

**ISOLASI SENYAWA STEROID DARI FRAKSI PETROLEUM ETER  
HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL ALGA MERAH (*Eucheuma  
spinosum*) MENGGUNAKAN METODE KROMATOGRAFI KOLOM**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**ARIESKA NURUL LAILATUS SHOLIKAH**  
**NIM. 12630006**



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2016**

**ISOLASI SENYAWA STEROID DARI FRAKSI PETROLEUM ETER  
HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL ALGA MERAH (*Eucheuma  
spinosum*) MENGGUNAKAN METODE KROMATOGRAFI KOLOM**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**ARIESKA NURUL LAILATUS SHOLIKAH**  
**NIM. 12630006**

**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**  
**2016**

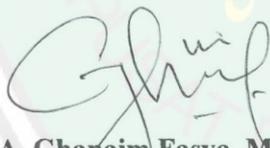
**ISOLASI SENYAWA STEROID DARI FRAKSI PETROLEUM ETER  
HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL ALGA MERAH (*Eucheuma  
spinosum*) MENGGUNAKAN METODE KROMATOGRAFI KOLOM**

SKRIPSI

Oleh:  
**ARIESKA NURUL LAILATUS SHOLIKAH**  
NIM : 12630006

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:  
Tanggal : 24 Agustus 2016

Dosen Pembimbing



**A. Ghanaim Fasva, M. Si**  
NIP. 19820616 200604 1 002

Dosen Pembimbing II



**Umaivatus Syarifah, M. A**  
NIPT. 19820925 200901 2 005

Mengetahui,  
**Ketua Jurusan Kimia**



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

**ISOLASI SENYAWA STEROID DARI FRAKSI PETROLEUM ETHER HASIL  
HIDROLISIS EKSTRAK METANOL ALGA MERAH (*Eucheuma spinosum*)  
MENGUNAKAN METODE KROMATOGRAFI KOLOM**

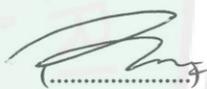
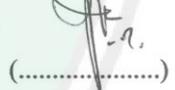
**SKRIPSI**

**OLEH:  
ARIESKA NURUL LAILATUS SHOLIKAH  
NIM. 12630006**

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

Tanggal, 24 Agustus 2016

Susunan Dewan Penguji:

- |                       |   |   |   |
|-----------------------|---|---|---|
| 1. Penguji Utama      | : | Akyunul Jannah, S. Si, M. P<br>NIP. 19750410 200501 2 009 |   |
| 2. Ketua Penguji      | : | Ahmad Hanapi, M. Sc<br>NIDT. 19851225 20160801 1 069      |  |
| 3. Sekretaris Penguji | : | A. Ghanaim Fasya, M. Si<br>NIP. 19820616 200604 1 002     |  |
| 4. Anggota Penguji    | : | Umaiatus Syarifah, M. A<br>NIP. 19820925 200901 2 005     |  |

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang



  
Elok Kamilah Hayati, M.Si  
NIP. 19790602200604 2 002

**SURAT PERNYATAAN  
ORISINALITAS TULISAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Arieska Nurul Lailatus Sholikhah  
NIM : 12630006  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : Isolasi Senyawa Steroid dari Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma spinosum* menggunakan Metode Kromatografi Kolom

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 di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 13 September 2016

Yang membuat pernyataan,



Arieska Nurul Lailatus Sholikhah

NIM. 12630006

# PERSEMBAHAN

Teriring Do'a dan Rasa Syukur Kepada Allah SWT

*Skripsi ini Kupersembahkan Teruntuk:*

---

Ayah Yakup dan Ibu Juarini sebagai bentuk baktiku dan sayangku  
Terima kasih untuk Kasih sayang dan Do'a yang selalu Engkau berikan  
Air mata dan keringatmu adalah pengorbanan yang takkan terbalaskan  
(Semoga mampu menjadi seperti yang Engkau Inginkan)

Bapak Ibu Dosen sebagai rasa terimakasihku atas ilmu yang  
Engkau berikan

Adikku tersayang Muhammad Nasikhul Umam  
serta Keluargaku  
Terimakasih atas motivasi dan dukungannya

من يزرع يحصد

**Malang, 24 Agustus 2016**

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat taufik hidayah serta inayah-Nya. Berkat rahmat dan petunjuknya, penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul Isolasi Senyawa Steroid dari Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma spinosum* menggunakan Metode Kromatografi Kolom ini.

Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW yang telah memberikan petunjuk kebenaran seluruh umat manusia yaitu Agama Islam yang kita harapkan syafa'atnya di Dunia dan di Akhirat. Aamiin.

Penyusunan skripsi ini penulis susun dengan harapan bisa memberikan suatu wawasan baru dan menambah khasanah keilmuan dalam bidang ilmu pengetahuan serta untuk memenuhi tugas akhir dalam menyelesaikan program Strata Satu (S1) Sarjana Sains jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari peran dan dukungan serta bimbingan dan arahan dari segenap pihak terkait. Dengan ini, penulis menyampaikan rasa hormat dan ucapan terima kasih kepada:

1. Ayah Yakup dan Ibunda Juarini yang senantiasa penulis hormati dan sayangi, karena kelimpahan kasih sayang dan doanya, penulis dapat menuntut ilmu dan dapat menyelesaikan skripsi ini
2. Bapak Prof. Dr. H. Mudjia Raharjo, M.Si., selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
3. Ibu Dr. Hj. Bayyinatul M, drh, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M. Si., selaku ketua jurusan Kimia
5. Ibu Diana Candra Dewi, M.Si., selaku dosen wali
6. Bapak A. Ghanaim Fasya, M. Si., Umayyatus Syarifah, M. A, A. Hanapi, M. Sc sebagai dosen pembimbing yang senantiasa memberikan arahan dan bimbingan dalam menyelesaikan skripsi

7. Seluruh Dosen Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmunya selama kuliah
8. Seluruh teman-teman Jurusan Kimia angkatan 2012 khususnya Kimia A yang banyak membantu selama kuliah dari awal sampai akhir perjuangan
9. Pengasuh PPAP Nurul Ummah beserta keluarga besar PPAP Nurul Ummah khususnya kamar A8 yang selalu menemani dalam suka maupun duka
10. Semua pihak yang berpartisipasi membantu penulis baik dalam hal moral, maupun spiritual, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal skripsi ini.

Akhirnya dengan memohon ridho Allah SWT, semoga Allah SWT melimpahkan Rahmat dan balasan kepada semua pihak yang telah membantu hingga selesainya skripsi ini. Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, saran dan kritik dari berbagai pihak sangat diharapkan demi terwujudnya karya yang lebih baik untuk masa yang akan datang dan bisa memberikan manfaat bagi kita semua. *Aamiin ya Robbal 'aalamiin.*

Malang, 13 September 2016

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>xiii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	. 1
1.2 Rumusan Masalah.....	. 7
1.3 Tujuan .....	. 7
1.4 Batasan Masalah .....	. 8
1.5 Manfaat .....	. 8
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Alga Merah .....	9
2.2 Kandungan dan Khasiat <i>Eucheuma spinosum</i> .....	11
2.3 Steroid.....	13
2.4 Ekstraksi Maserasi .....	16
2.5 Hidrolisis dan Partisi .....	18
2.6 Uji Fitokimia Senyawa Steroid.....	20
2.7 Kromatografi Lapis Tipis .....	21
2.8 Kromatografi Kolom .....	23
2.9 Identifikasi dengan FT-IR .....	27
<b>BAB III METODOLOGI</b>	
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	30
3.2 Alat dan Bahan .....	30
3.2.1 Alat .....	30
3.2.2 Bahan .....	30
3.3 Rancangan Penelitian.....	31
3.4 Tahapan Penelitian.....	31
3.5 Cara Kerja .....	32
3.5.1 Preparasi Sampel .....	32
3.5.2 Analisis Kadar Air .....	32
3.5.3 Ekstraksi Sampel .....	33
3.5.4 Hidrolisis dan Ekstraksi Cair-cair Ekstrak Pekat Metanol .....	34
3.5.5 Uji Fitokimia Senyawa Steroid .....	34
3.5.6 Penentuan eluen terbaik dengan KLTA .....	34
3.5.7 Isolasi Senyawa Steroid dengan Metode Kromatografi Kolom ....	35

3.5.7.1 Kolom Pengisian Cara Basah .....	36
3.5.7.2 Kolom Pengisian Cara Kering.....	36
3.5.8 Monitoring dengan KLTA.....	37
3.5.9 Penggabungan Vial dan Pemekatan .....	37
3.5.10 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan FT-IR.....	37
3.6 Analisis Data.....	38
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Preparasi Sampel .....	39
4.2 Analisis Kadar Air .....	39
4.3 Ekstraksi Sampel .....	41
4.4 Hidrolisis dan Fraksinasi .....	42
4.5 Identifikasi Steroid.....	45
4.6 Penentuan Eluen Terbaik dengan KLTA.....	46
4.7 Isolasi Senyawa Steroid dengan Metode Kromatografi Kolom .....	48
4.7.1 Kolom Pengisian Cara Basah.....	48
4.7.2 Kolom Pengisian Cara Kering .....	49
4.8 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan FT-IR .....	51
4.9 Pemanfaatan Senyawa Steroid dalam Prospektif Islam .....	58
<b>BAB V PENUTUP</b>	
5.1 Kesimpulan.....	60
5.2 Saran .....	60
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>61</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>66</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i> .....	10
Gambar 2.2 Struktur Dasar Steroid.....	14
Gambar 2.3 Dugaan Reaksi pemutusan ikatan glikosida.....	19
Gambar 2.4 Reaksi antara HCl dan NaHCO <sub>3</sub> .....	19
Gambar 2.5 Reaksi Perubahan Warna Senyawa Steroid saat Penambahan Reagen <i>Lieberman Burchard</i> .....	21
Gambar 2.6 Spektrum Inframerah senyawa Steroid .....	27
Gambar 2.7 Spektrum IR senyawa steroid hasil isolasi dari akar tumbuhan cendana.....	28
Gambar 4.1 Dugaan Reaksi Pemutusan Ikatan Glikosida pada Steroid .....	42
Gambar 4.2 Reaksi antara HCl dan NaHCO <sub>3</sub> .....	43
Gambar 4.3 Reaksi Perubahan Warna Senyawa Steroid saat Penambahan Reagen <i>Lieberman Burchard</i> .....	44
Gambar 4.4 Hasil KLTA berbagai perbandingan eluen.....	46
Gambar 4.5 Spektra hasil Identifikasi FT-IR fraksi A.1 (10 – 20) .....	51
Gambar 4.6 Spektra hasil Identifikasi FT-IR fraksi B.1 (22 – 24) .....	52
Gambar 4.7 Spektra hasil Identifikasi FT-IR fraksi C.1 (25) .....	53
Gambar 4.8 Spektra hasil Identifikasi FT-IR fraksi D.1 (28) .....	54
Gambar 4.9 Spektra hasil Identifikasi FT-IR fraksi E.1 (30).....	55

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi Nilai Nutrisi Alga Merah .....	12
Tabel 2.2 Hasil Isolasi Fraksi Petroleum Eter dan Karakterisasi dengan LB .....	20
Tabel 4.1 Data Kadar Air Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i> .....	39
Tabel 4.2 Pengelompokan fraksi hasil isolasi menggunakan kromatografi kolom pengisian adsorben cara basah.....	48
Tabel 4.3 Pengelompokan fraksi hasil isolasi menggunakan kromatografi kolom pengisian adsorben cara kering.....	49
Tabel 4.4 Interpretasi spektra FT-IR fraksi A.1 (10 – 20) .....	51
Tabel 4.5 Interpretasi spektra FT-IR fraksi B.1 (22 – 24) .....	52
Tabel 4.6 Interpretasi spektra FT-IR fraksi C.1 (25) .....	53
Tabel 4.7 Interpretasi spektra FT-IR fraksi D.1 (28) .....	54
Tabel 4.8 Interpretasi spektra FT-IR fraksi E.1 (30).....	55



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Kerangka Berfikir .....	66
Lampiran 2	Diagram Alir .....	67
Lampiran 3	Pembuatan Larutan .....	72
Lampiran 4	Uji Kadar Air .....	74
Lampiran 5	Perhitungan Rendemen .....	77
Lampiran 6	Perhitungan Rf .....	78
Lampiran 7	Monitoring KLTA .....	80
Lampiran 8	Lampiran Gambar .....	83



## ABSTRAK

Sholikhah, A. N. L., 2016. Isolasi Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) menggunakan Metode Kromatografi Kolom Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M. Si; Pembimbing II: Umaiyatus Syarifah, M. A; Konsultan: A. Hanapi, M. Sc.

---

**Kata Kunci:** Isolasi, Alga merah *Eucheuma spinosum*, steroid, Kromatografi kolom, FT-IR

Alga merupakan bagian terbesar dari tanaman yang ada di laut. Jenis alga di perairan Indonesia berjumlah 555 dan 4 kelas yang dikenal, salah satunya adalah alga merah (*Rhodophyceae*). Firman Allah SWT surat as Syu'ara'(26): 7 yang menjelaskan bahwa Allah SWT telah menumbuhkan berbagai macam tumbuhan yang baik. Alga merah *Eucheuma spinosum* merupakan salah satu tumbuhan yang baik karena mengandung senyawa steroid. Golongan senyawa steroid mempunyai potensi toksisitas dengan nilai  $LC_{50}$  76 ppm. Isolasi senyawa steroid perlu dilakukan, sehingga dapat diketahui manfaat lain dari senyawa steroid.

Isolasi senyawa steroid dari alga merah *Eucheuma spinosum* diawali dengan pengeringan sampel kemudian dihaluskan dan diayak 90 mesh. Selanjutnya dilakukan uji kadar air menggunakan metode *Thermogravimetri*. Ekstraksi dilakukan dengan maserasi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak metanol selanjutnya dihidrolisis menggunakan katalis asam dan dipartisi dengan pelarut petroleum eter. Lapisan organik yang diperoleh dipekatkan. Hasil pemekatan fraksi diisolasi menggunakan kromatografi kolom pengisian adsorben cara basah dan cara kering dengan eluen n-heksana : etil asetat (4,25 : 0,75). Fraksi yang menunjukkan steroid diidentifikasi dengan FT-IR.

Hasil analisis kadar air basah alga merah *Eucheuma spinosum* diperoleh nilai 90,25 % dan kadar air kering diperoleh 8,05 %. Rendemen hasil maserasi diperoleh sebesar 3,075 % dan rendemen hasil partisi diperoleh 14,072 %. Fraksi hasil partisi diisolasi menggunakan kromatografi kolom. Isolasi dengan adsorben pengisian cara basah menghasilkan 127 vial dan diperoleh 5 kelompok fraksi steroid, 4 kelompok fraksi triterpenoid. Sedangkan isolasi menggunakan pengisian adsorben cara kering menghasilkan 148 vial dengan 2 kelompok fraksi steroid dan 3 kelompok fraksi triterpenoid. Identifikasi senyawa steroid kelompok fraksi A.1, B.1 dan D.1 diduga senyawa steroid yang memiliki C=C, C=O, OH sekunder, OH tersier, dan gem dimetil. Sedangkan kelompok fraksi C.1 dan E.1 diduga senyawa steroid yang memiliki C=O, OH sekunder, OH tersier, dan gem dimetil.

## ABSTRACT

Sholikah, A. N. L., 2016. Isolation of Steroid Compound from Pethroleum Ether Fraction Hidrolysis Result of Red Algae *Eucheuma Spinosum* methanol extract Using Coloumn Chromatography Method. Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M. Si; Supervisor II: Umai'yatus Syarifah, M. A; Consultant: A. Hanapi, M. Sc.

---

**KeyWords:** Isolation, Red Algae *Eucheuma spinosum*, Steroid, Coloumn Chromatography, FT-IR

Algae is the largest among plants in the sea. The spesies of algae in Indonesia amounted to 555 and and four classes known, one of them is red algae *Eucheuma spinosum*. Based on holy Quran Assyu'ara':7 explain that the God create a variety of plants good. Red algae is a good plant because contain steroid compound. The purpose of this study was to know the method of isolation steroid compounds from petroleum ether fraction of red algae *Euchema spinosum* using column chromatography method.

Isolation of steroid compound from red algae begins with drying the sample then powdered and filtered by size 90 mesh. The next analysis water content using thermogravimetry method. Sample powder was macerated using methanol solvent. The methanol extract continued with hydrolysis process using an acid catalyst and partitioned by petroleum ether. The organic phase was concentrated using vacuum rotary evaporator. the isolation of steroid compound from petroleum ether fraction using column chromatography by surry method and dry method with mobile phase n-heksan and etyl acetate (4,25:0,75). Identification using FT-IR for the fraction of a positif steroid.

The results of water content of wet red algae *Eucheuma spinosum* is 90.25 % and the result of dry red algae content is 8.05 %. The result rendement of maceration is 3.075 % and the result of partition is 14.072 %. The fractions already partition isolated using column chromatography. The result of isolation column chromatography slurry method is 127 vials and obtained 5 groups of steroid fractions and 4 groups of triterpenoid fractions. The result of isolation column chromatography dry method is 148 vials with 2 groups of steroid fractions and 3 groups of triterpenoids fractions. Identification of steroid compounds fraction group A.1, B.1, D.1 estimated steroid compound with C=C, C=O, OH secunder, OH tertier, and gem dimetil. Meanwhile fraction group C.1, and E.1 estimated steroid compound with C=O, OH secunder, OH tertier, and gem dimetil.

## ملخص

صالحة, ان.ل. ٢٠١٦. العزلة مركبات الستيروبيدية قسم فيتروليبوم ايتيرنتيجة التحليل الماء خلاصة ميتانول الطحالب الحمراء باستخدام الطريقة عمود اللوني المشرقة الأولى: احمد غنائم فشى الماجستير, المشرقة الثاني: امية الشريفة الماجستير, مستشار احمد حنفي الماجستير

**الكلمات البحث :** العزلة, الطحالب الحمراء, الستيروبيدية, عمود اللوني, الطيفية الأشعة تحت الحمراء

الطحالب هو أكبر من النباتات البحرية. فى المياه الإندونيسية هي أنواع من الطحالب قدر ٥٥٥. وأربعة فصول معروف مثل الطحالب الحمراء (رودوفيجياي) كما قال الله تعالى فى السورة الشعراء الآية:٧ أن الله تعالى أنبت خير النباتات الطحالب الحمراء (أيوحيوما سبينوسوم) واحد من خير النبات متظمن على مركبات الستيروبيد. مجموعة مركبات الستيروبيدية لها السمية المتحملة بقيمة ل ج ٧٦ ٥٠ جزء من المليون. تجفف الطحالب الحمراء وتملس وتتحل قدر ٩٠ ميش. تستخدم تجريب طور الماء بطريقة عمود اللوني. عزل مركبات الستيروبيدية مستخدمة الذائب ميتانول بعملية الناقعة. تحلل مقتطف الميتانول بالماء على استخدام حفز الحمضية ومقسمه بمقتطف فيتروليبوم ايتير تكتسب وتنتائب الطلية العضوية وتفصل بعمود اللوني طريق رطبا وجاف بشاطف. فئة تظهر الستيروبيد تحديدا طيفية الأشعة تحت الحمراء. تحليل النتائج طور الماء الرطب على الطحالب الحمراء (أيوحيوما سبينوسوم) قدرا على ٩٠ و ٢٥ من مائة وطور الماء الجاف قدرا على ٨ و ٥٥ من مائة. الفصيل تفصل بعمود اللوني. الفصيل بطريق رطبا يحصل ١٢٧ قارورة ويكتسب به خمسة فرقة الستيروبيد. وأربعة فرقة تريتيبينوبيد. الفصيل بطريقة جافة يحصل ١٤٨ قارورة ويكتسب فرقتين الستيروبيد وثلاثة فرقة تريتيبينوبيد. محصول الإمتصاص من فرقة أ.١ و ب.١ و د.١ هي مركبات الستيروبيدية لها غيم ديميتيل, C=C, C=O, OH. فرقة ج.١, ي.١ هي المركبات الستيروبيدية لها غيم ديميتيل, C=O, OH.

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Alga yang juga dikenal dengan nama *seaweed* merupakan bagian terbesar dari tanaman laut. Menurut Diharmi dkk. (2011), tercatat setidaknya ada 555 jenis alga di perairan Indonesia. Dari 555 jenis alga tersebut, terdapat 4 kelas yang dikenal yakni alga biru (*Cyanophyceae*), alga hijau (*Chlorophyceae*), alga coklat (*Phaeophyceae*), dan alga merah (*Rhodophyceae*).

Alga mempunyai bagian yang tidak dapat dibedakan antara akar, daun dan batang sehingga seluruh tubuhnya disebut thallus. Alga merupakan salah satu tumbuhan yang bermanfaat. Sebagaimana dalam firman Allah SWT yang menjelaskan bahwa Allah SWT telah menciptakan berbagai macam tumbuhan yang bermanfaat bagi manusia dalam surat as Syu'ara'(26): 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 pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?” (Qs. as Syu'ara' (26): 7)

Menurut tafsir al-Aisar Lafadz زوج berarti jenis, sedangkan menurut tafsir al- Mishbah Lafadz كريم digunakan untuk menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap obyek yang disifatinya. Lafadz tersebut mempunyai makna banyak jenis tumbuhan yang baik. Tumbuhan yang baik berarti tumbuhan yang tumbuh subur dan bermanfaat. Alga merah *Eucheuma spinosum* merupakan salah satu tumbuhan baik dari golongan makroalga yang mengandung metabolit

sekunder. Menurut Mardiyah dkk. (2012) *Eucheuma spinosum* mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid, triterpenoid, asam askorbat dan steroid. Anam dkk. (2015) menyatakan bahwa ekstrak metanol dan petroleum eter *Eucheuma spinosum* mengandung senyawa steroid.

Firman Allah SWT dalam surat al Baqarah (2): 164 menjelaskan bahwasannya segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah SWT akan membawa manfaat bagi makhluk hidup. *Eucheuma spinosum* yang terdapat di laut mempunyai manfaat yang penting. Selain dapat dikonsumsi, *Eucheuma spinosum* mempunyai kandungan senyawa steroid dengan potensi toksisitas 176,06 ppm (Kholidiyah dkk., 2013).

Steroid terdiri dari beberapa kelompok senyawa. Penelitian Idler dkk. (1968) menyebutkan alga merah kelas *Rhodophyceae* mengandung berbagai macam senyawa steroid di antaranya adalah braseicasterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, fukosterol, desmosterol dan kolesterol. Pada penelitian tersebut juga dijelaskan bahwa senyawa steroid yang paling dominan adalah desmosterol dan kolesterol. Senyawa yang paling toksik terhadap sel kanker meyloma adalah senyawa golongan stigmasterol dan kolesterol dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 5 ppm (Diastuti dan Winarsih, 2010). Sapar dkk. (2004) melakukan uji bioaktivitas  $\beta$ -sitosterol terhadap *Artemia salina*. Nilai  $LC_{50}$  sebesar 76 ppm menunjukkan bahwa  $\beta$ -sitosterol mempunyai potensi toksisitas yang baik. Berdasarkan penelitian tersebut, perlu dilakukan kajian lebih lanjut mengenai pemanfaatan senyawa steroid yang terdapat pada *Eucheuma spinosum*. Sehingga perlu dilakukan isolasi senyawa steroid.

