

Optimizing Thin Layer Chromatography (TLC) Eluent Composition for Compound Content Separation the Ethanolic Extract of Sponge and Ascidia

(Optimasi Komposisi Eluen Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Untuk Pemisahan Kandungan Senyawa Ekstrak Etanol Spons dan Ascidia)

Rosita A. J. Lintang^{1*}, Fitje Losung¹, Febry I. S. Menajang², Deiske A. Sumilat¹

¹Marine Science Study Program, Faculty of Fisheries and Marine Sciences, Sam Ratulangi University, Manado 95115 North Sulawesi, Indonesia

²Aquatic Resources Management Study Program, Faculty of Fisheries and Marine Sciences, Sam Ratulangi University, Manado 95115 North Sulawesi, Indonesia

*Corresponding author: rositalintang@unsrat.ac.id

Manuscript received: 27 April 2024. Revision accepted: 15 July 2024

Abstract

An optimization study of the KLT eluent composition was carried out on the ethanolic extracts of 3 ascidian samples (Ascd-2, Ascd-3, Ascd-4) and 2 sponge samples (Spons-2 and Spons-3). The Ascidia and Sponge marine invertebrate samples were collected from Malalayang, Manado City's coastal waters, and were not identified. This research is a preliminary test to determine the best eluent composition to separate the compounds in the ascidian and sponge sample extracts. Extracted samples with ethanol solvent using the maceration method for 3 x 24 hours at room temperature followed by evaporation at 40°C to obtain a thick ethanol extract. The composition of the eluent used is as follows: Hexane: Ethyl Acetate = 3: 7, Hexane: Ethyl Acetate = 2: 3, Hexane: Ethyl Acetate = 1: 9, Methanol: Ethyl Acetate = 1:1, and 100% Methanol. KLT analysis of the extracts from the ascidia and sponge samples showed that most of the variations in eluent composition used could not separate the compound components in the extracts, except the 100% methanol composition which could separate the compounds in the sponges 3 samples.

Keywords : Eluent ; Marine Invertebrate; Optimization ; Thin Layer Chromatography (TLC)

Abstrak

Telah dilakukan studi optimasi komposisi eluen KLT terhadap ekstrak etanol dari 3 sampel Ascidia (Ascd-2, Ascd-3, Ascd-4) dan 2 sampel Spons (Spons-2 dan Spons-3). Sampel avertebrata laut Ascidia dan Spons berasal dari perairan pantai Malalayang, Kota Manado dan belum diidentifikasi jenisnya. Penelitian ini merupakan suatu uji pendahuluan yang bertujuan menentukan komposisi eluen terbaik untuk memisahkan senyawa yang terkandung dalam ekstrak sampel ascidian dan spons. Ekstraksi sampel dengan pelarut etanol menggunakan metode maserasi selama 3 x 24 jam pada suhu ruang dan kemudian dievaporasi pada suhu 40°C untuk mendapatkan ekstrak etanol kental. Adapun komposisi eluen yang digunakan adalah sebagai berikut: Heksana : Etil Asetat = 3 : 7, Heksana : Etil Asetat = 2 : 3, Heksana : Etil Asetat = 1 : 9, Metanol : Etil Asetat = 1 : 1, dan Metanol 100%. Analisis KLT terhadap ekstrak sampel ascidia dan spons memperlihatkan bahwa sebagian besar variasi komposisi eluen yang digunakan ternyata tidak dapat memisahkan komponen senyawa dalam ekstrak, kecuali komposisi 100% methanol yang dapat memisahkan senyawa pada sampel Spons-3.

Kata Kunci : Avertebrata Laut; Eluen; KLT: Optimasi

PENDAHULUAN

Ascidia dan spons merupakan avertebrata laut yang diketahui sangat prospektif dalam menghasilkan berbagai metabolit alami seperti terpenoid, alkaloid, steroid, tannin, peptide dan lain-lain. Senyawa-senyawa ini memiliki berbagai

aktivitas biologis yang bermanfaat bagi kehidupan manusia, seperti antibakteri, antivirus, antioksidan, antiinflamasi, dan lain sebagainya (Blunt et al., 2017 ; Carroll et al., 2019). Berbagai jenis Ascidia dan Spons tersebar pada perairan Sulawesi Utara (Palit et al., 2022 ; Malintoi et al., 2020) banyak di antaranya memiliki

aktivitas antibakteri (Sumilat *et al.*, 2022 ; Losung *et al.*, 2022 ; Pasodung *et al.*, 2018 ; Opa *et al.*, 2018 ; Maradou *et al.*, 2019).

Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan salah satu metode analisis sederhana yang dapat digunakan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa yang terkandung dalam ekstrak (Kowalska & Sajewicz, 2022). Perbandingan komposisi eluen sangat menentukan terjadinya pemisahan senyawa dengan baik dimana komposisi dan jenis eluen memiliki pengaruh signifikan dalam pemisahan dan analisis KLT. Eluen adalah cairan yang digunakan untuk menggerakkan fasa diam pada plat KLT, membawa senyawa-senyawa dalam sampel sehingga terjadi pemisahan senyawa-senyawa tersebut. Optimasi eluen (solven) dalam analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan langkah penting untuk memastikan pemisahan yang optimal dari senyawa-senyawa dalam sampel (Rachmawati, 2015 ; Saputri, 2016). Perbandingan eluen, yang juga dikenal sebagai rasio campuran pelarut atau fase gerak, merujuk pada proporsi relatif dari berbagai komponen eluen yang digunakan dalam Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pengaruh perbandingan eluen ini sangat signifikan dalam proses pemisahan dan analisis. Komposisi eluen merupakan salah satu factor yang mempengaruhi keberhasilan proses pemisahan dalam

metode KLT, sehingga perlu dilakukan optimasi komposisi eluen (Obradović *et al.* 2017).

Penelitian ini merupakan suatu kajian awal yang bertujuan menentukan komposisi eluen terbaik untuk memisahkan senyawa yang terkandung dalam ekstrak sampel spons dan ascidian menggunakan teknik pemisahan KLT.

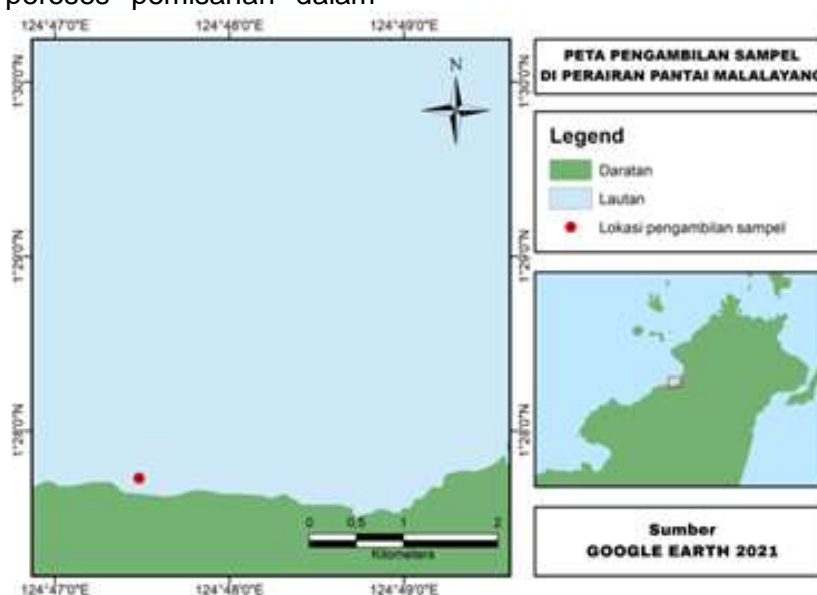
METODE PENELITIAN

Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian yang meliputi pengambilan sampel, ekstraksi dan analisis data dilaksanakan selama bulan Maret-Mei 2023. Sampel Ascidian dan Spons berasal dari pantai Malalayang Kota Manado (Gambar 1). Kegiatan ekstraksi dan analisis data dilakukan pada Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasetika Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah beberapa jenis sampel Ascidia dan Spons. Selain itu digunakan beberapa bahan kimia seperti Pelarut Etanol, Metanol, Heksana, Etil Asetat dan Air. Alat yang digunakan adalah seperangkat peralatan gelas seperti gelas ukur, gelas piala, toples kaca, *rotary evaporator*, erlenmeyer, labu ukur, batang pengaduk, silica gel 60 F254 (merck), pipa kapiler, lampu UV.



