten tersebut akan digunakan untuk menghitung % recovery terhadap konsentrasi β -karoten awal pada bahan baku. Berdasarkan Tabel 4, % recovery yang didapat adalah sebesar 80,90 %. Angka tersebut menunjukkan persentase jumlah β -karoten yang dapat terekstrak dari bahan baku. β -karoten yang hilang dari total bahan baku diduga terdegradasi selama tahapan ekstraksi.

3.3. Karakterisasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) pada penelitian ini memiliki dua fungsi utama yaitu sebagai tahapan optimasi pelarut dalam pemisahan senyawa β -karoten dan sebagai tahapan konfirmasi komponen senyawa β -karoten melalui perbandingan nilai R_f dengan senyawa standar. Fase diam yang digunakan adalah gel silika. Senyawa standar yang

digunakan adalah β -karoten, α -karoten dan β -cryptoxanthin. Penggunaan standar-standar tersebut adalah untuk konfirmasi keberadaan senyawa target yang ingin diisolasi, melihat pola pemisahan senyawa-senyawa dengan kemiripan secara struktur kimia (antara β -karoten dan α -karoten), mengevaluasi efektifitas pemisahan senyawa oleh eluen yang digunakan serta melihat kemungkinan pemisahan pita β -karoten dengan kelompok *xantofil* (kelompok karotenoid dengan atom oksigen). Berdasarkan Gambar 3 dapat diketahui bahwa pada setiap eluen hanya terdapat satu pita yang terbentuk dari *crude* senyawa hasil metode ekstraksi terbaik. Satu pita tersebut memiliki nilai R_f yang identik dengan pita senyawa standar β -karoten pada kelima eluen yang digunakan. Pita tersebut juga terpisah dengan pita senyawa β -cryptoxanthin (sebagai perwakilan senyawa *xantofil*) serta memiliki kesamaan dengan pita standar α -karoten. Pada Tabel 5 disajikan data mengenai hasil nilai R_f standar dan senyawa hasil ekstraksi minyak sawit mentah.

Tabel 5.

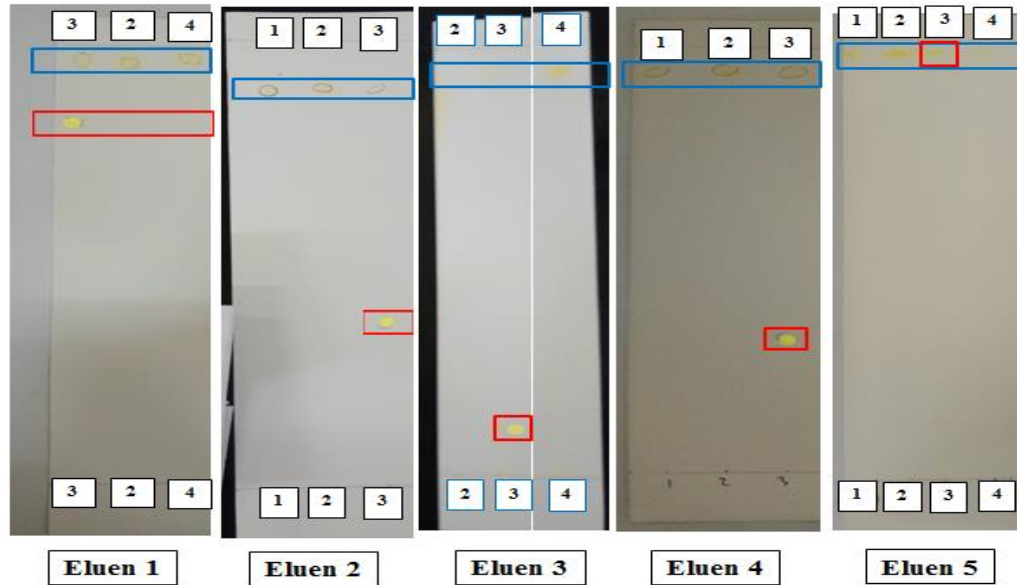
Nilai R_f senyawa standar dan hasil ekstraksi pada beberapa kombinasi fase gerak

