

ELUSIDASI STRUKTUR ISOLAT SKUALENA DARI IKAN HIU CUCUT BOTOL (*Centrophorus sp*)

Aniek Setiya Budiadin

Bagian Ilmu Biomedik Farmasi, Fakultas Farmasi & Laboratorium Dasar Bersama Unair

ABSTRACT

The main source of squalene was liver oil of shark. Producing of squalene this oil could be separated from other components inside. The research obtained that the value of squalene was $75.83 \pm 1.14\%$. To discover the purification and safety to consume squalene which had been isolated from oil of the liver's shark cucut botol ' was used a method which available in AOAC, therefore that could be done elucidation of the structure of isolate with any instruments such as KLT; FTIR; GC; GC-MS; and NMR. Structure elucidation of isolate compare with standard of squalene had result as follows: a. KLT: Rf isolate = 0.457; Rf standard = 0,457; b. FTIR = 2980–2850 CH of methyl and methylene; 1668.58 & 1446.74 a double chain of carbon (C=C); 1381.16 & 835.25 = branch chain that all for isolate was the same with standard; GC tR = 9.065 minute of isolate and standard was 9.124 minutes; GC-MS the main fraction with mass 69 was one unit of isoprene (C₅H₈); the value of proton NMR ($\delta = \text{ppm}$) were 1.601 & 1.674; 2.016; 5.150 & 5.155 for isolate; the standard were 1.599 & 1.670; 2.016; 5.155. The result of elucidation structure could be concluded that the isolate was the same with the squalene standard. Therefore, isolate could be able to consume safety as natural health food for all consumers because it had already pure and free from other compound such as cholesterol.

Key words: squalene, AOAC, KLT, GC-MS, NMR, FTIR; liver oil of shark

PENDAHULUAN

Akhir-akhir ini penggunaan skualena di masyarakat sebagai makanan sehat alami (*natural health food*) dan sebagai pelindung kulit dalam kosmetik semakin meningkat karena skualena dipercaya bahwa mampu mencegah dan menyembuhkan beberapa penyakit antara lain liver, kencing manis, dan kanker serta meningkatkan ketahanan daya tahan tubuh, menjaga kulit dari sengatan sinar matahari dan menjaga kelembapan kulit (Budiarso, 1992, Desai *et al.*, 1996)

Skualena tidak dapat disintesis di luar tubuh makhluk hidup, senyawa tersebut terdapat tersebar di semua organ dan jaringan dengan berbagai fungsi (Budiarso, 1992). Sumber utamanya adalah minyak ikan dari hati ikan hiu cucut botol yang mengandung skualena antara 70 sampai 80% (Andiyany, 1995; Retnowati, 1994; Suprayitno, 1995)

Ikan tersebut banyak ditangkap oleh para nelayan daerah Sendang Biru Malang Selatan. Mereka mengekstraksi minyak hati ikan hiu cucut botol secara tradisional dengan cara memanaskan hati ikan hiu di bawah sinar matahari atau dengan cara merebusnya (Suprayitno, 1995).

Menurut Saanin (1968), klasifikasi ikan hiu cucut botol (*Centrophorus sp.*) adalah termasuk filum Chordata; subfilum vertebrata; klas pisces; subklas elasmobranchi; Ordo squaliformes; famili squalidae; genus *centrophorus*; spesies *Centrophorus sp* dan nama lokal cucut botol.

Isolasi skualena menurut Andiyany (1995) dapat diperoleh rendemen yang tinggi (85,88%) dan dimurnikan secara superkritik, menggunakan pelarut karbon dioksida cair pada tekanan 4500 psi selama 2 jam. Namun prosedur ini operasionalnya sangat sukar dan biaya besar. Sehingga pada penelitian ini digunakan prosedur sesuai dengan AOAC secara kromatografi kolom dengan fase gerak heksana dan fase diam silika, yang prosedurnya mudah dan biaya tidak mahal. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui kemurnian dari isolat tersebut maka dilakukan elusidasi strukturnya dengan menggunakan instrumen FTIR; GC-MS, GC, KLT, RMI; sehingga dapat meyakinkan konsumen bahwa isolat aman untuk dikonsumsi sebagai makanan sehat karena tidak mengandung kolesterol yang dapat menyebabkan penyakit.

BAHAN DAN CARA KERJA

Alat. Alat utama yang dipergunakan dalam penelitian ini antara lain alat gelas untuk refluk, corong pisah, rotavapor, elektronik balance, FTIR (Jasco FTIR-5300); GC-MS (Jeol), RMI (Hitachi R-1900), GC (GC-380, GL Sciences).

