

**ISOLASI SENYAWA TRITERPENOID FRAKSI PETROLEUM
ETER HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL
ALGA MERAH (*Eucheuma spinosum*) MENGGUNAKAN
KROMATOGRAFI KOLOM CARA KERING DAN BASAH**

SKRIPSI

oleh:

NURWATI SEPTIANDARI

NIM. 12630008



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

2016

**ISOLASI SENYAWA TRITERPENOID FRAKSI PETROLEUM
ETER HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL
ALGA MERAH (*Eucheuma spinosum*) MENGGUNAKAN
KROMATOGRAFI KOLOM CARA KERING DAN BASAH**

SKRIPSI

oleh:

NURWATI SEPTIANDARI

NIM. 12630008

**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 TRITERPENOID FRAKSI PETROLEUM ETER
HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL
ALGA MERAH (*Eucheuma spinosum*) MENGGUNAKAN
KROMATOGRAFI KOLOM CARA KERING DAN BASAH**

SKRIPSI

Oleh:
NURWATI SEPTIANDARI
NIM. 12630008

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 30 Agustus 2016

Pembimbing I



A. Ghanaim Fasya, M.Si
NIP. 19820616 200604 1 002

Pembimbing II



Nur Aini, M.Si
NIDT. 19840608 20160801 2 070

Mengetahui,

Ketua Jurusan Kimia



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

**ISOLASI SENYAWA TRITERPENOID FRAKSI PETROLEUM ETER
HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL
ALGA MERAH (*EUCHEUMA SPINOSUM*) MENGGUNAKAN
KROMATOGRAFI KOLOM CARA KERING DAN BASAH**

SKRIPSI

**Oleh:
NURWATI SEPTIANDARI
NIM. 12630008**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 30 Agustus 2016**

**Penguji Utama : Diana Candra Dewi, M.Si (.....)
NIP. 19770720 200312 2 001**

**Ketua Penguji : Ahmad Hanapi, M.Sc (.....)
NIDT. 19851225 20160801 1 069**

**Sekretaris Penguji : A. Ghanaim Fasya, M.Si (.....)
NIP. 19820616 200604 1 002**

**Anggota Penguji : Nur Aini, M.Si (.....)
NIDT. 19840608 20160801 2 070**

**Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia**



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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nurwati Septiandari
NIM : 12630008
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Isolasi Senyawa Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) Menggunakan Kromatografi Kolom Cara Kering dan Basah

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

Malang, 7 September 2016



Nurwati Septiandari
NIM. 12630008

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum wr. Wb

Puji syukur penulis ucapkan kehadiran Allah SWT, karena atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan study di Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, sekaligus menyelesaikan tugas akhir/skripsi ini dengan baik.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Mudjia Rahardjo, M.Si, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr.drh. Bayyinatul, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si, selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si, selaku dosen pembimbing skripsi yang telah meluangkan waktu untuk membimbing dan mengarahkan kami di sela-sela kesibukan beliau, demi terselesainya skripsi ini.
5. Kedua orang tua (bapak Abd. Kadir Jailani dan ibu Sundari) yang telah memberikan dukungan moril dan materil. Mas Idrus dan adek Hisul yang tiada henti memberi semangat dan selalu memotivasi untuk mensegerakan penyelesaian skripsi ini
6. Segenap sivitas akademika Jurusan Kimia, seluruh dosen, administrasi dan laboran, terima kasih untuk segala bantuan hingga skripsi ini terselesaikan.
7. Teman-teman angkatan 2012, khususnya tim makro alga yang telah memberi semangat dan berbagai bantuan (Arieska, Rumzil, Laili, Donardi dan Sofyan)
8. Teman-teman Alpha team (jeng Asih, emmak Nad, adek Lucky) yang telah menemani lemburnya dan memberi semangat
9. Pihak-pihak yang telah membantu kami yang tidak mungkin disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga skripsi ini memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya bagi penulis secara pribadi.

Malang, Agustus 2016

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
ABSTRAK	xii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Batasan Masalah.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i>	7
2.2 Manfaat dan Kandungan <i>E.spinsum</i>	9
2.3 Senyawa Triterpenoid.....	11
2.4 Ekstraksi Senyawa Triterpenoid dari <i>E.spinsum</i>	13
2.5 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Peekat Metanol	15
2.6 Identifikasi Senyawa Triterpenoid dengan Uji Reagen.....	17
2.7 Kromatografi Lapis Tipis Analitik	18
2.8 Isolasi Senyawa Triterpenoid Menggunakan Kromatografi Kolom	20
2.9 Identifikasi Gugus Fungsi Menggunakan Spektroskopi IR.....	22
BAB III METODOLOGI	
3.1 Waktu dan Pelaksanaan Penelitian.....	26
3.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	26
3.2.1 Alat.....	26
3.2.2 Bahan	26
3.3 Rancangan Penelitian	26
3.4 Tahapan Penelitian	27
3.5 Cara Kerja	28
3.5.1 Preparasi Sampel.....	28
3.5.2 Analisis Kadar Air	28
3.5.3 Ekstraksi Sampel.....	29
3.5.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Peekat Metanol	29
3.5.5 Identifikasi Senyawa Triterpenoid dengan Uji Reagen	30
3.5.6 Penentuan Eluen Terbaik Menggunakan Metode KLT Analitik	30
3.5.7 Isolasi Senyawa Triterpenoid Menggunakan Kromatografi Kolom ..	31
3.5.7.1 Pembuatan Fase Diam Cara Kering	31

3.5.7.2 Pembuatan Fase Diam Cara Basah	32
3.5.8 Monitoring Spot dengan KLTA	32
3.5.9 Identifikasi Gugus Fungsi Menggunakan Spektrofotometer FT-IR ..	33
3.6 Analisis Data	33

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel.....	35
4.2 Analisis Kadar Air	35
4.3 Ekstraksi Sampel.....	36
4.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol	37
4.5 Identifikasi Senyawa Triterpenoid dengan Uji Reagen	38
4.6 Penentuan Eluen Terbaik Menggunakan KLT Analitik	40
4.7 Isolasi Senyawa Triterpenoid Menggunakan Kromatografi Kolom	43
4.7.1 Kromatografi Kolom Cara Kering	43
4.7.2 Kromatografi Kolom Cara Basah	45
4.8 Identifikasi Gugus Fungsi Menggunakan Spektrofotometer FT-IR	48
4.9 Perspektif Islam	50

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan.....	54
5.2 Saran	54

DAFTAR PUSTAKA.....	55
----------------------------	-----------

LAMPIRAN.....	61
----------------------	-----------

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Konstanta Dielektrikum dan Tingkat Kelarutan Beberapa Pelarut ..	13
Tabel 4.1 Hasil Penentuan Eluen Terbaik Menggunakan KLTA.....	41
Tabel 4.2 Fraksi Hasil Kromatografi Kolom Cara Kering	44
Tabel 4.3 Fraksi Hasil Kromatografi Kolom Cara Basah	46
Tabel 4.4 Interpretasi Spektra FT-IR Isolat Triterpenoid.....	49



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Alga Merah (<i>Eucheuma spinosum</i>)	8
Gambar 2.2	Skualena	12
Gambar 2.3	Senyawa Triterpenoid dari akar <i>Hyptis suaveolens</i>	12
Gambar 2.4	Asam 3 β -Hidroksiolean-12-en-28-oat.....	12
Gambar 2.5	Senyawa Triterpenoid Asam Karboksilat dari <i>E.spinsum</i>	12
Gambar 2.6	Dugaan Reaksi Hidrolisis Metabolit Sekunder	15
Gambar 2.7	Dugaan Reaksi antara Lanosterol dengan Pereaksi Liberman Burchard	18
Gambar 2.8	Struktur Silika Gel	21
Gambar 2.9	Spektra IR Senyawa Triterpenoid dari akar <i>Hyptis suaveolens</i>	23
Gambar 2.10	Spektra IR Senyawa Triterpenoid Kulit Batang Srikaya.....	24
Gambar 2.11	Spektra IR Senyawa Triterpenoid Kulit Batang Kecapi.....	25
Gambar 4.1	Dugaan Reaksi antara Senyawa Triterpenoid dengan Reagen LB	39
Gambar 4.2	Hasil Uji Liberman Burchard	40
Gambar 4.3	Ilustrasi Hasil KLTA pada eluen terbaik.....	42
Gambar 4.4	Spektra FT-IR Isolat Triterpenoid (fraksi K.2, K.3 dan K.5).....	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian	61
Lampiran 2 Diagram Alir	64
Lampiran 3 Pembuatan Larutan	69
Lampiran 4 Kadar Air Basah <i>Eucheuma spinosum</i>	71
Lampiran 5 Kadar Air Kering <i>Eucheuma spinosum</i>	72
Lampiran 6 Rendemen Ekstrak Metanol <i>Eucheuma spinosum</i>	73
Lampiran 7 Rendemen Fraksi Petroleum eter <i>Eucheuma spinosum</i>	74
Lampiran 8 Perhitungan Nilai Rf	74
Lampiran 9 Tabel Hasil Monitoring KLT	78
Lampiran 10 Dokumentasi	80

Abstrak

Septiandari, N. 2016. Isolasi Senyawa Triterpenoid Fraksi Petroleum eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) Menggunakan Kromatografi Kolom Cara Kering dan Basah. Skripsi. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing 1: A. Ghanaim Fasya, M.Si. Pembimbing 2: Nur Aini, M.Si. Konsultan: Ahmad Hanapi, M.Sc.

Kata Kunci: *Triterpenoid, Eucheuma spinosum, Isolasi, Spektrofotometer FT-IR, Kromatografi kolom*

Alga merah (*Eucheuma spinosum*) telah dimanfaatkan untuk konsumsi dan dapat digunakan sebagai obat karena didalamnya banyak terdapat kandungan metabolit sekunder, salah satunya adalah senyawa triterpenoid. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengisolasi senyawa triterpenoid menggunakan metode kromatografi kolom dengan variasi pada pembuatan fase diam, yaitu menggunakan cara basah dan cara kering.

Ekstraksi bahan aktif menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol. Ekstrak metanol dihidrolisis dengan HCl 2N, dipartisi menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan pelarut Petroleum eter. Fraksi P.E di uji dengan reagen Liberman Burchard, kemudian dilakukan KLT Analitik dengan eluen campuran n-heksana:etil asetat perbandingan 4:1; 4,5:0,5 dan 4,25:0,75 mL. Senyawa triterpenoid diisolasi menggunakan kromatografi kolom dengan variasi pembuatan fase diam yaitu, cara basah dan kering. Isolat dimonitoring menggunakan KLT. Selanjutnya isolat diidentifikasi gugus fungsinya menggunakan spektrofotometer FT-IR.

Hasil penelitian menunjukkan kandungan kadar air pada *E. spinosum* sebesar 7,73 %. Ekstrak metanol diperoleh sebesar 3,193 % dan fraksi P.E sebesar 14,072 %. Eluen terbaik dari hasil KLT Analitik adalah campuran n-heksana:etil asetat (4,25:0,75 mL). Hasil kromatografi kolom terbaik untuk mengisolasi senyawa triterpenoid adalah kromatografi kolom cara kering. Hasil monitoring KLT diperoleh 5 fraksi besar 3 fraksi positif senyawa triterpenoid yang terdiri dari fraksi K.2, K.3 dan K5 sedangkan 2 fraksi yang lain positif senyawa steroid yang terdiri dari fraksi 1.A dan 1.D. 3 fraksi positif triterpenoid diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FT-IR. Diperoleh gugus fungsi yang ada yaitu OH, -CH₃, -CH₂, C=O ester, R – CO.OCH₃ dan O – C ester.

ABSTRACT

Septiandari, N. 2016. **The Implementation of Column Chromatography using Dry and Slurry Method in Isolation Triterpenoid Compound From Petroleum Ether Fraction Resulting Hydrolysis of Red Algae (*Eucheuma spinosum*) Methanol Extract**. Thesis. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, the State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor 1: A. Ghanaim Fasya, M.Sc. Supervisor 2: Nur Aini, M.Sc. Consultant: Ahmad Hanapi, M.Sc.

Keywords: triterpenoid, *Eucheuma spinosum*, isolation, spectrophotometer FT-IR, column of chromatography

Red algae (*Eucheuma spinosum*) has been used for consumption and can be used as a drug because of the content of secondary metabolites, one of which is a compound of triterpenoids. The purpose of this study was to isolate the compound of triterpenoids using column chromatography with variations in the manufacture of stationary phase; it was using the wet method and dry method.

Extraction of active ingredients used method of maceration with methanol extract that hydrolyzed with HCl 2N, partitioned using liquid extraction with solvents Petroleum of ether. Fraction of P.E was tested by Liberman Burchard reagent, then Analytical TLC with eluent mixture n-hexane: ethyl acetate 4: 1; 4.5: 0.5 and 4.25: 0.75 mL. Triterpenoid compound was isolated using column chromatography with variations in the manufacture of stationary phase, namely the wet and dry. Isolate was monitored by TLC. Furthermore isolate was identified functional groups using spectrophotometer FT-IR.

The result showed that the content of water in *E. spinosum* was 7.73%. The methanol extract was obtained for 3.193% and amounted to 14.072% of P.E fraction. The best Eluent of Analytical TLC result was a mixture of n-hexane: ethyl acetate (4.25: 0.75 mL). Best result of column chromatography was to isolate the *triterpenoid* compound of column chromatography of dry method. TLC monitoring result was obtained 5 large fractions and 3 positive fractions of compounds *triterpenoids* consisted of fraction K.2, K.3 and K5, while two other fractions had positive steroid compound consisted of fractions K.1. and K.4. 3 *triterpenoids* positive fractions were identified using FT-IR spectrophotometer. Retrieved existing functional groups were CH₃, -CH₂, C=O ester, R - CO.OCH₃ and O - C ester

ملخص

سيفتينداری ن. 2016. عزل المركبات تريترفنويد جزء 1 لبتترول الأثير النتائج التحليل المائي مقتطف الميثانول عشب ماء الأحمر (*Eucheuma spinosum*) عن طريق العمود اللوني الطريقة الجافة والرطبة. بحث جامعي. شعبة الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، وجامعة الإسلامية الحكومية مولانا مالك إبراهيم مالانج. المشرف: أ غنائم فشى، الماجستير ونور العيني، الماجستيرة و مستشار: أحمد حنفى، الماجستير

كلمات الرئيسية: تريترفنويد اليوكيما سفوسيوم، عزل، تحويل فوريبه الأشعة تحت الحمراء، والأعمدة اللوني

الطحالب الحمراء (*Eucheuma spinosum*) هو هبة من الله التي يمكن استخدامها على نحو جيد. بالإضافة إلى استهلاك المباشر. يمكن *Eucheuma spinosum* استخدامها كدواء لأنه في كثير هناك محتوى المركبات الثانوية، واحدة منها هو مركب تريترفنويد. وكان الغرض من هذه الدراسة لعزل مركب تريترفنويد باستخدام عمود اللوني مع وجود اختلافات في صناعة مرحلة ثابتة، وذلك باستخدام الطريقة الرطبة والطريقة الجافة. استخراج المكونات النشطة باستخدام وسائل النقع باستخدام الميثانول. مستخلص الميثانول تحلل مع N_2 حمض الهيدروكلوريك وتقسيم باستخدام استخراج السائل مع المذيبات للبتترول الأثير. جزء P.E اختبارها من قبل الكاشف ليبرمان بورشارد، ثم القيام تحليلية KLT مع خليط شاطئ ن الهكسان: خللات الإيثيل في نسبة 4:1 و 4,0:0,05 و 4,25:0,075 ميل لىتر. عزل المركبات تريترفنويد باستخدام عمود اللوني مع وجود اختلافات في صناعة مرحلة ثابتة، وهي كيفية الرطب والجاف. العزلات التي رصدتها KLT. وعلاوة على ذلك يعزل المجموعات الوظيفية التي تم تحديدها باستخدام معمل تحويل فوريبه الأشعة تحت الحمراء. وأظهرت النتائج أن محتوى الماء في *E. spinosum* 73,7%. ينتج عن ذلك من استخراج الميثانول من 3,193% و جزء P.E 14,072%. شاطئ أفضل النتائج KLT التحليلية هي مزيج من ن الهكسان: خللات الإيثيل مع نسبة 4,25:0,075 ميل لىتر. أفضل عمود النتائج اللوني لعزل المركب تريترفنويد العمود اللوني الطريقة الجافة. نتائج الرصد KLT حصلت 5 أجزاء كبيرة 3 اجزاء إيجابي تتكون من مركبات تريترفنويد جزء K.2، K.3 و K.5، في حين أن جزئين أخرى مركب الستيرويد الإيجابي تتكون من كسور K.1 و K.4. 3 اجزاء كسور الإيجابية تريترفنويد باستخدام معمل تحويل فوريبه الأشعة تحت الحمراء. المجموعات الوظيفية الموجودة استردادها هي $O - C \text{ ester}$ و $OH, -CH_3, -CH_2, C=O \text{ ester}, R - CO.OCH_3$

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Allah SWT berfirman dalam surat an Nahl ayat 14.

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

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

Qs. an Nahl ayat 14 menjelaskan bahwa lautan merupakan karunia Allah SWT yang berupa sumber daya hayati. Dalam tafsir Al-Maraghi pada kata *وليتبغوا من فضله* Allah SWT memerintahkan kepada kita untuk mencari rezki dan keuntungan dari karuniaNya yaitu sumber daya hayati laut tersebut. Salah satu sumber daya hayati laut yang berpotensi untuk dimanfaatkan secara maksimal adalah alga merah.

Alga merah jenis *Eucheuma spinosum* merupakan salah satu jenis makro alga yang mudah dibudidayakan dan telah banyak dibudidayakan di wilayah Indonesia. Penduduk Jepang, Cina dan Korea memanfaatkannya untuk makanan sehari-hari (Suparmi, 2009) seperti asinan, nori, dan es rumput laut. Pemanfaatannya saat ini lebih maju karena telah merambah dalam bidang yang lain. *E. spinosum* dimanfaatkan sebagai bahan untuk laboratorium yaitu sebagai media kultur bakteri dan jamur (Marianingsih, dkk., 2013). Selain itu, *E.*

spinosum juga dimanfaatkan dalam bidang farmasi sebagai antibakteri (Haniffa, dkk., 2012) dan antimikroba (Ahmad, 2013).

Penelitian mengenai senyawa aktif pada alga merah telah dilakukan antara lain oleh Setiyawan (2015) melakukan uji fitokimia pada fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol *E. spinosum* dan diperoleh fraksi tersebut positif senyawa triterpenoid dan steroid. Habibah, dkk (2012) melakukan penelitian pada ekstrak metanol *E. spinosum*. Hasil uji fitokimia menunjukkan adanya kandungan golongan senyawa saponin dan triterpenoid.

Terpena merupakan senyawa organik bahan alam yang ada dalam metabolit sekunder pada tanaman yang mencakup mono, di, tri dan senyawa politerpenoid (Sastrohamidjojo, 1996). Triterpenoid adalah senyawa golongan terpenoid yang memiliki rantai karbon 30. Senyawa ini banyak ditemukan dalam jaringan tanaman yang terdapat sebagai glikosida. Triterpenoid siklik banyak ditemukan berupa alkohol, aldehida atau asam karboksilat (Harborne, 1987). Kebanyakan triterpenoid ada dalam bentuk glikosida, sehingga dapat diekstraksi menggunakan pelarut polar dari golongan alkohol yaitu metanol.

Senyawa triterpenoid menunjukkan aktivitas farmakologi yang baik. Senyawa triterpenoid dari ekstrak n-heksana daun tempuyung menunjukkan aktifitas antibakteri terhadap bakteri *S.aureus* dan *E.coli* pada konsentrasi 50 ppm (Rumondang, dkk., 2013). Selain itu, Ahmad (2013) mengisolasi senyawa triterpenoid dari Alga merah *E. spinosum* dan diperoleh senyawa triterpenoid yang merupakan golongan asam karboksilat. Kemudian senyawa tersebut diuji aktifitas antimikrobanya dan diperoleh senyawa triterpenoid hasil isolasi mampu

menghambat pertumbuhan patogen *M. Tuberculosis* (patogen penyebab TBC). Senyawa tersebut juga menambah sensitifitas patogen terhadap obat yang biasa digunakan untuk penderita TBC.

