

Isolasi, Karakterisasi, dan Penetapan Kadar Flavonoid dari Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) menggunakan Teknik Kromatografi dan Spektrofotometri UV-Vis

Ratri Pramudita^{1*}, Adhel Arfiani Achmad², Zalva Atalya Rieuwpassa³, Asmarani Ayuning Putri⁴, Andini Amanah Saharudin⁵, Zulfahmi Hamka⁶

¹⁻⁶ Program Studi Farmasi, Universitas Muhammadiyah Makassar

Email: ratripramudita740@gmail.com^{1*}, adhelarfiani29@gmail.com², zalfarini71@gmail.com³, asmaraniayuningputri@gmail.com⁴, andiniamanah796@gmail.com⁵, fahmihamka13@gmail.com⁶

*Penulis Korespondensi: ratripramudita740@gmail.com

Abstract: This study aimed to isolate and characterize bioactive compounds from the red algae *Eucheuma cottonii* using chromatographic techniques. The dried sample was extracted by maceration with 96% ethanol, followed by liquid-liquid fractionation using *n*-hexane and ethyl acetate. The ethyl acetate fraction was separated by column chromatography employing seven solvent ratio gradients and monitored using thin-layer chromatography (TLC), followed by preparative TLC and two-dimensional TLC for purity evaluation. The extraction yielded 20.72% crude extract. Column chromatography produced 22 fractions, which were grouped into five categories based on color characteristics: clear, orange, light peach, faint light peach, and clear. TLC analysis showed an *R_f* value of 0.32, indicating satisfactory separation. Preparative TLC produced a single major band, whereas two-dimensional TLC revealed elongated spots, suggesting that the isolate had not yet reached complete purity. The flavonoid content of the red algae sample, as determined by the UV-Vis spectrophotometric method, was 74.65%. These findings demonstrate that column chromatography is effective as an initial separation method for bioactive compounds from *Eucheuma cottonii*. However, further optimization of the eluent system is required to obtain compounds with higher purity for subsequent characterization.

Keywords: Bioactive Compounds; Column Chromatography; *Eucheuma Cottonii*; Preparative TLC; Thin-Layer Chromatography.

Abstrak: Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan mengkarakterisasi senyawa bioaktif dari alga merah *Eucheuma cottonii* menggunakan teknik kromatografi. Siplisia diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 96%, kemudian dilakukan fraksinasi cair-cair menggunakan *n*-heksana dan etil asetat. Fraksi etil asetat selanjutnya dipisahkan menggunakan kromatografi kolom dengan tujuh variasi perbandingan pelarut, kemudian dimonitor menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), dilanjutkan dengan kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP), dan diuji kemurniannya menggunakan KLT dua dimensi. Hasil penelitian menunjukkan rendemen ekstrak sebesar 20,72%. Kromatografi kolom menghasilkan 22 fraksi yang dikelompokkan menjadi lima kelompok berdasarkan karakteristik warna, yaitu bening, oranye, peach muda, peach muda samar, dan bening. Hasil KLT menunjukkan nilai *R_f* sebesar 0,32 yang berada dalam rentang pemisahan yang baik. Pengamatan KLTP memperlihatkan satu pita utama, sedangkan KLT dua dimensi masih menunjukkan noda memanjang sehingga mengindikasikan bahwa isolat belum sepenuhnya murni. Persen kadar flavonoid yang didapatkan dari sampel alga merah dengan menggunakan metode spektrofotometri uv-vis sebesar 74,65%. Penelitian ini menunjukkan bahwa kromatografi kolom efektif sebagai tahap awal pemisahan senyawa bioaktif *Eucheuma cottonii*, namun masih diperlukan optimasi sistem eluen untuk memperoleh isolat dengan tingkat kemurnian yang lebih tinggi.

Kata kunci: *Eucheuma Cottonii*; KLT Preparatif; Kromatografi Kolom; Kromatografi Lapis Tipis; Senyawa Bioaktif.

1. PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara pemasok utama rumput laut kering di pasar internasional khususnya jenis rumput laut *Eucheuma cottonii*. Rumput laut adalah bagian terbesar dari tanaman laut. Tercatat 555 jenis rumput laut dari sekitar 8000 jenis yang ada tumbuh dengan baik di perairan Indonesia. Indonesia adalah salah satu produsen utama rumput laut dunia dengan produksi rumput laut basah mencapai 11,6 juta ton pada tahun 2016. Produksi rumput laut dunia pada tahun 2016 sekitar 30 juta ton sehingga Indonesia berkontribusi hampir 40% dari total produksi rumput laut dunia (Husna *et al.*, 2023).

Rumput laut alga merah (*Eucheuma cottonii*) merupakan jenis makroalga yang hidup menempel pada substrat di dasar perairan atau terapung di permukaan perairan. Secara taksonomi, alga merah (*Eucheuma cottonii*) termasuk dalam filum *Rhodophyta*, kelas *Florideophyceae*, ordo *Gigartinales*, famili *Solieriaceae*, dan species *Eucheuma cottoni*. Alga ini umumnya berbentuk silindris, gepeng atau bercabang dengan tekstur seperti tulang rawan dan berwarna hijau hingga cokelat kemerahan sehingga sering dibedakan menjadi varietas hijau dan varietas cokelat (Saraswati *et al.*, 2022).