Contoh/senyawa	Nilai R_f pada eluen				
	PE: Ase: Hex	Hex: Ase	Klo: Hex: Met	Hex:Ase: Et.A:Met	Hex: Klo
	(2:1:1)	(7:3)	(20:70:5)	(27:4:2:2)	(6:4)
	Eluen 1	Eluen 2	Eluen 3	Eluen 4	Eluen 5
Standar α -karoten	0,97	0,91	0,88	0,88	0,97
Standar β -karoten	0,97	0,91	0,88	0,88	0,97
Standar β -cryptoxanthin	0,82	0,63	0,11	0,31	0
Pita yang diduga β -karoten pada hasil ekstraksi	0,97	0,91	0,88	0,88	0,97

Keterangan. PE: Petroleum eter; Ase: Aseton; Hex: Heksana; Klo: Kloroform; Met: Metanol; Et.A: Etil asetat

β -karoten menghasilkan nilai R_f yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa β -cryptoxanthin. Nilai R_f dapat dijadikan bukti dalam mengidentifikasi senyawa. Secara kualitatif, nilai R_f yang sama menunjukkan senyawa tersebut adalah senyawa yang sama atau memiliki kemiripan (Zeb & Murkovic, 2010). Perbandingan nilai R_f juga dapat dijadikan acuan untuk menunjukkan efektifitas pelarut dalam memisahkan beberapa senyawa berbeda yang tergolong dalam suatu kelompok.

Secara umum kelima eluen yang digunakan dapat membawa dan memisahkan pita β -karoten. Hal ini dapat disebabkan oleh komposisi senyawa non-polar yang dominan pada setiap eluen. Sifat ini memudahkan senyawa target yang bersifat polar dapat terbawa oleh eluen atau meminimalisir



Gambar 3. Hasil *Running* KLT pada beberapa eluen, angka dalam gambar menunjukkan jenis senyawa yang akan dianalisis: (1) standar α -karoten, (2) standar β -karoten, (3) campuran standar alfa, β -karoten+ β -cryptoxanthin, (4) Hasil ekstraksi metode ekstraksi-saponifikasi pada waktu reaksi 60 menit.

interaksi dengan fase diam. Pemilihan eluen didasarkan pada pertimbangan efektifitas pemisahan dan pertimbangan keamanan pelarut yang digunakan.

Efektifitas kemampuan pelarut memisahkan antara senyawa target dengan kelompok senyawa karotenoid lainnya menjadi parameter pertama yang menjadi dasar pertimbangan. Hal ini dikarenakan pita β -karoten yang terbentuk pada kolom diharapkan bisa terpisah sejauh mungkin dengan pita senyawa lainnya terutama dari sesama kelompok karotenoid yang ikut terekstraksi. Berdasarkan data pada Gambar 3 dan Tabel 5, jarak antar pita senyawa karoten dan *xantofil* pada eluen 1 dan eluen 2 tidak terlalu jauh. Nilai R_f yang terlalu berdekatan akan mempersulit pemisahan senyawa tersebut pada tahapan fraksinasi kolom. Adapun eluen 5 tidak masuk ke dalam kriteria pelarut yang akan digunakan karena ketidakmampuannya dalam memisahkan senyawa karoten dan *xantofil*. Berdasarkan kriteria efektifitas pemisahan pita senyawa target maka eluen yang terbaik adalah eluen 3 dan eluen 4.

Pertimbangan selanjutnya adalah mengenai keamanan pelarut yang digunakan. Hal ini perlu dipertimbangkan terutama jika terdapat rencana penggunaan hasil *crude* ekstraksi maupun isolat β -karoten untuk produk farmasetikal dan pangan. Berdasarkan regulasi FDA (*Q3C guideline solvents*) komposisi pelarut dalam eluen-eluen tersebut

tergolong sebagai pelarut organik kelas 2 dan 3. Pelarut kelas 2 merupakan kelompok pelarut yang diizinkan namun diberi batas konsentrasi tertentu karena memiliki potensi sebagai agen penyebab toksisitas seperti neurotoksisitas dan teratogenisitas. Adapun pelarut kelas 3 tergolong lebih aman dari pelarut kelas 2 sehingga dapat digunakan sesuai kebutuhan dalam aturan *Good Manufacturing Practice* (Grodowska & Parczewski, 2010). Eluen 3 tersusun dari kloroform, heksana dan metanol yang ketiganya merupakan pelarut kelas 2. Eluen 4 tersusun dari komposisi pelarut kelas 2 (heksana dan metanol) dan kelas 3 (etil asetat dan aseton). Eluen 3 mengandung kloroform yang tergolong lebih berbahaya dibandingkan heksana maupun metanol berdasarkan perhitungan *Permitted daily exposure* (PDE). Nilai PDE kloroform, heksana dan metanol masing-masing adalah 0,6 mg/hari, 2,9 mg/hari dan 20 mg/hari. Semakin rendah nilai PDE menunjukkan tingkat resiko yang lebih tinggi terhadap potensi gangguan kesehatan subyek yang terpapar (Grodowska & Parczewski, 2010).