Senyawa triterpenoid dari makro alga jenis *Padina australis* juga dimanfaatkan sebagai anti tuberculosis. Pridawati, dkk., (2014) telah mengisolasi kemudian senyawa triterpenoid mampu meningkatkan aktivitas rifampisin 0,5 µg/mL dalam menghambat pertumbuhan bakteri *M. Tuberculosis*. Mengingat manfaat senyawa triterpenoid tersebut maka perlu dilakukan isolasi senyawa tersebut.

Isolasi senyawa triterpenoid pada *E. spinosum* telah dilakukan oleh Setiyawan, dkk (2015) dengan menggunakan metode KLT Analitik. Pemisahan menggunakan KLTA digunakan untuk isolasi senyawa dalam jumlah yang sedikit. Maka untuk mengisolasi senyawa dalam jumlah besar diperlukan metode yang lain. Salah satu metode yang dapat digunakan adalah kromatografi kolom.

Penggunaan metode kromatografi kolom untuk proses isolasi harus menggunakan fase gerak (eluen) terbaik. Penentuan eluen terbaik dapat dilakukan melalui KLTA. Setiyawan, dkk (2015) menggunakan eluen n-heksana;etil asetat untuk memisahkan fraksi petroleum eter *E. spinosum* dengan 3 variasi perbandingan, yaitu 4:1; 4,5:0,5 dan 4,25:0,75. Hasil KLTA diperoleh eluen terbaik adalah perbandingan 4,25:0,75 mL yang menghasilkan 9 noda, sedangkan pada perbandingan volume 4:1 dan 4,5:0,5 hanya menghasilkan 8 noda dengan noda tampak melebar. Maka dalam penelitian ini digunakan 3 variasi perbandingan eluen tersebut.

Ada dua variasi metode pada pembuatan fase diam yaitu, pembuatan fase diam cara kering dan cara basah. Kromatografi kolom cara kering dikenal dengan kromatografi kolom vakum cair (KVC). Isolasi metabolit sekunder menggunakan metode KVC telah dilakukan oleh Suryani (2011) yang mengisolasi dan elusidasi struktur senyawa triterpenoid dari ekstrak etil asetat kulit batang tumbuhan kecap. Kemudian Putri (2012), juga telah mengisolasi senyawa kolestan dari ekstrak kloroform kulit batang tumbuhan *tooná sinensis* (a.juss) roem menggunakan metode KVC.

Isolasi senyawa aktif menggunakan metode kromatografi kolom cara basah dikenal dengan pemisahan menggunakan bubuk silika. Kusmiyati (2011) telah mengisolasi dan mengidentifikasi zat aktif pada rimpang kunyit putih menggunakan bubuk silika. Selain itu, isolasi pada senyawa β -sitosterol dari fraksi etil asetat tumbuhan paku *Neprolepis falcata* (Cav.) C. Chr telah dilakukan oleh (Priyanto, 2013).

Berdasarkan alasan yang telah disebutkan maka perlu dilakukan isolasi senyawa triterpenoid pada fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol *E. spinosum* menggunakan metode kromatografi kolom. Pada penelitian ini akan digunakan dua variasi pembuatan fase diam, yaitu pembuatan fase diam cara basah dan cara kering. Isolat murni hasil pemisahan kemudian diidentifikasi menggunakan spektroskopi IR. Identifikasi ini untuk memastikan gugus fungsi yang terdapat pada isolat murni.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana hasil isolasi senyawa triterpenoid fraksi Petroleum Eter hasil hidrolisis ekstrak Metanol Alga Merah (*E.spinosum*) dengan menggunakan Kromatografi Kolom cara kering dan cara basah?
2. Bagaimana hasil identifikasi gugus fungsi senyawa triterpenoid hasil isolasi kromatografi kolom fraksi petroleum eter dari Alga Merah (*E.spinosum*) menggunakan FTIR ?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui hasil isolasi senyawa Triterpenoid fraksi Petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak Metanol Alga Merah (*E.spinosum*) dengan menggunakan Kromatografi Kolom cara basah dan cara kering.
2. Untuk mengetahui hasil identifikasi gugus fungsi menggunakan FTIR pada senyawa triterpenoid hasil isolasi kromatografi kolom fraksi petroleum eter dari Alga Merah (*E. spinosum*).

1.4 Batasan Masalah

1. Alga Merah (*E.spinosum*) berasal dari pantai Jumiang Pamekasan, Madura
2. Metode ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol dan ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut petroleum eter.
3. Fase gerak pada KLTA adalah campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan volume 4:1; 4,5:0,5 dan 4,25:0,75 mL.
4. Fase gerak pada Kromatografi kolom adalah n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan volume 4,25:0,75 mL.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Dapat memberikan informasi mengenai teknik pemisahan menggunakan kromatografi kolom terhadap senyawa triterpenoid dalam alga merah (*E.spinosum*).
2. Dapat memberikan informasi mengenai hasil analisis FTIR pada senyawa triterpenoid hasil pemisahan kromatografi kolom fraksi petroleum eter dari Alga Merah (*E.spinosum*).



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga Merah *Eucheuma spinosum*

Allah SWT berfirman dalam Qs. al Faathir ayat 12, yaitu:

وَمَا يَسْتَوِي الْبَحْرَانِ هَذَا عَذْبٌ فُرَاتٌ سَائِغٌ شَرَابُهُ وَهَذَا مِلْحٌ أُجَاجٌ وَمِن كُلِّ تَاكُلُونَ
لَحْمًا طَرِيًّا وَتَسْتَخْرِجُونَ حِلْيَةً تَلْبَسُونَهَا وَتَرَى الْفَلَكَ فِيهِ مَوَازِيرَ لَتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ وَلِعَلَّكُمْ
تَشْكُرُونَ ﴿١٢﴾

Artinya:

“dan tiada sama (antara) dua laut; yang ini tawar, segar, sedap diminum dan yang lain asin lagi pahit. dan dari masing-masing laut itu kamu dapat memakan daging yang segar dan kamu dapat mengeluarkan perhiasan yang dapat kamu memakainya, dan pada masing-masingnya kamu Lihat kapal-kapal berlayar membelah laut supaya kamu dapat mencari karunia-Nya dan supaya kamu bersyukur.”(Qs. al Faathir:12).

Qs. al Faathir ayat 12 menjelaskan bahwa. Allah menciptakan laut agar manusia dapat memanfaatkannya dengan baik bagi kehidupan manusia. Dalam tafsir Al-Aisar Allah SWT menjelaskan bahwa pada kata لحمًا طريًا (daging segar) adalah ikan. Kemudian Allah SWT kembali menjelaskan dalam Qs. al Maa'idah ayat 96 tentang hal tersebut, yaitu:

أَحِلَّ لَكُمْ صَيْدُ الْبَحْرِ وَطَعَامُهُ مَتَعًا لَكُمْ وَلِلسَّيَّارَةِ وَحُرِّمَ عَلَيْكُمْ صَيْدُ الْبَرِّ مَا دُمْتُمْ حُرِّمًا
وَاتَّقُوا اللَّهَ الَّذِي إِلَيْهِ تُحْشَرُونَ ﴿٩٦﴾

Artinya:

“Dihalalkan bagimu binatang buruan laut^[442] dan makanan (yang berasal) dari laut^[443] sebagai makanan yang lezat bagimu, dan bagi orang-orang yang dalam perjalanan; dan diharamkan atasmu (menangkap) binatang buruan darat, selama kamu dalam ihram. dan bertakwalah kepada Allah yang kepada-Nyalah kamu akan dikumpulkan.”(Qs. al Maa'idah: 96).

Qs. al Maa'idah ayat 96 dijelaskan dalam tafsir al-Qurtubi bahwa ini merupakan sebuah keputusan Allah menghalalkan semua binatang buruan didalam laut. Maka pada ayat ini Allah mengizinkan manusia untuk mengkonsumsi makanan yang berasal dari laut. Salah satunya adalah *E. spinosum* yang habitatnya berada di laut.

Menurut UU RI no.45 tahun 2009 tentang Perikanan pada pasal 1 ayat 4 menyebutkan bahwa ikan adalah segala jenis organisme yang seluruh atau sebagian dari siklus hidupnya berada di dalam lingkungan perairan. Berdasarkan hal tersebut maka *E. spinosum* digolongkan dalam jenis ikan. Alga merah lebih dikenal sebagai rumput laut merah oleh masyarakat pesisir merupakan jenis yang paling banyak terdapat di perairan Indonesia yaitu sekitar 452 jenis. Alga merah tergolong tumbuhan tingkat rendah, karena seluruh bagian tubuhnya tidak dapat dibedakan yaitu, berupa *thallus* (Suparmi, 2009).

Menurut Anggadiredja, dkk., (2006) *E. spinosum* memiliki klasifikasi taksonomi sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Rhodophyta
Kelas	: Rhodophyceae
Ordo	: Gigartinales
Famili	: Solieriaceae
Genus	: Eucheuma
Spesies	: <i>Eucheuma spinosum</i>



Gambar 2.1 Alga Merah (*Eucheuma spinosum*)

E. spinosum tumbuh melekat pada terumbu karang, batuan, cangkang kerang serta benda keras dalam lingkungan air. *E. spinosum* membutuhkan sinar matahari untuk proses fotosintesis dan pertumbuhannya membutuhkan salinitas 28-33 per mil maka *E. spinosum* hanya hidup pada permukaan atas laut (Anggadiredja, dkk., 2006).

2.2 Manfaat dan Kandungan *E. spinosum*

Kestabilan ekosistem laut yang terjaga merupakan salah satu peran dari *E. spinosum* secara ekologis. Peran secara biologisnya adalah sebagai tempat hidup sekaligus perlindungan bagi biota laut yang lain (Suparmi, 2009), selain itu juga menghasilkan oksigen yang dibutuhkan oleh biota laut yang lain (Hidayat, 2006).

Golongan alga telah mengalami kemajuan dalam pemanfaatannya dan bernilai ekonomis yaitu, sebagai bahan baku dalam industri dan kesehatan (Suparmi, 2009). Menurut Hudha, dkk., (2012) karaginan dari *E. spinosum* dapat dimanfaatkan dalam bidang industri makanan, kosmetika, tekstil, cat, obat dan pakan ternak.

Selain mengandung senyawa metabolit primer seperti pada Tabel 2.1 *E. spinosum* juga mengandung metabolit sekunder. Hasil uji fitokimia pada ekstrak metanol *E. spinosum* menunjukkan adanya kandungan golongan senyawa triterpenoid (Habibah, dkk., 2012). Kemudian hasil penelitian Mardiyah, dkk., (2012) menyatakan bahwa uji fitokimia ekstrak P.E pada *E. spinosum* menunjukkan adanya kandungan metabolit sekunder, yaitu golongan senyawa flavonoid, alkaloid, asam askorbat dan triterpenoid.

Allah berfirman dalam Qs. asy Syu'araa ayat 78 – 80 yaitu

الَّذِي خَلَقَنِي فَهُوَ يَهْدِينِ ﴿٧٨﴾ وَالَّذِي هُوَ يُطْعِمُنِي وَيَسْقِينِ ﴿٧٩﴾ وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ .



Artinya:

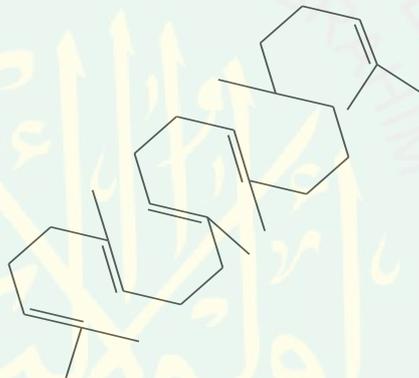
“(Yaitu Tuhan) yang telah menciptakan Aku, Maka Dialah yang menunjuki Aku, dan Tuhanku, yang Dia memberi Makan dan minum kepadaKu, dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan Aku.”

Qs. asy Syu'araa ayat 78 – 80 menjelaskan bahwa manusia adalah salah satu ciptaan Allah SWT dan Dia yang memberi petunjuk bagi manusia. Dalam tafsir Ibnu Katsir, rezki yang Allah SWT berikan adalah air yang diturunkan dari langit, kemudian dihidupkan-Nya tanah dengan air tersebut dan dikeluarkan-Nya seluruh buah-buahan sebagai rezki bagi hamba-hamba-Nya. Selain itu, pada ayat 80 menjelaskan saat manusia mengalami sakit maka Allah pula yang memberikan kesembuhan. Kesembuhan tersebut dapat diperoleh manusia dengan jalan ikhtiar kepada Allah SWT. Ikhtiar ini dapat diwujudkan dengan doa dan usaha, salah satu usaha tersebut adalah dengan mengkonsumsi obat.

Menurut UU RI no 7 tahun 1963 tentang farmasi, pada pasal 2 obat adalah obat yang dibuat dari bahan-bahan yang berasal dari binatang, tumbuh-tumbuhan, mineral dan obat sintetis. *E.spinosum* yang merupakan tumbuhan laut memiliki kandungan senyawa triterpenoid dapat digunakan sebagai obat. Menurut Hijaz, dkk (2009) pada ekstrak kasar dan fraksi aktif karaginan *E. spinosum* memiliki aktivitas antioksidan. Selain itu, *E. spinosum* juga dimanfaatkan sebagai antibakteri (Haniffa, dkk., 2012) dan antimikroba (Ahmad, 2013). Anggadiredja, dkk., (2006) telah menginventarisir 61 jenis dari 27 famili alga yang sudah bisa dijadikan makanan oleh masyarakat wilayah pesisir dan 21 jenis dari 12 famili yang telah digunakan sebagai obat tradisional.

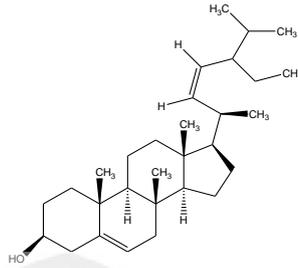
2.3 Senyawa Triterpenoid

Triterpenoid merupakan komponen tumbuhan yang dapat diisolasi dari bahan nabati dengan penyulingan sebagai minyak atsiri. Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari 6 satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C_{30} asiklik yaitu skualena. Senyawa ini berstruktur siklik yang kebanyakan berupa alkohol, aldehida, atau asam karboksilat (Harborne, 1987). Triterpenoid yang paling penting dan paling tersebar luas adalah triterpenoid pentasiklik (Robinson, 1995).



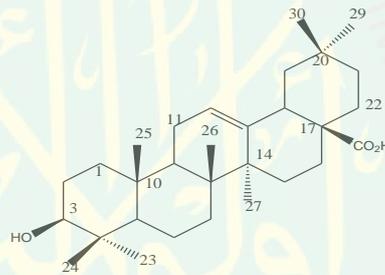
Gambar 2.2 Skualena (Struktur dasar golongan senyawa triterpenoid) (Robinson, 1995)

Beberapa contoh senyawa golongan triterpenoid yang berhasil diisolasi antara lain senyawa triterpenoid dari *Hyptis suaveolens* menggunakan kromatografi kolom oleh Jasani, dkk (2012) dan identifikasi menggunakan spektrofotometer UV, FT-IR dan NMR. Dan diperoleh isolat triterpenoid tersebut memiliki struktur sebagai berikut:



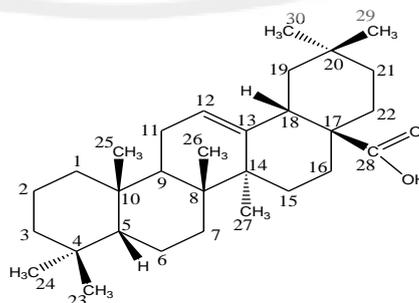
Gambar 2.3 Senyawa Triterpenoid dari akar *Hyptis suaveolens*

Selanjutnya adalah senyawa Asam 3 β -Hidroksiolean-12-en-28-olat. Senyawa tersebut merupakan senyawa golongan triterpenoid pada batang durian kura (*D. testudinarum Becc.*) yang diisolasi menggunakan metode kromatografi kolom vakum (Deny, dkk., 2013) Struktur senyawa tersebut adalah sebagai berikut:



Gambar 2.4 Asam 3 β -Hidroksiolean-12-en-28-olat

Ahmad (2013) telah melakukan isolasi dan karakterisasi pada senyawa triterpenoid dari *E. spinosum* dan diperoleh senyawa tersebut merupakan golongan triterpenoid asam karboksilat. Struktur senyawa triterpenoid tersebut adalah:



Gambar 2.5 Senyawa Triterpenoid Asam Karboksilat dari *E. Spinosum*

2.4 Ekstraksi Senyawa Triterpenoid dari *E.spinosum*

Ekstraksi pada penelitian ini dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi adalah perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada suhu ruang. Pada proses perendaman, dinding serta membran sel analit tumbuhan akan terpecah akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel, yang mengakibatkan metabolit sekunder dalam sitoplasma terlarut dalam pelarut organik. Lama perendaman yang diatur akan menghasilkan ekstraksi yang sempurna. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam pelarut tersebut (Indrayani, dkk., 2006).

E. spinosum yang telah dikering anginkan pada suhu kamar kemudian dimaserasi. Proses maserasi pada penelitian menggunakan pelarut metanol. Hal ini dikarenakan sifat kepolaran dari metanol polar. Selain itu, senyawa triterpenoid banyak ditemukan dalam jaringan tanaman yang terdapat sebagai glikosida. Triterpenoid siklik banyak ditemukan berupa alkohol, aldehida atau asam karboksilat (Harborne, 1987) serta titik didih metanol lebih rendah dari senyawa triterpenoid sehingga akan lebih mudah dipisahkan.

Proses maserasi dilakukan berulang hingga warna *E. spinosum* dan filtrat hasil maserasi berubah lebih pucat. Ekstrak yang diperoleh disaring kemudian dipekatkan menggunakan *Rotary evaporator vacuum*. Pemekatan ini bertujuan untuk memisahkan pelarut metanol dengan ekstrak kasar metanol *E. spinosum*.

Kelebihan maserasi yaitu sederhana, relatif murah, tidak memerlukan peralatan yang rumit, terjadi kontak antara sampel dan pelarut yang cukup lama dan dapat menghindari kerusakan komponen senyawa yang tidak tahan panas.

Dan kekurangannya adalah membutuhkan waktu yang lama untuk mencari pelarut organik yang dapat melarutkan dengan baik senyawa yang akan diisolasi dan harus mempunyai titik didih yang tinggi pula sehingga tidak mudah menguap (Voight, 1995).

Pemilihan pelarut organik yang akan digunakan dalam ekstraksi komponen aktif merupakan faktor penting dan menentukan untuk mencapai tujuan dan sasaran ekstraksi komponen. Konstanta dielektrikum beberapa pelarut ditunjukkan pada Tabel 2.1 (Sax, 1998).

Tabel 2.1 Konstanta Dielektrikum dan Tingkat Kelarutan Beberapa Pelarut

Jenis pelarut	Konstanta dielektrikum	Tingkat kelarutan dalam air	Titik didih (°C)
Heksana	1,9	TL	68,7
Petroleum eter	2,28	TL	60
Kloroform	4,81	S	61,3
Etil asetat	6,02	S	77,1
Metil asetat	6,68	S	57
Metil klorida	9,08	S	39,75
Butanol	15,80	S	117,2
Propanol	20,1	L	97,22
Aseton	20,70	L	56,2
Etanol	24,30	L	78,5
Metanol	33,60	L	64
Air	78,4	L	100

Keterangan: TL = tidak larut; S = sedikit; L = larut dalam berbagai proporsi
 Sumber: Sax (1998), HAM (2006), Fesenden dan Fesenden (1997), dan Mulyono (2006)

Kutsiyah, dkk (2012) melakukan maserasi pada *E. spinosum* menggunakan pelarut metanol dan n-heksan, hasil rendemen menunjukkan bahwa ekstraksi tertinggi didapatkan pada pelarut metanol yaitu sebesar 16,25 % sedangkan pada pelarut n-heksan hanya 0,88 %. Kemudian Ahmad (2013) mengekstrak senyawa triterpenoid dari alga merah *E. spinosum* dengan metode maserasi menggunakan

dilakukan dengan cara hidrolisis menggunakan HCl 2 N selama 2-3 jam. Mardiyah (2012) juga menguji aktivitas antioksidan ekstrak kasar metanol. *spinosum* dengan proses hidrolisis dan didapatkan aktivitas antioksidan yang lebih baik yaitu dengan nilai EC_{50} 22,13 ppm.