Eucheuma cottonii juga memiliki potensi sebagai sumber senyawa bioaktif. Rumput laut ini mengandung lemak, mineral, vitamin, polisakarida, dan protein, serta metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, dan saponin. Berbagai penelitian melaporkan aktivitas biologis *E. cottonii* antara lain sebagai antioksidan, antibakteri, penyembuh luka, analgesic, pelindung sinar UV, bahan baku krim tabir surya, antiinflamasi dan antikanker (Husna *et al.*, 2023).

Untuk mengkaji potensi senyawa bioaktif pada alga merah (*Eucheuma cottonii*), diperlukan tahapan analisis lanjutan untuk memisahkan, memurnikan, dan mengevaluasi kemurnian senyawa yang terkandung di dalamnya. Kromatografi kolom merupakan metode pemisahan yang digunakan untuk memurnikan fraksi berdasarkan perbedaan tingkat kepolaran senyawa dengan menggunakan silika gel sebagai fase diam dan pelarut sebagai fase gerak. Selanjutnya, Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) digunakan untuk memperoleh isolat senyawa target melalui proses pengerokan noda yang terbentuk pada plat. Sementara itu, Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi (KLT2D) digunakan sebagai metode uji kemurnian isolat melalui dua arah pengembangan dengan fase gerak yang berbeda, sehingga isolat yang menunjukkan satu noda tunggal dapat dinyatakan relatif murni (Inayah *et al.*, 2024).

Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa metode kromatografi seperti kromatografi kolom, KLTP, dan KLT2D berperan penting dalam proses pemisahan, pemurnian, dan pengujian kemurnian senyawa bioaktif dari alga merah (*Eucheuma cottonii*).

Namun, penerapan metode tersebut pada penelitian alga merah masih terbatas, sehingga kajian mengenai kemurnian dan karakteristik senyawa aktif yang terkandung di dalamnya masih kurang. Penelitian ini menjadi tahap awal untuk mendukung pengembangan penelitian bahan alam laut secara lebih akurat serta meningkatkan pemanfaatan alga merah (*Eucheuma cottonii*) di bidang farmasi.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi golongan senyawa bioaktif ekstrak etanol *Eucheuma cottonii* menggunakan metode Kromatografi Kolom, Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP), Kromatografi Lapis Tipis 2D (KLT 2D) dan Spektrofotometri Uv-Vis sebagai dasar pengembangan lebih lanjut dalam bidang farmasi dan industri berbasis bahan alam.

2. METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Bahan dan alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alga merah (*Eucheuma cottonii*) yang diperoleh dari Pantai Desa Kupa, Kecamatan Mallusetasi, Kabupaten Barru, Provinsi Sulawesi Selatan. Bahan kimia yang digunakan adalah aquades, aluminium foil, etanol 96%, etil asetat, ekstrak kental alga merah (*Eucheuma cottonii*), hasil fraksi ekstrak alga merah, isolat hasil KLT, kapas, kapas/kertas saring, karet, lempeng KLT, n-heksan, serbuk silika, silica gel G60, dan simplisia alga merah (*Eucheuma cottonii*). Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang pengaduk, botol vial, cawan porselin, chamber, corong, corong pisah, desikator, erlenmeyer, gelas kimia, gelas ukur, gunting, klem, kolom kromatografi, lampu UV 254 nm, lampu UV 366 nm, lap halus, lap kasar, lempeng KLT, oven, penggaris, pensil, pipa kapiler, pipet tetes, plastik wrap, Pyrex, sendok tanduk, spektrofotometri uv-vis, statif, timbangan analitik, tissue, wadah maserasi dan alat-alat glass yang umum digunakan di Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Makassar. Instrument yang digunakan pada penelitian ini adalah sinar UV 254 nm dan 366 nm (*ultraviolet*), penelitian ini memiliki beberapa tahap diantaranya sebagai berikut :

Ekstraksi

Proses ekstraksi alga merah (*Eucheuma cottonii*) dengan metode maserasi dimulai dengan menyiapkan 300 gram alga merah (*Eucheuma cottonii*) yang dimasukkan ke dalam maserator berisis 700 ml etanol 96%. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat menggunakan kertas saring. Kumpulkan semua maserat kemudian uapkan dengan cara diangin-anginkan hingga diperoleh

ekstrak kental. Hitung rendamen yang diperoleh, yaitu presentase bobot (b/b) antara rendamen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan (Triyanti, dkk., 2025).

$$\% \text{ rendamen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang diperoleh}}{\text{bobot awal simplisia}} \times 100\% \dots\dots\dots (i)$$

Farksinasi Cair-Cair

10 gram ekstrak etanol alga merah (*Euchaema cottonii*) dilarutkan menggunakan, 50 mL n-heksan lalu masukkan kedalam corong pisah dan tambahkan 15 ml aquadest. Kemudian kocok perlahan corong pisah dan sesekali dibuka penutup corong pisah untuk mengeluarkan gas agar tidak terbentuk emulsi. Setelah itu, diamkan hingga terbentuk 2 lapisan pelarut, ditampung larutan n-heksan dan lapisan air dimasukkan kembali kedalam corong pisah. Ditambahkan kembali pelarut n-heksan, hingga pelarut tidak berwarna. Lapisan n-heksan yang diperoleh dikumpulkan dan diuapkan lalu ditimbang dan ditambahkan etil asetat pada lapisan air lalu masukkan kembali kedalam corong pisah lalu kocok perlahan dan diamkan hingga terbentuk 2 lapisan. Dilakukan hingga lapisan etil asetat tidak berwarna. Lapisan etil asetat yang di hasilkan kemudian di timbang dan diuapkan (Triyanti et al., 2025).

