

**ANALISIS KEMOMETRIK MENGGUNAKAN PCA (*Principal Component Analysis*) PADA PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS BIJI ANGGUR BALI (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavallee*) DIDASARKAN PERBEDAAN LETAK GEOGRAFIS**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
DWI NOVIANTI NUR CHOLIFAH  
NIM. 17630006**



**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2022**

**ANALISIS KEMOMETRIK MENGGUNAKAN PCA (*Principal Component Analysis*) PADA PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS BIJI ANGGUR BALI (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavallee*) DIDASARKAN PERBEDAAN LETAK GEOGRAFIS**

**SKRIPSI**

**Oleh :  
DWI NOVIANTI NUR CHOLIFAH  
NIM. 17630006**

**Diajukan Kepada:  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang  
Untuk Memenuhi Skripsi**

**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAUALANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2022**

**ANALISIS KEMOMETRIK MENGGUNAKAN PCA (*Principal-Component Analysis*) PADA PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS BIJI ANGGUR BALI (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavallee*) DIDASARKAN PERBEDAAN LETAK GEOGRAFIS**

**SKRIPSI**

**Oleh :  
DWI NOVIANTI NUR CHOLIFAH  
NIM. 17630006**

**Telah Diperiksa dan Disetujui Untuk Diuji  
Tanggal: 17 Juni 2022**

**Pembimbing I**

**Pembimbing II**

**Elok Kamilah Hayati, M.Si  
NIP. 19790620 200604 2 002**

**Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I  
NIPT. 201402011409**

**Mengetahui,**

**Ketua Program Studi,**

**Rachmawati Ningsih, M.Si  
NIP. 19810811 200801 2 010**

**ANALISIS KEMOMETRIK MENGGUNAKAN PCA (*Principal Component Analysis*) PADA PROFIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS BIJI ANGGUR BALI (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavallee*) DIDASARKAN PERBEDAAN LETAK GEOGRAFIS**

**SKRIPSI**

**Oleh:  
DWI NOVIANTI NUR CHOLIFAH  
NIM. 17630006**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 17 Juni 2022**

<b>Penguji Utama</b>	<b>: Eny Yulianti, M.Si NIP. 19790611200501 2 006</b>	(.....)
<b>Anggota Penguji I</b>	<b>: Armeida Dwi Ridhowati Madjid, M.Si NIP. 19890527201903 2 016</b>	(.....)
<b>Anggota Penguji II</b>	<b>: Elok Kamilah Hayati, M.Si NIP. 19790620 200604 2 002</b>	(.....)
<b>Anggota Penguji III</b>	<b>: Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I NIPT. 201402011409</b>	(.....)

**Mengesahkan,  
Ketua Program Studi**



**Rachmawati Wingsih, M.Si  
NIP. 19840811 200801 2 010**

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dwi Novianti Nur Cholifah  
NIM : 17630006  
Program Studi : Kimia  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : Analisis Kemometrik Menggunakan PCA (*Principal Component Analysis*) Pada Profil Kromatografi Lapis Tipis Biji Anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavallee*) Didasarkan Perbedaan Letak Geografis

menyatakan dengan sebenarnya-benarnya bahwa skripsi ini hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihandata, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya, kecuali dengan mencantumkan sumber kutipan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia mempertanggungjawabkannya sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 24 Juni 2022  
Yang membuat pernyataan,



Dwi Novianti Nur Cholifah  
NIM. 17630006

## HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirabbil'alamin dengan mengucapkan syukur kepada Allah Swt. Saya persembahkan skripsi ini kepada :

Bapak dan ibuku yang tersayang, terhebat dan terbaik

### **Supatono dan Suntari**

Selalu memberikan segala bentuk dukungan moral maupun material, motivasi, nasihat dan untaian doa-doa yang baik yang tiada henti untuk anak-anaknya. Banyak lagi pengorbanan yang tidak bisa disebutkan karena begitu banyak pengorbanan yang telah Bapak dan Ibu lakukan. Terimakasih Bapak dan Ibu yang telah mengantarkan anakmu menjadi seorang sarjana. Terimakasih untuk segalanya, mungkin kiranya karya kecil ini hanya sebagian kecil hal yang dapat saya persembahkan untuk mereka, karena sampai kapanpun saya tidak akan pernah bisa membalas dengan apapun. Semoga Allah senantiasa melimpahkan kasih sayang-Nya dan mengangkat derajat kedua orang tua saya disurga.

Amiiiiinnnn.....

## MOTTO

### **IMPOSSIBLE IS NOTHING**

" Tidak ada yang tidak mungkin. "

*" Kegagalan adalah awal mula sebuah kesuksesan.*

*Maka jangan takut jika kegagalan sedang menghampiri.*

*Habiskan dulu jatah gagal yang ada.*

*Teruslah untuk maju dan bangkit hingga mencapai kesuksesan. "*

مَنْ جَدَّ وَجَدَ

" Barang siapa yang bersungguh-sungguh maka ia akan mendapatkan hasil. "

كُنْ فَيَكُونُ

**'Jadilah' Maka terjadilah.**

Jika semudah itu Allah menciptakan surga dan neraka, langit dan bumi,  
matahari dan bintang, manusia dan tumbuhan.

Maka yakinlah, tak akan sulit bagi Allah untuk menolong hamba-Nya.

Sebesar apapun masalah itu.

## KATA PENGANTAR

Assalmualaikum wa Rahmatullahi wa Barokatuh

Alhamdulillah, puji dan syukur ke hadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Shalawat serta salam senantiasa tecurahkan kepada junjungan kita, Nabi Muhammad SAW yang telah membimbing kita ke jalan yang benar, yaitu jalan yang diridhai oleh Allah SWT. Penulisan skripsi ini tidak luput dari bantuan semua pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu penulis ucapkan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya proposal skripsi. Ucapan terimakasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Bapak Prof. Dr. H. M. Zainuddin, MA. 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 Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si selaku Ketua Program Studi Kimia Fakultas Sains dan teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku dosen pembimbing Skripsi yang telah memberikan bimbingan dan motivasi serta arahan kepada penulis dalam penyelesaian penulisan proposal skripsi.
5. Bapak Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I selaku dosen pembimbing agama yang telah memberikan pengarahan dan bimbingan mengenai integrasi kimia dan Al-Qur'an pada penelitian penulis.

6. Ibu Eny Yulianti, M.Si dan Ibu Armeida Dwi Ridhowati Madjid, M.Si selaku dosen penguji atas semua bimbingan dan arahan serta masukan selama ini.
7. Ibu Himmatul Barroroh, M.Si selaku dosen wali yang telah memberikan bimbingan selama kuliah di Jurusan Kimia Fakultas Sains dan teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
8. Seluruh Dosen Program Studi Kimia Fakultas Sains dan teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu, pengalaman, bimbingan dan kesabaran dalam menghadapi kami selama ini.
9. Orang tua penulis, Bapak Supatono dan ibu Suntari serta adik kandung saya Ummi Shofiana A'malussholikhah yang telah banyak memberikan perhatian, nasihat, doa, dan dukungan baik moral maupun material yang tidak mungkin terbalaskan

Semoga amal perbuatan Bapak/Ibu serta semua pihak yang membantu dalam proses penyelesaian skripsi ini di ridhoi oleh Allah SWT dan dicatat sebagai amal soleh Bapak/Ibu/Saudara sekalian. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik serta saran atas kekurangan proposal ini akan diterima dengan senang hati.

Malang, 24 Juni 2022

Penulis

## DAFTAR ISI

LEMBAR JUDUL .....	i
LEMBAR PERSETUJUAN .....	ii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN .....	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	v
MOTTO .....	vi
KATA PENGANTAR .....	vii
DAFTAR ISI .....	x
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiv
ABSTRAK.....	xv
ABSTRACT .....	xvi
مستخلص البحث.....	xvii
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	7
1.3 Tujuan Penelitian .....	7
1.4 Batasan Masalah .....	7
1.5 Manfaat Penelitian .....	8
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>9</b>
2.1 Anggur Bali .....	9
2.2 Biji Anggur ( <i>Vitis Vinifera</i> ) .....	12
2.3 Ekstraksi Ultrasonik .....	16
2.4 Pemisahan Menggunakan KLT .....	19
2.5 Analisis <i>ImageJ</i> .....	22
2.6 Analisis PCA ( <i>Principle Component Analysis</i> ) .....	24
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>30</b>
3.1 Waktu dan Tempat .....	30
3.2 Alat dan Bahan .....	30
3.2.1 Alat .....	30
3.2.2 Bahan .....	30
3.3 Rancangan Penelitian.....	30
3.4 Tahapan Penelitian .....	31
3.5 Cara Kerja .....	31
3.5.1 Preparasi Sampel .....	32
3.5.2 Ekstraksi Biji anggur Bali dengan Ultrasonik.....	32
3.5.3 Pemisahan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis .....	32
3.5.4 Analisis dengan PCA .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>34</b>
4.1 Preparasi Sampel.....	34
4.2 Ekstraksi Biji Anggur Baku dengan Ultrasonik.....	35
4.3 Pemisahan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	37
4.4 Analisis dengan PCA .....	43
4.5 Pembahasan hasil Penelitian dalam Prespektif Al-Qur'an .....	48
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>54</b>
5.1 Kesimpulan .....	54
5.2 Saran.....	54
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>55</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## DAFTAR TABEL

<a href="#">Tabel 4.1. Nilai Rf dan SD Rf biji anggur bali dari berbagai daerah</a> .....	42
<a href="#">Tabel 4.2. Nilai AUC sampel Bali 1</a> .....	45
<a href="#">Tabel 4.3. Nilai AUC sampel Bali 2</a> .....	45
<a href="#">Tabel 4.4. Nilai AUC sampel Probolinggo</a> .....	45