Proses partisi ini berdasarkan pada metode ekstraksi cair-cair. Ekstraksi cair-cair merupakan teknik pemisahan zat-zat terlarut antara dua cairan yang tidak saling mencampur antara lain menggunakan alat corong pisah. Pada ekstraksi cair-cair ini tidak terjadi pemisahan dari bahan-bahan yang akan diperoleh (ekstrak), melainkan mula-mula hanya terjadi pengumpulan ekstrak dalam pelarut. Ekstrak berpartisi pada 2 pelarut sesuai dengan sifat kepolarannya. Menurut Afriyanti (2013) syarat agar pemisahan analit dapat dilakukan dengan baik pada proses partisi adalah:

1. Kedua campuran tidak saling campur
2. Analitnya lebih larut dalam pelarut pengekstraknya daripada dalam pelarut asalnya

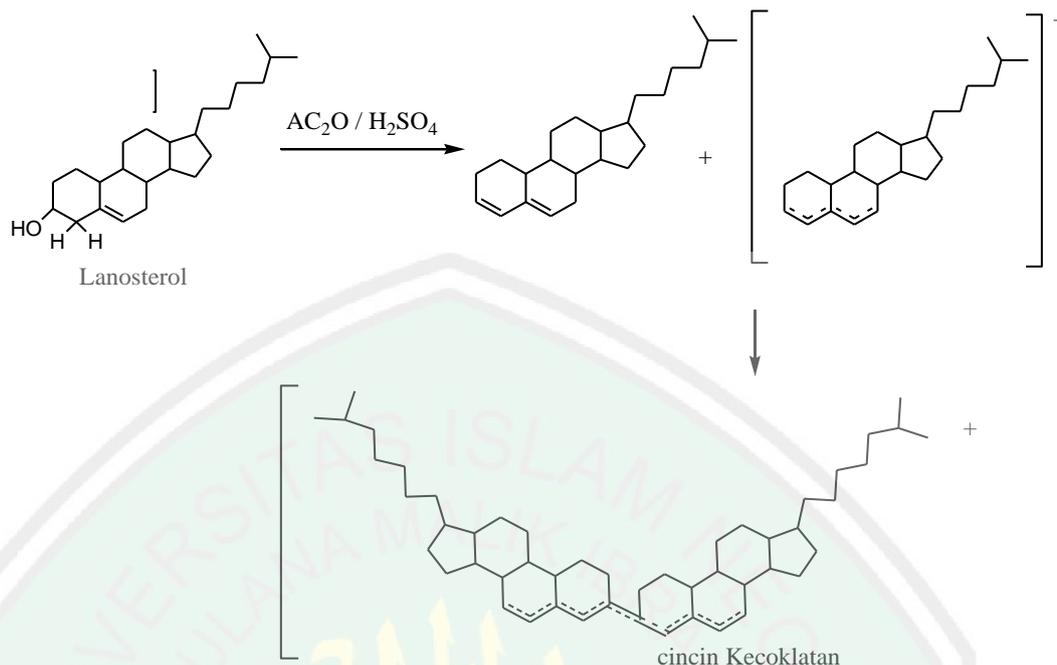
Partisi menggunakan *Petroleum eter* ini bertujuan agar senyawa-senyawa yang memiliki kepolaran sama dengan *Petroleum eter* akan berpartisi ke *Petroleum eter*. Dan triterpenoid yang bersifat non polar akan ada pada fase organik (*Petroleum eter*). Fraksi inilah yang akan digunakan untuk proses pemisahan dengan kromatografi kolom.

Pada penelitian ini proses partisi dilakukan menggunakan pelarut petroleum eter, penggunaan fraksi P.E berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Setiyawan, dkk (2015) telah menghidrolisis ekstrak kasar metanol

E.spinosum kemudian dipartisi menggunakan pelarut P.E dan diperoleh rendemen sebesar 4,9 %. Sedangkan Susetyo, dkk (2015) juga menghidrolisis ekstrak kasar metanol *E.spinosum* kemudian dipartisi menggunakan pelarut etil asetat dan diperoleh rendemen sebesar 4,78 % maka dalam penelitian ini digunakan pelarut P.E dalam proses partisi.

2.6 Identifikasi Senyawa Triterpenoid dengan Uji Reagen

Uji fitokimia senyawa triterpenoid dilakukan dengan uji Lieberman Burchard. Prinsip dasar dari uji Lieberman Burchard adalah senyawa triterpenoid dapat mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat yang akan membentuk garam dengan memberikan sejumlah reaksi warna (Robinson, 1995). Asam kuat yang digunakan dalam uji ini adalah asam sulfat pekat. Adanya triterpenoid pada uji ini ditunjukkan dengan terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan (Ciulei, 1984). Adapun reaksi dugaan uji terpenoid/steroid dapat dilihat pada gambar 2.7



Gambar 2.7 Dugaan Reaksi antara lanosterol dengan pereaksi Liberman Burchard (Anam, dkk., 2015).

Rumondang, dkk., (2013) telah melakukan uji fitokimia pada ekstrak kasar n-heksana daun tempuyung menggunakan pereaksi Liberman Burchard. Diperoleh sampel positif senyawa triterpenoid yang ditunjukkan dengan terbentuknya cincin merah kecoklatan. Kemudian Utama, dkk., (2013), memonitoring fraksi hasil kolom dari ekstrak kulit batang kecap pada plat KLT menggunakan pereaksi Liberman Burchard. Pereaksi LB disemprotkan pada plat dan diperoleh warna merah pada spot yang positif senyawa triterpenoid.

2.7 Kromatografi Lapis Tipis Analitik

Kromatografi lapis tipis analitik atau KLTA adalah salah satu jenis metode kromatografi. Menurut literatur (Gritter, 1991), kromatografi lapis tipis adalah kromatografi serapan, dimana fasa diam berupa zat padat yang disebut adsorben

(penyerap) dan fasa gerak adalah zat cair yang disebut larutan pengembang. Penyerap untuk KLT ialah plat silika gel, alumina, kiselgur, dan selulosa.

KLT analitik dalam penelitian ini digunakan untuk memastikan eluen terbaik yang akan digunakan untuk pemisahan pada kromatografi kolom. Pada KLTA ini digunakan campuran eluen n-heksana dan etil asetat. Variasi perbandingan volume yang digunakan yaitu 4:1, 4.5:0.5, 4.25:0.75 mL.

Setiyawan, dkk., (2015) telah mengisolasi senyawa triterpenoid dari *E.spinosum* menggunakan eluen n-heksana;etil asetaat dengan 3 variasi tersebut. Pada perbandingan 4:1 mL dan 4.5:0.5 mL diperoleh 8 noda tampak pada hasil KLTA masih ada noda yang melebar. Sedangkan pada perbandingan 4.25:0.75 mL terdapat 9 noda tampak, dengan noda yang tidak melebar dan tidak berimpit.

Selain itu, KLTA juga digunakan untuk memonitoring spot pada vial hasil pemisahan. Sehingga dapat dilakukan penyederhanaan vial, dengan cara menggabung vial dari hasil KLTA sehingga diperoleh fraksi yang lebih besar. Monitoring spot vial ini dilakukan dengan menghitung nilai Rf tiap vial. Adapun rumus menghitung Rf adalah (Sastrohamidjojo, 1985):

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa dari titik awal}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut dari titik awal}} \dots\dots\dots (2.1)$$

Utama, dkk (2013) telah mengisolasi senyawa triterpenoid dari kulit batang kecap menggunakan kromatografi kolom. Isolat yang diperoleh kemudian dimonitoring dengan KLTA hingga diperoleh noda tunggal. Hal ini mengindikasikan bahwa isolat telah murni. Sehingga untuk memperoleh senyawa yang relatif murni dari hasil kromatografi kolom maka perlu dilakukan monitoring menggunakan KLTA pada fraksi hasil kromatografi kolom.

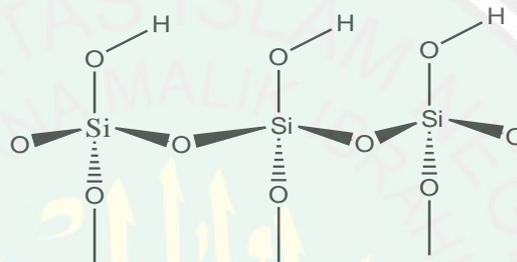
2.8 Isolasi Senyawa Triterpenoid Menggunakan Kromatografi Kolom

Pemisahan menggunakan kromatografi kolom berdasarkan pada adsorpsi dan partisi. Menurut Gritter (1991) kromatografi kolom merupakan kromatografi serapan yang dilakukan didalam sebuah kolom. Campuran yang akan dipisahkan diletakkan berupa pita diatas bagian penyerap yang berada pada tabung kaca. Fasa gerak dibiarkan mengalir melalui kolom yang disebabkan oleh gaya berat. Pita senyawa yang terlarut bergerak melalui kolom dengan laju yang berbeda, memisah dan dikumpulkan berupa fraksi-fraksi pada saat keluar dari bawah kolom.

Fase gerak yang digunakan harus sudah ditentukan sebelumnya agar diperoleh pola pemisahan yang diinginkan. Hal ini disebabkan karena kromatografi kolom memerlukan waktu lama dan bahan yang cukup banyak. Ada tiga pendekatan yang digunakan untuk memecahkan masalah ini yaitu dengan penelusuran pustaka, penerapan data KLT pada pemisahan dengan kolom dan dengan pemakaian elusi landaian umum mulai dari pelarut non-polar sampai pelarut polar (Sastrohamidjojo, 1985).

Pemisahan senyawa triterpenoid ini menggunakan fase gerak n-heksana ; etil asetat dengan perbandingan volume 4.25:0.75. Pemakaian fase gerak tersebut berdasarkan pada penelitian sebelumnya. Setiyawan, dkk (2015) menggunakan fase gerak n-heksan dan etil asetat dengan metode KLT untuk mengisolasi senyawa triterpenoid pada *E.spinosum*. Selain itu, sifat kepolaran dari triterpenoid yang semi polar hampir sama dengan sifat fase gerak diatas.

Fase diam yang digunakan pada proses pemisahan kromatografi kolom adalah silika gel G-60 (0,063 – 0,200 mm). Silika gel merupakan fase diam yang paling banyak digunakan dalam pemisahan bahan alam. Silika gel memberikan luas permukaan yang besar dikarenakan ukuran partikel silika gel yang kecil. Adapun struktur dasar silika gel dapat dilihat pada gambar 2.8 (Noviyanti, dkk., 2010):



Gambar 2.8 Struktur Silika Gel

Permukaan silika gel ini mengandung gugus silanol, hidroksil yang terdapat pada gugus silanol ini merupakan pusat aktif dan berpotensi mampu membentuk ikatan hidrogen yang kuat dengan senyawa yang akan dipisahkan. Silika gel membentuk ikatan hidrogen terutama dengan donor H seperti alkohol, fenol, amina, amida dan asam karboksilat. Sehingga semakin kuat kemampuan ikatan hidrogen suatu senyawa maka semakin kuat akan tertahan pada silika gel (Noviyanti, 2010).

Pada penelitian ini digunakan variasi metode berdasarkan pembuatan fase diam. Kusmiyati (2011) mengisolasi zat aktif dari rimpang kunyit putih dengan metode kromatografi kolom menggunakan pembuatan fase diam cara basah. Pada pembuatan fase diam cara basah ini, silika gel yang telah diaktivasi kemudian dicampur dengan eluen yang akan digunakan hingga homogen dan tidak terbentuk gelembung udara. Campuran silika dan eluen ini dikenal dengan istilah bubuk

silika. Bubur inilah yang kemudian dimasukkan kedalam kolom, dimampatkan dengan cara diketok-ketok hingga diperoleh fase diam yang rapat.

Selain fase diam dalam kolom harus memiliki kerapatan yang maksimal. Fase diam juga harus dijaga agar tidak kering dan selalu terendam eluen sehingga tidak terjadi retakan. Jika fase diam retak maka harus dikeluarkan karena tidak dapat digunakan untuk proses elusi.

Pembuatan fase diam cara kering berbeda dengan cara basah. Jika pada cara basah silika gel dibuat bubur silika terlebih dahulu sebelum dimasukkan kedalam kolom. Saat proses aktivasi silika melepas air yang terikat dan bersifat polar. Silika bertambah keasamannya pada pembuatan bubur silika dengan eluen (Priyatno, 2013). Pada pembuatan fase diam cara kering ini silika yang telah diaktivasi langsung dimasukkan dalam kolom dan dibantu dengan vakum agar kerapatan fase diam terjaga. Suryani (2011) mengisolasi senyawa triterpenoid dari tumbuhan kecap menggunakan metode pembuatan fase diam cara kering.

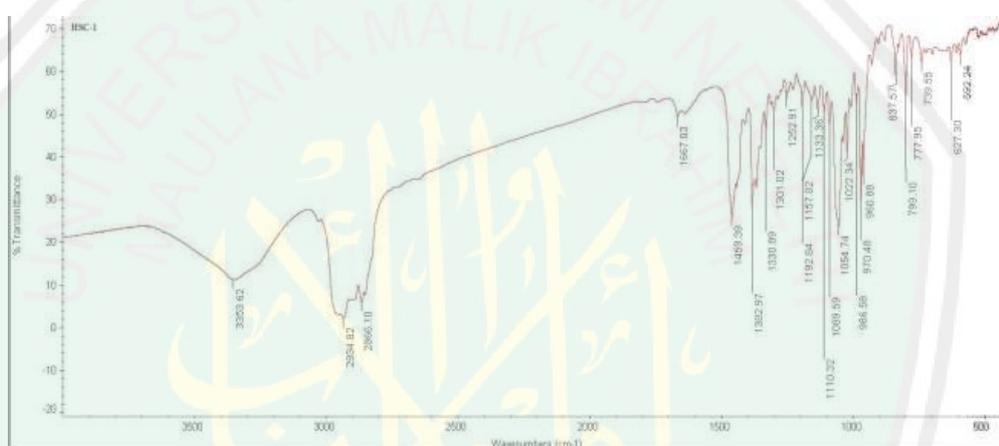
2.9 Identifikasi Gugus Fungsi Menggunakan Spektrofotometer FT-IR

Spektroskopi IR (Infra red) merupakan salah satu metode spektroskopi yang digunakan untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam suatu molekul. Ini karena gugus fungsi tersebut menunjukkan serapan yang spesifik pada daerah infra merah. Spektrum IR khas untuk senyawa tertentu, sehingga metode ini tepat untuk menentukan struktur senyawa yang belum dikenal yaitu dengan cara membandingkannya terhadap senyawa yang sudah diketahui.

Bagian kiri spektrum inframerah yaitu daerah $1400-4000\text{ cm}^{-1}$ (2,5 sampai kira-kira $7,1\text{ }\mu\text{m}$) merupakan daerah khusus untuk identifikasi gugus fungsional.

Daerah di bawah 1400 cm^{-1} biasanya senyawa organik memiliki serapan yang unik. Serapan di daerah ini seringkali sangat rumit sehingga bagian pada spektrum ini disebut daerah sidik jari (Fessenden, 1986).

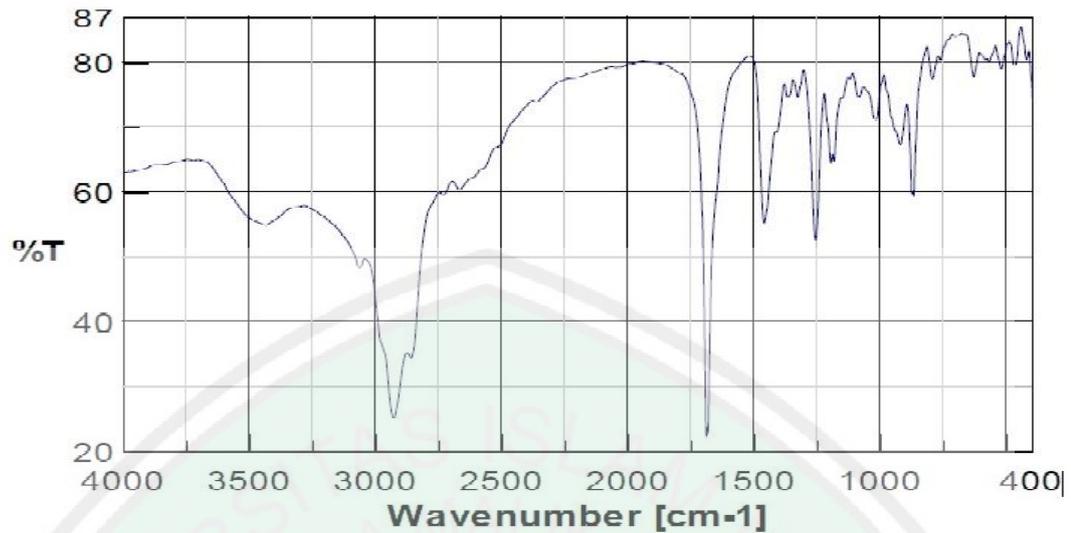
Beberapa spektra IR dari senyawa triterpenoid yang berhasil diisolasi, antara lain Jasani, dkk (2012) telah mengisolasi senyawa triterpenoid dari pada *Hyptis suaveolens* menggunakan kromatografi kolom dan identifikasi menggunakan FT-IR. Berikut spektra IR dan interpretasinya:



Gambar 2.9 Spektra IR Senyawa Triterpenoid dari akar *Hyptis suaveolens*

Berdasarkan spektra dapat diinterpretasikan bahwa isolat tersebut memiliki gugus beberapa serapan, antara lain pada bilangan gelombang 3353.62 cm^{-1} terjadi serapan O-H, terdapat gugus C-H pada bilangan gelombang 2934.82 cm^{-1} dan 2866.10 cm^{-1} . Pada bilangan gelombang 1667.3 cm^{-1} menunjukkan serapan C=C. Pada bilangan gelombang 1459.39 cm^{-1} dan $1382,97\text{ cm}^{-1}$ terjadi serapan C-H. Serapan C=O pada bilangan gelombang 1054.74 cm^{-1} serta pada bilangan gelombang 739.55 cm^{-1} menunjukkan serapan gugus $-\text{CH}_2$.

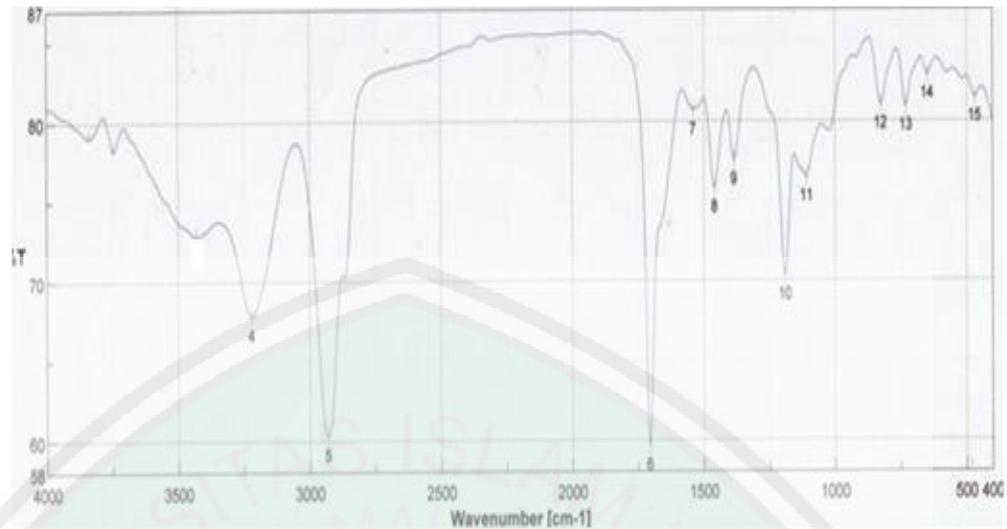
Spektra IR senyawa triterpenoid dari kulit batang srikaya yang diisolasi oleh Ridhia, dkk., (2013).



Gambar 2.10 Spektra IR Senyawa Triterpenoid Kulit Batang Srikaya

Berdasarkan gambar 2.7 dapat diinterpretasikan bahwa terjadi beberapa serapan penting pada bilangan gelombang 3440 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya regangan -OH. Terdapat regangan gugus C-O ditunjukkan pada bilangan gelombang 1199 cm⁻¹. Selain itu, pada bilangan gelombang 1686 cm⁻¹ terdapat regangan C=O. Adanya -CH₂ dan -CH₃ ditunjukkan pada bilangan gelombang 2931 cm⁻¹, yang didukung dengan adanya tekukan -CH pada bilangan gelombang 1463 cm⁻¹. Pada bilangan gelombang 1372 cm⁻¹ terdapat serapan gugus geminal dimetil.

