

PEMISAHAN DAN PEMURNIAN *TOCOTRIENOLS* DARI *CRUDE PALM OIL* DENGAN KROMATOGAFI KOLOM SILIKA GEL SERTA ANALISIS MENGGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV-VIS DAN *HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY* (HPLC)

(Skripsi)

Oleh

VIRA NURMALIA

NPM 2117011002



JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

BANDAR LAMPUNG

2025

ABSTRAK

PEMISAHAN DAN PEMURNIAN *TOCOTRIENOLS* DARI *CRUDE PALM OIL* DENGAN KROMATOGAFI KOLOM SILIKA GEL SERTA ANALISIS MENGGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV-VIS DAN *HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY* (HPLC)

Oleh:

Vira Nurmalia

Crude Palm Oil (CPO) merupakan sumber vitamin E alami, terutama isomer tokotrienol yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk memisahkan dan memurnikan senyawa *tocotrienols* dari CPO menggunakan metode saponifikasi dan kromatografi kolom, serta menganalisis tokotrienol yang dihasilkan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan HPLC.

Pemisahan tokotrienol dilakukan dengan saponifikasi dan dilanjutkan dengan kromatografi kolom (fase diam silika gel, dan fase gerak heksan:dietil eter (95:5)), dan dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan reagen visualisasi *Liebermann-buchard*. Fraksi yang positif terpenoid dan memiliki kesamaan nilai R_f dengan standar tokotrienol dipisahkan, kemudian diukur $\lambda_{\max}$ dan konsentrasinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Fraksi sampel dianalisa menggunakan HPLC dengan fase gerak (85% metanol, 7,5% etanol, dan 7,5% asetonitril), fasa diam Kinetex™ C18 (5 μm , 150 $\times$ 4,6 mm), laju alir 1 mL/menit, detektor PDA λ 294 nm.

Dari data Spektrofotometer UV-Vis. $\lambda_{\max}$ tokotrienol pada sampel 296 nm, $\lambda_{\max}$ tokotrienol standar 294 nm. Konsentrasi tokotrienol pada sampel 450 mg/L. Analisis HPLC menunjukkan bahwa senyawa dalam sampel memiliki puncak kromatogram dengan R_t 3,6 menit, R_t standar δ -tocotrienol 3,7 menit. Rendemen tokotrienol yang diperoleh sebesar 0,0045%. Hasil ini menunjukkan bahwa metode pemisahan dan analisis yang digunakan cukup selektif dan sensitif dalam mengidentifikasi senyawa *tocotrienols* meskipun dalam jumlah yang sangat kecil.

Kata Kunci: tokotrienol, CPO, saponifikasi, kromatografi kolom, UV-Vis, HPLC.

ABSTRACT

SEPARATION AND PURIFICATION OF *TOCOTRIENOLS* FROM CRUDE PALM OIL USING SILICA GEL COLUMN CHROMATOGRAPHY AND ANALYSIS WITH UV-VIS SPECTROPHOTOMETER AND HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

By

Vira Nurmalia

Crude Palm Oil (CPO) is natural source of vitamin E, especially tocotrienols isomers that have high antioxidant activity. This study aims to separate, purify and analyze tocotrienol compounds from CPO using saponification, column chromatography, and analyzed by UV-Vis spectrophotometer and HPLC.

Separation of tocotrienols was carried out by saponification, followed by column chromatography with silica gel as the stationary phase, and hexane:diethyl ether (95:5) as the mobile phase, analyzed by TLC using *Liebermann-buchard* reagent. The terpenoid fraction which has similar R_f with tocotrienols standard was isolated and analyzed by UV-Vis spectrophotometer and HPLC with mobile phase (85% methanol, 7.5% ethanol, and 7.5% acetonitrile), Kinetex™ C18 stationary phase (5 μ m, 150 $\times$ 4.6 mm), flow rate 1 mL/min, PDA detector λ 294 nm. UV-Vis spectrophotometer. λ_{max} tocotrienols measured at 296 nm (sample) and 294 nm (tocotrienols standard). Concentration of tocotrienols in sample was 450 mg/L. HPLC analysis showed that the compound in the sample had a chromatogram peak with R_t 3.6 minutes, R_t standard δ -tocotrienol 3.7 minutes. The tocotrienols yield obtained was 0.0045%. These results indicate that the separation and analysis methods used are sufficient, in identifying tocotrienol compounds even in very small quantities.

Keywords: tocotrienols, CPO, saponification, column chromatography, UV-Vis, HPLC.

PEMISAHAN DAN PEMURNIAN *TOCOTRIENOLS* DARI *CRUDE PALM OIL* DENGAN KROMATOGAFI KOLOM SILIKA GEL SERTA ANALISIS MENGGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV-VIS DAN *HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY* (HPLC)

Oleh

Vira Nurmalia

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2025**

Judul : PEMISAHAN DAN PEMURNIAN *TOCOTRIENOLS*
DARI *CRUDE PALM OIL* DENGAN KROMATOGRAFI
KOLOM SILIKA GEL SERTA ANALISIS
MENGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV-VIS
DAN *HIGH PERFORMANCE LIQUID*
CHROMATOGRAPHY (HPLC)

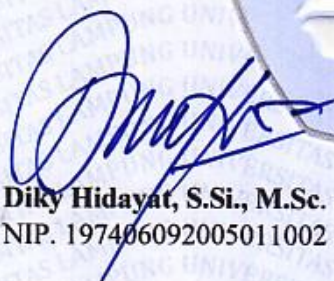
Nama : **Vira Nurmafia**

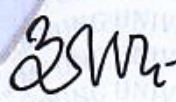
NPM : 2117011002

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam




Diky Hidayat, S.Si., M.Sc.
NIP. 197406092005011002


Dian Septiani Pratama, S.Si., M.Si.
NIP. 198009082009122003

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA


Prof. Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si.
NIP.1972053020000032001

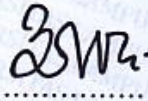
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

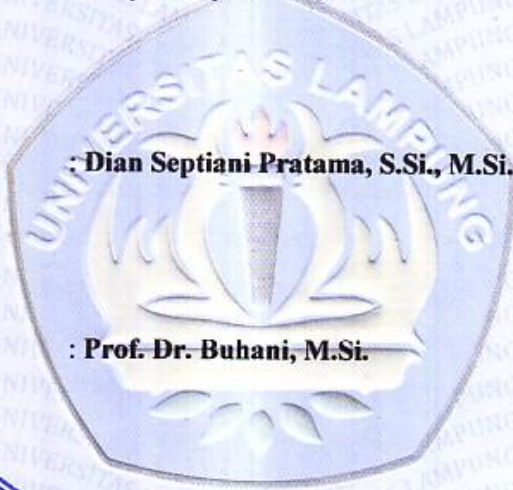
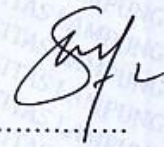
Ketua : Diky Hidayat, S.Si., M.Sc.



Sekretaris : Dian Septiani Pratama, S.Si., M.Si.



Anggota : Prof. Dr. Buhani, M.Si.



Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dr. Eng. Heri Satria, M.Si.
NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 28 Juli 2025

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Vira Nurmalia
NPM : 2117011002
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya yang berjudul "**Pemisahan dan Pemurnian *Tocotrienols* dari *Crude Palm Oil* dengan Kromatografi Kolom Silika Gel serta Analisis Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).**" adalah benar karya saya sendiri dan saya tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sesuai dengan kesepakatan.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenar-benarnya untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 4 Agustus 2025

nyatakan,


malia
NPM.2117011002



RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap **Vira Nurmalia**, lahir di Ambarawa pada 06 Juli 2003. Penulis merupakan anak pertama dari tiga bersaudara, dari pasangan Bapak Turyono dan Ibu Mussarofah. Saat ini penulis bertempat tinggal di Tanjung Gunung, Rt/Rw 001/003, Kelurahan Tanjung Anom, Kecamatan Ambarawa, Kabupaten Pringsewu, Lampung.

Penulis memulai pendidikan formal di TK Al-Basyar pada tahun 2008 dan lulus pada tahun 2009. Selanjutnya, penulis melanjutkan pendidikan di SD Negeri 2 Tanjung Anom yang diselesaikan pada tahun 2015. Pendidikan tingkat menengah pertama ditempuh di SMP Negeri 1 Ambarawa dan lulus pada tahun 2018. Kemudian, penulis melanjutkan ke SMA Negeri 1 Ambarawa dan lulus pada tahun 2021. Penulis diterima sebagai mahasiswa Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN).

Selama menjadi mahasiswa penulis pernah mengikuti Karya Wisata Ilmiah yang diselenggarakan oleh BEM FMIPA Unila tahun 2021. Penulis juga aktif dalam organisasi kampus dan terdaftar sebagai Anggota Bidang Sosial dan Masyarakat Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI), pada periode 2022. Penulis juga pernah menjadi Sekretaris Bidang Sosial dan Masyarakat Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI), pada periode 2023. Selama menjadi mahasiswa penulis juga pernah diberi kesempatan mengikuti Merdeka Belajar Kampus Merdeka (MBKM) Program Wirausaha Merdeka pada tahun 2023. Selain itu penulis juga diberi kesempatan menjadi asisten di Laboratorium Kimia Dasar. Tahun 2024 Penulis

telah melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) periode 1. pada tahun 2024 Penulis telah melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Dinas Lingkungan Hidup Kota Metro pada tahun 2024 yang berjudul “**Analisis Kualitas Air Sungai Way Raman Kota Metro dengan Parameter *Chemical Oxygen Demand* (COD) Sesuai Sni 6989.73:2019**”. Pada tahun 2025, penulis menyelesaikan penelitian di Laboratorium Kimia Analitik dan Instrumentasi Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung dengan judul “**Pemisahan dan Pemurnian *Tocotrienols* dari *Crude Palm Oil* dengan Kromatografi Kolom Silika Gel serta Analisis Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)**”.

MOTTO

“Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari suatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain). Dan hanya kepada Tuhan-Mu lah engkau berharap”

(QS. Al-Insyirah: 6-8)

“Keberhasilan bukanlah milik orang pintar, keberhasilan adalah kepunyaan mereka yang senantiasa berusaha”

(B.J Habibie)

“Aruming jeneng, ngambar-ambar salumahing bumi”

“Letakan aku dalam hatimu, maka aku akan meletakanmu dalam hatiku”

(QS. Al-Baqarah: 152)

“Dengan doa aku bertahan, dengan sabar aku sampai”

PERSEMBAHAN



“Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang”

Puji Syukur kepada Allah SWT atas limpahan karunia-Nya, sehingga terciptalah sebuah karya ini yang kupersembahkan sebagai wujud dan tanggung jawabku kepada:

Kedua orang tua tercinta, Bapak Turyono dan Ibu Mussarofah. Terima kasih atas cinta, doa, dukungan, dan pengorbanan tiada henti yang selalu menjadi sumber kekuatan dan motivasi saya dalam menyelesaikan studi ini.

Adik-Adiku ku tersayang Mikaila Naza dan Asila Syiha. Terima kasih telah menjadi penguat hati dalam suka dan duka perjalanan kuliahku.

Bapak Diky Hidayat, S.Si., M.Sc., Ibu Dian Septiani Pratama, S.Si., M.Si., Ibu Prof. Dr. Buhani, M.Si., serta seluruh Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia. Terima kasih telah membimbing, menasehati, serta memberikan ilmu ilmunya. Semoga Allah Subhanahu Wa Ta'ala membalas segala kebaikan yang telah diberikan.

Keluarga besar, teman-teman seperjuangan, diriku sendiri, dan Almamater Tercinta Universitas Lampung.

SANWACANA

Alhamdulillah rabbil'alam, puji syukur penulis sampaikan kepada Allah SWT, karena atas rahmat dan hidayah-Nya, Penulis dapat menyelesaikan penelitian serta dapat menuliskannya dalam bentuk karya tulis ilmiah.

Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Dengan judul skripsi “**Pemisahan dan Pemurnian *Tocotrienols* dari *Crude Palm Oil* dengan Kromatografi Kolom Silika Gel serta Analisis Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)**”.

Penulis menyadari bahwa dalam proses pengerjaan dan penulisan skripsi ini tidak terlepas dari kesulitan dan rintangan yang penulis hadapi. Namun, itu semua bisa terlewati berkat rahmat dan ridho Allah SWT serta adanya bimbingan, dukungan, nasihat serta bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua penulis ayahandaku tercinta Bapak Turyono dan Ibuku tersayang Mami Mussarofah, yang selalu sabar memberikan kasih sayang, dukungan, motivasi, materi dan yang selalu mendoakan penulis. Gelar ini kupersembahkan untuk kedua orang tua penulis.
2. Adik-adiku tersayang, Mikaila Naza dan Asila Syiha atas seluruh keceriaan, doa dan dukungan kepada penulis.
3. Almarhumah Nenek tercinta, yang senantiasa mendoakan, memberikan kasih sayang yang tulus, dan menjadi sumber kekuatan selama penulis menempuh

pendidikan. Meskipun kini telah tiada, cinta dan doanya selalu penulis rasakan dalam setiap langkah perjuangan ini. Semoga Allah SWT senantiasa menempatkan yang terbaik di sisi-Nya.

4. Keluarga keduaku tersayang Bapak Drs. Suyadi, MM., Ibu Rubingah Fatmawati, Pandu Febi Kurniawan, Dyah Purnama Putri, S.Pd., Rija Dwiono, S.Pd., M.Pd. Rayyan Prabu Kiano, Valley Binar Al-Sabil dan Kholifatun Azizah yang selalu memberikan dukungan dan arahan kepada penulis.
5. Bapak Diky Hidayat, S.Si., M.Sc. selaku dosen pembimbing satu yang senantiasa meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran dalam membimbing penulis.
6. Ibu Dian Septiani Pratama, S.Si., M.Si., selaku dosen pembimbing dua yang telah membantu memberikan pemikiran, arahan, koreksi serta membimbing penulis dengan sabar sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
7. Prof. Dr. Buhani, M.Si., selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan kritik membangun yang sangat berharga dalam penyempurnaan skripsi ini.
8. Bapak Dr. Agung Abadi Kiswandono, S.Si., M.Sc. selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing dan mendampingi penulis selama masa studi dengan penuh perhatian dan dukungan.
9. Prof. Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si. selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung
10. Ibu Dr. Dian Herasari, M.Si. selaku Wakil Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
11. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
12. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah mendidik serta memberikan ilmu pengetahuan dan pengalaman yang sangat bermanfaat kepada penulis selama menjalankan perkuliahan dan semoga ilmu yang diberikan membawa keberkahan.
13. Seluruh staf administrasi dan pegawai di lingkungan Jurusan Kimia, FMIPA, dan Universitas Lampung yang senantiasa membantu dalam sistem akademik, penelitian serta penyusunan skripsi ini dapat berjalan dengan baik.
14. Mas Fakhruddin, S.T. selaku laboran lab. kimia analitik yang telah mendampingi dan mendukung selama masa penelitian.