Bahan. Bahan yang dipakai dalam penelitian ini antara lain minyak ikan Hiu Cucut Botol (nelayan); KOH (E.Merck), Heksana (E.Merck), etanol (E.Merck), Floorisil F-9127 (Sigma), CDCL₃ (Sigma-Aldrich), plat silika gel-254F, KBr (E.Merck), squalena (Sigma).

Metode. Isolasi skualena dari minyak hati ikan Hiu Cucut Botol (AOAC, 2000).

Minyak hati ikan Hiu ditimbang dengan teliti sebanyak 5 gram; dimasukkan ke dalam labu alas bulat 125 ml, kemudian ditambahkan berturut-turut 3 ml KOH pekat (60 gram KOH dilarutkan dalam 40 ml aquades) dan 20 ml etanol. Campuran tersebut direfluk selama 30 menit. Dalam keadaan masih hangat, ditambahkan 50 ml heksana, kemudian larutan dipindahkan dalam corong pisah 125 ml (1), labu alas bulat dibilas dengan campuran 20 ml etanol dan 40 ml aquades, cairan bilasan dicampurkan pada corong (1). Corong pisah dikocok baik-baik kemudian dibiarkan cairan memisah. Fase heksana dituang ke dalam corong pisah (2) yang berisi 20 ml air, fase air corong (1) dibilas dengan heksana 50 ml dikocok, dibiarkan terpisah, mencampur fase heksana dengan fase heksana pada corong (2). Corong (2) dikocok-kocok dan membiarkan memisah. Fase air dibuang dan fase heksana yang tertinggal dicuci dengan 20 ml KOH encer (28 gram KOH ditambah aquades sampai 1 liter), fase air dibuang. Fase heksana dicuci berulang-ulang sampai bebas basa. Fase heksana adalah ekstrak skualena kasar, heksana diuapkan dengan rotavapor sampai tidak menetes lagi heksananya. Residu dimurnikan dengan cara dimasukkan dalam kolom berisi Florisil F-9127 dengan derajat kehalusan mesh 60–100 PR kemudian dilusi dengan heksana sampai diperoleh larutan 100 ml. Hasil diuapkan heksananya sampai benar-benar terbebas dari heksana. Isolat dialiri gas nitrogen untuk menghilangkan oksigen atau sisa heksana Isolasi dilakukan 3 kali.

Identifikasi isolat skualena

Kromatografi lapisan tipis (KLT)

Ditotolkan skualena baku dan isolat masing-masing (5 μ l) pada plat silika gel-254F yang sama dengan jarak 2,0 cm dari batas bawah dan jarak antara 2 skualena tersebut 1,5 cm, dimana plat tersebut sebelum digunakan diaktifkan terlebih dahulu dengan pemanasan dalam oven selama 3 jam pada suhu 100–120 °C, kemudian dimasukkan dalam bejana pengembang yang berisi n-heksana sampai garis batas 7,0 cm. Plat diambil dan dibiarkan pada suhu kamar untuk menghilangkan sisa eluen, kemudian dideteksi dengan sinar ultraviolet dan noda yang terlihat ditandai serta diukur R_f -nya.

Fuorier transform infra red (FTIR)

Pertama-tama ditimbang serbuk KBr 50 mg, kemudian dibuat pelet KBr dengan alat pengempa, setelah pelet jadi,

isolat diteteskan 10 μ l pada pelet tersebut dan diamati, hal tersebut juga dilakukan untuk skualena baku.

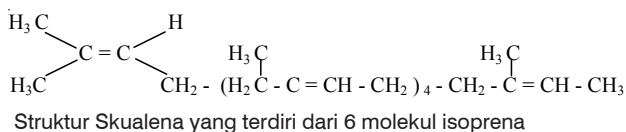
Resonansi Magnetik Inti (RMI)

Isolat \pm 0,25 ml dilarutkan dalam tabung gelas dengan 0,50 ml $CDCl_3$ kemudian dimasukkan alat dan diamati. Hal tersebut juga dilakukan untuk skualena baku.