Utama, dkk (2013) mengkarakterisasi senyawa triterpenoid dari kulit batang kecap menggunakan spektroskopi IR dan diperoleh spektra sebagai berikut:



Gambar 2.11 Spektra IR Senyawa Triterpenoid Kulit Batang Kecapi

Pada spektra memperlihatkan beberapa angka gelombang, yaitu pita serapan OH bebas pada vibrasi regangan didaerah 3220 cm^{-1} yang didukung oleh adanya C-O stretching pada daerah 1190 cm^{-1} . Pada angka gelombang 2931 cm^{-1} mengindikasikan adanya puncak C-H alifatis. Pada angka gelombang 1705 menurut literatur mengidindikasikan adanya gugus C=O keton .Geminal dimetil yang merupakan serapan khas senyawa golongan terpenoid ditunjukkan pada daerah 1384 cm^{-1} dan 1458 cm^{-1} .

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

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

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, rotary evaporator, spektrofotometer FT-IR merk Varian tipe FT-100, saringan 60-90 mesh, hotplate, pisau, desikator, *aluminium foil*, inkubator shaker, corong pisah, kolom kromatografi, statif dan seperangkat alat gelas laboratorium.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini alga merah (*Eucheuma spinosum*) yang berasal dari pantai Jumiang, Pamekasan Madura, metanol p. a 99,9%, petroleum eter p. a, akuades, HCl p. a 37 %, H₂SO₄ p. a 98 %, etanol p. a 96 %, glass woll, kloroform p. a, n-heksana p. a 99%, etil asetat p. a, silika Gel G-60 (0,063 – 0,200 mm), plat silika gel G F₂₅₄, dan NaHCO₃ p. a (Semua bahan kimia dan plat KLT yang digunakan dari Merck).

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif kualitatif. Diawali dengan pengambilan sampel *Eucheuma spinosum* lalu dikering anginkan. Dilakukan uji

kadar air pada sampel kering. Sampel kering kemudian digiling dengan ukuran 60-90 mesh. Serbuk sampel dimaserasi menggunakan pelarut metanol 99,9 %. Selanjutnya ekstrak kasar dihidrolisis menggunakan HCl 2 N. Setelah itu, difraksinasi dengan pelarut petroleum eter p. a, diambil fase organik, dipekatkan dan dilakukan uji fitokimia dengan reagen untuk mengetahui senyawa aktif pada fraksi P.E. Ekstrak yang diperoleh dipisahkan dengan KLT Analitik untuk memastikan eluen yang digunakan adalah terbaik. Eluen yang digunakan adalah n-heksana;etil asetat dengan variasi perbandingan volume yaitu, 4:1; 4,5:0,5 dan 4.25:0.75 mL. Kemudian ekstrak dipisahkan dengan metode kromatografi kolom menggunakan eluen terbaik hasil KLTA. Ada dua variasi yang dilakukan pada pembuatan fase diam, yaitu cara kering dan cara basah. Hasil pemisahan lalu dimonitoring menggunakan KLT. Monitoring I dilakukan dengan diambil tiap 10 vial eluat hasil elusi (vial ke 1, 10, 20, 30 sampai vial terakhir). Kemudian hasil monitoring I dimonitoring kembali dengan diambil tiap 2 vial hingga diperoleh batas antara vial murni dan campuran dengan memperhatikan kenampakan noda dan nilai Rf. Spot yang positif senyawa triterpenoid kemudian diidentifikasi gugus fungsinya menggunakan Spektrofotometer FT-IR.

3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan-tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu:

1. Preparasi sampel,
2. Analisis kadar air,
3. Ekstraksi sampel ,
4. Hidrolisis dan partisi ekstrak pekat metanol,

5. Identifikasi senyawa triterpenoid pada fraksi P.E
6. Pemisahan triterpenoid dengan metode KLT Analitik
7. Pemisahan dengan metode kromatografi kolom,
8. Monitoring spot dengan KLTA , penggabungan dan pemekatan fraksi,
9. Identifikasi gugus fungsi menggunakan Spektrofotometer FT-IR.

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Preparasi Sampel

Preparasi sampel dilakukan dengan mengambil seluruh bagian alga merah (*E.spinosum*) sebanyak 30 Kg lalu dipotong kecil-kecil, dicuci dan dikering anginkan. Kemudian dihaluskan menggunakan mesin penghalus dengan ukuran serbuk 60-90 mesh. Selanjutnya dikeringkan dengan oven pada suhu 38 °C.

3.5.2 Analisis Kadar Air (AOAC, 1984)

Analisis kadar air dilakukan pada semua bagian *E.spinosum*. Cawan dipanaskan dalam oven pada suhu 100 – 150 °C selama 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya, kemudian cawan disimpan dalam desikator sekitar 10 menit. Cawan selanjutnya ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Potongan *E. spinosum* dimasukkan ke dalam cawan yang telah diketahui berat konstannya sebanyak 2,5 gram dan dikeringkan ke 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:

$$\text{Kadar air} = \frac{b-c}{b-a} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.1)$$

Keterangan: a= berat cawan kosong
 b= berat cawan + sampel sebelum dikeringkan
 c= berat cawan + sampel setelah dikeringkan

3.5.3 Ekstraksi Sampel (Anam, dkk., 2015)

Ekstraksi komponen aktif pada *E. spinosum* dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi atau perendaman dengan pelarut metanol. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan karena dimungkinkan bahwa kandungan senyawa pada tanaman sudah cukup banyak yang terekstrak pada masing-masing tahapnya. Serbuk *E. spinosum* ditimbang sebanyak 150 gram dan diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut metanol 900 mL di dalam erlenmeyer dan diaduk dengan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm (*rotations per minute*) selama 3 jam. Kemudian disaring dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut dan perlakuan yang sama sampai 3 kali pengulangan atau sampai diperoleh filtrat yang cukup bening. Selanjutnya ketiga filtrat yang diperoleh digabung menjadi satu. Kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat ditimbang dan dihitung rendemennya dengan persamaan:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak metanol}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.4)$$

3.5.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol (Setiyawan, dkk., 2015)

Ekstrak pekat metanol diambil sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam *beaker glass*, kemudian dihidrolisis dengan menambahkan 10 mL HCl 2 N ke dalam ekstrak pekat. Hidrolisis dilakukan selama 1 jam menggunakan *magnetic stirrer hot plate* pada suhu ruang (Tensiska, dkk., 2007). Hidrolisat yang

diperoleh ditambahkan dengan natrium bikarbonat sampai pH-nya netral, lalu hidrolisat dipartisi menggunakan 25 mL pelarut petroleum eter. Proses partisi dilakukan dengan dua kali pengulangan. Ekstrak hasil partisi dipekatkan dengan *rotary evaporator* lalu dialiri dengan gas N₂, ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemennya.

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Berat fraksi P.E}}{\text{Berat ekstrak metanol}} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.5)$$

3.5.5 Identifikasi Senyawa Triterpenoid dengan Uji Reagen (Mardiyah, dkk., 2014)

Fraksi P.E *E.spinosum* diambil 1 mg dan dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Campuran ini selanjutnya ditambah 1 – 2 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan 2 pelarut menunjukkan adanya triterpenoid.

3.5.6 Penentuan Eluen Terbaik dengan Metode KLT Analitik

Pemisahan dengan KLT Analitik dilakukan menggunakan plat silika gel GF₂₅₄ dengan ukuran 1x10 cm. KLTA ini bertujuan untuk menentukan eluen terbaik untuk pemisahan selanjutnya dengan kromatografi kolom.

Plat silika diberi tanda batas atas dan bawah sebesar 1 cm. Kemudian diaktivasi dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100 °C selama 30 menit. Ekstrak pekat sampel diencerkan dengan konsentrasi 1000 ppm, dengan cara diambil sampel 0,05 gram kemudian dilarutkan dalam pelarut P.E 50 mL. Sampel ditotolkan pada jarak ±1 cm dari tepi bawah plat menggunakan pipa kapiler. Plat dielusi dengan eluen n-heksana;etil asetat menggunakan perbandingan 4:1; 4,5:0,5 dan 4,25:0,75. Setelah gerakan fase gerak sampai pada batas atas, maka proses

elusi dihentikan. Noda-noda yang dihasilkan kemudian diperiksa dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. Spot yang terbentuk ditandai menggunakan pensil, kemudian disemprot dengan reagen LB.

3.5.7 Isolasi Senyawa Triterpenoid Menggunakan Kromatografi Kolom

Pemisahan dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi kolom. Eluen yang dipakai adalah eluen terbaik hasil KLTA. Fase diam yang digunakan adalah silika gel G-60 (0,063-0,200 mm). Kolom yang digunakan berdiameter 1,5 cm, silika gel yang digunakan sebanyak 10 gr dan kecepatan alir saat proses elusi adalah 2 mL/menit. Selain itu, ada dua variasi metode yang digunakan dalam pembuatan fase diam yaitu, pembuatan fase diam cara basah dan cara kering.

3.5.7.1 Pembuatan Fase Diam Cara Kering (Suryani, 2011)

Pembuatan fase diam cara kering yaitu diisi kolom dengan glasswool pada bagian bawah. Diaktivasi silika gel G-60 dengan pemanasan menggunakan oven selama 2 jam pada 110 °C. Kemudian didinginkan silika gel dalam desikator selama 15 menit. Dimasukkan silika gel G-60 ke dalam kolom dan selama penambahan ini kolom diketok-ketok untuk memampatkan fase diam. Selanjutnya ditambahkan eluen secara perlahan hingga silika dalam kolom terendam eluen. Sampel diambil 0,2 gram dicampur dengan 1 mL eluen. Selanjutnya kran sedikit dibuka dan dikeluarkan eluen hingga tersisa diatas fase diam namun tidak melebihi fase diam. Setelah itu, kran ditutup dan dimasukkan campuran sampel dan eluen menggunakan pipet dan ditunggu hingga sampel turun. Selanjutnya ditambahkan eluen, kran dibuka, dilakukan elusi kemudian eluat ditampung setiap

2 mL dalam botol vial. Elusi dilakukan dengan menjaga agar silika gel dalam kolom selalu terendam eluen.

3.5.7.2 Pembuatan Fase Diam Cara Basah (Kusmiyati, 2011)

Silika gel G-60 diaktivasi menggunakan oven pada suhu 110 °C selama 2 jam lalu didinginkan dalam desikator selama 15 menit. Kolom bagian bawah diisi *glasswool* dan eluen (n-heksana : etil asetat). Dibuat bubur silika gel dengan dimasukkan silika gel dalam *beaker glass* lalu ditambahkan eluen, diaduk hingga homogen, tidak ada gelembung udara, dimasukkan bubur silika gel kedalam kolom dan didiamkan selama 24 jam. Sampel diambil 0,2 gram dicampur dengan 1 mL eluen. Selanjutnya kran sedikit dibuka dan dikeluarkan eluen hingga tersisa diatas fase diam namun tidak melebihi fase diam. Setelah itu, kran ditutup dan dimasukkan campuran sampel dan eluen menggunakan pipet dan ditunggu hingga sampel turun. Selanjutnya ditambahkan eluen, kran dibuka, dilakukan elusi kemudian eluat ditampung setiap 2 mL dalam botol vial. Selain itu, elusi dilakukan dengan menjaga agar silika gel dalam kolom selalu terendam eluen.

3.5.8 Monitoring Spot dengan KLT, Penggabungan dan Pemekatan Fraksi (Asih, 2010)

Fraksi-fraksi yang didapat dari pemisahan kromatografi kolom kemudian dimonitoring dengan KLTA. Monitoring I dilakukan dengan cara diambil tiap 10 vial yaitu vial ke 1, 10, 20, 30, 40 sampai vial terakhir.. Hasil monitoring kemudian dikelompokkan berdasarkan noda dan nilai Rf yang muncul. Kelompok fraksi dari monitoring I dimonitoring kembali dengan cara diambil tiap 2 vial. Sehingga dapat dilakukan penyederhanaan fraksi dengan cara penggabungan fraksi berdasarkan pola noda dan Rf yang sama dari hasil KLT.

Eluen yang digunakan sebagai fase gerak adalah eluen pada kromatografi kolom dan digunakan plat silika gel F₂₅₄ dengan ukuran 10x10 cm. Eluen dijenuhkan dalam bejana pengembang selama 1 jam. Plat silika gel ditandai 1cm pada batas atas dan bawah, lalu diaktivasi dengan dioven selama 30 menit. Kelompok tiap fraksi ditotolkan pada plat KLT 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, disemprot dengan reagen LB lalu diamati dibawah lampu UV 366 nm dan dihitung Rf tiap noda.

3.5.9 Identifikasi Gugus Fungsi Menggunakan Spektrofotometer FT-IR

Isolat triterpenoid yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan FT-IR. Spektra yang dihasilkan lalu dianalisa untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam isolat.

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisa secara deskriptif yaitu dengan memperhatikan pola pemisahan berdasarkan hasil monitoring I pada fraksi dengan diambil tiap 10 vial (vial ke 1, 10, 20, 30, 40 sampai vial terakhir) yang terbentuk pada kromatografi kolom dari pembuatan fasa diam cara basah dan cara kering. Fraksi hasil monitoring I dimonitoring kembali dengan diambil tiap 2 vial hingga diperoleh batas vial murni dan campuran. Identifikasi kemurnian senyawa triterpenoid dapat diketahui dengan melakukan analisis hasil uji KLT Analitik dari pengukuran Rf dan kenampakan noda. Data ditampilkan dalam bentuk tabel dan diinterpretasikan berdasarkan tabel tersebut. Isolat murni yang positif senyawa

triterpenoid kemudian diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR dengan memperhatikan gugus fungsinya.



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi sampel

Sampel yang digunakan adalah alga merah jenis *Eucheuma spinosum* yang diperoleh dari pantai Jumiang Pamekasan, Madura. Sampel dicuci untuk menghilangkan kotoran yang menempel dan dipotong kecil-kecil untuk mempercepat proses pengeringan. Sampel dikeringkan tanpa sinar matahari langsung bertujuan untuk menghindari kerusakan atau rusaknya senyawa aktif yang diinginkan. Pengeringan juga bertujuan untuk menghilangkan air dalam sampel sehingga proses ekstraksi dapat berjalan maksimal.

Sampel kemudian dihaluskan untuk memperluas permukaan sampel. Sampel yang telah halus disaring menggunakan ayakan 60-90 mesh, untuk mendapatkan sampel dengan ukuran yang sama. Semakin kecil ukuran sampel maka luas permukaan sampel semakin besar (Voight, 1995), sehingga kontak sampel dengan pelarut saat proses ekstraksi akan semakin cepat. Serbuk sampel yang memiliki tingkat kehalusan yang tinggi memungkinkan terjadinya kerusakan sel-sel yang lebih optimal, sehingga pengambilan senyawa aktif dalam sampel semakin mudah oleh pelarut.

4.2 Analisis kadar air

Analisis kadar air menggunakan metode *thermogravimetri*. Prinsip dari metode ini adalah pemanasan dan penimbangan. Simplisia *Eucheuma spinosum* dioven pada suhu 105 – 110° C karena air mempunyai titik didih 100 °C. Sehingga untuk menguapkan air dibutuhkan suhu di atas titik didihnya. Kemudian

sampel didiamkan dalam desikator untuk mencegah kontak sampel dengan udara luar. Pengovenan dilakukan secara berulang-ulang hingga diperoleh berat konstan. selisih berat sampel sebelum pemanasan dan sesudah pemanasan menunjukkan jumlah air yang teruapkan. Analisis kadar air bertujuan untuk mengetahui kandungan air dalam sampel *E. spinosum*. Hal ini karena kadar air dalam *E. spinosum* berpengaruh pada hasil maserasi. Semakin tinggi kadar air sampel maka konsentrasi pelarut akan semakin rendah karena telah bercampur dengan kadar air sampel dan sebaliknya. Perubahan konsentrasi suatu pelarut akan merubah kepolaran dari pelarut tersebut sehingga akan berpengaruh pada hasil ekstraksi.

Selain itu, kadar air sampel perlu diketahui untuk meningkatkan daya simpan sampel. Hal ini berkaitan dengan aktivitas mikrobiologi dalam sampel. Jika kadar air tinggi akan menyebabkan sampel memiliki kelembaban yang lebih tinggi, sehingga sampel mudah terdegradasi oleh mikroorganisme, tumbuh jamur dan penguraian oleh enzim.

Hasil analisis kadar air *E. spinosum* segar diperoleh sebesar 93,04%, dan pada sampel kering sebesar 7,73%. Kestabilan optimum bahan dapat tercapai dan pertumbuhan mikroba dalam sampel dapat dikurangi jika suatu sampel memiliki kadar air dibawah 11 % (Puspita, 2011). Selain itu, kadar air maksimum yang disyaratkan agar proses ekstraksi dapat berjalan lancar adalah 11 % (Sulistijowati, 2011).

4.3 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi menggunakan metode maserasi bertujuan untuk mengekstrak senyawa aktif yang terdapat dalam *E. spinosum*. Pada saat maserasi serbuk kering

E. spinosum direndam menggunakan pelarut metanol dan terjadi proses difusi. Proses difusi terjadi karena adanya perbedaan konsentrasi larutan, pelarut metanol yang memiliki konsentrasi lebih tinggi akan masuk ke dalam sel *E. spinosum* melalui dinding sel. Seluruh isi sel akan larut ke dalam pelarut metanol yang ada di dalam sel. Sehingga konsentrasi larutan dalam sel lebih tinggi daripada larutan diluar sel dan terjadi proses difusi. Ekstrak metanol yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vacuum*. Ekstrak metanol sebelum dipekatkan awalnya berwarna kuning kehijauan, setelah dipekatkan menjadi kecoklatan yang diakibatkan pelarut telah menguap.

Rendemen ekstrak metanol *E. spinosum* diperoleh sebesar 3,193 %. Hasil ini lebih kecil dibandingkan dengan penelitian Afif (2013) yaitu sebesar 16,99 %. Perbedaan rendemen dapat dikarenakan perbedaan kadar air sampel. Pada penelitian ini kadar air sebesar 7,73 % sedangkan penelitian Afif sebesar 4,74 %. Kadar air berpengaruh terhadap rendemen hasil ekstraksi. Apabila kadar air sampel tinggi maka konsentrasi pelarut kecil karena telah bercampur dengan air yang terkandung dalam sampel *E. spinosum*

4.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Peekat Metanol

Ekstrak metanol yang diperoleh kemudian dihidrolisis dengan HCl 2N dan dipartisi dengan pelarut petroleum eter. Hidrolisis bertujuan untuk memutus ikatan glicosida sehingga diperoleh senyawa triterpenoid tunggal. Senyawa triterpenoid banyak ditemukan dalam jaringan tanaman sebagai glikosida (Harborne, 1987).

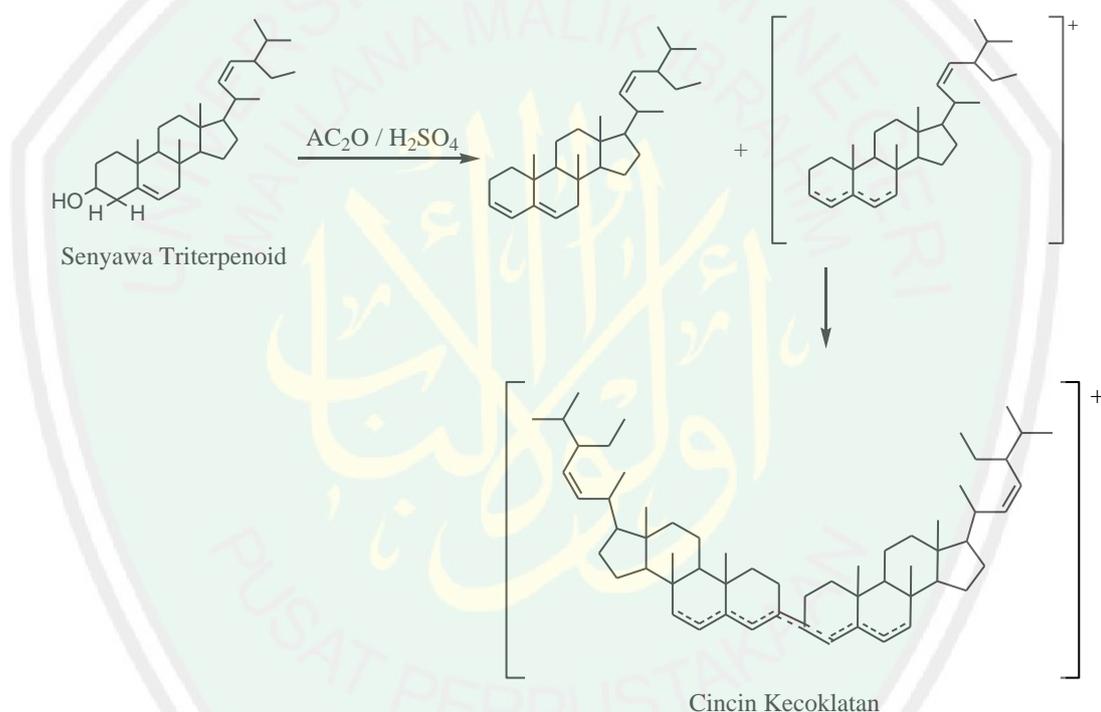
Hidrolisat yang diperoleh bersifat asam, kemudian di netralkan menggunakan NaHCO_3 . Hidrolisat yang telah netral kemudian difraksinasi menggunakan pelarut petroleum eter. Pemilihan pelarut petroleum eter dikarenakan senyawa triterpenoid yang akan diisolasi memiliki sifat kepolaran yang mirip dan larut dalam pelarut petroleum eter. Setiyawan (2015) telah memfraksinasi ekstrak metanol *E. spinosum* menggunakan petroleum eter dan diperoleh positif triterpenoid dan steroid. Proses fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair, yang memiliki prinsip yaitu distribusi suatu zat diantara dua pelarut yang tidak saling campur. Fraksi petroleum eter yang telah dipisahkan, diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* untuk memisahkan pelarutnya dan diperoleh rendemen sebesar 14,072%.

