



Artikel Penelitian

## Variasi Komposisi Eluen pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* dengan Kromatografi Kolom Basah

Armeida Dwi Ridhowati Madjid\*, Dwi Anik Rahmawati, Ahmad Ghanaim Fasya

Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang, Indonesia, 65144

**INFO ARTIKEL****ABSTRAK****Riwayat Artikel**

Direvisi 6 Juni 2019

Diterima 23 Juni 2020

Tersedia online 27 Juli 2020

\* Email penulis korespondensi:

armeida@uin-malang.ac.id

Steroid and triterpenoid compounds in petroleum ether fractions of red algae *Eucheuma cottonii* were isolated by slurry column chromatography. Isolation was started with maceration extraction using methanol solvent. The methanol extract was hydrolyzed with HCl 2 N and partitioned using petroleum ether solvent. The presence of steroid and triterpenoid was determined by phytochemical test using *Lieberman Burchard* reagent. Petroleum ether fraction was separated by slurry column chromatography with the variation of eluent composition n-hexane: ethyl acetate 16:4; 17:3; 18:2. The isolates were monitored by analytical thin-layer chromatography (TLC) and the best result was identified using FTIR. Percent yields of methanol extract and petroleum ether fraction were 11.866% and 8.03%, respectively. The optimum eluent composition in column chromatography for separation was n-hexane : ethyl acetate (18:2) obtained 2 steroid and 3 triterpenoid fractions. FTIR analysis gives information about functional groups of -OH, C=C, C-O, CH<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> for steroids and functional groups of -OH, C=O, C=C, CH<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> for triterpenoid.

Keywords: *Eucheuma cottonii*, column chromatography, steroid, triterpenoid, variation of eluent composition

Senyawa steroid dan triterpenoid dalam fraksi petroleum eter alga merah *Eucheuma cottonii* telah diisolasi menggunakan kromatografi kolom basah. Isolasi dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak pekat metanol dihidrolisis dengan HCl 2 N dan dipartisi menggunakan pelarut petroleum eter. Senyawa steroid dan triterpenoid diuji fitokimia menggunakan reagen *Lieberman Burchard*. Fraksi petroleum eter dipisahkan menggunakan kromatografi kolom basah variasi komposisi eluen n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 16:4; 17:3; dan 18:2. Hasil isolasi dimonitoring menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) analitik. Hasil monitoring yang terbaik diidentifikasi gugus fungsinya menggunakan FTIR. Hasil penelitian menunjukkan rendemen ekstrak metanol dan fraksi petroleum eter masing-masing sebesar 11,866% dan 8,03%. Pemisahan kolom dengan variasi komposisi eluen n-heksana:etil asetat terbaik adalah 18:2 dengan diperoleh 2 kelompok fraksi steroid dan 3 kelompok fraksi triterpenoid. Hasil analisis FTIR pada isolat steroid memberikan informasi gugus -OH, C=C, C-O, CH<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, sedangkan isolat triterpenoid memberikan informasi gugus -OH, C=O, C=C, CH<sub>2</sub>, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Gugus gem dimetil (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) merupakan ciri khas rantai samping steroid ataupun triterpenoid.

Kata kunci: *Eucheuma cottonii*, kromatografi kolom, steroid, triterpenoid, variasi komposisi eluen

## 1. Pendahuluan

Kekayaan alam di Indonesia untuk golongan alga tersebar luas di seluruh daerah. Salah satu daerah yang memiliki kekayaan tersebut adalah Wongsorejo Banyuwangi. Kekayaan alam biota laut pada daerah ini cukup melimpah dengan beberapa jenis serta variasi warna. Rumput laut memiliki toksisitas [1, 2] sehingga berpotensi sebagai antivirus [3], antibakteri [4, 5] dan antioksidan [2, 6, 7]. Salah satu kekayaan biota laut yang dimanfaatkan dan dibudidayakan manusia adalah alga merah *Eucheuma cottonii*. Hal ini dikarenakan banyak kandungan zat-zat yang bermanfaat di dalamnya. Senyawa metabolit sekunder yang terkandung *E. cottonii* adalah steroid dan triterpenoid [8]. Senyawa steroid tersebut memiliki toksisitas terhadap *Artemia salina* [9] dan berpotensi sebagai antioksidan [2] serta antimikroba [5]. Adapun senyawa triterpenoid memiliki kemampuan sebagai zat yang mampu meningkatkan aktivitas rifampisin (antibiotik) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* [10].