Isolasi senyawa steroid dapat dimulai dengan proses ekstraksi sampel menggunakan metode maserasi (Kristanti, 2008). Metode maserasi sering dipilih karena aman untuk digunakan dan dapat mengantisipasi senyawa yang tidak tahan panas. Proses ini sangat menguntungkan dalam proses isolasi bahan alam karena proses perendaman mampu memecah dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel, sehingga senyawa metabolit sekunder akan larut dalam pelarut organik. Mardiyah dkk. (2014) menyatakan bahwa senyawa metabolit sekunder di alam berada dalam bentuk glikosida sehingga ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut yang bersifat polar. Menurut Lenny (2006) pelarut yang paling sering digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam adalah pelarut golongan alkohol, salah satunya metanol. Metanol dapat melarutkan senyawa metabolit sekunder dan memiliki titik didih yang rendah sehingga mudah diuapkan pada suhu yang lebih rendah (Atun, 2014).

Habibah dkk. (2012) telah melakukan penelitian ekstraksi maserasi 100 gram *Eucheuma spinosum* kering dengan pelarut metanol dan n-heksana. Rendemen yang paling banyak diperoleh dari hasil ekstraksi menggunakan pelarut metanol dengan nilai sebesar 16,25% (b/b) dan warna ekstrak pekat yang dihasilkan adalah hijau. Sedangkan pada penelitian Kholidiyah dkk. (2013) rendemen ekstrak metanol *Eucheuma spinosum* adalah 7,45% (b/b). Penelitian lain juga dilakukan oleh Ningsih, dkk. (2015) dan diperoleh rendemen ekstrak metanol sebesar 9,62% (b/b). Ekstrak kasar metanol yang diperoleh selanjutnya dilakukan hidrolisis menggunakan katalis HCl (Fessenden dan Fessenden, 1982) untuk memutuskan ikatan antara glikosida dan selanjutnya dipartisi.

Partisi dapat dilakukan menggunakan pelarut nonpolar, sehingga diharapkan senyawa steroid akan lebih terdistribusi pada fase non-polar dan terpisah dengan senyawa polar (Kristanti dkk., 2008). Fraksi non-polar yang diperoleh dari hasil partisi biasanya masih berupa senyawa campuran, sehingga perlu dilakukan isolasi lebih lanjut. Setiyawan dkk. (2015) melakukan isolasi senyawa triterpenoid dari fraksi petroleum eter menggunakan KLTP dan menghasilkan 8 spot. Berdasarkan uji menggunakan reagen *Lieberman-Burchard* terdapat 4 spot yang merupakan triterpenoid dan 4 spot lainnya merupakan steroid.

Isolasi senyawa steroid dapat dilakukan dengan metode kromatografi kolom (Saleh, 2007); (Kristanti, 2008); (Sapar dkk., 2008); (Diastuti dan Winarsih, 2010); (Astuti dkk., 2014). Kromatografi kolom merupakan metode pemisahan preparatif. Prinsip dari alat ini adalah pemisahan yang didasarkan pada peristiwa adsorpsi suatu senyawa pada adsorben yang digunakan. Hal yang paling berperan pada keberhasilan pemisahan dengan kromatografi kolom adalah pemilihan adsorben, pemilihan pelarut, dan pengemasan kolom (Kristanti, 2008).

Sapar (2004) melakukan isolasi senyawa metabolit sekunder dari spons *Biemna triraphis* menggunakan kromatografi kolom dan diperoleh 121 fraksi. Senyawa steroid teridentifikasi pada fraksi 67 – 85 dengan nilai  $R_f$  0,68. Setelah pelarut diuapkan diperoleh kristal seberat 26,5 mg. Isolasi senyawa steroid juga dilakukan oleh Saleh (2007) dari akar tumbuhan cendana dengan kromatografi kolom menggunakan adsorben silika gel 60 dan diperoleh 170 fraksi. Identifikasi yang menunjukkan positif steroid sebanyak 6 fraksi pada fraksi nomor 52 – 59 dengan berat 51,9 mg.

Pengisian adsorben dapat mempengaruhi hasil pemisahan suatu senyawa. Penelitian ini akan dilakukan variasi pengisian adsorben dengan cara kering dan cara basah. Pengemasan kolom pengisian kering dilakukan dengan tanpa mencampurkan silika dengan fasa geraknya. Sedangkan pengemasan pengisian adsorben cara basah dilakukan dengan pencampuran silika dan fasa geraknya (Kristanti, 2008).

Suryani (2011) melakukan isolasi senyawa metabolit sekunder menggunakan kromatografi kolom dengan pengisian adsorben cara kering dan diperoleh fraksi murni seberat 32 mg dengan satu kali elusi. Pengemasan kolom pengisian adsorben cara kering relatif cepat (Pedersen dan Rosenbohm, 2001). Kromatografi kolom flash pengisian adsorben kering efektif digunakan untuk pemisahan senyawa dengan berat <2 g (Harwood dkk., 1999).

Isolasi senyawa steroid yang dilakukan oleh Sapar dkk. (2004) dari ekstrak metanol spons menggunakan kromatografi kolom pengisian adsorben cara basah menghasilkan satu noda tunggal pada fraksi 67 – 85 dan setelah pelarut diuapkan diperoleh senyawa murni sebesar 26,5 mg dari berat sampel awal 777 mg. Saleh (2007) juga melakukan isolasi senyawa steroid dari fraksi kloroform akar tumbuhan cendana menggunakan kromatografi kolom pengisian adsorben cara basah dan menghasilkan senyawa steroid yang murni. Isolasi senyawa steroid menggunakan kromatografi kolom pengisian adsorben cara basah dapat menghasilkan senyawa murni pada satu kali elusinya. Hal tersebut dibuktikan dengan hasil KLT analitik yang menghasilkan spot tunggal pada uji kemurnian dengan berbagai macam eluen (Bogoriani, 2008).

Faktor lain yang dapat mempengaruhi pemisahan menggunakan kromatografi kolom adalah pemilihan eluen. Penentuan eluen terbaik dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA). Eluen yang akan digunakan pada penelitian ini merujuk pada penelitian Ningsih, dkk. (2015) yang menggunakan eluen terbaik campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 4,25 : 0,75. Eluen terbaik dapat ditentukan berdasarkan banyaknya spot yang terbentuk. Berdasarkan eluen tersebut didapatkan 9 spot yang terbentuk.

Analisis isolat hasil kromatografi kolom dapat dilakukan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Kusmiyati dkk. (2011) melakukan isolasi zat aktif ekstrak metanol rimpang kunyit putih fraksi etil asetat menggunakan kromatografi kolom. Eluat yang didapatkan dianalisis menggunakan metode kromatografi lapis tipis. Eluat dengan harga Rf dan bercak yang sama dikumpulkan sebagai fraksi yang sama dan selanjutnya dipekatkan menggunakan *Rotary evaporator vacum*. Harga Rf 0,84 dan 0,66 menunjukkan uji positif steroid dengan pereaksi *Lieberman-Burchard* yang ditunjukkan dengan warna hijau (Sukandana, 2011). Sehingga setelah didapatkan eluat dilakukan KLT, lalu dihitung nilai Rfnya dan selanjutnya spot dengan nilai Rf yang sama diuji menggunakan pereaksi *Lieberman-Burchard*.

Sapar, dkk. (2004) melakukan analisis senyawa steroid dari spons menggunakan FT-IR. Berdasarkan hasil serapan analisis Inframerah gugus fungsi yang tampak pada spektra adalah O-H, C-H, C=C, C-H, dan C-O. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa senyawa yang terdapat pada spons merupakan sterol. Namun, pada penelitian tersebut didukung dengan analisis GC-MS yang menunjukkan massa ion molekuler isolat adalah 414 dan H-NMR yang

menghasilkan puncak serapan pada 0,67 ppm dengan 1,008 ppm sebagai serapan puncak metil angular, 0,905 ppm dan 0,819 ppm yang merupakan serapan puncak atom C-21, C-26, C-27. Sehingga dapat diketahui senyawa hasil isolasi yakni  $\beta$ -sitosterol.

Pada penelitian ini, isolasi senyawa steroid fraksi petroleum eter dilakukan menggunakan metode kromatografi kolom dengan pengisian adsorben cara kering dan basah. Variasi pengisian kolom bertujuan untuk mengetahui perbedaan hasil isolasi antara keduanya. Fraksi hasil kromatografi kolom selanjutnya dimonitoring dengan KLTA dan isolat yang menunjukkan positif steroid dianalisis menggunakan FT-IR.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana hasil isolasi senyawa steroid fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol *Eucheuma spinosum* menggunakan metode kromatografi kolom cara basah dan cara kering?
2. Bagaimana hasil identifikasi senyawa steroid hasil isolasi dengan kromatografi kolom menggunakan FT-IR?

## 1.3 Tujuan

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui hasil isolasi senyawa steroid fraksi *petroleum eter* hasil hidrolisis ekstrak metanol *Eucheuma spinosum* menggunakan metode kromatografi kolom cara basah dan cara kering.

2. Untuk mengetahui hasil identifikasi senyawa steroid hasil isolasi dengan kromatografi kolom menggunakan FT-IR.

#### 1.4 Batasan Masalah

Batasan-batasan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah alga merah *Eucheuma spinosum* yang didapat dari nelayan sekitar perairan Pantai Jumiang Pamekasan, Madura.
2. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan menggunakan pelarut metanol dan dipartisi dengan petroleum eter.
3. Isolasi senyawa steroid dari *Eucheuma spinosum* menggunakan metode kromatografi kolom gravitasi pengisian adsorben cara basah dan cara kering
4. Fasa gerak yang digunakan untuk kromatografi kolom adalah eluen terbaik hasil KLTA.
5. Monitoring fraksi hasil kromatografi kolom dilakukan menggunakan KLT Analitik.
6. Identifikasi senyawa steroid dilakukan menggunakan spektrofotometer FT-IR.

#### 1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi ilmiah, bahwa terdapat kelimpahan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak metanol alga merah (*Eucheuma spinosum*) yang dipartisi dengan petroleum eter khususnya senyawa steroid. Penelitian ini juga diharapkan mampu memberikan informasi mengenai cara isolasi senyawa steroid menggunakan kromatografi kolom.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Alga Merah (*Eucheuma spinosum*)

Makroalga jenis *Eucheuma spinosum* merupakan tumbuhan yang tidak dapat dibedakan akar, batang, dan daunnya. Bagian-bagian *Eucheuma spinosum* terdiri dari batang yang disebut *Thallus*. *Eucheuma spinosum* mempunyai thallus silindris, permukaan yang licin, terdapat benjolan dan duri pada tubuhnya, bercabang ke berbagai arah dengan batang utama keluar yang saling berdekatan ke daerah pangkal dengan jumlah setiap percabangannya adalah dua (*dichotome*) atau tiga (*trichotome*).

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَسَلَكَهُ يَنْبِيعَ فِي الْأَرْضِ ثُمَّ نُخْرِجُ بِهِ  
زُرْعًا مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ ثُمَّ يَهِيَجُ فَتَرَهُ مُصْفَرًّا ثُمَّ يَجْعَلُهُ حُطْمًا ۚ إِنَّ فِي ذَلِكَ  
لَذِكْرًا لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿٢١﴾

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)

Tafsir al-Qurthubi menjelaskan bahwa kata زرعاً berarti “tanaman-tanaman”, lafadz مختلفاً berarti “bermacam-macam” sedangkan lafadz ألوانه berarti “warnanya”. Lafadz-lafadz tersebut menunjukkan arti untuk tumbuhan yang beragam warnanya. Merah, kuning, biru, hijau, dan putih (Qurthubi, 2009). Alga Merah merupakan salah satu tanaman yang mempunyai warna merah. Warna

merah yang dimiliki *Eucheuma spinosum* disebabkan oleh pigmen fikokeritin (Diharmi, dkk., 2011). Taksonomi dari tumbuhan *Eucheuma spinosum* adalah sebagai berikut (Anggadireja, dkk., 2006):

Diviso : Rhodophyta  
 Kelas : Rhodophyceae  
 Bangsa: Gigartinales  
 Suku : Solieriscea  
 Marga : Eucheuma  
 Jenis : *Eucheuma spinosum*

Ciri-ciri umum marga *Eucheuma* adalah (Aslan, 1998):

- a. *Thalli* (kerangka tubuh tanaman) bulat silindris atau gepeng
- b. Berwarna merah, coklat, hijau, kuning, dan sebagainya
- c. Bercabang berselang tidak teratur, *di* atau *trikhotomus*
- d. Memiliki benjolan-benjolan (*blunt nodule*) dan duri-duri atau spines
- e. Substansi *thall* “gelatinus” dan atau “kartilagenus” (lunak seperti tulang rawan).

Ciri khusus dari tumbuhan makroalga jenis *Eucheuma spinosum* adalah memiliki duri-duri yang tumbuh berderet melingkari *thallus* dengan interval yang bervariasi sehingga terbentuk ruas-ruas *thallus* di antara lingkaran duri. Percabangan berselang-selang dan timbul teratur pada deretan duri antar ruas dan merupakan ruas perpanjangan dari duri tersebut dan ujung percabangan yang mudah melekat pada substrat (Anggadireja, dkk., 2006).



Gambar 2.1 Alga Merah *Eucheuma spinosum* (Anggadireja, dkk., 2006)

## 2.2 Kandungan Alga Merah *Euclima spinosum*

وَفِي الْأَرْضِ قِطْعٌ مُتَجَوِّرَاتٌ وَجَنَّاتٌ مِّنْ أَعْنَابٍ وَزُرْعٌ وَنَخِيلٌ صِنَوَانٌ وَغَيْرُ  
صِنَوَانٍ يُسْقَى بِمَاءٍ وَاحِدٍ وَنُفِضَ بَعْضُهَا عَلَىٰ بَعْضٍ فِي الْأَكْلِ ۚ إِنَّ فِي  
ذَٰلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ ﴿٤﴾

dan di bumi ini terdapat bagian-bagian yang berdampingan, dan kebun-kebun anggur, tanaman-tanaman dan pohon korma yang bercabang dan yang tidak bercabang, disirami dengan air yang sama. Kami melebihkan sebahagian tanaman-tanaman itu atas sebahagian yang lain tentang rasanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berfikir. (Qs. Ar Ra'd (13): 4).

Firman Allah SWT *وَنُفِضَ بَعْضُهَا عَلَىٰ بَعْضٍ فِي الْأَكْلِ* berarti “Kami melebihkan sebagian tanaman-tanaman itu atas sebagian yang lain tentang rasanya”. Sabdanya “Kurma al farisi, kurma ad-dalaq, yang manis dan yang masam”. Buah-buahan mempunyai perbedaan rasa walaupun mereka disirami dengan air yang sama (Qurthubi, 2009). Perbedaan rasa tersebut dikarenakan kandungan yang berbeda. Begitu pula dengan alga merah yang mempunyai komposisi kandungan berbeda-beda.

Chapman and Chapman (1980) dalam Diharmi, dkk., (2011) menyatakan bahwa musim, habitat, dan jenis rumput laut sangat mempengaruhi komposisi kandungan kimia rumput laut. Berdasarkan penelitian Diharmi, dkk., (2011) kandungan tertinggi pada *Euclima spinosum* adalah karbohidrat, serat dan mineral. Kandungan Karbohidrat *Euclima spinosum* dari perairan Sumenep adalah 55,52%. Sedangkan kandungan serat totalnya sebesar 14,61 %. Karbohidrat yang terdapat pada *Euclima spinosum* adalah senyawa polisakarida linier dari unit D-galaktosa, dan L-galaktosa 3,6-anhidrogalaktosa, baik yang

berikatan dengan sulfat atau tidak dan dihubungkan dengan  $\alpha$  (1,3) dan  $\beta$  (1,4) dengan ikatan glikosidik.

Kadar air merupakan salah satu kandungan yang harus diperhatikan pada penyimpanan rumput laut. Karena, akan mempengaruhi mutu rumput laut. Penyimpanan pada tempat yang lembab dapat mengakibatkan rumput laut cepat rusak karena sifatnya yang higroskopis (Diharmi, dkk., 2011). Penelitian Diharmi, dkk. (2011) menyatakan, rumput laut mengandung polisakarida yang tinggi. Kadar air rumput laut *Eucheuma spinosum* dari perairan Nusa Penida, Takalar dan sumenep berkisar antara 10,55-21,27%. Penelitian tersebut juga menyatakan bahwa kadar air rumput laut *Eucheuma spinosum* dari perairan yang berbeda tidak memiliki perbedaan yang jauh. Kadar air maksimal rumput laut kering menurut SNI 1992 sebesar 35%. Komposisi nilai nutrisi alga merah *Eucheuma spinosum* Ditunjukkan pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi nilai nutrisi alga merah *Eucheuma spinosum* (Resy, 2009)

Komponen	Jumlah
Kadar air (%)	12,90
Karbohidrat (%)	5,12
Protein (%)	0,13
Lemak (%)	13,38
Serat kasar (%)	1,39
Abu (%)	14,21
Mineral : Ca (ppm)	58,82
Fe (ppm)	0,0108
Cu (ppm)	0,768
Pb (ppm)	-
Vitamin B1 (Thiamin)(mg/100g)	0,21
Vitamin B2 (Riboflavin)(mg/100g)	2,26
Vitamin C (mg/100g)	43,00
Karaginan (%)	65,75

Berdasarkan penelitian Miftahurrahmah (2012) alga merah *Eucheuma spinosum* mengandung senyawaan metabolit sekunder, di antaranya adalah

senyawa flavonoid, triterpenoid, steroid, alkaloid, dan asam askorbat. Mardiyah, dkk., (2014), melakukan identifikasi senyawa aktif pada alga merah *Eucheuma spinosum*, dan menghasilkan beberapa golongan senyawa metabolit sekunder. Hasil identifikasi golongan senyawa aktif memberikan respon positif terhadap senyawa flavonoid, triterpenoid, steroid dan asam askorbat. Penelitian lain juga menyatakan bahwa alga merah *Eucheuma spinosum* mengandung senyawa steroid dan teriterpenoid (Setiyawan, dkk., 2015), (Ningsih, dkk., 2015).

Penelitian Idler dkk. (1968) tentang kandungan steroid pada alga merah kelas Rhodophyceae menyatakan bahwa terdapat senyawa stigmasterol, fukosterol, brassikasterol,  $\beta$ -sitosterol, desmosterol dan kolesterol. Steroid yang paling dominan adalah desmosterol dan kolesterol. Penelitian lain dilakukan oleh Kanazawa dkk. (1972). Hasil penelitian tersebut menyatakan bahwa kandungan senyawa steroid pada alga merah adalah desmosterol, kolesterol, dan ergosterol. Bhakuni dan Rawat (2005) menyebutkan bahwa kandungan steroid pada alga merah yang paling dominan adalah kolesterol.

### 2.3 Steroid

Salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada alga merah *Eucheuma spinosum* adalah steroid (Miftahurrahmah, 2013), (Kholidiyah, dkk. 2014), (Setiyawan, dkk.,2015), (Ningsih, dkk., 2015). Steroid merupakan senyawa kimia yang tergolong bahan alam. Sebagian besar struktur senyawa steroid terdiri dari 17 atom karbon dan mempunyai struktur dasar 1,2-siklopentenoperhidrofenantren (Gambar 2.2). Pengelompokan senyawa steroid dapat didasarkan berdasarkan efek fisiologis yang dapat ditimbulkan. Berdasarkan

struktur, perbedaan antar kelompok ditentukan dengan substituen yang terikat pada kerangka dasar (R1, R2, dan R3). Sedangkan perbedaan antar senyawa dari satu kelompok dapat dibedakan berdasarkan panjangnya rantai karbon substituen, gugus fungsi, jumlah dan posisi gugus fungsi oksigen, ikatan rangkap pada kerangka dasar, serta konfigurasi pusat asimetris pada kerangka dasar (Kristanti, dkk., 2008).



1,2-siklopentenoperhidrofenantren

Gambar 2.2 Struktur Dasar Steroid (Kristanti, dkk., 2008)

Steroid yang terdapat di alam secara biogenetik berasal dari triterpen. Jaringan hewan mempunyai steroid yang berasal dari lanosterol sedangkan jaringan tumbuhan mempunyai steroid dari sikloartenol, steroid tersebut terbentuk setelah kedua triterpen tersebut mengalami perubahan. Molekul steroid adalah relatif datar /planar. Berdasarkan konfigurasi cincinnya, steroid mempunyai dua kelompok besar, yakni jika cincin A-B berada pada posisi *trans*, maka disebut dengan deret 5 $\alpha$  sedangkan jika posisi A-B berada pada posisi *cis* disebut deret 5 $\beta$  (Kristanti, dkk., 2008).

Steroid terbentuk dari asam asetat melalui jalur asam mevalonat yang telah mengalami berbagai macam reaksi kondensasi, siklisasi, dan sebagainya. Sehingga terbentuklah senyawaan antara (*intermediet*). Steroid terbagi dalam berbagai kelompok senyawa seperti  *$\beta$ -sitosterol*, isofukosterol, fukosterol dan

sebagainya (Sapar, dkk., 2004). Berdasarkan penelitian Renai *Institute of Integrative Medicine* (dalam Sapar, dkk. 2004) senyawa  $\beta$ -sitosterol merupakan senyawa yang mempunyai efek farmakologis terhadap penghambatan kerja enzim yang menyebabkan terjadinya kanker prostat. Cara kerja dari senyawa  $\beta$ -sitosterol adalah dengan kerja enzim yang mengkonversi testosteron menjadi dehidrotestosteron (DHT).

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ  
وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

“ (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha suci Engkau, Maka peliharalah Kami dari siksa neraka.” (Qs. ali Imran (3): 191).

Tafsir al-Qurthubi menjelaskan makna kata بطلا adalah yang akan hilang atau yang akan pergi. Kata tersebut *manshub* karena terdapat *mashdar* yang tidak disebutkan, yakni: ما خلقت هذا (خالقًا) بطلا “Engkau tidak akan menciptakan semua ini sebagai ciptaan yang sia-sia” (Qurthubi, 2009). Begitu pula dengan penciptaan senyawa steroid. Allah SWT menciptakan senyawa steroid karena senyawa tersebut dapat bermanfaat bagi makhluk hidup.

Senyawa steroid dari alga *Tydemnia exepditionis* mempunyai aktivitas menghambat pertumbuhan kanker prostat (Zhang dkk., 2012). Penelitian tentang antikanker untuk senyawa steroid juga dilakukan oleh Diastuti dan Winarsih (2010) dan menghasilkan nilai sitotoksisitas terbaik dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 5 ppm. Sedangkan penelitian Contini dkk. (2013) menyatakan bahwa steroid mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* gram positif.