15. Keluarga besar sang penulis yang senantiasa memberikan dukungan serta doa, skripsi ini menjadi bukti kecil rasa terima kasih saya atas segala dukungan dan kasih yang diberikan.
16. Untuk sahabat-sahabat terbaik penulis Dinda Aprillia Defi, S.Si. Haya Ulfa Atiqah, Ririn Destiana dan Nurmala Rohmah kalian bukan hanya teman, tapi sudah seperti rumah di tengah hiruk-pikuk perkuliahan. Terima kasih sudah selalu ada, saling menguatkan, dan berbagi tawa juga lelah bersama. Semoga kebersamaan ini tetap terjaga, meski nanti kita akan berjalan ke arah yang berbeda.
17. Teman baik penulis, Fera Agistarika. S.Si. yang selalu memberikan dukungan dan semangat untuk penulis menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
18. Teman-teman Kelas A, atas kebersamaan, tawa, kerja sama, dan semangat yang kita bagi selama masa perkuliahan.
19. Seluruh teman-teman Kimia Angkatan 2021 atas kebersamaan dan perjuangan yang kita lalui bersama selama masa kuliah ini.
20. Teman-teman pejuang penelitian di Laboratorium Kimia Analitik.
21. *Last but not least, I wanna thank me*, yang telah bertahan sejauh ini. Terima kasih karena tidak menyerah, meskipun sering lelah, ragu, dan hampir putus asa. Untuk setiap malam yang penuh kecemasan, setiap tangis yang tak terlihat, dan setiap doa yang terucap dalam diam, terima kasih telah tetap percaya bahwa semua ini akan selesai. Perjalanan ini mungkin tidak mudah, namun diri ini tetap berjalan, perlahan tapi pasti. Terima kasih karena sudah cukup kuat untuk sampai di titik ini. Semoga ke depan, diri ini tetap diberi kekuatan untuk terus belajar, tumbuh, dan mencintai proses kehidupan dengan sepenuh hati.

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan	3
1.3 Manfaat	3
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Kelapa Sawit	4
2.1.1 Klasifikasi Kelapa Sawit.....	4
2.1.2 Varietas Kelapa Sawit.....	6
2.2 <i>Crude Palm Oil</i> (CPO).....	7
2.3 Minyak Lemak	9
2.4 Vitamin E	9
2.5 <i>Tocotrienols</i>	10
2.5.1 Struktur <i>tocotrienols</i>	11
2.5.2 Manfaat <i>tocotrienols</i>	13
2.5.3 <i>Tocotrienols</i> sebagai Antioksidan.....	13
2.6 Pemisahan <i>Tocotrienols</i>	14
2.7 Saponifikasi.....	15
2.8 Kromatografi Kolom.....	16
2.8.1 Pembuatan Kolom Kromatografi	16
2.9 Kromatografi Lapis Tipis	17
2.10 <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC)	18
2.10.1 Cara Kerja <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC).....	19
2.10.2 Prinsip <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC)	21
2.10.3 Jenis-Jenis Kromatografi pada <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC)	22
2.10.4 Instrumentasi <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC) .	23
2.10.5 Parameter <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC).....	26
2.11 Spektrofotometer Uv-Vis	26
2.11.1 Prinsip Kerja Spektrofotometri Uv-Vis	27
2.11.2 Hukum Lambert-Beer	28

2.11.3 Komponen Spektrofotometer Uv-Vis.....	29
2.11.4 Tipe-Tipe Spektrofotometer Uv-Vis.....	30
III. METODE PERCOBAAN	32
3.1 Waktu dan Tempat	32
3.2 Alat dan Bahan	32
3.3 Prosedur Penelitian.....	33
3.3.1 Saponifikasi	33
3.3.2 Kromatografi Kolom	33
3.3.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	34
3.4 Analisis Spektrofotometer UV-Vis	34
3.4.1 Penetapan Gelombang Maksimum	34
3.4.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi	35
3.4.3 Penentuan Konsentrasi Sampel.....	35
3.5 Analisis High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	35
3.5.1 Identifikasi Kualitatif dan Kuantitatif.....	35
3.6 Diagram Alir.....	36
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
4.1 Saponifikasi CPO	27
4.2 Optimasi Ekstraksi Vitamin E.....	27
4.3 Kromatografi Kolom dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	39
4.4 Optimasi Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	43
4.5 Analisis Vitamin E dengan Metode Spektrofotometer UV-Vis.....	45
4.5.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum <i>Tocotrienols</i>	45
4.5.2 Penentuan Konsentrasi Sampel <i>Tocotrienols</i>	46
4.6 Analisis Vitamin E Menggunakan <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC).....	48
4.7 Penentuan Kadar Sampel <i>Tocotrienols</i>	51
V. KESIMPULAN DAN SARAN	53
5.1 Simpulan	53
5.2 Saran.....	54
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN.....	63

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Indeks Polaritas Pelarut HPLC.....	20
2. Optimasi Saponifikasi	39
3. Perbandingan Standar dengan Sampel	44
4. Data Konsentrasi Standar dan Sampel.	47
5. Nilai parameter kuantitatif.	50
6. Nilai Rf hasil kolom kromatografi.	68
7. Data Perhitungan Linearitas	70
8. Data perhitungan Kurva kalibrasi	72
9. Data konsentrasi Sampel.	72
10. Data Standar dan Sampel	73

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Buah Kelapa Sawit.....	6
2. Struktur Molekuler Stereoisomer Vitamin E. Isomer α -, β -, γ - dan δ - Memiliki Pola Metilasi yang Berbeda.....	12
3. Isomer α -, β -, γ -, dan δ - <i>tocotrienols</i>	12
4..Reaksi Saponifikasi Trigliserida	15
5. Rangkaian Alat HPLC.....	19
6. HPLC Normal Phase	22
7. HPLC Reverse Phase.	22
8. Ilustrasi Sistem HPLC.....	23
9. Komponen Spektrofotometer UV-Vis.	29
10. Spektrofotometer UV-Vis Single Beam.....	31
11. Spektrofotometer UV-Vis Double Beam	31
12. Diagram Alir Penelitian.....	37
13. Pemisahan Kolom Kromatografi Heksan:Etil Asetat (a) Proses Elusi, (b) Fraksi Hasil Pemisahan.....	40
14. Hasil KLT Sampel (a) UV 254, (b) UV 366.....	41
15. Pemisahan Kolom Kromatografi Heksan:Dietil Eter (a) Proses Elusi, (b) Fraksi Hasil Pemisahan.....	41
16. Hasil KLT Sampel (a) UV 254, (b) UV 366, (c) Visualisasi <i>liebermann–burchard</i>	42
17. KLT Standar <i>tocotrienols</i> dan Hasil Kolom (a) Uv 254, (b) 366, (c) Visualisasi <i>liebermann–burchard</i>	43
18. Panjang Gelombang <i>Tocotrienols</i>	46
19. Kurva Kalibrasi <i>Tocotrienols</i>	48

20. Kromatogram (a) Standar, (b) Sampel	49
22. Kromatografi Lapis Tipis (a) Visualisasi sinar UV 254 nm; (b) Visualisasi UV 366 nm; (c) Visualisasi Serum Sulfat.	66
23. Kromatografi Lapis Tipis (a) Visualisasi Sinar UV 254 nm; (b) Visualisasi UV 366 nm; (c) Visualisasi <i>liebermann–burchard</i>	66
24. Kromatografi Lapis Tipis (a) Visualisasi Sinar UV 254 nm; (b) Visualisasi UV 366 nm; (c) Visualisasi Serum Sulfat	66
25. Kromatografi Lapis Tipis (a) Visualisasi Sinar UV 254 nm; (b) Visualisasi UV 366 nm; (c) Visualisasi <i>liebermann–burchard</i>	67
26. Panjang Gelombang Maksimum (a)Tocotrienol Komersil, (b) Sampel.....	71

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia menjadi produsen terbesar minyak kelapa sawit di dunia, minyak sawit memiliki potensi besar untuk dikembangkan menjadi produk farmaseutikal, nutraseutikal dan pangan. Minyak sawit sebagian besar terdiri atas gliserida yang tersusun dari beberapa asam lemak. Selain itu, minyak sawit juga mengandung komponen-komponen minor seperti karotenoid, vitamin E (*tocopherol* dan *tocotrienols*), sterol, fosfolipid, glikolipid, terpenoid dan hidrokarbon alifatik. Kandungan vitamin E yang terdapat pada kelapa sawit didominasi oleh *tocopherol* dengan kandungan vitamin E yang signifikan, mencapai 600-1.000 ppm bahkan pada residu minyak serabut sawit kandungan vitamin E mencapai 2.000-4.000 ppm (Han Ng et al., 2004).

Vitamin E merupakan suatu zat senyawa kompleks yang memiliki fungsi sebagai antioksidan yang melindungi membran sel dari kerusakan oksidatif yang dipicu oleh radikal bebas (Goon et al., 2017). Vitamin E juga berperan dalam tubuh untuk memproses glukosa, mengurangi peradangan, regulasi sel darah, pertumbuhan jaringan ikat, dan kontrol genetik dari pembelahan sel. Vitamin E alami meliputi 8 isomer yang berbeda, yaitu: α -, β -, γ dan δ -*tocopherol* serta *tocotrienols*. Vitamin E pertama kali ditemukan (dalam bentuk α -*tocopherol*) pada tahun 1922 oleh Herbert Evans, sebagai nutrisi vital yang berperan dalam absorpsi nutrisi pada janin. Seiring dengan penemuan tersebut, bentuk lain dari *tocopherol* pun ditemukan, hingga ditemukan pula *tocotrienols*. Komponen vitamin E pada minyak sawit khususnya gamma dan delta *tocotrienols* ternyata mampu bertindak sebagai antioksidan pada minyak sawit secara baik, hal ini dilihat dari

karakteristik antioksidan dan antiinflamasi yang sebanding atau bahkan lebih kuat dari *tocopherol* (Sudibyo, 1996).

Tocotrienols adalah bentuk utama vitamin E dalam endosperma biji sebagian besar monokotil, termasuk biji-bijian sereal yang penting secara agonomi seperti gandum, beras, dan jelai. Minyak kelapa sawit mengandung *tocotrienols* dalam jumlah yang signifikan (Sundram et al., 2003). *Tocotrienol* juga ditemukan dalam endosperma biji dari sejumlah dikotil terbatas, termasuk spesies *Apiaceae* dan spesies *Solanaeaceae* tertentu, seperti tembakau. Molekul-molekul ini jarang ditemukan di jaringan vegetatif tanaman. Namun minyak sawit mentah yang diekstraksi dari buah *Elaeis guineensis* terutama, mengandung *tocotrienols* dalam jumlah yang cukup tinggi (hingga 800 mg/kg) terdiri dari *c-tocotrienol* dan *α-tocotrienol*. Dibandingkan dengan *tocopherol*, *tocotrienols* jauh lebih jarang tersebar luas di kerajaan tumbuhan (Horvath et al., 2006).

Ekstraksi vitamin E dari minyak kelapa sawit khususnya *tocotrienols* merupakan bahasan penting untuk diteliti. Berbagai cara dikembangkan untuk mendapatkan vitamin E dari minyak sawit, tetapi kompleksitas struktur dan variasi yang luas, menyebabkan perlunya teknik analisis untuk isolasi, diferensiasi dan kuantifikasi masing-masing komponen dari campuran yang diperoleh dari suatu sampel. Meskipun isomer *tocotrienols* individual tersedia secara komersial dan isolasi isomer *tocotrienols* telah didokumentasikan dalam beberapa penelitian, metode ekstraksi yang dilaporkan sering kali ambigu dan kurang jelas, dan beberapa protokol tidak efisien dalam mengekstraksi isomer δ hidrofilik dari *tocotrienols*. Dari metode yang dilaporkan, Kordsmeier et al. (2015) telah menunjukkan bahwa isomer vitamin E individual dapat dipisahkan menggunakan gradien fase *mobile* yang terdiri dari heksana–asam asetat (99,1:0,9) dan etil asetat–asam asetat (99,1:0,9). Ekstraksi umum yang digunakan adalah dengan menggunakan saponifikasi dan ekstraksi fraksi yang tidak tersaponifikasi dengan dietil eter yang diikuti oleh analisis penentuan dengan kromatografi kolom (Halodin et al., 2001).

Penelitian sebelumnya oleh Andulaa et al., (2017) melaporkan studi perbandingan analisis vitamin E minyak sawit merah tersaponifikasi antara metode

spektrofotometer UV Vis dan HPLC. pada penelitian tersebut, vitamin E yang diperoleh hanya berupa fraksi hasil ekstraksi saponifikasi minyak sawit merah. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi vitamin E dari CPO dengan metode ekstraksi dan optimasi saponifikasi vitamin E untuk mendapatkan vitamin E dengan pemurnian yang lebih baik serta membangun apa yang telah dilaporkan pada isolasi isomer vitamin E dan menyajikan metode sederhana untuk ekstraksi isomer α -, β -, γ dan δ -*tocotrienols* dari minyak sawit olahan.

1.2 Tujuan

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah di uraikan diatas, tujuan dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Memisahkan dan memurnikan *tocotrienols* dalam komponen vitamin E dari *Crude Palm Oil*.
2. Mendapatkan kadar *tocotrienols* pada *Crude Palm Oil*.

1.3 Manfaat

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi tentang metode pemisahan dan pemurnian vitamin E(*tocotrienols*) dalam *Crude Palm Oil* (CPO) yang efektif.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kelapa Sawit

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis*) merupakan tanaman asli Afrika Barat. Tumbuh subur di daerah tropis yang lembap dalam rumpun dengan kepadatan yang bervariasi, terutama di wilayah pesisir antara 10 derajat lintang utara dan 10 derajat lintang selatan. Kelapa sawit juga ditemukan hingga 20 derajat lintang selatan di Afrika Tengah dan Timur serta Madagaskar di daerah terpencil dengan curah hujan yang sesuai. Kelapa sawit tumbuh di tanah yang relatif terbuka dan, oleh karena itu, awalnya menyebar di sepanjang tepi sungai dan kemudian di tanah yang dibuka oleh manusia untuk penanaman jangka panjang (Maarasyid dkk., 2008).