## DAFTAR GAMBAR

<a href="#">Gambar 2.1 (a) Daun anggur Bali, (b) Buah muda anggur Bali</a> .....	12
<a href="#">Gambar 2.2 Biji Anggur (<i>Vitis vinifera</i>)</a> .....	12
<a href="#">Gambar 2.3 Struktur kimia katekin (a), epikatekin (b)</a> .....	14
<a href="#">Gambar 2.4 Perbandingan hasil pemisahan ekstrak biji anggur Bali</a> .....	19
Gambar 2.5 Hasil KLT pada ekstrak biji anggur .....	21
<a href="#">Gambar 2.6 Contoh penandaan pita KLT</a> .....	23
<a href="#">Gambar 2.7 Densitogram</a> .....	23
<a href="#">Gambar 2.8 Noda sinesetin</a> .....	24
<a href="#">Gambar 2.9 Komatogram kumis kucing</a> .....	24
<a href="#">Gambar 2.10 Pola diagram PCA</a> .....	26
<a href="#">Gambar 2.11 Plot PCA</a> .....	28
<a href="#">Gambar 2.12 Score plot temulawak, kunyit, dan bangle</a> .....	29
Gambar 4.1 Biji anggur basah (a) dan biji anggur kering (b) .....	34
Gambar 4.2 Filtrat ekstrak kasar .....	36
Gambar 4.3 Reaksi Protonasi vanillin dalam larutan asam .....	39
Gambar 4.4 Reaksi kondensasi vanillin dengan flavonoid .....	39
Gambar 4.5 Perbandingan hasil pemisahan ekstrak biji anggur Bali .....	41
Gambar 4.6 Kromatogram biji anggur Bali 1 (a), Bali 2 (b) .....	44
Gambar 4.7 Pola diagram .....	47

## DAFTAR LAMPIRAN

<a href="#">Lampiran 1 Rancangan Penelitian</a> .....	61
<a href="#">Lampiran 2 Skema Kerja</a> .....	62
<a href="#">Lampiran 3 Perhitungan dan Pembuatan Larutan</a> .....	66
<a href="#">Lampiran 4 Perhitungan Rf dan SD Rf</a> .....	68
Lampiran 5 Analisis PCA .....	74
Lampiran 6 Dokumentasi Penelitian .....	81
Lampiran 7 Tahapan Pengolahan data dengan Perangkat Lunak .....	84
Lampiran 8 Lain-Lain .....	89

## ABSTRAK

Cholifah, Dwi Novianti Nur. 2022. **Analisis Kemometrik Menggunakan PCA (*Principal Component Analysis*) Pada Profil Kromatografi Lapis Tipis Biji Anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavalle*) Didasarkan Perbedaan Letak Geografis**. Skripsi. Jurusan Kimia. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I : Elok Kamilah Hayati, M.Si, Pembimbing II : Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I

---

**Kata Kunci** : Biji anggur Bali, Ultrasonik, KLT, *ImageJ*, PCA

Biji anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavalle*) merupakan salah satu buah-buahan yang dimanfaatkan dalam produksi obat-obatan, karena di dalamnya mengandung senyawa aktif yang berpotensi sebagai tanaman obat. Biji anggur Bali memiliki kandungan senyawa aktif yang berbeda-beda setiap daerah, sehingga perlu dilakukan standarisasi dari biji anggur Bali tersebut. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui profil kromatografi lapis tipis senyawa aktif dalam biji anggur Bali yang diperoleh dari daerah Kecamatan Grogak (Bali), Kecamatan Buleleng (Bali), dan Kecamatan Sumberasih (Probolinggo) menggunakan analisis PCA.

Pengambilan ekstrak kasar dalam biji anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavalle*) dilakukan dengan ekstraksi ultrasonik frekuensi 20 kHz selama 5 menit dengan pelarut methanol : akuades : asam asetat. Pemisahan senyawa aktif biji anggur dilakukan menggunakan metode kromatografi lapis tipis menggunakan silika gel G<sub>60</sub>F<sub>254</sub> dengan eluen toluene : asam asetat : aseton (3:1:3). Hasil KLT kemudian disemprot menggunakan reagen vanillin-HCl. Hasil kromatogram akan diolah menggunakan *ImageJ* dan dianalisis kemometrik dengan menggunakan PCA.

Hasil KLT menunjukkan bahwa berdasarkan profil kromatogram, sampel biji anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavalle*) berdasarkan perbedaan letak geografis memiliki profil yang mirip dari berbagai daerah dan nilai standar deviasi menghasilkan tingkat kepresisian yang tinggi setiap node. Hal tersebut menunjukkan sampel yang berasal dari berbagai daerah tersebut memiliki kedekatan berdasarkan kandungan senyawanya. Hasil analisis PCA berdasarkan nilai AUC yang didapat dari *ImageJ*, bahwa komponen senyawa aktif atau kadarnya dalam biji anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavalle*) berbeda satu dengan lainnya.

## ABSTRACT

Cholifah, Dwi Novianti Nur. 2022. **Chemometric Analysis Using PCA (Principal Component Analysis) on Thin Layer Chromatography Profile of Bali Grape Seed (*Vitis vinifera* L. Alphonso Lavallo) Based on Geographical Location Differences**. Essay. Chemistry Department. Faculty of Science and Technology. Maulana Malik Ibrahim State Islamic University, Malang. Advisor I : Elok Kamilah Hayati, M.Si, Advisor II : Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I

---

**Keywords:** Bali Grape Seed, Ultrasonic, TLC, *ImageJ*, PCA

Bali grape seed (*Vitis vinifera* L. Alphonso Lavallo) is one of the fruits used in the production of medicines, due to its active compounds. Bali grape seeds contain different active compounds in each region, so it is necessary to standardize the active compounds of Bali grape seeds. This study was conducted to determine the thin layer chromatographic (TLC) profile of active compounds in Bali grape seeds obtained from the Grogak District (Bali), Buleleng District (Bali), and Sumberasih District (Probolinggo) using principal component analysis (PCA).

Extraction of crude extract in the seeds of Bali grape (*Vitis vinifera* L. Alphonso Lavallo) was carried out by ultrasonic extraction with a frequency of 20 kHz for 5 minutes with solvent methanol : aquadest : acetic acid. Separation of active compounds in grape seed was accomplished using TLC method using silica gel G<sub>60</sub>F<sub>254</sub> with toluene : acetic acid : acetone (3:1:3) as an eluent. The spot of active compound in the TLC were then sprayed using vanillin-HCl. The chromatogram were processed with ImageJ then analyzed using PCA.

Based on the chromatogram profile, samples of Bali grape seeds (*Vitis vinifera* L. Alphonso Lavallo) based on geographical differences had similar profiles from various regions and based on the standard deviation value showed a high precision for each spot. This showed that samples from various regions have close proximity based on their compound content. The results of the PCA analysis based on the AUC value obtained from ImageJ, that the active compound components or their levels in Bali grape seeds (*Vitis vinifera* L. Alphonso Lavallo) differ from one another.

## مستخلص البحث

خليفة، دوي نوفيانتى نور. ٢٠٢٢. التحليل الكيميائي باستخدام PCA (تحليل المكون الرئيسي) في الملف الكروماتوغرافي لطبقة رقيقة من بذور العنب بالي (*Vitis Vinifera L. Alphonso Lavalle*) استنادا إلى اختلافات الموقع الجغرافي. البحث الجامعي. قسم الكيمياء. كلية العلوم والتكنولوجيا. جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج.

المشرفة الأولى: إيلوك كاملة حياقي الماجستير، المشرف الثاني: الدكتور محمد مخلص فخر الدين.

الكلمة الإشارية: بذور العنب بالي، الصوت العالي، KLT، ImageJ، PCA

بذور عنب بالي (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavalle*) هي إحدى الثمار المستخدمة في إنتاج الأدوية لاحتوائها على مركبات نشطة لها إمكانات كنباتات طبية. تحتوي بذور العنب البالية على مركبات نشطة مختلفة في كل منطقة، لذلك من الضروري توحيد بذور العنب البالية. أجريت هذه الدراسة لتحديد المظهر الكروماتوغرافي للطبقة الرقيقة للمركبات النشطة في بذور العنب البالية التي حصلت الباحثة من منطقة غراغك (بالي) ومنطقة بوللينج (بالي) ومنطقة سومبرأسيه (فروبولينغا) باستخدام تحليل PCA .

استخرج المستخلص الخشن من بذور العنب بالي (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavalle*) عن طريق الاستخلاص بالموجات الصوت العالي بتردد ٢٠ كيلو هرتز لمدة ٥ دقائق باستخدام مسيل الميتانول: أكواديس: حمض الأسيتيك. وأما فصل المركبات الفعالة في بذور العنب بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة باستخدام هلام السيليكا G<sub>60</sub>F<sub>254</sub> مع مسيل توليني: حمض الأسيتيك: الأسيتون (٣ : ١ : ٣). ثم رش نتائج KLT باستخدام كاشف vanillin-HCl . ثم صنع نتائج الكروماتوغرام باستخدام ImageJ وتحليلها كيميائيا باستخدام PCA . وأظهرت نتائج KLT إن عينات بذور العنب البالية (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavalle*) بناء على ملف الكروماتوجرام والاختلافات الجغرافية لها ملامح متشابهة من مناطق مختلفة وأن قيمة الانحراف المعياري أدت إلى مستوى عال من الدقة لكل بقعة. وهذا يدل على أن العينات من مناطق مختلفة لها تقارب وثيق بناء على محتواها المركب. وأما نتائج تحليل PCA المستندة إلى قيمة AUC المحسولة من ImageJ يدل على أن مكونات المركب النشط أو مستوياتها في بذور عنب بالي (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavalle*) تختلف بعضها بعضا.

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Buah anggur merupakan salah satu buah-buahan yang dimanfaatkan dalam produksi obat-obatan. Biji buah anggur mengandung banyak senyawa aktif seperti antosianin (Zubaidah & Veronica, 2014), resveratrol (Kurnia, 2019), proantosianidin (Afrianto, 2020), dan polifenol (Villani et al., 2015). Kandungan senyawa aktif pada biji anggur dapat dimanfaatkan sebagai obat anti inflamasi (Kurnia, 2019), antioksidan (Handayani dkk, 2016), antikanker (Mantena dkk, 2006), antibakteri (Setyohadi, 2010), perlindungan terhadap kerusakan hati (Zubaidah & Veronica, 2014), dan sebagai netralisasi radikal bebas (Ghafoor et al., 2009). Potensi penggunaan tanaman anggur sebagai obat ini telah dijelaskan dalam Q.S At Thaha ayat 53 sebagai berikut:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَوَسَّلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ  
أَنْوَاجًا مِنْ تَنْبَاتٍ شَتَّى

Artinya: “Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuhan yang bermacam-macam.”