Gambar 1 Lokasi pengambilan sampel

Preparasi dan Ekstraksi Sampel

Pengambilan sampel dilakukan pada kedalaman 5 m - 10 m menggunakan seperangkat alat selam. Sampel yang diambil selanjutnya dipotong kecil-kecil berbentuk kubus/dadu, direndam dalam larutan etanol 95% dan dibawa ke Laboratorium Biologi Molekuler dan Farmasetika Laut, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Sam Ratulangi.

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi selama 3 x 24 jam menggunakan pelarut etanol selanjutnya dilakukan proses evaporasi sehingga didapatkan ekstrak kental (Gambar 2).

Proses Kromatografi Lapis Tipis

Persiapan plat KLT

Pemisahan senyawa ekstrak kasar dilakukan menggunakan plat silica sebagai fase diam dengan ukuran 1cm x 10cm. Selanjutnya diberi pananda garis pada tepi bawah plat pada jarak 1 cm sebagai posisi awal totolan dan 0,5 cm dari tepi atas plat untuk menunjukkan batas akhir proses elusi. Setelah itu plat silica diaktivasi pada suhu 100°C selama 15 menit untuk

menghilangkan kadar air yang terdapat pada plat KLT.

Persiapan Fase gerak (eluen)

Sebelum dilakukan pengelusan, eluen dalam bejana dijenuhkan terlebih dahulu untuk menyamakan tekanan uap pada seluruh bagian bejana. Setiap campuran eluen dimasukkan dalam Chamber dan ditutup rapat selama 60 menit. Adapun komposisi eluen pengembang yang digunakan adalah sebagai berikut: Heksana : Etil Asetat = 3 : 7, Heksana : Etil Asetat = 2 : 3, Heksana : Etil Asetat = 1 : 9, Metanol : Etil Asetat = 1 : 1, dan Metanol 100%.

Sebelum dilakukan penotolan, ke dalam semua ekstrak masing-masing dicampurkan dengan larutan methanol dan ditotolan sebanyak 10 totolan menggunakan pipet kapiler pada tempat yang telah ditandai, kemudian dikering-anginkan. Pendeteksian bercak hasil kromatografi dilakukan dengan menggunakan sinar ultraviolet pada panjang gelombang λ 254 nm dan λ 366 nm.



Gambar 2 . Ekstrak Sampel (Asc-2, Asc-3, Asc-4, Spn-2, Spn-3)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dingin dengan pelarut etanol 70%. Metode ini dipilih karena metode cara dingin dapat mencegah terurainya metabolit sekunder yang tidak tahan pemanasan. Pelarut etanol

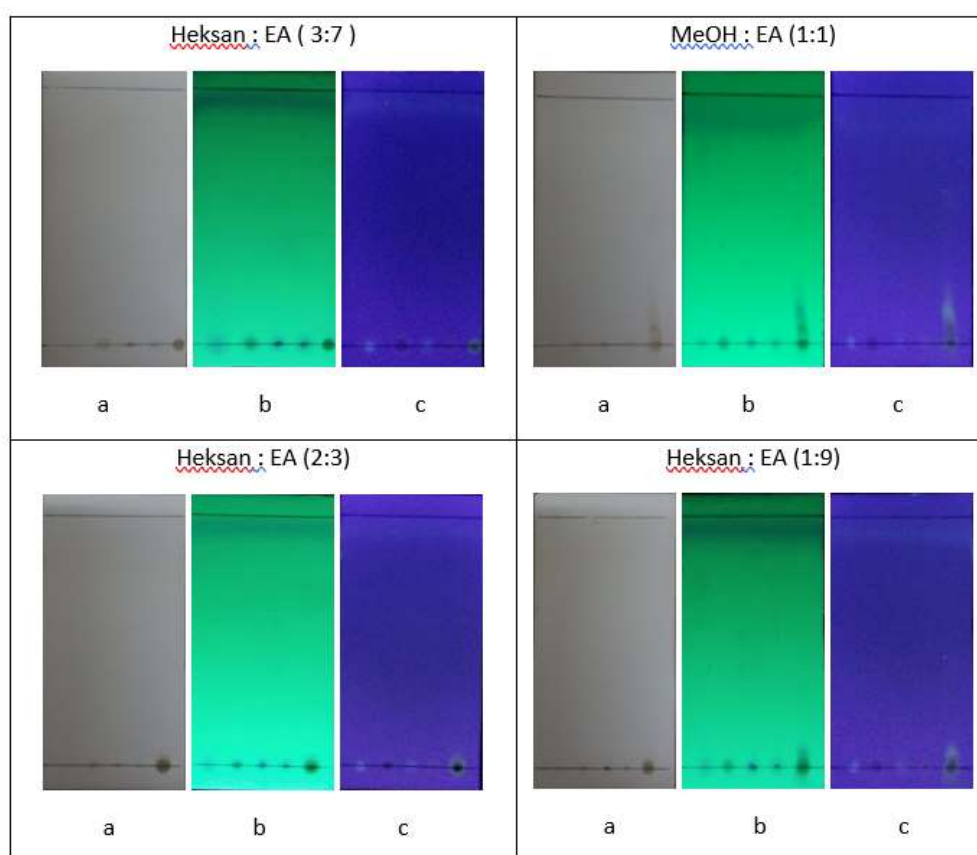
digunakan karena memiliki kepolaran yang baik untuk mengekstrak berbagai komponen yang bersifat polar seperti flavonoid, saponin, steroid, tanin dan alkaloid. Maserat diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator tujuannya untuk menguapkan pelarut yang digunakan selama proses ekstraksi sehingga didapatkan ekstrak kental dari ke-5 ekstrak