2.1.1 Klasifikasi Kelapa Sawit

Klasifikasi tanaman kelapa sawit menurut Pahan (2012), sebagai berikut:

Divisi: Embryophyta Siphonagama

Kelas: Angiospermae

Ordo: Monocotyledonae

Famili: Arecaceae (dahulu disebut Palmae)

Subfamili: Cocoideae Genus:

Elaeis Spesies: *Elaeis guineensis* Jacq.

a. Akar

Kelapa sawit merupakan tumbuhan monokotil yang tidak memiliki akar tunggang. Radikula (bakal akar) pada bibit terus tumbuh memanjang ke arah bawah selama enam bulan terus-menerus dan panjang akarnya mencapai 15 meter. Akar primer

kelapa sawit terus berkembang. Susunan akar kelapa sawit terdiri dari serabut primer yang tumbuh vertikal ke dalam tanah dan horizontal ke samping. Serabut primer ini akan bercabang menjadi akar sekunder ke atas dan ke bawah. Akhirnya, cabang-cabang ini juga akan bercabang lagi menjadi akar tersier, begitu seterusnya. Kedalaman perakaran tanaman kelapa sawit bisa mencapai 8 meter hingga 16 meter secara vertikal.

b. Batang

Tanaman kelapa sawit umumnya memiliki batang yang tidak bercabang. pada pertumbuhan awal setelah fase muda (*seedling*) terjadi pembentukan batang yang melebar tanpa terjadi pemanjangan internodia (ruas). Titik tumbuh batang kelapa sawit terletak di pucuk batang, terbenam di dalam tajuk daun, berbentuk seperti kubis dan enak dimakan. pada batang tanaman kelapa sawit terdapat pangkal pelepah-pelepah daun yang melekat kukuh dan sukar terlepas walaupun daun telah kering dan mati. pada tanaman tua, pangkal-pangkal pelepah yang masih tertinggal di batang akan terkelupas, sehingga batang kelapa sawit tampak berwarna hitam beruas.

c. Daun

Tanaman kelapa sawit memiliki daun (*frond*) yang menyerupai bulu burung atau ayam. Di bagian pangkal pelepah daun terbentuk dua baris duri yang sangat tajam dan keras di kedua sisinya. Anak-anak daun (*foliage leaflet*) tersusun berbaris dua sampai ke ujung daun. Di tengah-tengah setiap anak daun terbentuk lidi sebagai tulang daun.

d. Bunga dan Buah

Tanaman kelapa sawit yang berumur tiga tahun sudah mulai dewasa dan mulai mengeluarkan bunga jantan atau bunga betina. Bunga jantan berbentuk lonjong memanjang, sedangkan bunga betina agak bulat. Buah kelapa sawit tersusun dari kulit buah yang licin dan keras (*epicarp*), daging buah (*mesocarp*) dari susunan serabut (*fibre*) dan mengandung minyak, kulit biji (*endocarp*) atau cangkang atau tempurung yang berwarna hitam dan keras, daging biji (*endosperm*) yang berwarna putih dan mengandung minyak, serta lembaga (*embryo*). Bunga atau

bakal buah *Elaeis guineensis* menghasilkan dua jenis minyak kelapa sawit dari mesokarp berdaging, dan minyak inti kelapa sawit dari inti, dalam rasio volume 10:1 (Bakewell, 2023). Buahnya adalah buah berbiji bulat telur-lonjong, sepanjang 2-5 cm. pada gambar 2 buah dengan diamere 2-5 cm yang tersusun rapat dalam tandan besar berbentuk bulat telur dengan 1000-3000 buah dan berbiji dengan eksokarp tipis. mesokarp mengandung minyak dan endokarp berlignifikasi yang mengandung biji dengan embrio dan endospermapadat (Wahyuni dkk., 2017)



Gambar 1. Buah kelapa sawit (Anonim, 2024)

2.1.2 Varietas Kelapa Sawit

Tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) merupakan tanaman monokotil yang tergolong dalam famili palmae. Tanaman kelapa sawit digolongkan berdasarkan ketebalan tempurung (cangkang) dan warna buah (Pahan, 2012). Menurut Pahan (2012), berdasarkan ketebalan cangkang, tanaman kelapa sawit dibagi menjadi tiga varietas, yaitu

1. Varietas Dura, dengan ciri-ciri yaitu ketebalan cangkangnya 2-8 mm, dibagian luar cangkang tidak terdapat lingkaran serabut, daging buahnya relatif tipis, dan daging biji besar dengan kandungan minyak yang rendah. Varietas ini biasanya digunakan sebagai induk betina oleh para pemulia tanaman.
2. Varietas Pisifera, dengan ciri-ciri yaitu ketebalan cangkang yang sangat tipis (bahkan hampir tidak ada). Daging buah pissifera tebal dan daging biji sangat tipis. Pisifera tidak dapat digunakan sebagai bahan baku untuk tanaman

komersial, tetapi digunakan sebagai induk jantan oleh para pemulia tanaman untuk menyerbuki bunga betina.

3. Varietas Tenera merupakan hasil persilangan antara dura dan pisifera. Varietas ini memiliki ciri-ciri yaitu cangkang yang tipis dengan ketebalan 1,5 – 4 mm, terdapat serabut melingkar disekeliling tempurung dan daging buah yang sangat tebal. Varietas ini umumnya menghasilkan banyak tandan buah.

Berdasarkan warna buah, tanaman kelapa sawit terbagi menjadi 3 jenis yaitu:

1. *Nigescens*, dengan ciri-ciri yaitu buah mudanya berwarna ungu kehitaman, sedangkan buah yang telah masak berwarna jingga kehitamhitaman.
2. *Virescens*, dengan ciri-ciri yaitu buah mudanya berwarna hijau, sedangkan buah yang telah masak berwarna jingga kemerah-merahan dengan ujung buah tetap berwarna hijau.
3. *Albescens*, dengan ciri-ciri yaitu buah mudanya berwarna keputih-putihan, sedangkan buah yang telah masak berwarna kekuning-kuningan dengan ujung buah berwarna ungu kehitaman (Adi, 2011).

2.2 Crude Palm Oil (CPO)

Minyak Sawit mentah (*Crude Palm Oil*) adalah minyak kasar yang diperoleh dengan cara ekstraksi daging buah sawit dan mempunyai karakter yang belum layak makan karena masih banyak mengandung kotoran terlarut dan tidak terlarut dalam minyak (Jondra dkk., 2022). Minyak sawit mengandung senyawa fitonutrien meliputi karoten (sebagai pro-vitamin A) 500-700 ppm, *tocopherol* 500-600 ppm dan *tocotrienols* 1000-1200 ppm (sebagai vitamin E), fitosterol 326-527 ppm, fosfolipid 5-130 ppm, squalene 200-500 ppm, ubiquinone 10-80 ppm, alifatik alkohol 100-200 ppm, triterpen alkohol 40-80 ppm, metil sterol 40-80 ppm dan alifatik hidrokarbon 50 ppm (Oktarianti dkk., 2022). Minyak sawit memiliki potensi besar untuk dikembangkan menjadi produk farmaseutikal dan nutraseutikal, di antaranya karena kandungan *tocopherol* (Sinaga *et al.*, 2015). Kandungan vitamin E yang terdapat pada kelapa sawit didominasi oleh *tocopherol*

namun jenis *tocopherol* lainnya diantaranya *tocotrienols* pada kelapa sawit lebih tinggi dibandingkan dengan sumber lain (Hilma dkk., 2018).

Minyak kelapa sawit mentah terdiri dari berbagai komponen penyusun, yaitu komposisi lemak, kandungan senyawa, dan sifat kimia serta fisika. Perlu diingat bahwa sifat kimia dan fisika dari minyak kelapa sawit dapat berubah tergantung pada tingkat kemurnian dan mutu minyak tersebut (Sutiah *et al.*, 2008). Secara umum, sifat kimia dan fisika dari minyak kelapa sawit memiliki kaitan dengan warna, rasa, bau, kelarutan, titik nyala, titik api, titik didih, polymorphism, serta titik cair (Seftiono, 2018). Selain itu, terdapat bilangan penyabunan dan bilangan lod yang juga perlu diperhatikan. Minyak kelapa sawit mengandung berbagai nutrisi dan komponen, di antaranya:

a. Lemak

Minyak kelapa sawit mengandung lemak jenuh, lemak tak jenuh tunggal, dan lemak tak jenuh ganda. Lemak jenuhnya lebih dari 50%, lemak tak jenuh tunggalnya 40%, dan lemak tak jenuh gandanya 10% Minyak sawit mengandung asam lemak dalam jumlah cukup banyak dan asam lemak tersebut berikatan dengan gliserol membentuk trigliserida (Harikedua dkk., 2018) Menurut Morad *et al.* (2006) komponen trigliserida dalam minyak sawit kasar mencapai 95 persen.

b. Karotenoid

Minyak kelapa sawit mengandung karotenoid, seperti beta-karoten dan likopen, yang dapat menjaga kesehatan mata dan kulit. β -karoten dalam vitamin E dari α -*tocopherol* dapat berperan sebagai bahan pangan fungsional karena memiliki senyawa aktif yang baik untuk kesehatan dan mencegah stres oksidatif di dalam tubuh (Sidik, 2024)

c. Fitosterol

Minyak kelapa sawit mengandung fitosterol, seperti sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol (Boateng *et al.*, 2016). Fitosterol (PS) adalah steroid yang berasal dari tumbuhan. Lebih dari 250 PS telah diisolasi, dan setiap spesies tumbuhan mengandung komposisi fitosterol yang khas (Salehi *et al.*, 2021) fitosterol potensial dapat digunakan sebagai suplemen untuk melawan penyakit yang mengancam. (Gupta, 2021).

d. Vitamin E.

Minyak kelapa sawit mengandung vitamin E yang tinggi, sekitar 15 mg per 100 g. Vitamin E ini mengandung delapan antioksidan yang dapat melindungi kulit. Vitamin E juga berfungsi melindungi membran sel dari kerusakan akibat proses peroksidasi yang dipicu oleh radikal bebas (Goon *et al.*, 2017).

2.3 Minyak Lemak

Minyak dan lemak adalah senyawa organik yang terdapat di alam serta tidak larut dalam air, tetapi larut dalam pelarut organik non-polar (Rahmawati dan Maisari., 2022), misalnya dietil eter ($C_2H_5OC_2H_5$), Kloroform ($CHCl_3$), benzena dan hidrokarbon lainnya, lemak dan minyak dapat larut pada bahan di atas karena minyak dan lemak mempunyai polaritas yang sama dengan pelarut tersebut (Herlina, 2009). Minyak dan lemak merupakan salah satu dari anggota lipid, yaitu merupakan lipid netral. Lipid itu sendiri dapat diklasifikasikan menjadi 4 kelas, yaitu: lipid netral, fosfatida, spingolipid, glikolipid (Susilo, 2002). Bahan penyusun utama minyak dan lemak adalah rantai panjang hidrokarbon yang disebut 'asam lemak'. Tingginya mutu CPO dipengaruhi oleh jenis dan kematangan buah yang diolah. Pada buah yang matang kandungan asam lemak bebas berada pada persentase yang tinggi. Namun pada buah yang belum matang kandungan minyak pada sawit rendah (Jilani, 2018). Asam lemak bebas adalah asam lemak yang terbentuk akibat proses hidrolisis yang terjadi pada lemak sehingga menghasilkan gliserol dan asam lemak bebas (Simanjuntak, 2018).

2.4 Vitamin E

Vitamin E adalah istilah kolektif yang diberikan kepada sekelompok senyawa yang larut dalam lemak yang pertama kali ditemukan pada tahun 1922 oleh Evans dan Bishop; senyawa ini memiliki aktivitas antioksidan yang berbeda yang penting untuk kesehatan (Martha *et al.* 2013). Vitamin E terdapat dalam makanan

yang mengandung lemak dan, karena sifat vitamin yang larut dalam lemak memungkinkannya untuk disimpan dalam jaringan lemak hewan dan manusia, vitamin ini tidak harus dikonsumsi setiap hari. Kelompok vitamin E (yaitu kroman-6-ol), yang secara kolektif disebut tokokromanol (dibagi menjadi *tocopherol* dan *tocotrienols*), mencakup semua turunan tokol dan *tocotrienols* yang secara kualitatif menunjukkan aktivitas biologis *d-alfa-tocopherol* (Rizvi *et al.*, 2014)

Vitamin E merupakan antioksidan utama yang larut dalam lemak dalam sistem antioksidan sel dan secara eksklusif diperoleh dari makanan (Rizvi *et al.*, 2014) Vitamin E melindungi asam lemak tak jenuh ganda dan komponen lain dari membran sel dan lipoprotein densitas rendah dari oksidasi oleh radikal bebas Vitamin E terutama terletak di dalam lapisan ganda fosfolipid membran sel (Bohm, 2018). Secara fisik vitamin E yang larut dalam lemak ini tidak dapat disintesis oleh tubuh sehingga harus dikonsumsi dari makanan dan suplemen, vitamin E dialam ditemukan 8 jenis senyawa yang mengandung aktifitas vitamin E, yaitu: alfa, beta, gama, delta *tocotrienols* dan *tocopherol*.

2.5 Tocotrienols

Tocotrienols merupakan salah satu bentuk dari vitamin E, yang terdiri dari dua kelompok utama yaitu *tocopherol* dan *tocotrienols*. Dalam konteks kimia, *tocotrienols* memiliki struktur yang mirip dengan *tocopherol*, tetapi dengan perbedaan signifikan pada rantai samping yang mengandung tiga ikatan ganda tak jenuh. Terdapat empat isomer *tocotrienols* yang dikenal, yaitu α -, β -, γ -, dan δ -*tocotrienols* (Lodu dan Karwur. 2017). *tocotrienols* memiliki bentuk fisik cairan kental berwarna kuning pucat pada suhu kamar, larut dalam lipid dan pelarut lipofilik, tetapi tidak larut dalam air. Mereka mudah teroksidasi dengan adanya cahaya, panas, dan alkali. *tocotrienols* dioksidasi secara perlahan oleh oksigen atmosfer dalam gelap (Singanusong dan Garba, 2019). Jika tidak ada oksigen, mereka menjadi resisten terhadap alkali dan suhu hingga 200 °C (Lampi *et al.*, 2002).

Umumnya, L-isomer *tocotrienols* tidak memiliki aktivitas vitamin, dan bersifat alami bentuk yang terjadi adalah bentuk D (Ahsan *et al.*, 2015). *tocotrienols* memiliki aktivitas vitamin E lebih rendah dibandingkan *tocopherol* (Lampi *et al.*, 2002). Di antara keluarga tocols, analog γ - dan δ dari *tocotrienols* adalah yang paling efektif dan agen pencegahan alami terkuat melawan kanker dan efek berbahaya paparan radiasi (Kordsmeier *et al.*, 2015). Meski tertinggi aktivitas antioksidan absolut α -*Tocotrienols*, ini adalah faktor paling penting yang terlibat di dalamnya degradasi makanan kaya *tocotrienols*. Hal ini disebabkan oleh sumbangan hidrogen kekuatan α -T3 terhadap radikal bebas. Namun, dalam lemak dan minyak, ia menunjukkan hal yang sama degradasi tercepat dan aktivitas antioksidan relatif terendah terhadap lipid per oksidasi dibandingkan dengan isomer *tocotrienols* yang tersisa (Ahsan *et al.*, 2015).

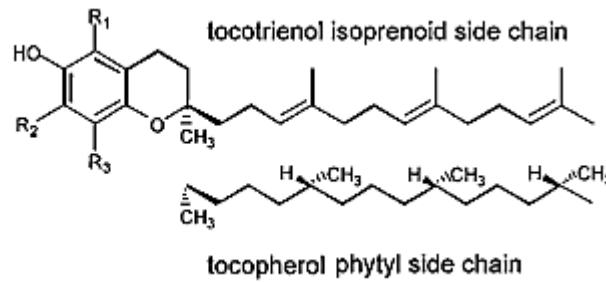
Tocopherol dan *tocotrienols* dikatakan mirip karena pada strukturnya ada tiga ikatan rangkap pada rantai samping isoprenoid/*phytyl* pada *tocotrienols* menyebabkan keduanya mempunyai potensi dan aktivitas biologi yang berbeda. *Tocopherol* berbentuk cairan berminyak yang bersifat transparan, kental, sedikit berbau, dan mempunyai warna berkisar dari kuning muda sampai coklat kemerahan. *Tocopherol* bersifat tidak larut dalam air tetapi larut dalam pelarut organik seperti etanol, kloroform, dan heksana (Musalmah *et al.*, 2005).

2.5.1 Struktur *tocotrienols*

Tocotrienols mempunyai tiga ikatan rangkap pada rantai samping. Perbedaan struktur ini mempengaruhi tingkat aktivitas vitamin E secara biologik yang dapat dilihat pada Gambar 2 menunjukkan struktur *tocotrienols* pada vitamin E, dimana *tocotrienols* memiliki isomer yang berbeda, yaitu α -, β -, γ -, dan δ -*tocotrienols*, tergantung pada jumlah dan posisi gugus metil pada cincin kromanol (Martha *et al.*, 2013).