Isolasi senyawa aktif diawali dengan ekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol dan rendemen yang diperoleh sebesar 16,97% [1]. Ekstrak metanol *E. cottonii* dihidrolisis dengan HCl 2 N untuk memecah ikatan glikosida yang menghubungkan antara komponen gula (glikon) dan metabolit sekunder (aglikon) [7]. Ekstrak hasil hidrolisis dengan HCl 2 N memiliki nilai LC<sub>50</sub> lebih rendah sebesar 70,32 ppm dibandingkan dengan sebelum dilakukan hidrolisis sebesar 194,40 ppm [1].

Senyawa steroid lebih murni dapat diisolasi menggunakan kromatografi kolom [8]. Fase gerak (eluen) merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi hasil isolasi pada kromatografi kolom [11]. Isolasi senyawa steroid dan triterpenoid menggunakan kromatografi kolom dapat dilakukan dengan memvariasikan komposisi eluen n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 16:4; 17:3; dan 18:2. Hasil isolat murni yang diperoleh dapat dimonitoring dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) analitik dengan eluen terbaik 4,25:0,75 [12]. Adanya steroid ditunjukkan dengan noda berwarna hijau kebiruan [13] dan triterpenoid ditunjukkan dengan noda berwarna merah ungu (violet) [14].

Isolasi steroid dan triterpenoid dengan menggunakan kromatografi kolom basah diperoleh 9 kelompok fraksi dengan 5 kelompok fraksi steroid dan 4 kelompok fraksi triterpenoid [13]. Gugus fungsi dari hasil isolat yang positif terdapat steroid dan triterpenoid dapat diidentifikasi gugus fungsinya dengan FTIR (Fourier-Transform Infrared), dimana terdapat gugus gem dimetil yang merupakan ciri khas rantai samping senyawa steroid ataupun triterpenoid. Berdasarkan latar belakang di atas, untuk mengetahui keefektifan kromatografi kolom dengan variasi komposisi eluen dalam memisahkan senyawa steroid dan triterpenoid dalam sampel *E. cottonii* menjadi tujuan atas penelitian ini.

## 2. Bahan dan Metode

### 2.1. Bahan

Sampel pada penelitian ini adalah alga merah *Eucheuma cottonii* dari Wongsorejo, Banyuwangi. Bahan kimia yang digunakan adalah metanol p.a (Merck), HCl 2 N p.a. (Merck), petroleum eter p.a. (Merck), n-heksana p.a. (Merck), etil asetat p.a. (Merck), asam asetat anhidrat (Merck), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> p.a. (Merck), kloroform p.a. (Merck), NaHCO<sub>3</sub> (Merck), plat silika gel GF<sub>254</sub> (Merck), dan silika gel G60 (Merck).

### 2.2. Preparasi Sampel

Alga merah sebanyak 75 kg dicuci bersih dengan air dan diiris kecil-kecil. Kemudian, sampel dikeringanginkan dan dioven pada suhu 38°C selama 24 jam. Sampel yang sudah kering dihaluskan hingga didapatkan serbuk alga merah.

### 2.3. Penentuan Kadar Air

Sampel sebanyak 1 g dimasukkan dalam cawan porselen yang sudah diketahui berat konstan, kemudian dioven pada suhu 100-105°C dan didinginkan dalam desikator. Perlakuan ini diulangi sampai berat konstan. Kadar air dalam alga merah dapat dihitung menggunakan Persamaan 1 [15].

$$\text{Kadar air} = \frac{(b - c)}{(b - a)} \times 100\% \quad (1)$$

Dimana, a adalah bobot cawan kosong, b adalah bobot sampel ditambah cawan sebelum dikeringkan, dan c adalah bobot cawan ditambah sampel setelah dikeringkan.