Kromatografi gas (GC) dan GC-MS digunakan kondisi alat sebagai berikut:

1. Kolom yang digunakan : OV-1
2. Suhu injektor : 280 °C
3. Suhu detektor : 280 °C
4. Suhu oven : 240 °C
5. Laju dan gas pembawa : udara = 2,1 kg/cm²;
H₂ = 2,7 kg/cm²; dan
N₂ = 2,6 kg/cm²
6. Volume injeksi : 0,2 μ l
Skualena isolat dan baku masing-masing diinjeksikan 0,2 μ l.

HASIL DAN PEMBAHASAN



Isolasi skualena dengan bahan dasar minyak hati ikan Hiu yang diperoleh dari nelayan daerah Pantai Sendang Biru Malang Selatan berwarna coklat kekuningan, dilakukan dengan reaksi penyabunan yang menggunakan kalium hidroksida (KOH) dalam etanol (AOAC, 1995). Pada proses ini akan terjadi pemisahan antara fase tersabunkan dan tak tersabunkan, di mana fase tersabunkan mengandung asam lemak yang memiliki gugus karboksil (-COOH) berwarna coklat tua dan skualena yang tidak mempunyai gugus karboksil masuk fase tak tersabunkan berwarna kekuningan masuk ke fase nonpolar yaitu heksana. Pemisahan ini terjadi akibat adanya perbedaan polaritas dari kedua fase tersebut. Pemurnian dilakukan dengan kolom kromatografi yang berisi fase diam florisil dan fase gerak heksana, skualena yang bersifat nonpolar akan terikat fase gerak sedang pengotornya terikat pada fase diam, hal ini dapat dilihat dari perubahan warna fase diam tersebut dari putih menjadi kuning.

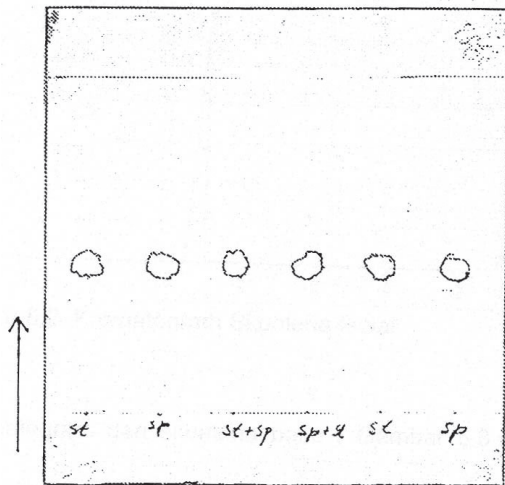
Isolasi skualena dari minyak hati ikan hiu cucut botol adalah sebagaimana tertera pada Tabel 1 dan diperoleh hasil 75,830 \pm 1,140%.

Tabel 1. Hasil isolasi skualena dari minyak hati ikan Hiu Cucut Botol

Percobaan	Berat minyak hati ikan Hiu (g)	Berat isolat (g)	% Hasil isolat
1	5,100	3,835	75,196
2	5,150	3,973	77,146
3	5,050	3,795	75,149
Rata-rata	5,100	3,867	75,830
SD	0,050	0,093	1,140

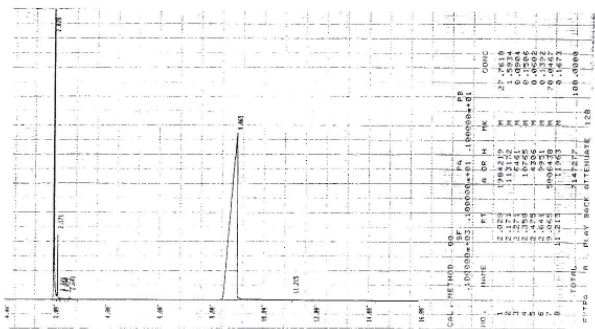
Identifikasi isolat skualena

Identifikasi isolat dengan KLT diperoleh harga $R_f = 3,20/7,00 = 0,457$, sedangkan baku $R_f = 3,20/7,00 = 0,457$, adisi isolat dengan baku = $3,20/7,00 = 0,457$ jadi isolat identik dengan baku (Gambar 1).