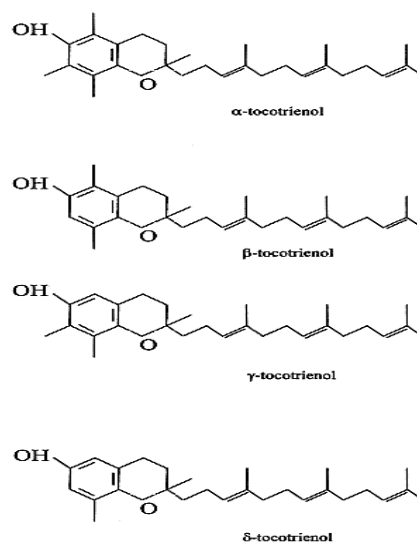
tocotrienol isoforms

	R ₁	R ₂	R ₃
α :	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β :	CH ₃	H	CH ₃
γ :	H	CH ₃	CH ₃
δ :	H	H	CH ₃



Gambar 2. Struktur Molekul Stereoisomer Vitamin E. Isomer α -, β -, γ - dan δ - Memiliki Pola Metilasi yang Berbeda (Świgło *et al.*, 2007)

Membedakan α -, β -, γ -, dan δ -tocotrienols, tergantung pada jumlah dan posisi gugus metil pada cincin kromanol (Martha *et al.*, 2013). Struktur ini memberikan sifat non-polar pada molekulnya, memungkinkan tocotrienols untuk berinteraksi dengan membran sel lipid (Lodu dan Karwur. 2017). α -tocotrienols memiliki tiga ikatan rangkap dalam rantai sampingnya dengan gugus metil pada posisi yang sama dengan alfa-tocopherol, β -tocotrienols memiliki dua gugus metil pada posisi berbeda dibandingkan alfa-tocotrienols. γ -tocotrienols memiliki satu gugus metil yang berbeda posisinya dari alfa dan beta, dan δ -tocotrienols memiliki satu gugus metil pada posisi yang paling berbeda dibandingkan jenis tocotrienols lainnya. Perbedaan struktur α -, β -, γ -, dan δ -tocotrienols dari tokofeol adalah bahwa setiap jenis tocotrienols memiliki perbedaan dalam jumlah dan posisi gugus metil yang terikat pada cincin kromanol di strukturnya yang dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Isomer α -, β -, γ -, dan δ -tocotrienols (Ronald dan Junsoo.2004)

Perbedaan struktur ini memengaruhi aktivitas biologis mereka, termasuk posisi gugus metil, dimana *alfa-tocotrienols* memiliki gugus metil lebih banyak dibandingkan dengan beta, gamma, dan delta *tocotrienols*, yang memengaruhi kemampuan antioksidan dan sifat biologis lainnya. *Alfa-tocotrienols* paling kuat sebagai antioksidan dan dalam melindungi sel-sel otak dari kerusakan oksidatif. *Beta-Tocotrienols* sedikit lebih lemah dibandingkan *alfa-tocotrienols* dalam aktivitas antioksidan tetapi tetap memiliki manfaat kardiovaskular. *Gamma-Tocotrienols* lebih efektif dalam menurunkan kolesterol dan menekan pertumbuhan sel kanker. *Delta-Tocotrienols* paling aktif dalam menghambat pertumbuhan sel kanker dan memiliki efek anti-inflamasi yang kuat. Perbedaan struktural ini membuat masing-masing *tocotrienols* memiliki sifat spesifik yang dapat dimanfaatkan dalam kesehatan, meskipun semuanya memiliki efek antioksidan dan anti-inflamasi.

2.5.2 Manfaat tocotrienols

Tocotrienols merupakan antioksidan yang dapat bekerja cepat, 40-60 kali lebih efektif dalam mencegah kerusakan akibat radikal bebas daripada *α-tocoferol* (Perricone. 2008). Hal ini berkaitan dengan distribusi yang lebih baik pada lapisan berlemak membran sel. Rantai samping *tocotrienols* yang tidak jenuh menyebabkan penetrasi pada lapisan lemak jenuh pada otak dan hati lebih baik. Disamping mempunyai sifat penangkapan radikal bebas, sifat antioksidatif *tocotrienols* juga berkaitan dengan kemampuannya menurunkan pembentukan tumor, kerusakan DNA, dan kerusakan sel (Ahmadi dan Estiasih. 2011).

2.5.3 Tocotrienols sebagai Antioksidan

Antioksidan didefinisikan dengan senyawa yang dapat memberikan elektron (donor elektron) yang bisa menghambat terjadinya reaksi oksidasi, dengan cara mengikat radikal bebas serta molekul yang sangat reaktif tanpa menjadi radikal bebas itu sendiri (Suwardi dan Noer, 2020). Antioksidan juga dapat

diklasifikasikan menjadi dua jenis yaitu endogen serta eksogen, untuk antioksidan endogen merupakan antioksidan yang diproduksi oleh tubuh tidak dapat menetralkan radikal bebas secara berlebihan sehingga dibutuhkan pemberian antioksidan dari sumber luar (eksogen). Berdasarkan sumbernya, antioksidan eksogen dapat dibagi lagi menjadi dua jenis yakni alami dan sintetis. Untuk antioksidan sintetis terdapat beberapa contoh seperti butil hidroksil anisol (BHA), butil hidroksil toluene (BHT), dan tetra butil hidroksil quinon (TBHQ). Antioksidan alami biasanya dapat diperoleh dari bahan-bahan alami seperti halnya dari tanaman sayuran ataupun dari buah-buahan. Antioksidan alami lebih dianggap aman dibandingkan dengan antioksidan sintesis, hal ini dikarenakan pada antioksidan alami belum terkontaminasi dan tercampur oleh bahan kimia dan mudah untuk didapatkan di lingkungan sekitar, contoh antioksidan alami seperti flavonoid, senyawa fenol dan asam folat.

2.6 Pemisahan *Tocotrienols*

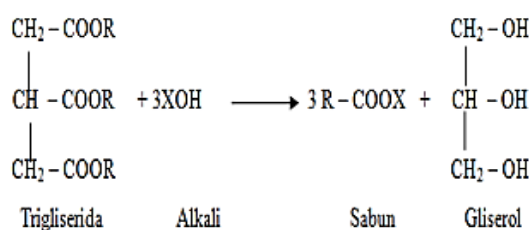
Pemisahan vitamin E untuk mendapatkan *tocotrienols* sebagai antioksidan dapat dilakukan melalui beberapa metode, yang umumnya melibatkan teknik saponifikasi dan kromatografi. Ada beberapa proses pemisahan dan pemurnian yang dilakukan secara awal dalam pemisahan vitamin E adalah saponifikasi, di mana asam lemak dari minyak sawit dicampur dengan kalium hidroksida (KOH) dan etanol. Saponifikasi ini bertujuan untuk memisahkan komponen tersaponifikasi (seperti gliserol dan asam lemak) dari komponen tak tersaponifikasi yang mengandung vitamin E, termasuk *tocotrienols* (Martha *et al.*, 2012).

Setelah saponifikasi, fraksi tak tersabunkan diekstrak menggunakan pelarut organik seperti heksana. Campuran ini kemudian dibiarkan untuk memisahkan fraksi tak tersabunkan (yang mengandung vitamin E) dari fraksi tersabunkan (Lodu dan Karwur, 2017). Pemisahan dengan menggunakan metode kolom kromatografi juga efektif untuk pemisahan *tocotrienols*. Pemurnian dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) telah menjadi metode yang efektif,

HPLC digunakan untuk memisahkan isomer tertentu dan memisahkan vitamin larut lemak dengan tokokromanol bebas maupun teresterifikasi. HPLC memiliki sensitifitas, selektifitas, dan spesifitas tinggi jika dibandingkan UV. HPLC FLD dapat mengidentifikasi konsentrasi komponen vitamin E secara individual dari CPO, PPC, dan *unsaponifiables* of PPC (Martha *et al.*2013).

2.7 Saponifikasi

Saponifikasi adalah reaksi yang terjadi ketika minyak atau lemak dicampur dengan larutan alkali. Dengan kata lain saponifikasi adalah proses pembuatan sabun yang berlangsung dengan mereaksikan asam lemak dengan alkali yang menghasilkan sintesa dan air serta garam karboni (Mahmudi dan Wahyuni,2018). Prinsip dari reaksi saponifikasi yaitu tersabunkannya asam lemak dengan alkali. Gambar 4 menunjukan asam lemak yang terdapat dalam keadaan bebas ataupun dalam keadaan terikat sebagai minyak atau lemak (*gliserida*) direaksikan dengan alkali sehingga menghasilkan sabun dan gliserol (Amelia dkk., 2023). Proses saponifikasi terjadi saat hidrolisis lemak menjadi asam lemak dan gliserol dalam kondisi basa (Jalaludin dkk., 2023).



Gambar 4.. Reaksi Saponifikasi *Trigliserida* (Amelia,2023)

Trigliserida dapat diubah menjadi sabun dalam proses satu atau dua tahap. pada proses satu tahap, trigliserida diperlakukan dengan basa kuat yang akan memutus ikatan ester dan menghasilkan garam asam lemak dan *gliserol*. Proses ini digunakan dalam industri *gliserol*. Dengan cara ini, sabun juga dihasilkan dengan cara pengendapan. Peristiwa ini disebut dengan salting out oleh NaCl jenuh (Hasibuan dkk.,2019).

2.8 Kromatografi Kolom

Kromatografi adalah metode pemisahan kimia berdasarkan perbedaan distribusi zat dalam fasepadat dan fase gerak. Tujuan kromatografi biasanya untuk memisahkan senyawa-senyawa dalam suatu campuran. Pemisahan dengan kromatografi dapat dilakukan dengan mudah dan cepat hanya dengan menggunakan peralatan yang relatif sederhana (Fasya, 2018). Berdasarkan jenis fase gerak dan mekanisme pemisahannya kromatografi dapat dibagi menjadi beberapa jenis. Jika ditinjau dari fase geraknya meliputi kromatografi cair, kromatografi gas, kromatografi adsorpsi, dan kromatografi partisi. Jika ditinjau dari mekanismenya meliputi kromatografi pertukaran ion dan kromatografi gel. Jika ditinjau dari fase diamnya berupa kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis, dan kromatografi kertas (Dwiwarso, 2017).

Prinsip kerja kromatografi kolom adalah adanya perbedaan interaksi dengan fase gerak dan fase diam dari masing-masing senyawa campuran yang akan dipisahkan. Senyawa polar lebih kuat berinteraksi dalam gel silika yang bersifat polar, menyebabkannya turun lebih lambat, sedangkan senyawa non-polar lebih lemah interaksinya sehingga bergerak lebih cepat. Senyawa dalam kolom terpisah membentuk pita serapan sesuai dengan polaritas senyawa dan mengalir keluar kolom dengan pelarut (fase gerak) dengan polaritas yang sama (Syahmani dkk, 2017). Fase gerak yang digunakan dapat berupa pelarut murni atau campuran dua pelarut yang bersesuaian dengan perbandingan tertentu. Optimasi pelarut dilakukan melalui uji pendahuluan menggunakan plat KLT dengan pelarut yang sama namun volume yang diperkecil (Mirawati, 2022).

2.8.1 Pembuatan Kolom Kromatografi

Kromatografi kolom terbagi menjadi dua jenis, yaitu kromatografi kolom tertutup dan kromatografi terbuka (konvensional). Kromatografi kolom adalah kromatografi

yang menggunakan kolom sebagai alat untuk memisahkan komponen-komponen dalam campuran.

Cara pembuatan kolom ada dua macam (Hargono, 1986):

1. Cara kering yaitu silika gel dimasukkan ke dalam kolom yang telah diberi kapas kemudian ditambahkan cairan pengelusi.
2. Cara basah yaitu silika gel terlebih dahulu disuspensikan dengan cairan pengelusi yang akan digunakan kemudian dimasukkan ke dalam kolom melalui dinding kolom secara kontinyu sedikit demi sedikit hingga masuk semua, sambil kran kolom dibuka. Eluen dialirkan hingga silika gel mapat, setelah silika gel mapat eluen dibiarkan mengalir sampai batas adsorben kemudian kran ditutup dan sampel dimasukkan yang terlebih dahulu dilarutkan dalam eluen sampai diperoleh kelarutan yang spesifik. Kemudian sampel dipipet dan dimasukkan ke dalam kolom melalui dinding kolom sedikit demi sedikit hingga masuk semua, dan kran dibuka dan diatur tetesannya, serta cairan pengelusi ditambahkan. Tetesan yang keluar ditampung sebagai fraksi-fraksi.

Kolom dapat dibuat dari berbagai jenis material, seperti *stainless steel*, aluminium, tembaga, gelas dan paduan silika. Sebagian besar sistem kolom modern terbuat dari gelas atau paduan silika. Kolom konvensional dibuat dari material pendukung yang dilapisi fase diam dari berbagai pembebanan yang dikemas di dalam kolom. Kolom kapiler terdiri dari tabung kapiler panjang yang didalamnya dilapisi dengan fase diam (fase diam dapat juga direkatkan langsung pada permukaan silika). Sebagian besar kolom kapiler terbuat dari paduan silika yang dilapisi polimer di bagian luarnya. Paduan silika sangat mudah pecah sedangkan lapisan polimer tersebut bertindak sebagai pelindungnya.

2.9 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan suatu analisis sederhana yang dapat digunakan untuk melakukan penegasan terhadap senyawa kimia (Forestryana dan Arnida., 2020). Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan cara pemisahan

campuran senyawa menjadi senyawa murninya dan mengetahui kuantitasnya yang menggunakan. Kromatografi juga merupakan analisis cepat yang memerlukan bahan sangat sedikit, baik penyerap maupun cuplikannya. Kromatografi merupakan teknik pemisahan yang menggunakan prinsip distribusi suatu senyawa pada fasa diam dan fasa gerak berdasarkan perbedaan kepolaran. Analisis kualitatif kromatografi lapis tipis didasarkan pada nilai R_f (*Retention factor*), dua senyawa dapat dikatakan identik (sama) jika mempunyai nilai R_f yang sama. Sedangkan analisis kuantitatif dilakukan dengan mengukur luas spot atau pengerokan secara langsung terhadap spot lalu penentuan kadar senyawa yang terdapat dalam spot tersebut dengan metode analisis lain (Gandjar dan Rohman, 2009). Pemisahan yang baik sangat ditentukan oleh jenis dan kondisi eluen yang digunakan dalam melakukan pekerjaan isolasi biasanya tidak menggunakan eluen tunggal tetapi menggunakan campuran dua atau tiga jenis eluen dengan perbandingan tertentu (Darmawansyah dkk., 2023)

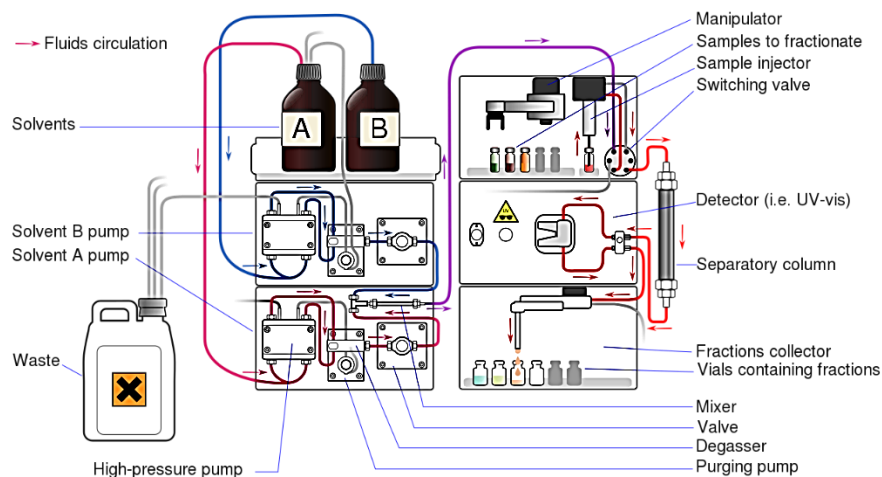
2.10 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Kromatografi pertama kali ditemukan oleh Tsweet pada tahun 1903, dimana Tsweet berhasil melakukan pemisahan pigmen dari daun dengan menggunakan kolom berisi kapur (CaSO_4). Tsweet juga menciptakan istilah kromatografi untuk menggambarkan daerah berwarna yang bergerak menuju bawah kolom. HPLC merupakan salah satu teknik kromatografi untuk zat cair yang disertai dengan tekanan tinggi (Rosydiati dkk., 2019). HPLC adalah pengembangan terkini dari kromatografi cair kolom klasik pada kolom, detektor yang lebih sensitif dan peka serta kemajuan teknologi pada pompa bertekanan tinggi yang menyebabkan HPLC menjadi suatu metode dengan sistem pemisahan zat yang cepat dan efisien (Johnson, 1991).