### 2.4. Ekstraksi Maserasi Alga Merah

Sampel alga merah sebanyak 100 g diekstraksi secara maserasi menggunakan 500 mL pelarut metanol selama 24 jam disertai dengan pengocokan, dan disaring menggunakan ayakan 60 mesh. Ampas yang telah diperoleh selanjutnya dimaserasi kembali dengan pelarut metanol sebanyak tiga kali pengulangan hingga filtrat yang dihasilkan bening. Ketiga

filtrat yang diperoleh hasil penyaringan digabung dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat yang diperoleh dihitung nilai rendemennya dengan Persamaan 2 [6].

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \quad (2)$$

### 2.5. Hidrolisis Ekstrak Pekat Metanol

Ekstrak pekat metanol alga merah sebanyak 5 g ditambahkan 10 mL larutan HCl 2 N dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu ruang selama 1 jam. Selanjutnya, hidrolisat yang diperoleh ditambahkan NaHCO<sub>3</sub> sampai pH-nya netral (pH 7) [16].

### 2.5. Partisi Ekstrak dengan Petroleum Eter

Hidrolisat dengan pH 7 kemudian dipartisi dengan 50 mL petroleum eter dan 50 mL metanol. Dari hasil partisi akan diperoleh dua lapisan yaitu lapisan organik dan lapisan air. Partisi dilakukan tiga kali pengulangan dengan pelarut yang sama untuk memperoleh senyawa aktif yang lebih maksimal. Ekstrak hasil partisi kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat yang kemudian ditimbang beratnya dan ditentukan rendemennya [16].

### 2.6. Uji Steroid dan Triterpenoid dengan Reagen Lieberman Burchard

Satu miligram ekstrak petroleum eter alga merah dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform. Selanjutnya, ekstrak ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrida dan 1-2 mL larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung reaksi. Golongan senyawa steroid akan menunjukkan warna biru kehijauan [17] dan senyawa triterpenoid akan menunjukkan cincin kecoklatan atau violet pada pembatas dua pelarut [16].

### 2.7. Isolasi Steroid dan Triterpenoid dengan Kromatografi Kolom Basah Variasi Komposisi Eluen

Ekstrak alga merah yang menunjukkan positif steroid dan triterpenoid diisolasi menggunakan kromatografi kolom basah dengan fase diam silika gel G60. Bubur silika dibuat dengan ditambahkan pelarut n-heksana:etil asetat (16:4; 17:3; 18:2) sampai silika terendam dan diaduk dengan *magnetic stirrer* pada suhu ruang sampai terbentuk suspensi. Suspensi tersebut kemudian dimasukkan ke dalam kolom dan didiamkan selama 24 jam. Setelah itu, sampel sebanyak 0,1 g yang sudah dilarutkan dalam 1 mL eluen n-heksana:etil asetat (16:4) dimasukkan dalam kolom kromatografi [13]. Perlakuan yang sama diulangi dengan untuk eluen dengan komposisi 17:3 dan 18:2. Kecepatan alir diatur 2 mL/menit dan eluat ditampung pada botol vial. Proses elusi dihentikan setelah semua senyawa steroid dan triterpenoid diperkirakan telah keluar dari kolom.

### 2.8. Monitoring Hasil Kromatografi Kolom Basah dengan Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Analitik

Identifikasi fraksi hasil isolasi kromatografi kolom dilakukan dengan KLT analitik. Identifikasi dengan KLT analitik menggunakan fase diam plat silika gel GF<sub>254</sub> dan eluen berupa pelarut campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17:3. Sebelum digunakan, eluen dijenuhkan selama 1 jam, sedangkan plat silika gel diaktivasi dengan dioven pada suhu 110°C. Kemudian, fraksi ditotolkan pada silika gel yang telah diaktivasi, dimasukkan ke dalam bejana pengembang yang berisi eluen jenuh, dan dielusi sampai tanda batas atas. Noda hasil pemisahan kemudian diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm dan dihitung faktor retensi (R<sub>f</sub>) noda [18].