Berdasarkan pertimbangan efektifitas pemisahan dan keamanan pelarut yang digunakan dalam analisis KLT, maka ditetapkan eluen untuk kolom kromatografi terbuka adalah eluen 4 dengan komposisi pelarut heksana, aseton, etil asetat, metanol (27:4:2:2).

3.4. Pemisahan fraksi dengan kromatografi kolom terbuka

Fase diam yang digunakan adalah gel silika yang dimasukan ke dalam kolom dengan diameter 2.54 cm. Fase diam dalam bentuk *slurry* dimasukan bersama dengan eluen heksana, aseton, etil asetat, metanol (27:4:2:2), kemudian dibiarkan mengendap. Pada Gambar 4 disajikan rangkaian kolom kromatografi terbuka yang digunakan dalam penelitian. Keunggulan kromatografi kolom dibandingkan dengan teknik pemisahan yang lain adalah dapat memisahkan banyak senyawa dalam waktu bersamaan, komponen alat sederhana sehingga mudah dalam pengoperasian, relatif lebih murah karena tidak perlu energi dari luar karena pemisahan berdasarkan gravitasi.

Hasil eluat yang tertampung sebanyak 27 botol untuk kemudian dilakukan *screening* absorbansi maksimum menggunakan spektrofotometer pada rentang panjang gelombang 350 nm - 800 nm. Eluat dengan kecenderungan kesamaan nilai absorbansi maksimum dikumpulkan sebagai satu fraksi. Tabel 6 menunjukkan hasil pengelompokan eluat berdasarkan pengukuran absorbansi maksimum.



Gambar 4. Rangkaian Alat Kolom Kromatografi Terbuka

Dari Tabel 6 didapat empat kelompok fraksi berdasarkan *screening* absorbansi maksimum. Senyawa karotenoid yang memiliki sifat lebih non-polar seperti β -karoten diduga akan keluar pada urutan eluat terdepan sesuai dengan pola retensi pada KLT. β -karoten dapat keluar pada eluen urutan terdepan dikarenakan kecilnya preferensi β -karoten untuk berinteraksi dengan fase gerak (Zulkipli, 2007).

Berdasarkan absorbansi maksimum, fraksi 1 diduga merupakan fraksi yang mengandung β -

karoten. Empat fraksi kemudian disimpan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ untuk menjaga kestabilan fraksi senyawa β -karoten selama penyimpanan. Fraksi yang mengandung β -karoten akan dikonfirmasi pada tahapan selanjutnya dengan KLT dan instrumen spektrofotometer.

Tabel 6.

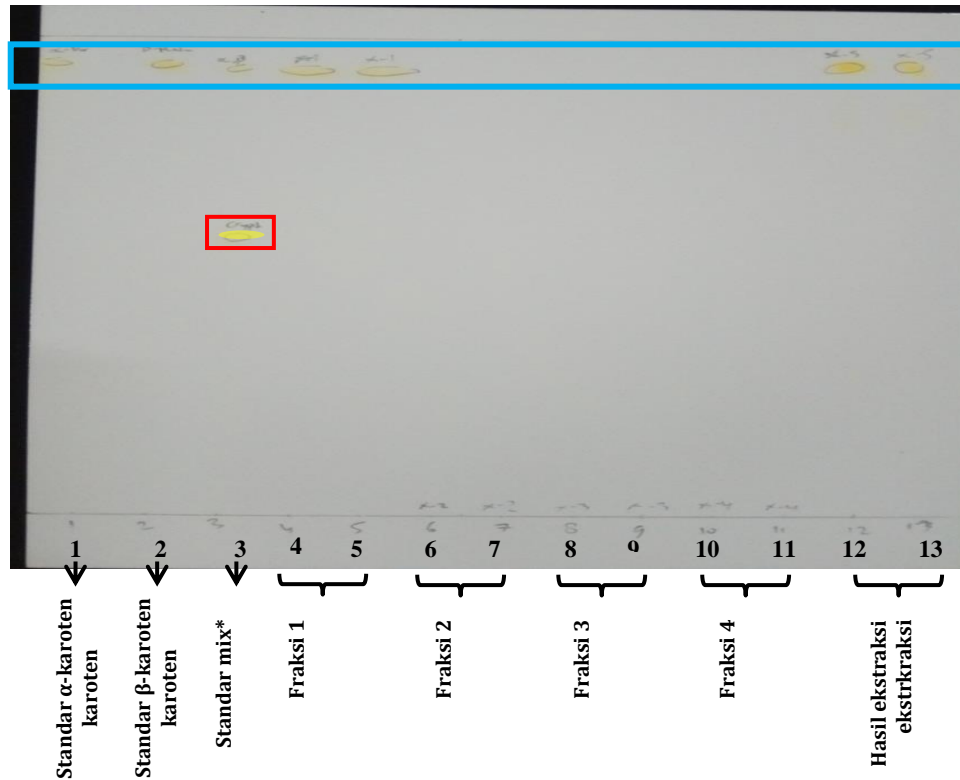
Kelompok Maksimum	Eluat	Berdasarkan	Pengukuran	Absorbansi
Fraksi	Nomor eluat (penomoran berdasarkan berdasarkan waktu)		Absorbansi maksimum (nm)	
1	3, 4, 5, 6		446,1 - 448,0	
2	2, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20		670,0 - 671,0	
3	7, 8, 9, 10, 22, 23, 24, 25, 26, 27		442,1 - 443,0 634,0 672,0 - 676,9	
4	1		373,0 670,0	