Kromatografi Kolom

Persiapan sampel: membuat bubuk preadsorpsi atau melarutkan langsung dengan eluen sebanyak 1-gram fraksi kental. Perbandingan Sampel: Silika (1:40-60). Eluen yang digunakan: Heksan: Etil Asetat (3:1) sebanyak 300 ml

Persiapan alat: Kolom terlebih dahulu dicuci dengan air - etil asetat/aseton - metanol - n-heksan.

Penyiapan kolom (Cara Basah)

Kapas diletakkan di bagian dasar kolom. Silika disiapkan sejumlah 20 kali berat sampel lalu ditambahkan eluen yang akan digunakan, diamkan beberapa saat. Masukkan silika yang telah basah ke dalam kolom menggunakan corong sambil diketuk-ketuk secara perlahan untuk mencegah terbentuknya gelembung udara yang dapat memecah kolom dan keran terbuka, pelarut yang keluar ditampung. Setelah kolom sudah terbentuk dan tidak ada gelembung udara maka sampel yang akan diisolasi dapat diletakkan di atas adsorben/silika. Lalu dielusi dengan eluen yang telah disiapkan. Hasil kromatografi di tampung ke dalam vial, lalu elusi kromatografi bisa dihentikan jika warna cairan pelarut yang keluar sudah lebih bening atau dengan mentotolkan cairan pelarut yang keluar pada plat KLT (Kromatografi Lapis Tipis) lalu dilihat di bawah UV pada panjang gelombang 254 nm dan 365 nm dan dengan reagen semprot H₂SO₄ 10%. Apabila tidak terlihat adanya bercak dengan dua perlakuan tersebut maka proses kromatografi kolom bisa dihentikan. Hasil pemisahan kromatografi kolom yang telah

ditampung dalam vial dimonitor menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Sampel yang memiliki pola KLT yang sama dikelompokkan (Darmawansyah, 2023).

Kromatografi Lapis Tipis

Disiapkan plat klat berukuran 7x4 cm dibuat 7 lempeng berukuran 7x1 lempeng. Diaktifkan lempeng di oven pada suhu 110 selama 5-10 menit. Dilarutkan Sampel fraksinasi dengan menggunakan pelarut yang sama sebanyak 5 ml alasan mencegah perubahan polaritas yang dapat mempengaruhi pemisahan, dilakukan penjenjuran chamber fase gerak menggunakan pelarut n-heksan dan etil asetat perbandingan 7:3. Kemudian dilakukan penotolan sampel dengan pipa kapiler pada lempeng KLT yang telah disiapkan, dimasukan lempeng kedalam chamber yang telah dijenuhkan bila eluen mencapai batas dari lempeng maka lempeng dikeluarkan. Kemudian diamati kromatogram di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm dan diukur jumlah elusi serta dihitung nilai *Retention factor* (Rf). Setelah itu, dilakukan identifikasi senyawa kimia menggunakan pereaksi disemprot plat KLT dengan masing-masing pereaksi. Identifikasi golongan senyawa pada alkaloid menggunakan pereaksi yaitu dragendroft, pada senyawa steroid menggunakan pereaksi libermann-bunchard, pada flavonoid menggunakan pereaksi aluminium klorida 5%, pada senyawa fenol menggunakan pereaksi besi (III) klorida 5% dan pada senyawa kumarin menggunakan KOH etanolik (Yustian *et al.*, 2022).

$$\text{Nilai Rf} = \frac{\text{jarak yang ditempuh sampel}}{\text{arak yang ditempuh pelarut}} \dots\dots\dots (ii)$$

Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Penyiapan lempeng: Letakkan plat kaca ukuran 20 x 20 cm pada permukaan alat cetak lempeng KLTP. Bersihkan permukaan plat dengan tisu atau kapas yang telah dibasahi heksan atau methanol. Timbang silika gel sebanyak 15-gram untuk 3 lempeng preparatif berukuran 20 x 20 cm. Silika gel ditambahkan 20-25 ml akuades hingga terbentuk suspensi silika. Lempeng kaca diatur sejajar lalu silika gel dituang ke atas lempeng kaca dan diratakan. Lempeng didiamkan 1 x 24 jam lalu diaktifkan di oven dengan suhu 110°C selama 2 - 3 jam.