## 2.4 Ekstraksi Maserasi

Senyawa steroid dalam *Eucheuma spinosum* masih bercampur dengan senyawa-senyawa lain. Sehingga untuk mendapatkan senyawa steroid perlu dilakukan beberapa proses tahapan. Tahapan pertama yang perlu dilakukan adalah proses ekstraksi. Teknik ekstraksi senyawa organik yang biasa digunakan adalah maserasi, perkolasi, dan sokhletasi (Atun, 2014). Maserasi merupakan ekstraksi padat-cair yang menggunakan metode perendaman dalam suatu pelarut tertentu. Proses perendaman yang dilakukan bertujuan untuk mengekstrak suatu senyawa dari bahan alam. Maserasi dapat dilakukan dengan tanpa disertai pemanasan, disertai pemanasan atau dipanaskan pada suhu didihnya. Setelah proses maserasi selesai, dilakukan penyaringan untuk memisahkan filtrat dan residunya. Residu sisa maserasi dilakukan maserasi kembali dengan proses yang sama dan pelarut yang baru, maserasi dilakukan sampai filtrat yang dihasilkan berbeda warnanya (Kristanti, dkk., 2008).

Ekstraksi maserasi digunakan untuk menjaga kerusakan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam *Eucheuma spinosum*. Maserasi merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana (Aslan, 1989). Maserasi dilakukan dengan cara sampel direndam dalam pelarut dan pelarut akan menembus dinding sel masuk ke rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif tersebut akan larut, disebabkan adanya perbedaan konsentrasi larutan zat aktif dalam sel dengan konsentrasi larutan zat aktif luar sel. Pengadukan perlu dilakukan agar konsentrasi larutan di luar serbuk dapat merata, sehingga derajat perbedaan antara larutan dalam sel dengan larutan luar sel dapat terjaga meski dengan konsentrasi yang kecil (Habibah, 2012).

Keuntungan dari metode maserasi salah satunya adalah cepat, terutama jika maserasi dilakukan pada suhu didih dari pelarut. Selain itu, maserasi juga efisien digunakan untuk ekstraksi senyawa yang tidak tahan panas. Sedangkan kekurangan dari maserasi adalah waktu rendam yang dibutuhkan oleh setiap bahan dalam pelarut bervariasi, antara 15-30 menit bahkan 24 jam. Maserasi dilakukan menggunakan pelarut yang selalu baru sehingga volume pelarut yang dibutuhkan cukup besar (Kristanti, dkk., 2008).

Steroid merupakan senyawa yang bersifat nonpolar. Namun di alam, steroid berada dalam bentuk glikosidanya (terikat dengan gugus gula). Sehingga proses ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut yang bersifat semipolar atau polar (Kristanti, dkk. 2008). Ekstraksi maserasi biasanya dilakukan menggunakan pelarut organik seperti metanol atau etanol. Kedua pelarut tersebut memiliki sifat toksik. Namun, metanol lebih toksik dibandingkan etanol. Akan tetapi, pada penelitian seringkali digunakan pelarut metanol untuk melakukan ekstraksi karena metanol memiliki titik didih yang lebih rendah dibandingkan etanol. Sehingga pelarut metanol akan lebih mudah untuk diuapkan pada suhu yang rendah. Sedangkan etanol memiliki titik didih yang lebih tinggi dari metanol sehingga akan sulit untuk diuapkan saat proses penghilangan pelarut (Atun, 2014).

Rendemen hasil maserasi rumput laut *Eucheuma spinosum* menggunakan metanol memberikan nilai sebesar 9,62%(b/b) (Ningsih, dkk., 2015). Sedangkan pada penelitian Setiyawan, dkk., (2015) diperoleh hasil yang tidak jauh berbeda yakni sebesar 8,54% (b/b). Pada penelitian tersebut juga disebutkan bahwa hasil maserasi dengan metanol memberikan warna hijau. Setelah dilakukan pemekatan

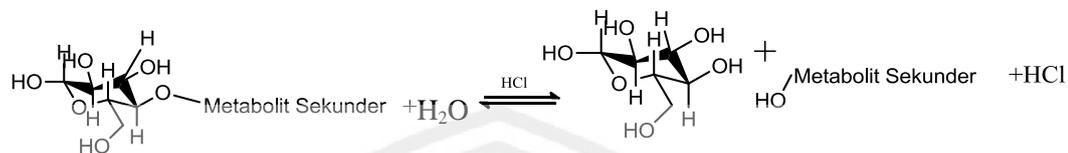
menggunakan *rotary evaporator vacuum* warna ekstrak berubah menjadi hijau kehitaman.

## 2.5 Hidrolisis dan Partisi

Senyawa steroid yang terdapat di alam biasanya berada dalam bentuk glikosidanya (terikat dengan gugus gula) (Kristanti, 2008). Sehingga untuk memperoleh senyawa steroid yang bebas dari gugus gula perlu dilakukan pemutusan ikatan glikosidanya dengan proses hidrolisis (Ningsih, dkk., 2015). Hidrolisis merupakan reaksi antara senyawa dan air dengan membentuk reaksi kesetimbangan. Selain bereaksi, peran air adalah sebagai medium reaksi sedangkan senyawanya dapat berupa senyawa anorganik maupun senyawa organik. Reaksi hidrolisis dilakukan untuk memutuskan ikatan glikosida pada senyawa organik yang berada pada bentuk glikosidanya. Glikosida merupakan senyawa yang terdiri dari gabungan gula (glikon) yang mempunyai sifat polar dan bagian bukan gula (aglikon) yang mempunyai sifat polar, semipolar dan nonpolar (Gunawan, 2004).

Hidrolisis adalah proses suatu senyawa terurai atau pecah dengan adanya reaktan dengan air (Groggins, 1958). Hidrolisis merupakan proses dekomposisi kimia yang terjadi dengan adanya pemutusan ikatan glikosida yang menjadi penghubung antar monomer melalui reaksi menggunakan air ( $H_2O$ ) sehingga membentuk bagian-bagian yang lebih sederhana (Adhiatama, dkk., 2012). Namun, reaksi hidrolisis memerlukan bantuan katalisator karena hidrolisis menggunakan air berlangsung sangat lambat (Nihlati, dkk., 2008). Berdasarkan

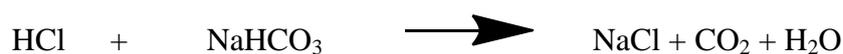
zat-zat penghidrolisis, hidrolisis dibedakan atas air, asam, basa dan enzim (Wahyudi, dkk. 2011).



Gambar 2.3 Dugaan Reaksi pemutusan ikatan glikosida (Mardiyah, 2012)

Berdasarkan penelitian Ningsih dkk., (2015) pemutusan ikatan glikosida pada steroid dilakukan menggunakan hidrolisis asam. Asam berfungsi sebagai katalisator dalam proses hidrolisis. Penambahan asam kuat pada sistem reaksi hidrolisis berpengaruh terhadap kekuatan pelepasan proton dari asam tersebut, sehingga proton akan membantu pemutusan ikatan glikosida. Asam yang biasa digunakan dalam proses hidrolisis di industri adalah  $H_2SO_4$  dan  $HCl$ . Namun,  $HCl$  lebih menguntungkan daripada  $H_2SO_4$  karena sifatnya yang lebih reaktif (Wahyudi, dkk. 2011). Selain itu, katalisator asam klorida ( $HCl$ ) akan membentuk garam yang tidak berbahaya yakni  $NaCl$  (Nihlati, dkk., 2008). Dugaan reaksi pemutusan antara ikatan glikosida dan steroid terdapat pada gambar 2.3.

Setelah proses pemecahan ikatan glikon dan aglikon perlu dilakukan penetralan. Karena hidrolisis yang dilakukan menggunakan katalis asam, sehingga dibutuhkan larutan basa. Basa yang digunakan adalah Natrium bikarbonat jenuh ( $NaHCO_3$ ) jenuh (Ningsih, dkk., 2015). Reaksi penetralan pembentukan garam ditunjukkan pada gambar 2.4.



Gambar 2.4 Reaksi antara  $HCl$  dan  $NaHCO_3$  (Ningsih, dkk., 2015)

Sehingga perlu dilakukan partisi menggunakan pelarut yang mempunyai perbedaan kepolaran. Pada penelitian ini akan digunakan pelarut metanol 99,9%

dan petroleum eter untuk partisi. Berdasarkan penelitian Kholidiyah, dkk (2014) komponen gula (glikon) akan larut pada fase air sedangkan komponen metabolit sekunder (aglikon) akan larut pada fase organik. Adanya perbedaan kepolaran antara keduanya, sehingga komponen gula (glikon) dan komponen metabolit sekunder (aglikon) dapat dipisahkan.

Setiyawan dkk. (2015) melakukan isolasi pada fraksi petroleum eter menggunakan KLTP dengan eluen campuran n-heksana dan etil asetat, lalu dikarakterisasi menggunakan pereaksi *Lieberman Burchard* (LB). Hasil isolasi ditunjukkan pada tabel 2.2. Partisi menghasilkan rendemen sebesar 4,9%.

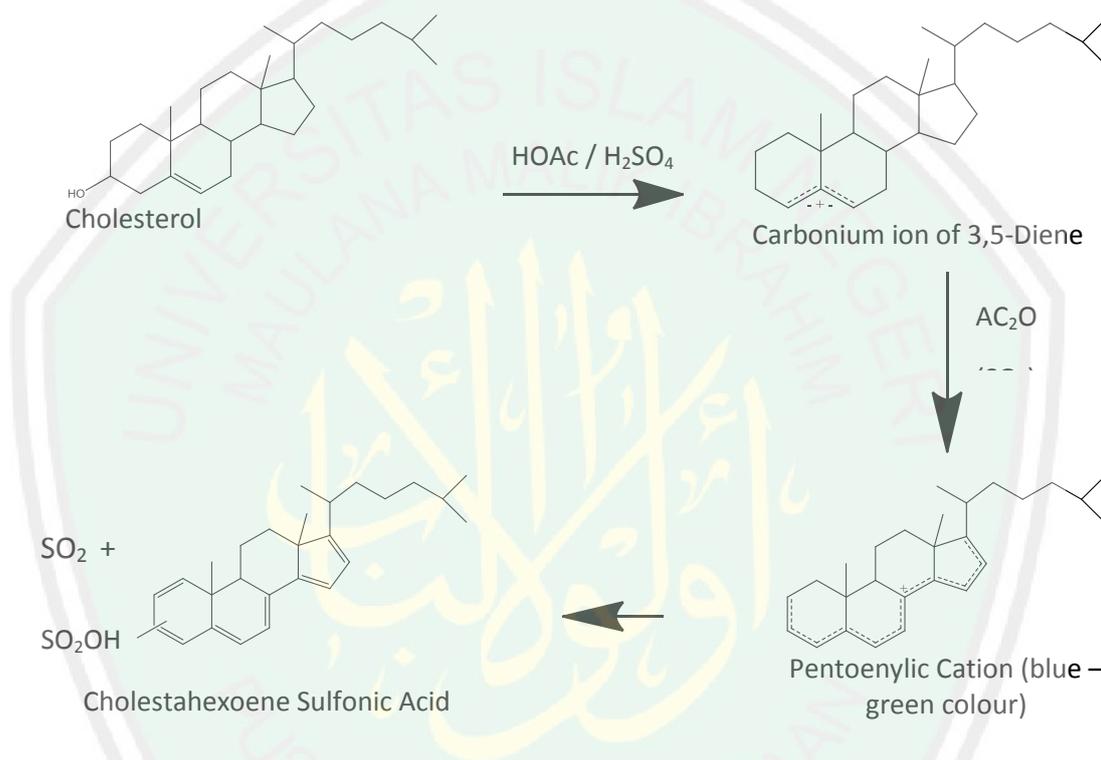
## 2.6 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Tabel 2.2 Hasil isolasi fraksi petroleum eter *Eucheuma spinosum* dan karakterisasi dengan pereaksi LB (Setiyawan, dkk., 2015)

Noda	Nilai Rf	Warna Noda	
		Sebelum disemprot Reagen	Setelah disemprot Reagen
1	0,17	Orange	Ungu
2	0,3	Hijau	Hijau
3	0,36	Ungu	Ungu
4	0,44	Hijau	Hijau
5	0,53	Ungu	Ungu
6	0,69	Hijau	Hijau
7	0,83	Orange	Merah Jingga
8	0,89	Biru	Biru

Uji fitokimia merupakan tahap awal untuk menentukan golongan senyawa yang terdapat pada suatu tanaman atau hewan. Uji fitokimia perlu dilakukan pada penelitian ini agar diketahui bahwa sebyawa steroid terdapat pada alga merah *Eucheuma spinosum*. Metode yang digunakan pada uji ini adalah pereaksi warna (Kristanti, dkk., 2008). Dengan reagen yang ditambahkan, hasil positif senyawa steroid dalam *Eucheuma spinosum* ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi

hijau sampai biru (Auterhoof dan Kovar, 1987). Berdasarkan penelitian Hanapi, dkk. (2013) uji fitokimia senyawa steroid dilakukan menggunakan pereaksi *Lieberman Burchard* dengan komposisi kloroform, asam asetat anhidrida dan asam sulfat pekat. Reaksi perubahan warna saat penambahan reagen *Lieberman Burchard* ditunjukkan pada gambar 2.5 (Burke, dkk., 1974).



Gambar 2.5 Reaksi Perubahan Warna Senyawa Steroid saat Penambahan Reagen *Lieberman Burchard* (Burke, dkk., 1974)

## 2.7 Kromatografi Lapis Tipis

Isolasi senyawa steroid membutuhkan pelarut yang cocok, sehingga dibutuhkan proses pemilihan eluen terbaik menggunakan metode kromatografi kolom. Kromatografi merupakan teknik pemisahan yang menggunakan prinsip distribusi suatu senyawa pada fasa diam dan fasa gerak berdasarkan perbedaan kepolaran. Teknik kromatografi dapat digunakan untuk memisahkan senyawa dalam suatu campuran, dapat digunakan untuk analisis kualitatif maupun

kuantitatif. Analisis kualitatif kromatografi lapis tipis didasarkan pada nilai  $R_f$ , dua senyawa dapat dikatakan identik (sama) jika mempunyai nilai  $R_f$  yang sama. Sedangkan analisis kuantitatif dilakukan dengan mengukur luas *spot* atau pengerokan secara langsung terhadap *spot* lalu penentuan kadar senyawa yang terdapat dalam spot tersebut dengan metode analisis lain (Gandjar dan Rohman, 2009).

KLTA dilakukan menggunakan plat KLT yang biasanya terdapat lapisan tipis di atasnya. Lapisan tipis seperti plat silika gel F<sub>254</sub> ditambahkan indikator fluoresensi yang dapat membantu kenampakan bercak berwarna pada lapisan tersebut. Indikator fluoresensi merupakan senyawa yang dapat memancarkan sinar dengan lampu UV (Gritter, 1991). Identifikasi dari senyawa yang telah terpisah menggunakan nilai  $R_f$ . Harga  $R_f$  dapat ditentukan berdasarkan perbandingan antara jarak senyawa yang terelusi dengan jarak pelarut yang mengelusi.

$$\text{Harga } R_f = \frac{\text{jarak tempuh senyawa}}{\text{jarak tempuh pelarut}}$$

Tujuan dilakukannya analisis KLT adalah untuk menentukan eluen terbaik yang akan digunakan untuk proses elusi atau fasa gerak (optimasi fasa gerak) dari kromatografi kolom (Sulastry dan Kurniawati 2010). Eluen terbaik ditentukan berdasarkan pemisahan noda yang paling baik. Pemisahan yang baik ditunjukkan dengan banyaknya noda yang terbentuk. Semakin banyak noda yang terbentuk, semakin banyak senyawa yang dapat dipisahkan dengan eluen tersebut (Sulastry dan Kurniawati, 2010).

Berdasarkan penelitian Ningsih dkk. (2015) eluen terbaik dari hasil Kromatografi Lapis Tipis Analitik untuk memisahkan senyawa steroid adalah

campuran senyawa n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 4,25 : 0,75. Campuran senyawa tersebut terdiri dari senyawa n-heksana yang bersifat non-polar dan senyawa etil asetat yang bersifat semi polar. Namun perbandingan dari campuran eluen tersebut, n-heksana mempunyai perbandingan yang lebih besar sehingga memberikan kontribusi yang lebih besar dan campuran senyawa tersebut lebih cenderung bersifat non polar. Senyawa steroid lebih cenderung bersifat non-polar sehingga senyawa steroid lebih terdistribusi pada eluen dibandingkan pada plat KLT yang bersifat polar (Ningsih, dkk., 2015).

Setiyawan dkk. (2015) melakukan KLTA pada *Eucheuma spinosum* fraksi petroleum eter dengan eluen campuran antara n-heksana : etil asetat perbandingan 4 : 1; 4,25 : 0,75; 4,5 : 0,5. Spot dari eluen campuran dengan komposisi 4,25 : 0,75 sebanyak 9 spot. Sedangkan spot dari eluen campuran komposisi 4 : 1 dan 4,5 : 0,5 didapatkan 8 spot. Berdasarkan jumlah spot yang didapat, eluen dengan komposisi 4,25 : 0,75 merupakan eluen terbaik. Karena semakin banyak spot yang didapat, semakin baik kemampuan eluen tersebut dalam memisahkan suatu senyawa.

Selain digunakan untuk optimasi fasa gerak, KLT analitik juga dapat digunakan untuk analisis (monitoring) isolat hasil kromatografi kolom (Sulastry dan Kurniawati, 2010), (Kusmiyati, dkk., 2011). Proses ini digunakan untuk dasar penggabungan isolat hasil kromatografi kolom yang mempunyai nilai  $R_f$  sama (Kusmiyati, dkk., 2011).

## 2.8 Kromatografi Kolom

Isolasi senyawa steroid dapat dilakukan menggunakan kromatografi kolom. Kromatografi kolom merupakan suatu metode pemisahan preparatif. Metode ini digunakan untuk memisahkan suatu sampel yang berupa campuran dengan berat beberapa gram. Prinsip dasar dari kromatografi kolom adalah suatu pemisahan yang didasarkan pada prinsip adsorpsi. Pemisahan dapat dilakukan dengan meletakkan sampel pada ujung atas kolom dan pelarut yang digunakan dialirkan secara terus menerus. Eleuen/pelarut akan melewati kolom dengan adanya gravitasi bumi atau karena bantuan tekanan (Kristanti, dkk., 2008).

Adsorben yang umum digunakan pada kromatografi kolom adalah  $\text{SiO}_2$ , selulosa atau amlumina yang tersedia dalam bentuk asam, basa, atau netral. Pemilihan adsorben yang sesuai sangat dibutuhkan untuk menghindari terjaidnya reaksi dalam kolom yang tidak diinginkan. Sebagai contoh alumina asam dapat mengakibatkan reaksi dehidrasi alkohol tersier dan bentuk basanya dapat mengakibatkan reaksi hidrolisis ester atau reaksi kondensasi aldol pada aldehida. Adsorben paling umum dipakai adalah silika gel, yang terutama dapat memisahkan senyawa organik yang kestabilannya relatif rendah jika dipisahkan dengan alumina (Kristanti, dkk., 2008).

Jumlah adsorben yang digunakan bergantung pada tingkat kesulitan pemisahan dari suatu senyawa dan jumlah sampel yang akan dipisahkan, secara umum, tiap gram sampe yang dipisahkanl membutuhkan adsorben 30 – 50 gram. Jika pemisahan yang dilakukan cukup sulit, jumlah adsorben yang dibutuhkan dapat mencapai 200 gram. Jumlah adsorben yang dibutuhkan akan lebih sedikit

untuk pemisahan senyawa-senyawa yang perbedaan kepolarannya cukup besar (Kristanti, dkk., 2008).

Pemilihan fasa gerak juga merupakan langkah yang penting untuk keberhasilan isolasi senyawa. Sifat-sifat pelarut juga sangat berpengaruh terhadap penentuan mobilitas komponen-komponen campuran. Kemampuan pelarut untuk menggerakkan suatu senyawa berhubungan dengan kekuatan elusi pelarut. Urutan kekuatan elusi beberapa pelarut air > metanol > etanol > aseton > etil asetat > kloroform > dietil eter > metilen diklorida > benzena > toluena > karbon tetraklorida > heksana > petroleum eter (Atun, 2014).

Pengisian adsorben dalam kolom dapat mempengaruhi hasil pemisahan dari kromatografi kolom. Pengisian harus dilakukan sampai homogen dan juga terbebas dari gelembung udara. Selama proses elusi berjalan, dapat terjadi cacat kolom jika saat pengisian adsorben dalam kolom kurang maksimal. Permukaan adsorben harus benar-benar horizontal agar meminimalisir kemungkinan terjadinya cacat kolom. Hal yang harus diperhatikan saat pengisian kolom adalah posisi dari kolom. Posisi kolom harus benar-benar vertikal (Kristanti, dkk., 2008).

Kromatografi telah mengalami beberapa modifikasi dan terbagi atas: Kromatografi Kolom Vakum (KKV), Kromatografi Kolom Tekan (KKT), dan Kromatografi Kolom Gravitasi (KKG). Pemisahan dan pemurnian senyawadapat dilakukan menggunakan kromatografi kolom gravitasi. Kolom yang digunakan biasanya berukuran 1-3 cm dan panjang kolom 50 cm. Sedangkan adsorben yang digunakan adalah silika gel GF 60 (200-400 mesh). Tinggi adsorben yang biasa digunakan berkisar 15-20 cm (Atun, 2014).

Pengisian adsorben dalam kolom dapat dilakukan menggunakan dua cara:

### 1. Pengisian cara basah

Pengisian cara basah dilakukan dengan membuat campuran antara adsorben yang akan digunakan dengan pelarut paling non polar yang akan digunakan untuk elusi. Campuran dibuat dengan kekentalan tertentu agar dapat dituang dalam kolom. Adsorben ditambahkan pada pelarut sedikit demi sedikit agar tidak terjadi gumpalan dalam campuran. Campuran yang telah terbentuk dimasukkan dalam kolom menggunakan corong sampai membentuk lapisan setebal 2 cm. Proses pemasukan adsorben campuran, dinding kolom diketuk-ketuk agar lapisan yang terbentuk benar-benar mampat dan juga tidak terdapat gelembung. Kran bagian bawah dari kolom dibuka untuk mengeluarkan pelarut. Langkah tersebut diulang sampai seluruh adsorben yang akan digunakan untuk elusi berhasil dimasukkan dalam kolom. Setelah itu, ditunggu cairan yang berada di atas adsorben sampai jernih (Kristanti, dkk., 2008).

### 2. Pengisian cara kering

Kolom diisi dengan pelarut paling nonpolar yang akan digunakan untuk elusi sebanyak 2/3 bagian. Adsorben yang akan digunakan dimasukkan secara perlahan setebal 2 cm sambil diketuk-ketuk dinding secara perlahan. Kran bagian bawah kolom dibuka agar semua pelarut keluar dan adsorben masuk ke dalam kolom. Setelah semua adsorben masuk dalam kolom, dibiarkan kolom beberapa saat sampai cairan yang beradadi atas adsorben menjadi jernih. Jumlah eluen/pelarut harus selalu di atas batas adsorben (Kristanti, dkk., 2008).

Bogoriani (2008) melakukan isolasi glikosida steroid menggunakan kromatografi kolom gravitasi dengan menggunakan fasa diam silika gel 60 (70-230 mesh) dan fase gerak kloroform; metanol; air dengan perbandingan 3; 1; 0,1.