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) atau dikenal juga dengan nama Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan suatu proses pemisahan senyawa yang berdasarkan kepolarannya, terdiri dari kolom sebagai fase diam dan larutan tertentu sebagai fase gerak, serta menggunakan tekanan

tinggi untuk dapat mendorong fase gerak. Fase diam dan fase gerak harus memiliki tingkat kepolaran yang berbeda agar proses pemisahan dapat berlangsung. Sampel dibawa oleh fase gerak (*mobile phase*) melewati kolom. Kolom berisi fase diam (*stationery phase*) yang berupa cairan dan berfungsi memisahkan komponen sampel. Senyawa kimia yang memiliki bobot molekul rendah maupun tinggi, umumnya dapat dipisahkan komponen-komponennya dengan metode kromatografi (Rosydiati dkk., 2019)

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) atau Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah salah satu instrument yang dipakai untuk teknik analisis pemisahan secara kualitatif, kuantitatif, pemisahan/isolasi dan pemurnian (Angaini. 2020). Dalam menentukan kadar secara kualitatif maupun kuantitatif dapat menggunakan larutan standar sebagai larutan pembanding, yaitu dengan cara eksternal (menyuntikkan sampel dan standar secara terpisah) dan dengan cara internal (menyuntikkan sampel dan standar secara bersamaan) (Murningsih dan Chairul, 2000). Instrumen HPLC dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Rangkaian Alat HPLC (Iqtar, 2021)

2.10.1 Cara Kerja High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC bekerja menggunakan dua fase utama, yaitu fase gerak dan fase diam. Fase gerak berupa pelarut cair yang berfungsi membawa sampel melalui sistem,

sedangkan fase diam adalah partikel berpori kecil dalam kolom yang memisahkan komponen berdasarkan afinitasnya. Fase gerak ditampung dalam reservoir dan dialirkan secara kontinu oleh pompa dengan laju alir yang diatur melalui perangkat lunak. Sampel diinjeksikan dan terbawa ke kolom, di mana komponen-komponen sampel berinteraksi dengan fase diam dan fase gerak, sehingga terpisah sesuai karakteristik kimianya. Setelah melewati kolom, senyawa terdeteksi oleh detektor dan hasilnya ditampilkan dalam bentuk sinyal pada perangkat komputer. Pemilihan fase gerak sangat penting karena memengaruhi efisiensi pemisahan (daya elusi dan resolusi). Fase gerak biasanya berupa campuran pelarut yang memiliki polaritas tertentu. Dalam fase normal (fase diam polar), daya elusi meningkat seiring bertambahnya polaritas pelarut. Sebaliknya, dalam fase terbalik (fase diam kurang polar), pelarut yang lebih polar justru menurunkan daya elusi. Fase gerak yang baik harus murni, inert, sesuai dengan detektor, dan mudah diperoleh. Indeks polaritas (P') dapat digunakan sebagai acuan dalam memilih campuran pelarut yang sesuai dengan sifat sampel dan sistem kolom yang digunakan (Harvey, 2000). Tabel 1 menunjukkan indeks polaritas beberapa pelarut pada HPLC.

Tabel 1. Indeks Polaritas Pelarut HPLC

Pelarut	Keasaman (α)	Kebasaan (β)	Dipolaritas (π)	Indeks polaritas (P')
Asam asetat	0,54	0,15	0,31	6,0
Asetonitril	0,15	0,25	0,60	5,8
Alkana	0,00	0,00	0,00	0,1
Kloroform	0,43	0,00	0,57	4,1
Dimetilsulfoksida	0,00	0,43	0,57	7,2
Etanol	0,39	0,46	0,25	4,3
Metanol	0,43	0,29	0,29	5,1
Nitrometana	0,17	0,19	0,64	6,0
Propanol	0,36	0,40	0,24	3,9
Tetrahidrofuran	0,00	0,49	0,51	4,0
Trietilamin	0,00	0,84	0,16	1,9
Air	0,43	0,18	0,39	10,2

Sumber: Snyder *et al.* (2010)

2.10.2 Prinsip High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Prinsip kerja HPLC adalah pemisahan komponen analit berdasarkan kepolarannya, setiap campuran yang keluar akan terdeteksi dengan detektor dan direkam dalam bentuk kromatogram. Dimana jumlah peak menyatakan jumlah komponen, sedangkan luas peak menyatakan konsentrasi komponen dalam campuran (Kusuma dan Ismanto. 2016). alatnya terdiri dari kolom (sebagai fasa diam) dan larutan tertentu sebagai fasa geraknya. Yang paling membedakan HPLC dengan kromatografi lainnya adalah pada HPLC digunakan tekanan tinggi untuk mendorong fasa gerak. Campuran analit akan terpisah berdasarkan kepolarannya, dan kecepatannya untuk sampai ke detektor (waktu retensinya) akan berbeda, hal ini akan teramati pada spektrum yang puncak-puncaknya terpisah (Ardianingsih, 2009).

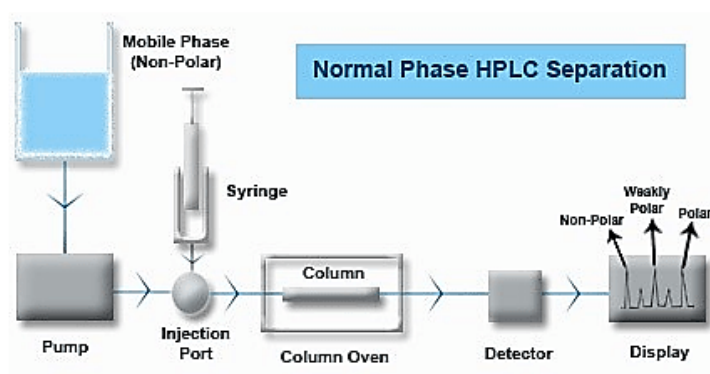
Analisis dengan HPLC memiliki beberapa keunggulan antara lain waktu analisis relatif singkat, volume sampel yang digunakan sedikit, dapat menganalisis senyawa organik dan anorganik, serta kolom yang dapat digunakan kembali (Ardianingsih, 2009). Analisis dikatakan baik jika waktu analisisnya singkat dan daya pisahnya tinggi (Gitter, et. al., 1991). Faktor-faktor yang mempengaruhi hasil pemisahan antara lain, pengaturan komposisi fase gerak, laju alir serta ada tidaknya penambahan asam (Amin, dkk., 2016).

Setiap campuran yang keluar dari kolom akan terdeteksi pada detektor dan direkam dengan bentuk kromatogram. Di mana jumlah peak (puncak) menyatakan jumlah komponen dan luas peak menyatakan konsentrasi komponen dalam campuran (Hendayana, 2006). KCKT memiliki berbagai keunggulan dalam proses pemisahan atau pemurniannya, yaitu dapat menghasilkan data analisis yang cepat dan akurat, mudah dalam proses pengoperasiannya, mengurangi limbah dari eluen, memiliki sensitivitas dan selektivitas yang tinggi, dapat menggunakan bermacam-macam detektor, memiliki resolusi yang baik, serta dapat menghindari dekomposisi sampel yang dianalisis (Ardianingsih, 2009).

2.10.3 Jenis-Jenis Kromatografi pada High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

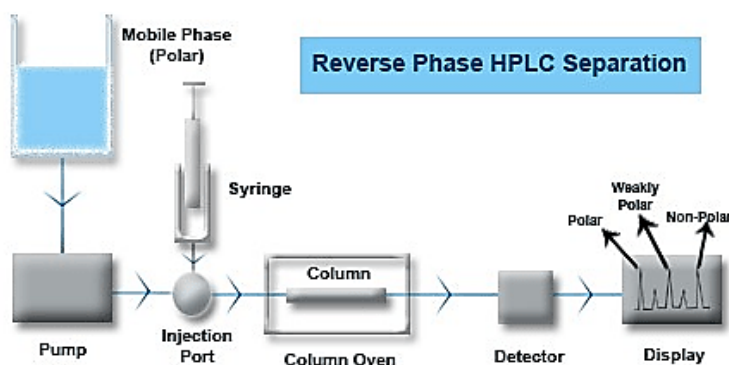
Jenis-jenis kromatografi pada KCKT berdasarkan fase diam dan geraknya, yaitu:

- a. Kromatografi fase normal (*normal-phase chromatography*) pada kromatografi fase normal digunakan fase diam polar dan menggunakan fase gerak nonpolar Gambar 6. Fase diam biasanya adalah silika gel, sedangkan fase geraknya yaitu diklorometan, kloroform, dietil eter, heksana, dan lain-lain. Dalam fase ini yang akan keluar terlebih dahulu adalah senyawa yang paling nonpolar.



Gambar 6. HPLC Normal Phase (Mubarok, 2021)

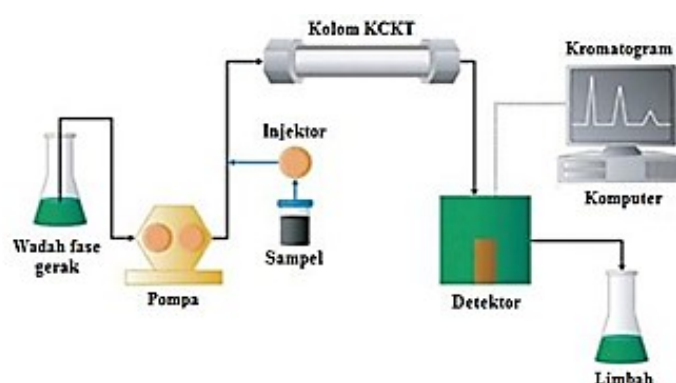
- b. Kromatografi fase terbalik (*reverse-phase chromatography*) pada kromatografi fase terbalik digunakan fase diam nonpolar dan menggunakan fase gerak polar Gambar 7. Fase diamnya adalah ODS/C18 (oktadesilsilan) atau C8 (oktilsilan), sedangkan fase geraknya yaitu air, metanol, asetonitril, THF, dan lain-lain. Dalam fase ini yang akan keluar terlebih dahulu adalah senyawa yang paling polar.



Gambar 7. HPLC Reverse Phase (Mubarok, 2021).

2.10.4 Instrumentasi High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Instrumen KCKT secara umum terdiri dari beberapa rangkaian alat wadah pelarut, pompa, injektor, kolom, dan detektor yang masing-masing memiliki fungsi berbeda. Namun, jika semuanya berjalan dengan baik maka akan memberikan data yang akurat serta dapat digunakan untuk analisis kuantitatif maupun analisis kualitatif. Sistem HPLC dapat diilustrasikan pada Gambar 8.



Gambar 8. Ilustrasi Sistem HPLC (Mubarok, 2021).

a. Wadah Pelarut (*Solvent Reservoir*)

Wadah pelarut atau fase gerak harus bersih dan inert. Wadah pelarut yang kosong atau labu laboratorium dapat digunakan sebagai wadah fase gerak. Wadah ini biasanya dapat menampung fase gerak antara 1 sampai 2 liter pelarut. Fase gerak yang digunakan harus dilakukan penyaringan terlebih dahulu untuk menghindari adanya partikel kecil yang tidak diinginkan.

b. Pompa

Pompa merupakan alat yang digunakan untuk mendorong fase gerak menuju kolom. Pompa terbuat dari bahan gelas, baja tahan karat, teflon atau batu nilam, di mana pompa harus bersifat inert terhadap fase gerak, memberikan tekanan yang tinggi serta mampu memberikan aliran sistem isokratik maupun gradien. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 3

mL/menit. Terdapat 2 jenis pompa dalam KCKT yaitu, pompa dengan tekanan konstan dan pompa dengan aliran fase gerak yang konstan.

- c. Tempat injeksi sampel (Injektor) Injektor adalah alat untuk memasukkan sampel ke dalam kolom yang dapat dilakukan secara otomatis (auto injector) ataupun manual (manual injector). Sampel-sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel (Sampel loop) internal atau eksternal.

d. Kolom

Kolom merupakan bagian terpenting dalam pemisahan yang terbuat dari logam, kaca dan stainless berbentuk tabung yang dapat menahan tekanan tinggi. Pemisahan senyawa sangat bergantung pada kolom. Kolom atau fase diam adalah tempat terjadinya pemisahan komponen-komponen campuran karena adanya perbedaan kekuatan interaksi antara zat-zat terlarut terhadap fase gerak. Zat-zat yang lebih kuat interaksinya dengan fase gerak akan keluar lebih dahulu. Semakin lemah interaksi analit dengan fase diam, semakin cepat analit tersebut keluar kolom. Proses pemisahan pada kolom yaitu memisahkan komponen-komponen dalam sampel. Syarat fase diam adalah bersifat inert, tidak larut dalam fase gerak, tidak berwarna, memberikan aliran yang baik terhadap fase gerak, tahan tekanan tinggi, memiliki gugus fungsi aktif, stabil dan tidak mudah rusak (Susanti dan Dachriyanus, 2010). Fase diam yang sering digunakan adalah Oktadesil silika (ODS atau C18) karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang maupun tinggi.

Kolom C18 adalah kolom silika gel termodifikasi, di mana pada gugus siloksannya (Si-O-Si) terikat hidorkarbon dengan 18 gugus karbon yang membuat kolom ini lebih nonpolar. Selain ODS, terdapat juga kolom BDS (*Base Deactivated Silica*) yang dapat digunakan dalam pemisahan dengan

KCKT. Perbedaan antara kolom ODS dan BDS yaitu kolom ODS memiliki gugus fungsi -OH yang bebas, sedangkan kolom BDS memiliki gugus -OH yang dinonaktifkan. Kolom ODS juga memiliki tailing puncak yang tinggi, sedangkan kolom BDS dirancang untuk mengurangi tailing puncak. Kolom C18 memiliki jumlah atom karbon yang banyak sehingga bersifat hidrofobik dan mampu menahan komponen nonpolar lebih lama.

e. Detektor

Detektor merupakan suatu alat yang mendeteksi komponen-komponen senyawa kimia yang telah terpisah melewati kolom. Sinyal yang terdeteksi akan diplot terhadap waktu oleh komputer yang disebut kromatogram. Kromatogram menampilkan puncak-puncak yang memiliki karakteristik berbeda karena adanya senyawa yang berbeda. Syarat kromatogram yang baik adalah memiliki bentuk puncak yang simetri, waktu retensi < 10 menit, dan resolusi $\geq 1,5$ (Rosydiati dan Ela, 2019). Pemilihan detektor diperlukan agar mendapatkan detektor yang sensitif untuk pemisahan atau senyawa. Detektor harus memenuhi syarat untuk dapat digunakan analisis, yaitu memiliki sensitivitas tinggi, gangguan rendah, daerah respon linear yang luas, stabil dan tidak peka terhadap perubahan laju alir maupun suhu. Beberapa jenis detektor yang dapat digunakan dalam KCKT yaitu photo-diode array (PDA), detektor refractive index, bulk, property detector, detektor UV-Vis, solute property detector, detektor fluorescence, dan detektor elektro-kimia. Detektor photo-diode array (PDA) merupakan detektor UV dengan beberapa keistimewaan seperti memiliki kecepatan deteksi 300-400 kali lebih baik dari detektor Photomultiplier Tube (PMT), rentang pengukuran panjang gelombangnya 200-650 nm, tidak mengalami pergerakan mekanis, dan hanya terdapat satu lensa fokus. pada detektor PDA juga mampu menampilkan kromatogram tiga dimensi yang akan sangat membantu dalam menentukan kemurnian puncak kromatogram (Susanti dan Dachriyanus, 2010).