3.5. Karakterisasi fraksi mengandung β -karoten

Hasil fraksi dari pemisahan kolom kromatografi dikarakterisasi melalui dua tahap yaitu dengan KLT dan pengukuran absorbansi maksimum. Gambar 5 menunjukkan perbandingan pita senyawa standar, pita senyawa dari empat fraksi serta pita senyawa *crude* hasil ekstraksi. Dapat dilihat bahwa nilai R_f fraksi 1 memiliki kesamaan dengan senyawa standar β -karoten. Melalui uji KLT dapat diidentifikasi bahwa fraksi 1 dan *crude* hasil ekstraksi (sebelum tahapan isolasi) mengandung senyawa β -karoten. Fraksi 2, 3 dan 4 tidak menunjukkan adanya pita pada fase diam yang diduga merupakan eluen yang tertampung.

Untuk validasi hasil maka dilakukan pengukuran absorbansi maksimum dengan spektrofotometer UV-VIS untuk membandingkan λ_{maks} fraksi 1 dengan standar senyawa β -karoten. Absorbansi maksimum standar β -karoten berada pada panjang gelombang 451.0 nm sedangkan absorbansi maksimum fraksi hasil isolasi yang diduga mengandung β -karoten berada pada panjang gelombang 448.0 nm.

Terjadi sedikit perbedaan pada panjang gelombang fraksi 1 dengan standar diduga karena faktor tingkat kemurnian fraksi yang masih terdapat campuran senyawa karotenoid lainnya selain β -karoten. Adanya senyawa lainnya dalam fraksi akan mempengaruhi respon serapan spektrum cahaya yang diterima dari spektrofotometer sehingga panjang gelombang yang dihasilkan akan berbeda dengan senyawa murni.



Gambar 5. Lempeng KLT pada Tahapan Karakterisasi Fraksi Mengandung β -Karoten

Ket : *) standar mix adalah campuran standar α -karoten, β -karoten dan β -cryptoxanthin. Tanda kurung biru menunjukkan pita senyawa β -karoten, tanda kurung merah menunjukkan pita senyawa β -cryptoxanthin.

3.6. Kuantifikasi fraksi mengandung β -karoten

Konsentrasi β -karoten dihitung dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 451 nm menggunakan kurva standar β -karoten. % *recovery* dihitung berdasarkan perbandingan antara konsentrasi β -karoten bahan baku dan konsentrasi β -karoten dalam fraksi 1. Konsentrasi β -karoten bahan baku dan fraksi satu serta % *recovery* dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7.
Konsentrasi β -Karoten bahan baku dan fraksi 1

Jenis contoh	Konsentrasi β -karoten ($\mu\text{g per g bahan baku}$)	% <i>Recovery</i>
Bahan baku	228,48 \pm 7,78	
Fraksi 1	178,43 \pm 20,37	78,09