Ascidia dan Spons. Prinsip dari alat rotary evaporator adalah vakum destilasi dengan menguapkan pelarut di bawah titik didih sehingga zat yang terkandung di dalam pelarut tidak rusak oleh suhu yang tinggi. Metode ekstraksi cara dingin juga telah digunakan oleh para peneliti sebelumnya (Opa et al., 2018 ; Pasodung et al, 2018 ; Maradou et al., 2019 ; Losung et al., 2022 ; Sumilat et al., 2022).

Pengujian dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dapat memberikan informasi tentang

komponen-komponen kimia terkandung yang dapat memberikan gambaran awal tentang komposisi senyawa yang terkandung dalam sampel tersebut (Rachmawati, 2015). Gambar 3 memperlihatkan bahwa ekstrak spons dan ascidia tidak dapat terpisah pada komposisi pelarut Heksan : Etil asetat. Namun pada pelarut Etil asetat yang dikombinasikan dengan Metanol terlihat ada sedikit pergerakan dari ekstrak yang diuji. Heksana merupakan pelarut yang memiliki sifat non polar, Etil asetat dan Metanol merupakan pelarut bersifat polar (Harborne, 1996).

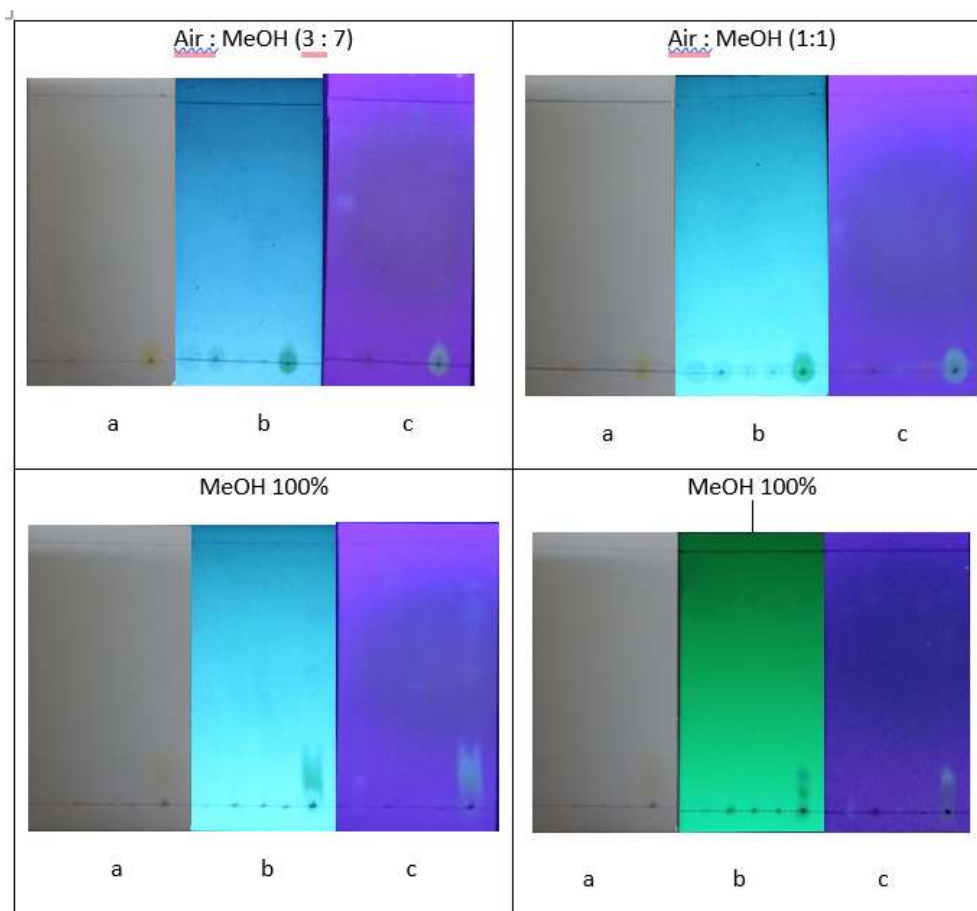


Gambar 3. Perbandingan konsentrasi pelarut Heksan : Etil Asetat : Metanol
Keterangan (Spot : Kiri -> Kanan) : Ascd 2- Ascd 3-Ascd 4-Spn 2-Spn 3
a. tanpa uv b. uv λ 254 nm c. uv λ 366 nm

Berdasarkan hasil yang diperoleh maka perlakuan difokuskan pada pelarut polar yakni Metanol yang dikombinasikan dengan Air. Hasil pengamatan terhadap 5 ekstrak yang diujikan, walaupun belum sempurna terlihat 1 ekstrak yakni Spons-3 yang dapat terpisah dengan komposisi

yang diterapkan dan pemisahan hanya terjadi oleh pelarut 100 % methanol. Perbandingan eluen, yang juga dikenal sebagai rasio campuran pelarut atau fase gerak, merujuk pada proporsi relatif dari berbagai komponen eluen yang digunakan dalam Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Pengaruh perbandingan eluen ini sangat signifikan dalam proses pemisahan dan analisis.