Menurut tafsir Adhwa’ul Bayan lafadz *azwaja* merupakan bentuk jamak dari *al-jauz* yang berarti jenis. Dalam ayat tersebut lafadz *azwaja* memiliki makna jenis-jenis tumbuhan salah satunya yaitu tumbuhan atau tanaman anggur. Sedangkan lafadz *Nabatin Syatta* memiliki makna bahwa jenis-jenis tumbuhan atau tanaman memiliki sifat yang berbeda baik dari segi rasa, warna, bentuk,

maupun manfaat. Dalam ayat tersebut dijelaskan bahwasanya Allah telah memberikan banyak nikmat serta karunia untuk makhlukNya yaitu dengan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang kaya akan manfaat (Asy-Syanqithi, 2007). Salah satunya yaitu tanaman anggur yang dapat dijadikan sebagai obat-obatan.

Adanya bukti empiris dan bukti ilmiah yang berkaitan dengan khasiat tanaman obat, membuat masyarakat banyak yang memanfaatkan tanaman obat ini sebagai obat alternatif pencegahan dan penyembuhan berbagai macam penyakit (Putri,2019). Obat yang berasal dari bahan dasar tanaman memiliki efek samping yang lebih rendah pada pengosumsinya dibandingkan obat sintetik, selain itu khasiat obat yang dihasilkan tidak kalah dari obat modern. Masa kini penggunaan obat-obatan herbal semakin berkembang pesat, sehingga perlu adanya pengendalian mutu, khasiat, serta keamanannya (Purnamasari, 2013). Salah satu upaya pengendalian mutu tanaman obat yaitu menggunakan analisis sidik jari. Pengendalian kualitas biji anggur menjadi salah satu parameter yang penting untuk menghindari pemalsuan akibat banyaknya kemiripan biji anggur dengan biji biji tanaman lainnya. Oleh karena itu, sangatlah perlu untuk mengontrol kualitas biji anggur sebagai bahan baku obat herbal. Upaya yang dapat dilakukan untuk mengontrol kualitas biji anggur ialah dengan menganalisis profil senyawa biji anggur yang dapat digunakan untuk memantau kualitas bahan baku produk obat herbal (Karimah, 2017). Hasil penelitian Villani (2015) menyatakan bahwa standarisasi baku mutu menggunakan analisis sidik jari tanaman obat sangat penting dilakukan untuk menjaga kualitas tanaman obat.

Indonesia merupakan negara beriklim tropis yang kaya akan berbagai jenis

tanaman obat, salah satunya buah anggur. Buah anggur yang terdapat di Indonesia dan sering dimanfaatkan masyarakat adalah buah anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavalle*) (Anggan dkk., 2018). Buah anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavalle*) banyak tumbuh di daerah dataran tinggi dan dataran rendah seperti daerah Jawa Timur (Probolinggo, Pasuruan, Situbondo), Bali dan Kupang (NTT). Menurut Periadnadi (2017) karakteristik dataran rendah yaitu memiliki ketinggian wilayah <200 mdpl, suhu 24-32°C dan iklim yang cenderung panas serta memiliki PO<sub>2</sub> lebih tinggi dibanding dataran tinggi. Sedangkan dataran tinggi yaitu wilayah yang terletak pada ketinggian >200 mdpl, suhu 23-28°C, dan iklim yang lembab. Daerah dataran tinggi akan berpengaruh terhadap pertumbuhan tanaman anggur. Akibatnya proses metabolisme yang berlangsung pada tanaman tersebut juga akan mengalami gangguan sehingga senyawa yang dihasilkan dari proses tersebut akan berbeda pada setiap ketinggian tempat (Laily et al., 2012).

Kualitas suatu senyawaan dapat ditunjukkan dengan sifat bioaktifitasnya. Bioaktifitas dipengaruhi oleh kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam biji anggur. Namun, Kandungan senyawa aktif yang ada dalam biji anggur dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, salah satunya ialah faktor eksternal dan faktor internal. Faktor eksternal yang dapat mempengaruhi adalah kondisi geografis atau lokasi tanam (Prasetya et al., 2020), ketinggian lokasi (Safrina & Priyambodo, 2018), spesies (Nuryani, 2015) iklim (Herlina et al., 2017), usia tanaman (Astuti dkk., 2014), kelembapan dan kesuburan tanah (Szakiel et al., 2011). Perbedaan daerah tumbuh tanaman anggur dapat berpengaruh terhadap kandungan senyawa kimia yang ada pada biji anggur tersebut. Sedangkan faktor internal yang dapat mempengaruhi senyawa aktif ialah jenis pelarut ekstraksi (Rifai et al., 2018),

metode ekstraksi (Sa'adah et al., 2017), waktu ekstraksi (Oktavia, 2011) dan proses pasca panen seperti proses pengeringan biji anggur (Safrina & Priyambodo, 2018). Faktor-faktor tersebut secara umum akan berdampak pada kualitas dan kandungan senyawa aktif yang terkandung pada tanaman guna dieksploitasi untuk kegunaan farmasi, nutrisi dan industri. Jadi tumbuhan yang termasuk dalam spesies yang sama tetapi berada di zona geografis yang berbeda dapat berbeda secara signifikan dalam kandungan metabolit sekunder tertentu, baik secara kualitatif maupun kuantitatif.

Pengambilan senyawa aktif pada biji anggur Bali dapat dilakukan dengan cara ekstraksi. Metode ekstraksi yang banyak digunakan adalah metode ultrasonik. Keuntungan utama dari ekstraksi dengan metode ultrasonik dibandingkan dengan ekstraksi dengan metode konvensional lainnya adalah efisiensi lebih besar dan waktu operasinya lebih singkat (Rifai et al., 2018). Afrianto (2020) melakukan penelitian pada biji anggur dengan ekstraksi ultrasonik menggunakan variasi pelarut dan waktu didapat hasil terbaik pada menit ke 5 menit, dan pelarut terbaik metanol : air : asam asetat (70:29,9:0,1).

Teknik analisis yang mampu mengidentifikasi keragaman profil metabolomit dalam suatu senyawaan yaitu melalui pendekatan metabolomit dengan kromatografi lapis tipis, supaya memberikan gambaran komponen kimia yang ada pada tumbuhan. Pemisahan senyawa dalam biji anggur dapat dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Pada hakikatnya KLT merupakan metode kromatografi cair yang melibatkan dua fase yaitu fase diam dan fase gerak (eluen). Fase diamnya dapat berupa serbuk halus yang berfungsi sebagai permukaan penyerap (kromatografi cair- padat) atau sebagai penyangga untuk lapisan zat cair

(kromatografi cair- cair) (Iskandar, 2007). Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi (Ganjar & Rohman, 2007). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Afrianto (2020) komposisi eluen fase gerak KLT yang menghasilkan pemisahan terbaik pada ekstrak biji anggur adalah toluena : asam asetat : aseton (3:1:3).

Untuk mengetahui seberapa besar suatu karakter dapat berkontribusi terhadap keragaman profil kromatografi senyawa sampel dari beberapa daerah Indonesia, dapat dianalisis menggunakan analisis multivarian salah satunya dengan analisis komponen utama *Principle Component Analysis* (PCA) (Putri, 2019). PCA ialah metode untuk mengidentifikasi pola yang terdapat pada sebuah data dan menyatakannya dalam sebuah cara untuk menentukan persamaan dan perbedaan yang dimiliki oleh data tersebut. Metode ini digunakan untuk melakukan pengenalan pola sehingga dapat mengelompokkan tanaman berdasarkan pendekatan perbedaan daerah, walaupun data spektrum yang dihasilkan memiliki kemiripan tiap daerahnya. PCA memudahkan visualisasi pengelompokan data, evaluasi awal kesamaan antar kelompok atau kelas, dan menemukan faktor atau pola yang teramati melalui korelasi (Nuryani, 2015).

Berbagai penelitian dan pengembangan telah dilakukan untuk melihat keragaman mutu daerah yang memiliki kondisi geografis yang cukup berbeda. Nuryani (2015) telah melakukan analisis sidik jari pada daun kumis kucing untuk mengetahui profil kromatogram dengan menggunakan kromatografi lapis tipis menghasilkan pola noda yang sama dan analisis metode PCA didapat saling

mengelompok dan berdekatan karena memiliki kemiripan nilai reflektans yang dimiliki. Nilai reflektans ini menunjukkan bahwa kelompok daun kumis kucing tiap daerahnya memiliki mutu yang berbeda berdasarkan kandungan senyawa kimianya. Sedangkan Fitrianti (2011) melakukan diferensiasi temulawak, kunyit dan bangle menggunakan kromatografi lapis tipis menghasilkan nilai AUC dari densitogram pita KLT, dari data tersebut akan dapat menunjukkan hasil PCA bahwa seluruh sampel berada saling berdekatan yang menunjukkan kemiripan sifat dan komposisi kimianya sama. Putri (2019) melaporkan bahwa ekstrak metanol sindaguri memiliki hasil densitogram pola profil kromatogram yang sama. Dengan adanya keragaman profil kromatogram tiap sampel, maka dapat dianalisis profil kromatogram berdasarkan perbedaan letak geografis menggunakan metode PCA. Hasil PCA menunjukkan tidak semua sampel pada daerah atau provinsi yang sama memiliki kedekatan berdasarkan clustering.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dalam penelitian ini akan dilakukan pemisahan senyawa aktif pada ekstrak kasar biji buah anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavalle*) dari daerah yang berbeda dengan metode ekstraksi ultrasonik menggunakan pelarut metanol : air : asam asetat (70 : 29,9 : 0,1). Kemudian dilakukan analisis keragaman menggunakan parameter profil kromatogram dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan eluen toluena : asam asetat : aseton (3 : 1 : 3). Data hasil kromatogram yang didapatkan selanjutnya akan diolah menggunakan *ImageJ* dan dianalisis untuk menentukan keragaman profil kromatogram menggunakan analisis PCA.

## 1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Bagaimana profil senyawa aktif pada ekstrak biji anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavallo*) berdasarkan perbedaan letak geografis ?
2. Bagaimana hasil interpretasi aplikasi *ImageJ* dan metode PCA pada senyawa aktif ekstrak biji anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavallo*) ?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Berdasarkan rumusan masalah tersebut, maka tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Untuk mengetahui profil senyawa aktif pada biji anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavallo*) berdasarkan perbedaan letak geografis.
2. Untuk mengetahui hasil interpretasi aplikasi *ImageJ* dan metode PCA pada senyawa aktif ekstrak biji anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavallo*).