### 2.9. Identifikasi Gugus Fungsi dengan Spektrofotometer FTIR

Senyawa hasil isolasi kemudian dilakukan identifikasi dengan menggunakan spektrofotometer FTIR. Isolat yang diperoleh dijadikan pelet KBr dengan cara digerus bersamaan dengan KBr menggunakan mortar agate kemudian ditekan dengan tekanan 80 Torr. Selanjutnya, sampel yang sudah berupa pelet dimasukkan ke dalam spektrofotometer FTIR untuk dianalisis gugus fungsi.

## 3. Hasil dan Pembahasan

### 3.1. Identifikasi Sampel

Kadar air yang tinggi dapat menurunkan konsentrasi pelarut yang digunakan pada ekstraksi maserasi. Kadar air maksimal untuk memenuhi syarat maserasi yaitu <11% [19]. Kandungan kadar air pada alga merah sebesar 4,56%. Ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol akan menyebabkan proses difusi dari steroid dan triterpenoid yang terkandung dalam sampel ke pelarut. Steroid dan triterpenoid bersifat non polar tetapi karena senyawa tersebut terikat dengan ikatan glikosida yang bersifat polar, maka untuk mengekstraknya dibutuhkan pelarut polar yaitu metanol. Dari 100 g sampel yang dimaserasi dengan 1,5 L metanol diperoleh rendemen sebesar 11,866%. Selanjutnya, ikatan glikosida tersebut diputus melalui hidrolisis dengan penambahan HCl. Pengambilan steroid dan triterpenoid dalam bentuk aglikon dilakukan dengan

menggunakan petroleum eter. Fase organik diambil dan dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator vacuum* dan rendemen yang diperoleh pada tahapan partisi sebesar 8,03% dari berat ekstrak awal 5,0004 g.

### 3.2. Isolasi Steroid dan Triterpenoid dengan Kromatografi Kolom Basah Variasi Komposisi Eluen

Fraksi pekat petroleum eter yang dilarutkan dengan reagen Lieberman Burchard menghasilkan warna hijau yang menunjukkan senyawa steroid dan cincin coklat menunjukkan senyawa triterpenoid. Fase diam yang berupa bubuk silika mengalami penurunan ketinggian dari 8 cm menjadi 7,5 cm, hal ini menunjukkan fase diam sudah termampatkan dan dapat memisahkan senyawa dengan maksimal. Hasil isolat ditampung setiap 2 mL dalam vial. Hasil monitoring variasi komposisi eluen 16:4 diperoleh dua kelompok fraksi yaitu 1 fraksi steroid dan 1 fraksi triterpenoid (**Tabel 1**).

**Tabel 1.** Hasil Monitoring Variasi Eluen n-Heksana : Etil Asetat (16:4)

Fraksi	Warna (UV 366 nm)	Js* (cm)	Je* (cm)	Rf	Senyawa
1-8	-	-	-	-	-
9-10	Hijau	4,9	8	0,6125	Steroid
11-12	Hijau	4,85	8	0,606	Campuran
	Hijau	2,8	8	0,35	
13	Hijau	2,8	8	0,933	Campuran
	Ungu	2,3	8	0,288	
14-19	Hijau	2,75	8	0,344	Campuran
	Ungu	2,35	8	0,294	
	Merah	1,5	8	0,188	
20	Hijau	2,9	8	0,363	Campuran
	Ungu	2,5	8	0,313	
	Merah	1,1	8	0,138	
21-25	Merah	1,1	8	0,138	Campuran
	Merah	1,05	8	0,131	
46-200	-	-	-	-	-

\*Js = jarak senyawa, Je = jarak elusi

Hasil monitoring variasi komposisi eluen 17:3 diperoleh tiga kelompok fraksi yaitu 1 fraksi steroid dan 2 fraksi triterpenoid (**Tabel 2**). Hasil monitoring variasi komposisi eluen 18:2 diperoleh lima kelompok fraksi yaitu 2 kelompok fraksi steroid dan 3 kelompok fraksi triterpenoid (**Tabel 3**). Jadi, dapat disimpulkan bahwa variasi komposisi eluen terbaik untuk isolasi steroid dan triterpenoid adalah 18:2 karena diperoleh hasil fraksi tunggal yang lebih banyak.