Gambar 4. Perbandingan Konsentrasi Pelarut Air : Metanol
Keterangan (Spot : Kiri -> Kanan) : Ascd 2- Ascd 3-Ascd 4-Spn 2-Spn 3
a. tanpa uv b. uv λ 254 nm c. uv λ 366 nm

Pengamatan bercak menggunakan sinar ultraviolet digunakan untuk senyawa yang tidak berwarna karena beberapa senyawa organik dapat bersinar (berfluoresensi) jika disinari dengan sinar ultraviolet pada panjang gelombang pendek (254 nm) atau gelombang panjang (366 nm). Hasil yang diperoleh apabila tidak dapat terdeteksi maka harus disemprot menggunakan pereaksi tertentu sehingga bercak tersebut tampak yaitu pertama tanpa pemanasan, kemudian dapat juga dengan pemanasan. Hasil kromatografi dipengaruhi oleh fase diam, fase gerak (eluen), dan teknik kerja. Teknik kerja meliputi atmosfer bejana, jenis pengembang, cara dan jumlah penotolan,

pembuatan cuplikan, dan deteksi senyawa yang dipisahkan (Harborne, 1996).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Komposisi eluen 100% methanol dapat memisahkan senyawa yang terkandung dalam ekstrak Spons-3, sehingga hampir dapat dipastikan bahwa senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak tersebut bersifat polar.

Saran

Perlu dilakukan analisis lanjut untuk mendapatkan perbandingan konsentrasi yang lebih tepat dalam memisahkan ekstrak dengan metode KLT dan pengujian

zookimia untuk mengetahui jenis senyawa yang terkandung dalam ekstrak.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Rektor Universitas Sam Ratulangi dan Pimpinan Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) yang telah membantu penelitian ini dengan dana PNPB Unsrat tahun 2023 skim RDUU K-2.