### **1.4 Batasan Masalah**

Batasan masalah dari penelitian ini adalah :

1. Sampel yang digunakan adalah biji anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavallo*)
2. Pelarut yang digunakan adalah metanol 70 : air 29,9 : asam asetat 0,1.
3. Eluen yang digunakan yaitu toluena : asam asetat : aseton dengan perbandingan 3 : 1 : 3.
4. Metode ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi ultrasonik selama 5

menit dengan frekuensi 20 kHz.

### **1.5 Manfaat Penelitian**

1. Memberikan informasi mengenai manfaat biji anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavallo*) sebagai tanaman obat.
2. Memberikan informasi mengenai profil Kromatografi Lapis Tipis senyawa aktif pada biji anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavallo*) yang berbeda letak geografis.
3. Mengetahui hubungan langsung antara ilmu kimia teoritis dan praktis, khususnya pada proses ekstraksi biji anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavallo*) sehingga kedepannya dapat dikembangkan lebih lanjut.
4. Mengetahui kendali mutu biji anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavallo*) melalui pendekatan metabolomik dengan analisis PCA.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Anggur Bali**

Tanaman anggur memiliki morfologi bunga majemuk (Rai, 2015) dan buah anggur yang bewarna biru kehitaman, kulit yang tebal dan rasanya yang asam. Buah anggur khususnya di Indonesia memiliki beberapa spesies. Salah satunya yaitu buah anggur Bali. Anggur Bali memiliki nama ilmiah *Vitis vinifera L. Alphonso Lavallee* merupakan salah satu buah unggulan di pulau Bali. Anggur ini ditanam di daerah Kabupaten Buleleng di tiga kecamatan, yaitu Seririt, Gerokgak dan Banjar. Jenis anggur bali ini memiliki buah dengan warna hitam keunguan serta tergolong ke dalam black variety (varietas anggur hitam). Anggur Bali ini dikenal dengan nama 'Ribier' dan dapat dimanfaatkan sebagai buah segar (table grape) ataupun wine (wine grape) (Astawa, 2015).

Tanaman anggur ini dikenal umat manusia sejak lama yaitu pada zaman Nabi Nuh as. Buah ini berasal dari sekitar Laut Hitam dan Laut Kaspi, kemudian menyebar ke Amerika Utara, Amerika Selatan, dan Eropa. Selanjutnya ke Asia termasuk Indonesia. Secara umum, buah ini merupakan tanaman yang merambat. Ketinggian tempat yang baik adalah tidak lebih dari 300 meter di atas permukaan laut. Buah anggur telah banyak disebutkan dalam Al-Quran. Buah ini disebutkan dalam Al-Quran sebanyak 14 kali yaitu terulang 2 kali dalam bentuk mufrod ('Inab) dan 9 kali dalam bentuk jama" (A'naab). Dalam Al-Quran buah ini seringkali disebut sebagai buah-buahan yang dapat digunakan sebagai sumber makanan bagi manusia seperti dalam Q.S Al-Mukminun ayat 19 sebagai berikut:

فَأَنْشَأْنَا لَكُمْ بِهِ جَنَّاتٍ مِنْ نَخِيلٍ وَأَعْنَابٍ لَكُمْ فِيهَا فَوَاكِهُ كَثِيرَةٌ وَمِنْهَا تَأْكُلُونَ

Artinya : *“Lalu dengan air itu, Kami tumbuhkan untuk kamu kebun-kebun kurma dan anggur; di dalam kebun-kebun itu kamu peroleh buah-buahan yang banyak dan sebahagian dari buah-buahan itu kamu makan”*. (Q.S Al-Mukminun: 19)

Pada ayat tersebut menjelaskan bahwa dengan air yang tersimpan di bumi maka tumbuh kebun-kebun kurma dan anggur maupun kebun-kebun lainnya. Dalam kebun-kebun tersebut diperoleh buah-buahan yang nantinya dapat digunakan sebagai sumber makanan yang mempunyai banyak nutrisi bagi manusia. Selain sebagai sumber makanan, buah anggur juga disebutkan sebagai buah-buahan yang memiliki banyak manfaat salah satunya sebagai obat. Seperti dalam Q.S An-Nahl ayat 67 sebagai berikut:

وَمِنْ ثَمَرَاتِ النَّخِيلِ وَالْأَعْنَابِ تَتَّخِذُونَ مِنْهُ سَكَرًا وَرِزْقًا حَسَنًا إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِقَوْمٍ يَعْقِلُونَ

Artinya: *“Dan dari buah korma dan anggur, kamu buat minuman yang memabukkan dan rezeki yang baik. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang memikirkan”* (QS. An-Nahl ; 67).

Menurut tafsir Kementerian Agama RI menyebutkan bahwa pada ayat tersebut Allah SWT menunjukkan tanda-tanda kebesaranNya melalui buah kurma dan anggur. Ayat tersebut menyebutkan bahwa buah anggur dapat digunakan sebagai minuman yang memabukkan, namun dari buah anggur pula manusia memperoleh banyak rizki. Rizki ini berupa manfaat-manfaat yang dapat diperoleh dari anggur maupun kurma. Salah satu rizki yang dapat kita ambil dari buah anggur

ialah dapat diperjual belikan sehingga memiliki nilai ekonomi yang dapat membantu untuk mencukupi kehidupan kita yang lainnya. Kita memikirkan kekuasaan Allah dari sudut ini dengan melihat segala ciptaan-Nya kita dapat meyakini akan kekuasaan-Nya, bahwasannya segala sesuatu tidaklah terjadi dengan kebetulan. Setelah disebutkan hubungan air dengan tumbuhan anggur, kita diminta untuk berpikir lebih mendalam atas segala kuasa Allah dan dapat mengambil manfaat serta kebaikan dari semua ciptaan-Nya sebagaimana mestinya (tidak mengeksploitasi). Maka dari itu penelitian ini saya lakukan sebagai bentuk tanggung jawab sebagai khalifah, yaitu untuk memecahkan masalah, dan mengungkapkan kebaikan yang telah Allah ciptakan salah satunya dari kebaikan buah anggur.



**Gambar 2. 1** (a) Daun anggur Bali, (b) Buah muda anggur Bali, (c) Buah anggur Bali siap panen

Tanaman anggur Bali ini sangat sesuai dibudidayakan di daerah Buleleng sebab daerah ini terletak pada dataran rendah, keadaan iklim dan keadaan tanah yang sangat sesuai. Anggur Bali termasuk anggur lokal yang memiliki morfologi buah berbentuk bulat sedikit lonjong, panjang buah sekitar 2-13 cm, berwarna hijau, ungu, kehitaman, dan memiliki rasa buah manis agak sepat (Anggan, 2018) serta

memiliki umur panen 105-110 hari (matang di pohon) setelah pemangkasan (Rai, 2015).

Klasifikasi anggur sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheophyta

Division : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Order : Vitales

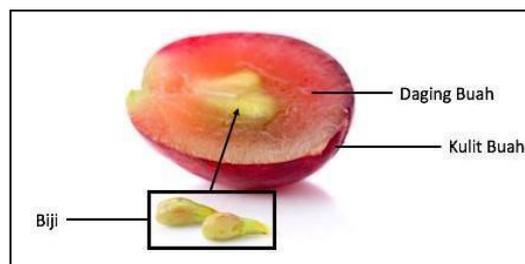
Family : Vitaceae

Genus : *Vitis*

Species : *Vitis vinifera* L. Var. Alphonso Lavalle (Setiadi, 2005).

## 2.2 Biji Anggur (*Vitis vinifera*)

Produksi anggur menjadi salah satu aktivitas agroekonomi terpenting di dunia, dengan lebih dari 67 juta ton anggur (*Vitis vinifera*) pada tahun 2012, dan sekitar 22 juta ton diproduksi dari Eropa (Ben et al., 2020). Dalam berbagai penelitian, buah anggur terbukti memiliki nilai baru di dunia biologi yaitu sebagai antimikrobia, antioksidan, dan sebagainya.



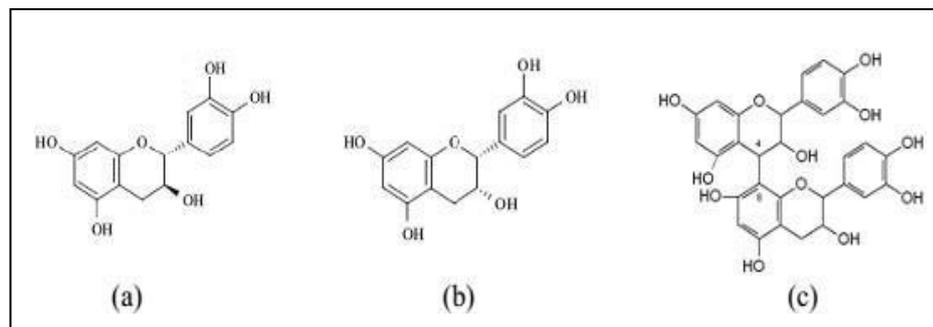
**Gambar 2. 2** Biji Anggur (*Vitis vinifera*)

Senyawa utama yang terdapat dalam anggur adalah flavonoid, diantaranya proanthocyanidins, anthocyanin dan flavonol. Flavonol ditemukan dalam kulit anggur sebagai glikosida dari kaempferol, quercetin, myricetin dan isorhamnetin. Sedangkan biji anggur mengandung flavan-3-OLS termasuk (+) katekin, (-) epikatekin (EC), (-) epikatekin-3-O-galat, baik sebagai monomer maupun polimer proanthocyanidins (Ennedy, 2006). Komposisi senyawa aktif yang terkandung dalam biji anggur dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, salah satunya ialah faktor eksternal dan faktor internal. Faktor eksternal yang dapat mempengaruhi adalah kondisi geografis atau lokasi tanam (Prasetya et al., 2020), ketinggian lokasi (Safrina & Priyambodo, 2018), spesies (Nuryani, 2015) dan iklim (Herlina et al., 2017). Perbedaan daerah tumbuh tanaman anggur dapat berpengaruh terhadap kandungan senyawa kimia yang ada pada biji anggur tersebut. Sedangkan faktor internal yang dapat mempengaruhi senyawa aktif ialah jenis pelarut ekstraksi (Rifai et al., 2018), metode ekstraksi (Sa'adah et al., 2017), waktu ekstraksi (Oktavia, 2011) dan proses pasca panen seperti proses pengeringan biji anggur (Safrina & Priyambodo, 2018).

