

**UJI TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI ISOLAT STEROID HASIL KLTP
EKSTRAK n-HEKSANA DAN PETROLEUM ETER *Hydrilla verticillata*
MENGUNAKAN UV-Vis DAN LC-MS/MS**

SKRIPSI

Oleh:
SOFIA NING AZAH
NIM. 14630004



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019**

**UJI TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI ISOLAT STEROID HASIL KLTP
EKSTRAK n-HEKSANA DAN PETROLEUM ETER *Hydrilla verticillata*
MENGUNAKAN UV-Vis DAN LC-MS/MS**

SKRIPSI

Oleh:
SOFIA NING AZAH
NIM. 14630004

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018

**UJI TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI ISOLAT STEROID HASIL KLTP
EKSTRAK n-HEKSANA DAN PETROLEUM ETER *Hydrilla verticillata*
MENGUNAKAN UV-Vis DAN LC-MS/MS**

SKRIPSI

Oleh:
SOFIA NING AZAH
NIM. 14630004

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 11 Desember 2018

Pembimbing I


A. Ghanaim Fasya, M.Si
NIP. 19820616 200604 1 002

Pembimbing II


Akyunul Jannah, S.Si, M.P
NIP. 19750410 200501 2 009

Mengetahui,
Ketua Jurusan


Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790630 200604 2 002

**UJI TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI ISOLAT STEROID HASIL KLTP
EKSTRAK n-HEKSANA DAN PETROLEUM ETER *Hydrilla verticillata*
MENGUNAKAN UV-Vis DAN LC-MS/MS**

SKRIPSI

Oleh:
SOFIA NING AZAH
NIM. 14630004

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 19 Desember 2018

Penguji Utama	: Elok Kamilah Hayati, M.Si NIP. 19790620 200604 2 002	(.....)
Ketua Penguji	: Ahmad Hanapi, M.Sc NIDT. 19851225 20160801 1 069	(.....)
Sekretaris Penguji	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	(.....)
Anggota Penguji	: Akyunul Jannah, S.Si, M.P NIP. 19750410 200501 2 009	(.....)

Mengesahkan,
Ketua Jurusan

Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Sofia Ning Azah
NIM : 14630004
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Uji Toksisitas dan Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLTP
Ekstrak n-Heksana dan Petroleum Eter *Hydrilla Verticillata*
Menggunakan UV-Vis dan LC-MS/MS.

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 4 Januari 2019
Yang membuat pernyataan



Sofia Ning Azah
NIM. 14630004



Alhamdulillahirobbilalamin, terimakasih kepada Bapak dan Ibuk, Keluarga besar, Tim *Hydrilla* dan Tim Organik, Dosen Pembimbing, Teman-teman Kimia-A, Angkatan 14, dan semua orang yang selalu memberikan motivasi, inspirasi dan semangat, semoga Allah SWT selalu memberkahi dan menuntun jalan kita semua, aamiin.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil 'alamin, segala puji bagi Allah yang telah memberikan rahmat serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat melaksanakan dan menyelesaikan laporan skripsi dengan judul **“UJI TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI ISOLAT STEROID HASIL KLTP EKSTRAK n-HEKSANA DAN PETROLEUM ETER *HYDRILLA VERTICILLATA* MENGGUNAKAN UV-VIS DAN LC-MS/MS”**. Dengan segala kerendahan hati penulis menyadari bahwa selama berlangsungnya penelitian, penyusunan sampai pada tahap penyelesaian laporan skripsi tak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat, hidayah serta karunia-Nya kepada penulis sehingga laporan ini dapat terselesaikan dengan baik.
2. Orang tua saya tercinta yang telah banyak memberikan perhatian, nasihat, doa, dan dukungan baik moril maupun materi, serta keluarga besar yang selalu memberi motivasi dan semangat.
3. Bapak Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag., selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

6. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si., selaku Dosen Pembimbing yang telah meluangkan waktu untuk membimbing, memotivasi, mengarahkan dan memberi masukan dalam penulisan laporan skripsi ini.
7. Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc., selaku Konsultan yang telah mengarahkan dan memberikan masukan dalam penulisan laporan skripsi ini.
8. Seluruh Dosen dan Laboran Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah mengalirkan ilmu, pengetahuan, pengalaman dan wawasannya sebagai pedoman dan bekal.
9. Teman-teman Jurusan Kimia Angkatan 2014, khususnya tim hydrilla, organik *squad* dan Kimia-A 2014, serta semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah ikut memberikan bantuan dan motivasi selama penelitian dan penyusunan laporan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa laporan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, dan penulis berharap semoga dapat memberikan manfaat kepada para pembaca. Amin.

Malang, 4 Januari 2019

Penyusun

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ABSTRAK	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan	4
1.4 Batasan Masalah	4
1.5 Manfaat	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 <i>Hydrilla verticillata</i>	6
2.2 Senyawa Steroid	8
2.3 Isolasi Senyawa Steroid	9
2.3.1 Ekstraksi Senyawa Steroid	9
2.3.2 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP	11
2.3.3 Uji Fitokimia Senyawa Steroid	13
2.4 Uji Toksisitas dengan Metode <i>BSLT</i>	14
2.5 Identifikasi Isolat Steroid	16
2.5.1 Identifikasi Isolat Steroid Menggunakan UV-Vis	16
2.5.2 Identifikasi Isolat Steroid Menggunakan LC-MS	18
BAB III METODOLOGI	20
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	20
3.2 Alat dan Bahan	20
3.2.1 Alat	20
3.2.2 Bahan	20

3.3 Rancangan Penelitian	21
3.4 Tahapan Penelitian	22
3.5 Cara Kerja	22
3.5.1 Preparasi Sampel	22
3.5.2 Penentuan Kadar Air	22
3.5.3 Ekstraksi Sampel	23
3.5.4 Uji Fitokimia Steroid Ekstrak Kasar <i>Hydrilla verticillata</i>	24
3.5.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTA	24
3.5.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP dan Uji Fitokimia	24
3.5.7 Uji Toksisitas Steroid Menggunakan Metode BSLT	25
3.5.7.1 Penetasan Larva Udang	25
3.5.7.2 Uji Toksisitas	25
3.5.8 Identifikasi Isolat Steroid	26
3.5.8.1 Identifikasi Isolat Steroid Menggunakan UV-Vis	26
3.5.8.2 Identifikasi Isolat Steroid Menggunakan LC-MS/MS	27
3.6 Analisa Data	28
BAB IV PEMBAHASAN	29
4.1 Preparasi Sampel	29
4.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri	29
4.3 Ekstraksi Sampel	30
4.4 Uji Fitokimia Steroid Ekstrak Kasar <i>Hydrilla verticillata</i>	31
4.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTA	32
4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP dan Uji Fitokimia	34
4.7 Uji toksisitas Steroid Menggunakan Metode BSLT	35
4.7.1 Penetasan Larva Udang	35
4.7.2 Uji Toksisitas	36
4.8 Identifikasi Isolat Steroid	39
4.8.1 Identifikasi Isolat Steroid Menggunakan UV-Vis	39
4.8.2 Identifikasi Isolat Steroid Menggunakan LC-MS/MS	40
BAB V PENUTUP	44
5.1 Kesimpulan	44
5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Hydrilla verticillata</i> L.F (Royle)	6
Gambar 2.2 Struktur dasar steroid	9
Gambar 2.3 Dugaan reaksi Libermann-Burchard	13
Gambar 2.4 Siklus hidup <i>Artemia salina</i>	15
Gambar 2.5 Hasil spektra UV-Vis isolat batang mengkudu	17
Gambar 2.6 Struktur ion prekursor dan ion produk	19
Gambar 2.7 Spektra LC-MS alga cokelat	19
Gambar 4.1 Penampakan noda KLTA pada 366 nm	33
Gambar 4.2 Spektra UV-Vis isolat 15 ekstrak n-heksana	39
Gambar 4.3 Kromatogram LC-MS/MS isolat steroid <i>Hydrilla verticillata</i>	40
Gambar 4.4 Struktur ion prekursor dan ion produk	41