2.10.5 Parameter High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Parameter yang biasa digunakan dalam metode HPLC yaitu:

a. Waktu retensi (t_R)

Waktu retensi atau retention time adalah selang waktu yang diperlukan solut (zat terlarut) saat mulai diinjeksikan (running) sampai keluar dari fase diam atau kolom dan sinyal kromatogram direkam oleh detektor. Waktu retensi pelarut (zat yang tidak teretensi) disebut dead-time yang disimbolkan t_0 atau t_m . Pengukuran waktu retensi tidak dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu komponen, karena waktu retensi ditentukan oleh susunan dan cara kerja kolom, sehingga waktu retensi adalah karakteristik terhadap suatu komponen, namun tidak spesifik. Syarat waktu retensi yang baik yaitu ≤ 10 menit (Depkes RI, 1995).

b. Faktor retensi atau faktor kapasitas (k')

Faktor retensi atau faktor kapasitas adalah pengukuran retensi suatu senyawa pada kondisi tertentu. Kondisi yang dimaksud yaitu pada komposisi fase gerak, suhu dan jenis kolom tertentu. Hubungan antara waktu retensi dan faktor retensi dapat dilihat pada Persamaan 1, yaitu semakin besar nilai t_R maka semakin besar juga nilai k' . Nilai k' yang disarankan yaitu $2 \leq k' \leq 10$ menit (Snyder et al., 2010). Faktor retensi dapat dihitung dengan Persamaan 2, di mana V_R adalah retensi volume analit (mL), V_0 adalah retensi volume fase gerak (mL), t_R adalah waktu retensi dalam menit, dan t_0 adalah waktu retensi analit yang tidak tertahan dalam menit.

2.11 Spektrofotometer Uv-Vis

Spektrofotometer merupakan instrumen penting dalam analisis kimia. Instrumen ini digunakan untuk menguji sampel tertentu yang berorientasi pada pengukuran kualitatif dan kuantitatif. Oleh karena itu instrumen ini penting digunakan pada sektor pendidikan, penelitian, maupun industri (Solvason dan Foley.2015).

Spektrofotometer UV-Vis menjadi salah satu instrumen yang dapat mendukung proses pembelajaran berbasis eksperimen, yang penting dalam analisis kimia. Instrumen ini digunakan untuk menguji sampel tertentu yang berorientasi pada analisis kualitatif dan kuantitatif pengukuran (Yohan *et al.*, 2018)

Spektrofotometri UV-Vis merupakan metode analisis yang menggunakan panjang gelombang UV dan Visible sebagai area serapan untuk mendeteksi senyawa. pada umumnya senyawa yang dapat diidentifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis adalah senyawa yang memiliki gugus kromofor dan gugus auksokrom. Pengujian dengan Spektrofotometer UV-Vis tergolong cepat jika dibandingkan dengan metode lain (Handoyo Sahumena *et al.*, 2020). Spektrofotometri UV-Vis dapat digunakan untuk informasi baik analisis kualitatif maupun analisis kuantitatif. Analisis kualitatif dapat digunakan untuk mengidentifikasi kualitas senyawa atau metabolitnya. Data yang dihasilkan oleh Spektrofotometer UV-Vis berupa panjang gelombang maksimal, intensitas, efek pH dan pelarut, sedangkan dalam analisis kuantitatif, suatu berkas radiasi dikenakan pada cuplikan (larutan sampel) dan intensitas sinar radiasi yang diteruskan diukur besarnya (Abriyani *et al.*, 2023).

2.11.1 Prinsip Kerja Spektrofotometri Uv-Vis

Prinsip kerja spektrofotometri UV-Vis (Ultra Violet-Visible) berdasar pada serapan cahaya, dimana atom dan molekul berinteraksi dengan cahaya (Iqbal, 2011). Gabungan antara prinsip spektrofotometri Ultraviolet dan visible disebut spektrofotometer Ultraviolet-visible (UV-Vis). Sumber UV dan visible adalah dua sumber sinar yang berbeda yang digunakan pada instrumen ini. Spektrofotometri UV-Vis berdasar pada hukum Lambert-Beer. Jika sinar monokromatik melewati suatu senyawa maka sebagian sinar akan diabsorpsi, sebagian dipantulkan dan sebagian lagi akan dipancarkan (Ahriani dkk., 2021). Cermin yang berputar pada bagian dalam spektrofotometer akan membagi sinar dari sumber cahaya menjadi dua (Sembiring *et al.*, 2019). Panjang gelombang pada daerah ultraviolet adalah

180 nm–380 nm, sedangkan pada daerah visible adalah 380 nm–780 nm (Warono dan Syamsudin. 2019).

Interaksi senyawa organik dengan sinar ultraviolet dan sinar tampak, dapat digunakan untuk menentukan struktur molekul senyawa organik. Bagian dari molekul yang paling cepat bereaksi dengan sinar tersebut adalah elektron-elektron ikatan dan elektron-elektron nonikatan (elektron bebas). Sinar ultralembayung dan sinar tampak merupakan energi, yang bila mengenai elektron-elektron tersebut, maka elektron akan tereksitasi dari keadaan dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi, eksitasi elektron-elektron ini, direkam dalam bentuk spektrum yang dinyatakan sebagai panjang gelombang dan absorbansi, sesuai dengan jenis elektron-elektron yang terdapat dalam molekul yang dianalisis. Makin mudah elektron-elektron bereksitasi makin besar panjang gelombang yang diabsorpsi, makin banyak elektron yang bereksitasi makin tinggi absorban (Suhartati.2017).

pada spektrofotometer UV-Vis ada beberapa istilah yang digunakan terkait dengan molekul, yaitu kromofor, auksokrom, efek batokromik atau pergeseran merah, efek hipokromik atau pergeseran biru, hipsokromik, dan hipokromik. Kromofor adalah molekul atau bagian molekul yang mengabsorpsi sinar dengan kuat di daerah UV-Vis, misalnya heksana, aseton, asetilen, benzena, karbonil, karbondioksida, karbonmonooksida, gas nitrogen. Auksokrom adalah gugus fungsi yang mengandung pasangan elektron bebas berikatan kovalen tunggal, yang terikat pada kromofor yang mengintensifkan absorpsi sinar UV-Vis pada kromofor tersebut, baik panjang gelombang maupun intensitasnya, misalnya gugus hidroksi, amina, halida, alkoksi (Suhartati.2017).

2.11.2 Hukum Lambert-Beer

Hukum Lambert-Beer yaitu sinar yang digunakan akan dianggap sebagai sinar dengan sinar panjang gelombang tunggal. Konsentrasi yang digunakan adalah konsentrasi larutan yang rendah karna jika tinggi akan mempengaruhi linearitas pada arbsorban. Menurut Wulandari dan Zulkifli, 2018. Hukum Lambert-Beer dapat dinyatakan dalam persamaan:

$$A=a \cdot c+b$$

Di mana:

A = absorbansi,

c = konsentrasi,

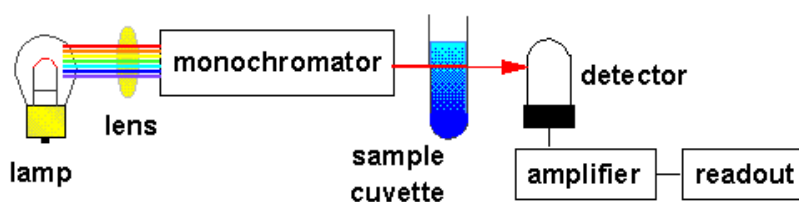
a = slope (kemiringan garis),

b = intercept.

Setelah kurva kalibrasi diperoleh, nilai absorbansi sampel yang tidak diketahui diukur pada λ maks. Nilai tersebut kemudian disubstitusikan ke dalam persamaan regresi untuk menghitung konsentrasi senyawa dalam sampel, Nilai tersebut kemudian disubstitusikan ke dalam persamaan regresi untuk menghitung konsentrasi senyawa dalam sampel (Wulandari dan Zulkifli, 2018).

2.11.3 Komponen Spektrofotometer Uv-Vis

Spektrofotometer UV-Vis terdiri dari beberapa komponen utama yang bekerja bersama untuk mengukur absorbansi atau transmitansi cahaya oleh sampel pada rentang panjang gelombang ultraviolet (UV) dan visible (Vis). Dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Komponen Spektrofotometer UV-Vis (Jones dkk,2016).

Menurut (Angaini dan Yanti, 2021) Spektrofotometer Uv-Vis menggunakan interaksi absorpsi. Secara sederhana, spektrofotometer Uv-Vis terdiri dari

1. Sumber Cahaya

Menghasilkan radiasi UV (lampu deuterium/hidrogen, 190–400 nm) dan cahaya tampak (lampu tungsten/wolfram, 350–700 nm), harus stabil dan kontinu untuk akurasi pengukuran.

2. Monokromator

Mengurai cahaya polikromatis menjadi monokromatis menggunakan prisma atau kisi difraksi serta memiliki celah optik (slit) untuk mengontrol intensitas cahaya yang masuk.

3. Sel Sampel (Kuvet)

Terbuat dari kuarsa (untuk UV) atau gelas/plastik (untuk visible) agar tidak menyerap cahaya. Berbentuk kotak atau silinder dengan ketebalan standar (biasanya 1 cm).

4. Detektor

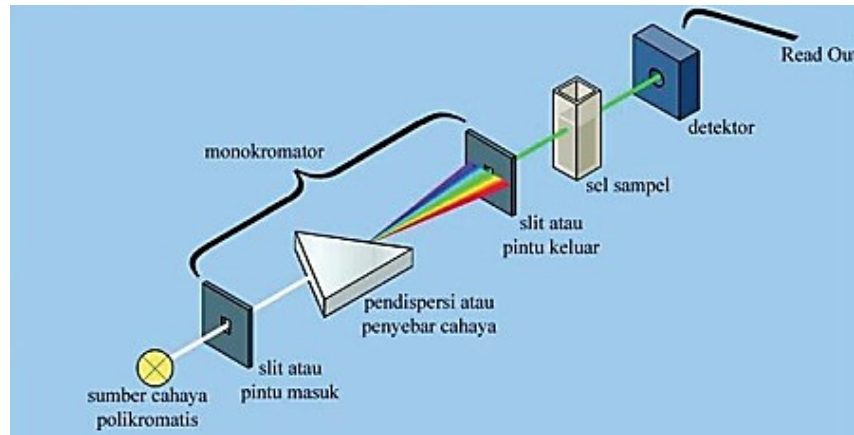
Mengubah energi cahaya menjadi sinyal listrik (misal: fototube, fotodioda, atau photomultiplier). Terintegrasi dengan sistem pembacaan (readout) untuk menampilkan hasil.

5. Sistem Pembacaan (Readout)

Menampilkan nilai absorbansi atau transmitansi dalam bentuk digital atau grafik

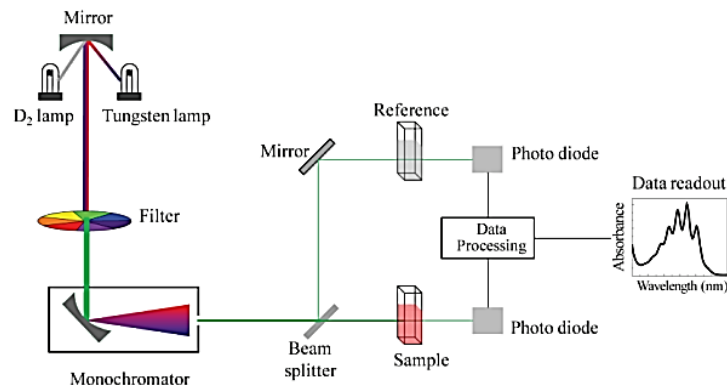
2.11.4 Tipe-Tipe Spektrofotometer Uv-Vis

pada umumnya terdapat dua tipe instrumen spektrofotometer, yaitu single-beam dan double-beam. Single-beam instrument Gambar 10, dapat digunakan untuk kuantitatif dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tunggal. Single-beam instrument mempunyai beberapa keuntungan yaitu sederhana, harganya murah, dan mengurangi biaya yang ada merupakan keuntungan yang nyata. Beberapa instrumen menghasilkan single-beam instrument untuk pengukuran sinar ultra violet dan sinar tampak. Panjang gelombang paling rendah adalah 190 sampai 210 nm dan paling tinggi adalah 800 sampai 1000 nm (Skoog, DA, 1996). Doublebeam dibuat untuk digunakan pada panjang gelombang 190 sampai 750 nm. Double-beam instrument (Gambar 11) mempunyai dua sinar yang dibentuk oleh potongan cermin yang berbentuk V yang disebut pemecah sinar. Sinar pertama melewati larutan blanko dan sinar kedua secara serentak melewati sampel (Skoog, DA, 1996).



Gambar 10. Spektrofotometer Uv-vis Single Beam (Analitika, 2022)

Sumber sinar polikromatis, untuk sinar UV adalah lampu deuterium, sedangkan sinar Visibel atau sinar tampak adalah lampu wolfram. Monokromator pada spektrometer UV-Vis digunakan lensa prisma dan filter optik. Sel sampel berupa kuvet yang terbuat dari kuarsa atau gelas dengan lebar yang bervariasi. Detektor berupa detektor foto atau detektor panas atau detektor dioda foto, berfungsi menangkap cahaya yang diteruskan dari sampel dan mengubahnya menjadi arus listrik. Diagram spektrofotometer UV-Vis (*Double-beam*) dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. Spektrofotometer Uv-vis Double Beam (Sa'diyah, 2018)

III. METODE PERCOBAAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2024 sampai Maret 2025. Sampel *Crude Palm Oil* didapatkan dari pabrik pengolahan sawit Metro, Preparasi sampel dilakukan di laboratorium Kimia Analitik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung, analisis Spektrofotometer UV-Vis dilakukan di Instrumentasi Kimia Analitik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung dan analisis *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dilakukan di Institut Teknologi Sumatera

3.2 Alat dan Bahan

Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur, erlenmeyer, gelas beaker, labu ukur, labu bundar, pipet volume, corong pisah, thermometer, chamber, plat KLT besi, pipa kapiler, klem, statif, neraca analitik (AND), magnetit stirrer hot plate (ARGO LAB M3-D), *rotary evaporator* Buchii/R210, kromatografi kolom, lampu UV Kohler/SN402006, Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1780) dan *High Performance Liquid Chromatography* (Shimadzu LabSolutions).