Pada umumnya biji anggur mengandung 74 -78% oligometrik proantosianidin dan kurang dari 6% berat kering ekstrak biji anggur mengandung flavonoid. Proantosianidin biji anggur merupakan kelompok dari polifenolik bioflavonoid. Warna kemerah-merahan dan rasa astringen biji anggur dapat mengindikasikan bahwa biji anggur kaya akan komponen polifenol terutama proantosianidin (Chen et al., 2020).

Biji anggur mengandung 40% serat, 16% minyak, 11% protein, dan 7%

fenol kompleks. Senyawa fenolik pada biji anggur dapat digunakan sebagai senyawa antibakteri untuk menghambat beberapa bakteri patogen (Jayaprakasha dkk., 2003). Biji anggur kaya akan komponen monomer fenolik seperti katekin, epikatekin, epikatekin-3-O-gallat, dan proantosianidin (pada bentuk dimetrik, trimetrik, dan tetrametrik) yang memiliki efek mutagenik dan antivirus (Kim et al., 2006). Struktur katekin, epikatekin dan dimetrik proantosianidin dapat dilihat pada Gambar 2.3 :



**Gambar 2.3** Struktur kimia katekin (a), epikatekin (b), dan dimeric proanthocyanidin (c) (Oktavia, 2011).

Efek dari fenolik tergantung pada konsentrasi. Pada konsentrasi rendah, fenolik memengaruhi aktivitas enzim, terutama enzim yang berkaitan dengan produksi energi. Pada konsentrasi tinggi, fenolik dapat menyebabkan denaturasi protein. Peran antioksidan fenolik dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme dan produksi toksin menyebabkan komponen ini mampu mengubah permeabilitas sel mikroorganisme, memungkinkan hilangnya makromolekul dalam sel (Perumalla dkk., 2011).

*Grape Seed Extract/GSE* dapat menghambat aktivitas dihidrofolat reduktase dan pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* merupakan salah satu patogen

yang paling sering menyebabkan infeksi dan penyakit yang ditularkan melalui makanan. Kandungan intraseluler tetrahidrofolat yang merupakan jenis folat yang teridentifikasi dalam *S. aureus* secara bermakna juga menurun jika terpapar oleh GSE (Prasetya et al., 2020).

Biji anggur kaya akan komponen monomer fenolik seperti katekin, epikatekin, epikatekin-3-O-gallat, dan dimeric procyanidin yang diketahui dapat berfungsi sebagai antioksidan (Kim dkk., 2006). Selama proses pengeringan, aktivitas antioksidan mengalami perubahan. Penguapan yang terjadi selama proses pengeringan menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan (Anissa, 2012). Menurut Kim dkk. (2006) pada suhu 50°C aktivitas antioksidan pada biji anggur cenderung menurun dan tidak stabil, dikarenakan suhu tinggi selama proses pengeringan menyebabkan penguapan, sementara senyawa antioksidan mudah menguap.

Kandungan senyawa aktif pada biji anggur sangatlah melimpah. Namun, metabolit sekunder yang ada pada tanaman, dapat dipengaruhi secara signifikan oleh banyak faktor intrinsik dan eksternal. Faktor intrinsik mencerminkan status fisiologis tanaman, yang terutama tergantung pada tahap pertumbuhan dan perkembangan. Faktor eksternal terdiri dari rangsangan lingkungan, baik abiotik maupun biotik, termasuk suhu, kesuburan tanah, ketersediaan air dan cahaya, makan serangga fitofag atau hewan herbivora lainnya, persaingan dengan tanaman tetangga, dan interaksi dengan patogen dan parasit seperti bakteri, jamur, virus dan nematoda (Szakiel et al., 2011).

Astuti 2014 telah melakukan penelitian tentang pengaruh lokasi tumbuh

terhadap senyawa minyak atsiri pada rimpang *cucurma manga*. Analisis menghasilkan bahwasannya dataran rendah mengandung jenis senyawa yang lebih banyak dibandingkan dengan rimpang pada dataran tinggi. Hal ini dikarenakan komposisi, kualitas, dan kuantitas minyak atsiri dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti perbedaan cara isolasi, peralatan yang digunakan, asal tanaman, iklim, struktur tanaman, usia tanaman, temperatur, curah hujan dan durasi pajanan sinar matahari. Sehingga dapat diketahui bahwa tanaman yang ditanam pada lahan kekurangan air akan menghasilkan minyak atsiri lebih banyak daripada yang ditanam pada lahan kecukupan air dan terdapat perbedaan komposisi minyak atsirinya. Kenaikan rendemen minyak atsiri pada saat tanaman yang diteliti kekurangan air diakibatkan oleh meningkatnya enzim PEP karboksilase yang berperan dalam sintesis ATP, peningkatan enzim geraniol dehidrogenase, dan kenaikan biogenesis geraniol dan sitral. Senyawa dalam minyak atsiri rimpang *C. mangga* yang ditanam pada dataran rendah lebih banyak daripada dataran tinggi, karena curah hujan pada dataran rendah lebih rendah sehingga kekurangan air menyebabkan enzim-enzim yang bertanggung jawab terhadap sintesis senyawa dalam minyak atsiri lebih banyak yang aktif. Selain curah hujan, intensitas penyinaran matahari, temperatur, kelembaban udara dan unsur hara tanah diperkirakan juga mempengaruhi perbedaan komposisi minyak atsiri tersebut.

### **2.3 Ekstraksi Ultrasonik**

Gelombang ultrasonik merupakan gelombang suara yang memiliki frekuensi diatas pendengaran manusia ( $\geq 20$  kHz). Ekstraksi ultrasonik digunakan

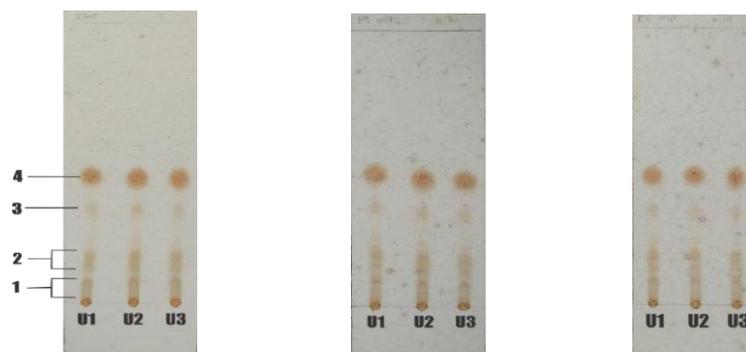
untuk memperoleh kandungan suatu senyawa yang lebih tinggi dengan waktu yang relatif singkat. Dengan bantuan gelombang ultrasonik yang dirambatkan melalui medium yang dilewati, proses ekstraksi senyawa organik pada tumbuhan maupun biji-bijian dapat berlangsung lebih cepat. Proses ekstraksi ultrasonik dengan getaran yang mengakibatkan dinding sel pecah sehingga kandungan atau senyawa antioksidan dapat diambil (Sholihah, dkk, 2017). Saat gelombang merambat, medium yang dilewatinya akan mengalami getaran sehingga akan memberikan pengadukan yang intensif terhadap proses ekstraksi, sehingga proses ekstraksi dapat berlangsung lebih cepat (Wardiyati, 2004).

Prinsip ekstraksi ultrasonik adalah dengan meningkatkan transfer massa yang disebabkan oleh naiknya penetrasi pelarut ke dalam jaringan tumbuhan lewat efek kapiler. Gelembung kavitasi akan terbentuk pada dinding sel tanaman akibat adanya gelombang ultrasonik. Efek dari pecahnya gelembung kavitasi ini dapat mengakibatkan peningkatan pori-pori dinding sel. Gelembung kavitasi akan terpecah disebabkan oleh tipisnya bagian kelenjar sel tumbuhan yang dapat mudah rusak oleh sonikasi. Hal ini yang menyebabkan proses ekstraksi dengan menggunakan gelombang ultrasonik menjadi lebih cepat dari metode konvensional dengan cara maserasi maupun ekstraksi Soxhlet. Medium yang dilewati akan mengalami getaran yang disebabkan oleh gelombang elektronik. Getaran yang diberikan gelombang ultrasonik akan memberikan pengadukan yang intensif terhadap proses ekstraksi. Proses Pengadukan akan meningkatkan osmosis antara bahan dengan pelarut sehingga akan mempercepat proses ekstraksi (Kartika, 2012).

Kelebihan dari metode ekstraksi ultrasonik yaitu kecepatan ekstraksinya,

dibandingkan dengan ekstraksi secara termal atau konvensional. Selain itu metode ultrasonik ini lebih aman, lebih singkat, dan dapat meningkatkan jumlah rendemen kasar. Parameter terpenting dalam suatu ekstraksi diantaranya adalah jenis pelarut dan lama ekstraksi (Tri, 2015). Pemilihan pelarut pada proses sangat berpengaruh pada hasil akhir. Dalam penelitian yang dilakukan Indrawati, dkk (2018) yang menggunakan variasi akuades, metanol, etil asetat, dan *n*-Heksana didapatkan hasil kadar antioksidan tertinggi terdapat pada metanol. Hal ini disebabkan senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, tannin, dll larut dalam senyawa polar. Sehingga dapat diketahui bahwa pelarut metanol merupakan pelarut yang sesuai, sebab metanol merupakan senyawa polar. Berdasarkan penelitian Xu, Changmou *et.al* (2010) hasil ekstraksi biji anggur (*Vitis vinifera* L.) menggunakan metode ekstraksi ultrasonik dengan waktu 20 menit menggunakan pelarut metanol/air/HCl (70:29:1) dikatakan merupakan komposisi paling efektif untuk ekstraksi pada biji anggur yang menghasilkan kadar *yield* total phenol sebesar 84,7 mg GAE/gDM; 73,9 mg PAE/gDM untuk total flavonol, dan 69,8 mgPAE/g DM untuk proantosianidin.