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan nutrisi pada <i>Hidrilla verticillata</i>	8
Tabel 2.2 Nilai LC_{50} ekstrak berpotensi sebagai senyawa bioaktif	16
Tabel 2.3 Hasil deteksi senyawa	18
Tabel 3.1 Senyawa target identiikasi dengan LC-MS/MS	27
Tabel 4.1 Hasil rendemen ekstrak Kasar <i>Hydrilla verticillata</i>	31
Tabel 4.2 Jumlah noda yang terbentuk pada KLTA	33
Tabel 4.3 Hasil uji fitokimia KLTP	35
Tabel 4.4 Nilai LC_{50} isolat steroid	37
Tabel 4.5 Hasil deteksi ion steroid oleh LC-MS/MS	42

DAFTAR LAMPIRAN

1. Rancangan Penelitian	55
2. Diagram Alir	56
2.1 Preparasi Sampel	56
2.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri	56
2.3 Ekstraksi Maserasi <i>Hydrilla verticillata</i>	56
2.4 Uji Fitokimia	57
2.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTA	57
2.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP	58
2.7 Uji Fitokimia Isolat Steroid KLTP	58
2.8 Uji Toksisitas	58
2.8.1 Penetasan Larva Udang	58
2.8.2 Uji Toksisitas	59
2.9 Identifikasi isolat steroid	59
2.9.1 Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis	59
2.9.2 Identifikasi Menggunakan LC-MS/MS	59
3. Perhitungan	59
3.1 Pembuatan Reagen Liebermann-Burchard	59
3.2 Pembuatan Konsentrasi Larutan Isolat untuk Uji Toksisitas	60
3.2.1 Pembuatan Larutan Stok Isolat 10 n-Heksana dan Petroleum Eter .	60
3.2.2 Pembuatan Larutan Stok Isolat 16 n-Heksana	61
3.2.3 Pembuatan Larutan Stok Isolat 15 n-Heksana	61
3.2.4 Pembuatan Larutan Stok Isolat 14 Petroleum Eter	62
4. Data Pengukuran Kadar Air dan Rendemen	63
4.1 Data Pengukuran Kadar Air Sampel <i>Hydrilla verticillata</i> Kering	63
4.2 Perhitungan rendemen	63
4.2.1 Ekstrak n-Heksana	63
4.2.2 Ekstrak Petroleum Eter	64
5. Hasil KLTA dan KLTP	64
5.1 Hasil KLTA	64
5.1.1 Hasil KLTA dengan Eluen 4,75: 0,25	65
5.1.2 Hasil KLTA dengan Eluen 4,5: 0,5	66
5.1.3 Hasil KLTA dengan Eluen 4,25: 0,75	66
5.1.4 Hasil KLTA dengan Eluen 4: 1	66
5.1.5 Hasil KLTA dengan Eluen 3,75: 1,25	67
5.2 Hasil KLTP	67
6. Data Hasil Uji Toksisitas	68
6.1 Data Hasil Uji Toksisitas Isolat Ekstrak n-Heksana	68
6.1.1 Data Hasil Uji Toksisitas Isolat 10	68
6.1.2 Data Hasil Uji Toksisitas Isolat 15	70
6.1.3 Data Hasil Uji Toksisitas Isolat 16	72
6.2 Data Hasil Uji Toksisitas Isolat Ekstrak Petroleum Eter	74
6.2.1 Data Hasil Uji Toksisitas Isolat 10	74
6.2.2 Data Hasil Uji Toksisitas Isolat 14	76
7. Data Hasil Uji Isolat Steroid	79