**Tabel 2.** Hasil Monitoring Variasi Eluen n-Heksana : Etil Asetat (17:3)

Fraksi	Warna (UV 366 nm)	Js* (cm)	Je* (cm)	Rf	Senyawa
1-8	-	-	-	-	-
9-10	Hijau	5,25	8	0,6563	Steroid
11-12	Hijau	5,2	8	0,65	Campuran
	Merah	3,75	8	0,4688	
13-16	Merah	3,8	8	0,475	Triterpenoid
17-19	Merah	3,85	8	0,4813	Campuran
	Hijau	3,15	8	0,3938	
	Ungu	2,7	8	0,3375	
20-29	Hijau	3,1	8	0,3875	Campuran
	Ungu	2,7	8	0,3375	
30-37	Hijau	3,2	8	0,4	Campuran
	Merah	1,8	8	0,225	
38-39	-	-	-	-	-
40-67	Merah	1,8	8	0,225	Campuran
	Merah	1,15	8	0,1438	
68-90	Merah	1,2	8	0,15	Triterpenoid
91-200	-	-	-	-	-

\*Js = jarak senyawa, Je = jarak elusi

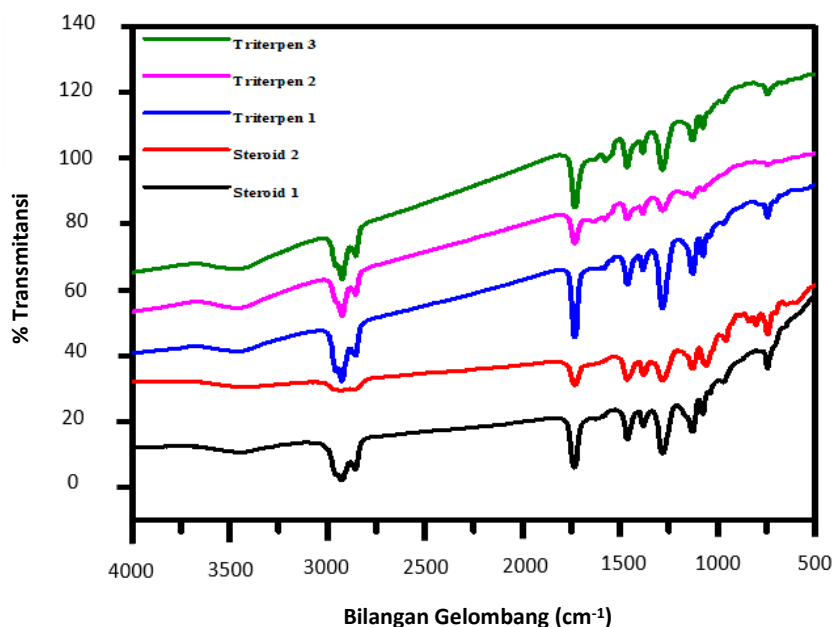
**Tabel 3.** Hasil Monitoring Variasi Eluen n-Heksana : Etil Asetat (18:2)