Adapun bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Sampel *Crude Palm Oil* (CPO) dari Metro Lampung, etanol (C_2H_5OH), natrium hidroksida (NaOH), *butylated hydroxytoluene* (BHT), natrium klorida (NaCl), metanol (MeOH), n-Heksan, 1% 2-propanol, silika gel 60 ukuran (0,063 – 0,200 mm) atau

(70-230 mesh), etil asetat (EtOAc), dietil eter, aseton, asetonitril, asam sulfat (H_2SO_4), asam asetat glasial (HOAc), serium sulfat, dan aquades.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Saponifikasi

Crude Palm Oil ditimbang sebanyak 10 g dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL kemudian ditambahkan 10 mL etanol (95%), 30 mL NaOH 0,25 M, dan 25 mL *butylated hydroxytoluene* (BHT) 0,3 M lalu ditutup dengan aluminium foil, setelah itu dipanaskan di atas penangas air pada suhu 40 °C- 60 °C sambil diaduk selama 30 menit. Setelah itu didinginkan pada suhu 5-10 °C, kemudian ditambahkan larutan NaCl 0,02 M sebanyak 75 mL (Furi et al., 2022)

Hasilnya dimasukkan ke dalam corong pisah dan dibiarkan hingga terbentuk tiga lapisan, bagian atas adalah fraksi minyak yang tak tersabunkan, bagian tengah adalah fraksi minyak yang tersabunkan, dan bagian bawah adalah fraksi air. Hasil reaksi saponifikasi dilakukan optimasi ekstraksi vitamin E (*tocotrienols*) dengan cara dipisahkan fraksi yang tak tersabunkan. Selanjutnya, fraksi minyak yang tak tersabunkan ditambahkan dengan 35 mL metanol dan didiamkan hingga terbagi menjadi dua fraksi. Bagian atas diambil ditambahkan dengan 10 mL n-heksana yang mengandung 1% 2-propanol. Fraksi non polar yang larut n-heksana (bagian atas) diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40 °C untuk dihilangkan n-heksananya (Furi et al., 2022)

3.3.2 Kromatografi Kolom

Sampel hasil saponifikasi dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom (diameter 0,5 cm x panjang 14,7 cm). Fase diam yang digunakan adalah silica gel 60 dengan ukuran partikel (0,063-0,200 mm) yang telah diaktifkan dalam heksana 100% selama semalaman. Sebanyak 0,5 g sampel dimasukkan ke dalam

kromatografi kolom yang telah diisi silica gel 60, sedangkan fase gerak pada awalnya dielusi dengan heksana 100% selanjutnya dielusi lagi dengan heksana: dietil eter (95% :5% v/v). Sampel di tampung berdasarkan perubahan warna larutan dari kuning menjadi bening (Lodu dan Karwur, 2017)

3.3.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sampel hasil kolom kromatografi diaplikasikan pada pelat KLT dengan fasa diam silika. Analisis kromatografi lapis tipis dilakukan dengan bantuan pipa kapiler kaca dengan penotolan 5-10 kali. Pelat KLT dimasukkan ke dalam ruang kaca (chamber) dan dielusi dengan fase gerak. Fase gerak yang digunakan adalah heksan dan etil asetat dengan perbandingan 7:3. Visualisasi pita yang dihasilkan dilakukan dengan sinar UV dengan panjang gelombang pendek 254 nm dan panjang gelombang panjang 366 nm. Untuk identifikasi terpenoid digunakan reagen *liebermann–burchard* yang dibuat dengan mencampurkan dengan H_2SO_4 ditambah dengan asam asetat glasial. (Albuquerque et al., 2015).

3.4 Analisis Spektrofotometer UV-Vis

3.4.1 Penetapan Gelombang Maksimum

Larutan standar *tocotrienols* 0,2 g dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan dilarutkan dengan heksan kemudian ditambahkan heksan hingga tanda batas menghasilkan larutan induk baku 2000 ppm. Larutan induk baku 2000 ppm diambil 0,5 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL menghasilkan larutan standar 100 ppm. Larutan di ukur dengan spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 200-350 nm. Perlakuan sama untuk mengukur panjang gelombang maksimum sampel *tocotrienols*. Untuk mengukur λ_{maks} sampel, 0,14 g sample dilarutkan dengan heksan dan dimasukan dalam labu ukur 10 mL. Larutan di ukur dengan spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 200-350 nm

3.4.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi

Pembuatan kurva kalibrasi standar *tocotrienols* komersil, larutan baku *tocotrienols* dengan konsentrasi 100%, dibuat menjadi larutan induk baku 2000 ppm lalu diencerkan dengan heksan menjadi larutan induk baku 100 ppm. Selanjutnya, dibuat deret konsentrasi standar kurva kalibrasi dengan variasi konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 80 ppm, dan 100 ppm. Lalu diukur absorbansi dari larutan standar menggunakan spektrofotometri uv-vis (Furi et al., 2022).

3.4.3 Penentuan Konsentrasi Sampel

Sampel *tocotrienols* 0,14 g terlebih dahulu dilarutkan dalam pelarut organik heksana 1mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur hingga mencapai volume akhir sebesar 10 mL guna memperoleh homogenitas larutan yang optimal. Larutan tersebut selanjutnya dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum serapan, yaitu 294 nm, yang merupakan karakteristik spesifik dari senyawa *tocotrienols* dalam pelarut nonpolar. Untuk memperoleh hubungan kuantitatif antara konsentrasi dan absorbansi, dilakukan pengukuran terhadap larutan standar dengan konsentrasi (20, 40, 60, 80, dan 100 ppm), sehingga diperoleh kurva kalibrasi yang merepresentasikan hubungan linier antara kedua parameter tersebut. Nilai absorbansi dari sampel yang terukur kemudian dielaborasi ke dalam persamaan tersebut untuk menentukan konsentrasi *tocotrienols* yang dinyatakan dalam satuan ppm.

3.5 Analisis High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

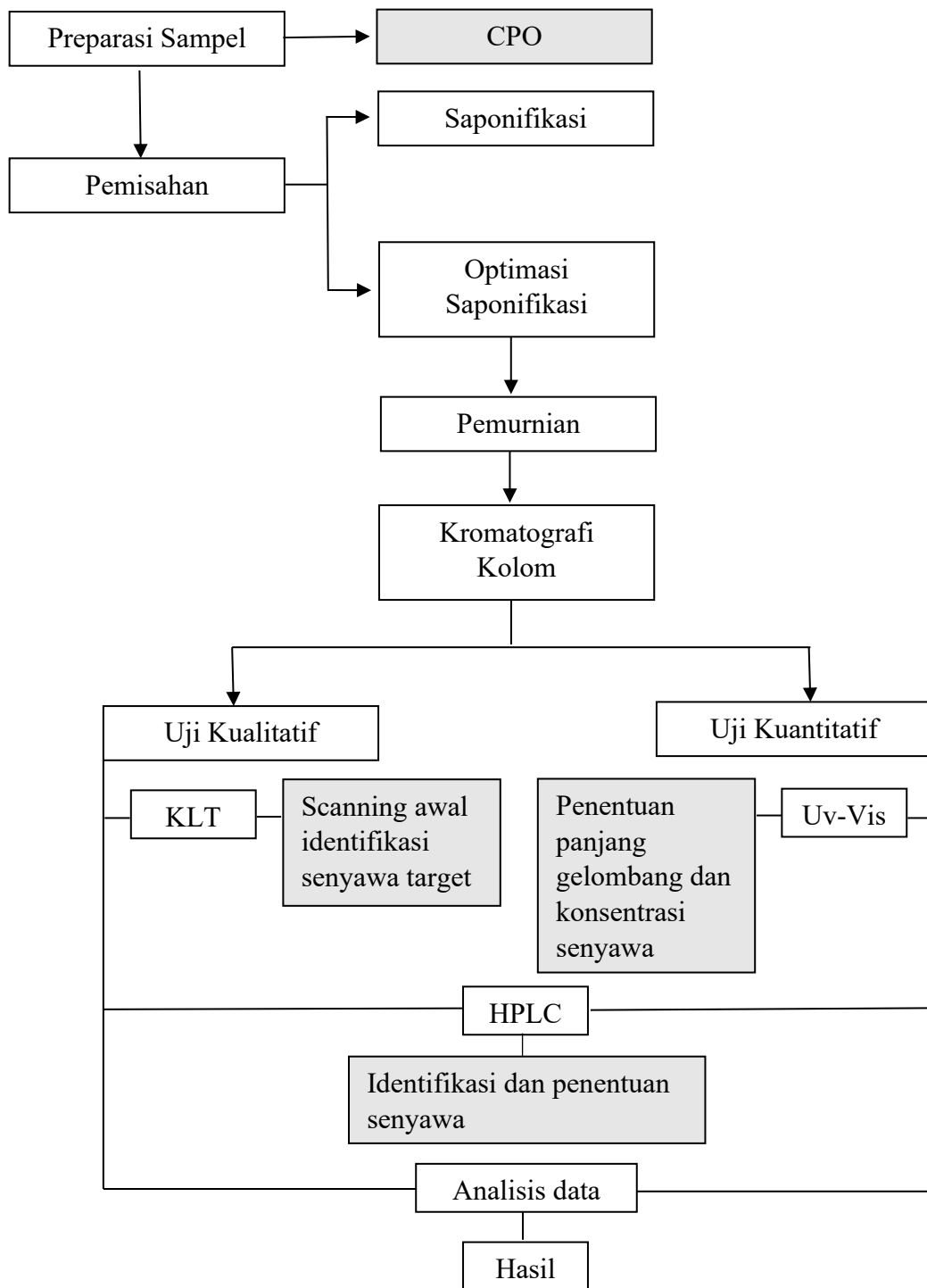
3.5.1 Identifikasi Kualitatif dan Kuantitatif

Sampel CPO yang telah tersaponifikasi dan pemurnian fraksi kolom yang positif terpenoid (fraksi 5 dan 6) dilarutkan dalam 2 mL fase gerak, yang terdiri dari 85%

metanol, 7,5% etanol, dan 7,5% asetonitril. Sampel (20 μ L) disuntikkan ke dalam kolom analitis Kinetex™ C18 (5 μ m, 150 $\times$ 4,6 mm) (Phenomenex Inc., Torrance, CA). Laju alir fase gerak adalah 1 mL/menit. Analit dideteksi secara bersamaan pada detektor PDA λ 294 nm (MICHA, 2017). Sampel dinyatakan mengandung vitamin E (*tocotrienols*) dengan membandingkan waktu retensi sampel dan *tocotrienols*. Diamati luas area dan dibandingkan antara kromatogram hasil *tocotrienols* komersil dan kromatogram larutan sampel dengan waktu retensi *tocotrienols* komersil. Selanjutnya perhitungan kuantitatif dilakukan berdasarkan luas area puncak pada kromatogram. Konsentrasi senyawa dalam sampel dihitung menggunakan perbandingan luas area puncak antara sampel dan standar.

3.6 Diagram Alir

Secara menyeluruh alur penelitian ini dapat digambarkan pada diagram penelitian yang ditunjukkan pada Gambar 12.



Gambar 12. Diagram Alir Penelitian

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Pemisahan dan pemurnian *tocotrienols* dari *crude palm oil* (CPO) berhasil dilakukan dengan metode kromatografi kolom menggunakan eluen heksan: dietil eter 95%:5%.
2. Hasil kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan bahwa sampel *tocotrienols* memiliki nilai R_f yang sama dengan *tocotrienols rich fractions*.
3. Spektrofotometri UV-Vis menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum dari sampel dan standar *tocotrienols* beradapada rentang yang hampir sama, yaitu 294,6 nm untuk standar dan 295,7 nm untuk sampel.
4. Analisis kuantitatif menggunakan spektrofotometri UV-Vis menunjukkan bahwa kadar *tocotrienols* dalam sampel sebesar 450,630 ppm.
5. Analisis dengan metode *high performance liquid chromatography* (HPLC) menunjukkan adanya perbedaan waktu retensi antara standar dan sampel, yaitupada 3,6 menit untuk sampel dan 3,7 untuk standar. Puncak lainpada waktu retensi 3,9 muncul sebagai γ -*tocotrienols*. Konsentrasi *tocotrienols* dalam sampel yang diperoleh melalui metode ini sebesar 116,53 ppm.
6. Rendementasi sample *tocotrienols* pada metode saponifikasi sebesar 5%, pada kolom kromatografi sebesar 28%, dan nilai rendemen akhir *tocotrienols* didapatkan sebesar 0,045%.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka untuk penelitian selanjutnya disarankan melakukan optimasi lebih lanjut pada proses pemisahan (saponifikasi) untuk mendapatkan rendementasi yang tinggi serta dalam pemilihan jenis dan komposisi eluen pada kromatografi kolom, agar hasil pemurnian *tocotrienols* menjadi lebih maksimal dan murni.

DAFTAR PUSTAKA

- Abriyani, M., Krisna T. W., Fidya S., Nadya A., dan Annisa R. S. 2023. Metode Spektrofotometer UV-Vis dalam Analisis Penentuan Kadar Vitamin C pada Sampel Yang Akan Diuji. *Jurnal Pendidikan dan Konseling*. 5: 1610-1613.
- Adi, P. 2011. Kaya Dengan Bertani Kelapa Sawit. Pustaka Baru Press. Yogyakarta.
- Ahmadi, K., dan Estiasih, T. 2011. Low Temperature Solvent Crystallization in Tocotrienol Containing Vitamin e Rich Fraction Preparation from Palm Fatty Acid. *AGITECH*. 31(3).
- Ahriani. 2021. Analisis Nilai Absorbansi pada Penentuan Kadar Flavonoid Daun Jarak Merah (*Jatropha Gossypifolia L.*). Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.
- Ahsan, H., Ahad, A., Iqbal, J., dan Siddiqui, W. A. 2014. Pharmacological Potential of *Tocotrienols*: Department of Biochemistry. Jamia Hamdard Hamdard University, New Delhi.
- Ahsan, H., Ahad, A., dan Siddiqui, W. A. 2015. A Review of Characterization of *Tocotrienols* from Plant Oils and Foods. *Journal of Chemical Biology*, 8(2): 4.
- Albuquerque, C. L. C., Ádina, L. S., and Angela, A. M. 2015. Thin Layer Chromatographic Analysis of Annatto Extracts Obtained Using Supercritical Fluid. *Food and Public Health*. 5(4): 127-137.
- Amelia, E., R., Rosdanelli H., dan Irvan. 2023. Pemanfaatan Tandan Pisang Kepok Sebagai Sumber Alkali pada Pembuatan Sabun Cair. *Jurnal Teknik Kimia USU*, 12(1): 18–23.
- Amin, S., Amir, M., dan Slamet, I. 2016. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Untuk Analisis Senyawa Diuretik Yang Disalahgunakan Sebagai Doping Dalam Urin. *Jurnal Sains Keolahragaan dan Kesehatan*. 1(2): 5-7.