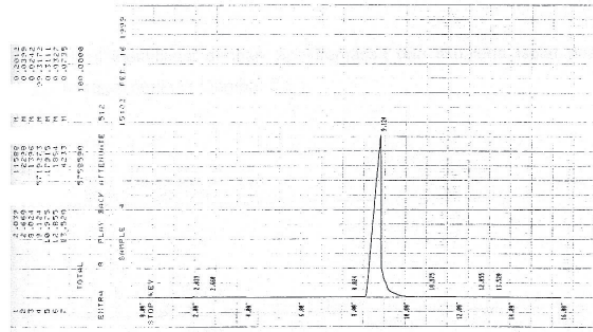


Gambar 1. Kromatografi lapisan tipis dari isolat(sp) dan baku (st)

Identifikasi dengan **kromatografi gas (GC)** diperoleh t_R isolat = 9,065 menit (Gambar 2), sedang baku = 9,124 menit (Gambar 3), sehingga dapat disimpulkan bahwa isolat identik dengan baku.

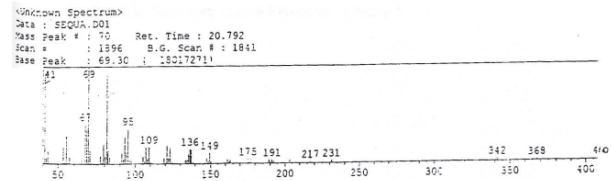


Gambar 2. Kromatogram GC dari isolate skualena

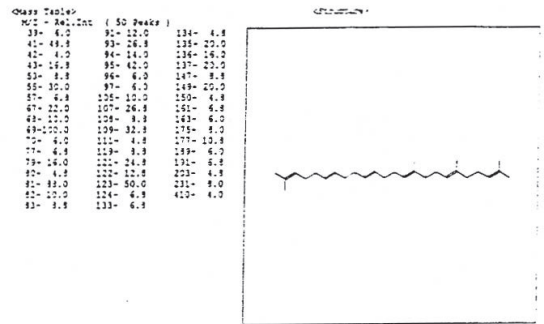
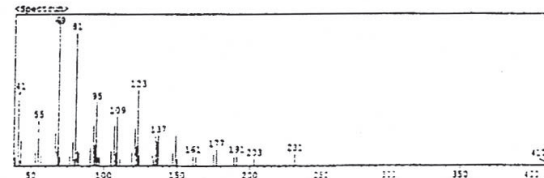
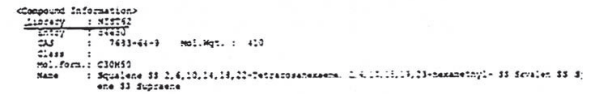


Gambar 3. Kromatogram GC dari baku skualena

Identifikasi dengan **kromatografi gas dan spektrum massa (GC-MS)**, dapat dilihat pada Gambar 4 (isolat) dan Gambar 5 (baku), serta hasil fragmentasi pada Tabel 2.



Gambar 4. Spektra-massa isolat skualena

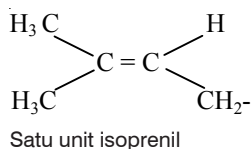


Gambar 5. Spektra massa baku skualena

Tabel 2. Hasil fragmentasi dari skualena

Skualena" Library"	Skualena isolat	Keterangan
41	41	C ₅ H ₅
55	55	C ₄ H ₇
69	69	C ₅ H ₉
81	81	C ₆ H ₉
95	95	C ₇ H ₁₁
109	109	C ₈ H ₁₃
123	123	C ₁₀ H ₁₃
137	*136	C ₁₁ H ₁₅ & C ₁₁ H ₁₄
149	149	C ₁₂ H ₁₅
161	161	C ₁₃ H ₁₅
177	*175	C ₁₄ H ₁₉ & *C ₁₄ H ₁₇
191	191	C ₁₅ H ₂₃
203	203	C ₁₆ H ₂₃
231	231	C ₁₈ H ₂₇
410	411	C ₃₀ H ₅₀