Untuk menilai keefektifan isolasi menggunakan kolom kromatografi terbuka maka dihitung % *recovery* konsentrasi β -karoten dari fraksi 1 dibandingkan dengan konsentrasi β -karoten hasil ekstraksi terbaik sebelum difraksinasi menggunakan kolom kromatografi terbuka (Dapat dilihat pada Tabel 8). Dari % *recovery* yang mencapai angka 96,52 %, diperoleh bahwa metode kolom kromatografi terbuka efektif digunakan untuk mengisolasi senyawa β -karoten dari contoh

minyak sawit mentah. Dengan demikian, perolehan % *recovery* konsentrasi β -karoten fraksi 1 terhadap bahan baku adalah 78,09 %

Tabel 8.
Konsentrasi β -Karoten hasil ekstraksi (sebelum difraksinasi) dan fraksi 1

Jenis contoh	Konsentrasi β -karoten ($\mu\text{g per g bahan baku}$)	% <i>Recovery</i>
Hasil ekstraksi (sebelum difraksinasi)	184,86 \pm 23,14	96,52
Fraksi 1	178,43 \pm 20,37	

4. Kesimpulan

Metode terbaik dalam mengekstraksi β -karoten dari minyak kelapa sawit mentah adalah metode ekstraksi-saponifikasi pada suhu 56°C selama 60 menit. Metode ini berbeda secara signifikan ($p < 0.05$) dengan keseluruhan perlakuan transesterifikasi-adsorpsi-desorpsi dan ekstraksi-saponifikasi pada suhu 56°C selama 0 menit. Metode ekstraksi pada suhu 56°C selama 60 menit tidak berbeda secara signifikan ($p > 0.05$) dengan

metode ekstraksi-saponifikasi pada suhu 56°C selama 30 menit.

Pelarut yang paling efektif digunakan sebagai eluen untuk memisahkan senyawa β -karoten dari hasil ekstraksi adalah heksana, aseton, etil asetat, metanol dengan perbandingan 27:4:2:2 (v/v). Dari hasil isolasi menggunakan kolom kromatografi terbuka diperoleh fraksi mengandung β -karoten yang memiliki nilai R_f yang sama dengan standar β -karoten serta memiliki absorbansi maksimum pada panjang gelombang 448,0 nm. Jumlah konsentrasi β -karoten yang dihasilkan tiap gram bahan baku minyak sawit mentah adalah sebesar 178,43 \pm 20,37 ppm dengan % *recovery* dari konsentrasi β -karoten bahan baku sebesar 78,09 %.