4.5 Identifikasi Senyawa Triterpenoid dengan Uji Reagen

Identifikasi adanya senyawa triterpenoid pada fraksi petroleum eter dilakukan menggunakan reagen Libermann Burchard. Reagen LB merupakan reagen yang spesifik untuk uji senyawa triterpenoid dan steroid (Kristanti, 2008). Prinsip dasar dari uji LB adalah senyawa triterpenoid dapat mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat yang akan membentuk garam dengan memberikan sejumlah reaksi warna (Robinson, 1995). Asam kuat yang digunakan dalam uji ini adalah asam sulfat pekat. Jika fraksi positif senyawa triterpenoid akan muncul cincin coklat pada perbatasan pelarut, sedangkan untuk senyawa steroid akan menghasilkan warna hijau-kebiruan (Burke, dkk., 1997).

Fraksi petroleum eter dilarutkan dengan kloroform dan ditambahkan dengan anhidrida asetat kemudian ditambahkan H_2SO_4 pekat (Mardiyah, dkk.,

2014). Reaksi yang terjadi pada uji Liebermann-Burchard merupakan reaksi esterifikasi (Anam, 2013). Siadi (2012), telah melakukan uji fitokimia pada ekstrak bungkil biji jarak pagar (*Jatropha curcas*) yang digunakan untuk biopestisida. Salah satu uji menggunakan reagen LB dan diperoleh pada ekstrak tersebut terbentuk cincin kecoklatan yang menandakan positif senyawa triterpenoid. Berikut dugaan reaksi yang terjadi pada senyawa triterpenoid pada Gambar 4.1

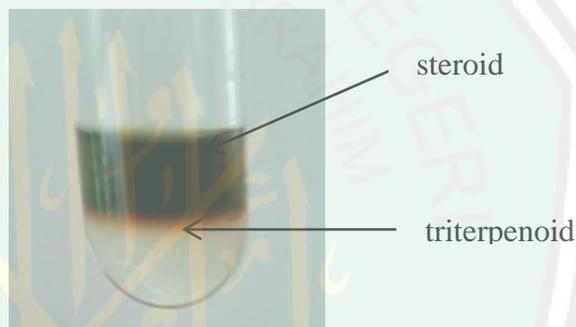


Gambar 4.1 Dugaan Reaksi antara Senyawa Triterpenoid dengan Reagen LB

Menurut Siadi (2012) menjelaskan bahwa saat H_2SO_4 pekat diteteskan melalui dinding tabung reaksi, ia akan bereaksi dengan anhidrida asetat sehingga terbentuk karbokation pada atom C anhidrida asetat (asetilasi). Kemudian karbokation akan bereaksi dengan atom O pada gugus OH yang ada pada senyawa

triterpenoid sehingga terbentuklah senyawa ester pada senyawa triterpenoid dengan anhidrida asetat. Selanjutnya terjadi pelepasan gugus hidrogen beserta elektronnya, mengakibatkan ikatan rangkap berpindah. Senyawa ini mengalami resonansi yang bertindak sebagai karbokation. Serangan karbokation menyebabkan adisi elektrofilik, diikuti pelepasan hidrogen. Kemudian gugus hidrogen beserta elektronnya dilepas, akibatnya senyawa mengalami perpanjangan konjugasi yang memperlihatkan terbentuknya cincin kecoklatan.

Berikut hasil uji Liberman Burchard pada Gambar 4.2 di bawah ini



Gambar 4.2 Hasil Uji Liberman Burchard

Hasil pengujian pada Gambar 4.2 menunjukkan terbentuknya cincin berwarna kecoklatan, yang menandakan fraksi petroleum eter mengandung senyawa triterpenoid, dan warna hijau menunjukkan adanya senyawa steroid. Setiyawan (2015) melakukan identifikasi senyawa triterpenoid pada fraksi petroleum eter *E. spinosum* dan menunjukkan hasil positif senyawa triterpenoid dan steroid.

4.6 Penentuan Eluen Terbaik Menggunakan KLT Analitik

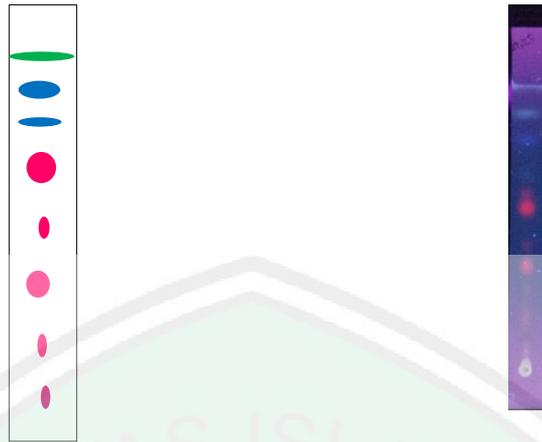
Fraksi petroleum eter *E. spinosum* yang telah positif senyawa triterpenoid kemudian dipisahkan menggunakan KLT Analitik. KLT Analitik ini bertujuan untuk menentukan fase gerak terbaik yang akan digunakan pada pemisahan

menggunakan kromatografi kolom. Noda-noda yang dihasilkan pada plat KLT kemudian diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. Spot kemudian disemprot dengan reagen LB. Berikut spot hasil KLTA dari ketiga variasi fase gerak dapat dilihat pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Hasil Penentuan Eluen Terbaik Menggunakan KLTA

Perbandingan Eluen (mL)	Rf	Warna	Senyawa
4:1	0,375	Ungu	Triterpenoid
	0,625	Merah	Triterpenoid
	0,812	Merah	Triterpenoid
	0,925	Biru	Steroid
	0,975	Biru	Steroid
4,5:0,5	0,131	Merah	Triterpenoid
	0,263	Merah	Triterpenoid
	0,394	Biru	Steroid
	0,526	Biru	Steroid
	0,684	Hijau	Steroid
4,25:0,75	0,096	Ungu	Triterpenoid
	0,165	Merah	Triterpenoid
	0,344	Merah	Triterpenoid
	0,551	Merah	Triterpenoid
	0,613	Merah	Triterpenoid
	0,668	Biru	Steroid
	0,813	Biru	Steroid
	0,910	Hijau	Steroid

Spot hasil pemisahan KLT Analitik terbaik diilustrasikan pada Gambar 4.2 di bawah ini, sedangkan hasil KLT Analitik untuk 3 perbandingan lebih lengkap ada pada lampiran.



Gambar 4.3 Ilustrasi Hasil KLTA pada eluen n-heksana;etil asetat (4,25;0,75 mL)

Berdasarkan Tabel 4.1 dan Gambar 4.3 diperoleh 8 spot pada plat KLT. Spot pertama berwarna ungu, spot kedua hingga kelima berwarna merah kedua warna tersebut menandakan senyawa triterpenoid. Pereaksi Liebermann Burchard yang disemprotkan pada plat KLT akan menghasilkan berbagai warna untuk senyawa triterpenoid, hal ini dikarenakan ada berbagai jenis senyawa triterpenoid yang terdapat di alam (Harborne, 1987). Warna tersebut antara lain, warna merah ungu, ungu (Asih (2010); Rita (2010); Setiyawan (2015)), merah (Setiyawan (2015); Rumondang (2013); Utama (2013); Suryani (2011)) Kemudian spot keenam dan ketujuh berwarna biru. Sedangkan spot kedelapan berwarna hijau, kedua warna tersebut menandakan senyawa steroid. Setelah di semprot reagen LB maka senyawa steroid menghasilkan beberapa warna, hijau kebiruan (Astuti, 2014), hijau (Saleh, 2007) dan warna biru (Setiyawan, 2015). Dikarenakan perbandingan fase gerak n-heksana;etil asetat 4,25;0,75 mL mampu memisahkan senyawa triterpenoid terbanyak, maka pada isolasi menggunakan kromatografi kolom digunakan perbandingan fase gerak tersebut.

4.7 Isolasi Senyawa Triterpenoid menggunakan Kromatografi Kolom

4.7.1 Kromatografi Kolom Cara Kering

Pembuatan fase diam cara kering dikenal juga dengan kolom vakum cair (KVC). Pada pembuatan fase diam cara kering tanpa dilakukan pembuatan bubuk silika dan tanpa didiamkan selama 24 jam. Pada pembuatan fase diam cara kering silika gel yang telah diaktivasi langsung dimasukkan kedalam kolom kromatografi selanjutnya kolom divakum untuk memampatkan fase diam dalam kolom.

Fase diam berupa silika gel terlebih dahulu diaktivasi dengan pemanasan. Proses aktivasi ini bertujuan untuk menghilangkan molekul air yang terdapat dalam silika sehingga interaksi antara fase diam, fase gerak dan senyawa yang akan dipisahkan maksimal dan diperoleh hasil pemisahan yang baik. Setelah silika gel didalam kolom rapat kemudian sampel dimasukkan kedalam kolom dan di atasnya ditaburi silika gel. Perbandingan fase diam dan sampel adalah 50:1 telah sesuai dengan literatur (Markham, 1998). Kemudian eluen dialirkan kedalam kolom melalui bagian atas kolom dan dilakukan elusi.

Kerapatan silika gel di dalam kolom ini terlihat karena setelah pemvakuman terjadi penurunan tinggi kolom yaitu dari 14,8 cm menjadi 14,6 cm. Pada isolasi senyawa triterpenoid menggunakan kromatografi kolom dengan pembuatan fase diam cara kering diambil hingga 153 vial. Kemudian dilakukan monitoring dengan metode KLT dan penyemprotan dengan reagen Liebermann-Burchard yang bertujuan untuk menyederhanakan fraksi yang diperoleh sehingga fraksi yang memiliki noda spot dan Rf yang sama dapat dicampur sehingga diperoleh gabungan fraksi yang lebih besar.

Proses monitoring I dilakukan dengan diambil tiap 10 vial dari vial ke 1, 10, 20, 30, 40, 50 sampai 153. Plat KLT yang telah dielusi kemudian disemprot dengan reagen LB dan dilihat di bawah lampu UV 366 nm. Hasil monitoring I menunjukkan pada vial ke-1 tidak menghasilkan noda (kosong). Vial ke-10 menghasilkan 1 noda berwarna hijau. Vial ke-20 dan 30 menghasilkan 2 noda (campur), pada vial-40, 50, 60 dan 70 menghasilkan 1 noda berwarna merah dengan Rf yang sama. Pada vial-80, 90 dan 100 menghasilkan 1 noda berwarna merah dengan Rf yang berbeda. Vial ke-110 dan 120 menghasilkan 1 noda biru dengan Rf sama. Dan pada vial ke-130, 140, 150 dan 153 tidak menghasilkan noda (kosong). Maka vial yang masih berupa campuran, vial yang memiliki warna noda sama namun berbeda Rf dan vial yang menghasilkan warna noda berbeda di monitoring kembali dengan cara diambil tiap 2 vial hingga diperoleh batas vial yang mengandung 1 noda dengan yang campuran (skema monitoring dilampirkan dalam lampiran 1.1). Vial yang mengandung satu noda digabung dan diperoleh 5 gabungan fraksi murni seperti pada Tabel 4.2

Tabel 4.2 Fraksi Hasil Kromatografi Kolom dengan pembuatan fase diam cara kering

Fraksi	Senyawa	Warna	Rf	Berat (mg)
K.1 (10 – 14)	Steroid	Hijau	0,385	1,9
K.2 (40 - 82)	Triterpenoid	Merah	0,112	1,5
K.3 (86 – 108)	Triterpenoid	Merah	0,038	1,3
K.4 (110 – 120)	Steroid	Biru	0,688	1,0
K.5 (122 – 140)	Triterpenoid	Merah	0,025	2,4

Berdasarkan hasil monitoring KLT pada isolat menggunakan kromatografi kolom cara kering diperoleh 3 fraksi yang positif senyawa triterpenoid memiliki berat

senyawa murni pada fraksi K.2 sebesar 1,3 mg; fraksi K.3 sebesar 1,3 mg dan fraksi K.5 sebesar 2,4 mg.

Hasil KLTA diperoleh 5 spot positif senyawa triterpenoid dengan Rf yang berbeda, sedangkan pada hasil kromatografi kolom cara kering hanya menghasilkan 3 fraksi senyawa triterpenoid dengan RF yang berbeda. Akan tetapi isolasi menggunakan kromatografi kolom lebih baik dari pada KLTA, hal ini dikarenakan pada vial hasil kromatografi kolom yang masih berupa campuran masih dapat dilakukan pemisahan kembali (rekromatografi kolom). Pada hasil kromatografi kolom cara kering vial ke-7 – 9; 15; 16 – 18 dan 20 – 29 merupakan fraksi yang masih campuran maka fraksi tersebut dapat dipisahkan kembali sehingga diperoleh fraksi senyawa triterpenoid yang lebih banyak.

4.7.2 Kromatografi Kolom Cara Basah

Pembuatan fase diam cara basah juga dikenal dengan istilah bubuk silika. Bubur silika yang terbentuk selanjutnya dimasukkan kedalam kolom kromatografi secara perlahan untuk mengurangi terbentuknya gelembung udara didalam kolom. fase diam kemudian didiamkan selama 24 jam. Setelah didiamkan selama 24 jam diperoleh ketinggian fase diam mengalami penurunan dari 18 cm menjadi 16 cm hal ini menandakan bahwa pendiaman ini bertujuan untuk memampatkan fase diam tersebut.

Perlakuan pada isolasi menggunakan cara basah sama dengan cara kering hanya berbeda pada pembuatan fase diamnya saja. Pada kromatografi kolom cara basah diperoleh 157 vial. Proses monitoring sama dengan monitoring pada cara kering yaitu dengan diambil tiap 10 vial dari vial nomor 1, 10, 20, 30, 40, 50

sampai 157. Hasil monitoring pertama menunjukkan pada vial ke-1 dan 10 tidak berwarna (kosong), vial ke -20 menghasilkan 1 noda berwarna hijau, pada vial ke 30 menghasilkan 3 noda, 2 noda berwarna merah dan 1 noda berwarna biru. Pada vial ke 40 dan 50 menghasilkan 2 noda berwarna merah. Vial ke-60, 70 dan 80 menghasilkan 1 noda merah dengan Rf sama. Vial ke-90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 dan 157 tidak menghasilkan warna (kosong). Maka vial yang masih berupa campuran, vial yang memiliki warna noda sama namun berbeda Rf dan vial yang menghasilkan warna noda berbeda di monitoring kembali dengan cara diambil tiap 2 vial hingga diperoleh batas vial yang mengandung 1 noda dengan yang campuran (skema monitoring dilampirkan pada Lampiran 1.2). Vial yang mengandung satu noda digabung dan diperoleh hanya 2 gabungan fraksi murni seperti pada Tabel 4.3

Tabel 4.3 Fraksi hasil Kromatografi Kolom dengan pembuatan fase diam cara basah

Fraksi	Senyawa	Warna	Rf	Berat (mg)
B.1 (14 – 22)	Steroid	Hijau	0,48	0,55
B.2 (60 – 80)	Triterpenoid	Merah	0,094	0,41

Berdasarkan hasil isolasi kromatografi kolom dengan pembuatan cara basah diperoleh isolat kurang murni dan pola pemisahan yang kurang bagus. Isolat triterpenoid yang murni hanya diperoleh 1 gabungan fraksi dengan berat 0,41 mg. Hasil ini kemungkinan dikarenakan pada kromatografi kolom cara basah dilakukan proses pembuburan yang mengakibatkan silika gel bersifat lebih asam karena terjadi interaksi antara silika gel dan eluen. Hal ini dikarenakan proton yang ada pada gugus silanol dalam silika gel semakin banyak yang lepas disebabkan interaksinya dengan eluen. Menurut Chang (2003), suatu zat yang

mampu memberikan proton merupakan asam Brønsted. Silika gel yang bersifat lebih asam ini mengakibatkan interaksi antara senyawa triterpenoid dan silika gel lebih lemah, sehingga selektivitas pada kromatografi kolom cara basah berkurang dan hanya diperoleh fraksi senyawa triterpenoid yang terpisah hanya sampai vial ke 80.

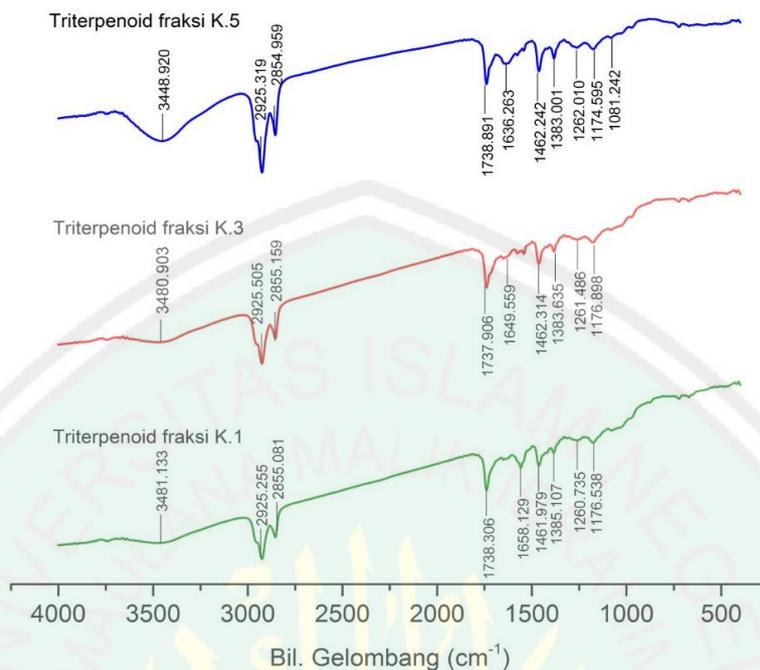
Hasil KLTA diperoleh 5 spot positif senyawa triterpenoid dengan Rf yang berbeda, sedangkan pada hasil kromatografi kolom cara kering hanya menghasilkan 1 fraksi senyawa triterpenoid dengan Rf yang berbeda. Pada hasil kromatografi kolom cara basah vial ke-23 – 26; 27 – 29; 30 – 39 dan 40 – 59 merupakan fraksi yang masih campuran maka fraksi tersebut dapat dipisahkan kembali sehingga diperoleh fraksi senyawa triterpenoid yang lebih banyak.

Berdasarkan hasil monitoring KLT pada Tabel 4.2 dan Tabel 4.3 maka isolasi senyawa triterpenoid lebih baik menggunakan kromatografi kolom cara kering. Hal ini didasarkan pada banyaknya fraksi triterpenoid yang terpisah pada cara kering diperoleh 3 fraksi sementara pada cara basah hanya satu fraksi. Isolat triterpenoid yang diperoleh juga memiliki range yang besar yaitu, fraksi K.2 sebanyak 22 vial; fraksi K.3 sebanyak 22 vial dan fraksi K.5 sebanyak 18 vial. Selain itu pada kromatografi kolom cara kering tidak dilakukan proses pembuburan silika gel dengan eluen, sehingga silika gel tidak bersifat asam. Hal ini mengakibatkan interaksi antara senyawa triterpenoid dan silika gel lebih kuat sehingga selektivitas kromatografi kolom cara kering baik. Dan diperoleh fraksi senyawa triterpenoid yang lebih baik yaitu pemisahan terjadi hingga vial ke 140.