7.1 Data Hasil Spektrofotometer Uv-Vis	79
7.2 Data Hasil LC-MS/MS	84
7.2.1 Data Hasil LC-MS/MS Isolat ekstrak n-Heksana	84
7.2.2 Data Hasil LC-MS/MS Ekstrak Kasar n-Heksana	86
8. Dokumentasi	87
9. Kartu Konsultasi	89



ABSTRAK

Azah, S.F. 2018. **Uji Toksisitas dan Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLTP Ekstrak n-Heksana dan Petroleum Eter *Hydrilla Verticillata* Menggunakan UV-Vis dan LC-MS/MS.** Pembimbing I: A. Ghanaïm Fasya, M.Si; Pembimbing II: Akyunul Jannah, S.Si, M.P; Konsultan: Ahmad Hanapi, M.Sc

Kata Kunci : *Hydrilla verticillata*, Steroid, Kromatografi Lapis Tipis, Uji Toksisitas, *Brine Shrimp Lethality Test*, UV-Vis, LC-MS/MS.

Hydrilla verticillata merupakan salah satu tumbuhan bawah permukaan air yang menjadi gulma perairan. Senyawa yang ada didalam *Hydrilla verticillata* bersifat sebagai antioksidan, antimikroba, antimalaria, antibakteri, dan antikanker yang berasal dari senyawa aktif didalamnya. Salah satu senyawa aktifnya adalah steroid yang sudah banyak dimanfaatkan sebagai senyawa toksik dan antikanker, sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat toksisitas, dan identifikasinya.

Hydrilla verticillata dimaserasi tunggal menggunakan pelarut n-heksana dan petroleum eter. Masing-masing ekstrak di pisahkan senyawa aktifnya dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Noda yang terduga sebagai senyawa golongan steroid di uji toksisitasnya menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* dengan parameter nilai LC_{50} . Identifikasi isolat terduga steroid menggunakan UV-Vis dan LC-MS/MS.

Hasil penelitian menunjukkan isolat steroid dari ekstrak n-heksana dan petroleum eter dapat digunakan sebagai senyawa antikanker dengan nilai LC_{50} sebesar 2,82; 0,28; 0,37; 2,70; dan 2,20 ppm pada masing-masing isolat 10, 15, 16 n-heksana dan 10, 14 petroleum eter. Hasil pengujian Uv-Vis menunjukkan isolat 15 ekstrak n-heksana menghasilkan serapan maksimum pada panjang gelombang 203 dan 273,9 nm, dengan hasil pengujian LC-MS/MS menunjukkan adanya 2 senyawa yaitu β -sitosterol dan kampesterol.

ABSTRACT

Azah, S.F. 2018. **The Examination of Toxicity and The Identification of Isolate Steroids The Result of KLTP extract on n-Hexane and Ether Hydrilla Verticillata Using UN-Vis and LC-MS/MS.** Supervisor 1: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Supervisor II: Akyunul Jannah, S.Si, M.P; Consultant: Ahmad Hanapi, M.Sc

Kata Kunci : *Hydrilla verticillata*, Steroid, Thin Layer Chromatography, Toxicity Test, Brine Shrimp Lethality Test, UV-Vis, LC-MS / MS.

Hydrilla verticillata is one of the plant growing in the surface of water that becomes aquatic weeds. Compound used in *Hydrilla verticillata* behaves as antioxidant, antimicrobial, antimalarial, antibacterial and anticancer which is originated from active compound source inside. One of the active compound is steroids which is now commonly used as toxic compound and anticancer, thus this result is aimed at knowing the level of toxic and its identification.

Hydrilla verticillata single imaseration using the n-hexane solvent and petroleum ether. Each of the compound has been separated in its active compound with Thin layer chromatography (KLT). The dirt is expected as compound of steroids class which its toxic is examined using the method of Brine Shrimp Lethality Test with the parameter value of LC₅₀. Isolates identification of steroid is expected using UV-Vis and LC-MS/MS.