Isolasi senyawa dengan KLTP: Larutkan sampel dengan pelarut yang cocok hingga diperoleh kepekatan yang sesuai. Totolkan sampel pada pelat KLTP dengan menggunakan pipa kapiler atau pipet tetes secara kontinyu hingga membentuk pita. Keringkan dan masukkan kedalam chamber KLTP yang telah berisi eluen yang telah dijenuhkan. Biarkan hingga lempeng terelusi sempurna kemudian angkat dan keringkan. Tandai pita-pita pemisahan yang muncul pada lampu UV 254/366 atau H₂SO₄, kemudian kerok dengan menggunakan spatula. Larutkan dengan pelarut organik yang sesuai, selanjutnya pisahkan antara silika gel dan komponen kimianya dengan cara sentrifugasi atau penyaringan (Herwin *et al.*, 2021).

Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi

Siapkan lempeng KLT berukuran 10 x 10 cm. Beri tanda untuk titik penotolan sampel sekitar 1 cm dari bawah lempeng KLT. Beri tanda batas elusi pertama pada bagian atas plat sekitar 1 cm dari bagian atas lempeng KLT. Selanjutnya beri tanda batas elusi kedua pada bagian kanan plat sekitar 1 cm dari bagian kanan lempeng KLT. Sampel (isolat hasil KLTP yang telah diperoleh) ditotolkan pada lempeng KLT dengan ukuran 10 x 10 cm, kemudian dielusi dengan menggunakan dua cairan pengelusi. Sebagai cairan pengelusi yang pertama adalah lebih non polar (misalnya eluen n- heksan: etil asetat (7:3) dan cairan pengelusi yang kedua adalah lebih polar (misalnya eluen etil asetat metanol (5:1). Untuk proses elusi yang pertama dilakukan dengan cara menotolkan filtrat yang telah dilarutkan dengan pelarut yang cocok pada lempeng kemudian dielusi, selanjutnya proses elusi yang kedua dilakukan dengan cara memutar 900 lempeng berlawanan arah jarum jam sehingga hasil elusi yang pertama menjadi titik awal pengelusan untuk proses elusi yang kedua. Hasil elusi diamati menggunakan lampu UV 254 nm dan 366 nm. Amati apakah noda yang nampak merupakan senyawa tunggal (Hasnaeni *et al*, 2025).

Analisis Kadar Flavonoid Total Dengan Metode Spektrofotometri UV-VIS

Pembuatan larutan blanko dilakukan dengan memasukkan 1 mL larutan asam asetat dan 1 mL larutan $AlCl_3$ ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan etanol pro analysis (PA) hingga mencapai tanda batas dan dihomogenkan. Etanol PA digunakan sebagai pelarut karena memiliki tingkat kemurnian yang tinggi sehingga tidak mengganggu hasil pengukuran spektrofotometri (Indriani, dkk. 2024). Larutan blanko dibuat tanpa penambahan kuersetin untuk mengoreksi absorbansi yang berasal dari pelarut dan pereaksi, sehingga absorbansi yang terbaca hanya berasal dari kompleks flavonoid (Nasrina, dkk. 2024).

pembuatan larutan baku induk (1000 ppm) dilakukan dengan melarutkan 10 mg kuersetin ke dalam etanol PA di dalam labu ukur 10 mL hingga mencapai tanda batas dan dihomogenkan sampai larut sempurna. Penggunaan kuersetin sebagai larutan baku didasarkan pada kemampuannya membentuk kompleks yang stabil dengan $AlCl_3$, sehingga banyak digunakan sebagai standar dalam penetapan kadar flavonoid total (Astuti, dkk. 2023).

Pembuatan larutan seri standar dilakukan dengan memipet larutan baku induk ke dalam labu ukur 5 mL sesuai konsentrasi yang diinginkan, yaitu 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm. Selanjutnya ditambahkan masing-masing 1 mL larutan $AlCl_3$ dan 1 mL larutan asam asetat, kemudian dicukupkan volumenya dengan etanol PA hingga tanda batas dan dihomogenkan. Penambahan $AlCl_3$ bertujuan membentuk kompleks dengan gugus flavonoid sehingga menghasilkan warna kuning yang dapat diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Sementara itu, asam asetat

berfungsi menjaga kondisi reaksi tetap stabil sehingga pembentukan kompleks berlangsung optimal (Astuti, dkk. 2024).

Penyiapan larutan sampel dilakukan dengan menimbang 0,5 g sampel, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL. Selanjutnya ditambahkan 1 mL larutan $AlCl_3$ dan 1 mL larutan asam asetat, kemudian dicukupkan dengan etanol PA hingga mencapai tanda batas dan dihomogenkan. Larutan diinkubasi selama 30 menit sebelum dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Waktu inkubasi diperlukan agar pembentukan kompleks flavonoid- $AlCl_3$ berlangsung secara sempurna sehingga menghasilkan absorbansi yang stabil dan akurat (Abdullah & Maryam, 2020).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi

Nilai rendemen ekstrak Alga Merah (*Euchaema cottonii*) dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Persen Rendamen Ekstrak Alga Merah (*Euchaema Cottonii*).