Kolom kering lebih baik digunakan untuk memisahkan senyawa yang merupakan komponen utama dari suatu sampel (Septyaningsih, 2010). Senyawa triterpenoid ini merupakan komponen utama pada fraksi petroleum eter dikarenakan saat identifikasi senyawa menggunakan reagen, cincin kecoklatan yang menandakan senyawa triterpenoid terlihat lebih terang daripada warna hijau yang menandakan senyawa steroid. Selain itu kolom kering ini lebih efisien waktu daripada kolom basah karena tidak perlu didiamkan 24 jam dan tanpa pembuatan bubuk silika. Maka isolat senyawa triterpenoid hasil kromatografi kolom cara kering yang terdiri dari fraksi K.2; K.3 dan K.5 kemudian diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FT-IR untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam isolat tersebut.

4.8 Identifikasi Gugus Fungsi Menggunakan Spektrofotometer FT-IR

Senyawa triterpenoid hasil isolasi kromatografi kolom dengan pembuatan fase diam cara kering yang terdiri dari 3 fraksi kemudian diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FT-IR. Identifikasi menggunakan FT-IR bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam isolat triterpenoid. Sehingga dapat diketahui golongan senyawa triterpenoid yang terkandung dalam *E. spinosum*. Berikut spektra FT-IR dari ketiga isolat dapat dilihat di bawah ini:



Gambar 4.4 Spektra FT-IR Isolat Triterpenoid (fraksi K.2, K.3 dan K.5).

Tabel 4.4 Interpretasi Spektra FT-IR Isolat Triterpenoid (fraksi K.2, K.3 dan K.5).

No	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)			Range Pustaka (Socrates, 1994)	Jenis Vibrasi	Intensitas Refrensi
	fraksi K.2	fraksi K.3	fraksi K.5			
1.	3481,133	3480,903	3448,920	3550 – 3230	O-H (stretch) dari ikatan hidrogen intrarmolekuler	m-s
2.	2925,255	2925,505	2925,319	3000 – 2800	C _{sp} ³ – H (stretch)	m-s
3.	2855,081	2855,159	2854,959	2870 – 2840	-CH ₂ - stretch (sym)	m
4.	1738,306	1737,906	1738,891	1750 – 1725	C = O ester (stretch)	w – m
5.	1658,129	1649,559	1636,263	1680 – 1620	C = C (stretch)	s – m
6.	1461,979	1462,314	1462,242	1480 – 1440	-CH ₂ (bend)	w
7.	1385,107	1383,635	1383,001	1396 – 1365	-CH ₃ (stretch)	m
8.	1260,735	1261,486	1262,010	~1200	Metil ester R – CO.OCH ₃ (stretch)	s – m
9.	1176,538	1176,898	1174,595	1180 – 1155	O – C ester (stretch)	s – m

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

Berdasarkan hasil identifikasi menggunakan FT-IR pada ketiga isolat terdapat serapan O – H pada bilangan gelombang 3481,133 cm⁻¹ (fraksi K.2), 3480,903 cm⁻¹ (fraksi K.3) dan 3448,920 cm⁻¹ (fraksi K.5). pada bilangan gelombang 2925,255 cm⁻¹ (fraksi K.2), 2925,505 cm⁻¹ (fraksi K.3) dan 29125,319 cm⁻¹ (fraksi K.5) terdapat serapan C_{sp}³ – H stretch. Dugaan ini diperkuat dengan

adanya serapan $-\text{CH}_3$ stretch pada bilangan gelombang $1385,107\text{ cm}^{-1}$ (fraksi K.2), $1383,635\text{ cm}^{-1}$ (fraksi K.3) dan $1383,001\text{ cm}^{-1}$ (fraksi K.5). Pada bilangan gelombang $2855,081\text{ cm}^{-1}$ (fraksi K.2), $2855,159\text{ cm}^{-1}$ (fraksi K.3) dan $2854,959\text{ cm}^{-1}$ (fraksi K.5) muncul puncak dengan intensitas sedang yang menunjukkan serapan $-\text{CH}_2-$ stretching yang simetris. Terdapat serapan pada bilangan gelombang $1738,306\text{ cm}^{-1}$ (fraksi K.2), $1737,906\text{ cm}^{-1}$ (fraksi K.3) dan $1738,891\text{ cm}^{-1}$ (fraksi K.5) yang merupakan serapan $\text{C}=\text{O}$ ester stretch.

Terdapat serapan $\text{C}=\text{C}$ stretch pada bilangan gelombang $1658,129\text{ cm}^{-1}$ (fraksi K.2), $1649,559\text{ cm}^{-1}$ (fraksi K.3) dan $1636,263\text{ cm}^{-1}$ (fraksi K.5). Pada bilangan gelombang $1461,979\text{ cm}^{-1}$ (fraksi K.2), $1462,314\text{ cm}^{-1}$ (fraksi K.3) dan $1462,242\text{ cm}^{-1}$ (fraksi K.5) yang merupakan serapan dari gugus $-\text{CH}_2$ bend. Serapan yang terjadi sekitar bilangan gelombang 1463 cm^{-1} 1385 cm^{-1} merupakan serapan khas pada senyawa triterpenoid.

Selain itu, terjadi serapan dari gugus $\text{R}-\text{CO}-\text{OCH}_3$ pada bilangan gelombang $1260,735\text{ cm}^{-1}$ (fraksi 1.B), $1261,486\text{ cm}^{-1}$ (fraksi K.3) dan $1262,010\text{ cm}^{-1}$ (fraksi K.5). hal ini diperkuat dengan adanya serapan pada bilangan gelombang $1176,538\text{ cm}^{-1}$ (fraksi 1.B), $1176,898\text{ cm}^{-1}$ (fraksi K.3) dan $1174,595\text{ cm}^{-1}$ (fraksi K.5) yang merupakan serapan dari gugus $\text{O}-\text{C}$ ester.

4.9 Isolasi Senyawa Triterpenoid dalam Perspektif Islam

Penelitian mengenai isolasi senyawa triterpenoid pada *E. spinosum* merupakan salah satu bentuk ibadah kepada Allah SWT. Mempelajari mengenai fenomena alam adalah perintah kepada manusia agar dapat menyadari kekuasaan

dan kebesaran Allah SWT sehingga menambah keimanan manusia kepada Allah SWT. Sebagaimana firman Allah SWT dalam Qs. Ali Imran: 190 yaitu:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَآخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾

Artinya:

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

Qs. Al Imran ayat 190 menjelaskan tentang kekuasaan dan kebesaran Allah SWT yang berkaitan dengan penciptaan alam semesta. Segala yang Allah SWT ciptakan memiliki manfaat, dan merupakan bentuk kasih sayangNya kepada makhlukNya. Selain itu, segala ciptaan Allah SWT telah tertata rapi dan sempurna. Dalam tafsir Ibnu Katsir menjelaskan bahwa orang-orang yang berakal akan memikirkan segala ciptaan Allah SWT yang terdapat di langit dan bumi. Mereka memahami dan mempelajarinya kemudian mengambil hikmahnya sehingga mereka mampu menunjukkan betapa besar keagungan Allah SWT atas segala ciptaanNya.

Kemudian Allah SWT berfirman dalam Qs. az Zumar ayat 21:

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَسَلَكَهُ يَنْبِيعَ فِي الْأَرْضِ ثُمَّ نُخْرِجُ بِهِ زَرْعًا مُّخْتَلِفًا

الْوَانِدِ ثُمَّ يَهِيْجُ فَتَرَاهُ مُّصْفَرًّا ثُمَّ يَجْعَلُهُ حُطَمًا إِنَّ فِي ذَلِكَ لَذِكْرًا لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿٢١﴾

Artinya:

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

Menurut tafsir Al-Qurtubi ayat tersebut menjelaskan bahwa semua air yang ada di bumi adalah berasal dari langit. Kemudian air tersebut menetap di bumi menjadi mata air dan juga air di laut, darinya Allah SWT menumbuhkan berbagai jenis tumbuhan..

Sampel *E.spinosum* yang berhabitat di laut kemudian dibersihkan dan dikeringkan selanjutnya dilakukan analisis kadar air dalam *E.spinosum* dan diperoleh kadar air basah sebesar 93,04 % dan kadar air kering sebesar 7,73 %. Hal ini sangat menguntungkan dalam penyimpanan sampel karena kadar air kering yang kecil dapat mengurangi pertumbuhan mikroba dalam sampel sehingga sampel dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama.

Menurut Setiyawan (2015) fraksi P.E hasil hidrolisis ekstrak metanol *E.spinosum* mengandung senyawa triterpenoid. Senyawa triterpenoid dapat digunakan sebagai antimikroba (Ahmad, 2013) dan sebagai anti bakteri (Rumondang, 2013). Pada penelitian ini bertujuan mengisolasi senyawa triterpenoid menggunakan kromatografi kolom, dengan variasi pembuatan fase diam cara kering dan cara basah.

Allah SWT kembali berfirman dalam Qs. al Maa'idah ayat 88, yaitu:

وَكُلُوا مِمَّا رَزَقَكُمُ اللَّهُ حَلالًا طَيِّبًا وَاتَّقُوا اللَّهَ الَّذِي أَنْتُمْ بِهِء مُؤْمِنُونَ

Artinya:

“dan makanlah makanan yang halal lagi baik dari apa yang Allah telah rezezikkan kepadamu, dan bertakwalah kepada Allah yang kamu beriman kepada-Nya” (Qs. al Maa'idah ayat 88).

Tafsir Ibnu Katsir menjelaskan intisari dalam Qs. Al Maa-idah ayat 88 adalah salah satu rezki bagi manusia adalah makanan yang halal dan baik. Makanan yang

halal dan baik adalah makanan yang tidak hanya mengenyangkan tetapi juga bermanfaat bagi tubuh manusia. *E. spinosum* merupakan salah satu makanan yang halal yang berasal dari laut yang baik untuk dikonsumsi

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa triterpenoid dalam *E. spinosum* lebih baik diisolasi menggunakan kromatografi kolom dengan pembuatan fase diam cara kering daripada menggunakan cara basah. Pada kromatografi kolom cara kering diperoleh 3 fraksi yang tiap fraksinya memiliki range besar sehingga diperoleh senyawa triterpenoid yang relatif murni dalam jumlah yang lebih besar. Pada fraksi K.2 diperoleh sebanyak 1,5 mg, fraksi K.3 sebanyak 1,3 mg dan fraksi K.5 sebanyak 2,4 mg. Fraksi kemudian diidentifikasi menggunakan FT-IR dan diperoleh 3 fraksi tersebut memiliki gugus fungsi OH, -CH₃, -CH₂, C=O ester, R – CO.OCH₃ dan O – C ester.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil isolasi senyawa triterpenoid fraksi P.E hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah (*E.spinosum*) dengan menggunakan Kromatografi Kolom cara kering lebih baik daripada menggunakan kromatografi kolom cara basah.
2. Hasil identifikasi gugus fungsi menggunakan FTIR pada senyawa triterpenoid hasil isolasi kromatografi kolom cara kering fraksi P.E dari Alga Merah (*E. spinosum*) diperoleh 3 fraksi K.2, K.3 dan K.5. Dari hasil identifikasi diperoleh 3 fraksi tersebut memiliki gugus fungsi OH, -CH₃, -CH₂, C=O ester, R – CO.OCH₃ dan O – C ester.

5.2 Saran

Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai isolasi senyawa triterpenoid menggunakan kromatografi kolom dengan variasi

1. Variasi berat sampel dan fase diam yang digunakan untuk isolasi
2. Variasi eluen menggunakan sistem gradien pelarut dengan mengatur kecepatan alir pada kolom
3. Hasil monitoring yang berupa campuran dipisahkan kembali (rekromatografi kolom) dan uji kemurnian pada fraksi
4. Serta dilakukan identifikasi lebih lanjut untuk mengetahui struktur senyawa triterpenoid menggunakan LC-MS dan spektroskopi H-NMR

DAFTAR PUSTAKA

- Adhiatama, I., Zainudin, M., Rokhati, N. 2012. Hidrolisis Kitosan Menggunakan Katalis Asam Klorida. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. 1(1):245-251.
- Ahmad, A., Muh. Nasrum M. 2013. Inhibitive Enhancement of Isoniasid Treatment on Mycobacterium Tuberculosis Through Triterpenoid Carbocyclic Acid From Red Algae *Eucheuma Spinosum*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences (ISSN 0975-6299)*, 4(2): (B) 231-237.
- Afriyanti, L. 2013. *Ekstraksi Pelarut Distribusi Asam Etanoat diantara Dietil Eter dan Air*. Malang: Universitas Negeri Malang.
- Al Hifnawi, M. I. 2009. *Tafsir Al-Qurtubi, Syeh Imam Jilid 15 ISBN 978-979-1368-44-5*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Al-Maraghi, A. M. 1992. *Tafsir Al-Maraghi 14 Juz 14*. Semarang: CV. Toha Putra Semarang.
- Anam, K., Fasya, A.G., Abtokhi, A., Amalia, S., 2015. Isolasi Senyawa Triterpenoid dari Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Analisisnya Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. *Skripsi tidak diterbitkan*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Anggadiredja, J., Irawati, S., dan Kusmiyati, 2006, *Rumput Laut : Pembudidayaan, Pengolahan, dan Pemasaran Komoditas perikanan Potensial*, Jakarta: Penebar Swadaya.
- AOAC 1984. *Official Methods of Analysis the Association of Official Analytical Chemist, Inc.* Washington DC. Association of Official Analytical Chemist.
- Asih, I. A. R. A. 2009. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Isoflavon dari Kacang Kedelai (*Glycine max*). *Jurnal Kimia Vol. 3, no. 1* hal 33-40.
- Asih, I. A. R. A., I W. G. Gunawan, N. M. Desi Ariani. 2010. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Golongan Triterpenoid Dari Ekstrak *N-Heksana* Daun Kepuh (*Sterculia Foetida L.*) Serta Uji Aktivitas Antiradikal Bebas. *JURNAL KIMIA (ISSN 1907-9850)*, 4 (2), JULI 2010 : 135-140.
- Atmadja. W. S, Kadi, A., Sulistijo dan Rachmaniar. 1996 *Pengenalan Jenis-Jenis Rumput Laut Indonesia*. Jakarta: PusLitBANG Oseanologi-LIPI.
- Burke, R. W., Diamondstone, B. I., Velapoldi, dan Menis, O. 1974. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol. *Clinical Chemistry, Vol.20, No.7*.

- Ciulei, J. 1984. *Metodology for Analysis of vegetable and Drugs*. Bucharest. Rumania: Faculty of Pharmacy.
- Deny, Rudiyanasyah, Ardiningsih, P. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Triterpenoid dari Fraksi Kloroform Kulit Batang Durian Kura (*D. testudinarum Becc.*). *JKK, th 2013, Vol. 2 (1), hal 7-12* ISSN 2303-1077.
- Ferdiansyah, I. A. 2006. Ekstraksi Daun Mindi (*Melia adedarach linn*) Kering Secara Maserasi Menggunakan Pelarut Etanol 90%. Malang: FTP UNIBRAW.
- Fessenden dan Fessenden. 1997. *Kimia Organik Edisi Ketiga*. Jakarta: Erlangga.
- Ghoffar, E. M., Mu'thi, A., Al-Atsari A., I. 2004. Tafsir Ibnu Katsir Jilid 1 ISBN:979-3536-06-3. Bogor: Pustaka Imam asy-Syafi'i.
- Ghoffar, E. M., Mu'thi, A., Al-Atsari A., I. 2004. Tafsir Ibnu Katsir Jilid 2 ISBN:979-3536-07-1. Bogor: Pustaka Imam asy-Syafi'i.
- Gritter, R.J. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Terbitan ke-2. Terjemahan Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- 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: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hanapi, A., Fasya, A. G., Mardiyah, U., Miftahurrahmah. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *Alchemy, Vol. 2, No. 2*, hal 126-137.
- Haniffa. M. A., Kavitha, K. 2012. Antibacterial activity of medicinal herbs against the fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Agricultural Technology*, 8(1): 205-211.
- Harbone, J.B. 1987. *Metoda Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Terbitan ke-2. Terjemahan Padmawinata, K dan I, Soediro. Bandung: ITB.
- Hidayat, A, 2006, *Budidaya Rumput Laut*, Surabaya:Penerbit Usaha Nasional.
- Hijaz, M.N., Jannah, A., Barizi, A. 2009. Uji Aktivitas Antioksidan Karaginan Dalam Alga Merah Jenis *Eucheuma spinosum* dan *Gracillaria verrucosa*. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Hudha, M. I., Sepdwiyantri, R., Sari, D. S. 2012. Ekstraksi Karaginan dari Rumput Laut (*Euचेuma spinosum*) dengan Variasi Suhu Pelarut dan Waktu Operasi. *Berkah Ilmiah Teknik Kimia Vol 1, No 1* hal 17-20.

Indrayani, L., Soetjipto, H., dan Sihasale, L., 2006, *Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (stachytarpheta jamaicensis L. Vahl) Terhadap Larva Udang Artemia Salina Leach. Berk.* Penelitian. Hayati: 12 (57-61), 2006.

Jasani, P. K., Bhimani, M. K., Dave, M. P. and Ushir, V. Y. 2012. Isolation and Determination of Triterpenoid from Roots of *Hyptis suaveolens*. *PhTechMed*: vol 1/ issue 2/2012. ISSN: 2278-1099.

Jeyabalan, J. P. P. and J. Marimuthu. 2012. Preliminary Phytochemical Analysis of *Sargassum myriocystum* J. Ag. and *Turbinaria ornata* (Turner) J. Ag. from The Southern Coast of Tamil Nadu, India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, : 1-4.

Kholidiyah, M., Fasya, A.G., Nashichuddin, A., Rachmawati, A. 2013. Uji Toksisitas Ekstrak Rumput Laut Jenis *Euचेuma spinosum* Perairan Madura Terhadap Larva Udang (*Artemia Salina*) Menggunakan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). *Skripsi tidak diterbitkan*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Khopkar. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta : Universitas Indonesia.

Kristanti, A.N. 2008. *Buku Ajar FITOKIMIA*. Surabaya: Airlangga University Press.

Kusmiyati, Aznam, N., Handayani, S. 2011. Isolasi Dan Identifikasi Zat Aktif Ekstrak Metanol Rimpang Kunyit Putih (*Curcuma mangga val*) Fraksi Etil Asetat. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, Vol. 1, No.2.

Lailiyah, A., Adi, T. K., Hakim, A., Yusnawan, E. 2014. Kapasitas Antioksidan dan Kandungan Total Senyawa Fenolik Ekstrak Kasar Alga Coklat *Sargassum cristaefolium* dari Pantai sumenep Madura. *Alchemy*, Vol. 3, No. 1, hal 18-30.

Lawoko, M., Sagar, D., Adriaan, R. P. van H. 2009. Pre-Hydrolysis of The Phenyl Glycosidic Bond in a Model Compound. *Lenzinger Berichte*: 77-87.

Lenny, S. 2006. *Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida dan Alkaloida*. Medan: MIPA Universitas Sumatera Utara.

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: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Markham. 1998. *Cara Mengidentifikasi Senyawa Flavonoid*. Bandung: ITB.
- Marianingsih, P., Amelia, E., Suroto, T. 2013. Inventarisasi dan Identifikasi makroalga di Perairan Pulau Untung Jawa. *Prosiding Seminar FMIPA Universitas Lampung*.
- Mubarak, H., 1982, *Teknik Budidaya Rumput Laut*, Jakarta : Sub Balai Penelitian Perikanan Laut.
- Nihlati, I., Abdul, R., Triana, H. 2008. Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata (roxb)* dengan Metode Penangkap DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*). *Skripsi* diterbitkan. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- Noviyanti, L., Wibowo, F. R., Wartono, M. W., Suharty, N. S., Patiha. 2010. Modifikasi Teknik Kromatografi Kolom Untuk Pemisahan Trigliserida dari Ekstrak Buah Merah (*Pandanus conoideus Lamk.*). *Skripsi* diterbitkan. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Pridawati, E., Ahmad, A., Hanapi, U. 2014. Isolation And Identification of Secondary Metabolites of Chloroform Fraction of Macroalgae *Padina australis* As Anti Tuberculosis. *Indonesia Chimica Acta (ISSN 2085-014X) Vol.7, No.1*.
- Priyatno Agung 2013. Isolasi Senyawa Aktif Antioksidan Fraksi Etil Asetat tumbuhan paku *Neprolepis falcata (Cav.) C. Chr.* *Skripsi* Diterbitkan. Uin Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Puspita, M. 2011. *Pengoptimuman Fase Gerak KLT Menggunakan Desain Campuran Untuk Pemisahan Komponen Ekstrak Meniran (Phyllanthus ninuri)*. Skripsi Fakultas MIPA IPB.
- Putri, W. E. A. dan Hidajati, N. 2012. SENYAWA KOLESTAN DARI EKSTRAK KLOOROFORM KULIT BATANG TUMBUHAN *Toona sinensis (A.Juss)* Roem dan UJI BIOINSEKTISIDA. *UNESA Journal of Chemistry Vol. 1, No. 1, May 2012*.
- Ridhia, Ibrahim, S., Efdi, M. 2013. Isolasi Dan Karakterisasi Triterpenoid Dari Fraksi N-Heksan Pada Kulit Batang Srikaya (*Annona squamosa L.*): *Jurnal Kimia Unand*, Volume 2 Nomor 1.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: ITB.