The Research result shows that the steroids isolates from the extract of n-hexane and petroleum ether can be used as anticancer compound with the value of LC₅₀ as high as 2,82; 0,28; 0,37; 2,70; and 2,20 ppm in each isolate 10, 15, 16 n-hexane and 10, 14 petroleum ether. The examination result on Uv-Vis shows that isolate 15 extract n-hexane resulted on the maximum absorption in the long wave 203 and 273,9 nm, with the result of LC-MS/MS test shows that there are 2 compounds which are β -sitosterol and campesterol.

الملخص

أزه، س، ف. 2018. اختبار السمية والتعرف على عزل الستيرويد نتائج كروماتوغرافيا طبقة رقيقة مقتطف هيكسان والبترولي أثير هيدريلا فرتيجيلاتا باستخدام UV-Vis و LC-MS / MS. المشرف الأول: احمد غنائم فشا، الماجستير؛ المشرفة الثانية: أعين الجنة، الماجستير؛ المستشار: احمد حنفي، الماجستير.

الكلمات الرئيسية: هيدريلا فرتيجيتا ، سيترويد، كروماتوغرافيا طبقة رقيقة، اختبار السمية، اختبار الماء المالح الروبيان ، UV-Vis ، LC-MS / MS.

هيدريلا فرتيجيلاتا هو واحد من النباتات المائية التي تصبح الأعشاب المائية. المركبات في هيدريلا فرتيجيلاتا هي مضادات للأكسدة ، مضادات الميكروبات ، مضادات الملاريا ، مضادات الجراثيم ، ومضاد للسرطان المشتقة من المركبات النشطة فيها. واحدة من المركبات النشطة هي الستيرويد التي استخدمت على نطاق واسع كمركبات سامة ومضادة للسرطان، لذلك تهدف هذه الدراسة لتحديد مستوى السمية، وتحديد هويتها. هيدريلا فرتيجيلاتا هو واحد متبدل باستخدام مذيبيات ن-هيكسان و البترول أثير. تم فصل كل مستخلص نشط بواسطة كروماتوغرافيا طبقة رقيقة. تم اختبار البقعة المشتبه بها كمركب مجموعة الستيرويد بسبب سميته باستخدام طريقة اختبار قشور الماء المالح مع معايير LC50. تحديد المنشطات المشتبه بها باستخدام UV-Vis و LC-MS / MS. أظهرت النتائج أن عزل الستيرويد من مستخلص هكسان و البترول أثير يمكن أن تستخدم كمركبات مضادة للسرطان مع قيم LC50 مقدارها 2.82، 0.28، 0.37، 2.70، و 2.20 جزء من المليون لكل عزل 10 و 15 و 16 ن-هكسان و 10 و 14 ، بترولي أثير. أظهرت نتائج اختبار Uv-Vis أن 15 عذلة مستخلصة من هكسان تنج أقصى امتصاص عند طول الموجة 203 و 273.9 نانومتر ، مع نتائج اختبار LC-MS / MS تظهر مركبان هما β -sitosterol و kampesterol.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hydrilla verticillata merupakan salah satu jenis tumbuhan air berwarna hijau yang tumbuh di bawah permukaan air (Crow dan Hellquist, 2000). Allah SWT berfirman dalam Al-Qur'an Surat Thaaha ayat 53:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَوَسَّلَ لَكُم فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَخَرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّنْ ثَبَاتٍ شَتَّى

“yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan, maka kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam”

Surat Thaaha ayat 53 menjelaskan bahwa bumi sebagai hamparan telah ditumbuhkan berbagai jenis tumbuhan dengan air. Shihab (2005) menjelaskan bahwa Allah dengan kekuasaan-Nya telah menurunkan hujan dari langit sehingga terciptalah aliran air baik di atas tanah (Sungai) maupun di bawah tanah, sehingga dari air tersebut terbentuklah rawa, danau, dan lain sebagainya. Danau Ranu-Grati Pasuruan merupakan salah satu Danau yang sumber airnya berasal dari air hujan dan air bawah tanah, yang menjadi tempat tumbuhnya salah satu tumbuhan, yaitu *Hydrilla verticillata*.