Nama sampel	Pelarut awal (mL)	Bobot sampel (g)	Ekstrak kental (g)	% Rendamen
Alga Merah (<i>Euchaema cottonii</i>)	3000 L	300	62,165	20,72%

Berdasarkan hasil ekstraksi sampel alga merah (*Eucheuma cottonii*) diperoleh hasil persen rendemen sebesar berapa 20,72% dengan berat awal 300-gram dan berat ekstrak kental yang diperoleh 62,165-gram menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 3000 mL dengan metode ekstraksi yaitu maserasi. Berdasarkan literatur menurut (Farmakope Herbal Indonesia, 2017), yaitu syarat rendamen ekstrak yang baik tidak kurang dari 10%, sehingga secara umum masih memenuhi kriteria rendemen ekstrak yang baik. Perbedaan komposisi senyawa yang terfraksinasi dapat dipengaruhi oleh jenis pelarut, metode ekstraksi awal, serta kondisi proses partisi yang digunakan.

Fraksinasi Cair-Cair

Hasil pengujian fraksinasi pada ekstrak alga merah (*Eucheuma cottonii*) dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Pengamatan Fraksinasi Ekstraksi Cair Cair.

Nama Sampel	Pelarut yang digunakan			
	Etil Asetat		N-Heksan (g)	
Alga Merah (<i>Euchaema cottonii</i>)	Bobot ekstrak (g)	% rendamen	Bobot ekstrak (g)	% rendamen
	9,89	197,86	1,73	34,7

Hasil fraksinasi menggunakan ekstrak alga merah (*Eucheuma cottonii*) diperoleh hasil persen rendemen yaitu pada pelarut etil asetat 197,86% dan pada fraksi n-heksan diperoleh sebesar 34,7% dengan metode ekstraksi cair-cair. Berdasarkan literatur nilai rendemen total yang diperoleh masih berada di bawah batas maksimum yang disyaratkan oleh (Farmakope Herbal Indonesia, 2017), yaitu tidak lebih kurang 10%, sehingga secara umum masih memenuhi kriteria rendemen ekstrak yang baik. Perbedaan komposisi senyawa yang terfraksinasi dapat dipengaruhi oleh jenis pelarut, metode ekstraksi awal, serta kondisi proses partisi yang digunakan.

Fraksinasi Cair-Cair

Hasil pengujian fraksinasi pada ekstrak alga merah (*Eucheuma cottonii*) dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Pengamatan Fraksinasi Ekstraksi Cair Cair.

Nama Sampel	Pelarut yang digunakan			
	Etil Asetat		N-Heksan (g)	
	Bobot ekstrak (g)	% rendamen	Bobot ekstrak (g)	% rendamen
Alga Merah (<i>Euchaema cottonii</i>)	9,89	197,86	1,73	34,7

Hasil fraksinasi menggunakan ekstrak alga merah (*Eucheuma cottonii*) diperoleh hasil persen rendemen yaitu pada pelarut etil asetat 197,86% dan pada fraksi n-heksan diperoleh sebesar 34,7% dengan metode ekstraksi cair-cair. Berdasarkan literatur nilai rendemen total yang diperoleh masih berada di bawah batas maksimum yang disyaratkan oleh (Farmakope Herbal Indonesia, 2017), yaitu tidak lebih kurang 10%, sehingga secara umum masih memenuhi kriteria rendemen ekstrak yang baik. Perbedaan komposisi senyawa yang terfraksinasi dapat dipengaruhi oleh jenis pelarut, metode ekstraksi awal, serta kondisi proses partisi yang digunakan.

Kromatografi Kolom

Hasil pengujian kromatografi kolom pada ekstrak alga merah (*Eucheuma cottonii*) dapat dilihat tabel 4.

Tabel 4. Pengelompokkan Fraksi Secara Visual.

Kelompok Fraksi	Fraksi	Warna
1	F1	Bening
2	F2-F6	Orange
3	F7-F12	Peach muda
4	F3-F16	Peach muda (samar)
5	F17-F22	Bening

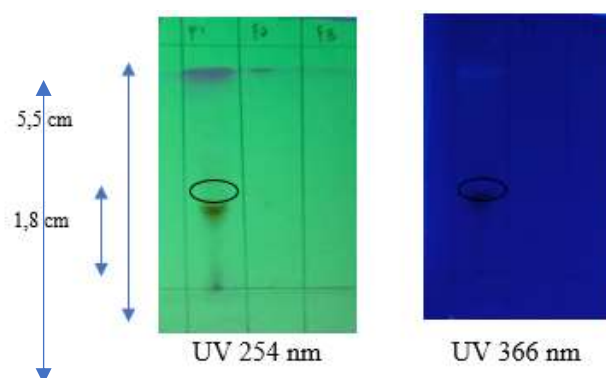
Pemisahan ekstrak alga merah *Eucheuma cottonii* menggunakan kromatografi kolom dengan tujuh variasi perbandingan pelarut etanol: etil asetat (40:0, 32:8, 24:16, 20:20, 16:24,

8:32, 0:40) menunjukkan bahwa perubahan kepolaran fase gerak memengaruhi pola elusi senyawa. Metode gradien pelarut memungkinkan senyawa terpisah berdasarkan perbedaan afinitas terhadap fase diam silika gel dan fase gerak, di mana senyawa kurang polar terelusi lebih dahulu, sedangkan senyawa yang lebih polar keluar pada penggunaan pelarut yang lebih polar.