Fraksi ditampung setiap 3 ml dan didapatkan 50 fraksi. Selanjutnya fraksi tersebut diuji kemurniannya menggunakan KLT sampai menghasilkan kelompok fraksi. Isolat mayor yang didapatkan setelah KLT sebesar 7,5 g dengan sampel awal sebesar 11,0 g.

Hasil isolat kromatografi kolom diuji tingkat kemurniannya menggunakan KLTA. Pengelusian dilakukan menggunakan berbagai tingkat kepolaran eluen noda tunggal. Noda hasil KLTA dilihat di bawah lampu UV dan selanjutnya diuji menggunakan pereaksi *Lieberman-Burchard* (LB). Steroid akan memberikan warna hijau/biru dengan pereaksi LB (Ismarti, 2011).

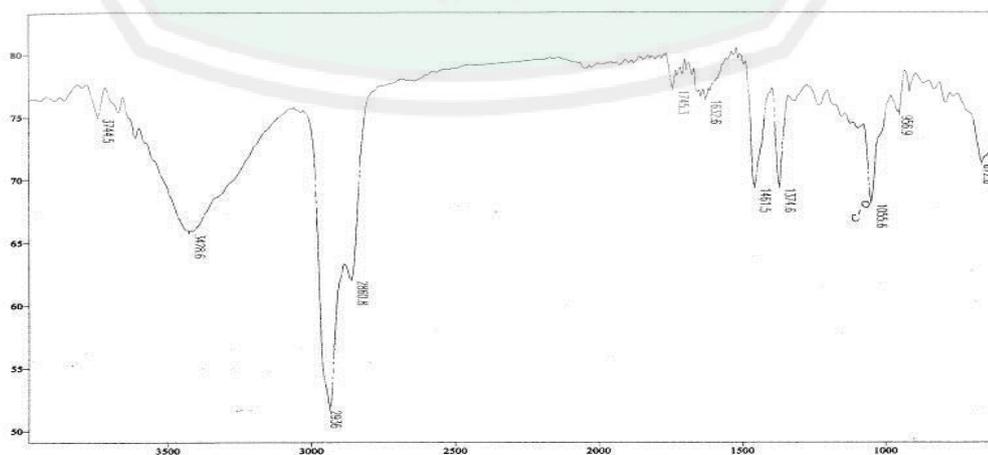
## 2.9 Identifikasi dengan FT-IR

Spektroskopi Infra Merah (IR) merupakan instrument yang digunakan untuk identifikasi suatu senyawa berdasarkan serapan yang ditimbulkan oleh vibrasi molekul. Energi vibrasi pada IR lebih rendah dibandingkan energy elektronik pada spektrofotometri UV-Vis. Namun, hal tersebut berbeda dengan panjang gelombang yang dihasilkan. Panjang gelombang sinar IR lebih panjang dibandingkan panjang gelombang dari UV-Vis (Panji, 2012).

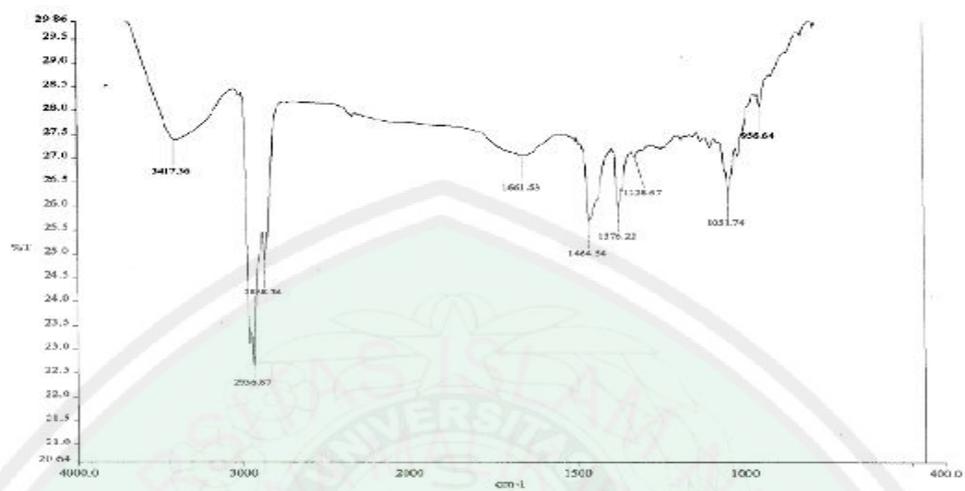
Identifikasi menggunakan FT-IR hanya akan memebrikan informasi mengenai gugus fungsi berdasarkan panjang gelombang, bentuk pita dan intensitas. Saleh (2007) melakukan identifikasi steroid menggunakan FT-IR memberikan serapan khas uluran gugus OH dengan serapan melebar pada bilangan gelombang  $3417,36\text{ cm}^{-1}$ . Penguatan dugaan tersebut ditunjukkan pada bilangan gelombang  $1328,67\text{ cm}^{-1}$  yang khas untuk tekukan dari gugus OH serta adanya uluran C-OH siklik pada daerah bilangan gelombang  $1051,74\text{ cm}^{-1}$ .

Serapan dengan intensitas kuat pada bilangan gelombang  $2936,87\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan uluran C-H dari  $\text{CH}_3$  serta bilangan gelombang  $2868$  menunjukkan uluran dari c-H pada  $\text{C-H}_2$ . Serapan tersebut diperkuat dengan adanya pita pada bilangan gelombang  $1376,22\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan tekukan C-H dari  $\text{C-H}_3$  dan serapan yang khas untuk C-H dari  $\text{C-H}_2$  juga terbentuk pada bilangan gelombang  $1464,54\text{ cm}^{-1}$ . Pita serapan juga menghasilkan uluran dari  $\text{C=C}$  non konjugasi pada bilangan gelombang  $1661,53\text{ cm}^{-1}$ . Pita serapan lain yang memperkuat hasil tersebut adalah  $\text{C=H}$  pada bilangan gelombang  $956,64\text{ cm}^{-1}$ . Hasil interpretasi tersebut menunjukkan steroid akan memberikan serapan yang khas untuk gugus OH, siklik, hidroksi, alkil dan ena non konjugasi.

Penelitian Ningsih dkk. (2015) senyawa steroid alga merah *Eucheuma spinosum* fraksi n-heksana diidentifikasi menggunakan FT – IR menghasilkan serapan untuk gugus O – H, gugus  $\text{Csp}_3\text{ – H}$ , gugus  $\text{C=C}$  dan gugus C – O alkohol sekunder. Penelitian lain (Saleh, 2007), melakukan isolasi senyawa steroid dari akar tumbuhan cendana menggunakan metode kromatografi kolom. Isolat yang menunjukkan positif steroid diidentifikasi menggunakan FT-IR dengan pellet KBr. Hasil spektra IR ditunjukkan pada gambar 2.6.



Gambar 2.6 Spektrum Inframerah senyawa Steroid (Tukiran, dkk., 2009)



Gambar 2.7 Spektrum IR senyawa steroid hasil isolasi dari akar tumbuhan cendana (Saleh, 2007)

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Februari – April 2016 di Laboratorium Organik Jurusan Kimia dan di Laboratorium Analitik Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

##### 3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah oven, *rotary evaporator vacum*, ayakan  $\geq 90$  mesh, *hotplate*, *aluminium foil*, *inkubator shaker*, corong pisah, kolom kromatografi (diameter 1,5 cm, tinggi 50 cm), statif, seperangkat alat gelas laboratorium, bejana pengembang, lampu UV, Spektroskopi FT-IR merk Varian Tipe FT 100, pipa kapiler, neraca analitik, lemari asap, dan penyaring vakum.

##### 3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alga merah (*Eucheuma spinosum*) yang berasal dari pantai Pamekasan Madura, metanol 99,9% merck 99,9%, petroleum eter *p.a.*, aquades, HCl 2 N, n-heksana 99 %, etil asetat *p. a.*, pereaksi *Lieberman-Burchard* (LB), Natrium bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) jenuh, plat KLT GF<sub>254</sub>, silika Gel G-60 (0,063 – 0,200 mm).

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat deskriptif kualitatif menggunakan variasi metode pengisian kolom. Proses penelitian dilakukan sebagai berikut: alga merah *Eucheuma spinosum* dikeringkan pada suhu ruang selama 7 hari lalu dikeringkan dengan oven pada suhu 38° C, dipotong kecil-kecil, dihaluskan dan diayak dengan ayakan  $\geq 90$  mesh. Hasil ayakan *Eucheuma spinosum* dimaserasi dengan pelarut metanol 99,9% lalu disaring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum*. Ekstrak metanol dihidrolisis menggunakan HCl 2 N dan dinetralkan dengan NaHCO<sub>3</sub> jenuh. Kemudian dipartisi dengan pelarut petroleum eter p. a dan dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum*. Selanjutnya, ekstrak hasil partisi diisolasi dengan kromatografi kolom dengan fasa diam pengisian adsorben cara basah dan kering menggunakan eluen campuran n-heksana dan etil asetat (4,25:0,75). Eluat yang didapatkan ditampung dalam botol vial lalu fraksi dimonitoring menggunakan KLT Analitik dengan eluen n-heksana dan etil asetat (4,25:0,75), spot dengan nilai R<sub>f</sub> yang sama disemprot menggunakan pereaksi *Lieberman-Burchard* (LB). Spot yang memberikan perubahan warna hijau menunjukkan aktif steroid. Fraksi yang menghasilkan spot warna hijau digabung lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan dialiri gas N<sub>2</sub>. Senyawa steroid diidentifikasi dengan Spektroskopi FT-IR merk Varian Tipe FT 100.

### 3.4 Tahapan penelitian

Tahapan-tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu:

1. Preparasi sampel,
2. Analisis kadar air,

3. Ekstraksi sampel,
4. Hidrolisis dengan HCl dan partisi dengan petroleum eter,
5. Uji Steroid,
6. Penentuan eluen terbaik dengan KLTA,
7. Isolasi dengan metode Kromatografi Kolom,
8. Monitoring dengan KLTA dan Uji *Lieberman Burchard*,
9. Penggabungan vial dan pemekatan,
10. Identifikasi senyawa steroid dengan Spektroskopi FT-IR merk Varian Tipe FT 100.

### **3.5 Cara Kerja**

#### **3.5.1 Preparasi Sampel (Anam, 2015)**

Preparasi sampel tanaman alga merah *Euclima spinosum* dilakukan dengan diambil seluruh bagian tanaman sebanyak 32 Kg, kemudian dicuci, dipotong kecil-kecil dan dikering anginkan selama 7 hari. Selanjutnya dihaluskan menggunakan mesin penghalus sampai terbentuk serbuk, dan diayak dengan ukuran  $\geq 90$  mesh kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu  $38^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.

#### **3.5.2 Analisis Kadar Air (AOAC, 1984)**

Analisis kadar air dilakukan pada semua bagian alga merah *Euclima spinosum*. Cawan dipanaskan dalam oven pada suhu  $100 - 105^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya. Kemudian cawan disimpan dalam desikator selama 10 menit. Selanjutnya cawan ditimbang, dan perlakuan yang sama diulang sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Alga merah *Euclima*

*spinosum* dimasukkan ke dalam cawan yang telah diketahui berat konstannya sebanyak 5 gam dan dikeringkan dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama 15 menit, kemudian sampel disimpan dalam desikator selama 10 menit dan ditimbang. Sampel tersebut dipanaskan kembali dalam oven selama 15 menit, disimpan dalam desikator dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi sampai berat konstan. Kadar air dalam tubuh alga merah dihitung menggunakan persamaan:

$$\text{Kadar air} = \frac{b - c}{b - a} \times 100\%$$

Keterangan: a= berat cawan kosong

b= berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c= berat cawan + sampel setelah dikeringkan

### 3.5.3 Ekstraksi Sampel (Anam, 2015)

Ekstraksi komponen aktif pada sampel dilakukan dengan ekstraksi maserasi atau perendaman dengan pelarut metanol 99,9%. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan karena dimungkinkan bahwa kandungan senyawa pada tanaman sudah cukup banyak yang terekstrak pada masing-masing tahapnya. Serbuk tanaman alga merah *Eucheuma spinosum* ditimbang sebanyak 100 gam dan diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut metanol 99,9% 500 mL di dalam Erlenmeyer dan diaduk dengan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm (*rotation per minutes*) selama 3 jam. Kemudian disaring dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut dan perlakuan yang sama sampai 3 kali pengulangan hingga diperoleh filtrat yang telah pudar warnanya (mendekati bening). Selanjutnya ketiga filtrat yang diperoleh kemudian digabung menjadi satu. Lalu dipisahkan menggunakan *rotary evaporator*.

### 3.5.4 Hidrolisis dengan HCl dan Partisi dengan Petroleum Eter (Setiyawan dkk., 2015)

Ekstrak pekat metanol 99,9% sebanyak 5 gam dimasukkan ke dalam beaker glass, kemudian dihidrolisis dengan menambahkan 10 mL asam klorida (HCl) 2 N ke dalam ekstrak pekat. Hidrolisis dilakukan selama 1 jam menggunakan *magnetic stirrer hot plate* pada suhu ruang. Hidrolisat yang diperoleh ditambahkan dengan natrium bikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) jenuh sampai pH-nya netral, lalu hidrolisat dipartisi dengan menambahkan 25 mL metanol 99,9% dan 25 mL pelarut petroleum eter. Proses partisi dilakukan tiga kali pengulangan. Ekstrak hasil partisi dipekatkan dengan *rotary evaporator*, ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemennya.

### 3.5.5 Uji Steroid (Mardiyah dkk., 2014)

1 mg ekstrak petroleum eter dari *Eucheuma spinosum* dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya, campuran tersebut ditambah dengan 1 – 2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung. Jika diperoleh hasil berupa cincin berwarna hijau kebiruan menunjukkan adanya senyawa steroid pada ekstrak tersebut.

### 3.5.6 Penentuan Eluen Terbaik dengan KLTA (Setiyawan, dkk., 2015)

Sebelum dilakukan kromatografi kolom penting untuk dilakukan penentuan eluen terbaik agar didapatkan hasil isolasi yang baik. Penentuan eluen terbaik dalam penelitian ini menggunakan KLTA. Eluen yang akan digunakan adalah campuran:

n-heksana : etil asetat = 4 : 1

n-heksana : etil asetat = 4,25 : 0,75

n-heksana : etil asetat = 4,5 : 0,5

Eluen dibuat dengan volume total 5 mL dan dijenuhkan selama 1 jam. Plat silika F<sub>254</sub> (1x10 cm) dioven pada suhu 110 °C selama 30 menit. Ekstrak pekat hasil partisi sebanyak 50 mg dilarutkan dengan 50 mL petroleum eter (konsentrasi 1000 ppm). Sampel ditotolkan sebanyak 5-7 kali. Elusi dilakukan sampai 1cm dibawah batas atas plat. Eluen terbaik ditandai dengan pemisahan yang menghasilkan spot paling banyak.

### **3.5.7 Isolasi senyawa Steroid dengan metode Kromatografi Kolom (Kristanti, dkk., 2013)**

Setelah uji fitokimia menunjukkan hasil positif steroid, pengerjaan dilanjutkan terhadap fraksi petroleum eter. Fraksi tersebut dikromatografi kolom menggunakan fasa diam silika gel 60 F-254 (0,063-0,200 mm). Fasa gerak yang digunakan merupakan campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 4,25 : 0,75. Kolom mula-mula diisi dengan glasswool pada bagian bawah kolom. Silika gel dimasukkan dalam kolom. Kolom diketuk-ketuk agar fasa diam tidak retak dan tidak terdapat gelembung. Sampel sebanyak 0,2 g (Kolom kering); 0,1 g (kolom basah) dilarutkan dalam 1mL fasa gerak yang digunakan lalu dimasukkan dalam kolom kromatografi. Kran dibuka lalu fasa gerak ditambahkan. Eluat ditampung setiap 2 mL pada botol vial. Selama proses elusi, eluen dalam kolom harus selalu di atas batas adsorben. Proses elusi dihentikan setelah semua senyawa steroid diperkirakan telah keluar dari kolom.

### **3.5.8.1 Kolom Pengisian Cara Basah (Kusmiyati, dkk., 2011)**

Pembuatan kolom cara basah dilakukan dengan disiapkan fasa gerak campuran n-heksana dan etil asetat (4,25 : 0,75) dan silika gel. Silika gel ditimbang sebanyak 10 g dan diaktivasi dengan cara dipanaskan dalam oven selama 2 jam pada suhu 110 °C. Selanjutnya didinginkan dengan diletakkan dalam desikator selama 15 menit. Bubur silika dibuat dengan ditambahkan sedikit demi sedikit dan diaduk dengan *magnetic stirrer hotplate* sampai terbentuk suspensi dan tidak terbentuk gelembung udara. Suspensi dimasukkan ke dalam kolom menggunakan corong. Dinding kolom diketuk-ketuk agar terbentuk adsorben yang benar-benar mampat. Adsorben dipastikan telah masuk semua dalam kolom dan kolom didiamkan selama 24 jam. Setelah itu pelarut dikeluarkan sampai mendekati batas adsorben lalu sampel dimasukkan dalam kolom kromatografi.

### **3.5.8.2 Kolom Pengisian Cara Kering (Suryani, 2011)**

Silika gel ditimbang sebanyak 10 g dan diaktivasi dengan cara dipanaskan dalam oven selama 2 jam pada suhu 110 °C. Selanjutnya didinginkan dengan diletakkan dalam desikator selama 15 menit. Silika Gel dimasukkan ke dalam kolom menggunakan corong dan dilakukan secara perlahan-lahan. Selama penambahan silika, dinding kolom diketuk-ketuk sampai adsorben benar-benar mampat. Setelah semua adsorben masuk dan mampat, sampel yang telah dicampur dengan pelautnya dimasukkan dalam kolom lalu ditambahkan eluennya.

### **3.5.8 Monitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) (Kristanti, dkk., 2008)**

Setelah didapatkan beberapa fraksi dari kromatografi kolom pengisian cara basah dan kering dilakukan identifikasi pada masing-masing eluat dengan KLTA.

Eluen yang digunakan sebagai fasa gerak adalah pelarut campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 4,25 : 0,75 dan digunakan silika gel F<sub>254</sub> dengan ukuran 10x10 cm. Eluen disiapkan dengan ditambahkan campuran fasa gerak ke dalam bejana pengembang lalu dijenuhkan selama 1 jam. Plat silika gel ditandai 1cm pada batas atas dan bawah, lalu diaktivasi dengan dioven pada suhu 110 °C selama 30 menit. Monitoring fraksi dilakukan setiap *range* 10 untuk memudahkan monitoring. Setiap fraksi dengan *range* 10 ditotolkan pada silika gel yang telah diaktivasi menggunakan pipa kapiler dengan jarak 1 cm dari batas bawah plat. Setelah selesai penotolan, dimasukkan plat tersebut ke dalam eluen yang telah dijenuhkan dan dielusi sampai tanda batas atas. Kemudian diamati noda yang terbentuk menggunakan lampu UV dan dihitung nilai R<sub>f</sub>-nya.

### **3.5.9 Penggabungan Vial dan Pemekatan (Utama, dkk., 2013)**

Spot yang dihasilkan dari KLTA dikarakterisasi menggunakan pereaksi *Liberman-Burchard*. Hasil karakterisasi yang berwarna hijau atau biru menunjukkan positif steroid. Fraksi yang menunjukkan hasil positif steroid digabungkan. Gabungan fraksi diuapkan pelarutnya dengan divakumkan pada desikator.

### **3.5.10 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan Spektrofotometer FT-IR (Sukandana, 2011)**

Hasil isolasi senyawa steroid dengan kromatografi kolom diidentifikasi menggunakan FTIR untuk membuktikan senyawa yang telah diisolasi adalah benar-benar senyawa steroid. Ekstrak pekat dicampur dengan pellet KBr lalu digerus bersamaan dengan mortar agate. Campuran pellet KBr dan sampel yang telah halus dipres dengan tekanan 80 Torr (8-20 tor per satuan waktu) selama 10

menit. Selanjutnya pellet yang telah dipress dianalisis menggunakan FT-IR merk Varian tipe FT 100.

### 3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dijelaskan secara deskriptif dengan memperhatikan pola pemisahan, kenampakan noda, uji LB pada plat dari berbagai fraksi yang diperoleh dan hasil identifikasi dengan menggunakan FT-IR. Data ditampilkan dalam bentuk tabel dan grafik. Penjelasan akan diinterpretasikan berdasarkan tabel dan grafik tersebut.



## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Preparasi Sampel

Preparasi sampel perlu dilakukan untuk memaksimalkan hasil penelitian. Sampel *Eucheuma spinosum* dicuci sampai bersih karena sampel diambil dari laut dan bercampur dengan lumut ataupun kotoran yang lain. *Eucheuma spinosum* basah mempunyai kadar air yang tinggi (Diharmi, dkk., 2011). Kadar air merupakan komponen penting yang berhubungan dengan mutu simplisia. Kadar air yang tinggi dapat menyebabkan tumbuhnya mikroorganisme dan jamur selama proses penyimpanan. Sehingga untuk mengurangi kadar air, sampel *Eucheuma spinosum* dikeringanginkan selama  $\pm 7$  hari dengan dipotong kecil-kecil untuk memperbesar luas permukaan dan mempercepat proses pengeringan.

Sampel yang telah kering selanjutnya dihaluskan dan diayak dengan ukuran 90 mesh. Fungsi dari pengayakan adalah untuk menyeragamkan ukuran serta memperbesar luas permukaan. Semakin besar luas permukaan, kontak sampel dengan pelarut semakin besar dan proses ekstraksi akan lebih optimal (Voight, 1995). Sampel yang telah halus dioven pada suhu 38 °C selama 24 jam untuk memaksimalkan pengeringan sampel.

#### 4.2 Analisis Kadar Air

Kadar air dalam sampel alga merah *Eucheuma spinosum* berpengaruh terhadap proses penyimpanan sampel. Kadar air yang tinggi dapat mengakibatkan sampel *Eucheuma spinosum* lembab sehingga akan mudah terdegradasi oleh mikroorganisme, dan tumbuh jamur. Analisis kadar air dilakukan untuk

mengetahui kadar air sehingga tidak berpengaruh terhadap proses penyimpanan sampel. Analisis kadar air dilakukan menggunakan metode *thermogravimetry*, yakni simplisia *Eucheuma spinosum* dioven dengan suhu 105 – 110 °C karena air mempunyai titik didih 100 °C. Sehingga untuk menguapkan air dibutuhkan suhu di atas titik didihnya. Setelah sampel dioven, sampel didiamkan dalam desikator untuk mencegah kontak sampel dengan udara luar. Pengovenan dilakukan secara berulang-ulang hingga diperoleh berat konstan. Setelah diperoleh berat konstan, kadar air dapat dihitung dari selisih antara berat simplisia sebelum dan sesudah dioven. Data kadar air sampel *Eucheuma spinosum* ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Data kadar air alga merah *Eucheuma spinosum*

Sampel	Kadar Air (%)
<i>Eucheuma spinosum</i> basah	90,25
<i>Eucheuma spinosum</i> kering	8,05

Tabel 4.1 menunjukkan kadar air *Eucheuma spinosum* tidak berbeda dengan kadar air tanaman umumnya yang berkisar antara 80 – 90 % (Astawan, dkk., 2001). Kadar air *Eucheuma spinosum* basah (90,25 %) memenuhi standar yang ditentukan SNI 1992 yang menyatakan bahwa kadar air rumput laut kering maksimal 35 % (SNI, 1992).