Hydrilla verticillata berasal dari Asia dan Australia, yang kemudian menyebar ke Amerika Selatan dan Utara (Zhu, dkk., 2017). Pertumbuhannya sangat cepat dengan kecepatan tumbuh maksimum sampai 2,5 cm per hari (Baniszewski, dkk., 2016). Di Indonesia cukup banyak dijumpai di perairan danau (Putri, 2014), dan dianggap sebagai ancaman bagi ekosistem danau karena menyebabkan

penurunan hasil tangkapan ikan, hal ini terjadi di Danau Limboto, Sulawesi (Goltenboth, dkk., 2012). Selain itu, tumbuhan ini juga tercantum dalam daftar gulma perairan Federal Amerika Serikat (USDA, 2012), meskipun keberadaanya di perairan kurang diharapkan, namun di sisi lain *Hydrilla verticillata* juga mempunyai aktivitas antioksidan, antimikroba (Prabha dan Rajkumar, 2015), antikanker, anti-inflamasi, dan antibakteri (Byju, dkk., 2013) yang berasal dari senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya.

Salah satu jenis metabolit sekunder adalah steroid yang banyak terdapat pada tumbuhan air, dan dapat diekstrak dengan pelarut organik seperti n-heksana dan petroleum eter serta diidentifikasi menggunakan Spektrofotometer *Ultraviolet-Visible* (UV-Vis) dan *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS). Ekstrak n-heksana (Hafiz, 2017) dan petroleum eter (Hasanah, 2017) *Hydrilla verticillata*, memberikan hasil positif steroid yang ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau kebiruan pada uji Lieberman-Burchard. Oliveira, dkk., (2015) mengidentifikasi adanya steroid pada ekstrak rumput laut menggunakan UV-Vis dan menghasilkan serapan pada rentang 290 - 310 nm, yang diduga merupakan fukosterol. Pereira, dkk., (2016) mengidentifikasi adanya tujuh senyawa turunan steroid dari ekstrak alga coklat menggunakan LC-MS. Senyawa steroid yang berasal dari tumbuhan mempunyai aktifitas sebagai *repellent*, *antifeedant* dan toksik (Dinan, dkk., 2001).

Toksik atau racun merupakan kemampuan atau potensi merusak dari suatu bahan tertentu terhadap organisme (Tranggono dan Latifah, 2007). Potensi aktivitas toksik suatu bahan disebabkan oleh adanya senyawa kimia, dan dapat diukur secara kualitatif dengan uji toksisitas (Kabinawa dan Sugiharto, 2006). Pengujian ini

merupakan pengujian awal suatu senyawa yang memiliki bioaktivitas seperti *antikanker*, *antibakteri*, *antioksidan* maupun *antitumor* (Soemirat, 2005). Pengujian toksisitas suatu senyawa dapat menggunakan hewan uji yang salah satu metodenya adalah *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan udang *Artemia salina*. Hafiz (2017) dan Hasanah (2017) melakukan pengujian toksisitas dengan metode tersebut dan masing-masing menghasilkan nilai *Lethal Concentration-50* (LC₅₀) sebesar 16,762 ppm dan 39,030 ppm, dan dapat diduga bahwa senyawa steroid adalah penyebab kematian dari larva udang *Artemia salina*.