Fraksi	Warna (UV 366 nm)	Js* (cm)	Je* (cm)	Rf	Senyawa
1-11	-	-	-	-	-
12-19	Hijau	4,75	8	0,594	Steroid
20-21	-	-	-	-	-
22-29	Merah	3,5	8	0,438	Triterpenoid
30-34	Merah	3,6	8	0,45	Campuran
	Hijau	3,1	8	0,388	
	Ungu	2,6	8	0,325	
35-49	Hijau	2,9	8	0,3625	Campuran
	Ungu	2,5	8	0,3125	
50-65	Hijau	2,8	8	0,35	Steroid
66-70	-	-	-	-	-
71-119	Merah	1,85	8	0,231	Triterpenoid
120-122	Merah	1,85	8	0,231	Campuran
	Merah	1,2	8	0,15	
123-199	Merah	1,2	8	0,15	Triterpenoid
200	-	-	-	-	-

\*Js = jarak senyawa, Je = jarak elusi

### 3.3. Identifikasi Senyawa dengan Spektrofotometer FTIR

Hasil identifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR ditunjukkan pada **Gambar 1**. Kelima isolat memiliki serapan O-H pada bilangan gelombang 3550-3200  $\text{cm}^{-1}$ , serapan  $\text{Csp}_3\text{-H}$  pada 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$ , C=C pada 1690-1620  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{-C(CH}_3)_2$  pada 1396-1365  $\text{cm}^{-1}$  dan C-O alkohol pada 1205-1030  $\text{cm}^{-1}$ . Adapun perbedaan dari kelima hasil serapan FTIR tersebut adalah pada triterpenoid 3 tidak memiliki serapan C=C-H siklik pada 995-650  $\text{cm}^{-1}$ , steroid 1 terdapat serapan C=O keton pada 1745-1715  $\text{cm}^{-1}$ , steroid 2 terdapat serapan C=C general pada 1750-1735  $\text{cm}^{-1}$ , triterpenoid 1 terdapat serapan C=O ester pada 1745-1735  $\text{cm}^{-1}$ , triterpenoid 2 terdapat C=O asam karboksilat pada 1725-1700  $\text{cm}^{-1}$ , sedangkan triterpenoid 3 terdapat serapan C=O keton pada 1745-1715  $\text{cm}^{-1}$ .



**Gambar 1.** Spektra FTIR fraksi tunggal variasi eluen n-heksana : etil asetat (18:2).

## 4. Kesimpulan

Fraksi pekat petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah mengandung steroid dan terpenoid. Variasi komposisi eluen terbaik pada pemisahan senyawa steroid dan triterpenoid fraksi petroleum eter menggunakan kromatografi kolom basah adalah 18:2. Identifikasi gugus fungsi menggunakan FTIR pada steroid dan triterpenoid dengan eluen terbaik



diperoleh 5 kelompok fraksi, yaitu 2 kelompok fraksi steroid dan 3 kelompok fraksi triterpenoid. Hasil identifikasi dari senyawa steroid menghasilkan serapan O-H, C-H  $sp^3$ , C=C,  $-C(CH_3)_2$ , sedangkan pada senyawa triterpenoid menghasilkan serapan O-H, C-H  $sp^3$ , C=O, C=C, C-O,  $-C(CH_3)_2$ . Adanya gugus gem dimetil merupakan ciri khas rantai samping senyawa steroid dan triterpenoid.