Daftar Pustaka

- Ali, E.N. & Isis, C. (2013). Characterization of Biodiesel Produced from Palm Oil via Base Catalyzed Transesterification. *Journal Procedia Engineering*, 53, 7-12.
- Badan Pusat Statistik. (2015). *Statistik Kelapa Sawit Indonesia*. Badan Pusat Statistik Indonesia.
- Badan Standarisasi Nasional. (2006). Standar Nasional Indonesia (SNI). SNI-01-2901-2006. Minyak kelapa sawit mentah (*crude palm oil*). Badan Standarisasi Indonesia. Jakarta.
- Breithaupt, D. E. & Bamedi, A. (2001). Carotenoid Esters in Vegetables and Fruits: A Screening with Emphasis on -Cryptoxanthin Esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 2064-2070.
- Damayanti, S., Andry, S., Khairurrijal & Kartasasmita, R. E. (2014). Isolation of β -carotene from Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Oil Using Transesterification-adsorption-desorption Method and its Characterization. *Journal of Applied Sciences*, 14 (20): 2615-2621.
- Eggersdorfer, M. & Wyss, A. (2018). Carotenoids in Human Nutrition and Health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. <http://doi.org/10.1016/j.abb.2018.06.001>.
- Eldahshan, O.A. & Singab, A.N.B. (2013). Carotenoid. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(1), 225-234.
- Enriquez, H.A., Mondaca-Fernández, I., Gortáez-Moroyoqui, P., López-Cervantes, J. & Rodríguez-Ramírez, R. (2013). Carotenoids extraction and quantification: a review. *Analytical Methods*, 5(12), 2916.
- EU Regulation 231, E.C. (2012). Commission Regulation (EU) No. 231/2012 of 9 March 2012.
- Fратиanni, A., Cinquanta, L. & Panfili, G. (2010). LWT - Food Science and Technology Degradation of carotenoids in orange juice during microwave heating. *LWT - Food Science and Technology*, 43(6), 867-871.
- Grodowska, K. & Parczewski, A. (2010). Organic solvents in the pharmaceutical industry. *Polish Pharmaceutical Society*, 67(1), 3-12.
- Gunstone, F. D. (2011). *Vegetable oils in food technology: Composition, properties and uses* (2nd ed.). West Sussex, UK: Blackwell Publishing Ltd. pp. 25-133.
- Jaswir, I., Noviendri, D., Hasrini, R.F., & Octavianti, F. (2011). Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. *Journal of Medicinal Plants Research*. <https://doi.org/10.5897/JMPRX11.011/>
- Karnjanawipagul, P. W. Nittayanuntawch, P. Rojsanga & L. Suntornsuk. (2010). Analysis of β -Carotene in Carrot by Spectrophotometry. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science*, 37(1-2), 8-16.
- Liu, Y. (2012). *Beta-cryptoxanthin: An overview on dietary sources, metabolism, benefits in human health, and biofortification*. Tesis. University of Wisconsin-Madison.
- Mba, O.I, Dumontn, M-J, & Ngadi, M (2015). Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry - A review. *Food Bioscience* 10, 26-41.
- Ng, T. K. W., Low, C. X., Kong, J. P., & Cho, Y. L. (2012). Use of red palm oil in local snacks can increase intake of provitamin A carotenoids in young aborigines children: A Malaysian experience. *Malaysian Journal of Nutrition*, 18(3), 393-397.
- Othman, N., Manan, Z.A., Alwi & Sarmidi. (2010). A review of extraction technology of carotenoids. *Journal of Applied Sciences*, 10(12), 1187-1191.
- Parker. (1992). *Extraction of Carotenoid from Palm Oil*. Cornell University, New York, USA.
- Rao, A. R., R. Sarada, & G.A. Ravishankar. (2007). Stabilization of astaxanthin in edible oils and its use as an antioxidant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 957-965.
- Ren, D. & Zhang, S. (2008). Separation and identification of the yellow carotenoids in *Potamogeton crispus* L. *Food Chemistry*, 106(1), 410 - 414.
- Sastry, N. V., Séquaris, J. M., & Schwuger, M. J. (1995). Adsorption of Polyacrylic Acid and Sodium Dodecylbenzenesulfonate on Kaolinite. *Journal of Colloid and Interface Science*, 171(1), 224-233. <https://doi.org/10.1006/JCIS.1995.1171>
- Schweiggert, R.M., Kopec, R.E., Villalobos-Gutierrez, M.G., Högel, J., Quesada, S., Esquivel, P., Schwartz, S.J. & Carle, R. (2014). Carotenoids are more bioavailable from papaya than from tomato and carrot in humans: a randomised cross-over study. *The British Journal of Nutrition*, 111(3), 490-498.
- Sulaswatty, A. (1998). Karakteristik Pemekatan Karotenoid Minyak Sawit dengan Teknik Fluida CO₂ Superkritik. Disertasi. Institut Pertanian Bogor.
- Sundram, K., Sambanthamurthi, R. & Tan, Y.A. (2003). Palm fruit chemistry and nutrition. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 12(3), 355-362.
- Vagueresse, M.H. Daurade-Le, M. & Bounias. (1991). Separation, quantification, spectral properties and stability of photosynthetic pigments on CN-coated HPTLC plates. *Chromatographia*, 31(1-2), 5-10.
- Venkateswarulu, T.C., Raviteja, C. V, Prabhaker, K. V & Babu, D.J. (2014). A Review on Methods of Transesterification of Oils and Fats in Bio-diesel Formation. *International Journal of ChemTech Research*, 6(4), 2568-2576.
- Widayanto, E. (2007). *Optimasi pemekatan karotenoid pada metil ester kasar (crude methyl ester) minyak sawit dengan metode kromatografi kolom adsorpsi*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor.
- Zeb, A. & Murkovic, M. (2010). Thin-layer chromatographic analysis of carotenoids in plant and animal samples. *Journal of Planar Chromatography*, 23(2), 94-103.
- Zou, Y., Jiang, Y., Yang, T., Hu, P., & Xu, X. (2012). *Minor constituents of palm oil: Characterization, processing, and application*. In O. -M. Lai, C.-P. Tan, & C. C. Akoh (Eds.), *Palm oil: Production, processing, characterization and uses* (pp. 471-524). Urbana, Illinois, USA: AOCS Press.
- Zulkpli. (2007). *Optimasi penggunaan adsorben pada proses pemisahan karotenoid dari metil ester kasar minyak sawit dengan metode kromatografi kolom adsorpsi*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor.