

**PEMISAHAN SENYAWA STEROID FRAKSI PETROLEUM ETHER ALGA  
MERAH (*Eucheuma cottonii*) DENGAN METODE KROMATOGRAFI  
LAPIS TIPIS DAN IDENTIFIKASI MENGGUNAKAN LC-MS**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**AHMAD BADEROS**  
NIM.13630021



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2017**

**PEMISAHAN SENYAWA STEROID FRAKSI PETROLEUM ETER ALGA  
MERAH (*Eucheuma cottonii*) DENGAN METODE KROMATOGRAFI  
LAPIS TIPIS DAN IDENTIFIKASI MENGGUNAKAN LC-MS**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**AHMAD BADEROS**  
NIM.13630021

**Diajukan Kepada:**  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang  
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2017**

**PEMISAHAN SENYAWA STEROID FRAKSI PETROLEUM ETER ALGA  
MERAH (*Eucheuma cottonii*) DENGAN METODE KROMATOGRAFI  
LAPIS TIPIS DAN IDENTIFIKASI MENGGUNAKAN LC-MS**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**AHMAD BADEROS**  
NIM.13630021

Telah Diperiksa dan Disetujui Diuji  
Tanggal: 19 Desember 2017

Pembimbing I



Ahmad Hanapi, M.Sc  
NIDT. 19851225 20160801 1 069

Pembimbing II



Akyunul Jannah, S.Si, M.P  
NIP. 19750410 200501 2 009

Mengetahui,

Ketua Jurusan Kimia



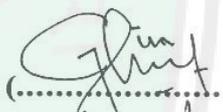
Elok Kamilah/Hayati, M.Si  
NIP. 19798620 200604 2 002

**PEMISAHAN SENYAWA STEROID FRAKSI PETROLEUM ETHER ALGA  
MERAH (*Eucheuma cottonii*) DENGAN METODE KROMATOGRAFI  
LAPIS TIPIS DAN IDENTIFIKASI MENGGUNAKAN LC-MS**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**AHMAD BADEROS**  
NIM.13630021

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 19 Desember 2017**

<b>Penguji Utama</b>	<b>: A. Ghanaim Fasya, M.Si</b> NIP. 19820616 200604 1 002	 (.....)
<b>Ketua Penguji</b>	<b>: Suci Amalia, M.Sc</b> NIP. 19821104 200901 2 007	 (.....)
<b>Sekretaris Penguji</b>	<b>: Ahmad Hanapi, M.Sc</b> NIDT. 19851225 20160801 1 069	 (.....)
<b>Anggota Penguji</b>	<b>: Akyunul Jannah, S.Si, M.P</b> NIP. 19750410 200501 2 009	 (.....)

Mengetahui,  
**Ketua Jurusan Kimia**



  
**Elok Kamillah Hayati, M.Si**  
NIP. 19798620 200604 2 002

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ahmad Baderos  
Nim : 13630021  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : “Pemisahan Senyawa Steroidfraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan Identifikasi Menggunakan LC-MS”

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 27 Desember 2017

Yang membuat pernyataan,



Ahmad Baderos

NIM. 13630021

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil‘Alamin, segala puji bagi Allah yang maha pengasih lagi maha penyayang dan telah memberikan kenikmatan tiada terukur sehingga kami dapat menyelesaikan naskah skripsi ini dengan judul “Pemisahan Senyawa Steroid fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan Identifikasi Menggunakan LC-MS” dengan semaksimal mungkin meskipun masih sangat banyak sekali kekurangannya. Kami hanya berharap apa yang kami lakukan dapat menjadi bermanfaat.

Shalawat beriringkan salam selalu kami haturkan pada junjungan besar kita, Nabi Muhammad SAW yang karenanya kita mendapat pencerahan menuju jalan yang lurus, jalan yang diridhoi Allah. Semoga Allah melimpahkan atas beliau, rahmat yang sesuai dengan keutamaan sebagai pahala atas amal perbuatan beliau.

Penulis sadar bahwa masih sangat banyak kesalahan dan kekurangan yang tidak lain disebabkan oleh keterbatasan pengetahuan penulis, sehingga dalam penyelesaian naskah ini penulis dibantu oleh beberapa pihak. Untuk itu dengan segala ketulusan hati penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag., selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si. selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Elok Kamilah, M.Si selaku ketua jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

4. Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc. selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, motivasi serta arahan kepada penulis dalam penyelesaian skripsi ini.
5. Ibu Suci Amalia, M.Sc. selaku konsultan yang telah memberikan saran dan masukan dalam penyelesaian skripsi ini.
6. Seluruh dosen jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang serta laboran yang telah memberikan ilmu, pengetahuan serta pengalaman sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
7. Ayah dan Ibu tercinta. Terima kasih atas segala doa, kepercayaan, kasih sayang dan dukungan.
8. Semua teman seperjuangan dan taklupa teman-teman dari konco ngopi yang selalu memberikan ide-ide baru dalam pembuatan naskah ini.

Serta pihak-pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan laporan ini. Penulis mengharapkan saran dan kritik yang bersifat konstruktif dari semua pembaca demi sempurnanya skripsi ini. Semoga naskah skripsi ini dapat memberikan kontribusi positif serta bermanfaat bagi kita semua, Aamiin.

Malang, 19 Desember 2017

Penulis

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
ABSTRAK .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
المخلص .....	xix

### BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian .....	6
1.4 Batasan Masalah .....	7
1.5 Manfaat Penelitian .....	7

### BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga Merah ( <i>Eucheuma cottonii</i> ).....	8
2.2.Senyawa Steroid.....	10
2.3 Teknik Pemisahan Steroid Alga Merah <i>Eucheuma cottonii</i> .....	13
2.3.1 Ekstraksi Steroid .....	14
2.3.2 Hidrolisis dan Partisi .....	15
2.3.3 Kromatografi Lapis Tipis.....	17
2.4 Identifikasi Senyawa Aktif Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis ...	18
2.5 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan LC-MS .....	20

### BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	25
3.2 Alat dan Bahan.....	25
3.2.1 Alat.....	25
3.2.2 Bahan .....	25
3.3 Rancangan Penelitian.....	26
3.4 Tahapan Penelitian.....	26
3.5 Cara Kerja .....	27
3.5.1 Uji taksonomi.....	27
3.5.2 Preparasi Sampel.....	27
3.5.3 Ekstraksi Alga Merah ( <i>Eucheuma cottonii</i> ) dengan Metanol.....	27
3.5.4 Hidrolisis dan Ekstraksi Cair-cair (Partisi) Ekstrak Metanol.....	28
3.5.5 Uji Fitokimia Senyawa Steroid.....	28

3.5.6 Pemisahan Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis .....	29
3.5.6.1 Kromatografi Lapis Tipis Analitik.....	29
3.5.6.2 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif .....	29
3.5.6.3 Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi .....	30
3.5.7 Identifikasi Isolat Kromatografi Lapis Tipis Preparatif Menggunakan Spektroskopi UV-Vis.....	31
3.5.8 Identifikasi Isolat Kromatografi Lapis Tipis Preparatif Menggunakan LC-MS .....	31
3.6 Analisis Data .....	32
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4. 1. Uji Taksonomi .....	33
4. 2. Ekstraksi Steroid Dari Alga Merah <i>Eucheuma cottonii</i> .....	33
4. 3. Hidrolisis dan Partisi Menggunakan Petroleum Eter .....	35
4. 4. Uji Fitokimia Senyawa Steroid .....	37
4. 5. Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) .....	38
4. 6. Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) .....	40
4. 7. Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis 2 Dimensi (KLT 2D) .....	42
4. 8. Identifikasi Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis .....	43
4. 9. Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan LC-MS/MS .....	45
4.10 .Pemanfaatan Rumput Laut dalam Perspektif Islam .....	48
<b>BAB V PENUTUP</b>	
5. 1 . .Kesimpulan .....	52
5. 2 . .Saran.....	52
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>53</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>58</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan rumput laut <i>Eucheuma cottonii</i> .....	10
Tabel 4.1 Hasil Pemisahan KLTA Fraksi Petroleum Eter .....	39
Tabel 4.2 Hasil Pemisahan Senyawa Steroid menggunakan KLTP .....	40
Tabel 4.3 Hasil Pemisahan Senyawa Steroid Menggunakan KLT 2D .....	41
Tabel 4.4 Hasil Identifikasi LC-MS/MS Steroid Kesembilan .....	45
Tabel 4.5 Literatur Steroid Menggunakan LC-MS/MS .....	45



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Alga Merah <i>Eucheuma cottonii</i> .....	9
Gambar 2.2 Struktur Senyawa Steroid.....	11
Gambar 2.3 (A) $\beta$ -sitosterol, (B) stigmasterol, (C) campesterol, (D) demosterol, (E) kolesterol, dan (F) fucosterol .....	12
Gambar 2.4. Reaksi Hidrolisis Glikosida .....	16
Gambar 2.5. Reaksi Antara Asam Klorida Dengan Natrium Bikarbonat.....	16
Gambar 2.6 Kromatogram Standar dari Senyawa (1) Desmosterol, (2) Fucosterol, (3) Kolesterol, (4) Stigmasterol + Campesterol (5) $\beta$ -Sitasterol .....	24
Gambar 2.7 Kromatogram Dari Rumput Laut Merah. (A) Deteksi Pada m/z 395, (B) m/z 381, (C) m/z 367 dan (D) Mode <i>Full Scan</i> .....	24
Gambar.2.8 Kromatogram Dari Rumput Laut Coklat, (A) Deteksi Pada m/z 381, (B) m/z 395, dan (C) Mode <i>Full Scan</i> .....	20
Gambar 3.1 Elusi KLT 2 Dimensi, (A) Elusi Pertama dan (B) Elusi Kedua.....	31
Gambar 4.1 Reaksi Hidrolisis Metabolit Sekunder .....	35
Gambar 4.2 Reaksi Penetralkan Asam Dengan $\text{NaHCO}_3$ .....	36
Gambar 4.3 Hasil Uji Fitokimia Alga Merah <i>Eucheuma cottonii</i> .....	37
Gambar 4.4 Hasil KLTA perbandingan 17:3 .....	40
Gambar 4.5 Hasil pemisahan KLTP. ....	42
Gambar 4.6 Hasil KLT 2 dimensi (A) Elusi pertama, (B) Elusi kedua .....	43
Gambar 4.7 Hasil spektrum uv-vis steroid kesembilan .....	44
Gambar 4.8 Kromatogram LC-MS steroid kesembilan.....	45
Gambar 4.9 Fragmentasi $\beta$ -sitosterol .....	48

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian .....	58
Lampiran 2. Diagram Alir.....	59
Lampiran 3. Pembuatan Larutan dan Reagen .....	64
Lampiran 4. Hasil Uji Taksonomi Alga Merah .....	66
Lampiran 5. Perhitungan Rendemen.....	67
Lampiran 6. Nilai Rf .....	68
Lampiran 7. Perhitungan Resolusi .....	76
Lampiran 8. Fragmentasi Struktur Steroid.....	77
Lampiran 9. Dokumentasi.....	80



## ABSTRAK

Baderos, Ahmad. 2017. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan Identifikasi Menggunakan LC-MS. Pembimbing I: Ahmad Hanapi, M.Sc. Pembimbing II: Akyunul Jannah, S.Si, M.P. Konsultan: Suci Amalia, M.Sc.

**Keywords :** Thin Layer Chromatography (TLC), *Eucheuma cottonii*, Steroid, LC-MS

*Eucheuma cottonii* termasuk dalam golongan alga merah yang memiliki banyak manfaat diantaranya sebagai antiinflamasi, antibakteri, antikanker, dan toksisitas.. Manfaat yang terkandung dalam alga dihasilkan oleh adanya metabolit sekunder yang dihasilkan. Steroid merupakan salah satu senyawa dominan yang dihasilkan oleh alga merah. Tujuan dari penelitian ini adalah pemisahan senyawa steroid dari alga merah (*Eucheuma cottonii*) serta mengidentifikasinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan LC-MS.

Steroid diekstraksi secara maserasi dengan pelarut metanol. Ekstrak metanol dihidrolisis dengan HCl 2N dan dinetralkan menggunakan natrium bikarbonat. Hasil hidrolisis dipartisi menggunakan petroleum eter. Uji fitokimia menggunakan reagen Liebermann Burchard. Steroid pada ekstrak pekat dipisahkan dengan kromatografi lapis tipis analitik, kromatografi lapis tipis preparatif, dan kromatografi lapis tipis 2 dimensi. Hasil terbaik diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan LC-MS.

Ekstraksi maserasi menghasilkan rendemen 13,936 %, dan rendemen dari partisi petroleum eter sebesar 12,132 %. Uji fitokimia menunjukkan bahwa positif mengandung steroid yang ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau. Pemisahan steroid menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Analitik menunjukkan bahwa eluen terbaik adalah n-heksana: etil asetat (17: 3) dengan 7 titik tanpa ekor. Pemisahan Kromatografi Lapis Tipis preparatif menghasilkan 14 spot. Pemisahan Kromatografi Lapis Tipis 2 dimensi menunjukkan bahwa noda nomer 9 menghasilkan spot tunggal. Identifikasi senyawa steroid menggunakan UV-Vis menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum sebesar 203 nm, sedangkan identifikasi LC-MS menunjukkan bahwa terdapat 4 jenis steroid yaitu kolesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, dan kampesterol.

## ABSTRACT

Baderos, Ahmad. 2017. Separation of Steroid Fraction Petroleum Eter Alga Red (*Eucheuma cottonii*) With Thin Layer Chromatography Method and Identification Using LC-MS. Supervisor I: Ahmad Hanapi, M.Sc. Supervisor II: Akyunul Jannah, S.Si, M.P. Consultant: Suci Amalia, M.Sc.

---

**Keywords :** Thin Layer Chromatograpy (TLC), *Eucheuma cottonii*, Steroid, LC-MS

*Eucheuma cottonii* belongs to of red algae which has many benefits such as anti-inflammatory, antibacterial, anticancer, and toxicity. The aliased benefits in algae are generated by the presence of secondary metabolites produced. Steroids are one of the dominant compounds produced from red algae. The purpose of this study was the separation of steroid compounds from red algae (*Eucheuma cottonii*) and to identify them using spectrophotometer UV-Vis and LC-MS.

Steroids are extracted by maceration with methanol solvent. The methanol extract is hydrolyzed with HCl 2N and neutralized using sodium bicarbonate. The hydrolysis results are partitioned using petroleum ether. Phytochemical tests use Liebermann Burchard reagents. Steroids in concentrated extracts are separated by analytical thin layer chromatography, preparative thin layer chromatography, and 2-dimensional thin layer chromatography. The best results were identified using spectrophotometer UV-Vis and LC-MS.

The maceration extraction yielded 13.936% , and the yield of the petroleum ether partition was 12.132%. Phytochemical tests show that positively contains steroids characterized by green discoloration. The separation of steroids using Analytical Thin Layer Chromatography shows that the best eluent is n-hexane: ethyl acetate (17: 3) with 7 points without a tail. Preparative Thin Layer Chromatography Separation generates 14 spots. The 2 dimensional Thin Layer Chromatography Separation shows that stain number 9 produces a single spot. The identification of steroid compounds using UV-Vis showed that the maximum wavelength of 203 nm, while LC-MS identification showed that there are 4 types of steroids cholesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, and cholesterol.

## الملخص

باديروس، أحمد. ٢٠١٧. انفصال مجموعة ستيرويدية فصيلة بتزول أثير الطحلب الأحمر (*Eucheuma cottonii*) بطريقة كروماتوغرافي البطانة الرقيقة والتحديد باستخدام LC-MS. المشرف الأول أحمد حنفي الماجستير، المشرفي الثانية: أخين الجنة الماجستير، المستشارة: سوشي عملية الماجستير.

الكلمات المفتاحية: كروماتوغرافي البطانة الرقيقة (KLT)، *Eucheuma cottonii*، ستيرويدية، LC-MS.

أن *Eucheuma cottonii* من الطحلب الأحمر عنده عدّة الفوائد التي يكتسبها المستقلب الثانوي ومنها كضد التهابي وضد البكتيرية وضد السرطان وتوليد الديقان. وعلى حين أن الستيرويدية من المجموعة المعظمة التي يكتسبها الطحلب الأحمر. تهدف هذه الدراسة لانفصال مجموعة ستيرويدية من الطحلب الأحمر (*Eucheuma cottonii*) و التحديد باستخدام الطيف UV-Vis و LC-MS.

استخراج الستيريدية باستخدام النقع بمذيب الميثانول. و يحلل ماء استخراج الميثانول باستخدام HCl 2N وتحديد باستخدام صوديوم البيكربونات. ونتيجة تحليل الماء التقسيم باستخدام بتزول الأثير. اختبار الكيمائي النباتي باستخدام كاشف لييرمان بورشار. أن الستيريدية في الاستخراج الخثر منفصل بكروماتوغرافي البطانة الرقيقة التحليلية والتحضيرية والقياسين. أماتحديد النتيجة الجيدة باستخدام الطيف UV-Vis و LC-MS.

يكتسب استخراج النقع العائد ١٣,٩٣٩% والعائد من تقسيم بتزول الأثير ١٢,١٣٢%. اختبار الكيمائي النباتي تدل على ايجابية الستيريدية الدال بتغير اللون إلى الخضراء. انفصال الستيريدية باستخدام كروماتوغرافي البطانة الرقيقة التحليلية تدلّ إلى أن الشاطف الجيد هو n-heksana: إيثيل الأسيتات (١٧ : ٣) بسبع تقطعات دون الذيل. انفصال بكروماتوغرافي البطانة الرقيقة التحضيرية مكتسب ١٤ بقعة. انفصال بكروماتوغرافي البطانة الرقيقة التحليلية القياسين تدل إلى أن العيب النمرة التاسعة مكتسب بقعة واحدة. أن تحليل مجموعة ستييريدية باستخدام UV-Vis تدل على أن طويل الفيض الأقصى على المبلغ ٢٠٣ nm، وعلى حين تحديد LC-MS تدل على أربع ستييرويديات وهو كوليسترول وستيجماستيرول و بتاسيتوستيرول و كامفستيرول.

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan dimana sebagian besar dari seluruh luas Indonesia adalah berupa perairan. Karena itu Indonesia memiliki potensi laut yang besar meliputi sumber daya hayati, mineral, dan energi. Dengan potensi laut tersebut maka kita dapat memanfaatkannya untuk mengembangkan ilmu pengetahuan dan kemakmuran bagi manusia. Sebagaimana firman Allah SWT dalam surat an Nahl ayat 14 :

وَهُوَ الَّذِي سَخَّرَ الْبَحْرَ لِتَأْكُلُوا مِنْهُ لَحْمًا طَرِيًّا وَتَسْتَخْرِجُوا مِنْهُ حِلْيَةً تَلْبَسُونَهَا  
وَتَرَى الْفُلْكَ مَوَاجِرَ فِيهِ وَلِتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ ۗ وَلِعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ ﴿١٤﴾

Artinya :

*“Dan Dialah, Allah yang menundukkan lautan (untukmu), agar kamu dapat memakan dari padanya daging yang segar (ikan), dan kamu mengeluarkan dari lautan itu perhiasan yang kamu pakai; dan kamu melihat bahtera berlayar padanya, dan supaya kamu mencari (keuntungan) dari karunia-Nya, dan supaya kamu bersyukur”*

Berdasarkan firman Allah SWT QS an Nahl ayat 14, Allah SWT telah memberikan nikmat-Nya berupa lautan beserta isinya agar manusia dapat bersyukur. Keragaman hayati dari laut perlu dimanfaatkan keberadaannya. Salah satu hayati laut yang memiliki banyak manfaat yaitu rumput laut (alga). Rumput laut adalah nama umum dalam dunia perdagangan yang digunakan untuk menyebut sejenis alga yang hidup di laut. Alga merupakan salah satu sumber devisa negara dan sumber pendapatan bagi masyarakat pesisir. Selain dapat digunakan sebagai bahan makanan, minuman, obat-obatan, beberapa hasil olahan

alga seperti agar-agar, alginat, dan karaginan merupakan yang paling penting dalam industri (Istini dan Suhaimi, 1998).

Para ahli menggolongkan rumput laut menjadi 5 kelompok yaitu: *Cyanophyta* (alga biru), *Chlorophyta* (alga hijau), *Chrysophyta* (alga keemasan), *Phaeophyta* (alga coklat), *Rhodophyta* (alga merah). Dari kelima jenis alga tersebut, potensi yang banyak dimanfaatkan dalam kehidupan sehari-hari di Indonesia adalah jenis *Rhodophyta* (alga merah) dengan berbagai jenis diantaranya *Eucheuma spinosum*, *Eucheuma edule*, dan *Eucheuma cottonii* (Junaedi, 2004).

Jenis alga merah yang telah banyak diteliti salah satunya adalah *Eucheuma cottonii* dimana manfaatnya antara lain sebagai bahan obat, antioksidan dan antibiotik (Rasyid, 2004). Menurut penelitian terdahulu ekstrak metanol dan kloroform *Eucheuma cottonii* dapat berpotensi sebagai antikanker. Hasil penelitian yang dilakukan ekstrak metanol diuji aktivitas terhadap *Artemia salina*. *L* memiliki nilai  $LC_{50}$  23,3346 ppm dan ekstrak kloroform sebesar 89,7429 ppm (Nurhayati, Abdulgani, & Febrianto, 2006). Selain itu, ekstrak metanol dari alga merah *Eucheuma cottonii* dapat digunakan sebagai anti bakteri yang dapat menghambat aktivitas bakteri *Staphylococcus aureus* dengan diameter hambat sebesar 10,50 mm dan *Solmonella typhi* dengan diameter hambat 8,00 mm dalam konsentrasi 0,5% pada waktu inkubasi 48 jam (Dwyana dan Johannes. 2010). Selain itu penelitian Muhibah (2013) tentang *Eucheuma cottonii* juga menunjukkan bahwa ekstrak metanol dari alga merah tersebut memiliki daya hambat terbaik terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Daya hambat terbaik

terhadap *S. aureus* pada konsentrasi 5 % dengan rata-rata diameter 6,167 mm dan *E. coli* pada konsentrasi 5 % dengan rata-rata diameter 5,333 mm.

Alga merah (*Eucheuma cottonii*) memiliki aktivitas sebagai antibiotik dan bersifat toksik dikarenakan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkannya. Metabolit sekunder dihasilkan oleh tumbuhan sebagai hasil samping atau intermediet dari metabolisme primer (asam amino, nukleotida, gula, lipid). Tumbuhan memproduksi metabolit sekunder sebagai antibiotik atau agen sinyal selama interaksi dengan patogen. Alga merah (*Eucheuma cottonii*) mengandung metabolit sekunder flavonoid (Andriani, dkk., 2015), triterpenoid (Sharo, dkk., 2013; Andriani, dkk., 2015), steroid (Sharo, dkk., 2013; Afif, dkk., 2015; Andriani, dkk., 2015) dan alkaloid (Afif, dkk., 2015; Andriani, dkk., 2015).

Steroid telah dilaporkan memiliki beberapa aktivitas biologi. Ko dkk., 2008 melakukan isolasi terpenoid dan steroid dari jamur *Ganoderma lucidum* dan *Ganoderma stugae*. Mendapatkan steroid (lanosteroid) hasil isolasi memberikan efek anti inflamasi dengan menghambat pelepasan mediator kimia dari sel-sel inflamasi. Sedangkan menurut Putra (2007) mekanisme kerja steroid dalam menghambat mikroba sebagai (antibakteri), adalah dengan merusak membran plasma sel mikroba, sehingga menyebabkan bocornya sitoplasma keluar sel yang selanjutnya menyebabkan kematian sel. Diduga hal tersebut disebabkan karena molekul steroid memiliki gugus nonpolar (hidrofobik) dan polar (hidrofilik) sehingga memiliki efek surfaktan yang dapat melarutkan komponen fosfolipid membran plasma.

Metabolit sekunder pada alga merah yang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut yang berbeda akan menghasilkan perbedaan pada

senyawa yang terekstrak Din dan Ahwany (2015) telah mengekstrak alga merah dengan variasi pelarut metanol, etanol, aseton dan kloroform. Kemudian dilakukan uji fitokimia pada masing-masing ekstrak dan didapatkan ekstrak metanol dan etanol mengandung metabolit sekunder antara lain alkaloid, triterpenoid, steroid, tannin, terpenoid, pitosteroid, dan flavonoid. Sedangkan pada aseton tidak dapat mengekstrak alkaloid dan kloroform tidak dapat mengekstrak alkaloid dan tannin.

Steroid pada alga merah dapat diekstraksi menggunakan maserasi menggunakan pelarut metanol. Alfiyaturrohmah, dkk. (2013) melakukan ekstraksi metabolit sekunder dari alga coklat *Sargassum vulgare* dengan variasi pelarut metanol, kloroform dan n-heksana. Hasil ekstraksi yang terbaik dan memiliki rendemen tertinggi adalah ekstrak metanol. Sedangkan Hanapi, dkk. (2013) menyatakan bahwa senyawa aktif pada alga merah dapat di ekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol.

Di alam senyawa steroid sebagian besar berikatan dengan senyawa lain dan membentuk glikosida sehingga perlu dilakukan pemutusan ikatan. Hidrolisis menggunakan asam dapat dilakukan untuk memutus ikatan glikosida menjadi senyawa glikon dan aglikon. Asam klorida (HCl) merupakan asam kuat yang mudah melepaskan ion  $H^+$  secara sempurna dalam air. Semakin banyak proton  $H^+$  yang dilepas, semakin mudah melepaskan ikatan glikosida (Handoko, 2006). Artanti, dkk. (2012) menghirolisis pelepah pisang menggunakan asam klorida dengan variasi konsentrasi 1,0 N; 1,5 N; 2,0 N; 2,5 N; dan 3,0 N. Didapatkan hasil konsentrasi maksimum berada pada konsentrasi asam klorida 2,0 N.

Untuk memisahkan senyawa aktif berdasarkan kepolarannya dapat digunakan metode partisi (eksatraksi cair-cair). Pelarut petroleum eter merupakan salah satu pelarut organik yang mempunyai sifat non polar, sehingga senyawa aktif yang memiliki kepolaran sama dapat larut dalam petroleum eter. Anggraeni, dkk. (2014) memvariasi jenis pelarut untuk partisi dari ekstrak metanol *Chlorella sp.* Dari semua pelarut yang digunakan yaitu *n*-heksana, petroleum eter, kloroform, dan etil asetat. Fraksi petroleum eter merupakan fraksi terbaik dengan nilai LC<sub>50</sub> sebesar 27,26 ppm. Utami, dkk., (2014) melakukan uji aktifitas antibakteri fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter dan *n*-heksana dari ekstrak metanol *Chlorella sp.* Fraksi petroleum eter memiliki aktifitas tertinggi dibandingkan fraksi lainnya. Zona hambat yang dihasilkan fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter dan *n*-heksana secara berturut-turut 4,6 mm, 2,3 mm, 10 mm, dan 5,2 mm. Halilu dkk., (2013) mengisolasi steroid dari *Parinari curatellifolia* menggunakan partisi petroleum eter. Handoko (2016) melakukan isolasi senyawa steroid dari *Chlorella sp.* dengan menggunakan fraksi petroleum eter.

Senyawa hasil partisi merupakan senyawa steroid yang masih tercampur dengan senyawa lain sehingga perlu dipisahkan, salah satu metode pemisahan steroid adalah kromatografi lapis tipis (KLT). Sharo, dkk. (2013) melakukan pemisahan menggunakan kromatografi lapis tipis ekstrak etanol dan *n*-heksana pada alga merah *Eucheuma cottonii*. Pada ekstrak etanol digunakan eluen *n*-heksana : etil asetat dengan perbandingan (7:3) didapatkan 7 noda dan setelah disemprot reagen Lieberman-Buchard warna noda berubah menjadi merah keunguan sampai ungu muda yang menunjukkan senyawa triterpenoid, sedangkan

pada ekstrak n-heksana digunakan eluen n-heksana : etil asetat dengan perbandingan (17:3) didapatkan 8 noda dan setelah disemprot reagen Liebermann-Buchard warna noda berubah menjadi hijau sampai biru kehijauan yang menunjukkan senyawa steroid.

Mengacu pada penelitian yang telah dilakukan, pada penelitian ini akan dilakukan isolasi steroid pada alga merah *Eucheuma cottonii* yang didapatkan dari perairan Wongsorejo Banyuwangi. Sampel akan diekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol Ekstrak metanol yang didapat akan dihidrolisis menggunakan HCl 2N dan dipartisi menggunakan petroleum eter. Kemudian dipisahkan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) analitik dan preparatif. KLT analitik digunakan untuk memperoleh pemisahan terbaik dengan menggunakan variasi perbandingan eluen petroleum eter dan etil asetat. Sedangkan KLT preparatif digunakan untuk memperoleh isolat steroid. Hasil isolat steroid KLT preparatif diuji kemurnian dengan KLT dua dimensi dan diidentifikasi senyawa steroid yang didapatkan menggunakan instrumentasi spektrofotometer UV-Vis dan LC-MS.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana hasil pemisahan steroid dari fraksi petroleum eter menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT)?
2. Bagaimana hasil identifikasi ekstrak senyawa steroid dalam alga merah *Eucheuma cottonii* menggunakan instrumentasi spektrofotometer UV-Vis dan LC-MS?

### 1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui hasil pemisahan steroid dari fraksi petroleum eter menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT).
2. Untuk mengetahui hasil identifikasi ekstrak senyawa steroid dalam alga merah *Eucheuma cottonii* menggunakan instrumentasi spektrofotometer UV-Vis dan LC-MS.

### 1.4 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan bersal dari perairan Wongsorejo Banyuwangi.
2. Ekstraksi sampel menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol.
3. Fraksi yang digunakan adalah petroleum eter.
4. Teknik pemisahan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yaitu KLT analitik, KLT preparatif dan KLT dua dimensi.
5. Eluen yang digunakan adalah n-heksana dan etil asetat.
6. Identifikasi steroid menggunakan spektroskopi UV-Vis dan LC-MS.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat penelitian ini dilakukan adalah memberi informasi kepada pembaca mengenai metode isolasi steroid dari alga merah *Eucheuma cottonii*. Hasil identifikasinya menggunakan spektroskopi UV-Vis dan LC-MS yang terdapat pada sampel alga merah *Eucheuma cottonii* menggunakan fraksi petroleum eter.

## BAB II

### KAJIAN PUSTAKA

#### 2.1 Alga merah *Eucheuma cottonii*

Alga merah merupakan salah satu jenis tumbuhan tingkat rendah, genus ini mempunyai *thallus* berwarna kuning kecoklatan sampai merah keungu-unguan. Bentuk agak pipih, dan memiliki cabang yang tidak beraturan. Percabangan dari genus ini adalah dua (*dichotome*) atau tiga (*trichotome*) buah (Hidayat, 2006). Ciri khusus secara morfologis, jenis ini memiliki duri-duri yang tumbuh berderet melingkari *thallus* dengan interval yang bervariasi sehingga terbentuk ruas-ruas *thallus* di antara lingkaran duri. Percabangan berlawanan atau berselang-seling timbul teratur pada deretan duri antara ruas dan membuat perpanjangan dari duri tersebut (Anggadiredja, dkk. 2006). Allah SWT berfirman dalam al-Quran surat az-Zumar (39) : 21:

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَسَلَكَهُ وَيَنْبِيعَ فِي الْأَرْضِ ثُمَّ يُخْرِجُ بِهِ زَرْعًا  
مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ ثُمَّ يَهيجُ فَتَرْتَهُ مُصْفَرًّا ثُمَّ يَجْعَلُهُ حُطَامًا إِنَّ فِي ذَلِكَ لَذِكْرًا لِأُولِي  
الْأَلْبَابِ ﴿٢١﴾

Artinya :

“Apakah kamu tidak memperhatikan, bahwa Sesungguhnya Allah menurunkan air dari langit, Maka diaturnya menjadi sumber-sumber air di bumi kemudian ditumbuhkan-Nya dengan air itu tanam-tanaman yang bermacam-macam warnanya, lalu menjadi kering lalu kamu melihatnya kekuning-kuningan, kemudian dijadikan-Nya hancur berderai-derai. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat pelajaran bagi orang-orang yang mempunyai akal.” (Qs. az-Zumar (39):21).

Lafadz *أَلْوَانُهُ مُخْتَلِفًا* memiliki arti tanaman yang bermacam-macam warnanya. Lafadz ini menunjukkan kepada jenis, yakni tumbuhan yang

bermacam-macam warnanya yaitu merah, kuning, biru, hijau dan putih (Qurthubi, 2009)

*Euचेuma cottonii* merupakan salah satu jenis rumput laut merah (*Rhodophyceae*) dan berubah nama menjadi *Kappaphycus alvarezii* karena karaginan yang dihasilkan termasuk fraksi kappa-karaginan. Maka jenis ini secara taksonomi disebut *Kappaphycus alvarezii* (Doty 1985). Nama daerah 'cottonii' umumnya lebih dikenal dan biasa dipakai dalam dunia perdagangan nasional maupun internasional. Klasifikasi *Euचेuma cottonii* menurut Doty (1985) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Rhodophyta
Kelas	: Rhodophyceae
Ordo	: Gigartinales
Famili	: Solieracea
Genus	: <i>Euचेuma</i>
Species	: <i>Euचेuma alvarezii</i> Doty



Gambar 2.1 Alga merah *Euचेuma cottonii*

Rumput laut umumnya mengandung karbohidrat, protein, sedikit lemak dan abu yang sebagian besar merupakan senyawa garam natrium dan kalium. Selain itu rumput laut juga mengandung vitamin A, B1, B2, B6, B12, C, serta mineral seperti kalium, kalsium, fosfor, natrium, zat besi dan yodium

(Anggadireja, dkk., 2008). Rumput laut *Eucheuma cottonii* mempunyai kandungan seperti pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Kandungan rumput laut *Eucheuma cottonii* (Istini dan suhaimi. 1998)

Komposisi	Nilai
Air	13.90 %
Protein	2.69 %
Lemak	0.37 %
Serat Kasar	0.95 %
Mineral Ca	22.39 ppm
Mineral Fe	0.121 ppm
Mineral Cu	2.763 ppm
Tiamin	0.14 (mg/100 g)
Ribovlamin	2.7 (mg/100 g)
Vitamin C	12 (mg/100 g)
Karagenan	61.52 %
Abu	17.09 %
Kadar Pb	0.04 ppm

Kandungan dan manfaat yang ada pada rumput laut *Eucheuma cottonii* sesuai dengan berfirman Allah SWT dalam al Quran surat asy Syu'ara (26):7.

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya

“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?”

Lafadz زَوْجٍ كَرِيمٍ diartikan sebagai tumbuhan yang baik. Tumbuhan baik dijelaskan sebagai tumbuhan yang tumbuh subur dan menghasilkan manfaat bagi manusia. Dengan adanya tumbuhan yang bermanfaat tersebut seorang mukmin harus berfikir tentang manfaat dari bagian tumbuhan tersebut (Shihab, 2002).

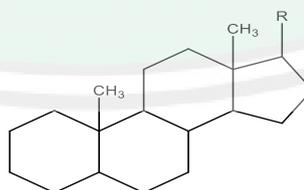
## 2.2 Senyawa steroid

Biota laut umumnya memiliki senyawa aktif dalam bentuk metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid dan lain-lain untuk

melindungi diri dari lingkungan sekitar. Senyawa metabolit sekunder dapat melindungi diri dari hama penyakit ataupun lingkungan karena kemampuan bioaktivitasnya.

Steroid merupakan senyawa metabolit sekunder yang tergolong dalam senyawa lemak yang terdiri dari rantai karbon dengan 4 cincin, 3 cincin utama sikloheksana dan 1 cincin siklopentana. Pengelompokan senyawanya berdasarkan pada gugus yang terikat pada kerangka dasar rantai karbon (Kristanti, 2008). Steroid tersusun dari isopren-isopren dari rantai panjang hidrokarbon yang menyebabkan sifatnya non-polar. Beberapa senyawaan steroid mengandung gugus -OH yang sering disebut dengan sterol, sehingga sifatnya yang cenderung lebih polar. Beberapa turunan steroid yang penting ialah steroid alkohol atau sterol. Steroid lain antara lain asam-asam empedu, hormon seks (androgen dan estrogen) dan hormone kortikosteroid (Robinson, 1995).

Tumbuhan memiliki senyawa steroid yang disebut dengan fitosterol dan yang terdapat dalam hewan disebut dengan zoolesterol serta di fungi (jamur) disebut sebagai mikosterol. Selain pelindung diri, steroid juga berfungsi sebagai hormon. Kolesterol, ergosterol, progesteron, dan estrogen merupakan hormon yang senyawanya turunan dari steroid (Poedjiadi, 1994).



Gambar 2.2 Struktur senyawa steroid (Poedjiadi, 1994).

Halilu, dkk., (2013) berhasil mengisolasi senyawa steroid dari *Parinari curatellifolia*. Fraksi petroleum eter dipisahkan menggunakan kromatografi kolom

dan diidentifikasi menggunakan 1D-NMR ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  and DEPT-135), 2D-NMR (HSQC, HMBC,  $^1\text{H-}^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H-}^1\text{H}$  NOESY), spektrofotometer massa (MS) dan FTIR menunjukkan adanya 3 senyawa steroid yaitu  $\beta$ -sitosterol (22,23-dihydrostigmasterol), stigmast-4-en-3-one and stigmasterol. Berikut struktur dari senyawa-senyawa steroid dapat dilihat pada Gambar 2.2 (Fu dan Joseph, 2012).



Gambar 2.3 (A)  $\beta$ -sitosterol, (B) stigmasterol, (C) campesterol, (D) demosterol, (E) kolesterol, dan (F) fucosterol.

Senyawa steroid secara umum dapat digunakan sebagai (Dewick. 2002):

- a. Bermanfaat untuk menurunkan kolesterol dan mampu menghambat perkembangan kanker usus.

- b. Digunakan sebagai bahan campuran dalam produk makanan.
- c. Lemak sterol, berperan untuk fungsi seluler tubuh serta menjadi substrat awal bagi vitamin yang larut dalam lemak dan hormon steroid.
- d. Berperan sebagai indikator kontaminasi.
- e. Dimanfaatkan dalam budidaya ikan.

### 2.3. Teknik Pemisahan Steroid Alga Merah *Eucheuma cottonii*

Isolasi steroid dari alga merah *Eucheuma cottonii* dapat dilakukan dengan beberapa tahapan. Menurut Setiyawan (2015) isolasi steroid dapat dilakukan dengan metode ekstraksi, hidrolisis dan partisi, dan kromatografi. Sedangkan menurut Sulastry (2010) isolasi senyawa steroid dapat dilakukan tanpa fraksinasi hanya melakukan ekstraksi dan kromatografi.

#### 2.3.1. Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kelarutannya terhadap dua cairan tidak saling larut. Prinsip ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non polar dalam senyawa non polar. Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap proses ekstraksi adalah lama ekstraksi, suhu dan jenis pelarut yang digunakan. Hal yang harus diperhatikan dalam pemilihan jenis pelarut adalah daya melarutkan, titik didih, sifat toksik, mudah tidaknya terbakar dan sifat korosif terhadap peralatan ekstraksi (Khopkar, 2008).

Ekstraksi yang digunakan untuk mengisolasi senyawa yang ada dalam alga merah adalah menggunakan metode maserasi. Metode maserasi merupakan metode pemisahan senyawa dengan menggunakan pelarut organik pada suhu

ruang dengan perendaman. Penggunaan metode maserasi pada isolasi senyawa steroid dikarenakan maserasi murah, mudah dilakukan (Sa'adah, 2010). Kekurangan metode maserasi memerlukan pelarut banyak, perlu pengadukan dan membutuhkan waktu yang lama (Atun, 2014). Saat proses maserasi terjadi perbedaan tekanan antara pelarut dan sel tumbuhan atau hewan. Tekanan tersebut menyebabkan pemecahan dinding dan membran sel dan senyawa metabolit yang berada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut yang digunakan (Sa'adah, 2010).

Perlu dilakukan preparasi terlebih dahulu terhadap sampel yang digunakan sebelum dilakukan proses maserasi. Preparasi yang dilakukan adalah dengan mencuci alga hingga bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada alga. Kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 38°C atau dengan dikering anginkan tanpa sinar matahari. Pengeringan yang dilakukan digunakan untuk meminimalisir keberadaan mikroorganisme yang akan tumbuh bila kadar air tinggi. Alga merah kering dapat disimpan dalam waktu yang lama sebelum dilakukan maserasi (Mardiyah dkk., 2013).

Pelarut pada proses maserasi dapat digunakan pelarut organik, baik pelarut polar maupun non polar sesuai kebutuhan tergantung senyawa yang diinginkan.. Jenis pelarut yang berbeda dapat mempengaruhi jenis senyawa yang diekstrak. Menurut Hardiningtyas (2009), senyawa aktif yang dapat diekstrak dari suatu sampel tergantung pada tingkat kepolaran pelarut yang dipakai. Senyawa yang terikat pada pelarut polar antara lain alkaloid, asam amino, polihidroksi steroid dan saponin. Sedangkan senyawa yang terikat pada pelarut semi polar antara lain

peptida dan depsipectida. Dan senyawa yang terikat pada pelarut non polar antara lain hidrokarbon, asam lemak dan terpen.

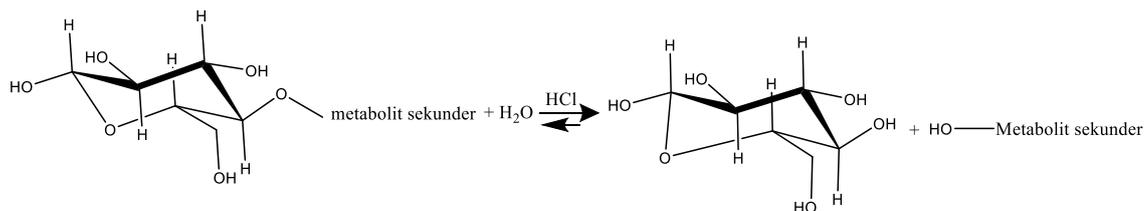
Ekstraksi maserasi dari *Eucheuma cottonii* dapat dilakukan dengan pelarut metanol dan n-heksana. Hasil rendemen ekstraksi dari kedua pelarut tersebut secara berurutan adalah 16,25% dan 0,88% (Kutsiyah dkk., 2012). Hasil tersebut dapat diartikan bahwa untuk maserasi *Eucheuma cottonii* baik dilakukan dengan pelarut metanol.

### 2.3.2 Hidrolisis dan Partisi

Hidrolisis merupakan suatu reaksi untuk memecah suatu senyawa menggunakan air berlebih. Namun, karena reaksi antara air dengan selulosa lambat sehingga perlu katalisator untuk mempercepat reaksi. Katalis yang digunakan untuk hidrolisis adalah menggunakan katalis asam dan katalis enzim. Hidrolisis dengan menggunakan katalis asam digunakan asam klorida, asam nitrat dan asam sulfat (Artati, 2012).

Hasil ekstraksi maserasi kemudian dilakukan proses hidrolisis dengan menggunakan HCL 2N (Setiyawan dkk., 2015). Hal tersebut dikarenakan senyawa metabolit di alam umumnya memiliki ikatan glikosida antara metabolit sekunder (aglikon) dengan komponen gula (glikon) yang saling berikatan (Mardiyah, 2014).

Berikut adalah reaksi pemutusan ikatan O-glikosida dari senyawa metabolit sekunder dengan HCl:



Gambar 2.4. Reaksi hidrolisis glikosida (Mardiyah, 2014)

Penambahan HCl akan terbentuk suasana asam yang akan dinetralkan dengan  $\text{NaHCO}_3$ . Penetralkan ini berfungsi untuk menghentikan reaksi hidrolisis yang bersifat reversibel. Apabila reaksi ini tidak dihentikan dengan cepat maka ikatan glikosida antara glikon dan aglikon yang terurai dalam proses hidrolisis dapat terbentuk kembali. Reaksi tersebut akan menghasilkan produk samping yang tidak berbahaya yaitu berupa garam  $\text{NaCl}$ . Reaksi penetralan pembentukan garam adalah (Fasya, dkk. 2016):



Gambar 2.5. Reaksi antara asam klorida dengan natrium bikarbonat

Setelah dilakukan proses hidrolisis isolasi senyawa steroid dapat dilanjutkan dengan partisi. Hal tersebut karena senyawa steroid merupakan senyawa nonpolar namun diekstraksi dengan pelarut polar maka perlu dilakukan partisi dengan pelarut nonpolar. Anggraeni, dkk. (2014) memvariasi jenis pelarut untuk partisi dari ekstrak metanol *Chlorella sp.* Dari semua pelarut yang digunakan yaitu *n*-heksana, petroleum eter, kloroform, dan etil asetat. Fraksi petroleum eter merupakan fraksi terbaik dengan nilai  $\text{LC}_{50}$  sebesar 27,26 ppm. Utami, dkk., (2014) melakukan uji aktifitas antibakteri fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter dan *n*-heksana dari ekstrak metanol *Chlorella sp.* Fraksi petroleum eter memiliki aktifitas tertinggi dibandingkan fraksi lainnya. Zona hambat yang dihasilkan fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter dan *n*-heksana secara berturut-turut 4,6 mm, 2,3 mm, 10 mm, dan 5,2 mm.

### 2.3.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan kromatografi paling sederhana dengan bentuk kromatografi planar yang memisahkan campuran analit berdasarkan distribusi komponen tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Prinsip kerja KLT adalah dengan menotolkan cuplikan atau sampel pada lempeng KLT, kemudian lempeng dimasukkan ke dalam wadah berisi fase gerak sehingga komponen-komponen dalam sampel tersebut terpisah. Komponen yang mempunyai afinitas besar terhadap fase gerak atau afinitas yang lebih kecil terhadap fase diam akan bergerak lebih cepat dibandingkan komponen dengan sifat sebaliknya (Gritter dkk, 1991). Pada KLT, pemisahan masing-masing komponen dinyatakan dengan faktor retardasi atau faktor perlambatan (nilai  $R_f$ ). Nilai  $R_f$  dapat diketahui dengan mengukur jarak tempuh analit pada plat dan dibandingkan dengan jarak tempuh dari fase gerak (Braithwaite & Smith, 1999).

Fase diam pada KLT terdiri dari lempeng silika, tanah diatome, alumina dan serbuk selulosa. Plat yang paling sering digunakan adalah plat silika gel. Fase gerak pada sistem KLT berupa campuran pelarut yang ditempatkan dalam bejana pengembang. Pelarut sangat berpengaruh pada distribusi analit, sehingga perlu diperhatikan polaritas dan kekuatan elusinya. Sistem pelarut yang paling sederhana adalah campuran dua pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut ini mudah diatur untuk mengoptimalkan pemisahan (Braithwaite & Smith, 1999).

Untuk identifikasi dari senyawa yang terpisah dari lapisan tipis menggunakan harga  $R_f$ . Harga  $R_f$  untuk senyawa murni dapat digunakan perbandingan sebagai berikut (Sastrohamidjojo, 2005):

$$\text{Harga } R_f = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}} \dots\dots\dots (2.1)$$

Daya pisah (Resolusi) harus baik untuk memastikan tidak ada *overlapping* antara dua pucak yang dipisahkan. Nilai resolusi yang baik dalam kromatografi harus mendekati atau lebih dari 1,5. Rumus untuk mengitung resolusi dalam KLT sebagai berikut (Rohman, 2009):

$$R_s = \frac{d}{(W_1+W_2)\sqrt{2}} \dots\dots\dots (2.2)$$

Dimana :

$R_s$  = Resolusi

$d$  = Jarak antara 2 spot

$W$  = lebar bercak

#### 2.4 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis merupakan alat yang dapat digunakan untuk menentukan absorbansi (daya penyerap) sebuah larutan terhadap sinar yang mempunyai warna tertentu. Absorbansi tersebut seimbang dengan konsentrasi zat (ion) yang bersifat warna. Untuk senyawa berwarna akan memiliki satu atau lebih penyerapan spektrum yang tertinggi di daerah spektrum tampak (400-700 nm). Spektrum yang terserap pada ultra violet (200-400 nm) dan daerah nampak terjadi karena adanya perubahan energi electron terluar dari molekul yang disebabkan adanya ikatan atau bukan ikatan (Sudarmadji, 1996). Spektrometri merupakan metode pengukuran yang didasarkan pada interaksi radiasi elektromagnetik dengan partikel, dan akibat dari interaksi tersebut menyebabkan energi diserap atau dipancarkan oleh partikel dan dihubungkan pada konsentrasi analit dalam

larutan. Prinsip dasar dari spektrofotometri UV-Vis adalah ketika molekul mengabsorpsi radiasi UV atau visible dengan panjang gelombang tertentu, elektron dalam molekul akan mengalami transisi atau pengeksitasian dari tingkat energi yang lebih rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi dan sifatnya karakteristik pada tiap senyawa. Penyerapan cahaya dari sumber radiasi oleh molekul dapat terjadi apabila energi radiasi yang dipancarkan pada atom analit besarnya tepat sama dengan perbedaan tingkat energi transisi elektronnya (Rudi, 2004).

Sinar ultraviolet dan sinar tampak memberikan energi yang cukup untuk terjadinya transisi elektronik. Dengan demikian, spektra ultraviolet dan spektra tampak dikatakan sebagai spektra elektronik. Keadaan energi yang paling rendah disebut dengan keadaan dasar (*ground state*). Transisi-transisi elektronik akan meningkatkan energi molekuler dari keadaan dasar ke satu atau lebih tingkat energi tereksitasi. Jika suatu molekul sederhana dikenai radiasi elektromagnetik maka molekul tersebut akan menyerap radiasi elektromagnetik yang energinya sesuai (Gandjar, 2007).

Steroid yang terdapat pada suatu sampel dapat dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Etika (2014) mengisolasi steroid dari daun mengkudu (*Morinda citrifolia L.*), dihasilkan Spektrofotometer ultra violet (UV) dengan pelarut metanol memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 203 nm. Menurut literature pada panjang gelombang 203 nm menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi merupakan senyawa stigmasterol. Selain itu penelitian yang dilakukan Mukharromah dan suyatno (2014), mengisolasi metabolit sekunder dari ekstrak

diklorometana kulit batang bakau merah (*Rhizophora stylosa*). Isolat diuji menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard menunjukkan perubahan warna menjadi biru kehijauan, hal itu menunjukkan bahwa isolat tersebut positif senyawa golongan steroid. Kemudian diuji menggunakan spektroskopi UV-Vis isolat terdapat puncak dengan serapan maksimum pada daerah panjang gelombang 208 nm. Kromatografi gas-spektroskopi massa (GC-MS), isolat merupakan campuran dari 3 senyawa yang masing-masing memiliki massa molekul relatif 400 (A), 412 (B) dan 414 (C) dengan persen luas area masing-masing 2,35; 3,58 dan 94,07. Hasil identifikasi dapat disimpulkan berdasarkan indeks library bahwa senyawa tersebut adalah kampesterol (ergost-5-en-3-ol) dengan rumus molekul  $C_{28}H_{48}O$ , stigmasterol (stigmast-5,22-dien-3-ol) dengan rumus molekul  $C_{29}H_{48}O$ , dan  $\beta$ -sitosterol (stigmast-5-en-3-ol) dengan rumus molekul  $C_{29}H_{50}O$ .

## 2.5 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan LC-MS

*Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS) merupakan kromatografi cair yang memiliki detektor massa sehingga dapat memisahkan sekaligus mengidentifikasi massa dari sampel yang dipisahkan. Suatu sampel yang dianalisis akan dipisahkan dalam kromatografi cair kemudian ditembak oleh elektron yang berenergi tinggi. Penembakan tersebut akan menyebabkan lepasnya sebuah elektron dari suatu sampel membentuk suatu ion organik. Ion yang dihasilkan oleh penembakan elektron tersebut tidak stabil dan pecah menjadi fragmen kecil, baik dalam bentuk radikal maupun ion positif dan negatif. Dalam

sebuah spektroskopi massa yang khas, fragmen yang bermuatan positif akan dideteksi oleh rekorder (Supratman, 2010).

MS (Spektrometer massa) bekerja dengan mengionkan molekul dan memilih berdasarkan rasio fragmentasi ( $m/z$ ). Beberapa komponen yang harus terdapat dalam MS yaitu sumber ion dan analisis massa. Komponen tersebut memiliki berbagai jenis yang akan disesuaikan berdasarkan kepolaran senyawa serta kelebihan dan kekurangan masing-masing. Berikut beberapa komponen yang ada dalam MS (Primer, 2001) :

**a. Sumber Ion**

LC-MS dalam mengionisasi senyawa menggunakan system antar muka dinilai kurang efektif untuk memisahkan fase gerak dan analit. Molekul analit akan terionisasi pada kondisi *vacuum*, hal ini terjadi pada ionisasi elektron tradisional. Sehingga digunakanlah ionisasi tekanan atmosfer yang memiliki kelebihan dimana dapat memperluas jumlah senyawa yang dapat dianalisis. Kemudian molekul-molekul analit akan terionisasi terlebih dahulu pada tekanan atmosfer secara mekanis dan elektrostatis akan terpisah dari inti molekulnya. Berikut beberapa teknik ionisasi LC/MS diantaranya (Primer, 2001):

1. Ionisasi elektropray (*Electrospray Ionization/ESI*)

Metode ini bergantung pada pelarut yang digunakan agar analit dapat mengion sebelum masuk ke spektrofotometer massa. Kemudian eluen LC dan gas yang dipanaskan akan masuk dalam bidang elektstatik. Masuknya gas akan menyebabkan menyusutnya analit karena menguapnya pelarut. Selanjutnya ion yang keluar dalam bentuk fasa gerak akan tertarik dan melewati pipa kapiler menuju analisis massa. Ionisasi elektropray berguna untuk analisis protein,

peptida dan oligonukleotida serta dapat menganalisa molekul kecil seperti benzodiapin.

## 2. Ionisasi Kimia Tekanan Atmosfer (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization/APCI*)

Metode ini menggunakan eluen yang disemprotkan melalui pemanas bersuhu tinggi (200 °C – 400 °C) pada tekanan atmosfer. Cairan akan menguap karena adanya uap panas yang timbul dari pemanas. Fase gas pelarut yang dihasilkan akan terionisasi dan ion-ionnya akan mentransfer muatan pada molekul analit. Ion dari analit akan melewati pipa kapiler menuju spektrometer massa. APCI biasanya digunakan pada kromatografi fase normal karena analit yang digunakan merupakan fasa normal.

Proses identifikasi steroid menggunakan LC/MS dengan dilengkapi APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) mode positif sebagai sumber ionisasi. Menurut Diaz (2006) APCI dapat menganalisa m/z dengan range 70 - 1000. Sistem LC menggunakan alliance 2695 lengkap dengan autosampler, degasser, dan pemanas kolom. Sistem MS menggunakan ZQ 2000 *single quadropole*. Sehingga diperoleh data dengan menggunakan software MassLynx 4.0. Kolom yang digunakan adalah C<sub>18</sub> 150 x 2,1 mm dengan fase gerak asetonitril/air (0,01% asam asetat) dengan laju alir 0,5 mL/menit.

## 3. Photoionisasi Tekanan Atmosfer (*Atmospheric Pressure Photoionization/APPI*)

Metode photoionisasi tekanan atmosfer ionisasi dilakukan dengan mengubah eluen LC menjadi fase gas. Foton yang dihasilkan oleh lampu dengan energi ionisasi dalam kisaran yang kecil. Kisaran energi dipilih merupakan energi

yang mampu mengionisasi analit dan mampu meminimalkan adanya ionisasi pelarut. Ion yang dihasilkan kemudian menuju pipa kapiler dan menuju penganalisa masa. LC/MS digunakan untuk menganalisa senyawa yang sangat nonpolar dengan laju alir rendah.

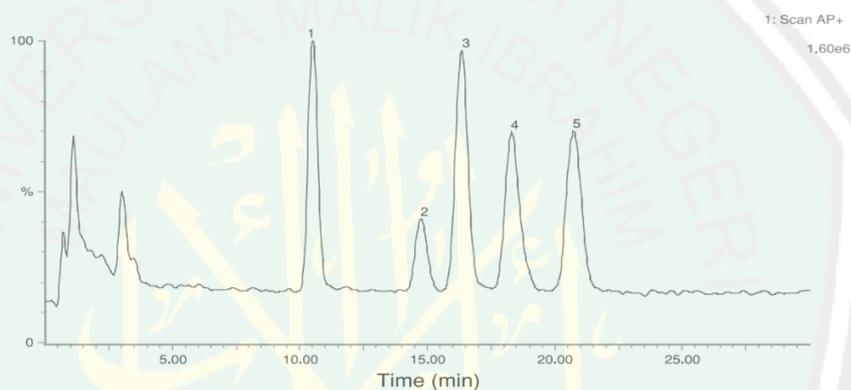
**b. Analisa Massa (*mass analyzer*)**

Adapun 4 jenis analisa massa yang sering digunakan dalam analisa, yaitu:

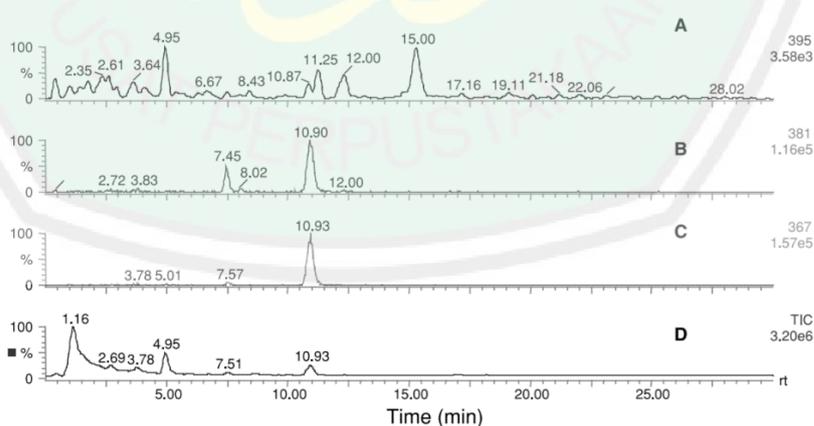
1. *Quadropole*: Metode ini terdiri atas empat batang parallel yang diatur dalam persegi yang ditengah persegi dialirkan ion analit. Bidang ini digunakan untuk menentukan rasio massa dari senyawa yang dianalisa dapat melewati bagian filter dengan waktu tertentu.
2. *Time of Flights*: Analisa ini digunakan untuk semua ion dengan menggunakan gaya elektrostatis yang menyebabkan ion akan dipercepat melewati tabung analisa massa. Fragmentasi ion analisa massa jenis *Time of flights* ditentukan oleh kedatangan ion pada detektor. Kisaran massa senyawa hasil analisa yang diperoleh lebih luas dan akurat.
3. Perangkap ion: Perangkap ion terdiri atas elektroda melingkar cincin dua penutup di dua ujungnya membentuk sebuah ruang. Ruang tersebut digunakan untuk menjebak ion dengan medan elektromagnetik sedangkan bagian lain digunakan untuk mengeluarkan ion dengan memilihnya dari perangkap.
4. *Fourier Transform-Ion Resonance (FT-ICR)*: FT-ICR merupakan bentuk lain dari perangkap ion. Ion yang telah masuk ruangan akan terjebak dalam lingkaran orbit oleh medan listrik dan medan magnet yang kuat dalam perangkat ion. Eksitasi dilakukan oleh frekuensi radio (RF) dalam medan listrik, ion dapat menghasilkan arus bergantung dengan waktu. Arus yang

dihasilkan akan dikonversi menjadi frekuensi orbital sesuai dengan rasio massa muatan relatifnya oleh fourier.

Machado, dkk. (2004) melakukan pemisahan sterol pada rumput laut coklat dan merah kemudian diidentifikasinya menggunakan HPLC-MS dengan mode APCI. Jenis sterol yang dihasilkan oleh rumput laut coklat adalah 24-methylenecholesterol dan fucosterol, sedangkan pada rumput laut merah sterol yang adalah desmosterol dan  $\beta$ -sitosterol. Berikut kromatogram HPLC-MS yang terbentuk :



Gambar 2.6 Kromatogram standar dari senyawa (1) desmosterol, (2) fucosterol, (3) kolesterol, (4) stigmasterol + campesterol, (5)  $\beta$ -sitasterol



Gambar 2.7 Kromatogram dari rumput laut merah. (a) deteksi pada m/z 395, (b) m/z 381, (c) m/z 367 dan (d) mode *full scan*

## **BAB III**

### **METODOLOGI**

#### **3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Biologi Universitas Brawijaya Malang dan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Januari – Mei 2017.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas (Iwaki), neraca analitik, mortar, pisau, kertas saring, corong buchner (Iwaki), rotary evaporator, shaker, vortex, corong pisah (Iwaki), oven, desikator, seperangkat pipet volume (Iwaki), seperangkat pipet ukur (Iwaki), pipet tetes, bejana kromatografi, sentrifuge, plat KLT GF<sub>254</sub>, spektrofotometer UV-Vis, LC-MS merk ACCELLA type 1250 dan MS/MS triple Q (Quadrupole) spectrometer massa TSQ QUANTUM ACCESS MAX.

##### **3.2.2 Bahan**

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini alga merah (*Eucheuma cottonii*) yang berasal dari pantai Wongsorejo Banyuwangi, metanol p. a, *petroleum eter* p. a, akuades, HCl 2 N, natrium bikarbonat, n-heksana, etil asetat, dan reagen Lieberman-Buchard (kloroform, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, asam asetat anhidrat).

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian eksperimental di laboratorium. Alga merah yang telah diambil diuji taksonomi untuk mengidentifikasi jenis makro alga yang digunakan dalam penelitian. Sampel alga merah (*Eucheuma cottonii*) dibersihkan dengan cara dicuci, dipotong-potong dan ditentukan kadar air basahnya. Kemudian dikeringkan di bawah naungan (tanpa sinar matahari langsung). Sampel yang telah kering dihaluskan dan diayak menggunakan ayakan 60-90 mesh. Serbuk yang didapatkan ditentukan nilai kadar airnya, kemudian dimaserasi selama 3x24 jam menggunakan metanol dengan perbandingan 1:5 sampai semua senyawa di dalamnya terambil oleh pelarut. Hasil maserasi dipekatkan menggunakan *rotary vacum evaporator* kemudian dihidrolisis menggunakan HCl 2 N dan dipartisi menggunakan petroleum eter. Hasil partisi dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui kandungan steroid dengan pereaksi Lieberman-Buchard. Isolasi senyawa dilakukan dengan KLTA pada komposisi eluen yang berbeda. Kemudian hasil isolasi terbaik dilakukan KLTP dan diuji kemurnian dengan KLT dua dimensi. Selanjutnya diidentifikasi hasil isolat menggunakan LC-MS dan spektrofotometer UV-Vis

### 3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Uji taksonomi.
2. Preparasi sampel.
3. Ekstraksi sampel menggunakan metode maserasi menggunakan metanol.
4. Hidrolisis dan ekstraksi cair-cair (partisi) dari ekstrak pekat metanol.

5. Uji fitokimia senyawa steroid.
6. Pemisahan senyawa steroid dari hasil partisi dengan KLTA, KLTP dan KLT dua dimensi.
7. Identifikasi isolat steroid dengan menggunakan spektroskopi UV-Vis
8. Identifikasi isolat steroid dengan menggunakan LC-MS

### 3.5 Cara Kerja

#### 3.5.1 Uji Taksonomi (Andriani, 2015)

Uji taksonomi alga merah *Eucheuma cottonii* dari perairan Wongsorejo dilakukan secara kualitatif di laboratorium Biologi Universitas Brawijaya Malang.

#### 3.5.2 Preparasi Sampel (Andriani, 2015)

Sampel yang digunakan merupakan sampel alga merah *Eucheuma cottonii* sebanyak 10 Kg dicuci dengan air, kemudian diiris kecil dan dikeringkan menggunakan panas matahari secara tidak langsung dan dengan menggunakan oven pada suhu 37-38 °C selama 24 jam. Setelah proses pengeringan alga merah dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan 60 – 90 mesh.

#### 3.5.3 Ekstraksi Sampel dengan Maserasi (Andriani, 2015)

Ekstraksi komponen aktif dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi atau perendaman. Serbuk alga merah yang telah dikeringkan ditimbang sebanyak 100 g dan diekstraksi secara maserasi menggunakan 500 mL pelarut metanol. Perendaman dilakukan selama 24 jam dengan pengocokan menggunakan shaker dan kecepatan 150 rpm. Setelah itu, dilakukan penyaringan menggunakan corong buchner. Ampas yang diperoleh dimaserasi kembali menggunakan pelarut yang sama sebanyak 3 kali pengulangan dengan perlakuan yang sama, setelah itu dilakukan penyaringan. Ketiga filtrat yang diperoleh digabung menjadi satu.

Kemudian dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator*. Ekstrak pekat ditimbang lalu dihitung rendemennya.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \dots\dots\dots(3.1)$$

### 3.5.4 Hidrolisis dan Ekstraksi Cair-cair (Partisi) Ekstrak Metanol (Andriani, 2015)

Diambil ekstrak pekat metanol alga merah *Eucheuma cottonii* sebanyak 5 gram, dimasukkan ke dalam *beaker glass*, kemudian dihidrolisis dengan menambahkan 10 mL asam klorida (HCl) 2N ke dalam ekstrak pekat dengan perbandingan (1:2). Hidrolisis dilakukan selama 1 jam menggunakan *magnetik stirer hot plate* pada suhu ruang. Hidrolisis yang diperoleh ditambahkan dengan natrium bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) sampai pH-nya netral, lalu hasil hidrolisis dipartisi dengan 25 mL pelarut petroleum eter. Dipartisi kembali sampai 3 kali pengulangan dengan pelarut petroleum eter (3 x 25 mL). Ekstrak hasil partisi dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator*, ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemennya.

### 3.5.5 Uji Fitokimia Senyawa Steroid (Andriani, 2015)

Fraksi petroleum eter *Eucheuma cottonii* dimasukkan ke dalam tabung reaksi, selanjutnya dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform. Kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrida dan 1 – 2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung. Jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya golongan senyawa steroid.

### **3.5.6 Pemisahan Steroid Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (Khoiriyah, 2015)**

#### **3.5.6.1 Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)**

Pemisahan dengan KLTA digunakan plat silica gel. Masing-masing plat diukur dengan  $2 \times 10 \text{ cm}^2$ . Sampel ditotolkan pada dua titik sebanyak 15 totolan pada jarak  $\pm 1 \text{ cm}$  dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler. Kemudian dikeringkan dan dielusi dengan menggunakan variasi fase gerak. Setelah gerakan fase gerak sampai pada garis batas, elusi dihentikan. Noda-noda pada permukaan plat diperiksa di bawah UV pada panjang gelombang  $366 \text{ nm}$ . Kemudian plat KLTA disemprot menggunakan reagen Lieberman Buchard. Kemudian dihitung nilai  $R_f$  nya, bentuk noda pada berbagai fase gerak. Selanjutnya diulang sebanyak 3 kali untuk memastikan ketepatan dan keakuratan hasil yang diperoleh. Hasil pemisahan terbaik digunakan sebagai acuan pemisahan menggunakan KLT preparatif. Eluen yang digunakan adalah petroleum eter dan etil asetat dengan komposisi sebagai berikut

- a. Petroleum eter : etil asetat (18:2)
- b. Petroleum eter : etil asetat (17:3)
- c. Petroleum eter : etil asetat (16:4)
- d. Petroleum eter : etil asetat (15:5)
- e. Petroleum eter : etil asetat (14:6)

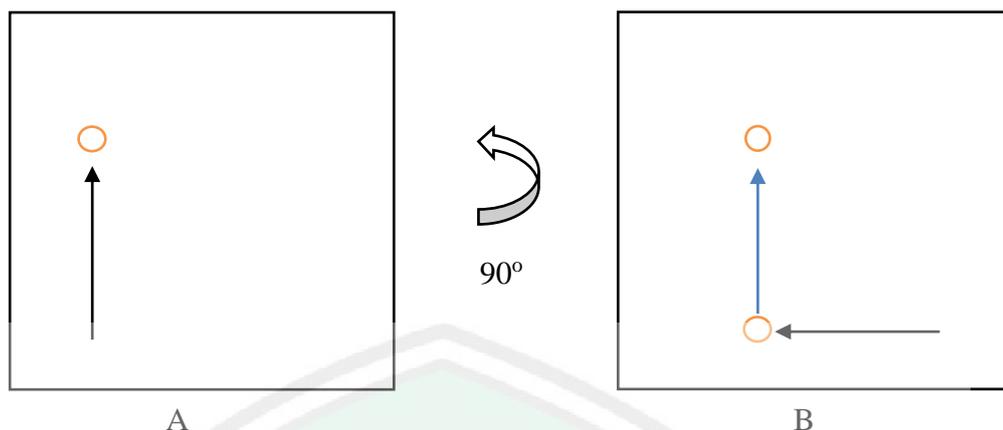
#### **3.5.6.2 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)**

Pemisahan dengan KLTP menggunakan plat silica gel GF<sub>254</sub> dengan ukuran  $10 \times 20 \text{ cm}$ . Ekstrak ditotolkan sepanjang plat pada jarak  $1 \text{ cm}$  dari tepi bawah dengan pipa kapiler sebanyak 10 totolan. Kemudian dikeringkan dan dielusikan sejauh  $18 \text{ cm}$  dengan eluen terbaik hasil KLTA. Setelah sampai pada

garis batas, elusi dihentikan. Plat KLT dipotong  $\pm 1$  cm pada tepi samping, kemudian disemprot menggunakan reagen Lieberman Buchard. Setelah itu plat dikeringkan, noda yang terbentuk diamati dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm dan dihitung nilai Rf-nya. Noda yang diduga steroid dikerok dan dilarutkan dalam pelarut petroleum eter. Kemudian disentrifugasi untuk mengendapkan silikanya, filtrat hasil sentrifugasi didiamkan selama 1 jam lalu didekantasi. Filtrat hasil dekantasi digunakan dalam analisis KLT 2D dan identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan LC-MS.

### 3.5.6.3 Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi (Lestari, 2015)

Isolat yang diperoleh dari hasil KLTP yang diduga senyawa steroid dilakukan uji kemurnian menggunakan KLT dua dimensi. pada pemisahan KLT dua dimensi digunakan plat silika gel GF<sub>254</sub> dengan ukuran 10x10 cm. Isolat pekat ditotolkan pada plat dengan jarak 1 cm dari tepi bawah dan 1 cm dari tepi kiri plat. Kemudian dikembangkan dengan satu sistem gerak pertama menggunakan n-heksana : etil asetat (4:1) sehingga campuran terpisah menurut jalur yang sejajar dengan salah satu sisi. Plat silica diangkat dari *chamber* dan dikeringkan, selama 5-10 menit. Diamati noda yang terbentuk dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. Plat diputar 90° dan diletakkan dalam bejana kromatografi yang berisi fase gerak kedua yaitu benzena : etil asetat (3:2), sehingga bercak yang terpisah pada pengembangan pertama terletak dibagian bawah sepanjang lempeng. Kemudian dikromatografi kembali, diamati noda yang terbentuk dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. Dan dihitung nilai Rfnya. Adapun gambar ilustrasi elusi pada KLT dua dimensi ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Elusi KLT 2 dimensi, a. elusi pertama dan b elusi kedua.

### 3.5.7 Identifikasi Isolat Kromatografi Lapis Tipis Preparatif Menggunakan Spektroskopi UV-Vis

Sebanyak 2 mL isolat hasil pemisahan dengan KLTP dimasukkan ke dalam kuvet. Pada blanko, pelarut petroleum eter dimasukkan kedalam kuvet dan dianalisis pada panjang gelombang 200-800 nm, selanjutnya sampel dianalisis pada panjang gelombang dengan rentang 200 – 800 nm sehingga akan diperoleh spektrum dan panjang gelombang maksimum. Hasil yang diperoleh merupakan panjang gelombang maksimum senyawa steroid.

### 3.5.8 Identifikasi Fraksi Petroleum Eter dan Isolat Kromatografi Lapis Tipis Preparatif Menggunakan LC-MS (Azizah ,2016)

Hasil fraksi petroleum eter dan hasil pemisahan KLTP dianalisa menggunakan LC-MS. Kolom yang digunakan dengan spesifikasi *hypersil gold* (50 mm x 2,1 mm x 1,9  $\mu\text{m}$ ). UHPLC merk ACCELLA *type* 1250 buatan *Thermo Scientific* yang terdiri dari *degasser* vakum, pompa *quartener*, *autosampler* *thermostatic* yang dikendalikan oleh computer melalui program *x-calibur 2.1*. Fasa gerak yang digunakan adalah 0,1% asam format dalam air (fasa A) dan 0,1%

asam format dalam asetonitril (fase B). Pengaturan eluen secara gradient linier 100% (A) : 0% (B) sampai 0% (A) : 100% (B) yang diatur selama 5 menit dengan laju alir 500  $\mu\text{L}/\text{menit}$ . Volume yang diinjeksikan 2  $\mu\text{L}$ . Kolom dikontrol pada suhu 30°C, dan kompartemen autosampler ditetapkan untuk 10°C. MS yang digunakan adalah MS/MS tripe Q (*Quadrupole*) spektrometer massa TSQ QUANTUM ACCESS MAX dari Thermo Finnigan dengan sumber ionisasi APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) dikendalikan oleh software TSQ Tune yang dikendalikan dengan metode positif. Kondisi ion APCI 41 adalah sebagai berikut : arus yang digunakan 4  $\mu\text{A}$ , suhu penguapan 250°C, suhu kapiler 300°C, sheat gas pressure 45 arbitrary units, dan aux gas pressure 15 arbitrary units.

### 3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara destruktif dengan menganalisa hasil pola yang didapatkan dari eluen yang digunakan. Senyawa steroid yang diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan LC-MS dianalisa spektrumnya. Hasil pembacaan dapat digunakan untuk menentukan jenis dari steroid yang ada dalam alga merah (*Eucheuma cottonii*).

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1 Uji Taksonomi**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alga merah yang diperoleh dari perairan Wongsorejo Banyuwangi. Untuk mengetahui jenis dan spesies dari sampel yang akan diteliti dilakukan uji taksonomi. Uji taksonomi alga dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang. Berdasarkan identifikasi yang dilakukan diketahui bahwa alga merah yang berasal dari perairan Wongsorejo Banyuwangi merupakan spesies *Eucheuma cottonii* disajikan pada Lampiran 4.

#### **4.2 Ekstraksi Steroid Dari Alga Merah *Eucheuma cottonii***

Ekstraksi steroid dari alga merah *Eucheuma cottonii* dilakukan melalui beberapa tahap yaitu preparasi sampel dan ekstraksi. Sampel dicuci untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada alga. Setelah itu, sampel dikeringkan agar dapat dijadikan serbuk. Proses pengeringan sampel dilakukan dengan cara dikeringanginkan dibawah naungan, hal ini bertujuan untuk menghindari kerusakan atau hilangnya senyawa aktif yang diinginkan. Pembuatan serbuk akan memaksimalkan ekstraksi. Semakin kecil ukuran sampel maka luas permukaannya akan semakin besar sehingga kontak yang terjadi antara sampel dengan pelarut metanol akan semakin besar. Kemungkinan terjadi pemecahan sel akan semakin besar sehingga memaksimalkan ekstraksi (Voight, 1995).

Ekstraksi bertujuan untuk memisahkan senyawa metabolit sekunder yang ada dalam alga merah *Eucheuma cottonii*. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut metanol. Metanol yang memiliki konsentrasi tinggi akan masuk ke dalam sel *Eucheuma cottonii* melewati dinding sel, sehingga isi sel akan larut dalam metanol sehingga larutan

di dalam sel lebih tinggi konsentrasinya dari larutan di luar sel dan terjadi difusi kembali (Saifudin, 2014). Proses ekstraksi maserasi alga merah *Eucheuma cottonii* dilakukan hingga menghasilkan filtrat yang lebih bening.

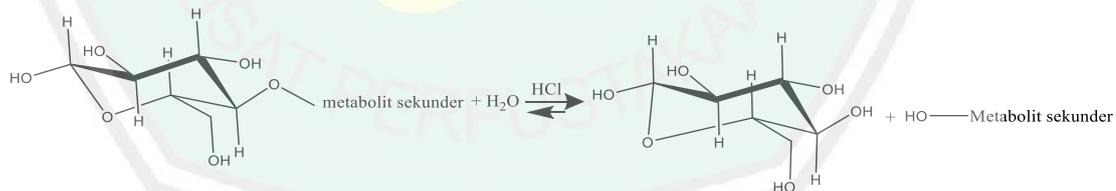
Filtrat hasil maserasi dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* untuk memisahkan pelarut dan ekstrak pekatnya. Proses pemekatan digunakan pompa vacum yang membuat tekanan dalam labu sampel lebih rendah, sehingga pelarut akan mendidih pada suhu yang lebih rendah dari titik didih normalnya dan diperoleh kembali pelarut dalam bentuk cair. Alat ini sering digunakan dalam proses penguapan pelarut dikarenakan memberikan keuntungan dimana ekstrak yang dihasilkan tidak akan mengalami kerusakan akibat panas. Penguapan pelarut dihentikan ketika ekstrak dirasa cukup pekat atau pelarut tidak menetes lagi pada labu penampung pelarut.

Ekstrak metanol alga merah (*Eucheuma cottonii*) yang awalnya berupa larutan berwarna hijau setelah pemekatan diperoleh ekstrak pekat berwarna hijau kehitaman. Rendemen yang dihasilkan dari ekstrak pekat metanol alga merah *Eucheuma cottonii* yaitu sebesar 13,936 % dari 100 g sampel (disajikan pada Lampiran 5). Hasil ekstraksi ini lebih kecil dibandingkan penelitian Andriani, dkk (2015) yang mengekstrak alga merah *Eucheuma cottonii* dari perairan Sumenep Madura dihasilkan rendemen ekstrak sebesar 20,7%. Hal ini dikarenakan sampel

yang digunakan berasal dari tempat yang berbeda yaitu dari Sumenep Madura. Kondisi lingkungan yang berbeda akan mempengaruhi jumlah senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan. Hal ini karena senyawa metabolit sekunder digunakan untuk melindungi tumbuhan dari gangguan lingkungan sehingga produksinya bergantung pada kondisi lingkungan.

### 4.3 Hidrolisis dan Partisi Menggunakan Petroleum Eter

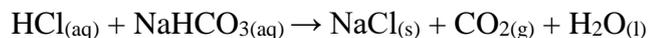
Hidrolisis merupakan reaksi pemutusan ikatan kimia oleh molekul air. Reaksi hidrolisis menggunakan air berlangsung sangat lambat sehingga memerlukan suatu katalis asam seperti HCl. Hidrolisis dengan katalis HCl dilakukan untuk memutuskan ikatan glikosida antara senyawa metabolit sekunder (aglikon) dengan gula (glikon) karena kebanyakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat di alam masih berikatan dengan gula membentuk ikatan glikosida. Proses hidrolisis pada penelitian ini menggunakan pengadukan *magnetic stirrer* dan katalis asam yaitu HCl 2 N. Reaksi hidrolisis disajikan pada Gambar 4.1



Gambar 4.1 Reaksi hidrolisis metabolit sekunder

Reaksi hidrolisis merupakan reaksi reversible (bolak-balik), sehingga apabila tidak dihentikan maka akan terbentuk ikatan glikosida kembali. Pada penelitian ini dilakukan penambahan natrium bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) yang berfungsi untuk menetralkan dan menghentikan reaksi hidrolisis. Pengecekan

kenetralan larutan dapat dilakukan menggunakan pH universal sampai menunjukkan pH 7. Reaksi penetralan yang terjadi saat penambahan natrium bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) jenuh disajikan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Reaksi penetralan asam dengan  $\text{NaHCO}_3$

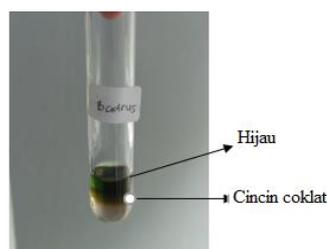
Hidrolisat yang diperoleh kemudian dipartisi menggunakan pelarut petroleum eter. Metabolit sekunder golongan steroid bersifat non-polar sehingga dapat larut dalam pelarut organik seperti petroleum eter. Ekstraksi cair-cair (partisi) bertujuan untuk memisahkan metabolit sekunder yang telah terlepas ikatannya dari gugus gula akibat proses hidrolisis. Proses partisi perlu didiamkan sampai terjadi pemisahan yang sempurna dan terbentuk dua lapisan fase cair. Komponen kimia akan terpisah ke dalam dua fase tersebut sesuai dengan tingkat kepolarannya. Hasil partisi menunjukkan terbentuknya dua lapisan yang tidak saling campur yaitu fase air yang bersifat polar dan fase organik (petroleum eter) yang bersifat non polar. Proses partisi dilakukan dengan tiga kali pengulangan sampai lapisan bawah berwarna bening.

Lapisan air akan mengekstrak komponen gula (glikon) sedangkan lapisan petroleum eter mengekstrak metabolit sekunder (aglikon) yang telah terpisah dengan komponen gulanya. Fraksi petroleum eter berada di atas karena densitas petroleum eter lebih kecil dari air yaitu 0,77 g/mL sedangkan densitas air yaitu 1 g/mL. Ekstrak hasil partisi kemudian dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator*. Nilai rendemen fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah *Eucheuma cottonii* pada penelitian ini yaitu sebesar 12,132 % (disajikan pada Lampiran 5). Hasil ini lebih besar dari pada penelitian

sebelumnya yang dilakukan oleh Andriani, dkk (2015) yang mendapatkan rendemen 3,14%, perbedaan rendemen ini dikarenakan sampel berasal dari tempat yang berbeda sehingga dimungkinkan jumlah dan kandungan senyawa metabolit sekunder berbeda.

#### 4.4 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan golongan senyawa aktif yang terdapat dalam sampel alga merah *Eucheuma cottonii* dengan penambahan reagen. Reagen yang digunakan pada uji fitokimia senyawa steroid yaitu reagen Lieberman-Burchad. Uji Reagen Lieberman-Burchad merupakan uji reagen spesifik yang digunakan pada senyawa steroid dan triterpenoid. Pereaksi Lieberman-Burchad merupakan campuran antara anhidrida asetat dan  $H_2SO_4$  pekat. Siadi (2012) menyatakan bahwa ketika ditetesi  $H_2SO_4$  pekat melalui dinding tabung reaksi, maka  $H_2SO_4$  akan bereaksi dengan anhidrida asetat sehingga akan mengalami proses asetilasi yaitu terbentuknya karbokation pada atom C anhidrida asetat. Karbokation yang terbentuk akan bereaksi dengan atom O pada gugus  $-OH$  yang ada pada senyawa steroid, reaksi yang terjadi merupakan reaksi esterifikasi yaitu pembentukan senyawa ester pada senyawa steroid dengan anhidrida asetat. Kemudian reaksi berlanjut sampai terbentuknya warna hijau. Hasil uji fitokimia pada alga merah *Eucheuma cottonii* fraksi petroleum eter disajikan pada Gambar 4.3



Gambar 4.3 Hasil uji fitokimia alga merah *Eucheuma cottonii*

Berdasarkan Gambar 4.3 menunjukkan adanya golongan senyawa aktif steroid yang ditandai dengan warna hijau. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Ningsih, dkk., (2015) dan Kholidiyah, dkk., (2013) bahwa pada ekstrak alga merah fraksi n-heksana dan fraksi petroleum eter menunjukkan adanya senyawa steroid. Astuti, dkk., (2014) menyatakan bahwa uji kualitatif senyawa steroid menggunakan pereaksi Lieberman-Burchard menghasilkan warna hijau kebiruan. Sedangkan cincin coklat yang terbentuk menunjukkan adanya senyawa triterpenoid.

#### 4.5 Pemisahan Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)

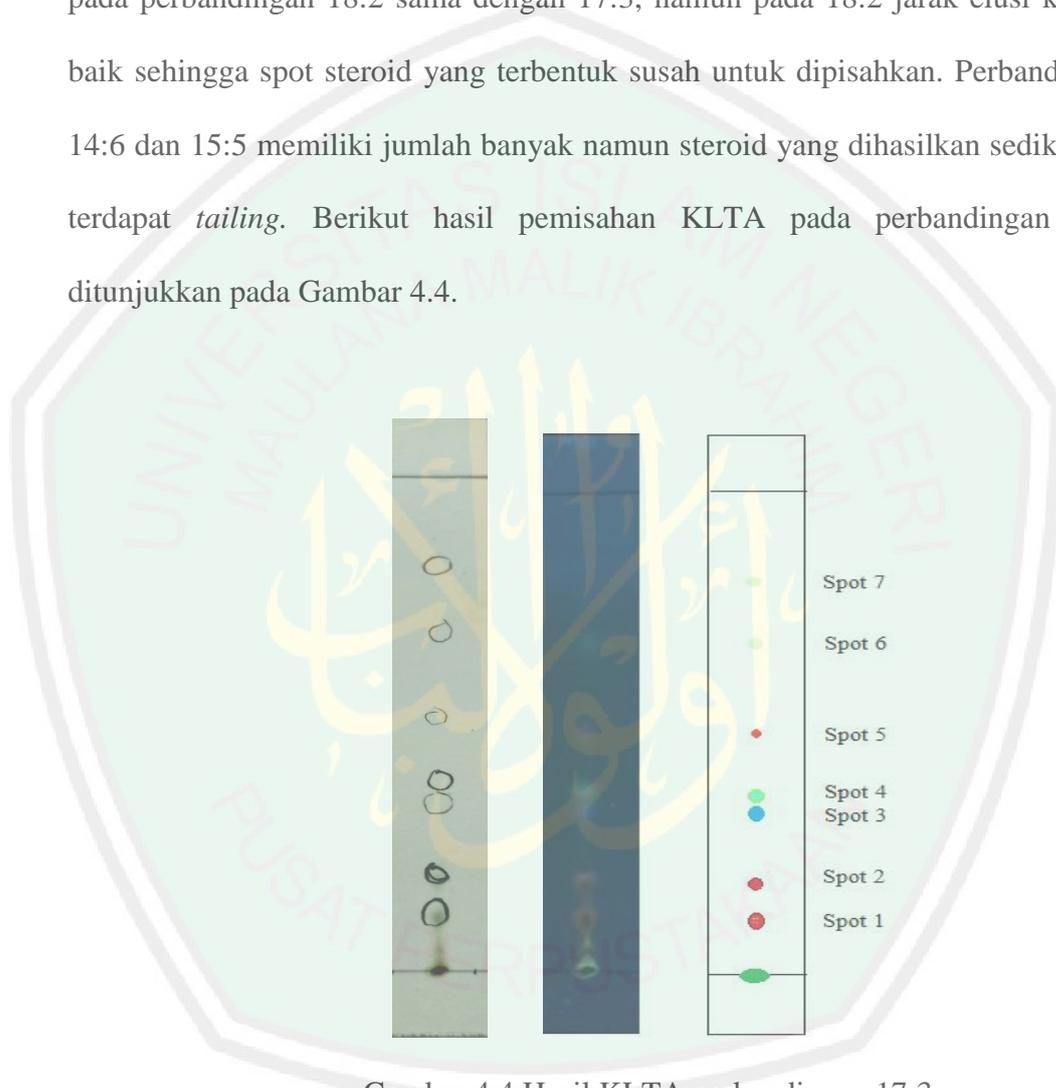
Pemisahan senyawa steroid dalam alga merah *Eucheuma cottonii* dilakukan dengan metode KLT. KLT merupakan metode pemisahan suatu senyawa berdasarkan perbedaan distribusi dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Kromatografi lapis tipis analitik (KLTA) ini digunakan untuk mencari eluen terbaik dalam pemisahan senyawa steroid. Eluen yang baik ditandai dengan banyaknya spot yang muncul, spot yang terbentuk tidak berekor dan jarak antara spot yang satu dengan yang lainnya jelas. Spot yang dihasilkan diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. Pada sinar UV 366 nm, spot akan berfluoresensi dan lempeng akan berwarna gelap, sedangkan pada sinar UV 254 nm lempeng akan ikut terfluoresensi sehingga menghasilkan warna latar hijau. Penampakan warna pada panjang gelombang 254 nm akan menyulitkan penentuan spot sehingga digunakan sinar 366 nm. Penampakan warna pada spot disebabkan adanya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh auksokrom yang terdapat pada spot tersebut (Saifudin, 2014).

Hasil pemisahan KLTA dengan variasi eluen n-heksana dan etil asetat ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil pemisahan KLTA fraksi petroleum eter

No	Perbandingan Eluen	Jumlah spot	Rf	Warna	Senyawa
1	14:6	9	0,137	Merah	Triterpenoid
			0,288	Hijau	<b>Steroid</b>
			0,450	Merah	Triterpenoid
			0,538	Merah	Triterpenoid
			0,600	Merah	Triterpenoid
			0,650	Merah	Triterpenoid
			0,700	Biru	<b>Steroid</b>
			0,750	Merah	Triterpenoid
			0,863	Hijau	<b>Steroid</b>
2	15:5	9	0,150	Hijau	<b>Steroid</b>
			0,288	Merah	Triterpenoid
			0,363	Merah	Triterpenoid
			0,438	Merah	Triterpenoid
			0,513	Ungu	<b>Steroid</b>
			0,650	Merah	Triterpenoid
			0,738	Merah	Triterpenoid
			0,775	Ungu	<b>Steroid</b>
			0,887	Merah	Triterpenoid
3	16:4	7	0,100	Merah	Triterpenoid
			0,250	Merah	Triterpenoid
			0,325	Merah	Triterpenoid
			0,475	Biru	<b>Steroid</b>
			0,500	Hijau	<b>Steroid</b>
			0,700	Merah	Triterpenoid
			0,800	Hijau	<b>Steroid</b>
4	17:3	7	0,100	Merah	Triterpenoid
			0,188	Merah	Triterpenoid
			0,337	Biru	<b>Steroid</b>
			0,375	Hijau	<b>Steroid</b>
			0,500	Merah	Triterpenoid
			0,688	Hijau	<b>Steroid</b>
			0,813	Hijau	<b>Steroid</b>
5	18:2	7	0,050	Merah	Triterpenoid
			0,075	Merah	Triterpenoid
			0,125	Biru	<b>Steroid</b>
			0,212	Hijau	<b>Steroid</b>
			0,262	Merah	Triterpenoid
			0,325	Merah	Triterpenoid
			0,512	Hijau	<b>Steroid</b>

Berdasarkan Tabel 4.1 hasil pemisahan terbaik menggunakan KLTA terdapat pada perbandingan eluen n-heksana dan etil asetat 17:3. Perbandingan eluen tersebut spot yang dihasilkan sebanyak 7 dengan pemisahan yang jelas, selain itu tidak terdapat *tailing* disetiap spotnya. Jumlah spot dan pola pemisahan pada perbandingan 18:2 sama dengan 17:3, namun pada 18:2 jarak elusi kurang baik sehingga spot steroid yang terbentuk susah untuk dipisahkan. Perbandingan 14:6 dan 15:5 memiliki jumlah banyak namun steroid yang dihasilkan sedikit dan terdapat *tailing*. Berikut hasil pemisahan KLTA pada perbandingan 17:3 ditunjukkan pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Hasil KLTA perbandingan 17:3

#### 4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

KLT preparatif dilakukan untuk mendapatkan sampel steroid yang lebih banyak. Ukuran plat yang digunakan pada proses pemisahan menggunakan KLT

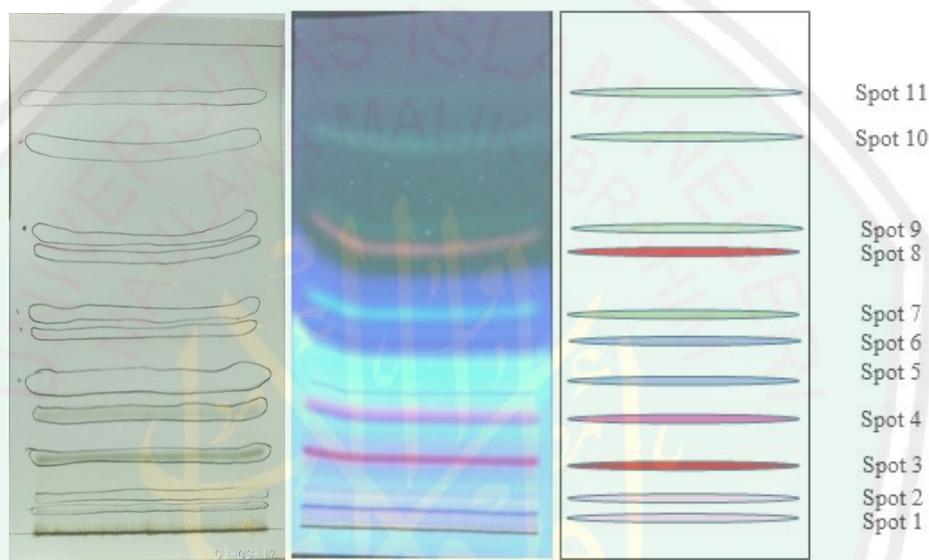
preparatif yaitu 10 x 20 cm. Eluen yang digunakan pada KLT preparatif menggunakan eluen terbaik yang dihasilkan pada KLT analitik yaitu n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17 : 3. Hasil pemisahan menggunakan KLT preparatif terbentuk 11 spot yang ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil pemisahan senyawa steroid menggunakan KLT Preparatif

No	Nilai Rf	Warna Spot	Senyawa	Resolusi (Rs)
1	0,033	Merah	Triterpenoid	0,71
2	0,061	Merah	Triterpenoid	1,42
3	0,139	Ungu	Triterpenoid	1,17
4	0,222	Merah	Triterpenoid	0,77
5	0,294	Biru	<b>Steroid</b>	1,34
6	0,394	Hijau	<b>Steroid</b>	0,81
7	0,439	Biru	<b>Steroid</b>	2,12
8	0,561	Merah	Triterpenoid	0,94
9	0,606	Hijau	<b>Steroid</b>	3,13
10	0,778	Hijau	<b>Steroid</b>	1,72
11	0,894	Hijau	<b>Steroid</b>	

Berdasarkan Tabel 4.2 dapat diketahui terdapat 6 steroid dan 5 triterpenoid. Jumlah spot yang dihasilkan pada KLT preparatif tidak sama dengan KLT analitik namun memiliki pola yang mirip. Jumlah steroid yang semula di KLTA 3 spot pada KLTP menjadi 6 spot. Hal ini dikarenakan jarak elusi yang berbeda, sehingga pada KLTP senyawa yang awalnya masih berhimpit akhirnya

terpisah. Resolusi pemisahan ( $R_s$ ) menunjukkan seberapa baiknya pemisahan yang dihasilkan, nilai  $R_s$  yang baik adalah 1,5. Penelitian ini senyawa yang dipisahkan berjumlah banyak, sehingga dihasilkan nilai  $R_s$  rata-rata dibawah 1,5. Hasil dari KLTP dikerok kemudian dilarutkan menggunakan pelarutnya dan dipisahkan menggunakan *sentrifuge* dan diuapkan pelarutnya. Berikut hasil pemisahan KLTP disajikan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Hasil pemisahan KLTP.

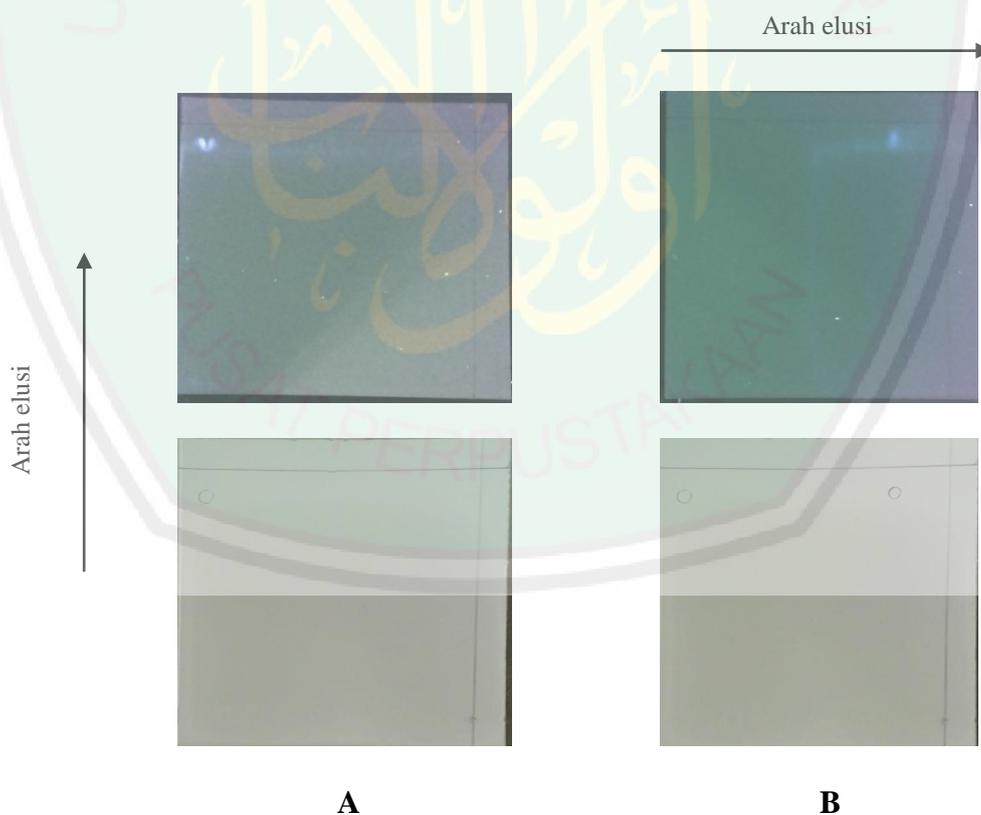
#### 4.7 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis 2 Dimensi

Hasil terbaik dari KLTP dilakukan uji kemurnian menggunakan KLT 2 dimensi. Steroid yang sudah dipisahkan dari silika ditotolkan 1 cm meter tepi bawah dan samping pada plat 10 x 10 cm. Plat kemudian dielusi menggunakan pelarut pertama yaitu benzene : etil asetat dengan perbandingan 3 : 2, setelah itu diamati spot yang terbentuk. Kemudian plat diputar 90° dengan posisi spot berada di bawah. Plat dielusi menggunakan eluen kedua yaitu n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 4 : 1. Hasil pemisahan KLT 2 dimensi ditunjukkan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil Pemisahan steroid menggunakan kromatografi ;apis tipis 2 dimensi

Steroid	Eluen 1	Eluen 2
5	1	3
6	1	2
7	1	2
<b>9</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
10	1	2
11	2	2

Berdasarkan Tabel 4.3 kemurnian steroid yang paling baik adalah steroid nomor 9. Pemisahan pada steroid nomor 9 menghasilkan jumlah spot tunggal pada eluen pertama maupun eluen kedua, hal ini mengindikasikan bahwa steroid tersebut tunggal. Steroid nomor 9 akan digunakan untuk analisa spektroskopi UV-Vis dan LC-MS. Pemisahan terbaik KLT 2 dimensi disajikan pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 (A) Elusi pertama, (B) Elusi kedua

#### 4.8 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Identifikasi steroid menggunakan Spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk mengetahui jenis senyawa steroid yang ada pada sampel berdasarkan panjang gelombang maksimum yang diserap oleh kromofor. Hasil pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis didapatkan serapan maksimum berada pada panjang gelombang 203 nm. Hasil identifikasi disajikan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.7 Hasil spektrum uv-vis steroid kesembilan

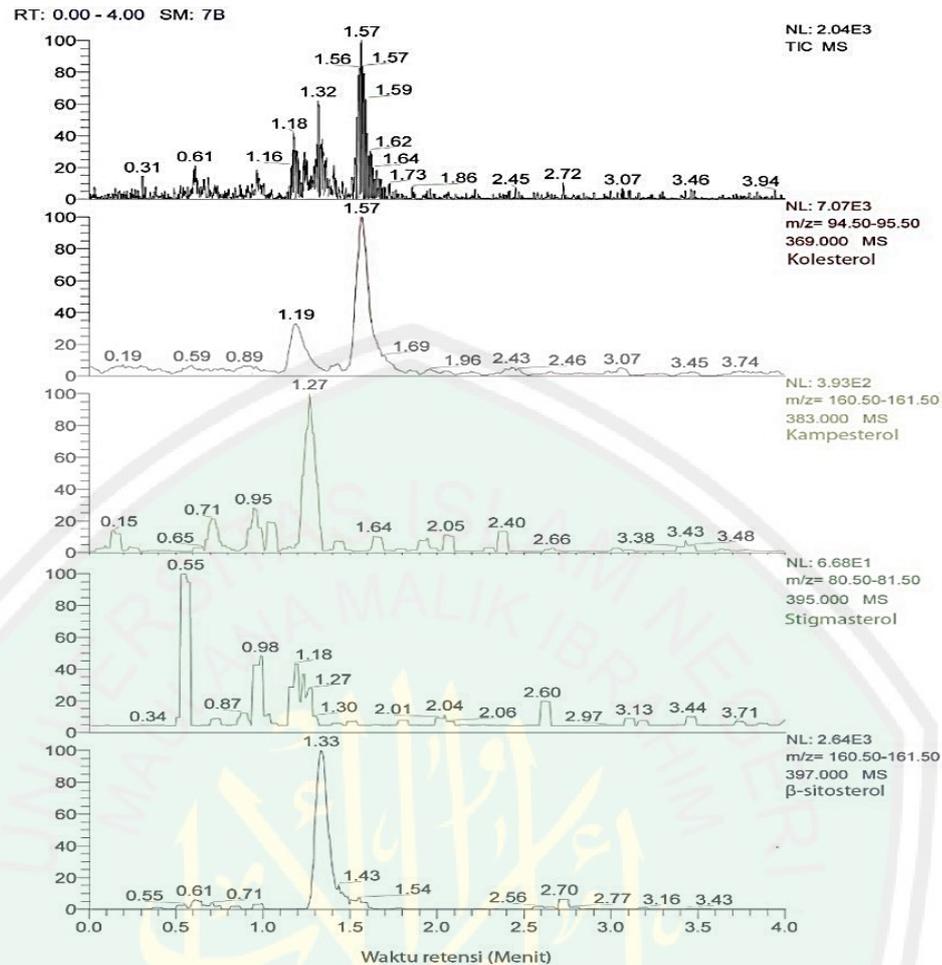
Berdasarkan Gambar 4.7 steroid memiliki panjang gelombang 203 nm yang menunjukkan bahwa tidak terdapat ikatan rangkap yang terkonjugasi. Panjang gelombang tersebut tergolong pada daerah ultraviolet yang disebabkan oleh adanya transisi elektron dari  $\pi$ - $\pi^*$  dari gugus C=C. Bila terjadi ikatan rangkap terkonjugasi dengan kromofor diena maka akan menghasilkan panjang gelombang lebih besar dari 214 nm pada posisi heteroanular dan 253 nm pada posisi homoanular. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Aprelia dan Suyatno (2013) yang melakukan identifikasi senyawa metabolit sekunder pada paku *Christella arida*. Hasil identifikasi menunjukkan serapan maksimum berada pada panjang gelombang 203 nm diduga merupakan steroid jenis *B*-sitosterol. Selain

itu, Etika dan Suryalita (2014) melakukan identifikasi steroid pada daun mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR, <sup>1</sup>H-RMI dan <sup>13</sup>C-RMI. Hasil penelitian menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 203 nm merupakan senyawa steroid jenis stigmasterol. Berdasarkan penelitian di atas dapat disimpulkan steroid nomer 9 pada fraksi petroleum eter diduga merupakan steroid jenis *B*-sitosterol dan stigmasterol. Identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis tidak dapat mengidentifikasi senyawa yang isomer maka dilakukan identifikasi kedua yaitu menggunakan LC-MS/MS untuk mengetahui steroid jenis apa yang terdapat dalam sampel.

#### 4.9 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan LC-MS/MS

*Liquid Chromatograph Massa Spectrometry* (LC-MS) merupakan salah satu alat yang dapat memisahkan suatu senyawa menggunakan kromatografi cair serta mengukur massa dari senyawa yang telah dipisahkan. Pemisahan steroid menggunakan LC-MS dilakukan dengan mode APCI sebagai sumber ion. Mode APCI dapat menganalisa senyawa yang memiliki tingkat kepolaran rendah (non polar) dengan *range*  $m/z$  70 – 1000 (Diaz, 2006). Metode kolom yang digunakan menggunakan mode terbalik dimana kolom bersifat non polar dan eluen bersifat polar. Sehingga senyawa non polar akan lebih tertahan di fase diam dari pada terbawa oleh eluen.

Hasil identifikasi isolat steroid nomor sembilan alga merah *Eucheuma cottoni* fraksi petroleum eter menggunakan LC-MS/MS disajikan pada Gambar 4.8



Gambar 4.8 Kromatogram LC-MS steroid kesembilan.

Berdasarkan Gambar 4.8 dalam steroid sembilan mengandung 4 macam steroid dengan waktu retensi dan m/z yang berbeda. Dugaan jenis steroid hasil identifikasi LC-MS/MS berdasarkan waktu retensi, *Parent Mass* (m/z), dan *daughter product mass* disajikan pada Tabel 4.4

Tabel 4.4 Hasil identifikasi LC-MS/MS steroid kesembilan

Jenis Steoid	Waktu retensi (menit)	Massa Molekul (g/mol)	<i>Parent Mass</i> (m/z)	<i>Daughter Product Mass</i>	NL ( <i>Neutral Lost</i> )
Kolesterol	1,19	386	369	95,5	$7,07 \times 10^3$
Kampesterol	1,27	400	383	161,5	$3,93 \times 10^2$
Stigmasterol	1,27	412	395	81,5	$6,68 \times 10^1$
$\beta$ -sitosterol	1,33	414	397	161,5	$2,64 \times 10^3$

Tabel 4.5 Literatur steroid menggunakan LC-MS

Jenis Steoid	Waktu retensi (menit)	Massa Molekul (g/mol)	<i>Parrent Mass</i> (m/z)	<i>Daughter Product Mass</i>
Kolesterol	9,87	386	369,4	95,2
Kampesterol	11,6	400	383,4	161,2
Stigmasterol	11,95	412	395,4	81,1
$\beta$ -sitosterol	13,78	414	397,4	161

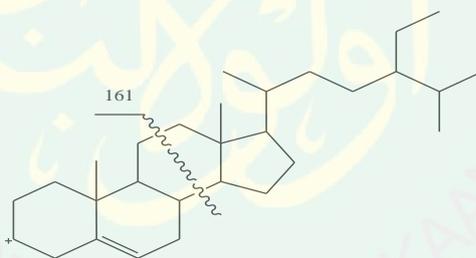
Sumber: Fu dan Joseph (2012)

Berdasarkan Tabel 4.4 hasil identifikasi LC-MS/MS steroid nomor sembilan memiliki perbedaan pada waktu retensi yang signifikan. Hal ini terjadi karena pengoperasian perbedaan LC-MS/MS, pada identifikasi steroid kesembilan waktu maksimum di set pada 4 menit sedangkan pada literatur waktu maksimum di set pada 20 menit. Selain itu hal ini juga dipengaruhi oleh perbedaan laju alir pada eluen (fase gerak). Jika kecepatan laju alir diperlambat maka steroid yang ikut terbawa oleh fase gerak akan memiliki waktu retensi yang lebih besar.

Urutan kepolaran dari steroid ditunjukkan oleh waktu retensi yang dihasilkan. Berdasarkan Tabel 4.4  $\beta$ -sitosterol memiliki kepolaran yang paling kecil (paling non polar) kemudian stigmasterol, kampesterol dan kolesterol.  $\beta$ -sitosterol memiliki waktu retensi yang paling besar yaitu 1,33 menit dikarenakan senyawa ini tertahan oleh kolom yang bersifat non polar. Sedangkan pada stigmasterol dan kampesterol memiliki waktu retensi yang sama yaitu 1,27 menit. Persamaan waktu retensi kedua steroid tersebut dikarenakan kecepatan dan waktu alir yang diatur kurang maksimal, pada penelitian Fu dan Joseph (2012) yang menggunakan waktu alir 20 menit terdapat perbedaan waktu retensi dari kedua steroid tersebut. Kolesterol memiliki waktu retensi paling kecil yaitu 1,19 menit yang menandakan steroid ini paling polar dibanding 3 steroid lainnya.

Berdasarkan puncak yang dihasilkan, dugaan steroid yang paling dominan adalah kolesterol dan  $\beta$ -sitosterol. Hal ini diperkuat dengan nilai dari NL (nilai yang dihasilkan dari hilangnya molekul netral yang stabil seperti:  $H_2O$ ,  $H_2$ , dan  $CO$ ) yang dimiliki oleh kolesterol dan  $\beta$ -sitosterol lebih tinggi dibandingkan dengan yang lainnya yaitu  $7,07 \times 10^3$  dan  $2,64 \times 10^3$ .

Penelitian yang dilakukan oleh Mo, dkk., (2013) yang mengidentifikasi fitosterol minyak nabati menggunakan LC-MS/MS dengan ionisasi APCI dan deteksi menggunakan SRM (*Selection Reaction Monitoring*). *Daughter Product Mass* yang dihasilkan akibat adanya pemutusan ikatan (fragmentasi) oleh elektron. Posisi pemutusan  $\beta$ -sitosterol terjadi dicincin C karena pada cincin B steroid terdapat ikatan  $C=C$ , bila ikatan  $C=C$  berada pada posisi cincin A maka pemutusan akan terjadi dicincin B. Pola fragmentasi dari  $\beta$ -sitosterol ditunjukkan pada Gambar 4.9.



Gambar 4.9 Fragmentasi  $\beta$ -sitosterol (Mo, dkk., 2013).

Berdasarkan hasil identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis maupun LC-MS/MS steroid pada spot kesembilan mengandung 4 jenis steroid yaitu kolesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol dan kampesterol. Hasil identifikasi spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 203 nm yang diduga merupakan serapan dari steroid stigmasterol dan  $\beta$ -sitosterol. Hal ini karena pada steroid  $\beta$ -sitosterol merupakan steroid yang paling dominan menurut hasil uji pada

LC-MS/MS. Menurut struktur dari keempat steroid (Gambar 2.3) yang teridentifikasi tersebut memiliki ikatan rangkap C=C, dimana ikatan ini memiliki transisi elektron  $\pi$ - $\pi^*$  (Gandjar, 2007).

#### 4.10 Pemanfaatan Rumput Laut dalam Perspektif Islam

Karunia terbesar yang diberikan Allah SWT kepada manusia adalah “akal” dan “pikiran” agar manusia berfikir dan dapat memanfaatkan segala ciptaan Allah SWT dengan baik dan benar. Allah SWT menyuruh kita untuk menggunakan karunia tersebut untuk mempelajari ciptaan-Nya hingga munculah berbagai eksperimen untuk mengetahui potensi dan manfaatnya. Seperti dalam firman Allah SWT dalam Q.S. Ali Imron ayat 190:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ۝

*“Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal,” (QS. Ali Imron:190).*

Ayat tersebut menjelaskan bahwasanya, Allah SWT telah memberi pernyataan bahwa seluruh ciptaan-Nya yang ada di langit maupun di bumi terdapat suatu tanda-tanda kebesaran-Nya. Namun Allah SWT membatasi tanda-tanda kebesaran-Nya yang hanya bisa diketahui bagi orang-orang yang mau memikirkannya (Shihab, 2002). Salah satu yang dapat dipikirkan dalam dunia sains adalah melakukan penelitian mengenai apa yang ada di alam, seperti halnya mengisolasi suatu bahan yang ada pada tumbuhan di alam. Tumbuhan merupakan salah satu nikmat Allah yang diberikan kepada manusia. Salah satu ayat Al

Qur'an yang menjelaskan tentang pemanfaatan tumbuhan terdapat dalam surat Thaahaa ayat 53:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ  
أَنْزَوْجًا مِّنْ نَّبَاتٍ شَتَّى ﴿٥٣﴾

*“Yang Telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang Telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam” (QS. Thaahaa: 53)*

Allah SWT menciptakan alam beserta isinya seperti hewan dan tumbuhan yang merupakan rahmat yang besar, tidak ada segala sesuatu yang diciptakan Allah SWT menjadi suatu yang sia-sia, melainkan Allah menciptakan setiap sesuatu dengan hikmah-hikmah tertentu. Manusia berhak untuk memanfaatkan segala sesuatu yang ada di bumi baik hewan maupun tumbuhan. Allah menumbuhkan berbagai macam tanaman dengan berbagai jenis bentuk dan ukuran manfaat. Sebagaimana dalam firman Allah SWT QS asy Syu'ara ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

*“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik” (QS. asy Syu'ara: 7).*

Shihab (2002) menjelaskan bahwa Allah SWT menumbuhkan berbagai macam tumbuhan yang baik, yaitu subur dan bermanfaat. Salah satu tumbuhan yang bermanfaat sebagaimana dalam penelitian ini yang menggunakan alga merah *Euchema cottonii* yang di dalamnya banyak manfaatnya bagi manusia, yaitu sebagai antioksidan, antibakteri, dan toksisitas. Hal ini karena didalam alga merah

tersebut terdapat senyawa metabolit sekunder, salah satu yang paling dominan adalah steroid.

Pemanfaatan senyawa steroid dari fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah pada penelitian ini dapat digunakan sebagai senyawa yang memiliki korelasi dengan obat. Namun, manusia wajib berusaha untuk memperoleh penyembuhan dari Allah SWT Yang Maha Penyembuh dan tidak ada yang dapat menyembuhkan kecuali atas izin-Nya. Allah SWT berfirmandalam surat asy-Syu'ara ayat 80:

وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ ﴿٨٠﴾

*“dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan aku” (QS. asy Syu'ara:80).*

Sesungguhnya kesehatan merupakan nikmat besar yang Allah berikan kepada manusia. Sedangkan sakit merupakan ujian dari Allah SWT. Sehingga apabila sakit manusia hendaknya tetap berfikir tentang makna dari musibah tersebut karena Allah memberikan ujian kepada umatnya yang mampu melewati ujian tersebut.

## BAB V PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pemisahan dan identifikasi senyawa steroid fraksi petroleum eter alga merah *Eucheuma cottonii* dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemisahan steroid fraksi petroleum eter pada alga merah *Eucheuma cottonii* menggunakan kromatografi lapis tipis dengan variasi eluen n-heksana dan etil asetat. Pemisahan terbaik untuk memisahkan steroid menggunakan KLT analitik adalah perbandingan eluen 17:3 dengan 7 spot.
2. Pemisahan steroid menggunakan KLT preparatif menghasilkan 11 spot dengan 6 spot steroid. Uji steroid menggunakan KLT 2 dimensi menunjukkan steroid nomor 9 merupakan steroid terbaik dengan menghasilkan spot tunggal.
3. Hasil identifikasi steroid nomor 9 menggunakan spektrofotometer UV-Vis menghasilkan serapan pada panjang gelombang 203 nm. Sedangkan hasil identifikasi menggunakan LC-MS/MS diketahui bahwa terdapat 4 jenis steroid yaitu kolesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol dan kampestrol.

### 5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai metode pemisahan senyawa steroid pada alga merah *Eucheuma cottonii* agar dihasilkan isolat yang lebih maksimal seperti menggunakan kromatografi kolom, serta penggunaan instrumen lain untuk memperjelas struktur steroid seperti NMR.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afif. S. 2013. Ekstraksi, Uji Toksisitas dengan Metode BLT dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Alga Merah *Eucheuma spinosam* dari Sumenep Madura. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Alfiyaturomah, Ningsih, R., dan Yusnawan, E. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Etanol, Kloroform dan n-Heksana Alga Coklat *Sargassum Vulgare* Asal Pantai Kapong Pamekasan Terhadap Bakteri *Staphilococcus Aureus* dan *Eschericia coli*. *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, 2(2), 101-149.
- Andriani, Z., Fasya, A.G dan Hanapi, A. 2015. Antibacterial Activity of the Red Algae *Eucheuma cottonii* Extract from Tanjung Coast Sumenep Madura. *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, 4(2), 93 - 100.
- Anggadiredja, J. T., Zاتمika A., Purwoto H, dan Istini, S. 2006. *Rumput Laut*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Anggraeni. O. N., Fasya. A. G., Abidin. M., dan Hanapi. A. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan N-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, 3(2), 173-188.
- Artanti. E. K., Irvina. F., dan Fatimah. 2012. Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Asam Terhadap Kinetika Reaksi Hidrolisis Pelepasan Pisang (*Musa paradisiaca L.*). *Jurnal Ekuilibrium*. ISSN: 1412-9124. Vol 11. No 2. 73-77.
- Astuti, M., Abdi, M., dan Evi, M. 2014. Isolasi Steroid dari Fraksi n-Heksana Batang Bajakah Tampala (*Spatholobus littoralis Hassk*). *Prosiding Seminar Nasional Kimia*, ISBN: 978-602-0951-00-3.
- Atun S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Kimia*. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta. Vol. 8 No.2, Hal 53-61.
- Braithwaite, A and Smith, F. J. 1995. *Chromatographic Methods*. London: Kluwer Academic Publishers.
- Dewick, M.P. 2002. *Medicine Natural Products: A Biosynthetic Approach 2th Edn*. Inggris: John Wiley & Sons Ltd.
- Diaz, C., A. Segura Carreteto, A. Fernandez G., A. Belmonte Vega, A. Garrido Frenich, J.L Martinez, Duran Martos. 2006. Separation and

- Determination of Sterols in Olive Oil by HPLC-MS. *Food Chemistry*, 102, 593 - 598.
- Din, S. M. M dan Ahwany. A. M. D. 2015. Bioactivity And Phytochemical Constituents Of Marine Red Seaweeds (*Jania rubens*, *Corallina mediterranea* and *Pterocladia capillacea*). *Journal of Taibah University For Science*. No 14.
- Doty, M.S. 1985. *Euचेuma alvarezii sp.nov (Gigartinales, Rhodophyta) from Malaysia*. Di dalam: Abbot IA, Norris JN (editors). *Taxonomy of Economic Seaweeds*. California Sea Grant College Program.
- Dwyana, Z dan Johannes, E. 2010. Uji Efektivitas Ekstrak Kasar Alga Merah *Euचेuma Cottonii* Sebagai Antibakteri Terhadap Bakteri Patogen. *Jurnal kimia*. Makassar: Universitas Hasanuddin Makassar.
- Etika, S.B. dan Suryelita. 2014. Isolasi Steroid Dari Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Eksakta*. Vol. 1, 60-64.
- Fasya A. G., Dinasti A. R., Syofiyah. M., Rahmawati. L. M., Millati. N., Safitri. D. A., Handoko. S., Hanapi. A., Ningsih. R., 2016. Ekstraksi, Hidrolisis dan Partisi Metabolit Sekunder dari Mikroalga *Chlorella sp.* *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, 5(1) 5-9.
- Fu, R., & Joseph, M. 2012. *LC/ELSD and LC/MS/MS Of Cholesterol and Related Sterols On a Poroshell 120 Column*. USA: Agilent Technologies.inc
- Gandjar, I.G. dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka belajar.
- Gritten, R.J.,J.M. Bobbit, and A.E. Schwarling. 1991. *Pengantar Kromatografi*, terjemahan K. Radmawinata dan I.Soediso. Bandung: Penerbit ITB.
- Halilu, M.E., October, N., Balogun, M., Agunu, A., Abubakar, A and Abubakar, M.S. 2013. Isolation and Characterization of Steroids from Petroleum Ether Extract of Stem Bark of *Parinari curatellifolia* Planch ex. Benth (*Chrysobalanaceae*). *Journal of Natural Sciences Research*, Vol.3, No.6.
- Hanapi. A., Fasya A. G., Mardiyah. U., dan Miftahurrohmah. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Metanol Alga Merah *Euचेuma cottonii* dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, 2(2), 126-137.
- Handoko, D. S. 2006. Kinetika hidrolisis maltosa pada variasi suhu dan jenis asam sebagai katalis. *SIGMA: Jurnal Sains dan Teknologi*, 9(1).
- Handoko, Singgih. 2016. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter (PE) Mikroalga *Chlorella Sp.* Dengan Metode Kromatografi Kolom

- Pembuatan Fasa Diam Cara Basah Dan Kering. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hardiningtyas, S. D. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Karang Lunak *Sarcophyton* sp. yang Difragmentasi dan Tidak Difragmentasi Di Perairan Pulau Pramuka, Kepulauan Seribu. *Skripsi*. FMIPA. IPB.
- Hidayat, A. 2006. *Budidaya Rumput Laut*. Surabaya: Penerbit Usaha Nasional
- Istini, S. dan Suhaimi. 1998. *Manfaat dan Pengolahan Rumput Laut*. Jakarta: Lembaga Oseanologi Nasional.
- Junaedi, W. 2004. *Rumput Laut, Jenis dan Morfologinya*. Jakarta: Departemen Pendidikan Nasional.
- Kholidiyah, M.2013. Uji Toksisitas Ekstrak Rumput Laut Jenis *Eucheuma spinosum* Perairan Madura Terhadap Larva Udang (*Artemia salina*) Menggunakan Metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test). *skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Khopkar, S. M. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Ko, H. H., Hung, C. F., Wang, J. P., & Lin, C. N. 2008. Antiinflammatory triterpenoids and steroids from *Ganoderma lucidum* and *G. tsugae*. *Phytochemistry*, 69(1), 234–239.
- Kristanti, A. N., N. S. Aminah, M. Tanjung, dan B. Kurniadi. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Kutsiyah. 2012. Penentuan Kandungan Senyawa Fenolik Total Dan Kapasitas Antioksidan Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Pantai Lobak Madura. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Lestari, S., Fasya A. G., Syarifah, U., Ningsih, R. 2015. Pemisahan Senyawa Aktif Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasi Menggunakan FTIR. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Mardiyah, U. 2012. Uji Aktifitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Identifikasi Golongn Senyawa Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Machado. D. I. S., Hernández. J. L., Losada. P., and Cervantes. J. L., (2004), An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds. *Journal Biomedical Chromatography*. 18: 183–190

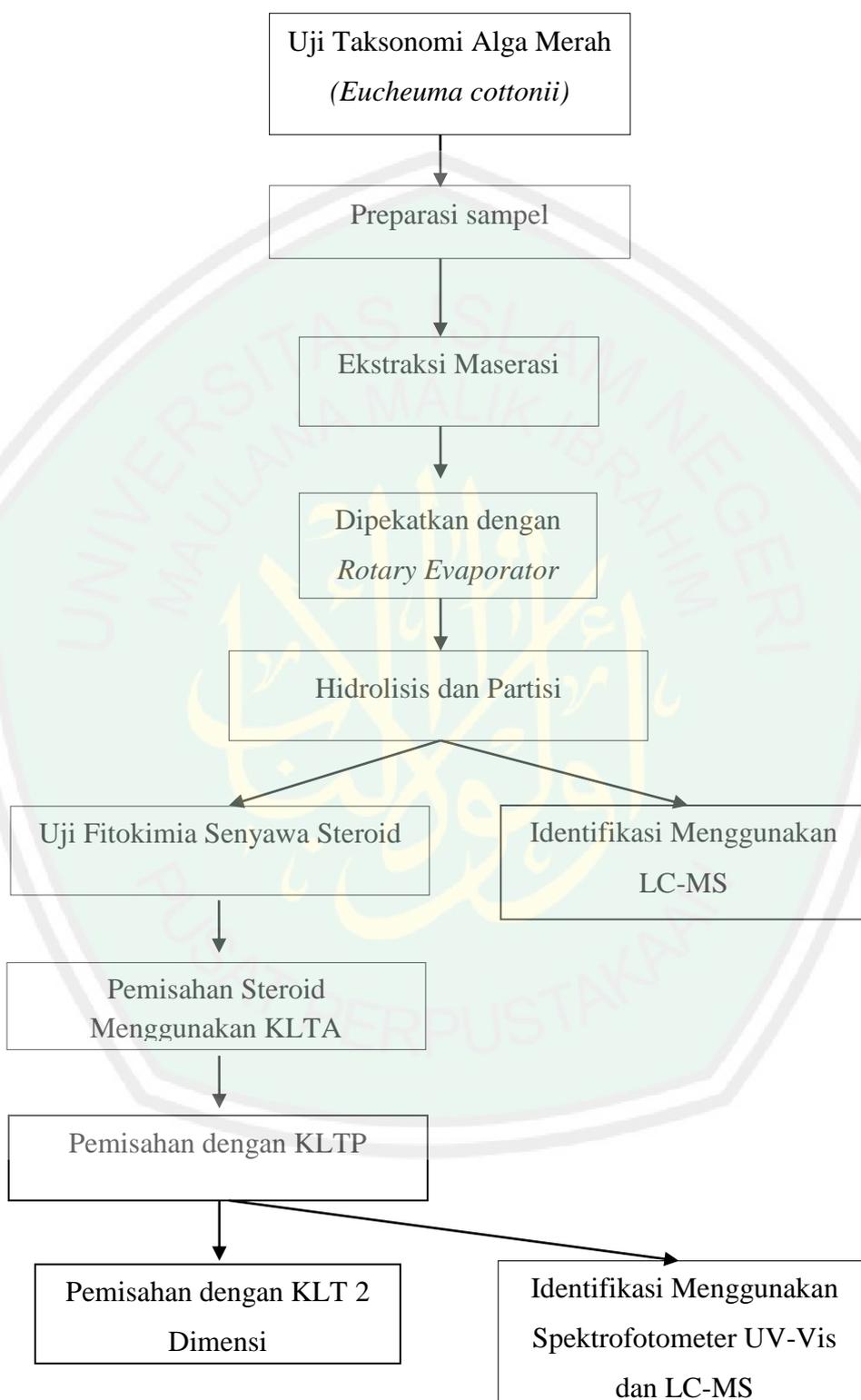
- Mo, S., Dong, L., Hurst, W.H, Richard, B. Breeman, V. 2013. Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Lipid*, 48, 949 - 956.
- Mohy El-Din, S. M., & El-Ahwany, A. M. D. 2016. Bioactivity and phytochemical constituents of marine red seaweeds (*Jania rubens*, *Corallina mediterranea* and *Pterocladia capillacea*). *Journal of Taibah University for Science*, 10(4), 471–484.
- Muhibah, S. R. N. 2013. Uji Golongan Senyawa Aktif dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Alga Merah *Eucheuma Cottonii* dari Petani Lobuk Madura. *Skripsi*. Malang: Universitas Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Mukharromah. R. R., Suyatno, 2014. Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Diklorometana Kulit Batang Bakau Merah (*Rhizophora Stylosa*). *Journal of Chemistry* Vol. 3, No. 3.
- Ningsih, E. M. A. 2015. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid pada Fraksi n-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*). *Skripsi*. Malang: Universitas Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Nurhayati, A. P. D., Abdulgani, N., dan Febrianto, R. 2006 Uji Toksisitas Ekstrak *Eucheuma Alvarezii* terhadap *Artemia Salina* sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker. *Akta Kimindo*. 2(1), 41 - 46.
- Poedjiadi, anna. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Putra, I.N.K. 2007. Study Daya Antimikroba Ekstrak Beberapa Bahan Tumbuhan Pengawet Nira Terhadap Mikroba Perusak Nira Serta Kandungan Senyawa Aktifnya. *Disertasi*. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya Malang.
- Qurthubi, I. 2008. *Tafsir al-Qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azam.
- Rasyid, A. 2004. Berbagai Manfaat Algae, *Oseana* Vol XXIX No.3 : 9-15. <http://www.Oseanografi.lipi.go.id>
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB
- Rohman, Abdul. 2009. *Kromatografi Untuk Analisis Obat*. Yogyakarta: Graha Ilmu
- Rudi, L., Suratno, W., dan Paundanan, J. 2004. *Perbandingan Penentuan Surfaktan Anionik Dengan Spektrofotometer UV-Vis Menggunakan Pengompleks Malasit hijau Dan Metilen biru*. *Jurnal Kimia Lingkungan*. Vol. 6, No.1.

- Sa'adah, L., Hayati, E. K., Adi, T. K. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Tanin dari Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). *Skripsi tidak diterbitkan*. Malang: UIN Universitas Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Saifudin, Aziz. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian Ed 1*. Yogyakarta: CV. Budi Utama.
- Sastrohamidjojo, H. 2005. *Kromatografi*. Yogyakarta: Liberty.
- Setiyawan, M. I. 2015. Isolasi Senyawa Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol dan Identifikasinya Menggunakan FTIR. *Skripsi tidak diterbitkan*. Malang: UIN Universitas Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Sharo, N. M., Ningsih, R., Nasichudin, A., Hanapi, A. 2013. Uji Toksisitas Dan Identifikasi Senyawa Ekstrak Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, Vol. 2 , 170 – 177.
- Shihab, M.Q. 2002. *Tafsir Al Mishbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati
- Sulastry, Taty dan Kurniawati N. 2010. Isolasi Steroid dari Metanol daun Blntas (*Plucea Indica* L). *Journal Chemical* Vol. 11 ,hal 52 – 56.
- Sudarmadji, Slamet. 1997. *Prosedur Analisis Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Penerbit Liberty.
- Utami. 2014. Uji Aktifitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter Dan N-Heksana Dari Ekstrak Metanol *Chlorella Sp*. *Skripsi tidak diterbitkan*. Malang: UIN Universitas Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Voight, R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Diterjemahkan oleh Soedani Noerono Soewandhi, Apt. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada Press.

## LAMPIRAN

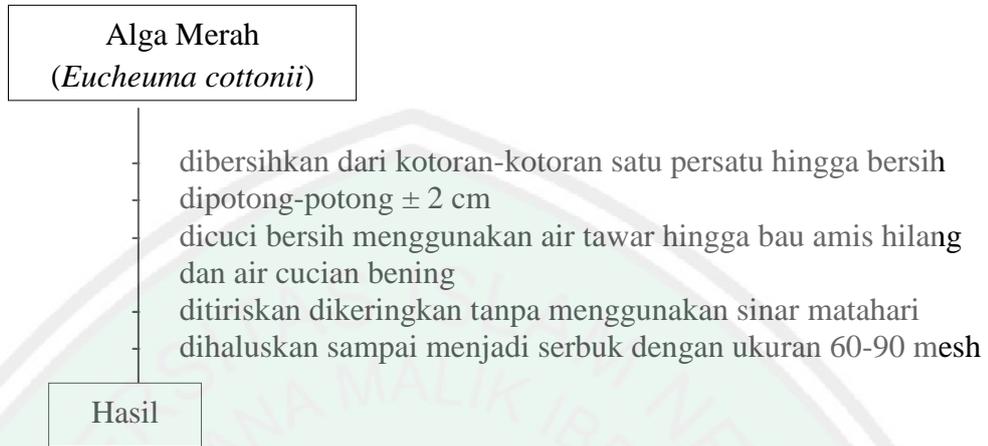
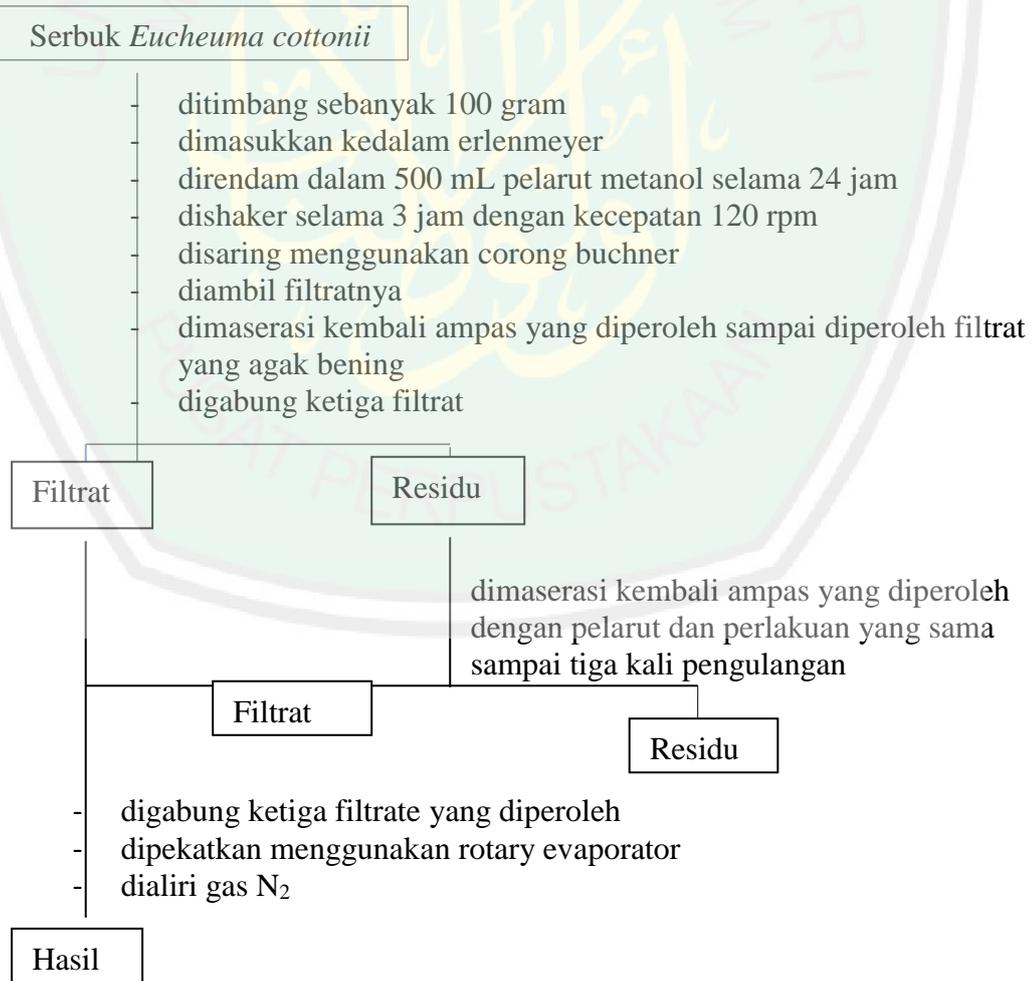
## Lampiran 1.