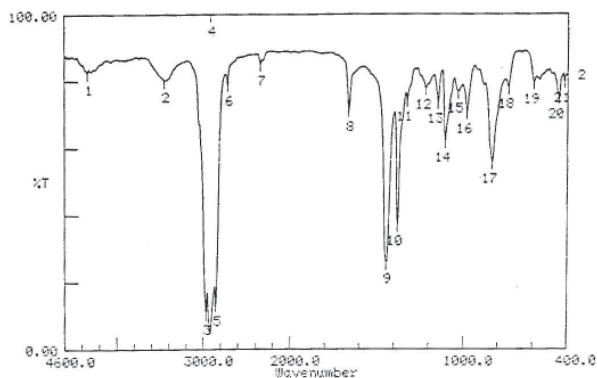
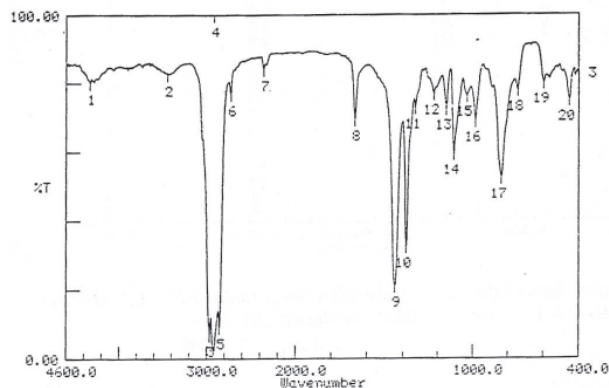
Fragmentasi tertinggi adalah $m/e = 69$ yaitu satu unit isoprena (C₅H₉) di mana molekul skualena terdiri dari 6 unit isoprena. Dari Tabel 2 menggambarkan bahwa fragmentasi isolat sama dengan standar yang ada diinstrumen (*Library*) sehingga dapat disimpulkan isolat sama dengan baku.



Identifikasi dengan **spektrofotometer infra merah (FTIR)**, diperoleh bilangan gelombang yang mirip antara baku dan isolat (Tabel 3, Gambar 6 (isolat), Gambar 7 baku).

Tabel 3. Bilangan gelombang skualena baku dan isolat

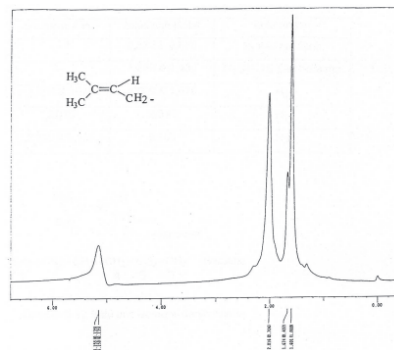
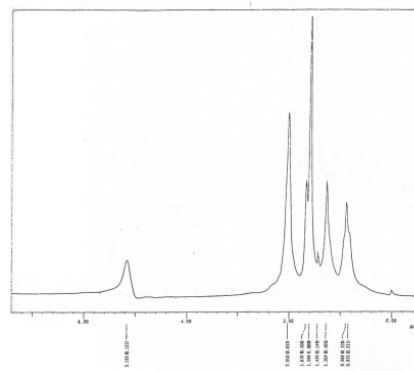
Skualena Baku	Skualena Isolat	Keterangan
2980–2850	2980–2850	CH dari metil dan metilena
1668,58 & 1446,74	1668,58 & 1446,74	C = C
1381,18 & 835,25	1381,16 & 835,25	Bentuk cabang
835,25	835,25	Trisubstitusi

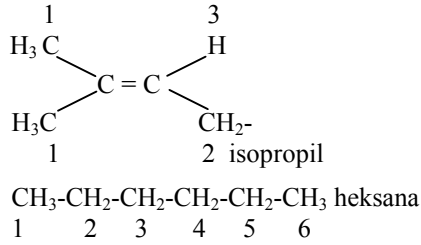
**Gambar 6.** Spektra infra merah isolat**Gambar 7.** Spektra infra merah skualena baku

Identifikasi dengan **resonansi magnetik inti (RMI)**, menghasilkan pergeseran kimia (δ) yang sama antara isolat dan baku terlihat pada Tabel 4 dari Gambar 8 (baku) dan Gambar 9 (isolat).

Tabel 4. Interpretasi pergeseran kimia (δ) pada RMI proton dari isolat dan skualena baku

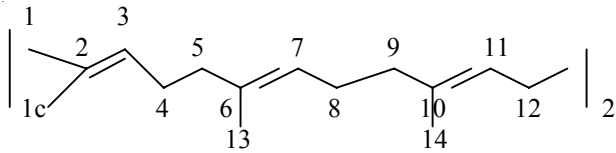
Skualena baku	Skualena isolat	Keterangan
–	0,835 & 0,888	H ₁ dari Heksana
–	1,269 & 1,435	H ₂ ,H ₃ ,H ₄ dari Heksana
1,601 & 1673	1,599 & 1,670	H ₂
2,016	2,016	H ₁
5,150 & 5,155	5,155	H ₃

**Gambar 8.** Spektra RMI dari proton baku**Gambar 9.** Spektra RMI dari proton isolat



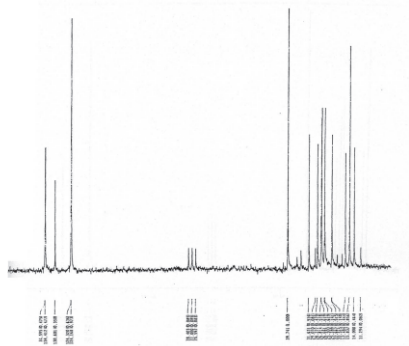
Dari hasil RMI terlihat masih ada heksana sebagai bahan untuk ekstraksi squalena dari kolom pada waktu pemurnian isolat, sehingga perlu diuapkan lagi dengan menggunakan gas nitrogen yang bersifat netral.