- Rumondang, M., Kusriani, D., Fachriyah, E. 2013. Isolasi, Identifikasi Dan Uji Antibakteri Senyawa Triterpenoid Dari Ekstrak n-Heksana Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis L.*). *Chemistry Info Vol 1, No 1, Hal 156.*
- Sastrohamidjojo, 1985. *Kromatografi*. Edisi ke-1. Yogyakarta: Liberty.
- Sastrohamidjojo, H. 1996. *Sintesis Bahan Alam*. Yogyakarta: Gajah Mada Press.
- 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 FTIR. *Skripsi Tidak Diterbitkan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.*
- Septyaningsih, D. 2010. Isolasi Dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Biji Buah Merah (*Pandanus conoideus Lamk*). *Skripsi di terbitkan*. Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret.
- Silverstein , R.M. 1986. *Penyidikan Spektrometrik Senyawa Organik*. Edisi ke-4. Terjemahan A.J. Hartomo dan Amy Victor Purba. Erlangga. Jakarta.
- Siadi, K. 2012. Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha Curcas*) Sebagai Biopestisida Yang Efektif Dengan Penambahan Larutan Nacl. *Jurnal MIPA 35 (1) (2012).*
- Socrates, G. 1994. *Infrared Characteristic Group Frequencies Tables and Charts Second Edition*. UK. The University of West London.
- Sudarmadji, S.B., Haryono dan Suhardi. 2007. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Suparmi, Sahri, A. 2009. Mengenal Potensi Rumput Laut: Kajian Pemanfaatan Sumber Daya Rumput Laut Dari Aspek Industri Dan Kesehatan. *Sultan Agung Vol XLIV No. 118.*
- Suryani, Erma. 2011. *Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Triterpenoid dari Ekstrak Etil Asetat Kulit Batang Tumbuhan Kecapi (Sandoricum koetjape Merr)*. Artikel. Universitas Andalas Padang Hal 1-15.
- Tasic, B, M., Budimir, V. K., Miodrag, L. L., dan Vlada, B. V. 2009. The acid hydrolysis of potato tuber mash in bioethanol production. *Biochemical Engineering Journal 43 (209): 208-211.*
- Tensiska, dkk. 2007. *Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Isoflavon dari Ampas Tahu*. Hasil Penelitian Dosen Jurusan Teknologi Industri Pangan. Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Utama, W.A., Efendi, M., Santoni, A. 2013. Isolasi Senyawa Triterpenoid Dari Fraksi Aktif Kulit Batang Kecapi (*Sandoricum Koetjape Merr*) Dan Uji

Bioaktifitas “Brineshrimps Lethality Bioassay”. *Jurnal Kimia Unand* (ISSN No. 2303-3401), Volume 2 Nomor1.

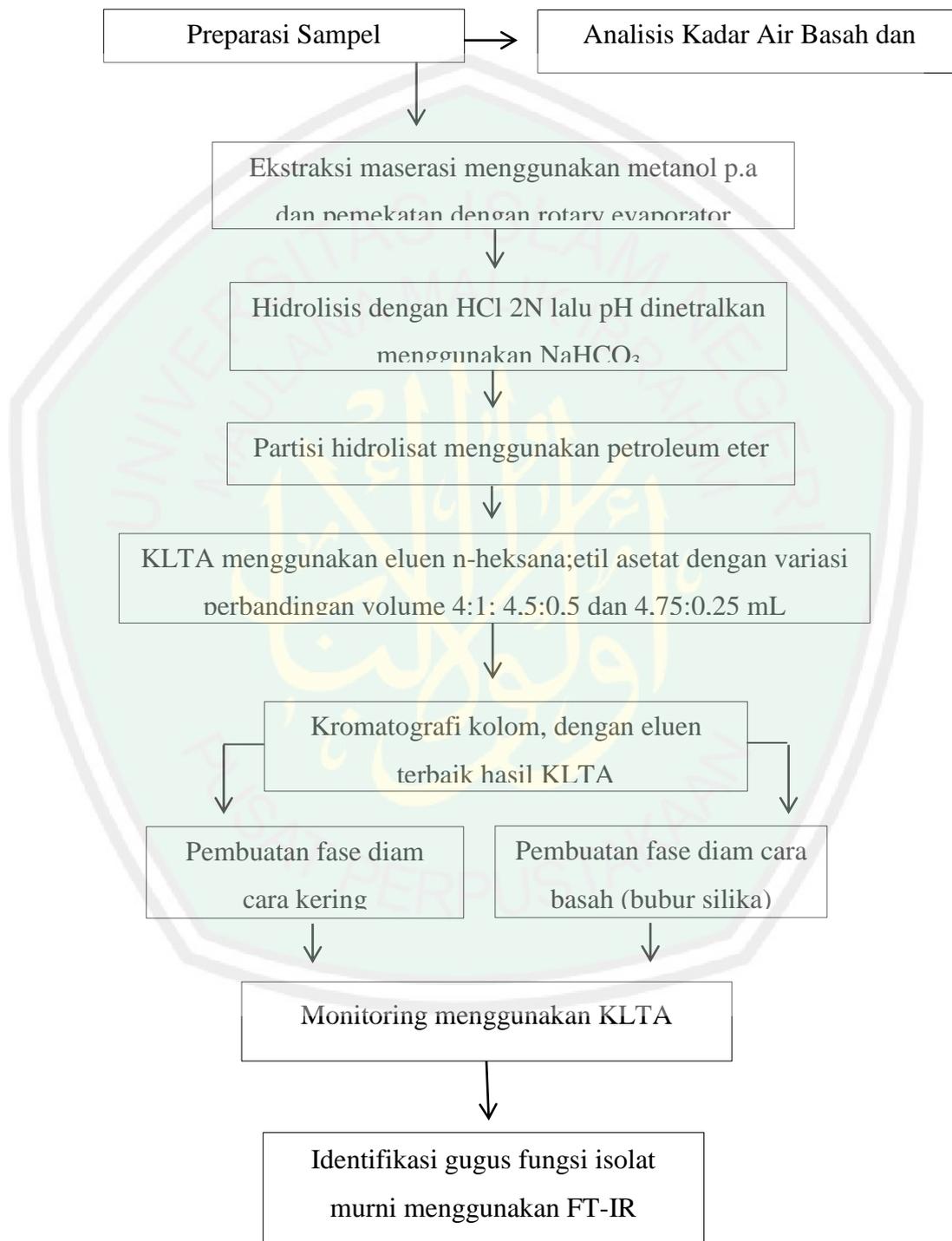
Voight, R.1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Diterjemahkan oleh Soedani Noerono Soewandi, Apt. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada press.

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.

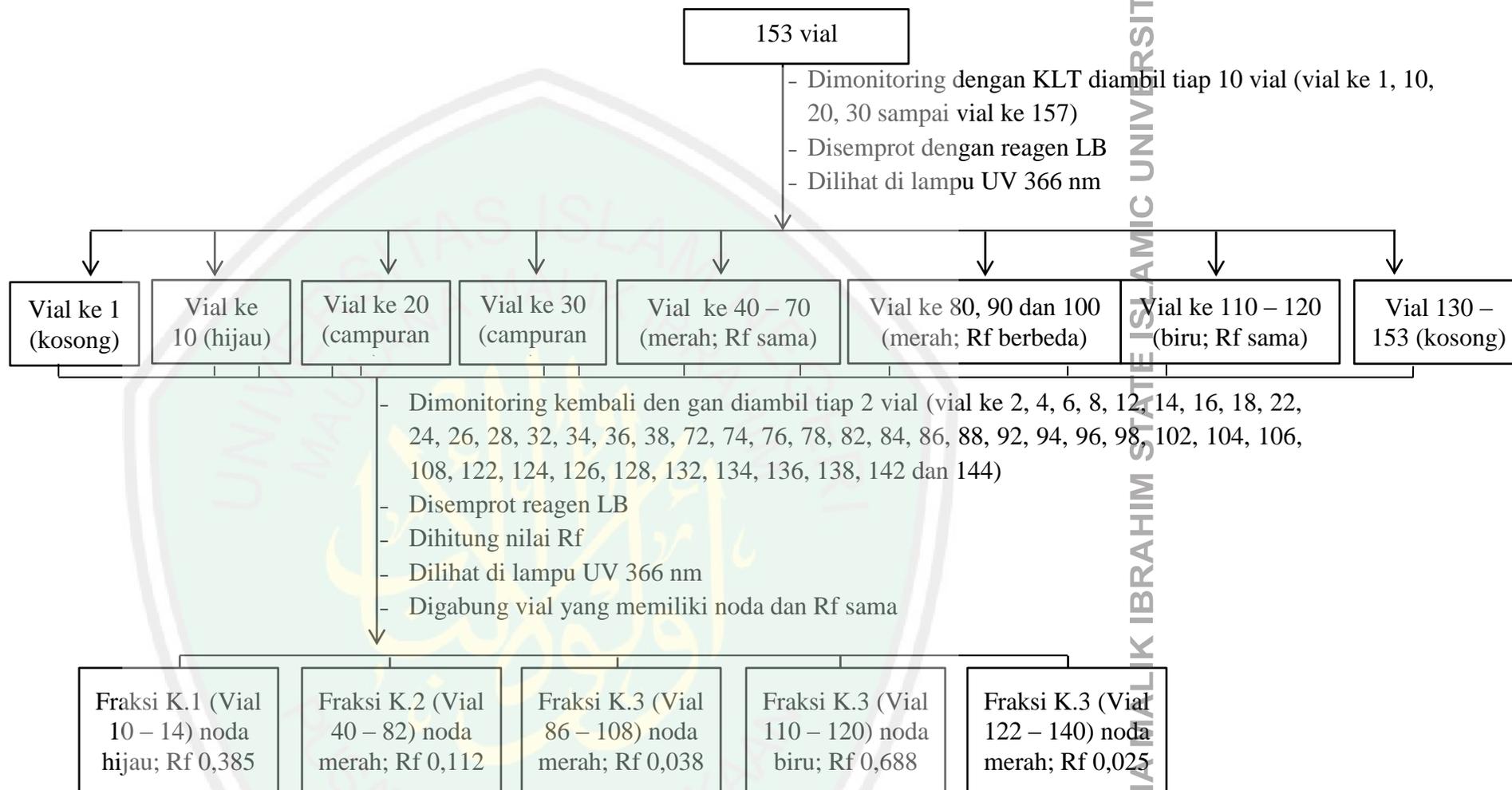


LAMPIRAN

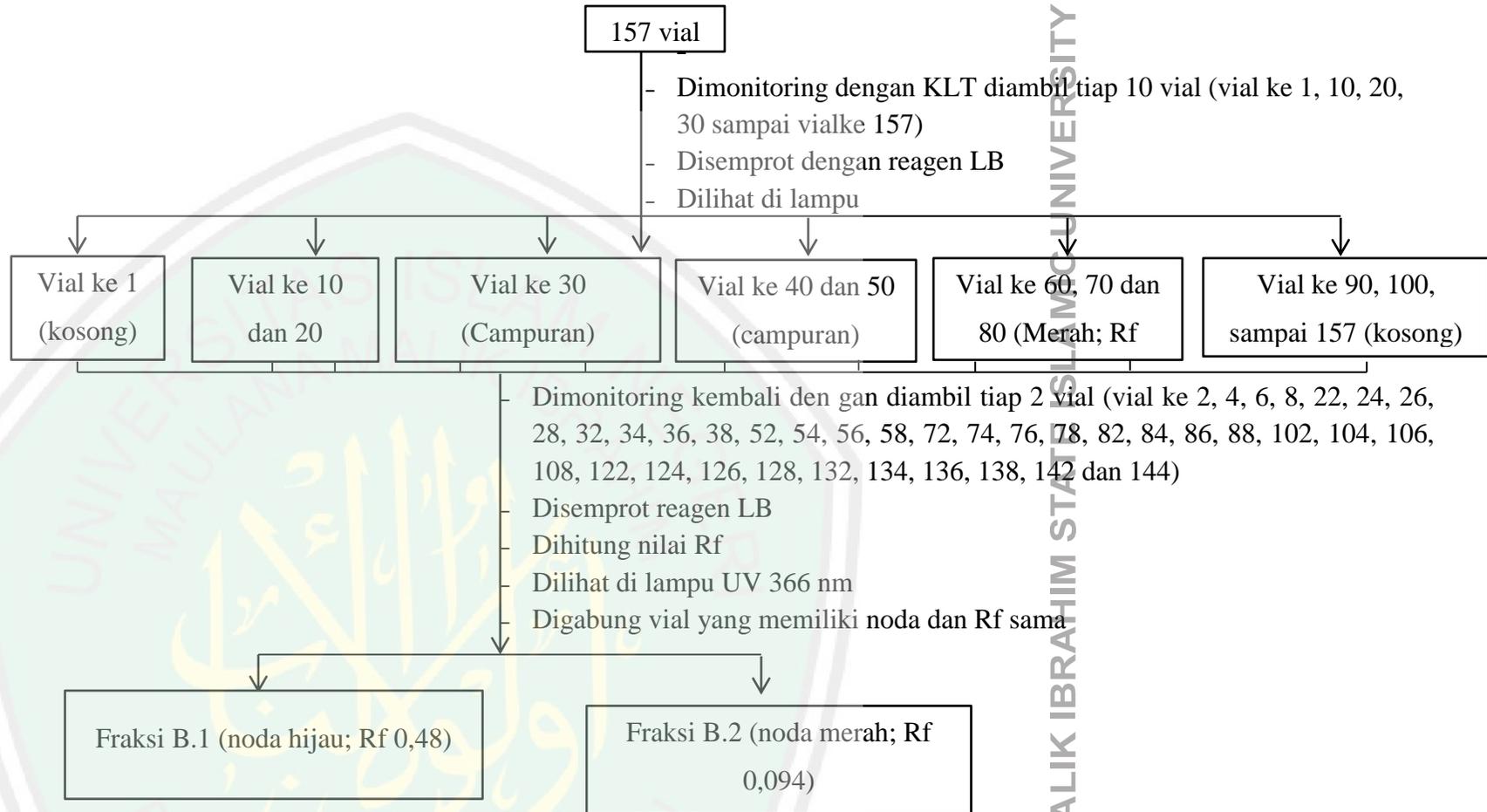
1. Rancangan Penelitian



1.1. Skema Monitoring Fraksi Hasil Isolasi Kromatografi Kolom Cara Kering



1.2. Skema Monitoring Fraksi Hasil Isolasi Kromatografi Kolom Cara Basah





UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



2. Diagram Alir

2.1 Preparasi Sampel

30 Kg Alga merah basah jenis *Eucheuma spinosum*

- diambil semua bagian tanaman lalu dicuci dan dipotong kecil-kecil
- dikering anginkan tanpa sinar matahari
- dihaluskan dengan mesin sampai berbentuk serbuk
- diayak dengan ayakan 60-90 mesh
- dioven pada suhu 38°C

Hasil

2.2 Analisis Kadar Air

Alga Merah yang telah dikeringkan

- cawan porselen kosong dioven 105°C selama 15 menit
- dimasukkan dalam desikator selama 10 menit
- ditimbang hingga berat cawan konstan
- 5 gram serbuk alga merah dimasukkan dalam cawan
- dioven pada suhu 105°C selama 15 menit
- didinginkan dalam desikator selama 10 menit dan ditimbang
- diulangi pengovenan, pendinginan dan penimbangan hingga berat konstan
- dihitung kadar air dengan persamaan pada 3.5.2

Hasil

2.3 Ekstraksi Sampel

150 gr serbuk alga merah

- dimasukkan dalam Erlenmeyer 1000 mL
- ditambahkan methanol 900 mL
- diaduk menggunakan shaker dengan kecepatan 120 rpm selama 3 jam
- disaring dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali hingga diperoleh filtrat menjadi bening
- filtrat yang diperoleh disatukan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*
- dialiri gas N₂
- ekstrak pekat ditimbang dan dihitung rendemennya dengan persamaan 3.5.3

Hasil

2.4 Hidrolisis dan Ekstraksi cair-cair (Partisi) ekstrak pekat methanol

5 gr ekstrak pekat metanol

- dimasukkan dalam beaker glass 50 ml
- ditambahkan HCl 2N sebanyak 10 ml dan dihidrolisis dengan magnetic stirrer selama 1 jam pada suhu ruang
- ditambahkan NaHCO₃ hingga ph netral
- dimasukkan hidrolisat dalam corong pisah lalu ditambahkan pelarut P.E 25 ml (partisi dilakukan 2 kali pengulangan)
- dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan dialiri dengan gas N₂
- ditimbang dan dihitung rendemen

Hasil

2.5 Uji Fitokimia

Fraksi petroleum eter

- dimasukkan kedalam tabung reaksi
- dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform dan 0,5 mL asam asetat anhidrat
- ditambahkan 1 – 2 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung

Hasil

2.6 Isolasi senyawa triterpenoid menggunakan metode KLT Analitik

Fraksi petroleum eter

- dilarutkan dengan pelarutnya
- ditotolkan 17 totolan dengan pipa kapiler pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat silika gel GF₂₅₄ yang telah diaktivasi dengan ukuran 1 x 10 cm
- dikeringakan dengan *hair dryer*
- dielusi dengan masing-masing fase gerak sampai mencapai jarak 1 cm dari tepi atas plat
- diangkat dan dikeringkan plat
- diperiksa pada permukaan plat di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm, disemprot dengan reagen LB, lalu diamati kembali dengan lampu UV
- diamati noda yang terbentuk dengan cara dilingkari dengan pensil (jumlah noda yang terbentuk, pemisahan noda yang dihasilkan, R_f serta warna yang terbentuk)

Hasil

2.7 Isolasi senyawa triterpenoid menggunakan metode Kromatografi Kolom

2.7.1 Cara Kering

0,2 gr ekstrak pekat Petroleum eter

- diisi bagian bawah kolom dengan glass wool dan eluen
- diaktivasi 10 gr silika gel G-60 pada suhu 110°C selama 2 jam
- didinginkan silika gel G-60 dalam desikator selama 15 menit
- dimasukkan silika teraktivasi dalam kolom sambil diketok-ketok
- ditambahkan eluen secara perlahan hingga silika terendam
- sampel ditambahkan eluen 1 mL lalu dipipet kedalam kolom
- dielusi dan ditampung setiap 2 ml dalam botol vial

Hasil

2.7.2 Cara Basah

0,2 gr ekstrak pekat Petroleum eter

- Diaktivasi 10 gr silika gel G-60 pada suhu 110°C selama 2 jam
- didinginkan dalam desikator selama 15 menit
- kolom diisi dengan glass wool pada bagian bawah dan eluen
- dimasukkan silika gel dalam beaker glass
- ditambahkan eluen, diaduk hingga homogen, tidak ada gelembung udara
- dimasukkan bubuk silika dalam kolom sambil diketok-ketok dan didiamkan selama 24 jam
- sampel ditambahkan eluen 1 mL lalu dipipet kedalam kolom
- dilakukan proses elusi dan ditampung setiap 2 mL dalam botol vial

Hasil

2.8 Monitoring spot dengan KLT Analitik dan Uji Liberman

Vial hasil isolasi

- Dijenuhkan eluen (nheksana;etil asetat) dalam chamber
- Dibuat fraksi botol vial berdasarkan perubahan warna
- Diambil vial batas awal dan akhir pada tiap fraksi
- ditotolkan pada plat KLT tiap totol ada 5 kali penotolan
- dikeringkan dengan hair dryer
- dielusi dengan eluen campuran n-heksana : etil asetat
- vial dengan Rf sama digabung

Hasil

2.9 Identifikasi menggunakan FTIR

Sampel hasil isolasi

- digerus sampel dengan serbuk KBr dalam mortar agate
- dipres campuran selama 10 menit dengan tekanan 80 torr lalu divakum
- dipindahkan pelet yang terbentuk kedalam holder
- dianalisis menggunakan FT-IR

Hasil

3. Pembuatan Larutan

3.1 Larutan HCl 2 N

BJ HCl pekat = 1,267 g/mL

Konsentrasi = 37%

BM HCl = 36,5 g/mol

n = 1 (jumlah mol ion H⁺)

Normalitas HCl = n x Molaritas HCl
 = 1 x $\frac{37\% \times \text{BJ HCl} \times 10}{\text{BM HCl pekat}}$

$$= \frac{37\% \times 12,67 \text{ g/mL}}{36,5 \text{ g/mol}}$$

$$= 12,84 \text{ N}$$

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

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

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

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

3.2 Etanol 95%

Perhitungan pembuatan larutan etanol 95 % dibuat dari etanol *p.a.*, etanol *p.a* yang diperlukan adalah:

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \times 98 \% = 10 \text{ mL} \times 95 \%$$
$$V_1 = 9,7 \text{ mL}$$

3.3 Larutan NaHCO₃ jenuh

Kelarutan NaHCO₃ sebesar 9,99 gr dalam 100 mL akuades. Sehingga untuk membuat larutan NaHCO₃ jenuh digunakan NaHCO₃ dengan berat >9,99 gr (sampai terdapat endapan padatan yang tidak larut). Lalu disaring larutan tersebut untuk memisahkan residu dan filtrate sehingga didapatkan larutan NaHCO₃ jenuh.