## RANCANGAN PENELITIAN

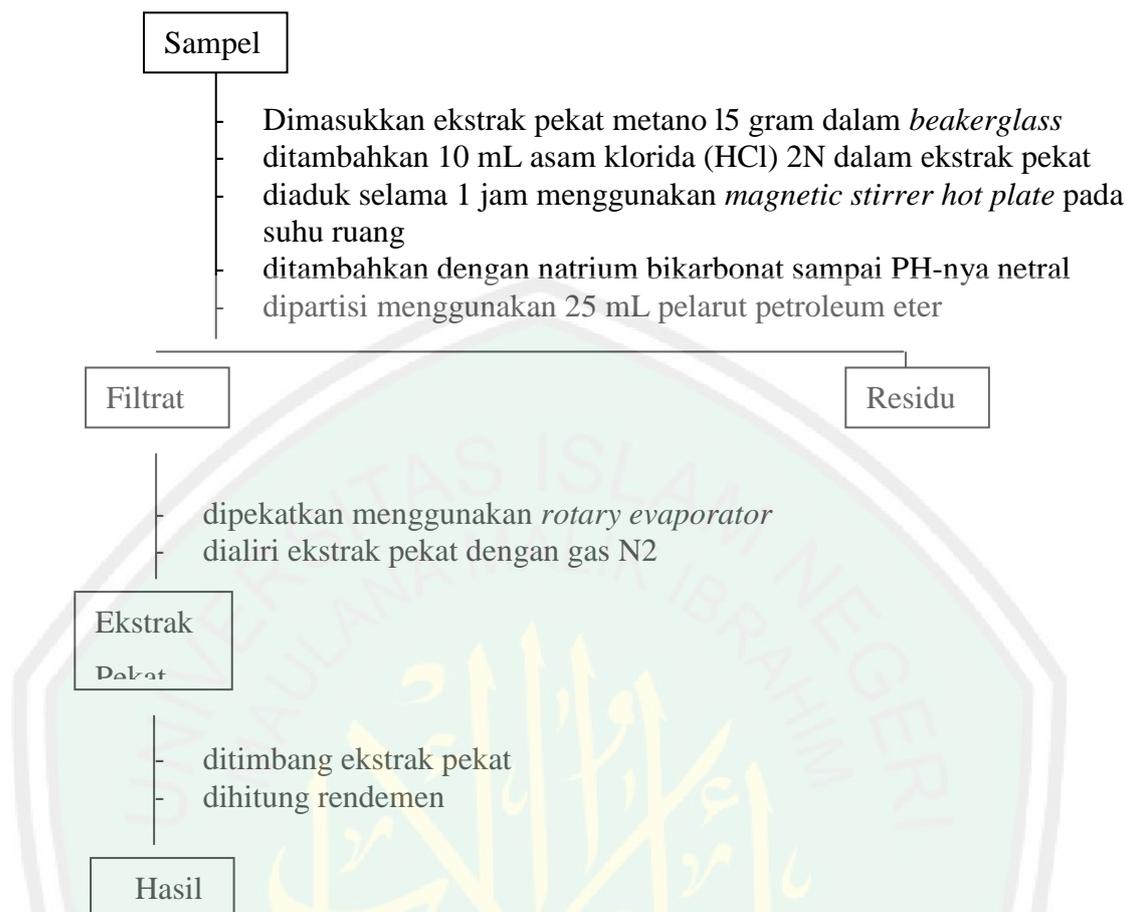


## Lampiran 2.

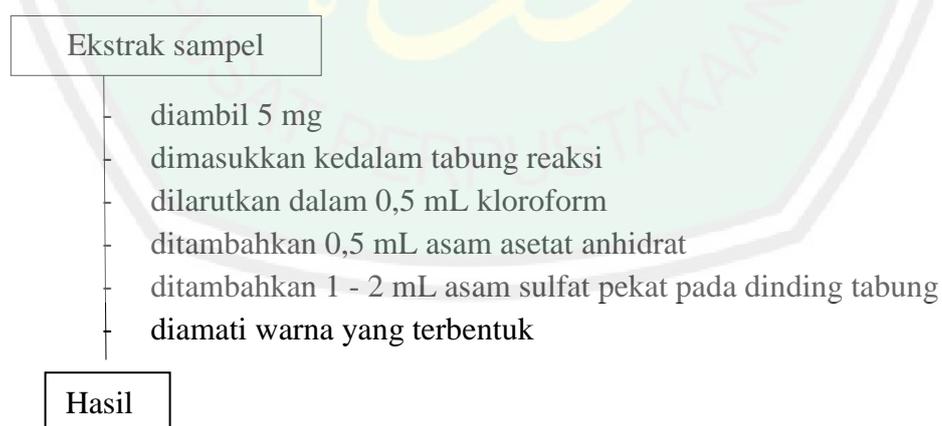
## DIAGRAM ALIR

1. Preparasi Alga Merah (*Eucheuma cottonii*)2. Ekstraksi Alga Merah (*Eucheuma cottonii*)

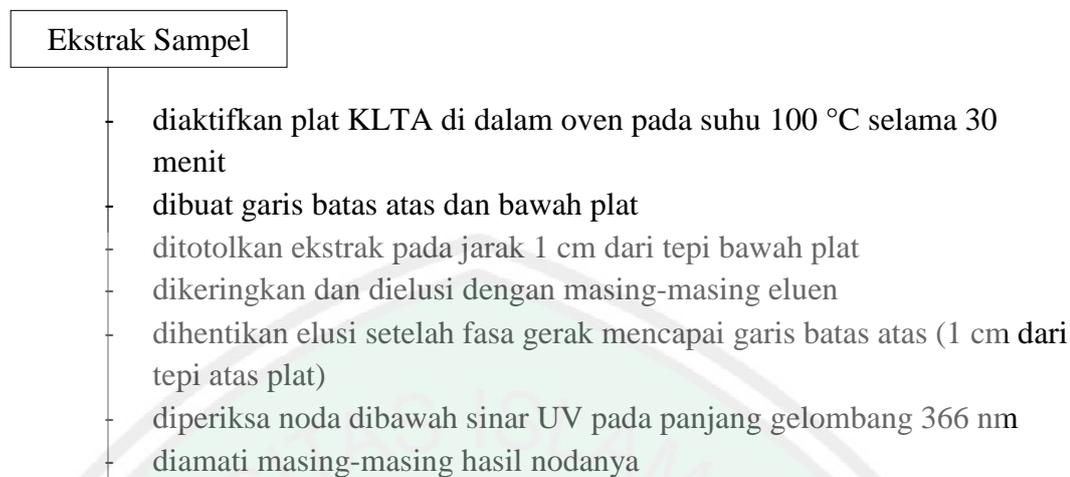
### 3. Hidrolisis dan Partisi



### 4. Uji Fitokimia Senyawa Steroid

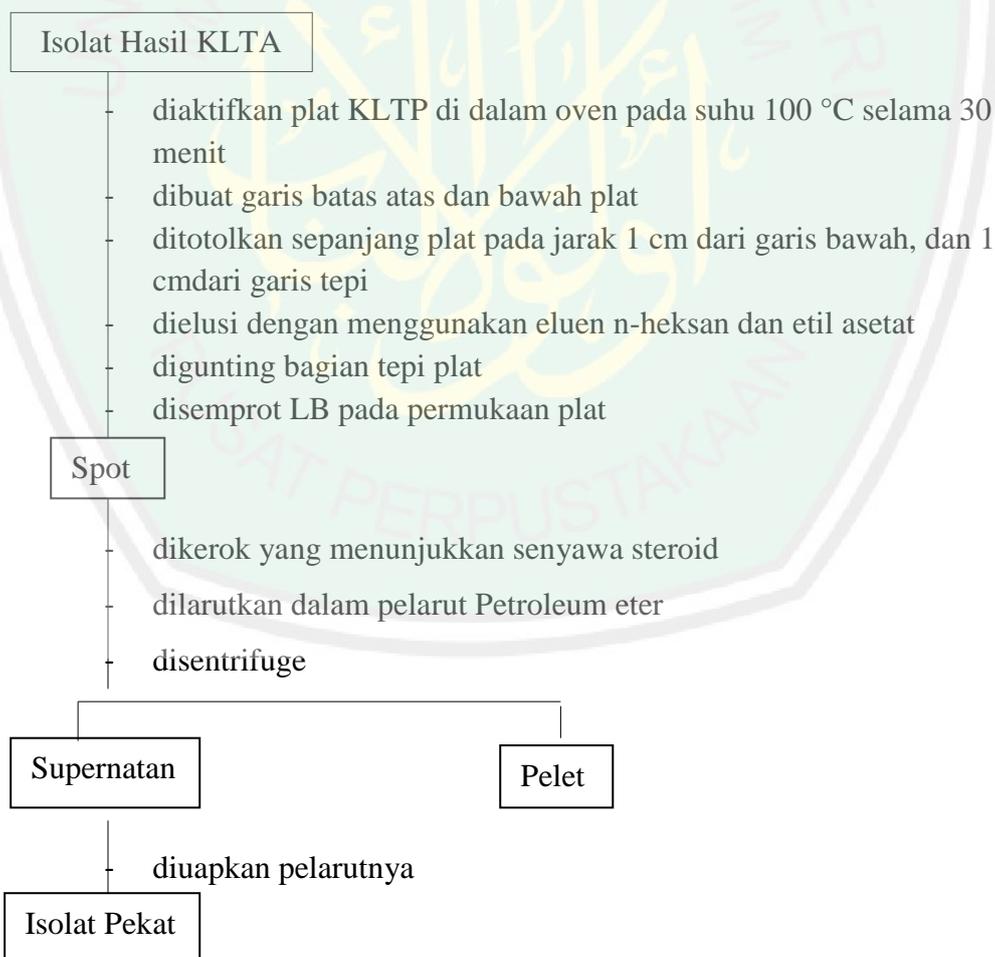


## 5. Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)



**Hasil**

## 6. Pemisahan senyawa steroid dengan KLT Preparatif



## 7. Uji Kemurnian dengan KLT Dua Dimensi

Isolat Hasil KLTP

diaktifkan plat KLT di dalam oven pada suhu 100 °C selama 30 menit  
 dibuat garis batas atas dan bawah plat  
 ditotolkan ekstrak pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat dan 1 cm dari batas tepi kiri sebanyak 20 kali totalan  
 dikeringkan dan dielusi dengan eluenn-heksana : etil asetat (4:1)  
 dihentikan elusi setelah fasa gerak mencapai garis batas atas (1 cm dari tepi atas plat)  
 diperiksa noda dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm  
 dihitung Rf-nya  
 dielusi kembali dengan memutar 90° menggunakan eluen benzena : etil asetat (3:2)  
 dihentikan elusi setelah fasa gerak mencapai garis batas atas (1 cm dari tepi atas plat)  
 diperiksa noda dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm  
 diamati masing-masing hasil nodanya dan dihitung Rf-nya

Hasil

## 8. Identifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Isolat Hasil KLT 2D

diambil sebanyak 2 mL  
 dimasukkan kedalam kuvet hingga sepertiganya  
 dianalisis pada panjang gelombang 200-800 nm

Hasil

## 9. Identifikasi Steroid menggunakan LC-MS

Isolat Hasil KLT 2D

diambil beberapa cuplikan  
 dilarutkan dalam pelarutnya  
 diinjeksikan dalam instrument LC-MS  
 dijalankan instrumentasi

Hasil

- Kolom : Spesifikasi *hypersil gold* (50 mm x 2.1 mm x 1,9  $\mu\text{m}$ ).
- Alat : UHPLC merk *ACCELLA type 1250* buatan *Thermo Scientific* yang terdiri dari : *degasser* vakum, pompa *quartener*, *autosampler* thermostatik yang dikendalikan oleh computer melalui program *x-calibur 2.1*.
- Fasa gerak : 0,1 % asam format dalam air (fasa A) dan 0,1 % asam format dalam asetonitril (fase B).
- Laju alir : 0,5 mL/menit.
- Volume injeksi : 2  $\mu\text{L}$
- MS : MS/MS triple Q (*Quadrupole*) spektrometer massa TSQ QUANTUM ACCESS MAX dari Thermo Finnigan
- Sumber ionisasi : APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) dikendalikan oleh software TSQ Tune yang dikendalikan dengan mode positif.
- Kondisi ion APCI adalah sebagai berikut: Arus yang digunakan 4  $\mu\text{A}$ , Suhu penguapan 250  $^{\circ}\text{C}$ , Suhu kapiler 300  $^{\circ}\text{C}$ , sheat gas pressure 45 arbitrary units, dan Aux gas pressure 15 arbitrary units.

**Lampiran 3.****PEMBUATAN LARUTAN DAN REAGEN****Lampiran 3. Pembuatan Larutan dan Reagen****1. Pembuatan Larutan HCl 2N**

$$\text{BJ HCl pekat} = 1,19 \text{ g/mL}$$

$$\text{Konsentrasi} = 37\%$$

$$\text{BM HCl} = 36,5 \text{ g/mol}$$

$$n = 1 \text{ (jumlah mol ion H}^+\text{)}$$

$$\begin{aligned} \text{Normalitas HCl} &= n \times \text{Molaritas HCl} \\ &= 1 \times \frac{37\% \times \text{BJ HCl} \times 10}{\text{BM HCl pekat}} \end{aligned}$$

$$= \frac{37\% \times 11,9 \text{ g/mL}}{36,5 \text{ g/mol}}$$

$$= 12,06 \text{ N}$$

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$12,06 \text{ N} \times V_1 = 2 \text{ N} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 15,87 \text{ mL}$$

Prosedur pembuatannya adalah diambil larutan HCl 37% sebanyak 15,6 mL. dimasukkan kedalam labu takar 100 mL yang telah terisi akuades 15 mL. kemudian ditambahkan *aquadets* hingga tanda batas dan dihomogenkan.

## 2. Pembuatan Larutan NaHCO<sub>3</sub>Jenuh

Kelarutan NaHCO<sub>3</sub> sebesar 9,99 gr dalam 100 mL *aquadest*. Sehingga untuk membuat larutan NaHCO<sub>3</sub> jenuh digunakan NaHCO<sub>3</sub> dengan berat > 9,99 gr(sampai terdapat endapan padatan yang tidak larut). Lalu disaring larutan tersebut untuk memisahkan residu dan filtrat sehingga didapatkan larutan NaHCO<sub>3</sub> jenuh.

## 3. Pembuatan Reagen Liberman Burchard

Reagen liberman burchard dibuat dengan cara dipipet sebanyak 5mL asam asetat anhidrat dan 5 mL asam sulfat konsentrat, kemudian ditambahkan secara hati-hati melalui dindingnya ke dalam 50 mL etanol *p.a* dalam keadaan dingin (Wagner, 2001).

### Lampiran 4: Hasil Uji Taksonomi Alga Merah



**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI**  
**UNIVERSITAS BRAWIJAYA FAKULTAS MIPA**  
**JURUSAN BIOLOGI**  
 Jl. Veteran, Malang 65145, Jawa Timur, Indonesia. Telp-fax : +62-341-575841  
<http://biologi.ub.ac.id>

---

**SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI**

No. 0187/Takso.Identifikasi/03/2016

Kepala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:

**Nama :** Fitroh Annisaul Mubarakah (NIM 13630074)  
 Khumairo Nur Fitri (NIM 13630077)  
 Etika Nurul Luthfiah (NIM 13630025)  
 Dwi Anik Rahmawati (NIM 13630049)  
 Ariska Purwaning Tyas (NIM 13630046)  
 Ira Ratnasari (NIM 13630024)  
 Ahmad Baderos (NIM 13630021)  
 Isma Mardaneni (NIM 13630039)  
 Achmad Zaky Farid Rahmawan (NIM 13630018)

**Instansi :** Jurusan Kimia, Fakultas SAINTEK, UIN Maliki Malang

Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Plant Resources of South East Asia. 15 Cryptogems: ALGAE Prosea Foundation Bogor (Von Raine, W.F.P & Trono G.C., 2002), halaman 150-153, diidentifikasi sebagai:

**Familia : Solieraceae**  
**Genus : Eucheuma**  
**Species : Eucheuma cottonii (Weber van Bosse)**  
**Nama lokal : Alga Merah**

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 4 Agustus 2016

Kepala Laboratorium



## Lampiran 5: Perhitungan Rendemen

### A. Perhitungan Rendemen Hasil Maserasi

Diketahui:

Berat sampel = 100 gram

Berat ekstrak = 13,936 gram

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{13,936 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} \times 100 \% \\ &= 13,936\% \end{aligned}$$

### B. Perhitungan Rendemen Hasil Partisi Petroleum Eter

Diketahui :

Berat ekstrak metanol = 5,003 gram

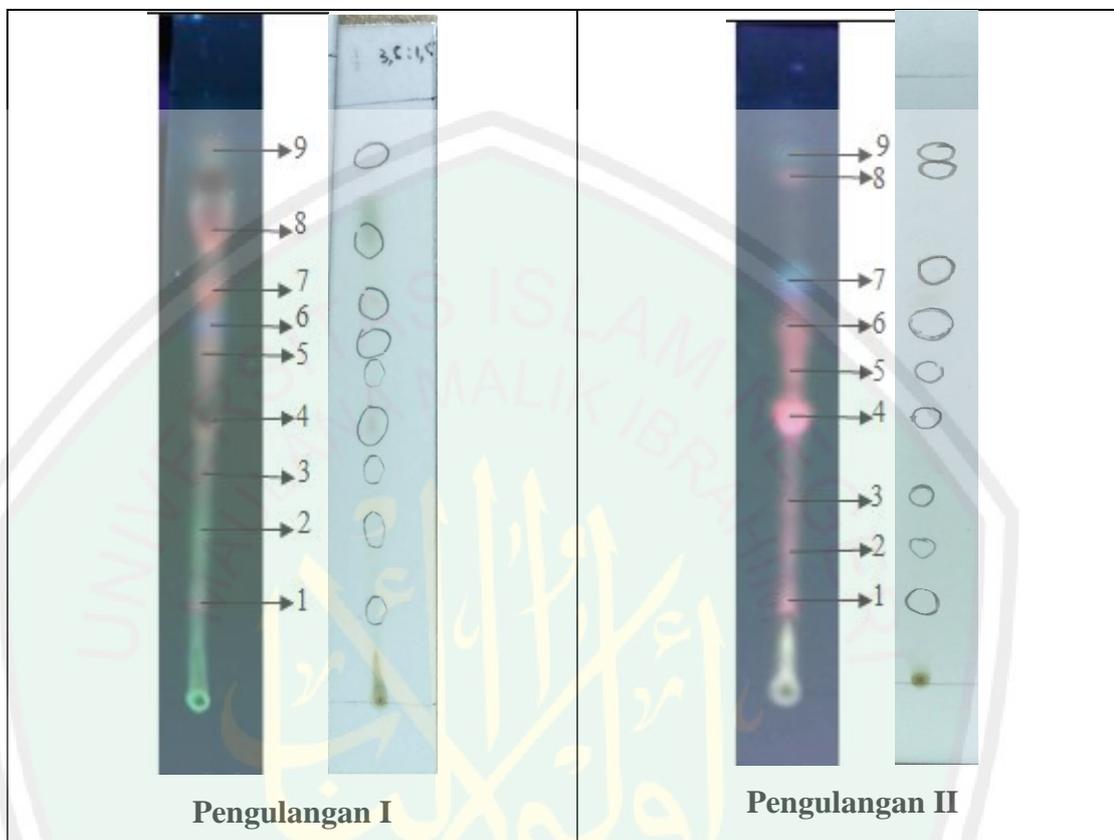
Berat hasil partisi = 0,607 gram

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{1,696 \text{ gram}}{5,0045 \text{ gram}} \times 100 \% \\ &= 12,132 \% \end{aligned}$$

## Lampiran 6: Nilai RF

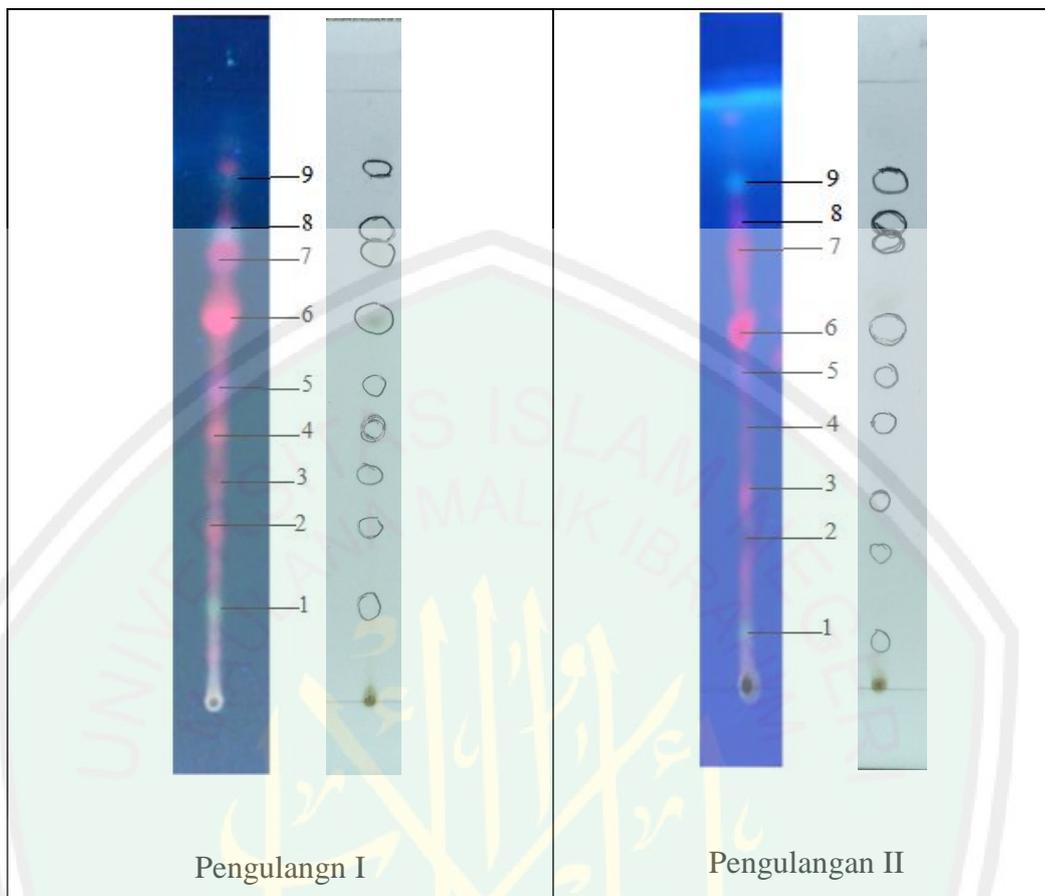
### 1. Hasil KLT Analitik Pengulangan I

#### a. Eluen n-heksana : etil asetat (14 : 6)



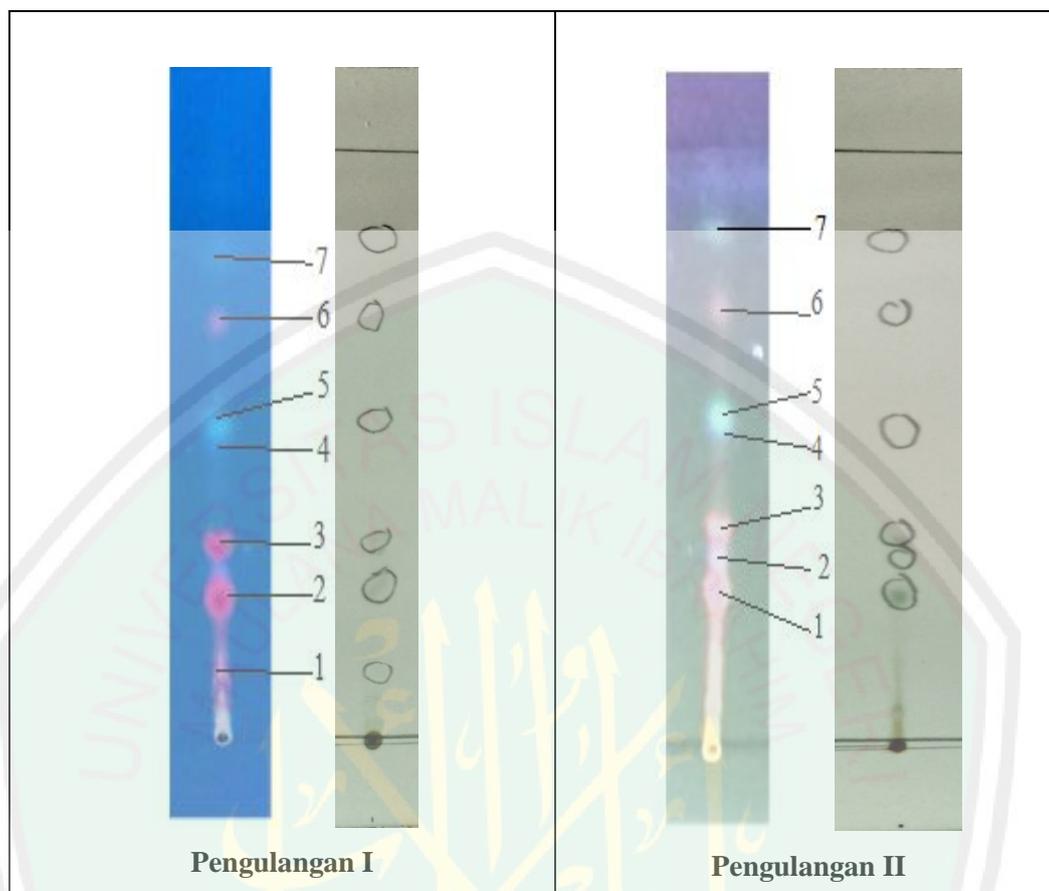
Spot ke-	Pengulangan I				Pengulangan II			
	Warna spot	Jarak tempuh fasa gerak	Nilai Rf	Dugaan senyawa	Warna spot	Jarak tempuh fasa gerak	Nilai Rf	Dugaan senyawa
1	Merah	1,1 cm	0,137	Triterpenoid	Merah	1,0 cm	0,125	Triterpenoid
2	Hijau	2,3 cm	0,288	Steroid	Merah	2,3 cm	0,288	Triterpenoid
3	Merah	3,6 cm	0,450	Triterpenoid	Merah	3,5 cm	0,437	Triterpenoid
4	Merah	4,3 cm	0,538	Triterpenoid	Merah	4,3 cm	0,538	Triterpenoid
5	Merah	4,8 cm	0,600	Triterpenoid	Merah	4,6 cm	0,575	Triterpenoid
6	Merah	5,2 cm	0,650	Triterpenoid	Merah	5,1 cm	0,637	Triterpenoid
7	Biru	5,6 cm	0,700	Steroid	Biru	5,3 cm	0,663	Steroid
8	Merah	6,0 cm	0,750	Triterpenoid	Merah	6,5 cm	0,812	Triterpenoid
9	Hijau	6,9 cm	0,863	Steroid	Hijau	6,8 cm	0,850	Steroid

b. Eluen n-heksana : etil asetat (15 : 5)



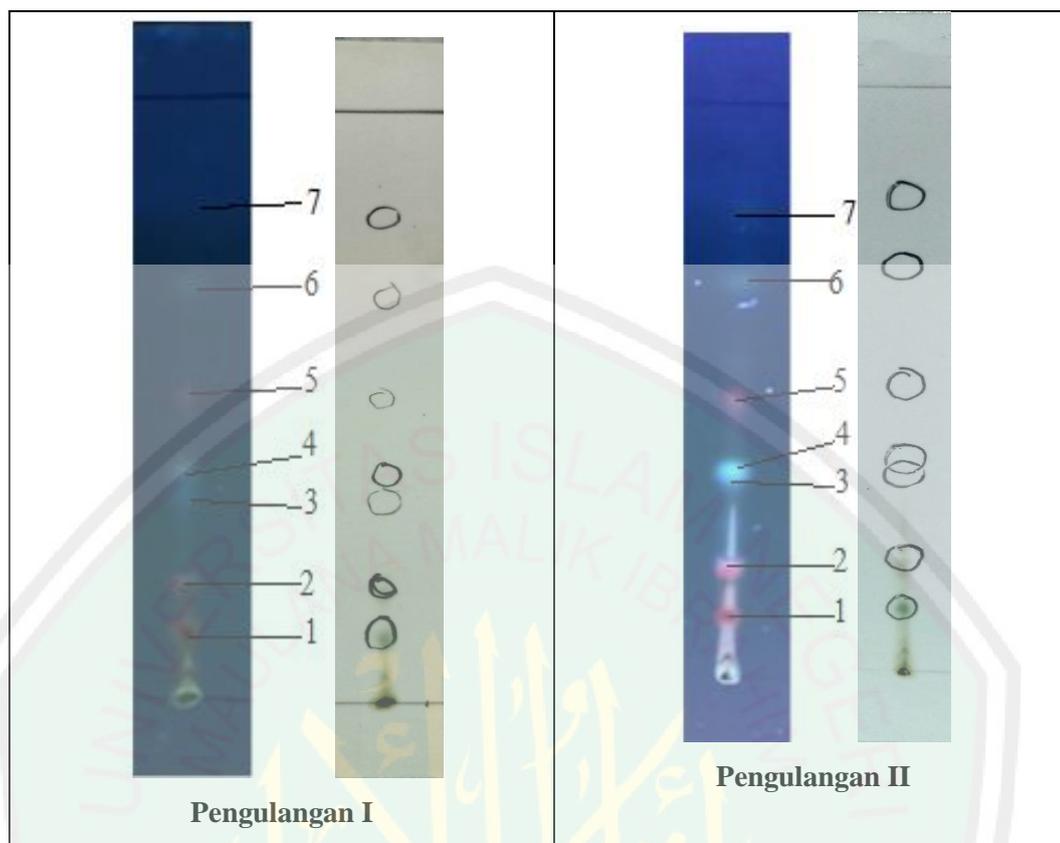
Spot ke-	Pengulangan I				Pengulangan II			
	Warna spot	Jarak tempuh fasa gerak	Nilai Rf	Dugaan senyawa	Warna spot	Jarak tempuh fasa gerak	Nilai Rf	Dugaan senyawa
1	Hijau	1,2	0,150	Steroid	Hijau	0,8	0,100	Steroid
2	Merah	2,3	0,288	Triterpenoid	Merah	2,0	0,250	Triterpenoid
3	Merah	2,9	0,363	Triterpenoid	Merah	2,6	0,325	Triterpenoid
4	Merah	3,5	0,438	Triterpenoid	Merah	3,4	0,425	Triterpenoid
5	Ungu	4,1	0,513	Steroid	Ungu	4,1	0,513	Steroid
6	Merah	5,2	0,650	Triterpenoid	Merah	4,7	0,587	Triterpenoid
7	Merah	5,9	0,738	Triterpenoid	Merah	5,8	0,725	Triterpenoid
8	Ungu	6,2	0,775	Steroid	Ungu	6,1	0,763	Steroid
9	Merah	7,1	0,887	Triterpenoid	Merah	6,7	0,837	Triterpenoid