Gambaran separuh dari molekul squalena (ada 30 atom karbon) yaitu 15 atom karbon (Breitmaier *et al.*,1978).

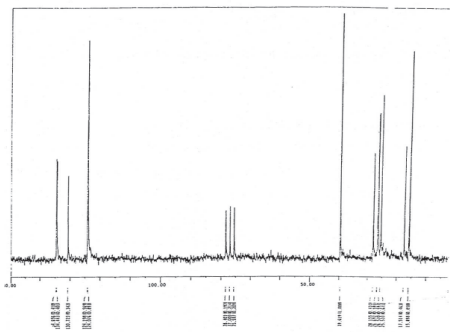


Besar geseran kimia karbon

1. 17,50 (cis) ; 1c. 25,50 (trans); 2. 130,60 ; 3. 124,80 ; 4. 27,00; 5. 39,90; 6. 134,80
7. 124,60; 8. 26,90; 9. 39,90; 10. 134,60; 11. 124,60; 12. 28,40; 13. 15,90 dan 14. 15,90



Gambar 10. Spektra RMI dari karbon isolat



Gambar 11. Spektra RMI dari karbon baku

Tabel 5. interpretasi pergeseran kimia (δ ppm) pada RMI karbon dari isolat dan squalena baku

Squalena baku	Squalena isolat	Keterangan
-	11,29; 14,008	H ₁ dari Heksana
15,6	15,6	C - 13 dan C - 14
17,514	17,514	C - 1 cis
-	22,515; 22,667	C - 2 heksana
25,533	25,289; 25,503	C - 1c trans
26,570; 26,692;	26,661; 26,814;	C - 4; C - 8 dan C -12
28,155	28,277	
-	29,070	C - 4 heksana
-	31,630	C - 3 heksana
39,619	39,741	C - 5 dan C-9
124,076; 124,198	124,168; 124,320	C - 3; C - 7 dan C - 11
130,723	130,601	C - 2
134,443; 134,656	134,412; 134,595	C - 6 dan C - 10

Dari hasil elusidasi terbukti bahwa isolat yang diperoleh murni sehingga aman untuk dikonsumsi untuk semuanya karena sudah tidak mengandung lemak lain terutama kolesterol yang dapat menimbulkan penyakit.

KEPUSTAKAAN

- Andiyany SV, 1995. Isolasi Squalen dari Minyak Hati Ikan Hiu Cucut Botol (*Centrophorus sp*) & pemurniannya menggunakan tehnik ekstraksi fluida CO₂ Superkritik. *Skripsi*, ITS, Surabaya, hlm 14–17.
- Breitmaier E, Voelter W, 1978. *¹³C NMR Spectroscopy. Methods and Applications in Organic Chemistry*. Second Edition, 221–223.
- Desai KN Wei H, Lamartiniere CA, 1996. The Preventive and Therapeutic Potential of the Squalene-Containing Compound, Roindex, on Tumor Promotion and Regression. *Cancer-Lett*, 101(1):93–6.
- Official Method of Analysis of AOAC International, 17, Vol II, AOAC International, Chap. 41, 30–31.
- Retnowati Rurini, 1994. Isolasi Squalen Dari Minyak Hati Ikan Hiu dan Konversinya menjadi Squalan. *Tesis Program Magister Kimia*, Program Pasca Sarjana ITB, Bandung.
- Saanin H, 1968, *Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan*, Bina Cipta, Bandung.
- Suprayitno Eddy, 1995. Peningkatan Rendemen dan Kualitas Minyak Hati Ikan Hiu Cucut (*Centrophorus squamosus*) dengan tehnik Ekstraksi Enzimatis. Studi optimasi kondisi kerja enzim papain dan bromelin, *Desertasi*, Program Doktor Ilmu Matematika Dan Sains, Program Pasca Sarjana, UNAIR, Surabaya, hlm 16.