Sampel *Eucheuma spinosum* kering tidak mempengaruhi proses maserasi karena telah memenuhi standar kadar air maksimum yang disyaratkan untuk maserasi yakni < 11% (Nurmillah, 2009). Kadar air yang tinggi akan mempengaruhi konsentrasi dari pelarut yang digunakan. Semakin tinggi nilai kadar air pada sampel, maka konsentrasi pelarut yang digunakan akan semakin berkurang karena bercampur dengan air yang terdapat pada sampel. Berkurangnya konsentrasi pelarut akan mempengaruhi jumlah senyawa yang terekstrak, sehingga maserasi kurang maksimal.

### 4.3 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi sampel merupakan langkah awal yang dilakukan untuk melakukan proses isolasi karena dapat melarutkan komponen senyawa aktif yang terkandung di dalamnya. Ekstraksi sampel *Eucheuma spinosum* dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol 99,9 % (Habibah, dkk., 2012 dan Kholidiyah, dkk., 2013). Metode maserasi dipilih karena menggunakan teknik perendaman dengan suhu ruang tanpa disertai pemanasan. Suhu yang tinggi menyebabkan senyawa metabolit sekunder terdegradasi sehingga metode maserasi lebih aman untuk dilakukan. Metanol digunakan karena pada umumnya senyawa metabolit sekunder di alam berada dalam bentuk glikosidanya. Selain itu, Metanol mempunyai titik didih yang lebih rendah (T.d 74 °C) dari etanol (78 °C) sehingga pelarut metanol akan lebih mudah untuk diuapkan (Atun, 2014).

Perendaman simplisia *Eucheuma spinosum* dilakukan selama 24 jam disertai dengan penggojokan menggunakan *shaker*. Penggojokan dilakukan untuk mempercepat kontak pelarut dengan sampel sehingga proses ekstraksi berjalan lebih cepat. Setelah 24 jam dipisahkan antara residu dan filtrat dengan cara disaring menggunakan corong buchner untuk mempercepat penyaringan. Residu yang diperoleh diremaserasi untuk mengoptimalkan proses maserasi. Karena kemungkinan komponen aktif masih banyak yang tertinggal di filtrat. Remaserasi dilakukan sampai warna filtratnya memudar dan lebih pucat (Kristanti, dkk., 2008). Warna yang memudar diasumsikan komponen senyawa yang terdapat pada sampel sudah habis. Maserasi pertama menghasilkan warna hijau dan setelah remaserasi ke-3 warna memudar menjadi kuning bening. Hasil maserasi kemudian

disaring kembali dan digabungkan filtrat yang diperoleh dari ketiga maserasi untuk diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 40 – 50 °C (Atun, 2014).

Metanol mempunyai titik didih 74 °C, namun pada proses pemekatan dilakukan dengan suhu 40 – 50 °C. Metanol dapat menguap di bawah titik didihnya karena adanya penurunan tekanan pada sistem. Karena tekanan berbanding lurus dengan temperatur, maka semakin kecil tekanan semakin rendah pula temperatur yang dibutuhkan untuk menguapkan pelarut. Hal tersebut menguntungkan pada proses penguapan pelarut karena dapat menguapkan di bawah titik didih pelarut. Proses pemekatan ekstrak dihentikan setelah pelarut tidak lagi menetes ke labu alas bulat.

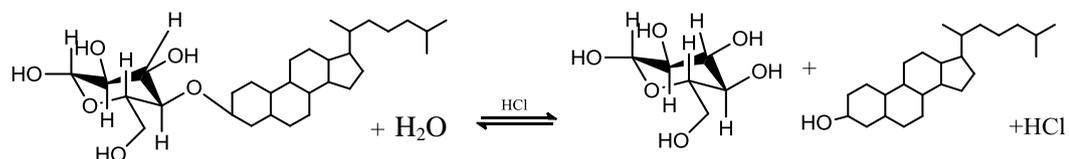
Filtrat hasil yang diperoleh digabungkan dan diuapkan pelarutnya sehingga diperoleh ekstrak metanol 10,765 gram dengan rendemen sebesar 3,075 % (b/b). Maserasi kedua juga menghasilkan rendemen yang tidak jauh berbeda yakni sebesar 3,075 % (b/b). Hasil ini berbeda dengan penelitian terdahulu yang didapatkan rendemen sebesar 8,54 % (b/b) (setiyawan, 2015). Perbedaan tersebut disebabkan karena perbedaan kadar air pada sampel yang digunakan untuk maserasi. Selain perbedaan kadar air, perbedaan waktu pengambilan, waktu/umur panen, lingkungan tempat tumbuh, iklim dan penanganan pasca panen dapat mempengaruhi kandungan rumput laut (Marseno, dkk., 2010).

#### **4.4 Hidrolisis dan Fraksinasi**

Senyawa steroid yang terdapat di alam pada umumnya masih berada dalam bentuk glikosidanya. Pemutusan ikatan glikosida antara glikon dapat dilakukan

dengan hidrolisis (Fessenden dan Fessenden, 1986). Hidrolisis merupakan reaksi kimia yang memecah molekul  $H_2O$  menjadi kation Hidrogen dan anion Hidroksida.

Reaksi hidrolisis membutuhkan katalisator karena hidrolisis dengan air akan berlangsung lambat (Nihlati, dkk., 2008). Katalis yang digunakan hidrolisis adalah katalis asam yakni HCl (Wahyudi, dkk., 2011), karena glikosida bersifat stabil pada kondisi netral atau basa (Fesenden & Fesenden, 1986). Kecepatan reaksi sebanding dengan jumlah ion  $H^+$  dari katalis. Jumlah ion  $H^+$  yang dilepaskan sebanding dengan konsentrasi HCl yang digunakan. Konsentrasi HCl yang baik digunakan untuk hidrolisis adalah 2N. Konsentrasi 2N menghasilkan laju konsentrasi yang lebih besar ( $0,036 \text{ min}^{-1}$ ) dari konsentrasi 1 N yang menghasilkan laju konsentrasi sebesar  $0,052 \text{ min}^{-1}$  (Tasic, dkk., 2009). Kecepatan laju reaksi berbanding lurus dengan besarnya nilai gula yang terhidrolisis. Semakin besar laju reaksinya maka semakin besar nilai gula yang terhidrolisis. HCl digunakan karena mempunyai kekuatan asam yang lebih besar dibandingkan  $H_2SO_4$ . Kekuatan asam dapat dilihat berdasarkan pKa yang dimiliki oleh HCl (-8,00) dan  $H_2SO_4$  (-3,00) (Wahyudi, dkk., 2011). Semakin kecil nilai pKa maka semakin kuat keasamannya. Dugaan reaksi pemutusan ikatan glikosida ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Dugaan Reaksi pemutusan ikatan glikosida pada Steroid (Mardiyah, 2012)

Reaksi hidrolisis berlangsung secara reversibel, untuk menghentikannya ditambahkan dengan natrium bikarbonat sampai netral. pH awal setelah hidrolisis 0 dan dinetralkan sampai pH 7. Reaksi dapat dihentikan dengan larutan basa karena glikosida bersifat stabil pada kondisi netral (Fessenden dan Fessenden, 1986). Reaksi saat penambahan natrium hidroksida ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Reaksi antara HCl dan NaHCO<sub>3</sub> (Ningsih, dkk., 2015)

Ekstrak hasil hidrolisis yang telah netral dilakukan partisi dengan pelarut petroleum eter. Petroleum eter merupakan pelarut yang paling nonpolar jika dibandingkan dengan pelarut organik lainnya (Atun, 2014). Steroid bersifat nonpolar setelah terpisah dengan glikonnya, sehingga steroid akan lebih terdistribusi pada pelarut nonpolar saat proses partisi (Kholidiyah, dkk., 2014).

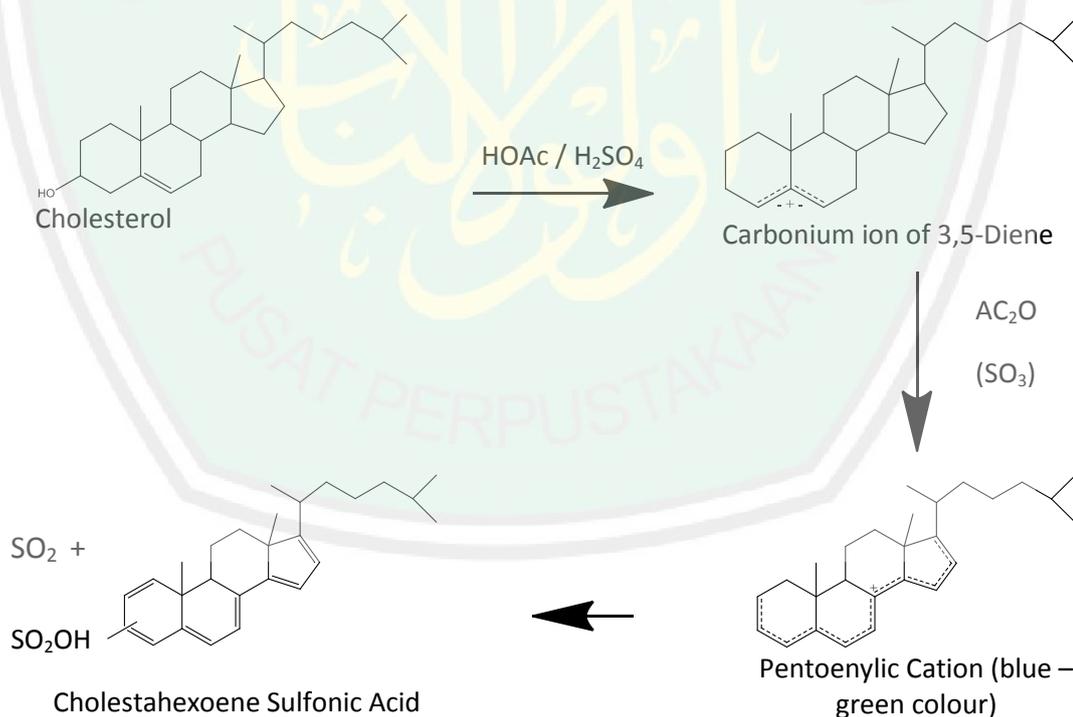
Partisi akan menghasilkan 2 lapisan berbeda. Lapisan tersebut terbentuk karena adanya perbedaan kepolaran, dan juga perbedaan densitas di antara 2 larutan. Lapisan atas merupakan lapisan organik dengan nilai densitas 0,7 g/L sedangkan lapisan bawah berupa lapisan air dengan nilai densitas 1 g/L. Nilai densitas yang besar akan berada pada lapisan bawah sedangkan nilai densitas yang rendah akan berada di lapisan atas. Lapisan bawah yang merupakan lapisan air yang berisi senyawa ataupun larutan yang polar seperti air, HCl, glikon, dan senyawa lain yang bersifat polar. Sedangkan lapisan organik berisi petroleum eter dan senyawa yang bersifat nonpolar seperti steroid.

Fasa organik yang mengandung aglikon diuapkan pelarutnya menggunakan *Vacuum rotary evaporator*. Proses penguapan dihentikan setelah

pelarut tidak lagi menetes. Rendemen hasil partisi didapatkan sebesar 14,072 % dari berat ekstrak awal 12,5 g dan didapatkan berat fraksi sebesar 1,759 g.

#### 4.5 Identifikasi Steroid

Fraksi petroleum eter dari ekstrak metanol alga merah *Eucheuma spinosum* mengandung beberapa senyawa. Uji Fitokimia merupakan langkah awal untuk mengetahui secara kualitatif kandungan senyawa steroid pada fraksi petroleum eter *Eucheuma spinosum*. Uji kualitatif senyawa steroid dilakukan menggunakan pereaksi LB (Kristanti, dkk., 2008). Pereaksi LB terdiri dari kloroform, asam asetat anhidrida dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Burke, dkk., 1974).



Gambar 4.3 Reaksi Perubahan Warna Senyawa Steroid saat Penambahan Reagen *Lieberman Burchard* (Burke, dkk., 1974)

Fraksi petroleum eter dilarutkan dengan kloroform dan ditambahkan dengan asam asetat anhidrida kemudian ditambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat (Mardiyah, dkk.,

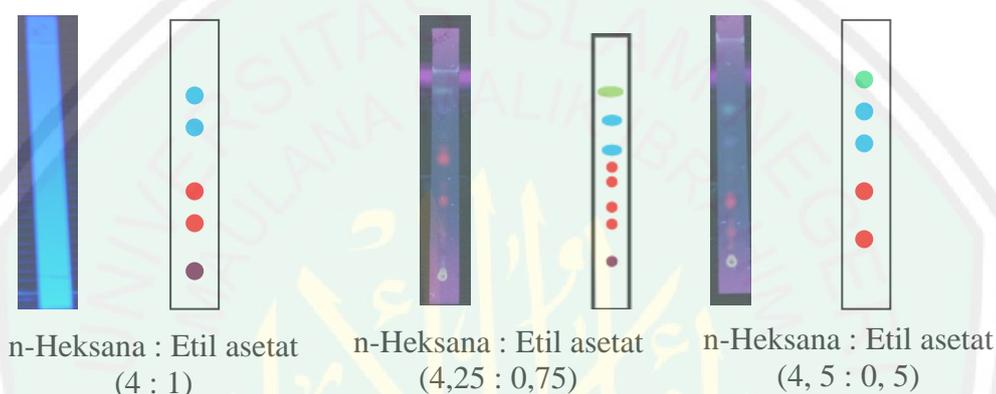
2014). Penambahan kloroform berfungsi sebagai pelarut sedangkan fungsi dari asam asetat anhidrida dan  $H_2SO_4$  untuk menghilangkan gugus OH dan mengubah Steroid menjadi ion karbonium dan air. Selanjutnya ion karbonium diubah menjadi kation pentaenil yang mempunyai ikatan rangkap konjugasi sehingga larutan akan menunjukkan warna hijau – biru jika fraksi positif mengandung senyawa steroid (Burke, dkk., 1997). Dugaan reaksi saat penambahan larutan ditunjukkan pada Gambar 4.4. Hasil uji yang telah dilakukan menunjukkan warna hijau kebiruan pada lapisan atas sehingga dapat diketahui bahwa fraksi petroleum eter *Eucheuma spinosum* positif mengandung senyawa steroid. Ningsih (2015) melakukan identifikasi steroid dari fraksi n-heksana alga merah *Eucheuma spinosum* dan menunjukkan hasil positif untuk steroid.

#### 4.6 Penentuan Eluen Terbaik dengan KLTA

Isolasi senyawa steroid dapat dipengaruhi oleh eluen yang digunakan, karena kepolaran dari senyawa organik adalah berbeda-beda. Fraksi mempunyai banyak kandungan senyawa sehingga untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan dibutuhkan eluen yang tepat untuk elusi, sehingga setiap senyawa yang terdapat pada fraksi terpisah. KLTA perlu dilakukan sebagai langkah untuk optimasi fasa gerak yang akan digunakan pada kromatografi kolom (Sulastry dan Kurniawati 2010). Penentuan eluen terbaik dengan KLTA dilakukan menggunakan eluen campuran n-heksana etil asetat perbandingan 4 : 1; 4,25 : 0,75; 4,5 : 0,5.

Berdasarkan hasil KLTA didapatkan 5 spot untuk campuran eluen n-heksana dan etil asetat perbandingan 4 : 1 serta perbandingan 4,5 : 0,5.

Perbandingan 4 : 1 didapatkan 2 spot senyawa steroid yang menunjukkan warna spot biru. Sedangkan perbandingan 4,5 : 0,5 didapatkan 3 spot senyawa steroid dengan 1 spot berwarna hijau dan 2 spot berwarna biru. Perbandingan 4,25 : 0,75 menghasilkan jumlah spot yang lebih banyak yakni 8 spot, 3 spot steroid dengan warna biru 2 spot dan warna hijau 1 spot. Hasil elusi ditunjukkan seperti gambar 4.5.



Gambar 4.4 Hasil KLTA berbagai perbandingan eluen

Eluen terbaik yang dapat digunakan untuk isolasi senyawa steroid adalah eluen dengan perbandingan 4,5 : 0,5 yang menghasilkan 3 spot steroid dengan jarak antar spot 0,2 cm (Atun, 2014). Eluen perbandingan 4,25 : 0,75 menghasilkan pemisahan senyawa yang paling banyak dengan jumlah spot steroid yang sama dengan eluen perbandingan 4,5 : 0,5 namun jarak antar spot yang didapat lebih kecil. Setelah dilakukan isolasi dengan plat KLT yang lebih panjang (20 cm) pada perbandingan 4,25 : 0,75 spot yang didapat memenuhi standar pemisahan yang baik dengan jarak antar spot 0,2 cm. Selain itu pada penelitian terdahulu digunakan eluen perbandingan 4,25 : 0,75, sedangkan eluen perbandingan 4 : 1 hanya menghasilkan 2 spot senyawa steroid. Sehingga pada penelitian ini digunakan eluen perbandingan 4,25 : 0,75.

## **4.7 Isolasi Senyawa Steroid menggunakan Kromatografi Kolom**

### **4.7.1 Pengisian Adsorben Cara Basah**

Pengisian adsorben cara basah merupakan pengisian adsorben yang biasa digunakan untuk kromatografi kolom. Silika mengandung gugus silanol yang bersifat polar (Noviyanti, 2010). Gugus silanol pada silika dapat membentuk ikatan hidrogen dengan uap H<sub>2</sub>O sehingga sebelum digunakan sebagai adsorben silika sebanyak 10 g diaktivasi terlebih dahulu dengan oven pada suhu 110 °C selama 2 jam untuk menguapkan molekul H<sub>2</sub>O yang berikatan dengan gugus silanol (Kusmiyati, 2011). Karena interaksi antara senyawa dan silika berdasarkan pada kemampuan senyawa membentuk ikatan hidrogen dengan gugus silanol dari silika. Sehingga apabila silika tidak diaktivasi terlebih dahulu dikhawatirkan akan mempengaruhi hasil pemisahan senyawa steroid.

Silika yang telah diaktifasi dicampurkan dengan pelarut hasil KLT terbaik sampai menjadi bubuk dan tidak terbentuk gelembung. Silika yang telah menjadi bubuk dimasukkan dalam kolom dan diketuk-ketuk agar tidak terbentuk gelembung (Kristanti, dkk., 2008). Kolom yang telah berisi adsorben didiamkan selama 24 jam untuk memastikan fasa diam benar-benar telah mampat, karena kerapatan adsorben kolom dapat mempengaruhi pemisahan. Apabila terbentuk gelembung pada fasa diam, dilakukan pengocokan sampai fasa diam benar-benar mampat dan tidak pecah.

Kolom dapat digunakan setelah adsorben benar-benar mampat yang ditandai dengan silika tidak turun lagi meskipun didiamkan kembali. Kran dibuka untuk mengeluarkan sisa pelarut, kemudian sampel dengan konsentrasi 100.000

ppm (0,1 g/mL) dimasukkan ke dalam kolom yang telah diisi adsorben. Pelarut ditambahkan sedikit demi sedikit melalui dinding kolom dan pelarut yang keluar dari kolom mulai ditampung. Laju alir yang digunakan adalah 1mL/menit dan eluat ditampung setiap 2 mL. Penampungan eluat 2 mL dan tidak lebih bertujuan untuk meminimalkan bercampurnya kembali senyawa yang telah terpisah dari kolom. Proses elusi dihentikan setelah warna adsorben memudar. Memudarnya warna adsorben menunjukkan senyawa yang terjerap pada silika telah terelusi oleh fasa gerak. Total volume fasa gerak yang digunakan adalah 300 mL dan diperoleh vial sebanyak 127 vial.

Fraksi yang diperoleh selanjutnya dimonitoring menggunakan KLT analitik untuk pengelompokan fraksi. Hasil monitoring diperoleh 9 kelompok fraksi dengan 5 kelompok fraksi senyawa steroid dan 4 kelompok fraksi senyawa triterpenoid. Data hasil pengelompokan fraksi ditunjukkan pada Tabel 4. 2.

Tabel 4.2 Pengelompokan fraksi hasil isolasi menggunakan kromatografi kolom pengisian adsorben cara basah

fraksi	Rf	Rendemen (%)	Senyawa	Warna
A.1 (10 – 20)	0,575	12,1	Steroid	Hijau
B.1 (22 – 24)	0,537	2,9	Steroid	Hijau
C.1 (25)	0,475	1	Steroid	Biru
D.1 (28)	0,437	1,5	Steroid	Biru
E.1 (30)	0,3	0,7	Steroid	Biru
F.1 (40 – 60)	0,2	3,3	Triterpenoid	Merah
G.1 (62 – 68)	0,218	0,3	Triterpenoid	Merah
H.1 (69)	0,15	0,1	Triterpenoid	Merah
I.1 (70 – 110)	0,125	1,7	Triterpenoid	Merah

#### 4.7.2 Pengisian Adsorben Cara Kering

Adsorben yang digunakan untuk pengisian cara kering adalah silika gel 60 F<sub>254</sub> (0,063 – 0,200 mm) khusus kolom kromatografi kering. Silika sebanyak 10 g

yang telah diaktivasi dan didiamkan sampai dingin dalam desikator dimasukkan dalam kolom sedikit demi sedikit dengan diketuk-ketuk dinding kolom agar silika mampat dan tidak retak. Setelah silika masuk semua dalam kolom, kolom divakumkan untuk memastikan adsorben yang terbentuk benar-benar mampat. Apabila adsorben tidak lagi turun proses isolasi dapat dimulai (Suryani, 2011).

Sampel dengan konsentrasi 200.000 ppm (0,2 g/mL) dimasukkan dalam kolom melalui dinding kolom sampai merata. Kran mulai dibuka dan apabila larutan sampel sudah turun ke adsorben ditambahkan pelarut melalui dinding kolom sedikit demi sedikit. Laju alir yang digunakan adalah 2mL/menit dan eluat ditampung setiap 2 mL. Eluat ditampung setelah kran mulai menetes dan proses isolasi dihentikan setelah warna yang terbentuk pada adsorben memudar. Total volume fasa gerak yang digunakan adalah 350 mL dan menghasilkan 148 vial.