Penelitian Afrianto (2020) melakukan penelitian mengenai variasi waktu ekstraksi ultrasonik dan jenis pelarut pada ekstraksi biji anggur bali (*Vitis vinifera* L. *Alphonso Lavallee*) menyatakan bahwa ekstraksi ultrasonik yang dilakukan pada frekuensi 20 kHz menunjukkan hasil pemisahan terbaik menggunakan pelarut metanol 70 : air 29,9 : asam asetat 0,1 dengan lama ekstraksi 5 menit seperti yang terlampir pada Gambar 2.4.



**Gambar 2.4** Perbandingan hasil pemisahan ekstrak biji anggur Bali dengan pelarut metanol : air : asam asetat (70:29,9:0,1) dan waktu ekstraksi 5 menit (a), 10 menit (b), dan 15 menit (c) pada U1 = ulangan1; U2 = ulangan 2; U3 = ulangan 3.

## 2.4 Pemisahan Menggunakan KLT

Teknik kromatografi lapis tipis dikembangkan oleh Ismail dan Schraiber pada tahun 1938. Dikenal juga sebagai kromatografi kolom terbuka. Resolusi KLT jauh lebih tinggi daripada kromatografi kertas karena laju difusi yang luar kecil pada lapisan pengabsorpsi. Aplikasi KLT sangat luas misalnya ahli kimia forensik menggunakan KLT untuk bermacam-macam pemisahan. Pemakaiannya juga meluas dalam pemisahan senyawa anorganik (Khopkar, 2003).

Kromatografi merupakan suatu proses pemisahan yang mana analit-analitnya dalam sampel terdistribusi antara dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam dapat berupa bahan padat atau dalam bentuk cairan yang dilapiskan pada dinding kolom. Fase gerak dapat berupa gas atau cairan. Dalam kromatografi lapis tipis, fase gerak yang digunakan selalu cair (Rachman, dkk. 2017).

Prinsip dari metode ini yaitu memisahkan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel yang digunakan dengan pelarut yang digunakan. Biasanya

fase diam yang digunakan adalah plat silika dan fase gerak yang disesuaikan dengan jenis kepolaran sampel yang ingin dipisahkan. Larutan yang digunakan sebagai fase gerak disebut eluen. Semakin dekat kepolaran antara sampel dan eluen maka sampel akan semakin mudah terbawa oleh fase gerak (Anam, 2015).

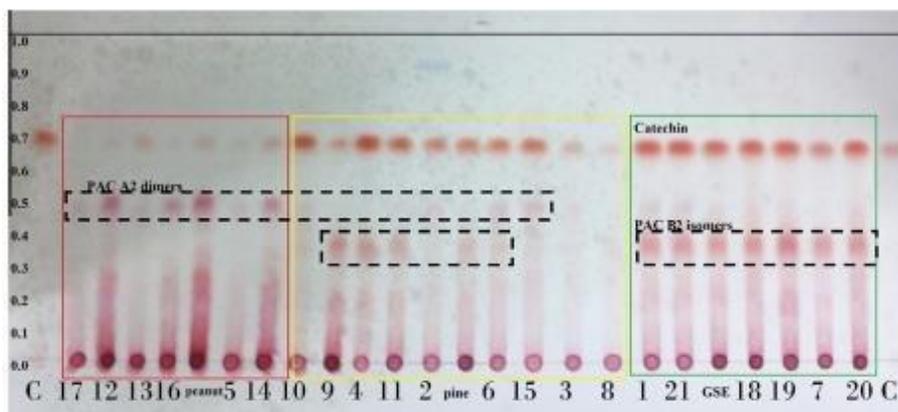
Nilai  $R_f$  dinyatakan sebagai perbandingan jarak senyawa yang terelusi dengan jarak fasa gerak yang mengelusi. Identifikasi dapat dilakukan dengan membandingkan nilai  $R_f$  yang diperoleh dengan  $R_f$  standar. Noda yang mempunyai nilai  $R_f$  yang berbeda dengan  $R_f$  reaktan diasumsikan bahwa produk sintesis telah terbentuk. Nilai  $R_f$  ditentukan menggunakan persamaan 2.1 (Rubiyanto, 2017) :

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}} \quad (2.1)$$

Stabilitas pada validasi metode KLT terdiri atas stabilitas analit pada pelat dan dalam larutan, stabilitas analit selama kromatografi, dan stabilitas visualisasi (pengamatan UV). Stabilitas bertujuan mengetahui mutu bahan baku maupun produk tanaman yang dapat bervariasi bergantung pengaruh lingkungan seperti suhu, kelembaban, dan oksigen serta memungkinkan rekomendasi terhadap kondisi penyimpanan, waktu sebelum pengujian, dan penentuan waktu simpan terhadap pola sidik jari analit (Reich dan Schibi, 2006).

Stabilitas suatu senyawa dapat ditentukan dengan tingkat presisi yaitu dengan cara mencermati pola sidik jari (noda), hasil dapat diterima jika pola sidik jari identik dengan jumlah, letak, warna dan syarat keberterimaan simpangan baku (intraplat) tidak lebih dari 0,02 dan simpangan baku (interplat) tidak lebih dari 0.05. Secara visual presisi semakin baik jika pola yang terlihat mendekati garis lurus.

Simpangan baku adalah nilai yang menunjukkan tingkat (derajat) variasi kelompok data dari rata-rata (Maulana, 2018).



**Gambar 2. 5** Hasil KLT pada Ekstrak Biji Anggur (Villani, 2015)

KLT merupakan salah satu teknik yang cepat, sederhana, dan murah untuk digunakan untuk membedakan ekstrak biji anggur murni dari campurannya. Metode ini dapat digunakan untuk memisahkan Proantosianidin dan divisualisasikan secara bersamaan menggunakan pewarnaan vanillin / HCl sederhana dan memungkinkan untuk mengetahui antara ekstrak biji anggur murni berkualitas tinggi dan yang dipalsukan. Pada Gambar 2.5 dapat dilihat bahwa pengujian kelompok pertama yang ditandai dengan garis tepi merah, menggambarkan sampel berkualitas rendah yang dicampur dengan kulit kacang. Dapat dilihat dengan mudah bahwa pada sampel ini mengandung dimer Proantosianidin A2, sedangkan biji anggur sampel asli (diuraikan dalam warna hijau) hanya berisi dimer Proantosianidin B. Dengan demikian, KLT telah dibuktikan sebagai metode yang cepat dan efektif untuk mendeteksi pemalsuan ekstrak biji anggur dengan ekstrak kulit kacang tanah (Villani, 2015).

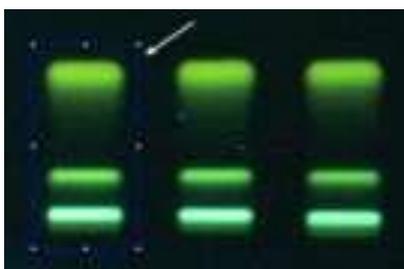
## 2.5 Analisis *ImageJ*

*ImageJ* ialah suatu piranti lunak untuk mengolah gambar yang berbasiskan program Java dan mudah didapatkan secara bebas untuk kalangan umum. Program ini dikembangkan oleh research services branch (RSB), national institute of mental health (NIMH), bagian dari national institute of mental health (NIH), Bethesda, Maryland, USA. *ImageJ* bisa menampilkan, memproses, mengedit, menyimpan, menganalisa, serta mencetak 8-bit, 16-bit, dan 32-bit.

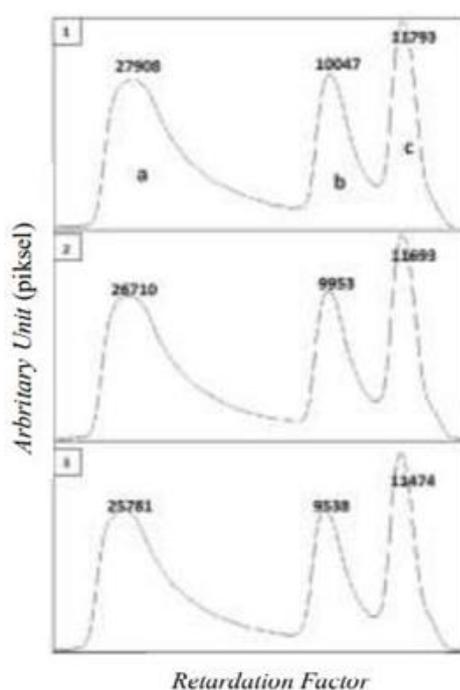
*ImageJ* ialah suatu piranti lunak yang bisa mengubah citra dari bentuk pita menjadi bentuk densitogram. *ImageJ* juga bisa menghitung area dan piksel dari suatu gambar, mengikuti jarak, sudut, membuat profil dari densitogram, dan garis kurva. Pengolahan parameter pada penelitian ini dilakukan sampai didapatkan metode terbaik yang ditunjukkan dengan nilai korelasi terbesar dari nilai AUC yang dihasilkan. Selain itu, dapat menghasilkan titik-titik yang berdekatan sepanjang garis lurus dengan nilai korelasi mendekati 1 dan stabil.

Penelitian sebelumnya yaitu oleh Fitriani (2011) yang berjudul diferensiasi temulawak, kunyit, dan bangle berdasarkan interpretasi kromatografi lapis tipis menggunakan *ImageJ*. Ada parameter yang penting dalam analisis menggunakan *ImageJ* yaitu penandaan pita yang berfungsi untuk memunculkan densitogram masing-masing komponen. Penandaan ini bertujuan menghasilkan nilai AUC yang dapat mewakili keseluruhan pita komponen yang ada untuk tiap penotolan. Pelebaran pada kotak penanda dari ukuran kotak awal tidak terlalu mempengaruhi nilai AUC tetapi perbedaan tinggi sangat mempengaruhi nilai AUC, yaitu nilai yang jauh menurun. Semakin besar konsentrasi komponennya, semakin tinggi puncak

yang dihasilkan karena intensitas warna gambar yang semakin terang.