- Analitika. 2022. Spektrofotometer UV-Vis: Fungsi, Prinsip Kerja, dan Cara Kerjanya. Diakses pada 12 juni 2025. <https://lsi.fleischhacker-asia.biz/en/spektrofotometer-uv-vis/>
- Andulaai, A. M., Ruslan, R, Y, S, H., dan Puspitasari DJ. 2017. Studi Perbandingan Analisis Vitamin E Minyak Sawit Merah Tersaponifikasi Antara Metode Spektrofotometer Uv-Vis dan KCKT. *Kovalen*. 3(1): 50.
- Angaini, N. 2020, Optimasi Penggunaan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Untuk Analisis Asam Askorbat Guna Menunjang Kegiatan Praktikum Bioteknologi Kelautan. *Jurnal Penelitian Sains*, 22(2): 69-75.
- Angaini, N dan Yanti F. 2021. Penggunaan Spektrofotometer UV-Vis Untuk Analisis Nutrien Fosfat pada Sedimen dalam Rangka Pengembangan Modul Praktikum Oseanografi Kimia. *Jurnal Penelitian Sains* 23 (2): 78-83.
- Ardianingsih, R. 2009. Penggunaan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Dalam Proses Analisa Deteksi Ion. Dirgantara Pusterapan, Lapan.
- Bakewell. S. P. 2023. *Elaeis guineensis* (African oil palm). Cabi Compendium NC State University Libraries.
- Boateng, L., Ansong, R., Owusu, W. B., dan Steiner-asiedu, M. 2016. Coconut Oil and Palm Oils Role in Nutrition, Health and National Development: A review. *Ghana Med J*. 50(3): 189-196.
- Bohm, V. 2018. Vitamin E. *Molecul. Jena Germany Volker.Boehm*. 7(2): 11–12.
- Darmawansyah, Nurlansi, dan Haeruddin. 2023. Pemisahan Senyawa Terpenoid Ekstrak N-Heksan Daun Kaembu-Embu (*Blumea balsamifera*) Menggunakan Kromatografi Kolom Gavitasi. *Sains: Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia*. 12(1): 6.
- Depkes RI. 1995. Farmakope Indonesia Edisi Iv. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Dwiarso, R. 2017. Metode Kromatografi: Prinsip Dasar, Praktikum dan Pendekatan Pembelajaran Kromatografi. Deepublish, Yogyakarta.
- Fajriaty, I, Hariyanto, Andres, dan Risky S. 2018. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis dari Ekstrak Etanol Daun Bintangur (*Calophyllum soulattri Burm. F.*). *Jurnal Pendidikan Informatika dan Sains* 7(1): 20.
- Fasya, A.G, Tyas A.P, dan Mubarakah F.A. 2018. Variasi Diameter Kolom dan Rasio Sampel-Silikapada Isolasi Steroid Dan Triterpenoid Alga Merah

- Euclidean Cottonii Dengan Kromatografi Kolom Basah. *Journal Of Chemistry*, 6(2): 57-64.
- Fayyad, A. A dan Nazzal. S. 2017. Extraction of Vitamin E Isomers From Palm Oil: Methodology, Characterization, And In Vitro Anti-Tumor Activity. *J Am Oil Chem* 94(9): 1209–1217.
- Forestryana, D., Arnida. 2020. Phytochemical Screenings and Thin Layer Chromatography Analysis of Ethanol Extract Jeruju Leaf (*Hydrolea Spinosa L*). *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari* 11(2): 113-124.
- Furi, M., Rahma, D., dan Vincent, T. 2022. Determination of Vitamin E Levels In N-Hexane Extract of Palm Fruits (*Elaeis guineensis Jacq*) and CPO (*Crude Palm Oil*) using HPLC Method). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 49 -54
- Gandjar, I. G., dan Rohman A. 2007. Kimia Analisis Farmasi. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Goon, J. A., Nor-Azman, N, H, E., Ghani A. S. M., Hamid A., and Ngah, W, Z. 2017. Comparing Palm Oil Tocotrienol Rich Fraction with Atocopherol Supplementation on Oxidative Stress in Healthy Older Adults. *Clinical nutrition ESPEN* .2504 - 4577.
- Gupta, E. 2021. β -Sitosterol: Predominant Phytosterol of Therapeutic Potential. *Journal MDPI*. 1(5):1-4.
- Halodin, M, M., Skeeget, Z, K., and Beruna. 2001. High Pressure Extraction of Vitamin E Rich Oil from Silyburn Macianum. *Food Chem* 74(3): 355-364.
- Handoyo, S, M., Ruslin, R., Asriyanti, A., dan Nurrohwindi D, E. 2020. Identifikasi Jamu Yang Beredar Di Kota Kendari Menggunakan Metode Spektrofotometer Uv-Vis. *Journal Syifa Sciences and Clinical Research*, 2(2): 65–72.
- Han, N. M., May, C. Y., Ngan, M. A., Hock, C. C., and Hashim, M. A. 2004 Isolation of Palm Tocols Using Supercritical Fluid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science* 42: 1-4.
- Hargono, J. 1986. Efek Samping Obat dari Bahan Alam Lebih Kecil Daripada Efek Samping Obat Kimia Murni, Cermin Dunia Farmasi.
- Harikiedua, S. D., dan Vika.H. T. 2018. Profil Asam Lemak Minyak Sawit Setelah Proses Penggorengan Ikan. *Jurnal Industri dan Perikanan*.6(1): 30–32.
- Harvey, D. 2000. Modern Analytic Chemistry Spectroscopy. McGaw-Hill Companies. United States of America

- Hasibuan, R., Fransiska A, dan Rahmad P, R. 2019. Effect of Temperature Reaction, Speed of Reaction and Reaction Time in Making Soap from Coconut Oil (*Cocos nucifera L.*). *Jurnal Teknik Kimia USU*, 8(1): 13.
- Held. D dan Gores. D. 2019. Tips and tricks GPC/SEC: System Peaks or Ghost Peaks in GPC/SEC. *The Column*, 15(2): 23.
- Hermin. 2015. Metode Purifikasi Vitamin E dari Minyak Kelapa Sawit. Universitas Brawijaya.
- Herlina, N.2009. Minyak dan lemak. UI press, Jakarta.
- Hilma, R., Anggita, A. F., dan Ikhtiarudin, I. 2018. Ekstraksi dan Optimasi Vitamin E dari Fraksi Non-Polar Crude Palm Oil (CPO). *photon: Jurnal Sain Dan Kesehatan*, 9(1): 169–176.
- Iqtiar, M. D. 2021. Unvelling the Power of High-Performance Liquid Chromatography: Techniques, Applications, And Innovations. *European Journal of Advance in Engineering and Technology*, 8(9): 79-84.
- Jalaluddin., Amri., A, dan Sari., N. 2018. Pemanfaatan Minyak Sereh (*cymbopogon nardus l*) Sebagai Antioksidan pada Sabun Mandipadat. *Jurnal Teknologi Kimia Unimal* 7(1): 52-60.
- Jilani, R., dan Iqbal, M. P. 2018. Vitamin E Deficiency in South Asian Population and the Therapeutic Use of Alpha-Tocopherol (vitamin e) for Correction of Anemia. *Pak J Med Sci*.34(6): 1571-1575.
- Johnson., dan Edward L. 1991. Dasar Kromatografi Cair. Bandung: ITB Bandung.
- Jondra, A., Azhari., Sulhatun, dan Zulnazri, M. J. 2022. Penurunan Kadar FFA (free fatty acid) pada CPO dengan Menggunakan Adsorben dari Karbon Aktif Cangkang Buah Ketapang. *Chemical Enggnering Journal Storage*. 7(5): 99-100.
- Jones, E., Sam, M., and Sittampalam, S.G. 2016. Basics of Assay Equipment and Instrumentation for High Throughput Screening. National Center for Advancing Translational Sciences.
- Kordsmeier, M., Howard, L. R., Brownmiller, C., and Proctor, A. 2015. Isolation of Gamma and Delta *Tocotrienols* from Rice Bran Oil Deodorizer Distillate Using Flash Chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(9): 1243–1252.
- Kusuma, A. S. W., dan Ismanto, R. M. H. 2016. Penggunaan Instrumen Highperformance Liquid Chromatography Sebagai Metode Penentuan Kadar Kapsaisin pada Bumbu Masak Kemasan “Bumbu Marinade Ayam Special” Merek Sasa. *Jurnal Farmaka*, 14(2): 41–46.

- Lampi, A.M., Kmal-Eldin., and Piironen, V., 2002. Functional Foods and Nutraceutical Series. In: Functional Foods Biochemical and Processing Aspects. Second Ed. CRC Press, London.
- Lodu, W., dan Karwur, F. F. 2017. Pemisahan dan Identifikasi Isomer *Tocotrienols* Dari *Tocotrienols* Rich Fraction (trf). *Biology Education Conference*. 14 (1): 532-535.
- Martha, S. A., Karwur, F. F., dan Rondonuwu, F. S. 2012. Metode Purifikasi Vitamin E dari Minyak Kelapa Sawit. Inproceeding Biology Education Conference: *Biology, Science, Enviromental, and Learning*. 10(1).
- Maarasyid, C. and Idayu, M.E. S. 2014. Potential Source and Extraction of Vitamin e from Palm-Based Oils: A Review. *Jurnal Teknologi*. 4: 43–50.
- Mahmudi dan Wahyuni D. 2018. Pengaruh Beberapa Komposisi Alkali dan Serbuk Jahe Merah (*Zingiber Officinale Roch. Var. Rubbrum*) Terhadap Kualitas Sabunpadat Berbahan Virgin Coconut Oil. *Journal of Animal Science and Agonomy Panca Bud*. 1(3).
- Mei, N., Yuen, C. 2012. Analisis Kromatografi *Tocoferol* dan *Tocotrienols* Dalam Minyak Sawit. *Journal of Chromatographic Science*. 283–286.
- Mirawati, D. 2022. Optimasi Pemisahan Senyawa Fenolik dari Daun Sirsak (*Annona muricata L*) Menggunakan Kromatografi Lapisan Tipis (KLT) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). *Jurnal Kimia Analisis*, 10(1), 1-10.
- Morad, N, A., Aziz., and Rohani. 2006. Process Design in Degumming and Bleaching of Palm Oil. Centre of Lipids Engineering and Apllied Research (CLEAR). *Malaysia: Universiti Teknologi Malaysia*.
- Mubarok Fithurul M. 2021. HPLC prinsip dan cara kerja, Diakses pada 17 juni 2025. <https://farmasiindustri.com/industri/prinsip-dan-cara-kerja-hplc.html>.
- Musalmah, M., Nizam, M.Y., Fairuz, A.H., Aini, A.H.N., Azian, A.I., Gapor, M.T. dan Wan-Ngah, W.Z. 2005. Comparative Effects of Palm Vitamin E and a Tocopherol on Healing and Wound Tissue Antioxidant Enzyme Levels in Diabetic Rats. *Lipids* 40: 575-580.
- Oktarianti, V., Dewi, E., dan Junaidi, R. 2022. Pemurnian Minyak Sawit Merah Menggunakan Filter Bentonit dan Membran Keramik. *Jurnal Pendidikan Dan Teknologi Indonesia*, 2(10), 407–412.
- Pahan, I. 2012. Panduan Lengkap Kelapa Sawit, Manajemen Agibisnis dari Hulu ke Hilir. Penebar Swadaya. Jakarta.

- Perricone, N. 2002. The Perricone Prescription. Penerjemah kristin A S dan Chairul. W. F. Jakarta: serambi. 144-146
- Rahmawati.E dan Maisari U. 2022. Analysis Of Free Fatty Acid Content and Water Content in Crude Palm Oil in The Laboratory of PT. Bina Pitri Jaya Mill Analisis Kadar Asam Lemak Bebas dan Kadar Airpada Crude Palm Oil. *IJCR Indonesian Journal of Chemical Research*. 7(2): 26–35.
- Rizvi, S., Raza, S. T., Ahmed, F., Ahmad, A., Abbas, S., dan Mahdi, F. 2014. The Role of vVitamin e in Human health and Some Diseases', Sultan Qaboos University Medical Journal. PMID: PMC3997530. 157–165.
- Ronald.E., dan Junsoo.L. 2004. Vitamin E Food Chemistry, Composition, and Analysis. CRC Press. Prancis.
- Rosydiati., dan Ela.K. S. 2019. Performance Liquid Chromatography (HPLC) Terhadap (Characterization of Peak Chromatogam in Hplc Influenced by Differences of Mobile Phase, Flow Rate, and Addition of Acid in. *KANDAGA*. 1(2)l
- Sa'diyah, A., Alfianto, E., Huda, N. M., dan Dyeka. A. Sp. 2018. Potensi rumput laut gacilaria sp sebagai bahan alternatif dye sensitized solar cell (DSSC). *Jurnal Teknologi Maritim*. 2(04).
- Salehi, B., Quispe, C., Shari, J., dan Cruz-martins, N. 2021. Phytosterols: From Preclinical Evidence to Potential Clinical Applications. *Front Pharmacol*. 11:59
- Seftiono, H. 2018. Karakteristik Fisik Dan Kimia Minyak Goreng Sawit Hasil Proses Penggorengan dengan Metode Deep-Fat. *Jurnal teknologi* 10(1), 59-66.
- Sembiring, T., Dayana, I., dan Rianna. M. 2019. Alat Penguji Material. Guepedia. Bogor:
- Scott, R. P. W. 2005. ESSENTIAL OILS. Encyclopedia of Analytical Science 2nd edition. Elsevier. UK
- Sidik. 2024. Utilization of B-Carotene And A-Tocopherol in Red Palm Oil as a Vitamin Fortification Ingedient for Functional Products - Systematic Review. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia*. 16(01).
- Simanjuntak, R. 2018. Penetapan Kadar Asam Lemak Bebaspada Sabun Cair Merek "LX" dengan Metode Titrasi Asidimetri. *Jurnal Ilmiah Kohesi*, 2(4), 59–71.
- Sinaga, A.G.S., Siahaan, D. 2015. Characterization and Antioxidant Activity of Non-Polar Extractfrom Crude Palm Oil and Palm Methyl Ester. *International*

Journal of ChemTech Research, Vol.8(4). pp 1810-1816

- Singanusong, R., dan Garba, U. 2019. Micronutrients in Rice Bran Oil. In Rice Bran and Rice Bran Oil. Elsevier Inc.
- Skoog, D.A. 1996, Fundamental of Analytic Chemistry, Seventh edition. Saunders College Publishing. USA:
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., and Dolan, J. W. 2010. Introduction to Modern Liquid Chromatography (3th Editio). John Wiley and Sons, Inc. Canada.
- Solvason, G.Ó. dan Foley, J.T. 2015. Low-cost spectrometer for icelandic chemistry education. *PROCEDIA CIRP*. 34: 156-161.
- Suhartati, Tati 2017. Dasar-dasar Spektrofotometer UV-VIS dan Spektrometri Massa untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik. 1, 1 (1). AURA, Lampung. ISBN 978-602-6565-39-6
- Susanti, M. dan Dachriyanus. (2010). Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. LPTIK Universitas Andalas. Sumatera Barat.
- Susilo.B., Siwindarto., Ponco., dan Hawa, L. C. 2002. Model Kavitasi Irradiasi Gelombang Ultrasonik pada Transesterifikasi Minyak Tanaman Menjadi Biodiesel. *Jurnal Teknik Industri*, 21(1), 24-33.
- Sutiah, S., Firdausi, K.S. dan Budi, W.S. 2008. Studi Kualitas Minyak Goreng dengan Parameter Viskositas dan Indeks Bias. *BERKALA FISIKA*, 11(2): 53-58.
- Suwardi, F., dan Noer, S. 2020. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Bawang Merah (*Allium ascalonicum* L). *SINASIS*, 1(1), pp. 117-120.
- Swigło, A. G., Sikorska, E., Khmelinskii, I., Sikorski, M. (2007) Tocopherol Content in Edible Plant Oil. *Journal Food Nutr. Sci.* 57 (4A), 157-161
- Syahmani, Leny, Iriani R, Elfa N. 2017. Penggunaan Kitin Sebagai Alternatif Fase Diam Kromatografi Lapis Tipis dalam Praktikum Kimia Organik. *Jurnal Vidya Karya* (32), 1.
- Wahyuni, I., Amruzi.M., Andi.M, dan Zulkifli. 2017. The Determinan of comercialization of Household Farmer Rice Tidal Land in Tanjung Jabung Timur District, Jambi Provincy. *International Journal of Scientific and Research Publication*. 20(3), 61-71.
- Warono Dwi dan Syamsudin. 2013. Unjuk Kerja Spektrofotometer Untuk Analisa Zat Aktif Ketoprofen. *Jurnal Konversi*. 2(1).

- Wulandari, D. A dan Yulkifli. 2018. Studi Awal Rancang Bangun Colorimeter Sebagai Pendeteksipada Pewarna Makanan Menggunakan Sensor Photodiode. *Pillar of Physics*, 11(2), 81 – 87.
- Yohan, Y., Astuti, F., dan Wicaksana, A. 2018. Pembuatan Spektrofotometer Edukasi Untuk Analisis Senyawa Pewarna Makanan. *Chimica et Natura Acta*, 6(3)