Kromatografi kolom pengisian adsorben cara kering juga dimonitoring menggunakan KLT analitik. Berdasarkan hasil monitoring tiap fraksi dengan KLT analitik diperoleh 5 kelompok fraksi dengan senyawa steroid 2 kelompok dan senyawa triterpenoid 3 kelompok. Hasil pengelompokan fraksi ditunjukkan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Pengelompokan fraksi hasil isolasi menggunakan kromatografi kolom pengisian adsorben cara kering

Fraksi	Rf	Rendemen (%)	Senyawa	Warna
A.2 (10 – 14)	0,385	0,95	Steroid	Hijau
B.2 (40 - 82)	0,112	0,75	Triterpenoid	Merah
C.2 (86 – 108)	0,038	0,65	Triterpenoid	Merah
D.2 (110 – 120)	0,688	0,5	Steroid	Biru
E.2 (122 – 148)	0,025	1,2	Triterpenoid	Merah

Berdasarkan hasil yang diperoleh, isolasi senyawa steroid menggunakan kromatografi kolom pengisian adsorben cara basah menghasilkan kelompok fraksi yang lebih banyak dibandingkan pengisian adsorben cara kering. Hal tersebut

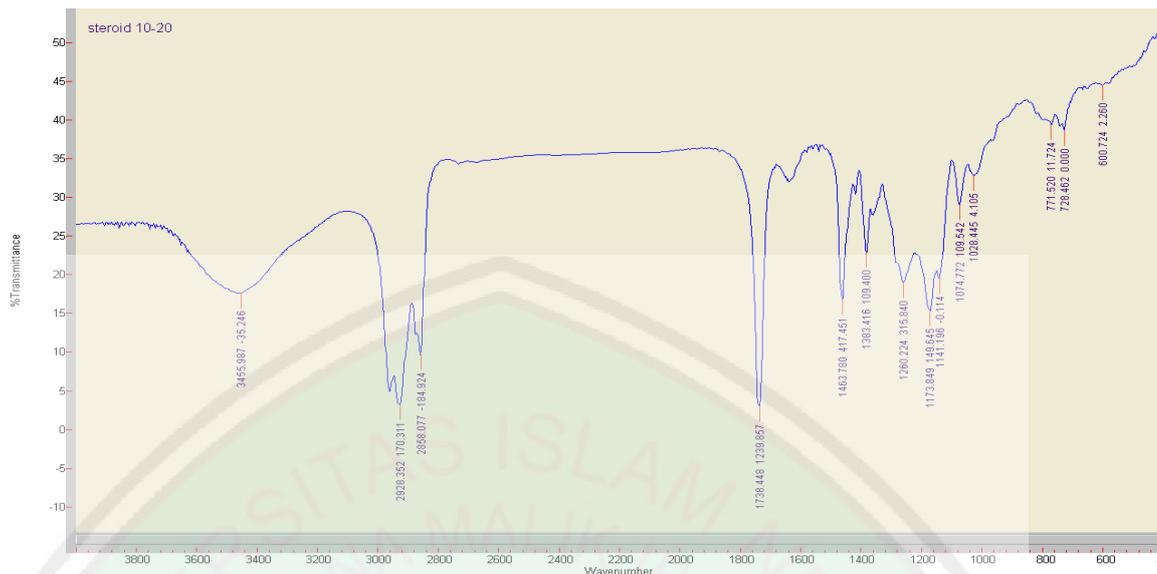
dimungkinkan karena isolasi yang dilakukan pada kolom basah lebih mendekati kondisi optimum untuk isolasi senyawa steroid.

Isolasi senyawa steroid dapat dipengaruhi oleh laju alir dari kolom. Laju alir yang optimum akan menghasilkan pemisahan yang maksimal. Laju alir suatu kolom dapat dipengaruhi oleh kerapatan adsorben kolom. Kerapatan adsorben kolom basah lebih besar dibandingkan kerapatan adsorben pada kolom kering, sehingga laju alir pada kolom basah lebih lambat dibandingkan laju alir kolom kering.

Kontak antara senyawa dengan adsorben akan menyebabkan interaksi dengan membentuk ikatan hidrogen antara gugus silanol dengan senyawa yang mempunyai gugus OH. Semakin kuat ikatan hidrogen suatu senyawa, maka semakin kuat senyawa akan tertahan oleh silika. Semakin lama suatu senyawa tertahan oleh silika maka akan semakin lama senyawa keluar dari kolom (Noviyanti, 2010).

#### **4.8 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektroskopi FT-IR**

Kelompok fraksi yang menunjukkan warna hijau/biru pada pereaksi *Lieberman Burchard* menunjukkan senyawa steroid. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan Spektroskopi Inframerah. Identifikasi dilakukan pada hasil isolasi terbaik dengan 5 fraksi menggunakan kromatografi kolom pengisian cara basah.

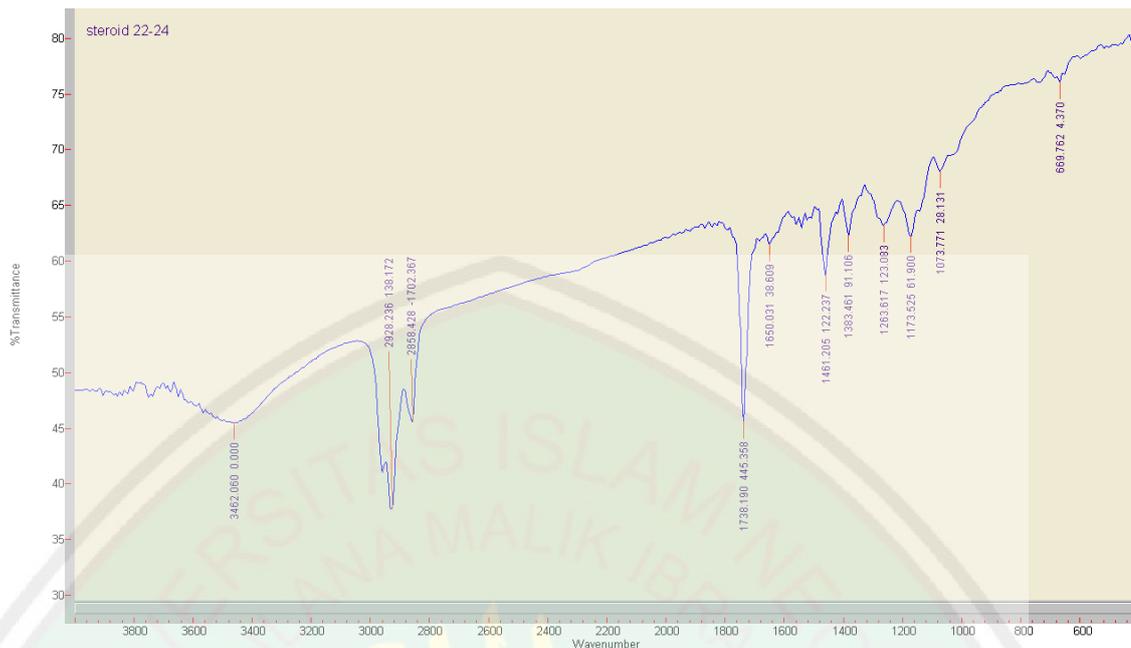


Gambar 4.5 Spektra hasil Identifikasi FT-IR fraksi A.1 (10 – 20)

Tabel 4.4 Interpretasi spektra FT-IR fraksi A.1 (10 – 20)

No	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Range Pustaka (cm <sup>-1</sup> ) (Socrates, 1994)	Jenis Vibrasi	Intensitas (Socrates, 1994)
1.	3455,987	3550 – 3250	OH (strech)	m – s
2.	2928,352	3000 – 2800	C sp <sub>3</sub> -H (strech)	m – s
3.	2858,077	2870 – 2840	-CH <sub>2</sub> - (sym)	M
4.	1738,448	1780 – 1730	C=O	M
5.	1650,685	1690 – 1620	Rentangan C=C	M
6.	1463,780	1600 – 1450	C-C strech	W
7.	1383,416	1395 – 1365	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (strech)	M
8.	1260,224	1300 – 1200	Secondary alcohol	w
9.	1173,849	110 – 1300	C-O-C	S
10.	1074,772	1125 – 1085	Siklik tert alkohol	s – w
11.	1028,445	1125 – 1000	C-OH Secondary Alcohol	S
12.	771,520 dan 728,462	995 – 650	=C-H siklik (broad)	W

Keterangan : s = strong, m = medium, w = weak

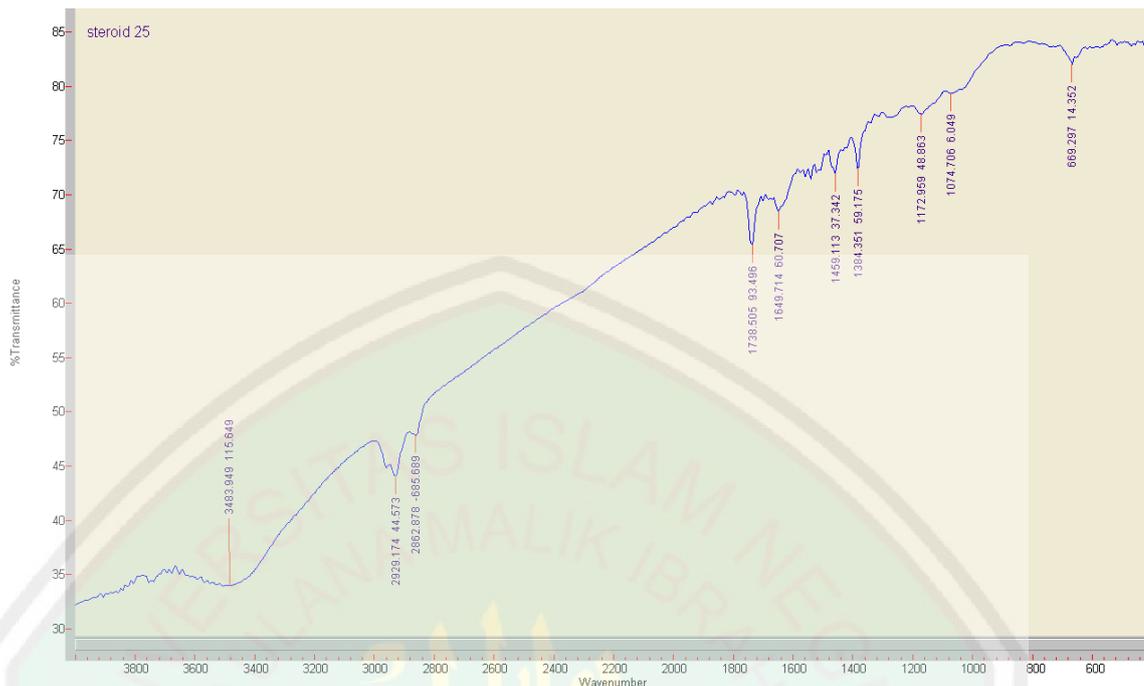


Gambar 4.6 Spektra hasil Identifikasi FT-IR fraksi B.1 (22 – 24)

Tabel 4.5 Interpretasi spektra FT-IR fraksi B.1 (22 – 24)

No	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Range Pustaka (cm <sup>-1</sup> ) (Socrates, 1994)	Jenis Vibrasi	Intensitas (Socrates, 1994)
1.	3482,060	3550 – 3250	OH (strech)	m – s
2.	2928,236	3000 – 2800	C sp <sub>3</sub> -H (strech)	m – s
3.	2858,428	2870 – 2840	-CH <sub>2</sub> - (sym)	M
4.	1738,190	1780 – 1730	C=O	M
5.	1650,031	1690 – 1620	Rentangan C=C	M
6.	1461,205	1600 – 1450	C-C strech	W
7.	1383,461	1395 – 1365	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (strech)	M
8.	1263,517	1300 – 1200	Secondary alcohol	w
9.	1173,525	110 – 1300	C-O-C	S
10.	1073,771	1125 – 1000	C-OH secondary alcohol	S
11.	669,762	995 – 650	=C-H siklik (broad)	W

Keterangan : s = strong, m = medium, w = weak

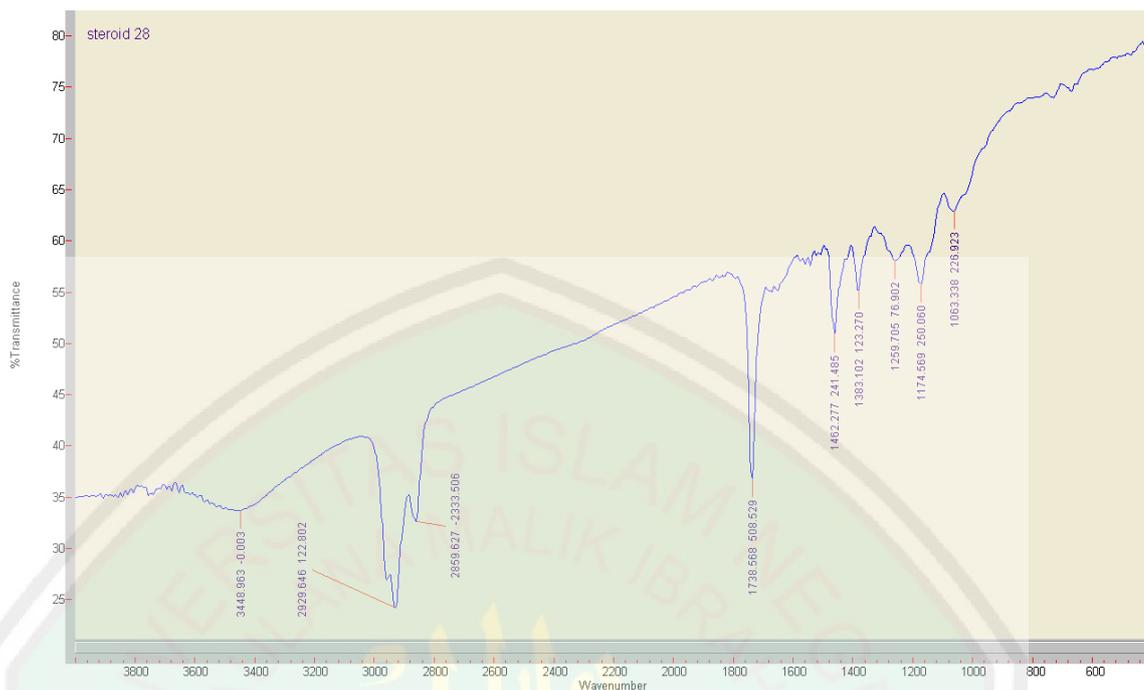


Gambar 4.7 Spektra hasil Identifikasi FT-IR fraksi C.1 (25)

Tabel 4.6 Interpretasi spektra FT-IR fraksi C.1 (25)

No	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Range Pustaka (cm <sup>-1</sup> ) (Socrates, 1994)	Jenis Vibrasi	Intensitas (Socrates, 1994)
1.	3483,949	3550 – 3250	OH (strech)	m – s
2.	2929,174	3000 – 2800	C sp <sub>3</sub> -H (strech)	m – s
3.	2852,878	2870 – 2840	-CH <sub>2</sub> - (sym)	M
4.	1738,505	1780 – 1730	C=O	M
5.	1649,714	1690 – 1620	Rentangan C=C	M
6.	1459,113	1600 – 1450	C-C strech	W
7.	1384,351	1395 – 1365	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (strech)	M
8.	1172,959	110 – 1300	C-O-C	S
9.	1074,705	1125 – 1000	C-OH	S
10.	659,297	995 – 650	Secondary Alcohol =C-H siklik (broad)	S

Keterangan : s = strong, m = medium, w = weak

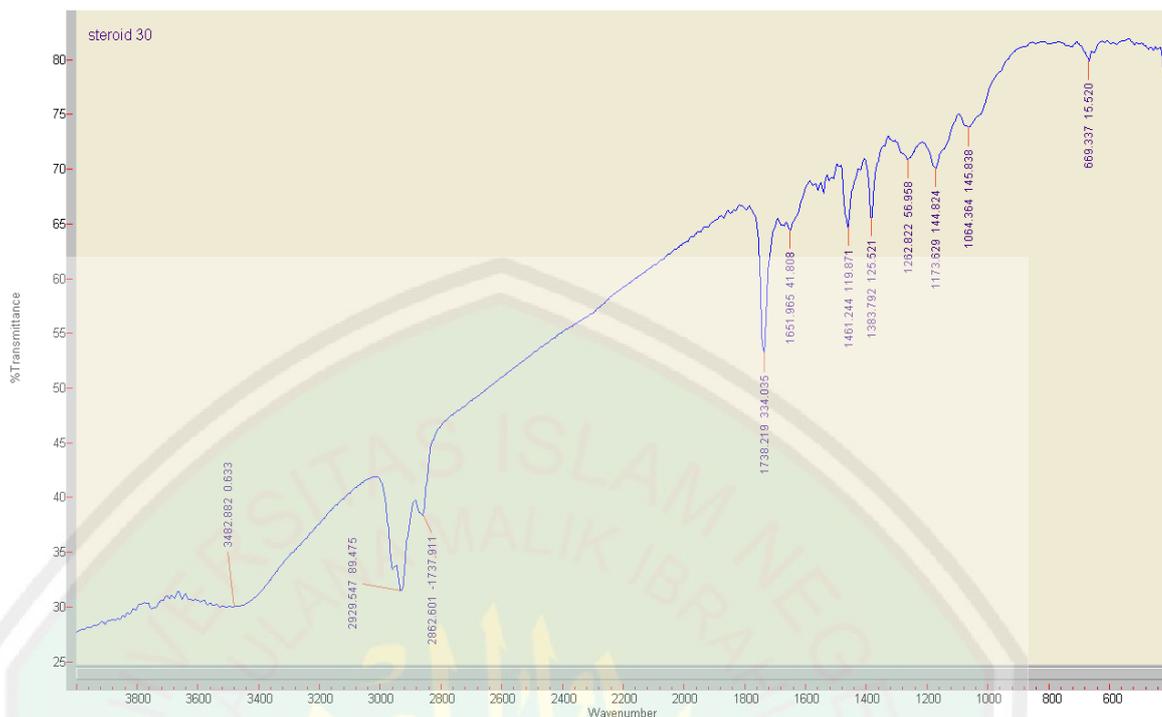


Gambar 4.8 Spektra hasil Identifikasi FT-IR fraksi D.1 (28)

Tabel 4.7 Interpretasi spektra FT-IR fraksi D.1 (28)

No	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Range Pustaka (cm <sup>-1</sup> ) (Socrates, 1994)	Jenis Vibrasi	Intensitas (Socrates, 1994)
1.	3448,963	3550 – 3250	OH (strech)	m – s
2.	2929,645	3000 – 2800	C sp <sub>3</sub> -H (strech)	m – s
3.	2859,627	2870 – 2840	-CH <sub>2</sub> - (sym)	M
4.	1738,568	1780 – 1730	C=O	M
5.	1462, 227	1600 – 1450	C-C strech	W
6.	1383,102	1395 – 1365	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (strech)	M
7.	1259,569	1300 – 1200	Secondary alcohol	w
8.	1174,669	110 – 1300	C-O-C	S
9.	1063,338	1125 – 1000	C-O alkohol sekunder	s – w

Keterangan : s = *strong*, m = *medium*, w = *weak*



Gambar 4.9 Spektra hasil Identifikasi FT-IR fraksi E.1 (30)

Tabel 4.8 Interpretasi spektra FT-IR fraksi E.1 (30)

No	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Range Pustaka (cm <sup>-1</sup> ) (Socrates, 1994)	Jenis Vibrasi	Intensitas (Socrates, 1994)
1.	3482,882	3550 – 3250	OH (strech)	m – s
2.	2929,547	3000 – 2800	C sp <sub>3</sub> -H (strech)	m – s
3.	2862,601	2870 – 2840	-CH <sub>2</sub> - (sym)	M
4.	1738,219	1780 – 1730	C=O	M
5.	1651,965	1690 – 1620	Rentangan C=C	M
6.	1461,244	1600 – 1450	C–C strech	W
7.	1383,792	1395 – 1365	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (strech)	M
8.	1262,822	1300 – 1200	Secondary alcohol	w
9.	1173,629	110 – 1300	C–O–C	S
10.	1064,364	1125 – 1000	C–O alkohol sekunder	s – w
11.	669,337	995 – 650	=C–H siklik (broad)	W

Keterangan : s = *strong*, m = *medium*, w = *weak*

Berdasarkan hasil identifikasi dengan FT-IR, serapan-serapan dari gugus fungsi yang dihasilkan adalah OH (strech) yang didukung serapan gugus fungsi

OH sekunder dan OH tersier. Serapan  $C_{sp^3-H}$  yang didukung dengan serapan C-C dan serapan  $CH_2$  simetri, serapan C=C yang didukung dengan serapan =C-H serta serapan C=O yang didukung adanya serapan C-O-C. Pita serapan yang khas untuk golongan steroid juga muncul pada semua spektra yakni serapan untuk C-C dan  $C(CH_3)_2$  yang disebut dengan serapan gugus gem dimetil (Astuti, dkk., 2014). Perbandingan serapan bilangan gelombang setiap fraksi ditunjukkan pada tabel 4.9.

Tabel 4.9 Perbandingan serapan bilangan gelombang fraksi A.1, B.1, C.1, D.1 dan E.1

No	Serapan fraksi A.1	Serapan fraksi B.1	Serapan fraksi C.1	Serapan fraksi D.1	Serapan fraksi E.1	Jenis vibrasi
1	3455,987	3482,060	3483,949	3448,963	3482,882	OH (stretch)
2	2928,352	2928,236	2929,174	2929,645	2929,547	$C_{sp^3-H}$ (stretch)
3	2858,077	2858,428	2852,878	2859,627	2862,601	- $CH_2$ - (sym)
4	1738,448	1738,190	1738,505	1738,568	1738,219	C=O
5	1650,685	1650,031	1649,714	-	1651,965	Rentangan C=C
6	1463,780	1461,205	1459,113	1462, 227	1461,244	C – C stretch
7	1383,416	1383,461	1384,351	1383,102	1383,792	- $C(CH_3)_2$ (stretch)
8	1260,224	1263,517	-	1259,569	1262,822	Secondary alcohol
9	1173,849	1173,525	1172,959	1174,669	1173,629	C – O – C
10	1074,772	1073,771	1074,705	1063,338	-	Siklik tert alkohol C – OH
11	1028,445	-	-	-	1064,364	Secondary Alcohol
12	771,520 dan 728,462	669,762	659,297	-	669,337	=C – H siklik (broad)

Berdasarkan perbandingan serapan tiap fraksi dapat diketahui bahwa senyawa steroid yang dipisahkan menghasilkan serapan yang berbeda-beda. Perbedaan

serapan disebabkan karena adanya perbedaan senyawa. Fraksi A.1, B.1 dan D.1 diduga mengandung senyawa steroid yang memiliki C=C, C=O, OH sekunder, OH tersier, dan gem dimetil. Sedangkan kelompok fraksi C.1 dan E.1 diduga senyawa steroid yang memiliki C=O, OH sekunder, OH tersier, dan gem dimetil.

#### 4.10 Pemanfaatan Senyawa Steroid dalam Prospektif Islam

Alga merah *Eucheuma spinosum* mengandung 5 kelompok fraksi senyawa steroid yang berhasil dipisahkan. Senyawa steroid merupakan metabolit sekunder yang sebagian besar tersusun atas 17 atom karbon (Kristanti, dkk., 2008). Bhakuni dan Rawat (2005) menyebutkan bahwa kandungan senyawa steroid yang paling dominan pada alga merah adalah kolesterol.