DAFTAR PUSTAKA

- Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G. & Prinsep, M.R. (2017). Marine Natural Products, Nat.Pro Rep, Issue 3. **(34)** : 235-294.
- Carroll, A.R., Copp, B.R., Davis, R.A., Keyzers, R.A. & Prinsep, M.R. (2019). Marine Natural Products. **Nat. Prod. Rep.** **(36)** : 122-173
- Harborne, J.B. (1996). Metode Fitokimia: Penentuan Cara Modern Menganalisa Tumbuhan.(Edisi Kedua). Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung: ITB.
- Kowalska, T. & Sajewicz, M. (2022) Thin-Layer Chromatography (TLC) in the Screening of Botanicals—Its Versatile Potential and Selected Applications. *Molecules* **27**, 6607. <https://doi.org/10.3390/molecules27196607>
- Luissandy, Sumilat D.A. & Lintang, R.A.J. (2017). [Bioaktivitas Antibakteri Fraksi ODS Spons *Agelas* sp. dari Perairan Pangalisang Pulau Bunaken.](#) *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*. **2**(1): 22-30.
- Losung, G., Losung F., Lintang, R.A.J., Wullur, S. & Manoppo, H. (2022). Aktivitas Antibakteri Dari Spons Asal Perairan Pulau Bantong Bolaang Mongondow Timur. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*. **10** (1), 81-88
- Malintoi, A., Rumengan, I.F.M., Roeroe, K.A., Warouw, V., Rondonuwu, A.B. & Ompi, M. (2020). Komunitas Ascidia di Pesisir Malalayang Dua, Teluk Manado, Sulawesi Utara. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, **8**(1): 39-46
- Maradou, R.B., Losung, F., Mangindaan, R.E.P., Lintang, R.A.J., Pelle, W.E. & Sambali, H. (2019). Uji Aktivitas Antibakteri Beberapa Spons dari Perairan Salibabu Kepulauan Talaud. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*. **7**(3):234-241
- Opa, L.S., Bara, R.A., Gerung, G.S., Rompas, R.M., Lintang, R.A.J. & Sumilat, D.A. (2018). Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi N-Heksana, Metanol dan Air dari Ascidia *Lissoclinum* sp. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*. **1**(1): 69-80
- Obradović, D., Oljačić, S., Nikolić, K. & Agbaba, D. (2017) Influence of selected mobile phase properties on the TLC retention behavior of ziprasidone and its impurities, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **40**:5-6, 247-251, DOI: [10.1080/10826076.2017.1298026](https://doi.org/10.1080/10826076.2017.1298026)
- Obradović, D. Filipić, S. Nikolić, K. Čarapić, M. & Agbaba, D. (2016). Optimization of TLC Method for Separation and Determination of Ziprasidone and its Impurities. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **39**, 271–276
- Pasodung, A., Losung, F., Angkouw, E.D., Lintang, R.A.J., Mantiri, D.H.M., Sumilat, D.A. (2018). Uji Aktivitas Antibakteri Spons *Plakortis* sp. yang Dikoleksi dari Perairan Bunaken. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*. **1**(1):44-51.
- Palit, C., Sumilat, D. A., Rumengan, A. P., Boneka, F. B., Sinjal, C. A. and Lalita, J. (2022). Komunitas dan Keanekaragaman Ascidia di Pesisir Minanga, Malalayang Satu, Kota Manado, *JURNAL PESISIR DAN LAUT TROPIS*, **10**(2), pp. 115–121.
- Rachmawati, F. (2015). Optimasi Penggunaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Pada Pemisahan Senyawa Alkaloid Daun Pulai (*Alstonia scholaris* L.R.Br). Skripsi. UIN Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Rompas, R. (2011). Farmakognosi Laut (Sumber Baru Ekonomi Kelautan). Dewan Kelautan Indonesia, Jakarta.
- Saputri, N. D. (2016). Analisis Kadar Flavonoid pada Benalu kopi

(*Dendrophthoe pentandra*)
menggunakan Teknik Kromatografi
Lapis Tipis-Densitometri. Skripsi.
FMIPA-Universitas Jember
Sumilat, D.A., Lintang, R.A.J., Undap, S.L.,
Adam, A.A., & Tallei, T.E. (2022)

Phytochemical, antioxidant, and
antimicrobial analysis of *Trichoderma*
asperellum Eudistoma isolated from
ascidian sp. J Appl Pharm Sci,
12(04):090–095.