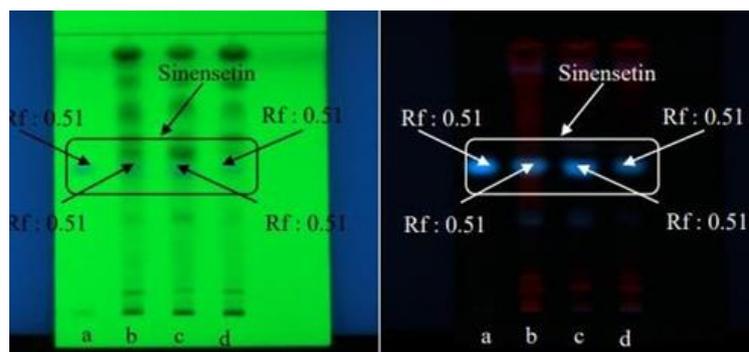


**Gambar 2.6** Contoh penandaan pita komponen KLT standar kurkumin



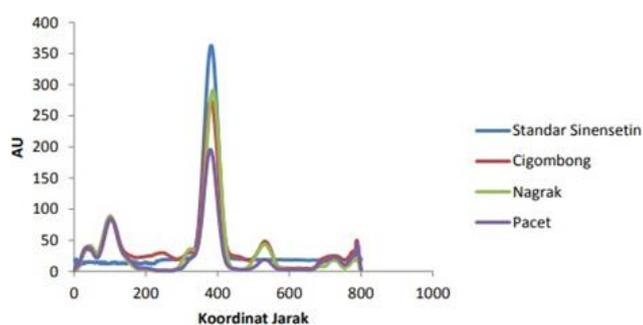
**Gambar 2.7** Densitogram dengan nilai area pada puncak dari masing-masing gambarpita komponen standar kurkumin.

Apabila pada densitogram terbentuk puncak ganda maka akan berpengaruh pada nilai AUC yang dihasilkan. Hal ini dapat disebabkan oleh adanya *tailing* / jejak elusi yang menyebabkan pembentukan puncak yang berekor. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Nuryani (2015) mengenai kendali mutu daun kumis kucing (*orthosiphon stamineus*) menggunakan pengolahan citra dan teknik pengenalan pola secara kemometrik, hasil dari *ImageJ* yaitu :



**Gambar 2.8** Noda sinensetin pada pelat KLT pada  $\lambda$  254 nm dan 366 nm standar sinensetin (a), Cigombong (b), Nagrak (c), dan Pacet (d)

Berdasarkan Gambar 2.8 menunjukkan noda pola pelat KLT yang sama dari 3 daerah yang berbeda. Hal ini menandakan jenis senyawa yang sama pada daun kumis kucing daerah Cigombong, Nagrak, dan Pacet, namun hanya berbeda intensitas atau jumlahnya. Berikut ini merupakan kromatogram hasil dari noda pelat KLT pada Gambar 2.9.



**Gambar 2.9** Kromatogram daun kumis kucing standar sinensetin (a), Cigombong (b), Nagrak (c), dan Pacet (d)

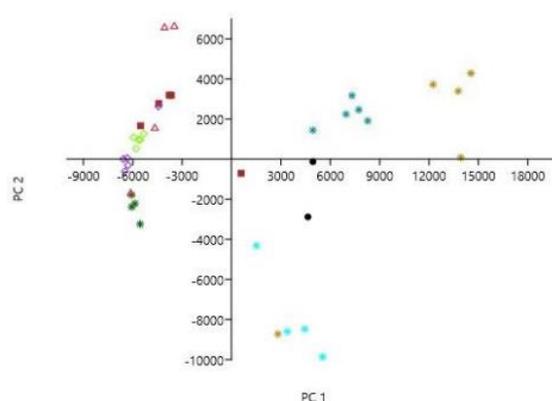
Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Nuryani (2015) semakin tinggi nilai AU, semakin besar konsentrasi senyawa yang diperoleh. Hasil tersebut juga membuktikan bahwa secara kimia terdapat perbedaan mutu daun kumis kucing berdasarkan perbedaan daerah.

## 2.6 Analisis PCA (*Principle Component Analysis*)

*Principal Component Analysis* (PCA) adalah salah satu bentuk metode interpretasi data dalam kemometri. Kemometri adalah penggunaan ilmu statistika dan matematika untuk pengolahan data kimia. *Software* ini mampu mengelompokkan dan menghubungkan hubungan dari banyak sampel. Metode ini dilakukan menggunakan *software* kemometri. Tujuan dari PCA adalah untuk mereduksi dimensi yang besar dari ruang data (*observed variables*) menjadi dimensi yang lebih kecil dari ruang fitur (*independent variable*), yang dibutuhkan untuk mendiskripsikan data lebih sederhana (Pratiwi, 2013).

PCA merupakan metode untuk mengidentifikasi pola yang terdapat pada sebuah data dan menyatakannya dalam sebuah cara untuk menentukan persamaan dan perbedaan yang dimiliki oleh data tersebut (Smith, 2002). PCA ialah suatu cara untuk mengidentifikasi pola-pola data dan kemudian mempresentasikan data tersebut ke bentuk lain untuk menunjukkan persamaan dan perbedaan antar pola. Analisis komponen utama (PCA) juga dapat dilakukan untuk melihat hubungan kekerabatan dan mencari karakter mana yang memiliki nilai kontribusi tinggi terhadap variasi. Komponen utama (PC) ditentukan berdasarkan *eigen value*. Kata “*vector eigen*” ialah ramuan Bahasa Jerman dan Inggris. Kata “*vector eigen*” merupakan ramuan Bahasa Jerman dan Inggris. Bahasa Jerman “*eigen*” dapat diterjemahkan sebagai “sebenarnya” atau “karakteristik”. Maka dari itu, nilai *eigen* dapat dinamakan nilai sesungguhnya atau nilai karakteristik. Komponen utama (PC) bermakna apabila nilai *eigen value* lebih dari satu (Kruse, 2006). Secara menyeluruh kegunaan PCA adalah untuk mengklasifikasi sampel menjadi group yang umum, mendeteksi adanya pencilan (*outliers*), melakukan pemodelan data, serta menyeleksi variabel untuk klasifikasi ataupun pemodelan.

PCA ini dapat mereduksi data yang berukuran besar menjadi komponen utama yang dapat mewakili struktur dan varians dalam data. Metode ini digunakan untuk melakukan pengenalan pola sehingga dapat mengelompokkan tanaman, walaupun data spektrum yang dihasilkan memiliki kemiripan. PCA memudahkan visualisasi pengelompokan data, evaluasi awal kesamaan antar kelompok atau kelas, dan menemukan faktor atau pola yang teramati melalui korelasi (Nuryani, 2015).



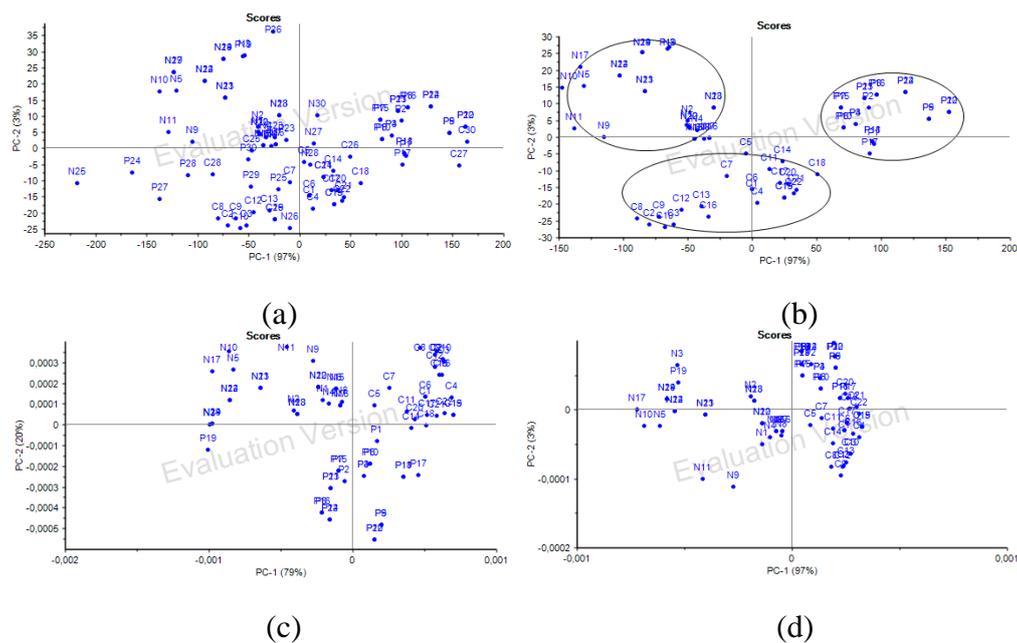
**Gambar 2.10** Pola diagram yang menunjukkan persebaran sampel ekstrak methanol sidaguri pada panjang gelombang 328 nm

Analisis kedekatan dilakukan dengan mengelompokkan sampel menjadi beberapa kelompok berdasarkan variabel Rf dan AUC yang digunakan. Adapun teknik yang digunakan adalah teknik pengelompokan (*clustering*). Hasil pengolahan data menunjukkan kelompok dari tiap sampel dapat dilihat dalam bentuk pola diagram. Penelitian sebelumnya yang dilakukan Putri (2019) yang berjudul profil keragaman kandungan tanaman obat sidaguri berdasarkan asal daerah dan korelasinya terhadap aktivitas penangkapan radikal 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil, hasil dari analisis PCA seperti yang terlampir Gambar 2.10.

Hasil PCA tersebut dapat menunjukkan bahwa analisis multivarian dengan pengelompokan (analisis *clustering*) terbagi menjadi 4 kluster sesuai diagram dari hasil PCA. Terlihat hasil analisis statistik multivarian sampel menggunakan metode PCA menunjukkan, bahwa tidak semua sampel yang berada pada daerah atau provinsi yang sama memiliki kedekatan berdasarkan clustering yang dilakukan. Nuryani (2015) juga melakukan penelitian kendali mutu daun kumis kucing menggunakan pengolahan citra dan teknik pengenalan pola secara kemometrik, hasil dari analisis PCA pada Gambar 2.11.