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُن لَّهُ شَرِيكٌ فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا

“Yang kepunyaan-Nya-lah kerajaan langit dan bumi, dan Dia tidak mempunyai anak, dan tidak ada sekutu baginya dalam kekuasaan(Nya), dan Dia telah menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya” (Qs. al Furqaan (25): 2)

“Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya”

yakni menetapkan segala sesuatu dari apa yang diciptakanNya sesuai dengan hikmah yang diinginkanNya (Qurtubi, 2009). Senyawa steroid yang terdapat pada Alga merah *Eucheuma spinosum* sebesar 12,1% (b/b). Kandungan tersebut tidak seperti kandungan dari metabolit primer yang mempunyai kandungan dominan pada tanaman. Karena metabolit primer merupakan kebutuhan pokok dari setiap tanaman. Metabolit sekunder seperti steroid digunakan sebagai pertahanan dari tumbuhan untuk melindungi tubuhnya dari gangguan luar. Karena fungsinya yang

digunakan saat dibutuhkan sehingga Allah SWT menciptakannya dengan komposisi yang yang kecil. Pernyataan tersebut menyatakan bahwasannya Allah SWT menciptakan segala sesuatu sesuai ukuran. Senyawa-senyawa tersebut diciptakan oleh Allah SWT dan tidak mungkin Allah SWT menciptakan segala sesuatu tanpa ada tujuannya.

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَطْلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا ۖ فَوَيْلٌ  
لِّلَّذِينَ كَفَرُوا مِنَ النَّارِ ﴿٢٧﴾

“Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya tanpa hikmah. yang demikian itu adalah anggapan orang-orang kafir, Maka celakalah orang-orang kafir itu karena mereka akan masuk neraka”(Qs. Shaad (38): 27)

Firman Allah SWT *وما بينهما بطلا* “Dan apa yang ada di antara keduanya tanpa hikmah,” yakni tidaklah sia-sia atau hanya senda gurau belaka. Allah SWT menciptakan semua itu untuk menjadi bukti atas kekuasaanNya (*Qudratullah*) (Qurthubi, 2009). Senyawa steroid yang berasal dari alga merah merupakan bagian dari ciptaan Allah SWT yang berada di antara langit dan bumi. Allah SWT menciptakannya agar dapat diambil hikmah oleh makhluk hidup.

Hikmah yang dapat diambil dari senyawa steroid adalah pemanfaatannya dalam berbagai uji aktivitas. Senyawa steroid dapat digunakan sebagai penghambat kanker prostat (Zhang dkk., 2012), sebagai toksisitas (Diastuti dan Winarsih, 2010), dan sebagai antibakteri (Contini dkk., 2013). Pemanfaatan senyawa steroid tersebut merupakan bukti kekuasaan Allah SWT.

## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolasi senyawa steroid dari fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah *Eucheuma spinosum* menggunakan kromatografi kolom pengisian adsorben cara basah menghasilkan 5 kelompok fraksi steroid sedangkan pada pengisian adsorben cara kering menghasilkan 2 kelompok fraksi steroid.
2. Identifikasi menggunakan FT-IR menunjukkan bahwa kelompok fraksi A.1, B.1 dan D.1 diduga mengandung senyawa steroid yang memiliki C=C, C=O, OH sekunder, OH tersier, C-O-C, dan gem dimetil. Sedangkan kelompok fraksi C.1 dan E.1 diduga mengandung senyawa steroid yang memiliki C=O, OH sekunder, OH tersier, C-O-C, dan gem dimetil.

#### **5.2 Saran**

Penelitian selanjutnya diharapkan:

1. Kondisi variabel bebas harus sama, antara lain: laju alir, Jumlah sampel, volume fasa gerak, tinggi adsorben, diameter kolom, dan Jumlah glasswool.
2. Optimalisasi isolasi senyawa steroid menggunakan kromatografi kolom dengan variasi diameter kolom, variasi perbandingan sampel dan adsorben, variasi tinggi adsorben, serta variasi laju alir.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adhiatama, I., Zainudin, M., Rokhati, N.. 2012. Hidrolisis Kitosan menggunakan Katalis Asam Klorida. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. 1 (1): 245 – 251
- Afif, S., Fasya, A. G., Barizi, A., Rachmawati, A., 2013. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp lethality Test*) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Alga Merah *Eucheuma cottoni* dari Perairan Sumenep Madura. *Skripsi* tidak diterbitkan. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Alam, A. A. 2011. Kualitas Karaginan Rumput Laut Jenis *Eucheuma spinosum* di Perairan Desa Punaga Kabupaten Takalar. *Skripsi* diterbitkan. Universitas Hasanuddin Semarang
- Anam, K. Fasya, A.G., Abtokhi, A., Amalia, S.. 2015. Isolasi Senyawa Triterpena dari Alga Merah (*Euchema cottoni*) menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Analisisnya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Mulana Malik Ibrahim Malang
- Anggadiredja, J., Irawati, S., dan Kusmiyati. 2006. *Rumput Laut*. Jakarta: Penerbit Swadaya
- Astuti, M.D., Maulana, A., dan Kuntowati, E.M. 2014. Isolasi Steroid dari Fraksi N-Heksana Batang Bajakah Tampala (*Spatholobus littoralis Hassk.*). *Prosiding Seminar Nasional Kimia*. Surabaya: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya. ISBN : 978-602-0951-00-3
- Auterhoof, H., dan Kovar, K. A.. 1987. *Identifikasi Obat*. Bandung: ITB
- AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. Inc.* Washington DC. Association of Analytical Chemist.
- Aslan, M. L. 1998. *Budidaya Rumput laut*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Atun, S.. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Konversi Cagar Budaya Borobudur*. 8 (2)
- Bengen, D.G. 2001. *Sinopsis Ekosistem dan Sumberdaya Pesisir dan Laut*. Bogor: Pusat Kajian Sumberdaya Pesisir dan Lautan Institut Pertanian Bogor
- Bogoriani, N. W.. 2008. Isolasi dan Identifikasi Glikosida Steroid dari Daun Andong. *Jurnal Kimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana*. 2 (1)
- Burke, R. W., Diamondstone, B. I., Velapoldi, R. A., dan Menis, O.. 1974. Mechanisms of the Libermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol. *Jurnal Clical Chemistry*. 20 (7)
- Contini, S. H., Salvador, M. J., Watanabe, E., Ito, I. Y., Oliveira, D. C.. 2003. Antimicrobial Activity of Flavonoids and Steroids Isolated from Two

- Chromolaena* species. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 39 (4)
- Diastuti dan Winarsih. 2010. Identifikasi Senyawa Antikanker dari Ekstrak Kloroform Kulit Batang *Rhizopora mucronata*. *Majalah Farmasi Indonesia* 21 (4): 266 – 271
- Diharmi, A., Dedi, F., Nuri, A., Dan Endang, S. H.. 2011. Karakteristik Komposisi Kimia Rumput Laut Merah *Eucheuma spinosum* yang Di Budidayakan dari Perairan Nusa Penida, Takalar, dan Sumenep. *Jurnal Berkala Perikanan Terburuk*. 39 (2). ISSN 0126-4265
- Fessenden dan Fessenden. 1986. *Kimia Organik*. Jakarta: Erlangga
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A.. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Gritter, R. J. 1991. *Pengantar Kromatografi Edisi Kedua*. Terjemahan Kokasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB
- Groggins. P. H., 1958. *Unit Process In Organic Synthesis*. New York: Mc Graw Hill Book Company
- Gunawan, I. W. G., IG. A. Gede Bawa dan N. L. Sutrisnayanti. 2008. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Triterpenoid yang Aktif Antibakteri pada Herba Meniran (Phyllanthus niruri Linn)*. Bali: Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana, Bukit Jimbaran
- Habibah, H. Adi, T.K., Fauziyah, B., Fitriyaningsih, A.A.. 2012. Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Alga Merah *Eucheuma Spinosum* Pantai Lobuk Madura terhadap Larva Udang *Artemia Salina Leach*. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim
- Hanapi, A. A., Fasya, G., Mardiyah, U., Miftahurrahmah. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Antibakteri Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheum spinosum* dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *Jurnal Alchemy*. 2 (2): 126 – 137
- Hardwood, L. M., Moody, C. J., Percy, J. M.. 1999. Dry Flash Column Chromatography. *Blakwell Science*
- Idler, D. R., Saito, A., Wiseman.. 1968. Sterols in Red Algae (Rhodophyceae). *Fisheries Research Board of Canada*
- Ismarti. 2011. Isolasi Triterpenoid dan Uji Antioksidan dari Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Meranti Merah (*Sshorea singkawang* (Miq). Miq). *Artikel Pascasarjana Universitas Andalas*
- Jazairi, S. A. B. J.. 2008. *Tafsir al-Qur'an Al-Aisar*. Jakarta: Darussunnah

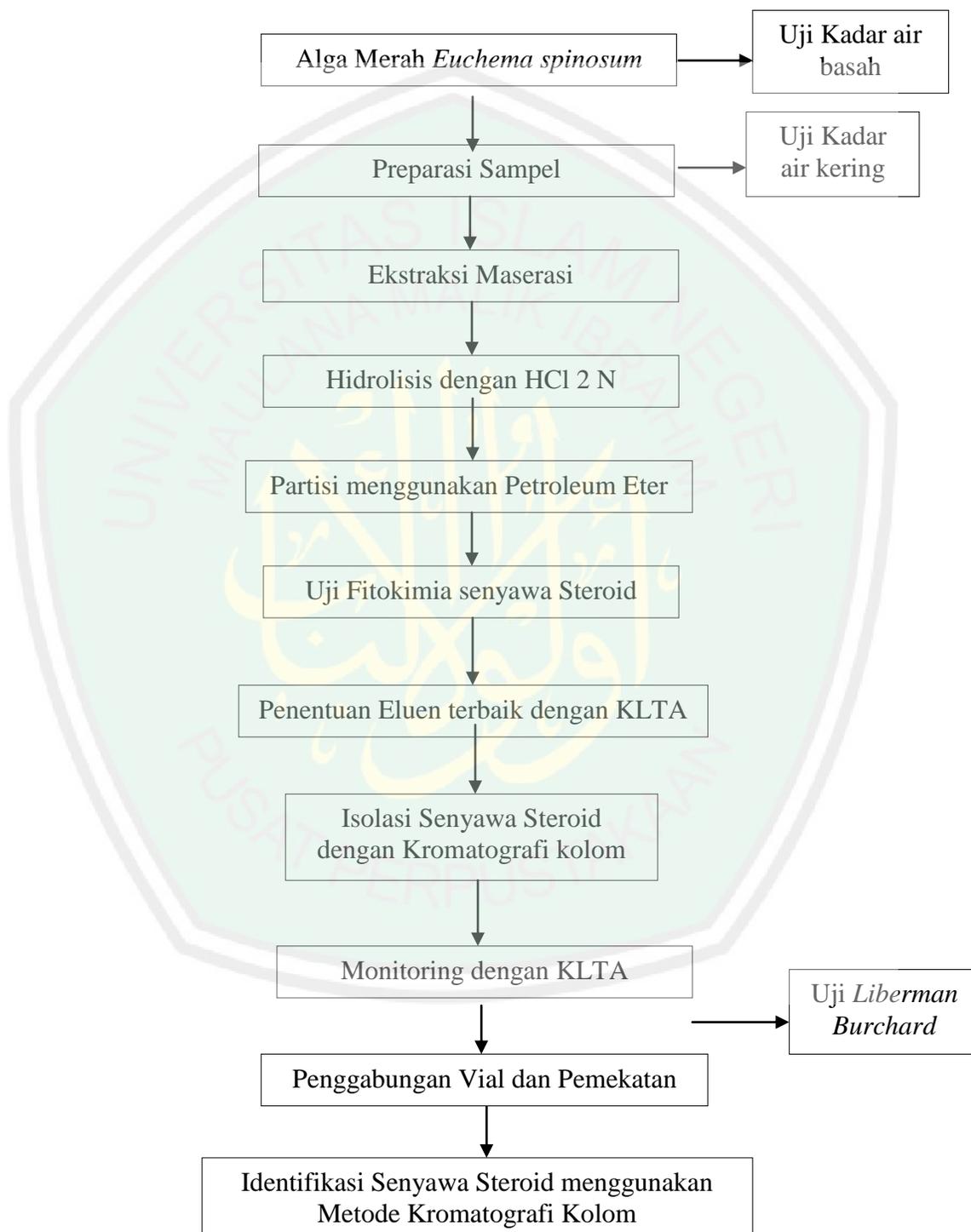
- Kanzawa, A. Yoshioka, M. Teshima, S.. 1972. Sterols in Some Red Algae. *Mem. Fac. Fish Kagoshima University*. 21(1): 103 – 107
- Kholidiyah, M. Fasya, A.G., Nashichuddin, A., Rachmawati, A.. 2010. Uji Toksisitas Ekstrak Rumput Laut Jenis *Euchema spinosum* Perairan Madura Terhadap Larva Udang (*Artemia salina*) Menggunakan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim
- Kristanti, A. N., Nanik, S. A., Mulyadi, T., Bambang, K.. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Universitas Airlangga
- Kusmiyati, Nurfina, A. Sri, H.. 2011. Isolasi dan Identifikasi Zat Aktif Ekstrak Metanol Rimpang Kunyit Putih Fraksi Etil Asetat. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian* 1 (2)
- Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoida, Fenil Flavonoida, dan Alkaloida. *Karya Ilmiah*. Medan: Universitas Sumatera Utara
- Lisdawati. V. 2002. *Uji Farmakologi pada Buah Mahkota Dewa*. Fakultas Kedokteran. Yogyakarta: UGM
- Mardiyah, U., Fasya, A.G., Fauziyah, B., Amalia, S.. 2012. Ekstraksi, Uji Aktivitas Antioksidan terhadap *1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil* (DPPH) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma Spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim
- Markham, K.R. 1998. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: Penerbit ITB
- Meyer, B. N, Ferrigni, N. R, Putnam, J. E, Jacobsen, L. B, Nichols, D. E, McLaughlin, J. L. 2009. A Comparative Study On Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of Root of *Alstonia Scholaris* With The Roots, Leaves and Stea, Bark. *Phytochem. Pharmacol.* 1 (2): 77-82
- Miftahurrahmah. 2012. Ekstraksi, Uji aktivitas Antibakteri dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Pesisir Laut Banyuwangi. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim
- Mulyani, M., Bustanul, A., Hazli, N.. 2013. Uji Antioksidan dan Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Daun Srikaya (*Annona Squamosa L*). *Jurnal Kimia Unand.* 2 (1) ISSN No. 2303-3401
- Mulyono. 2006. *Kamus Kimia*. Jakarta: Bumi Aksara
- Nihlati, I., Abdul, R., Triana, H. 2008. Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata (roxb) Schlecth*) dengan Metode Penangkapan Radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). *Skripsi* diterbitkan. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada

- Ningsih, E. M., Fasya, A. G., Adi, T. K., Hanapi, A., 2015. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid pada Fraksi n-heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma spinosum*. *Skripsi* tidak diterbitkan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Nurmillah, O. Y. 2009. Kajian Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Ekstrak Biji, Kulit buah, Batang dan Daun Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.). *Skripsi diterbitkan*. Bogor : Fakultas Teknologi Pertanian IPB
- Panji, Tri. 2012. *Teknik Spektroskopi untuk Elusidasi Struktur Molekul*. Yogyakarta: Graha Ilmu
- Pedersen dan Rosenbohm. 2011. Dry Column Vacuum Chromatography. *Synthesis* (16)
- Qurthubi, S. I.. 2009. *Tafsir al-Qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azzam
- Resy, R. 2009. *Efek Rumput Laut Eucheuma sp. Terhadap Kadar Glukosa Darah dan Jumlah Monosit pada Tikus Wistar yang diikduksi Aloksan*. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro
- Saleh. C.. 2007. Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Steroid dari Akar Tumbuhan Cendana (*Santalum album* Linn). *Disertasi* diterbitkan. Sumatera: Program Doktor Ilmu Kimia Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara
- Sapar, A., Kumanireng, A., Voogd, N.de., Noor, A.. 2004. Isolasi dan Penentuan Struktur Metabolit Sekunder Aaktif dari Spons *Biemna triraphis* Asal Pulau Kapodasang (Kepulauan Spermonde). *Marina Chimica Acta*. 5 (1) ISSN 1411-2132
- Setiyawan, M. I., Ningsih, R., Syarifah, U., Adi, T. K., 2015. Isolasi Senyawa Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol dan Identifikasi menggunakan FT-IR. *Skripsi* tidak diterbitkan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Shihab, Q.M.. 2002. *Tafsir Al-Mishbah*. Jakarta: Lentera Hati
- Siregar, A. F., Agus, S., Delianis, P.. 2012. Potensi Antibakteri Ekstrak Rumput Laut terhadap Bakteri Penyakit Kulit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus Epidermidis*, dan *Micrococcus luteus*. *Jurnal Of Marine Research*. 1 (2): 152 – 160
- Socrates, G. 1994. *Infrared Characteristic Group Frequencies Tables and Charts Second edition*. UK. The University of West London
- Sukandana, I. M.. 2011. Kandungan Senyawa Steroid-Alkaloid pada Ekstrak n-Heksana Daun Beringin (*Ficus benjamina* L). *Jurnal Kimia FMIPA Universitas Udayana*. 5 (2)
- Sulastry, T., dan Kurniawati, N.. 2010. Isolasi Steroid dari Ekstrak Metanol Daun Bluntas (*Plucea Indica* L). *Jurnal Chemica*. 11. (1): 52-56

- Suryani, E.. 2011. Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Triterpenoid dari Ekstrak Etil Asetat Kulit Batang Tumbuhan Kecapi (*sandoricum koetjape* Merr). *Artikel*. Padang: Program Studi Kimia Pascasarjana Universitas Andalas
- Suryati. 2011. Elusidasi Struktur Steroid dari Daun Tabarito (*Ficus Deltoideus* Jack). *Jurnal Poli Rekayasa*. 6 (2)
- Tensiska, dkk.. 2007. *Pengaruh Jenis Pelarut terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Isoflavon dari Ampas Tebu Hasil Penelitian Dosen Jurusan Teknologi Industri Pangan*. Bandung: Universitas Padjajaran
- Tukiran, Hamdani. B. E., Mahyudi, R., Syarief, S. H., dan Hidayati, N.. Beberapa Senyawa Hasil Isolasi dari Kulit Batang Tumbuhan Kedoya (*Dysoxylum gaudichaudianum* (A. Juss.) Miq.) (Meliaceae). *Jurnal Ilmu Dasar*. 10 (2): 236 – 244
- Utama, W. A, Mai. E, Adlis, S. 2013. Isolasi Senyawa Triterpenoid dari Fraksi Aktif Kulit Batang Kecapi (*Sandoricum Koetjape* Merr) dan Uji Bioaktivitas “Brineshrimps Lethality Bioassay”. *Jurnal Kimia Unand*. 2 (1). ISSN No. 2303-3401
- Wahyudi, J., Wibowo, W. A., Rais, Y. A., Kusumawardani, A.. 2011. Pengaruh Suhu terhadap Kadar Glukosa Terbentuk dan Konstanta Kecepatan Reaksi pada Hidrolisis Kulit Pisang. *Jurnal Pengembangan Teknologi Kimia untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia*. ISSN 1693 – 4393
- Zhang, J. L, dkk., 2012. Steroids with Inhibitory activity diversity of marine alga *Tydemania expeditions*. *Fitoterapia* 83: 973 – 978

Lampiran 1

KERANGKA BERFIKIR



## Lampiran 2

### DIAGRAM ALIR

#### 1. Preparasi Sampel

Alga Merah

seluruh bagian tanaman sebanyak 10 Kg

- dicuci sampai bersih
- dipotong kecil-kecil
- dikeringkan dengan diangin-anginkan
- dikeringkan dengan oven pada suhu 38°C selama 24 jam
- dihaluskan menggunakan mesin penghalus (blender) sampai terbentuk serbuk
- diayak dengan ukuran  $\geq 90$  mesh

Hasil

#### 2. Analisis Kadar Air

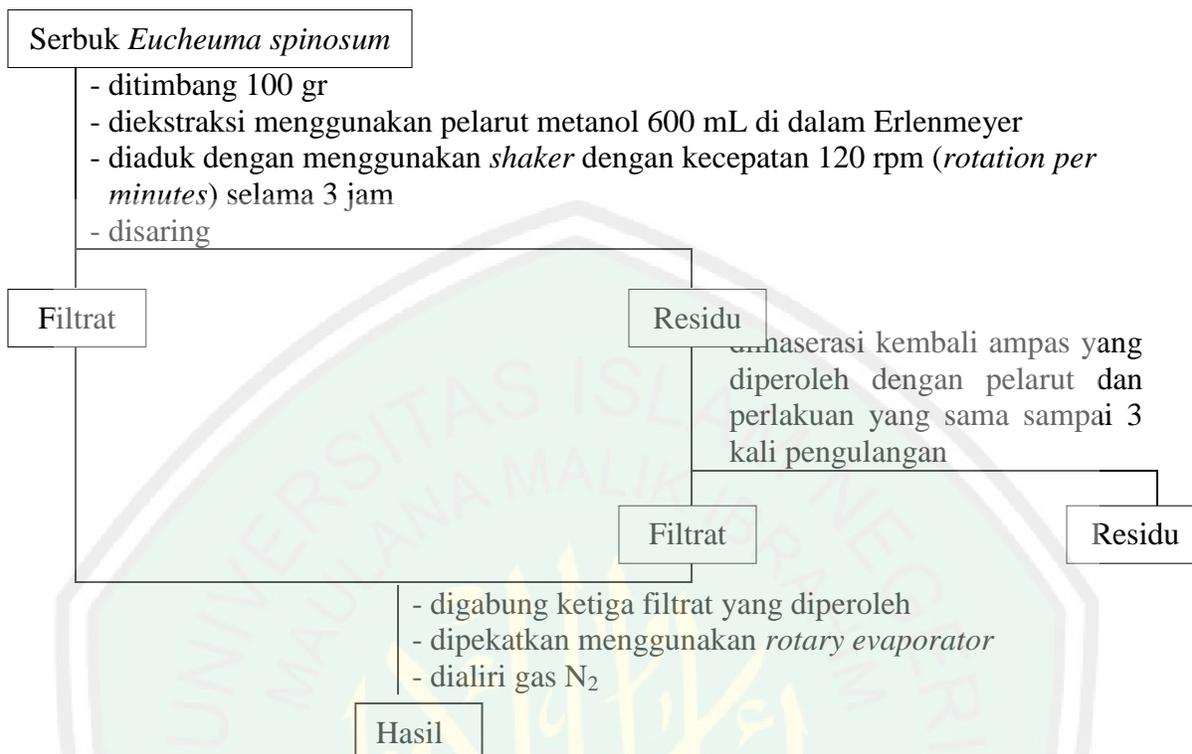
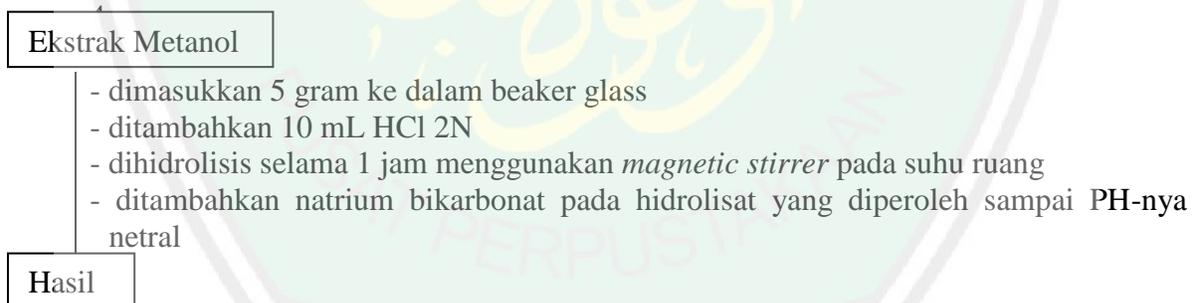
Alga merah