Hasil fraksinasi menghasilkan 22 fraksi yang dikelompokkan berdasarkan warna, yaitu F1 berwarna bening, F2–F6 berwarna oranye, F7–F12 berwarna peach muda, F13–F16 berwarna peach muda samar, dan F17–F22 kembali berwarna bening. Perbedaan warna tersebut menunjukkan adanya perbedaan komposisi senyawa yang terelusi pada setiap tahap elusi. Fraksi berwarna oranye diduga mengandung pigmen, terutama golongan karotenoid yang bersifat relatif nonpolar sehingga lebih mudah terelusi pada pelarut berkepolaran rendah hingga sedang. Selanjutnya, penurunan intensitas warna pada fraksi F7–F16 mengindikasikan berkurangnya kandungan pigmen serta mulai terelusnya senyawa yang lebih polar. Fraksi F17–F22 yang kembali berwarna bening menunjukkan bahwa sebagian besar senyawa berwarna telah terelusi, sehingga fraksi akhir didominasi oleh senyawa yang tidak berwarna atau pelarut. Secara keseluruhan, penggunaan tujuh variasi perbandingan pelarut mampu memisahkan komponen ekstrak *Eucheuma cottonii* berdasarkan tingkat kepolarannya. Hasil ini menunjukkan bahwa metode kromatografi kolom efektif sebagai tahap awal fraksinasi sebelum dilakukan identifikasi senyawa lebih lanjut menggunakan metode analisis lainnya.

Kromatografi Lapis Tipis

Hasil pengujian KLT pada ekstrak alga merah (*Eucheuma cottonii*) dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Pengamatan KLT pada UV 254 nm dan 366 nm.

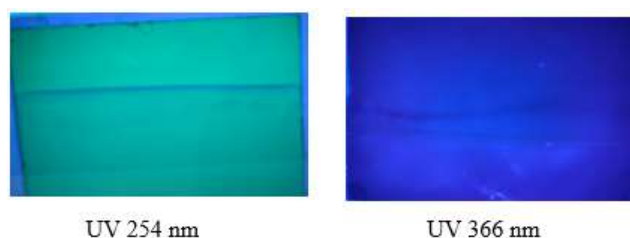
Tabel 5. Kromatografi Lapis Tipis.

Nama Sampel	Fraksi	Noda	Nilai Rf (nm)	
			UV 254	UV 366
Alga Merah (<i>Eucheuma cottonii</i>)	Etanol 100% (1:0)	-	0,32	0,32
	Etanol:etil asetat (32:8)	-	-	-
	Etanol:etil asetat (6:4)	-	-	-

Pada hasil identifikasi kromatografi lapis tipis (KLT) ekstrak alga merah (*Eucheuma cottonii*) dengan fase gerak n-heksan : etil asetat (7:3) diperoleh nilai Rf 0,32 cm ditandai dengan terbentuknya noda pada lempeng KLT. Berdasarkan literatur menurut (Sharo *et al.*, 2021) menyatakan bahwa nilai Rf yang baik berada dalam rentang 0,2-0,8 cm sehingga menunjukkan bahwa proses pemisahan berlangsung cukup optimal.

Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Fraksi aktif yang didapatkan dari metode KLT kemudian dilanjutkan



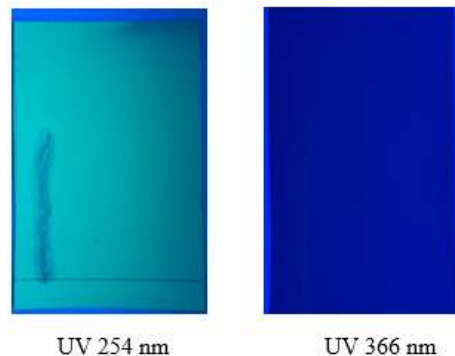
Gambar 2. Pengamatan KLTP UV 254 nm dan 366 nm

Berdasarkan hasil pengamatan lempeng KLT fraksi alga merah (*Eucheuma cottonii*) di bawah sinar UV, terlihat satu pita bergelombang secara horizontal sepanjang plat yang berwarna oranye muda yang terpisah pada jalur sampel. Munculnya satu pita noda menunjukkan bahwa terdapat senyawa atau kelompok senyawa yang berhasil dipisahkan oleh sistem eluen yang digunakan. Namun, tidak terbentuknya beberapa pita noda mengindikasikan bahwa pemisahan senyawa dalam sampel belum berlangsung secara optimal.

Hal ini kemungkinan disebabkan adanya senyawa-senyawa dalam fraksi yang memiliki polaritas relatif mirip sehingga bermigrasi pada posisi yang hampir sama dan tampak sebagai satu pita. Menurut prinsip KLT, pemisahan senyawa terjadi berdasarkan perbedaan afinitas senyawa terhadap fase diam (silika gel) dan fase gerak (eluen). Senyawa dengan karakteristik interaksi yang serupa akan sulit dipisahkan dan cenderung menghasilkan pita tunggal atau pita yang saling tumpang tindih (Najib, 2025).

Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi (KLT 2D)

Hasil pengujian KLT 2D pada ekstrak alga merah (*Eucheuma cottonii*) dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Pengamatan KLT 2D

Berdasarkan hasil KLT dua dimensi pada isolat hasil KLTP alga merah *Eucheuma cottonii*, terlihat noda berbentuk pita memanjang (tailing) pada pengamatan UV 254 nm dan UV 366 nm. Pada UV 254 nm noda tampak gelap, sedangkan pada UV 366 nm terlihat fluoresensi redup. Hasil ini menunjukkan bahwa senyawa dalam isolat belum terpisah secara optimal karena beberapa komponen kemungkinan memiliki polaritas yang hampir sama sehingga bermigrasi pada posisi yang berdekatan.

Pada metode KLT dua dimensi, pemisahan senyawa seharusnya menghasilkan beberapa spot yang terpisah jelas pada dua arah pengembangan. Namun pada penelitian ini noda masih menyatu dan memanjang, menandakan interaksi antara fase diam silika gel dan fase gerak belum menghasilkan pemisahan yang baik. Kondisi ini dapat dipengaruhi oleh komposisi eluen yang kurang sesuai, penjujukan chamber yang belum optimal, atau jumlah sampel yang terlalu banyak saat penotolan.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Kurnia dkk. (2022) pada alga merah *Eucheuma cottonii* yang melaporkan bahwa pemisahan noda pada KLT sangat dipengaruhi oleh pemilihan sistem eluen dan polaritas senyawa dalam sampel. Penggunaan eluen yang kurang sesuai menyebabkan noda bertumpuk dan pemisahan kurang jelas. Penelitian lain oleh Agusman dkk. (2022) juga menunjukkan bahwa fraksi alga merah dapat menghasilkan pola noda yang memanjang apabila senyawa dalam fraksi memiliki karakteristik polaritas yang mirip. Oleh karena itu, diperlukan optimasi eluen dan kondisi pengembangan agar pemisahan senyawa pada KLT dua dimensi menjadi lebih baik dan spesifik.

Analisis Kadar Flavonoid Total Dengan Metode Spektrofotometri UV-VIS

Hasil pengujian kadar flavonoid dengan metode spektrofotometri UV-Vis pada ekstrak alga merah (*Eucheuma cottonii*) dapat dilihat pada gambar.

Tabel 6. Metode Spektrofotometri UV-VIS.

Konsentrasi Kuersetin (ppm)	Volume Larutan Induk Dipipet (μL)	Absorbansi
2	10	0,160
4	20	0,305
6	30	0,437
8	40	0,577
10	50	0,687

Berdasarkan hasil praktikum analisis kandungan flavonoid total menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada sampel alga merah (*Eucheuma cottonii*), diperoleh panjang gelombang maksimum sebesar 421,0 nm. Kurva baku yang dihasilkan memiliki nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,998571, yang menunjukkan hubungan linear yang sangat baik antara konsentrasi larutan standar dengan nilai absorbansi. Nilai tersebut mendekati 1, sehingga persamaan regresi yang diperoleh layak digunakan untuk menghitung konsentrasi flavonoid dalam sampel. Hal ini sesuai dengan pendapat Haresmita dan Pradana (2022) yang menyatakan bahwa persamaan regresi dapat dikatakan baik apabila memiliki faktor korelasi pada rentang 0,99–1, sehingga hasil pengukuran memiliki tingkat ketelitian dan keakuratan yang baik.

Tabel 7. Metode Spektrofotometri UV-VIS.

Replikasi	Absorbansi Sampel	Konsentrasi (ppm) Berdasarkan Kurva Baku	Kadar Flavonoid Total (mg QE/g)	% Kadar Flavonoid
1	0,222	100.000 ppm	745,5 mg QE/g	74,65%

Berdasarkan persamaan regresi tersebut, diperoleh kadar flavonoid total pada sampel *Eucheuma cottonii* sebesar 746,5 mg QE/g atau setara dengan 74,65%. Apabila dibandingkan dengan penelitian Saleh dkk. (2026) yang melaporkan kandungan flavonoid *Eucheuma cottonii* sebesar 35,1771 mg QE/g, maka hasil praktikum menunjukkan nilai yang jauh lebih tinggi dan tidak sesuai dengan hasil yang dilaporkan dalam literatur.

Perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh berbagai faktor, antara lain perbedaan asal dan kondisi pertumbuhan alga, umur panen, metode ekstraksi, jenis serta konsentrasi pelarut yang digunakan, kondisi preparasi sampel, maupun perbedaan prosedur analisis. Selain itu, kemungkinan adanya senyawa lain yang ikut bereaksi dengan pereaksi pembentuk kompleks juga dapat menyebabkan nilai flavonoid total yang terukur menjadi lebih tinggi. Faktor teknis selama praktikum, seperti proses pengenceran, penimbangan, pemipetan, atau pembacaan absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis, juga dapat memengaruhi hasil akhir yang diperoleh.

4. KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil mengisolasi fraksi ekstrak alga merah *Eucheuma cottonii* melalui tahapan ekstraksi, fraksinasi cair-cair, kromatografi kolom, KLT, KLTP, dan KLT dua dimensi. Kromatografi kolom dengan tujuh variasi perbandingan pelarut mampu memisahkan ekstrak menjadi 22 fraksi yang menunjukkan perbedaan karakteristik warna sebagai indikasi keberhasilan proses pemisahan berdasarkan tingkat kepolaran. Hasil KLT menunjukkan nilai R_f yang baik, sedangkan hasil KLTP dan KLT dua dimensi menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh belum sepenuhnya murni sehingga diperlukan optimasi sistem eluen dan kondisi pemisahan. Persen kadar flavonoid yang didapatkan dari sampel alga merah dengan menggunakan metode spektrofotometri uv-vis sebesar 74,65%. Secara keseluruhan, metode kromatografi yang digunakan efektif sebagai tahap awal isolasi senyawa bioaktif dari *Eucheuma cottonii* dan berpotensi dikembangkan untuk penelitian lanjutan mengenai identifikasi struktur serta aktivitas biologinya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Makassar yang telah menyediakan fasilitas laboratorium sehingga penelitian ini dapat terlaksana. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada seluruh dosen pembimbing, laboran, serta semua pihak yang telah memberikan arahan, bantuan teknis, dan dukungan selama proses penelitian hingga penyusunan artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abriyani, E., Fikayuniar, L., Fauziah, S., & Melinda, L. (2022). *SKRINING FITOKIMIA DAN PROFIL KLT DARI FRAKSI N-HEKSANA DAN ETIL ASETAT PADA KULIT Pithecellobium jiringa (Jack) Prain*. 2(3), 8–13.
- Cotas, J., Leandro, A., Monteiro, P., Pacheco, D., Figueirinha, A., Gonçalves, A. M. M., Silva, G. J., & Pereira, L. (2020). Seaweed phenolics: From extraction to applications. *Marine Drugs*, 18(8), 384. <https://doi.org/10.3390/md18080384>
- Darmawansyah, A., Nurlansi1, Haeruddin, J. (2023). Pemisahan Senyawa Terpenoid Ekstrak n-Heksan Daun Kaembu-Embu (*Blumea balsamifera*) Menggunakan Kromatografi Kolom Gravitasi. *JURNAL KIMIA DAN PENDIDIKAN KIMIA : S a i n s*. 12, 24–30.
- Daun, E., Sauropus, K., & Merr, L. (n.d.). *PENGARUH JUMLAH PELARUT TERHADAP RENDEMEN EKSTRAK DAUN KATUK (Sauropus androgynus L. Merr)*. 125–135.
- Hasnaeni, Melvi, A., Ananda, R., & Amriati, R. (2025). *Pemisahan Senyawa Flavonoid pada Tanaman Keji Beling (Strobilantes crispa)*. *Jurnal Pharmascience* 12(1), 1–8.

- Herwin, Muzakkir Baits, Ririn, Ayyub Harly Nurung., I. (2021). ANALISIS KOMPONEN KIMIA AKTIF ISOLAT DAUN *Colocasia esculenta* L. IDTK01 SECARA SPEKTROFOTOMETER INFRA MERAH. *As-Syifaa Jurnal Farmasi*. 13(1), 7–11.
- Husna, S., & Utami, H. H. (2023). *Komponen fitokimia dan aktivitas antioksidan rumput laut eucheuma cottonii di perairan desa pajukukang bantaeng*. 5(2), 9–15.
- Ii, E. (2017). *HERBAL INDONESIA HERBAL*.
- Inayah, I., Saepudin, S., Ramdhani, H. M., & Ghifari, U. Al. (2024). IDENTIFIKASI STRUKTUR SENYAWA FLAVONOID DARI DAUN KESUM (*Polygonum minus Huds*.) MENGGUNAKAN. *JIFI (JURNAL ILMIAH FARMASI IMELDA)*.8(1), 57–68.
- Kumar, Y., & Sood, S. (2021). Phytochemical analysis and chromatographic separation of bioactive compounds from marine algae: A review. *Journal of Applied Phycology*, 33, 2851–2865. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02467-9>
- Nurjanah, Jacob, A. M., & Hidayat, T. (2018). Bioactive compounds and antioxidant activity of red seaweed (*Eucheuma cottonii*) as marine natural resources. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 21(2), 272–279. <https://doi.org/10.17844/jphpi.v21i2.23010>
- Sharo, N. M., Ningsih, R., Nasichuddin, A., & Hanapi, A. (2013). Uji Toksisitas dan Identifikasi Senyawa Ekstrak Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* LEACH. 2(3).
- Timur, B. (2022). *Sains Medisina*. 1(2), 77–82.
- Triyanti, S. B., Lestari, F. P., Anisa, P., Fitriana, N., & Rostiana, H. R. (2025). Pengaruh Metode Ekstraksi Maserasi, Sonikasi, dan Sokletasi Terhadap Nilai Rendemen Sampel Kulit Buah Naga (*Hylocereus polyrhizus*). *Jurnal Sains dan Edukasi Sains* 8(1), 71–78.
- Zingiberis, G., Extraction, O., Layer, T., & Tlc, C. (2023). Ekstraksi Jahe (*Zingiberis officinale*) dan Uji Pemisahan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). 1(2), 69–76.