## c. Eluen n-heksana : etil asetat (16 : 4)



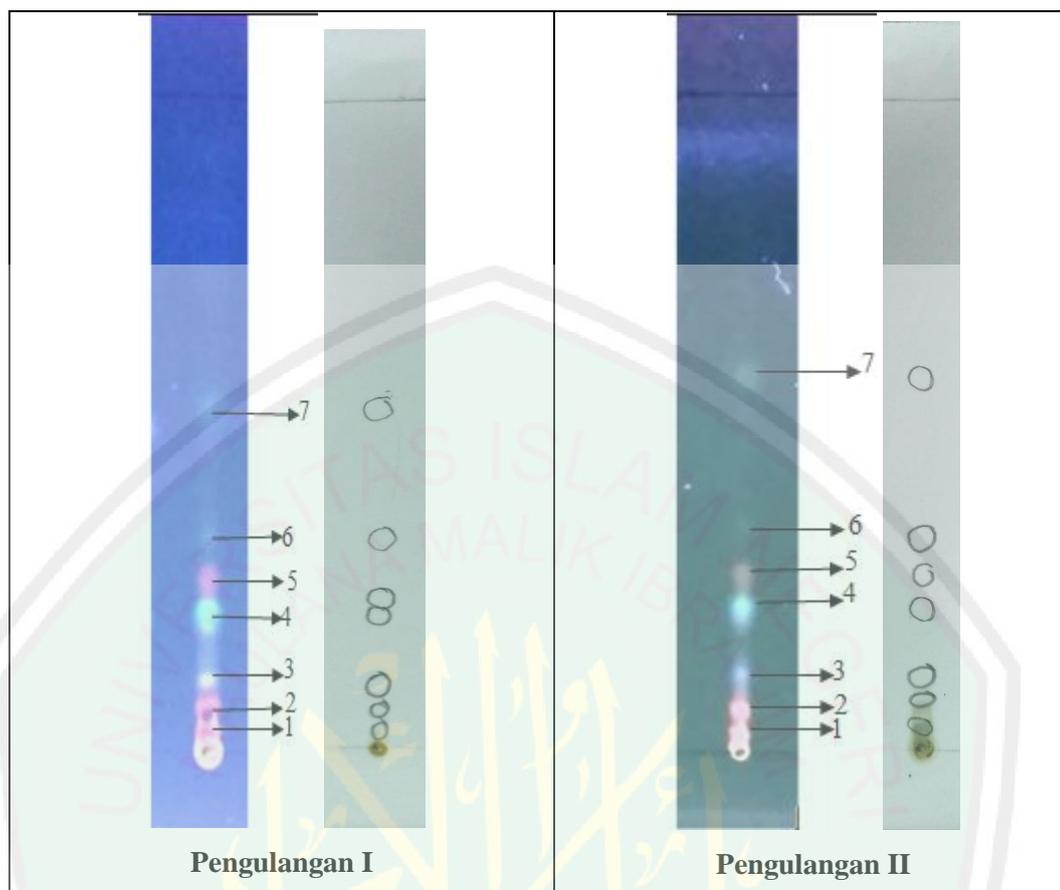
Spot ke-	Pengulangan I				Pengulangan II			
	Warna spot	Jarak tempuh fasa gerak	Nilai Rf	Dugaan senyawa	Warna spot	Jarak tempuh fasa gerak	Nilai Rf	Dugaan senyawa
1	Merah	0.8	0,100	Triterpenoid	Merah	1.6	0,200	Triterpenoid
2	Merah	2.0	0,250	Triterpenoid	Merah	2.0	0,250	Triterpenoid
3	Merah	2.6	0,325	Triterpenoid	Merah	2.2	0,275	Triterpenoid
4	Biru	3.8	0,475	Steroid	Biru	4,0	0,500	Steroid
5	Hijau	4,0	0,500	Steroid	Hijau	4,2	0,525	Steroid
6	Merah	5,6	0,700	Triterpenoid	Merah	5,8	0,725	Triterpenoid
7	Hijau	6,4	0,800	Steroid	Hijau	6,7	0,837	Steroid

## d. Eluen n-heksana : etil asetat (17 : 3)



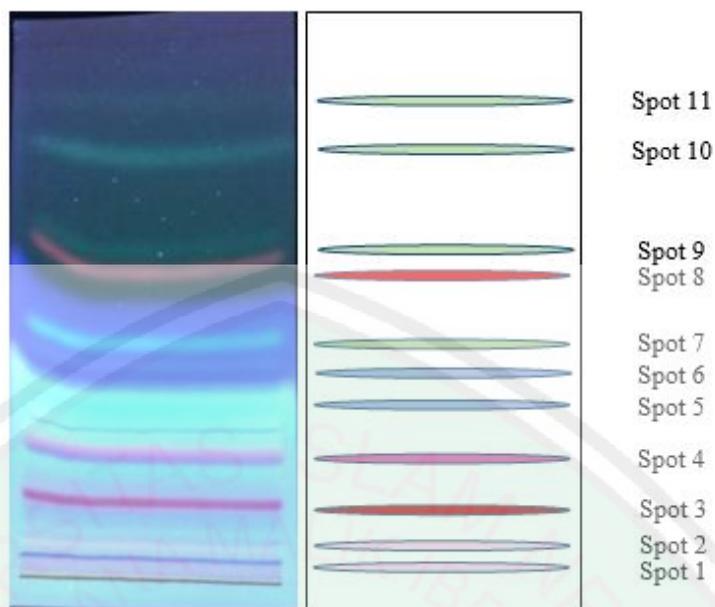
Spot ke-	Pengulangan I				Pengulangan II			
	Warna spot	Jarak tempuh fasa gerak	Nilai Rf	Dugaan senyawa	Warna spot	Jarak tempuh fasa gerak	Nilai Rf	Dugaan senyawa
1	Merah	0,8	0,100	Triterpenoid	Merah	0,9	0,112	Triterpenoid
2	Merah	1,5	0,188	Triterpenoid	Merah	1,6	0,200	Triterpenoid
3	Biru	2,7	0,337	Steroid	Biru	2,7	0,337	Steroid
4	Hijau	3,0	0,375	Steroid	Hijau	2,9	0,362	Steroid
5	Merah	4,0	0,500	Triterpenoid	Merah	3,9	0,487	Triterpenoid
6	Hijau	5,5	0,688	Steroid	Hijau	5,4	0,675	Steroid
7	Hijau	6,5	0,813	Steroid	Hijau	6,4	0,800	Steroid

## e. Eluen n-heksana : etil asetat (18 : 2)



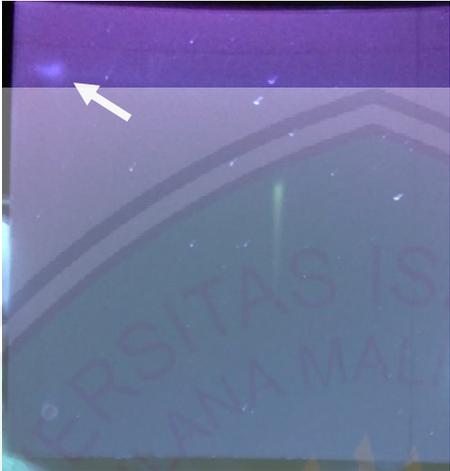
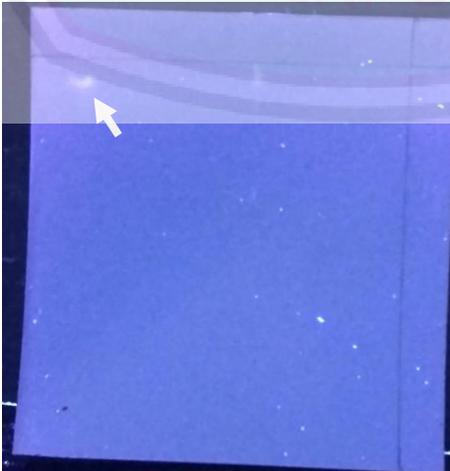
Spot ke-	Pengulangan I				Pengulangan II			
	Warna spot	Jarak tempuh fasa gerak	Nilai Rf	Dugaan senyawa	Warna spot	Jarak tempuh fasa gerak	Nilai Rf	Dugaan senyawa
1	Merah	0,4	0,050	Triterpenoid	Merah	0,3	0,037	Triterpenoid
2	Merah	0,6	0,075	Triterpenoid	Merah	0,5	0,062	Triterpenoid
3	Biru	1,0	0,125	Steroid	Biru	0,9	0,112	Steroid
4	Hijau	1,7	0,212	Steroid	Hijau	1,8	0,225	Steroid
5	Merah	2,1	0,262	Triterpenoid	Merah	2,2	0,275	Triterpenoid
6	Merah	2,6	0,325	Triterpenoid	Merah	2,7	0,337	Triterpenoid
7	Hijau	4,1	0,512	Steroid	Hijau	4,6	0,575	Steroid

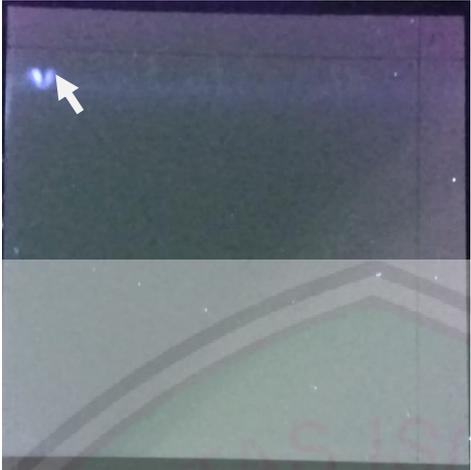
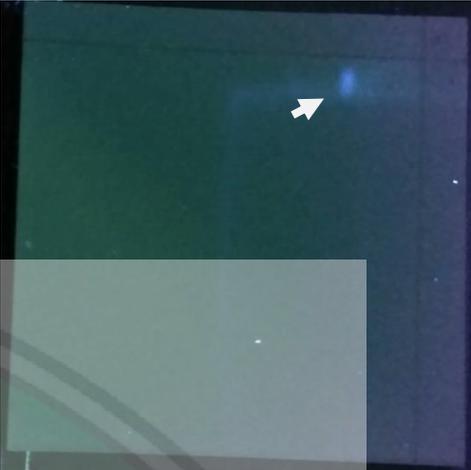
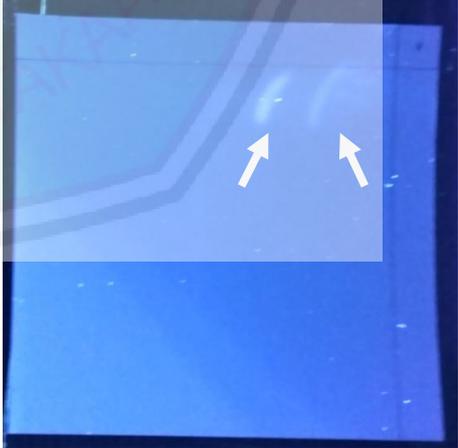
## 2. Hasil KLT Preparatif



Spot ke-	Warna spot	Jarak tempuh fasa gerak	Jarak fasa diam	Nilai Rf	Dugaan senyawa
1	Merah	0,6 cm	18 cm	0,033	Triterpenoid
2	Merah	1,1 cm	18 cm	0,061	Triterpenoid
3	Ungu	2,5 cm	18 cm	0,139	Triterpenoid
4	Merah	4,0 cm	18 cm	0,222	Triterpenoid
5	Biru	5,3 cm	18 cm	0,294	Steroid
6	Hijau	5,9 cm	18 cm	0,394	Steroid
7	Biru	7,9 cm	18 cm	0,439	Steroid
8	Merah	10,1 cm	18 cm	0,561	Triterpenoid
9	Hijau	10,9 cm	18 cm	0,606	Steroid
10	Hijau	14,0 cm	18 cm	0,778	Steroid
11	Hijau	16,1 cm	18 cm	0,894	Steroid

## 3. Hasil KLT 2D

Spot ke-	Benzena : Etil asetat (3:2)	N-heksana : Etil asetat (4:1)
5		
6		
7		

9		
10		
11		

### Lampiran 7. Perhitungan Resolusi

$$Rs = \frac{d}{(W1 + W2)\sqrt{2}}$$

$$RS \text{ Spot 1-2} = \frac{0,5 \text{ cm}}{(0,2 \text{ cm} + 0,3 \text{ cm})\sqrt{2}} = 0,71$$

$$RS \text{ Spot 2-3} = \frac{1,4 \text{ cm}}{(0,3 \text{ cm} + 0,4 \text{ cm})\sqrt{2}} = 1,42$$

$$RS \text{ Spot 3-4} = \frac{1,5 \text{ cm}}{(0,4 \text{ cm} + 0,5 \text{ cm})\sqrt{2}} = 1,17$$

$$RS \text{ Spot 4-5} = \frac{1,2 \text{ cm}}{(0,5 \text{ cm} + 0,6 \text{ cm})\sqrt{2}} = 0,77$$

$$RS \text{ Spot 5-6} = \frac{1,7 \text{ cm}}{(0,6 \text{ cm} + 0,3 \text{ cm})\sqrt{2}} = 1,34$$

$$RS \text{ Spot 6-7} = \frac{0,8 \text{ cm}}{(0,3 \text{ cm} + 0,4 \text{ cm})\sqrt{2}} = 0,81$$

$$RS \text{ Spot 7-8} = \frac{2,1 \text{ cm}}{(0,4 \text{ cm} + 0,3 \text{ cm})\sqrt{2}} = 2,12$$

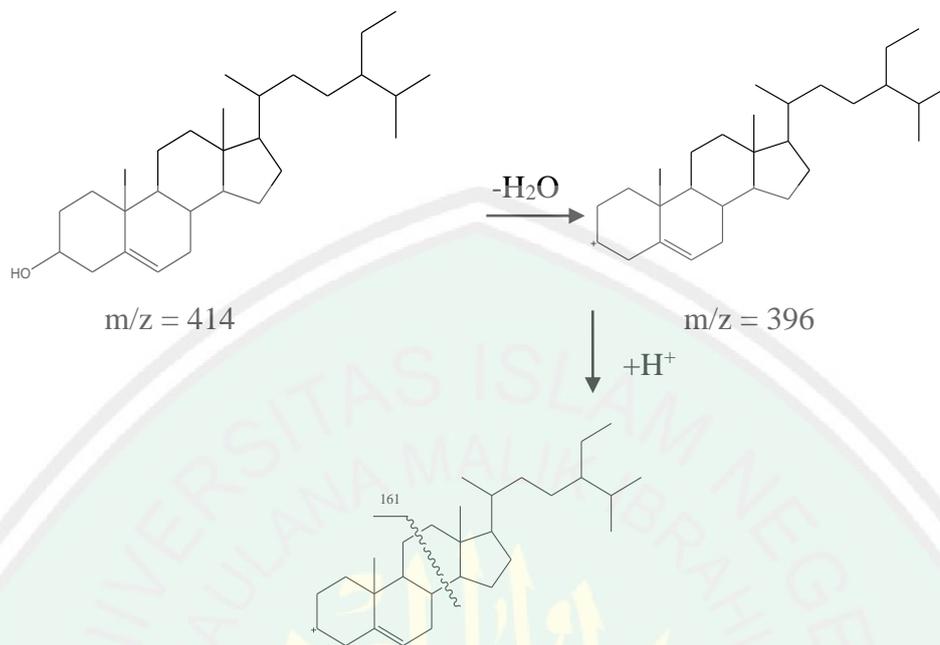
$$RS \text{ Spot 8-9} = \frac{0,8 \text{ cm}}{(0,3 \text{ cm} + 0,3 \text{ cm})\sqrt{2}} = 0,94$$

$$RS \text{ Spot 9-10} = \frac{3,1 \text{ cm}}{(0,3 \text{ cm} + 0,4 \text{ cm})\sqrt{2}} = 3,13$$

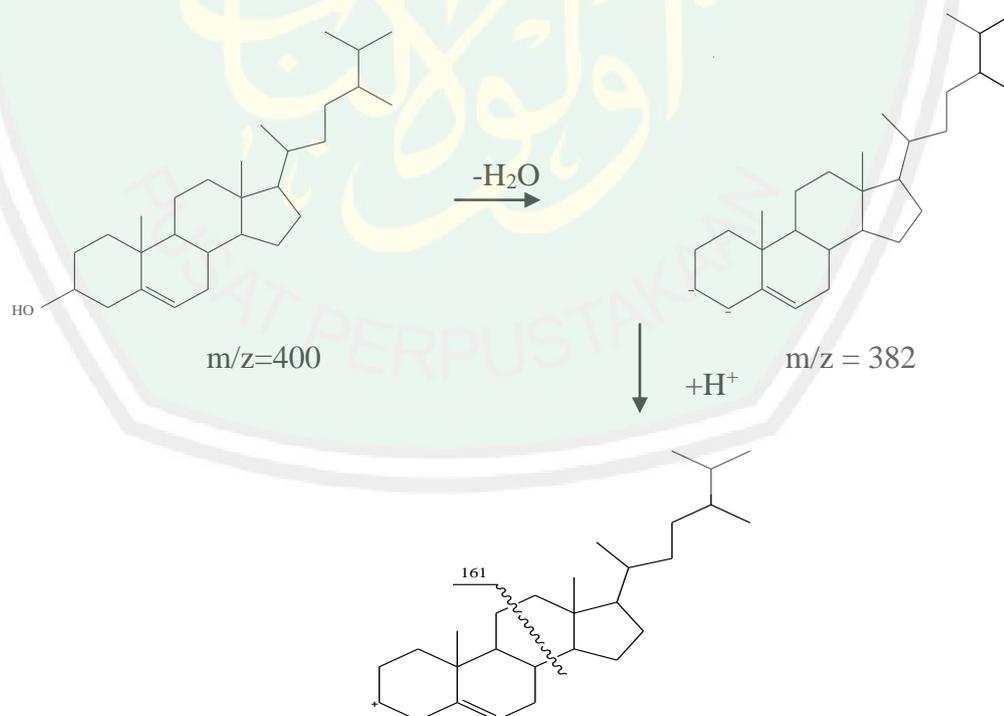
$$RS \text{ Spot 10-11} = \frac{1,7 \text{ cm}}{(0,4 \text{ cm} + 0,3 \text{ cm})\sqrt{2}} = 1,72$$

## Lampiran 8: Fragmentasi Struktur Steroid

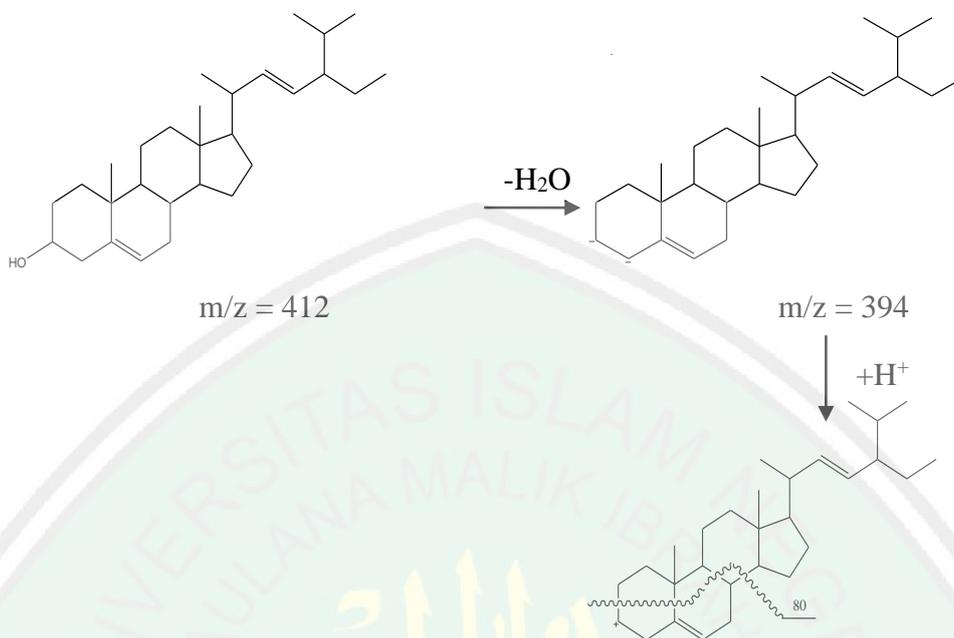
### 1. $\beta$ -Sitosterol (Lopes, 2011); (Fu, 2012) dan (Mo, 2013)



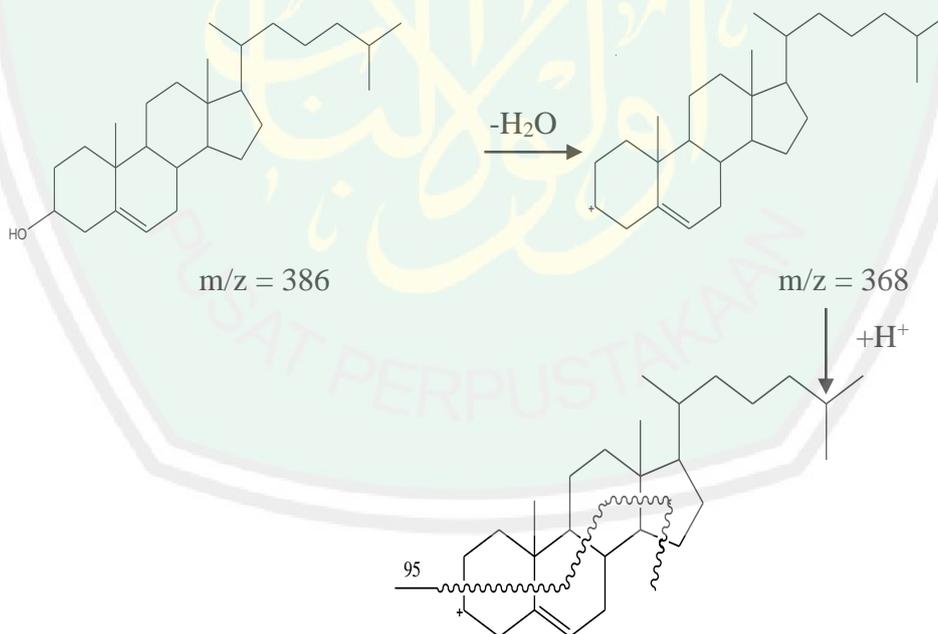
### 2. Kampesterol (Lopes, 2011); (Mo, 2013) dan (Pereira, 2016)



3. Stigmasterol (Fu, 2012); (Lopes, 2011) dan (Mo, 2013)



4. Kolesterol (Pereira, 2016) dan (Fu, 2012)



## Lampiran 9: Dokumentasi

### 1. Preparasi Sampel



Gambar 1. *Eucheuma cottonii*



Gambar 2. *Eucheuma cottonii* kering

### 2. Ekstraksi alga merah *Eucheuma cottonii*



Gambar 3. Proses ekstraksi maserasi



Gambar 4. Pengadukan dengan shaker



Gambar 5. Proses penyaringan



Gambar 6. Proses Rotary evaporator

### 3. Hidrolisis



Gambar 7. Hidrolisis dengan HCl 2 N



Gambar 8. Pengecekan pH setelah ditambah  $\text{NaHCO}_3$  (pH netral)



Gambar 9. Partisi dengan n-butanol

### 4. Uji Fitokimia Steroid



Gambar 10. Fraksi petroleum eter (steroid)