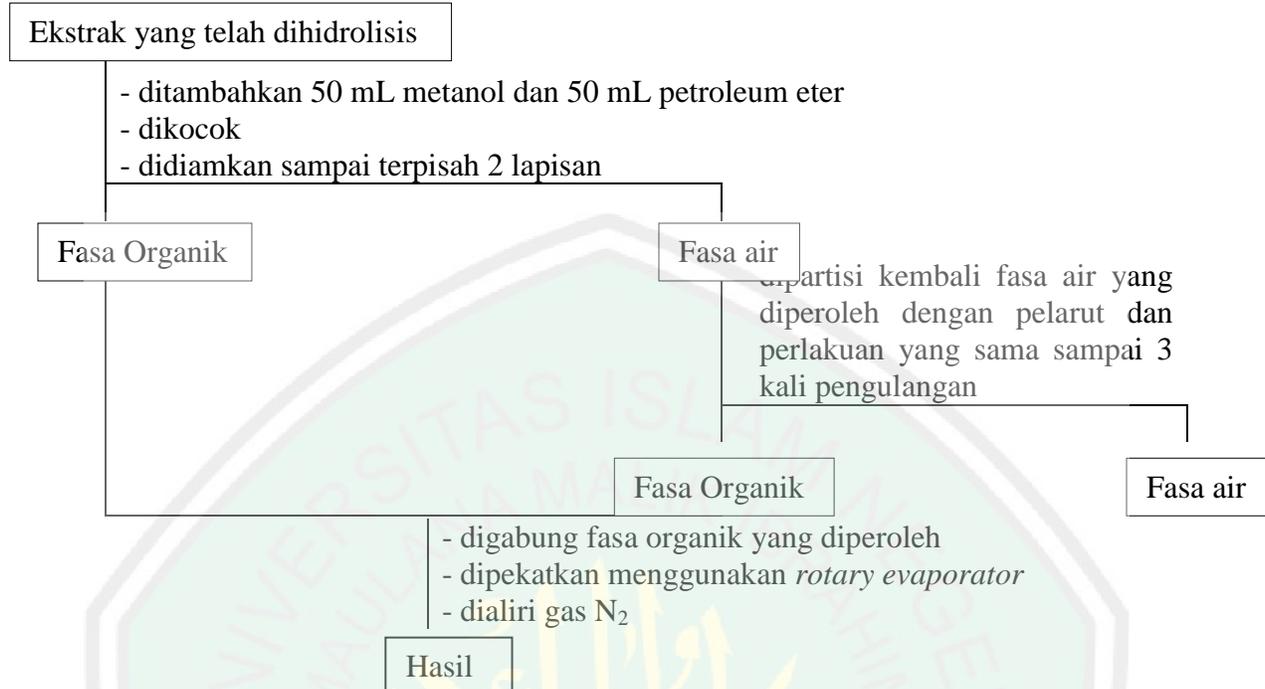
dan cawan dalam oven pada suhu 100-150°C selama 15 menit

- disimpan cawan dalam desikator selama 10 menit
- ditimbang cawan dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan
- dimasukkan 5 Kg serbuk alga merah ke dalam cawan yang telah diketahui berat konstannya
- dikeringkan dalam oven pada suhu 100-105°C selama 15 menit
- disimpan sampel dalam desikator selama 10 menit dan ditimbang
- diulangi perlakuan muai dari dikeringkan dalam oven pada suhu 100-105°C selama 15 menit sampai diperoleh berat konstan
- dihitung kadar air dalam tubuh alga merah

Hasil

## Ekstraksi sampel

3. Hidrolisis dan Ekstraksi cair-cair (Partisi) Ekstrak pekat metanol pada fraksi *petroleum eter* (P.E)



##### 5. Pemisahan dengan metode Kromatografi Kolom

Ekstrak pekat fraksi *petroleum eter*

- disiapkan fasa diam kolom silika gel G-60 (0,063-0,200 mm)
- dimasukkan sampel (perbandingan sampel : eluen adalah 1:50)
- dimasukkan eluen campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 4,25:0,75
- ditampung eluat setiap 2 mL pada botol vial dan dilakukan pengelompokan setiap 5 fraksi
- dihentikan proses elusi setelah semua senyawa steroid diperkirakan telah keluar dari kolom

Hasil

### 5.1 Kolom Pengisian Cara Basah

Silika Gel G-60 (0,063-0,200 mm) dimasukkan ke dalam kolom menggunakan corong dan dilakukan secara perlahan-lahan. Setelah terbentuk lapisan adsorben setebal 2 cm, dibuka kran bagian bawah kolom. Setelah terbentuk lapisan adsorben setebal 2 cm, dibiarkan kolom beberapa saat agar cairan yang berada di atas adsorben menjadi jernih (setelah adsorben masuk semua dalam kolom).

Hasil

### 5.2 Kolom Pengisian Cara Kering

Silika Gel G-60 (0,063-0,200 mm) dimasukkan ke dalam kolom menggunakan corong dan dilakukan secara perlahan-lahan. Setelah terbentuk lapisan adsorben setebal 2 cm, dibuka kran bagian bawah kolom. Setelah terbentuk lapisan adsorben setebal 2 cm, dibiarkan kolom beberapa saat sampai cairan yang berada di atas adsorben menjadi jernih.

Hasil

## 6. Monitoring dengan KLTA

### Fraksi hasil isolasi

- disiapkan eluen campuran n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 4,25:0,75 dalam bejana pengembang
- dijenuhkan selama 1 jam
- dioven plat KLT pada suhu 100°C selama 30 menit
- ditotolkan masing-masing kelompok fraksi
- dimasukkan dalam bejana pengembang berisi eluen yang telah dijenuhkan
- diamati noda yang terbentuk

### Hasil

## 7. Penggabungan vial dan pemekatan

### Spot hasil monitoring dengan Rf yang sam

- disemprotkan pereaksi *Lieberman-Burchard*
- ditandai fraksi yang mempunyai warna hijau
- digabungkan fraksi dan dipekatkan dengan *rotary evaporator*
- dialiri gas N<sub>2</sub>

### Hasil

## 8. Identifikasi senyawa steroid dengan FT-IR

### Ekstrak pekat ditetesi KBr sampai halus menggunakan mortar agate

- dicampurkan dengan sampel
- dipress
- dianalisis dengan FT-IR

### Hasil

### Lampiran 3 Pembuatan Reagen

#### 1. Pembuatan larutan HCl 2 N

Berat Jenis (BJ) HCl pekat = 1,267 g/mL

Konsentrasi (C) = 37 % =  $\frac{37}{100}$

Berat Molekul (BM) HCl = 36,5 g/mol

n = 1 (jumlah mol ion H<sup>+</sup>)

Normalitas HCl = n x Molaritas HCl

$$\begin{aligned}
 &= 1 \times \frac{C \times BJ \text{ HCl}}{BM \text{ HCl pekat}} \\
 &= \frac{37 / 100 \times 12,67 \text{ g/mL} \times 1000}{36,5 \text{ g/mol}} \\
 &= \frac{37 \times 12,67 / L \times 10}{36,5 / \text{mol}} \\
 &= 12,84 \frac{\text{mol}}{L}
 \end{aligned}$$

$$N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$$

$$12,84 \text{ N} \cdot V_1 = 2 \text{ N} \cdot 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 15,6 \text{ mL}$$

Adapun prosedur pembuatannya adalah diambil aquades dan dimasukkan dalam labu takar kemudian ditambahkan larutan HCl pekat 37% sebanyak 16,5 mL. Selanjutnya ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

## 2. Pembuatan larutan $\text{NaHCO}_3$ jenuh

Kelarutan  $\text{NaHCO}_3$  sebesar 9,99 g dalam 100 mL aquades. Sehingga untuk membuat larutan  $\text{NaHCO}_3$  jenuh ditimbang  $\text{NaHCO}_3$  dengan berat  $> 9,99$  g (sampai terdapat endapan padatan yang tidak larut). Lalu disaring larutan tersebut untuk memisahkan residu dan filtrat sehingga didapatkan larutan  $\text{NaHCO}_3$  jenuh.

## 3. Pembuatan Reagen Liberman-Burchard

- Kloroform p.a            0,5 mL
- Anhidrida asetat        0,5 mL
- Asam Sulfat pekat p.a   1,2 mL

Dimasukkan ekstrak sampel ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL. Kloroform lalu ditambah dengan 0,5 mL anhidrida asetat. Campuran ini selanjutnya ditambah dengan 1-2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung reaksi. Cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan keberhasilan terbentuknya reagen Liberman-Burchard.

## LAMPIRAN 4 PERHITUNGAN

### 1. UJI KADAR AIR BASAH

#### a. Berat Cawan Kosong

Ulangan	Berat cawan kosong (g)		
	Cawan 1	Cawan 2	Cawan 3
Ulangan 1	19,146	29,233	34,566
Ulangan 2	19,145	29,216	34,561
Ulangan 3	19,147	29,219	34,564
Ulangan 4	19,147	29,218	34,563
Rata-rata	19,147	29,19	35,564

#### b. Berat Cawan dan sampel

Ulangan	Berat cawan + alga merah <i>Eucheuma spinosum</i> kering		
	Cawan 1	Cawan 2	Cawan 3
Sebelum dioven	20,101	30,258	35,538
Ulangan 1	19,249	29,257	34,522
Ulangan 2	19,264	29,354	34,668
Ulangan 3	19,231	29,365	34,668
Ulangan 4	19,236	29,328	34,654
Ulangan 5	19,236	29,329	34,655
Ulangan 6	19,236	29,329	34,655

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{b-c}{b-a} \times 100\%$$

a = Berat rata-rata cawan kosong

b = Berat cawan + sampel sebelum dioven

c = Berat rata-rata cawan + sampel setelah dioven

$$\% \text{ kadar air cawan 1} = \frac{20,101-19,236}{20,101-19,147} \times 100\%$$

$$= \frac{0,865}{0,954} \times 100\%$$

$$= 90,67 \%$$

$$\% \text{ kadar air cawan 2} = \frac{30,258-29,329}{30,258-29,219} \times 100\%$$

$$= \frac{0,929}{1,039} \times 100\%$$

$$= 89,41\%$$

$$\% \text{ kadar air cawan 3} = \frac{35,438 - 34,655}{35,538 - 34,564} \times 100\%$$

$$= \frac{0,883}{0,924} \times 100\%$$

$$= 90,66 \%$$

$$\% \text{ kadar air rata-rata} = \frac{90,67\% + 89,41\% + 90,66\%}{3}$$

$$= \frac{270,74\%}{3}$$

$$= 90,25 \%$$

## 2. UJI KADAR AIR KERING

### a. Berat cawan kosong

Ulangan	Berat cawan kosong (g)		
	Cawan 1	Cawan 2	Cawan 3
Ulangan 1	17,494	19,153	34,556
Ulangan 2	17,494	19,152	34,556
Ulangan 3	17,494	19,152	34,557

### b. Berat Cawan dan sampel

Ulangan	Berat cawan + alga merah <i>Eucheuma spinosum</i> kering		
	Cawan 1	Cawan 2	Cawan 3
Sebelum dioven	19,995	21,654	37,058
Ulangan 1	19,865	21,524	36,915
Ulangan 2	19,820	21,476	36,877
Ulangan 3	19,803	21,462	36,862
Ulangan 4	19,798	21,453	36,861
Ulangan 5	19,793	21,452	36,858
Ulangan 6	19,794	21,450	36,859
Ulangan 7	19,796	21,450	36,859
Ulangan 8	19,796	21,448	36,859

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{b-c}{b-a} \times 100\%$$

a = Berat rata-rata cawan kosong

b = Berat cawan + sampel sebelum dioven

c = Berat rata-rata cawan + sampel setelah dioven

$$\% \text{ kadar air cawan 1} = \frac{19,995 - 19,795}{19,995 - 17,494} \times 100\%$$

$$= \frac{0,2}{2,501} \times 100\%$$

$$= 8,00 \%$$

$$\% \text{ kadar air cawan 2} = \frac{21,654 - 21,449}{21,654 - 19,153} \times 100\%$$

$$= \frac{0,205}{2,501} \times 100\%$$

$$= 8,20 \%$$

$$\% \text{ kadar air cawan 3} = \frac{37,058 - 36,859}{37,058 - 34,557} \times 100\%$$

$$= \frac{0,199}{2,501} \times 100\%$$

$$= 7,96 \%$$

$$\% \text{ kadar air rata-rata} = \frac{8,00\% + 8,20\% + 7,96\%}{3}$$

$$= \frac{24,16\%}{3}$$

$$= 8,05 \%$$

**LAMPIRAN 5 PERHITUNGAN RENDEMEN****1. Ekstrak Metanol Alga Merah**

$$\text{Berat Sampel} = 350 \text{ g}$$

$$\text{Berat Ekstrak pekat Metanol} = 10,765 \text{ g}$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat metanol}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{10,765 \text{ g}}{350 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 3,075\%$$

$$\text{Berat Sampel} = 100 \text{ g}$$

$$\text{Berat Ekstrak pekat Metanol} = 3,607 \text{ g}$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat metanol}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{3,607 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 3,607 \%$$

$$\begin{aligned} \text{Berat total ekstrak yang diperoleh} &= 10,765 \text{ g} + 3,607 \text{ g} \\ &= 14,372 \text{ g} \end{aligned}$$

**2. Ekstrak dari Fraksi Petroleum Eter**

$$\text{Berat ekstrak metanol} = 12,5 \text{ g}$$

$$\text{Berat fraksi yang diperoleh} = 1,759 \text{ g}$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak dari fraksi PE}}{\text{Berat ekstrak metanol}} \times 100\%$$

$$= \frac{1,759 \text{ g}}{12,5 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 14,072 \%$$

## LAMPIRAN 6

### PERHITUNGAN NILAI RF PENENTUAN ELUEN TERBAIK DENGAN KLTA

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{Jarak tempuh spot}}{\text{jarak tempuh fasa gerak}}$$

1. Eluen n-heksana : etil asetat (4 : 1)

Spot ke-	Warna spot pada UV (366 nm)	Jarak tempuh fasa gerak	Jarak tempuh spot	Nilai Rf
1	Coklat	8 cm	3 cm	$\frac{3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,375$
2	Merah	8 cm	5 cm	$\frac{5 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,625$
3	Merah	8 cm	6,5 cm	$\frac{6,5 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,813$
4	Biru	8 cm	7,4 cm	$\frac{7,4 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,925$
5	Biru	8 cm	7,8 cm	$\frac{7,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,975$

2. Eluen n-heksana : etil asetat (4, 5 : 0,5)

Spot ke-	Warna spot pada UV (366 nm)	Jarak tempuh fasa gerak	Jarak tempuh spot	Nilai Rf
1	Merah	7,6 cm	1 cm	$\frac{1 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,131$
2	Merah	7,6 cm	2 cm	$\frac{2 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,263$
3	Biru	7,6 cm	3 cm	$\frac{3 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,394$
4	Biru	7,6 cm	4 cm	$\frac{4 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,526$
5	Hijau	7,6 cm	5,2 cm	$\frac{5,2 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,684$

## 3. Eluen n-heksana : etil asetat (4,25 : 0,75)

Spot ke-	Warna spot pada UV (366 nm)	Jarak tempuh fasa gerak	Jarak tempuh spot	Nilai Rf
1	Ungu	7,25 cm	0,7 cm	$\frac{0,7 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,096$
2	Merah	7,25 cm	1,2 cm	$\frac{1,2 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,165$
3	Merah	7,25 cm	2,5 cm	$\frac{2,5 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,344$
4	Merah	7,25 cm	4 cm	$\frac{4 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,551$
5	Merah	7,25 cm	4,45 cm	$\frac{4,45 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,613$
6	Biru	7,25 cm	4,85 cm	$\frac{4,85 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,668$
7	Biru	7,25 cm	5,9 cm	$\frac{5,9 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,813$
8	Hijau	7,25 cm	6,6 cm	$\frac{6,6 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,910$

## Lampiran 7

### 1. Monitoring Hasil Isolasi Steroid menggunakan Kolom Pengisian Adsorben Cara Basah

No	Fraksi	Warna (UV)	Jarak Senyawa	Jarak Elusi	Rf	Senyawa
1.	1 - 9	kosong	-	-	-	-
2.	10 - 20	hijau	4,6 cm	8 cm	0,575	steroid
3.	21	hijau	3,1 cm	8 cm	0,388	campur
		hijau	3,7 cm	8 cm	0,463	
4.	22 - 24	hijau	4,3 cm	8 cm	0,537	steroid
5.	25	hijau	3,8 cm	8 cm	0,475	steroid
6.	26	kosong	-	-	-	-
7.	27	hijau	3,9 cm	8 cm	0,487	campur
		biru	3,1 cm	8 cm	0,387	
8.	28	biru	3,5 cm	8 cm	0,437	steroid
9.	29	biru	2,5 cm	8 cm	0,312	campur
		biru	3,1 cm	8 cm	0,437	
10.	30	biru	2,4 cm	8 cm	0,3	steroid
11.	31 - 37	merah	2,5 cm	8 cm	0,312	campur
		biru	3,75	8 cm	0,437	
12.	38	kosong	-	-	-	-
13.	39	merah	2,9 cm	5,8 cm	0,5	campur
		hijau	3,75 cm	5,8 cm	0,646	
14.	40 - 60	merah	1,6 cm	8 cm	0,2	Triterpenoid
15.	61	merah	1,2 cm	8 cm	0,15	Campur
		merah	1,5 cm	8 cm	0,187	
		merah	2,2 cm	8 cm	0,275	
16.	62 - 68	merah	1,75 cm	8 cm	0,218	Triterpenoid
17.	69	merah	1,2 cm	8 cm	0,15	Triterpenoid
18.	70 - 110	merah	1 cm	8 cm	0,125	Triterpenoid
19.	111	merah	1,8 cm	7,2cm	0,25	Campur
		merah	2 cm	7,2 cm	0,277	
20.	112 - 157	kosong	-	-	-	-

## 2. Monitoring Hasil Isolasi Steroid menggunakan Kolom Pengisian Adsorben Cara Basah

No	Fraksi	Warna (UV)	Jarak Senyawa	Jarak Elusi	Rf	Senyawa
1.	1 - 6	kosong	-	-	-	-
2.	7 - 9	merah	3,9 cm	7,8 cm	0,5	campur
		hijau	3 cm	7,8 cm	0,385	
3.	10 - 14	hijau	3 cm	7,8 cm	0,385	steroid
4.	15	hijau	3 cm	7,8 cm	0,385	campur
		merah	2,5 cm	7,8 cm	0,321	
5.	16 - 18	hijau	2,8 cm	8 cm	0,35	campur
		biru	2,2 cm	8 cm	0,275	
		merah	1,6 cm	8 cm	0,2	
6.	19	kosong	-	-	-	-
7.	20 - 29	merah	1,4 cm	8 cm	0,175	campur
		biru	1,9 cm	8 cm	0,245	
8.	30 - 39	merah	1,4 cm	8 cm	0,175	campur
		merah	1,3 cm	8 cm	0,16	
9.	40 - 82	merah	0,9 cm	8 cm	0,112	triterpenoid
10.	83 - 85	kosong	-	-	-	-
11.	86 - 108	merah	0,3 cm	8 cm	0,038	triterpenoid
12.	109	Kosong	-	-	-	-
13.	110 - 120	biru	5,5 cm	8 cm	0,688	steroid
14.	121	Kosong	-	-	-	-
15.	122 - 140	merah	0,2 cm	8 cm	0,025	triterpenoid
16.	141 - 148	kosong	-	-	-	-

**Rendemen hasil isolasi kromatografi kolom pengisian adsorben cara basah**

fraksi	Rf	Berat (mg)	Berat sampel (mg)	Rendemen (%)	Senyawa
1 (10 – 20)	0,575	12,1	100	12,1	Steroid
1 (22 – 24)	0,537	2,9	100	2,9	Steroid
1 (25)	0,475	1	100	1	Steroid
1 (28)	0,437	1,5	100	1,5	Steroid
1 (30)	0,3	0,7	100	0,7	Steroid
1 (40 – 60)	0,2	3,3	100	3,3	Triterpenoid
1 (62 – 68)	0,218	0,3	100	0,3	Triterpenoid
1 (69)	0,15	0,1	100	0,1	Triterpenoid
1 (70 – 110)	0,125	1,7	100	1,7	Triterpenoid
Berat Total (mg)		23,6	Rendemen total	23,6	

**Rendemen hasil isolasi kromatografi kolom pengisian adsorben cara kering**

Fraksi	Rf	Berat (mg)	Berat sampel (mg)	Rendemen (%)	Senyawa
2 (10 – 14)	0,385	1,9	200	0,95	Steroid
2 (40 - 82)	0,112	1,5	200	0,75	Triterpenoid
2 (86 – 108)	0,038	1,3	200	0,65	Triterpenoid
2 (110 – 120)	0,688	1	200	0,5	Steroid
2 (122 – 148)	0,025	2,4	200	1,2	Triterpenoid
Berat Total (mg)		8,1	Rendemen total	4,05	

Lampiran 8 Gambar



Gambar 1. Alga Merah (*Eucheuma spinosum*)



Gambar 2. Proses pengeringan Alga Merah



Gambar 3. Uji Kadar Air



Gambar 4. Inkubator Shaker



Gambar 5. Maserasi



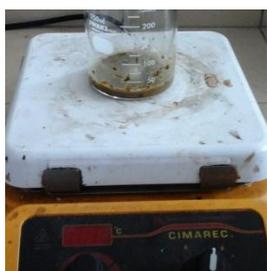
Gambar 6. Penyaringan Vakum



Gambar 7. Filtrat hasil maserasi



Gambar 8. Pemekatan dengan Rotary



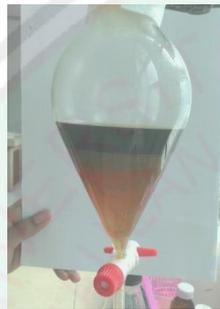
Gambar 9. Proses Hidrolisis



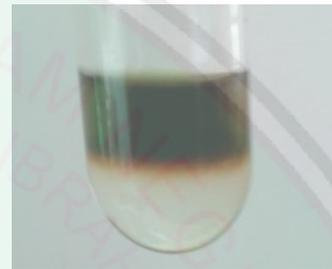
Gambar 11. Pengukuran pH

Gambar 10. Penambahan  $\text{NaHCO}_3$ 

Gambar 12. Pengocokan



Gambar 13. Proses Pemisahan saat partisi



Gambar 14. Uji Libermann-Burchard



Gambar 15. Kolom Kromatografi



Gambar 16. Monitoring Hasil Kolom



Gambar 17. Sampel yang akan diisolasi



Gambar 18. Hasil Penggabungan Fraksi