#### Daftar Pustaka

- [1] S. Afif, A. G. Fasya, & R. Ningsih, "Ekstraksi, Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma cottonii* dari Perairan Sumenep Madura," *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, vol. 4, no. 2, pp. 101-106, 2015.
- [2] A. G. Fasya, S. Amalia, D. S. Megawati, F. Salima, V. A. Kusuma, & B. Purwantoro, "Isolation, Identification, and Bioactivity of Steroids Isolates from *Hydrilla verticillata* Petroleum Ether Fraction," in IOP Conference Series: Earth and Environmental Science on the 10<sup>th</sup> International Conference on Green Technology, vol. 456, no. 012009, 2020.
- [3] A. Manilal, S. Sugathan, J. Selvin, S. Kiran, & C. Shakir, "In Vivo Antiviral Activity of Polysaccharide from the Indian Green Alga, *Acrosiphonia orientalis* (J. Agardh): Potential Implication in Shrimp Disease Management," *World Journal of Fish and Marine Sciences*, vol. 1, no. 4, pp. 278-282, 2009.
- [4] K. Zandi, S. Tajbakhsh, I. Nabipour, Z. Rastian, F. Yousefi, S. Sharafian, & K. Sartavi, "In Vitro Antitumor Activity of *Gracilaria corticata* (a Red Alga) against Jurkat and Molt-4 Human Cancer Cell Lines," *African Journal of Biotechnology*, vol. 9, no. 40, pp. 6787-6790, 2010.
- [5] Z. Andriani, A. G. Fasya, & A. Hanapi, "Aktivitas Antibakteri Ekstrak Alga Merah *Eucheuma cottonii* dari Pantai Tanjung, Sumenep," *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, vol. 4, no. 2, pp. 93-100, 2015.
- [6] A. Hanapi, A. G. Fasya, U. Mardiyah, & Miftahurrahmah, "Uji Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi," *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, vol. 2, no. 2, pp. 126-137, 2013.
- [7] U. Mardiyah, A. G. Fasya, B. Fauziah, & S. Amalia, "Ekstraksi, Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Perairan Banyuwangi," *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, vol. 3, no. 1, pp. 39-46, 2014.
- [8] A. G. Fasya, A. P. Tyas, F. A. Mubarakah, R. Ningsih, & A. D. R. Madjid, "Variasi Diameter Kolom dan Rasio Sampel-Silika pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* dengan Kromatografi Kolom Basah," *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, vol. 6, no. 2, pp. 57-64, 2018.
- [9] A. G. Fasya, A. Baderos, A. D. R. Madjid, S. Amalia, & D. S. Megawati, "Isolation, Identification, and Bioactivity of Steroids Compounds from Red Algae *Eucheuma cottonii* Petroleum Ether Fraction," in AIP Conference Proceedings, vol. 2120, no.1, 2019.
- [10] E. Pridawati, A. Ahmad, & U. Hanapi, "Isolation and Identification of Secondary Metabolites of Chloroform Fraction of Macroalgae *Padina australis* as Anti Tuberculosis," *Indonesia Chimica Acta*, vol. 7, no.1, pp. 1-8, 2014.
- [11] I. Sundari, "Identifikasi Senyawa dalam Ekstrak Etanol Biji Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.)," Skripsi, Universitas Sebelas Maret, Surakarta, 2010.
- [12] M. I. Setiyawan, R. Ningsih, U. Syarifah, & T. K. Adi, "Isolasi Senyawa Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol dan Identifikasinya Menggunakan FTIR," Skripsi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang, 2015.
- [13] A. N. L. Sholikah, "Isolasi Senyawa Steroid dari Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) Menggunakan Metode Kromatografi Kolom," Skripsi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang, 2016.
- [14] E. S. Simaremare, "Skriming Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Gatal (*Laportea decumana* (Roxb.) Wedd)," *Pharmacy*, vol. 11, no.1, pp. 98-107, 2014.
- [15] AOAC, *Official Methods of Analysis*. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1995.
- [16] S. Khoiriyah, A. Hanapi, & A. G. Fasya, "Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat, Kloroform dan Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga Coklat *Sargassum vulgare* dari Pantai Kapong Pamekasan Madura," *ALCHEMY*, vol. 3, no.2, pp. 133-144, 2014.
- [17] L. Indrayani, H. Soetjipto, & L. Sihalale, "Skriming Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach," *Berkala Penelitian Hayati*, vol. 12 no. 1, pp. 57-61, 2006.
- [18] A. N. Kristanti, N. S. Aminah, M. Tanjung, & B. Kurniadi, *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press. 2008.
- [19] A. Sulistijowati & D. Gunawan, "Efek Ekstrak Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* A. Gray) terhadap *Candida albicans* serta Profil Kromatografinya," *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*, vol. 8, no. 3-4, pp. 32-37, 1998.
- [20] G. Socrates, *Infrared Characteristic Group Frequencies 2<sup>nd</sup> Edition*. New Jersey: John Wiley and Sons, 1994.