3.4 Reagen Liberman Burchard

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

1. Kadar Air Basah Alga Merah *Eucheuma spinosum*

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

Keterangan: a= berat cawan kosong

b= berat cawan + sampel sebelum dioven

c= berat cawan + sampel

4.1 Data Pengukuran Kadar Air Alga Merah *Eucheuma Spinosum*

Segar

Pengukuran Berat Cawan Sampai Konstan Setelah
Dikeringkan

Ulangan	Berat Cawan Kosong (gram)		
	Cawan 1	Cawan 2	Cawan 3
Ulangan 1	19,146	17,493	24,911
Ulangan 2	19,145	17,495	24,907
Ulangan 3	19,147	17,497	24,900
Ulangan 4	19,147	17,497	24,900

Pengukuran Berat Cawan + Sampel Alga Merah *Eucheuma Spinosum* Segar Sampai Konstan

Ulangan	Berat Cawan Kosong (gram) + Sampel Segar		
	Cawan 1	Cawan 2	Cawan 3
Sebelum Dioven	20,101	19,442	25,972
Ulangan 1	19,264	17,628	25,074
Ulangan 2	19,249	17,627	24,993
Ulangan 3	19,236	17,588	24,960
Ulangan 4	19,231	17,553	25,006
Ulangan 5	19,231	17,553	25,006

$$1) \% \text{ kadar air} = \frac{20,101 - 19,231}{20,101 - 19,146} \times 100 \% = 91,09\%$$

$$2) \% \text{ kadar air} = \frac{19,442 - 17,553}{19,442 - 17,496} \times 100 \% = 97,07 \%$$

$$3) \% \text{ kadar air} = \frac{25,972 - 25,006}{25,972 - 24,910} \times 100 \% = 90,96 \%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ kadar air basah rata-rata} &= \frac{91,09 \% + 97,07 \% + 90,96 \%}{3} \\ &= 93,04\% \end{aligned}$$

2. Kadar Air Kering Alga Merah *Eucheuma spinosum*

5.1 Data Pengukuran Kadar Air Sampel Alga Merah *Eucheuma spinosum* Kering

Pengukuran Berat Cawan Sampai Konstan Setelah Dikeringkan

Ulangan	Berat Cawan Kosong (gram)		
	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	19,153	34,556

Pengukuran Berat Cawan + Sampel Alga Merah *Eucheuma*

Spinosum Segar Sampai Konstan

Ulangan	Berat Cawan Kosong (gram) + Sampel Segar		
	Cawan 1	Cawan 2	Cawan 3
Sebelum Dioven	19,995	21,654	37,038
Ulangan 1	19,865	21,521	36,915
Ulangan 2	19,820	21,476	36,877
Ulangan 3	19,798	21,463	36,961
Ulangan 4	19,796	21,450	36,859
Ulangan 5	19,796	21,450	36,859

$$1) \% \text{ kadar air} = \frac{19,995 - 19,796}{19,995 - 17,494} \times 100 \% = 7,83 \%$$

$$2) \% \text{ kadar air} = \frac{21,654 - 21,450}{21,654 - 19,153} \times 100 \% = 8,15 \%$$

$$3) \% \text{ kadar air} = \frac{37,038 - 36,859}{37,038 - 34,556} \times 100 \% = 7,21 \%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ kadar air basah rata-rata} &= \frac{7,83 \% + 8,15 \% + 7,21 \%}{3} \\ &= 7,73 \% \end{aligned}$$

3. Rendemen Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma spinosum*

Berat ekstrak pekat = 14,372 gram

Berat sampel = 450 gram

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

$$= \frac{14,372 \text{ gram}}{450 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 3,193 \%$$

4. Rendemen Fraksi Petroleum eter Alga Merah *Euचेuma spinosum*

Berat fraksi P.E = 1,759 gram

Berat ekstrak metanol = 12,5 gram

$$\begin{aligned} \% \text{ rendemen} &= \frac{\text{Berat fraksi P.E}}{\text{Berat ekstrak metanol}} \times 100 \% \\ &= \frac{1,759 \text{ gram}}{12,5 \text{ gram}} \times 100 \% \\ &= 14,072 \% \end{aligned}$$

5. Perhitungan Nilai Rf

8.1 Hasil Nilai Rf KLT Analitik

a. Eluen 1= n-heksana:etil asetat (4,25:0,75)

$$\text{Rf noda 1} = \frac{0,7 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,096$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{1,2 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,165$$

$$\text{Rf noda 3} = \frac{2,5 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,344$$

$$\text{Rf noda 4} = \frac{4 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,551$$

$$\text{Rf noda 5} = \frac{4,45 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,613$$

$$\text{Rf noda 6} = \frac{4,85 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,668$$

$$\text{Rf noda 7} = \frac{5,9 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,813$$

$$\text{Rf noda 8} = \frac{6,6 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,91$$

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

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{1 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,131$$

$$Rf \text{ noda 2} = \frac{2 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,263$$

$$Rf \text{ noda 3} = \frac{3 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,394$$

$$Rf \text{ noda 4} = \frac{4 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,526$$

$$Rf \text{ noda 5} = \frac{5,2 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,684$$

c. Eluen 2= n-heksana:etil asetat (4:1)

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,375$$

$$Rf \text{ noda 2} = \frac{5 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,625$$

$$Rf \text{ noda 3} = \frac{6,5 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,812$$

$$Rf \text{ noda 4} = \frac{7,4 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,925$$

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{7,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,975$$

8.2 Hasil Nilai Rf Monitoring Kromatografi Kolom

8.2.1 Nilai Rf Hasil Monitoring Kromatografi Kolom (Cara Kering)

a) Fraksi 7 – 9

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{3,9 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,5$$

$$Rf \text{ noda 2} = \frac{3 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,385$$

b) Fraksi 10 – 14

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{3 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,385$$

c) Fraksi 15

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{3 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,385$$

$$Rf \text{ noda 2} = \frac{2,5 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,321$$

d) Fraksi 16 -18

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{2,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,35$$

$$Rf \text{ noda 2} = \frac{2,2 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,275$$

$$Rf \text{ noda 3} = \frac{1,6 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,2$$

e) Fraksi 20 – 29

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{1,4 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,175$$

$$Rf \text{ noda 2} = \frac{1,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,245$$

f) Fraksi 30 – 39

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{1,4 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,175$$

$$Rf \text{ noda 2} = \frac{1,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,16$$

g) Fraksi 40 – 82

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{0,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,112$$

h) Fraksi 86 – 108

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{0,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,038$$

i) Fraksi 110 – 120

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{5,5 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,688$$

j) Fraksi 122 – 126

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{0,2 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,025$$

8.2.2 Nilai Rf Hasil Monitoring Kromatografi Kolom (Cara Basah)

a) Fraksi 14 – 20

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{3,85 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,48$$

b) Fraksi 23 – 26

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{2 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,25$$

$$Rf \text{ noda 2} = \frac{2,5 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,31$$

$$Rf \text{ noda 3} = \frac{3,85 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,48$$

c) Fraksi 27 – 29

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{2,6 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,30$$

$$Rf \text{ noda 2} = \frac{2,6 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,25$$

$$Rf \text{ noda 3} = \frac{3,1 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,37$$

$$Rf \text{ noda 4} = \frac{2,9 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,34$$

$$Rf \text{ noda 5} = \frac{2,8 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,32$$

d) Fraksi 30 – 49

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{0,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,1$$

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{1,4 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,175$$

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{2,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,28$$

e) Fraksi 50 – 59

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{0,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,1$$

$$Rf \text{ noda 2} = \frac{1,4 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,175$$

f) Fraksi 60 – 80

$$Rf \text{ noda 1} = \frac{0,8 \text{ cm}}{8,5 \text{ cm}} = 0,094$$

9. Tabel Hasil Monitoring KLT

9.1 Hasil Monitoring KLT Kromatografi Kolom Dengan Pembuatan Fase Diam Cara Kering

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 - 153	kosong				

9.2 Hasil Monitoring KLT Kromatografi Kolom Dengan Pembuatan Fase
Diam Cara Basah I

No	Fraksi	Warna (UV)	Jarak Senyawa	Jarak Elusi	Rf	Senyawa
1.	1 – 13	kosong				
2.	14 – 22	hijau	3,85 cm	8 cm	0,48	Steroid
3.	23 – 26	Merah	2 cm	8 cm	0,25	Campur
		Biru	2,5 cm	8 cm	0,31	
		hijau	3,85 cm	8 cm	0,48	
4.	27 – 29	Merah	2,4 cm	8,5 cm	0,25	Campur
		Merah			0,31	
		Biru	2,3 cm		0,37	
		Biru			0	
		Hijau				
5.	30 – 39	Merah	0,8 cm		0,094	Campur
		Merah	1,4 cm		0,16	
		biru	2,3 cm		0,27	
6.	40 – 59	Merah	0,8 cm	8 cm	0,094	Campur
		Merah	1,4 cm		0,16	
7.	60 – 80	merah	0,8 cm	8,5 cm	0,094	triterpenoid
8.	81 – 157	kosong				

10. Dokumentasi



Gambar 1. Analisis Kadar Air Sampel
E. spinosum



Gambar 2. Maserasi ke 1 E. spinosum



Gambar 3. Maserasi ke 3 E. spinosum



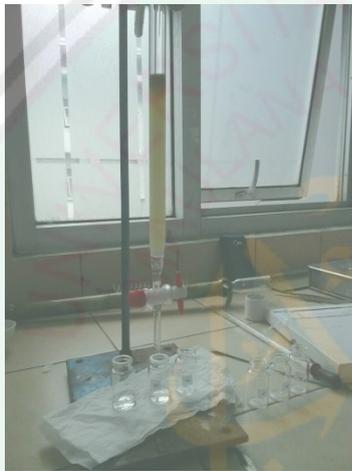
Gambar 4. Proses pemekatan ekstrak
metanol



Gambar 5. Partisi



Gambar 6. Identifikasi Senyawa
Triterpenoid menggunakan
uji reagen

Gambar 7. Ekstrak metanol *E.spinsum*Gambar 8. Fraksi P.E *E. spinosum*

Gambar 9. Kromatografi Kolom Cara



Gambar 10. Kromatografi Kolom Cara

Kering



Basah



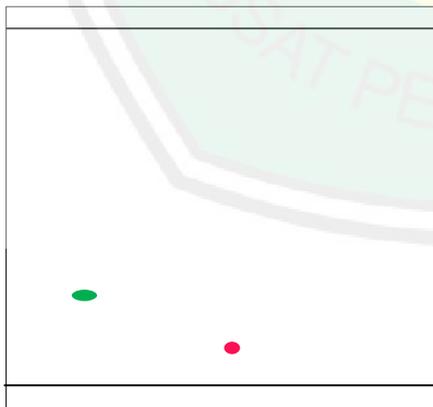
Gambar 9. KLTA menggunakan eluen
n-heksana:etil asetat
(4,25:0,75 mL)



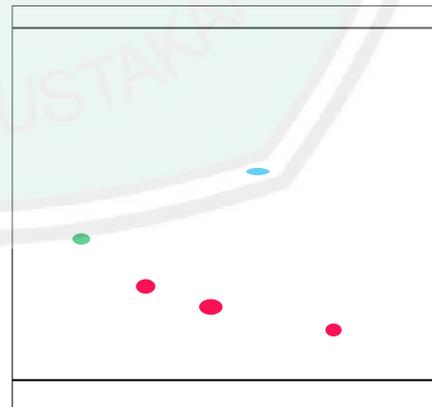
Gambar 10. KLTA menggunakan eluen
n-heksana: etil asetat
(4,5:0,5)



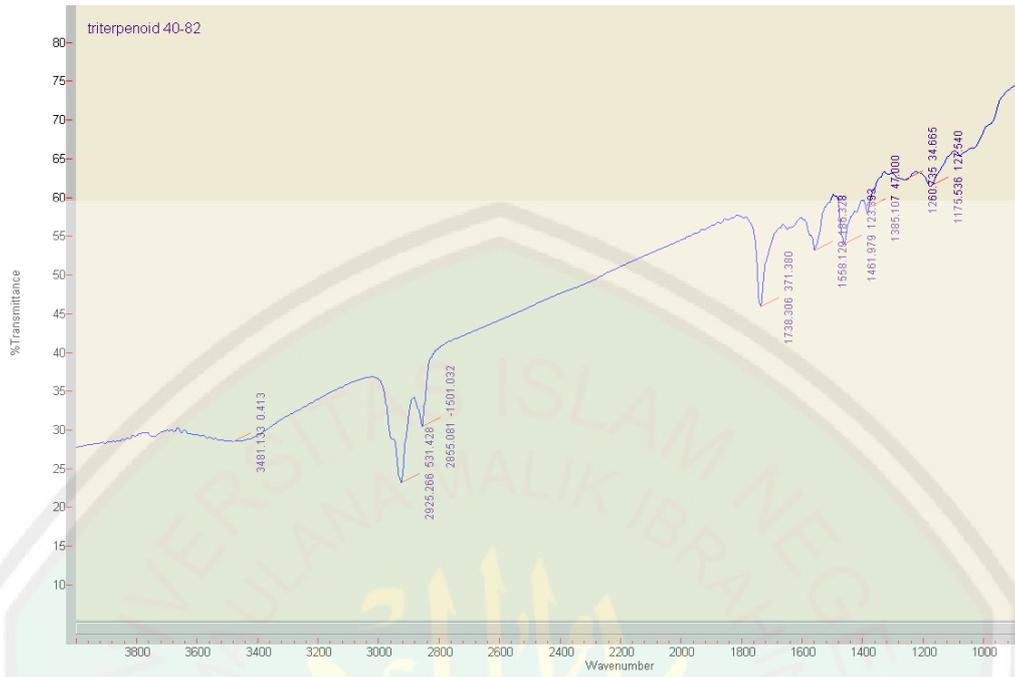
Gambar 11. KLTA menggunakan eluen
n-heksana:etil asetat (4:1)



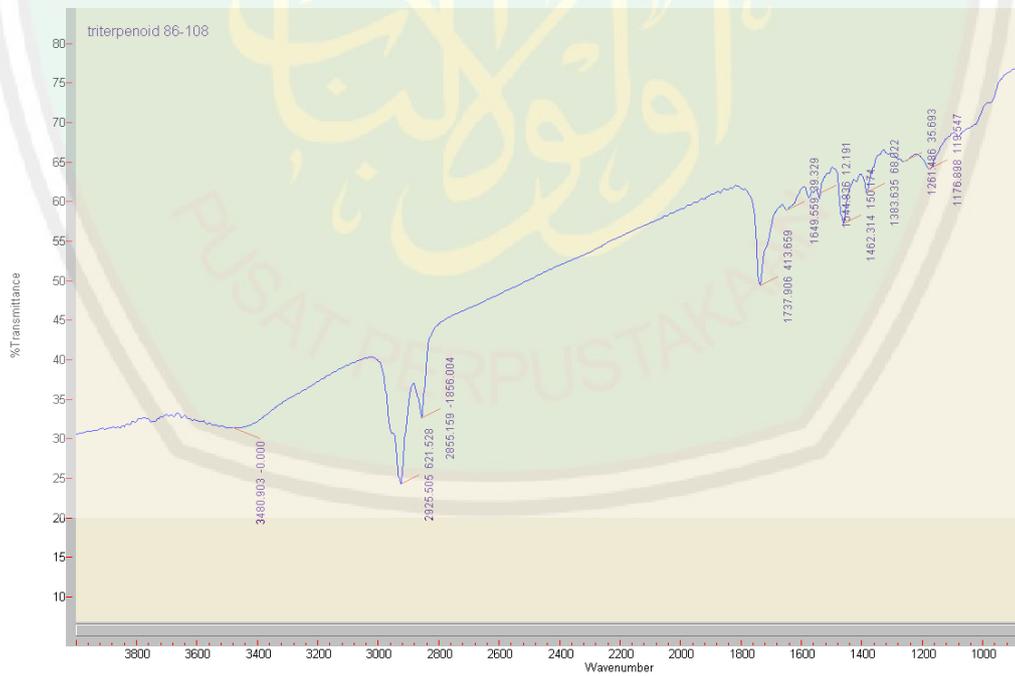
Gambar 12. Ilustrasi gabungan fraksi
kromatografi kolom basah



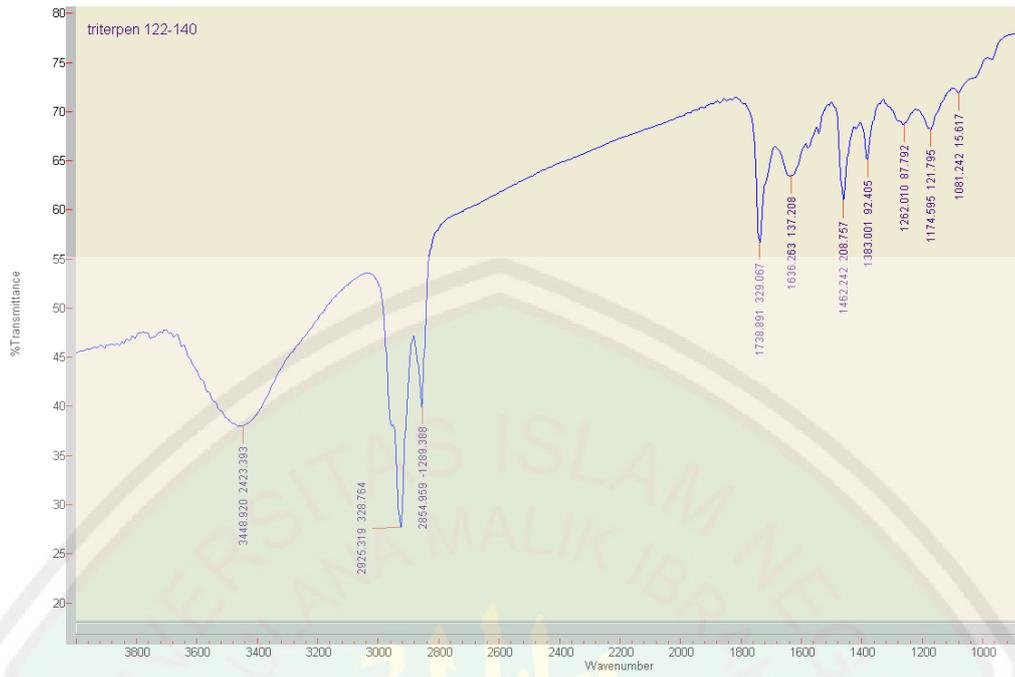
Gambar 13. Ilustrasi gabungan fraksi
kromatografi kolom
kering



Gambar14. Spektra FT-IR fraksi K.2



Gambar 15. Spektra FT-IR fraksi K.3



Gambar 16. Spektra FT-IR fraksi K.5