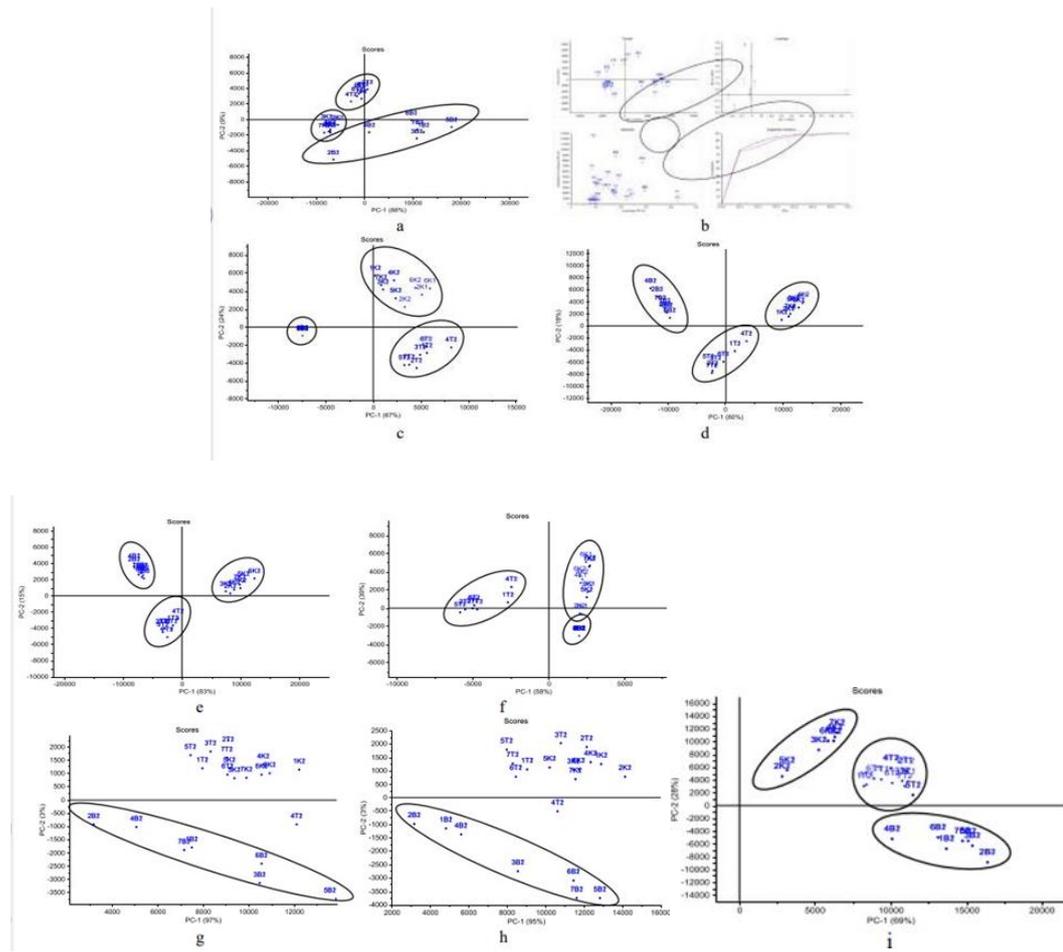
Hasil PCA pada Gambar 2.11 menunjukkan pola pemisahan yang baik, model PCA yang baik adalah data asli rekonstruksi reflektans yang telah dihilangkan pencilannya. Sampel dengan daerah yang sama saling mengelompok dan berdekatan karena memiliki kemiripan nilai reflektans yang dimiliki. Nilai reflektans ini menunjukkan bahwa kelompok daun kumis kucing tiap daerahnya memiliki mutu yang berbeda berdasarkan kandungan senyawa kimianya.

Analisis PCA diawali dengan menghitung nilai korelasi setiap variabel dan dibentuk dalam sebuah matriks berkorelasi. Matriks berkorelasi ini akan dilakukan analisis PCA dengan melihat nilai eigen yang ada pada masing-masing variabel. Penelitian sebelumnya telah dilakukan oleh Fitrianti (2011) tentang diferensiasi temulawak, kunyit, dan bungle berdasarkan interpretasi kromatografi lapis tipis menggunakan *ImageJ*, hasil dari analisis PCA nya terlampir pada Gambar 2.12.



**Gambar 2.11** Plot skor antara PC 1 dan PC 2 dengan perlakuan data asli (a), data asli dengan menghilangkan pencilan (b), *baseline*, normalisasi, derivatif, dan menghilangkan pencilan (c), dan normalisasi, derivatif, dan menghilangkan pencilan (d)

Hasil PCA pada Gambar 2.12 terlihat memisahkan terbaik tanaman temulawak, kunyit, dan bangle dimiliki oleh data nilai AUC dari densitogram pita KLT tanpa penyemprotan larutan pendeteksi pita komponen (Gambar 2.12d) dan data nilai AUC dari densitogram pita KLT dengan penyemprotan menggunakan larutan vanilin pada visualisasi sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm (Gambar 2.12e). Terlihat bahwa seluruh sampel pada masing-masing kelompok berada saling berdekatan. Sampel tanaman dengan jenis yang sama berada saling berdekatan karena kemiripan sifat dan komposisi kimia yang dimilikinya.



**Gambar 2.12** Score plot dua PC pertama dari nilai AUC temulawak, kunyit, dan bangle

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian dilaksanakan pada Januari 2022 – April 2022 di Laboratorium Kimia Dasar Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

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

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan adalah oven, loyang dan ayakan 90 mesh untuk preparasi sampel. Ekstraksi dengan metode ultrasonik menggunakan seperangkat alat ekstraksi ultrasonik. Pada tahap pemisahan menggunakan plat KLT silika gel G<sub>60</sub>F<sub>254</sub>, oven, loyang, pipa kapiler, chamber, spatula, botol vial, pipet ukur, bola hisap, pipet tetes, alat semprot, hairdryer, cutter, penggaris dan camera canon EOS M10.

##### **3.2.2 Bahan**

Adapun bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah biji anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavalle*), akuades, aseton, metanol, toluena, asam asetat, reagen vanillin dan plat KLT silika gel G<sub>60</sub>F<sub>254</sub>.

#### **3.3 Rancangan Penelitian**

Biji anggur Bali yang telah kering dari berbagai daerah dihaluskan dengan mortar. Selanjutnya diayak menggunakan ayakan 90 mesh. Serbuk kasar

kemudian dilakukan ekstraksi ultrasonik menggunakan pelarut metanol 70% : akuades 29,9 % : asam asetat 0,1% selama 5 menit pada suhu kamar. Selanjutnya hasil ekstraksi ultrasonik disaring, dan filtratnya merupakan ekstrak kasar senyawa biji anggur Bali. Ekstrak kasar biji anggur Bali dipisahkan menggunakan metode KLT. Hasil profil komatogram kemudian dianalisis menggunakan *ImageJ* dan PCA.

### **3.4 Tahapan Penelitian**

Penelitian ini dirancang dengan tahapan sebagai berikut :

1. Preparasi sampel biji anggur Bali
2. Ekstraksi senyawa biji anggur Bali dengan ultrasonik dengan lama ekstraksi 5 menit menggunakan pelarut metanol 70% : air 29,9 % : asam asetat 0,1%
3. Metode pemisahan kromatografi lapis tipis berdasarkan perbedaan letak geografis
4. Analisis profil senyawa biji anggur Bali menggunakan KLT
5. Analisis menggunakan *ImageJ*
6. Analisis data menggunakan PCA.

### **3.5 Cara Kerja**

#### **3.5.1 Preparasi Sampel**

Biji anggur Bali (*Vitis vinifera L. Alphonso Lavalle*), dikumpulkan dari daerah Bali dan Probolinggo. Biji anggur Bali yang telah kering dihaluskan menggunakan mortar dan diayak menggunakan ayakan 90 mesh. Sampel yang sudah halus kemudian dikumpulkan dalam wadah tertutup untuk selanjutnya diekstraksi.

### **3.5.2 Ekstraksi Biji Anggur Bali dengan Ultrasonik**

Senyawa pada biji anggur Bali diekstrak menggunakan ekstraksi ultrasonik dengan frekuensi 20 kHz menggunakan metanol 70% : akuades 29,9 % : asam asetat 0,1% selama 5 menit (Afrianto, 2020). Ekstraksi ultrasonik dilakukan dengan mengambil 1 gram sampel, kemudian dilarutkan dalam 10 mL pelarut metanol 70% : akuades 29,9% : asam asetat 0,1% di dalam botol kaca. Selanjutnya botol kaca ditutup rapat dan dilakukan ekstraksi ultrasonik pada suhu kamar. Kemudian disaring hasil ekstraksi sehingga diperoleh filtrat ekstrak kasar biji anggur Bali. Ekstrak kasar kemudian dilakukan proses pemisahan menggunakan KLT, kemudian dilakukan analisis hasil spot KLT menggunakan *ImageJ* dan PCA.

### **3.5.3 Pemisahan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis**

Pemisahan senyawa ekstrak kasar biji anggur Bali dilakukan dengan menggunakan plat silika G<sub>60</sub>F<sub>254</sub> sebagai fase diamnya dengan ukuran 8x10 cm. Selanjutnya diberi garis pada tepi atas dengan jarak 1 cm untuk mengetahui batas akhir elusi dan batas tepi bawah dengan jarak 1 cm untuk menentukan titik awal penotolan. Selanjutnya plat silika G<sub>60</sub>F<sub>254</sub> diaktivasi dengan cara dioven pada suhu 105°C selama 30 menit untuk menghilangkan kelembaban air (Wulandari, 2011).

Sebelum dilakukan elusi, eluen dalam bejana dijenuhkan terlebih dahulu. Eluen yang digunakan yaitu toluena : asam asetat : aseton dengan perbandingan 3 : 1 : 3 (Afrianto, 2020). Kemudian ditutup rapat dan dilakukan penjenuhan selama 1 jam. Penjenuhan dilakukan untuk menyamakan tekanan uap pada seluruh bagian bejana.

Plat 8 x 10 cm diberi garis dengan jarak 10 mm dari masing-masing tepi. Sebanyak 10 totolan ekstrak biji anggur diaplikasikan sebagai bercak di bagian tepi kiri bawah pelat (1 cm dari tiap tepi). Plat kemudian dikembangkan dalam bejana twin-trough hingga fase gerak mencapai tinggi 8 cm dari posisi aplikasi ekstrak. Setelah pengembangan, plat diangkat dan dikeringanginkan kemudian plat disemprot dengan pereaksi vanilin-HCl didiamkan kurang lebih 8 jam dan didokumentasi.