Memperhatikan berbagai macam potensi aktivitas steroid, maka perlu dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa steroid dari *Hydrilla verticillata* menggunakan suatu pelarut organik non polar, yaitu n-heksana dan petroleum eter, yang dapat dilakukan menggunakan metode ekstraksi maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada suhu ruang (Hermawan, dkk., 2012). Pemisahan komponen senyawa aktif dapat dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP), dengan pemilihan variasi eluen terbaik menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA). Hayati, dkk., (2013) mengidentifikasi adanya senyawa steroid dari ekstrak n-heksana batang kesembukan dengan KLT menggunakan eluen n-Heksana dan etil asetat, dan didapatkan empat noda dengan nilai R_f 0,10; 0,35; 0,61 dan 0,68. Pengujian aktivitas steroid pada penelitian ini menggunakan BSLT. Kematian larva udang dianalisis dengan program pengolah data Minitab. Hasil pengujian isolat yang memiliki sifat toksisitas tertinggi dianalisis lebih lanjut menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan LC-MS/MS.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana toksisitas senyawa steroid hasil isolasi menggunakan KLTP ekstrak n-Heksana dan petroleum eter *Hydrilla verticillata* terhadap udang *Artemia salina*?
2. Bagaimana hasil identifikasi isolat senyawa steroid yang terdapat dalam ekstrak dengan nilai LC_{50} terendah dari *Hydrilla verticillata* menggunakan UV-Vis dan LC-MS/MS?

1.3 Tujuan

Tujuan dalam penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui toksisitas senyawa steroid hasil isolasi menggunakan KLTP ekstrak n-Heksana dan petroleum eter *Hydrilla verticillata* terhadap udang *Artemia salina*.
2. Untuk mengetahui hasil identifikasi senyawa steroid yang terdapat dalam isolat dengan nilai LC_{50} terendah dari *Hydrilla verticillata* menggunakan UV-Vis dan LC-MS/MS.

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Sampel *Hydrilla verticillata* yang digunakan berasal dari Danau Ranu Grati, Kabupaten Pasuruan.

2. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi dengan pelarut n-heksana dan petroleum eter dan isolasi senyawa steroid dilakukan menggunakan KLTP.
3. Uji toksisitas isolat steroid dilakukan menggunakan metode BSLT dan tingkat toksisitas dari masing-masing isolat dianalisis nilai LC_{50} menggunakan program pengolah data Minitab.
4. Identifikasi senyawa steroid menggunakan instrumentasi UV-Vis dan LC-MS/MS.

1.5 Manfaat

Manfaat dalam penelitian ini adalah:

1. Dapat diketahui tingkat toksisitas senyawa steroid hasil isolasi menggunakan KLTP ekstrak n-heksana dan petroleum eter *Hydrilla verticillata* terhadap udang *Artemia salina*.
2. Dapat diketahui hasil identifikasi senyawa steroid yang terdapat dalam ekstrak dengan sifat paling toksik dari *Hydrilla verticillata*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Hydrilla verticillata*

Hydrilla verticillata adalah tumbuhan air yang seluruh bagian tubuhnya tenggelam di bawah permukaan air. *Hydrilla verticillata* memiliki akar serabut berwarna putih atau merah kecoklatan jika tumbuh pada sedimen, ataupun berwarna hijau karena adanya klorofil ketika terpapar sinar matahari (Langeland, 1996). Batang *Hydrilla verticillata* berwarna hijau, tegak, ramping, bercabang dan dapat tumbuh sepanjang 7 m. Bunganya jarang ada, apabila ada akan tumbuh pada ketiak daun menuju permukaan air melalui tangkai bunga yang panjang, berwarna putih dengan 3 mahkota dan 3 kelopak.



Gambar 2.1 *Hydrilla verticillata* L.F (Royle)

Berdasarkan Gambar 2.1, dapat dilihat bahwa daun *Hydrilla verticillata* berwarna hijau, tipis, berbentuk lanset dengan tepi bergerigi dan berduri, lebar 2-4 mm dan panjang 6-20 mm, setiap tiga sampai empat helai daun tumbuh melingkar dan membentuk ruas-ruas pada batang. Tangkai daun berdiameter 0,1 mm dan

berwarna hijau. Pelepah daun sering berwarna merah dan memiliki satu duri di bawah permukaannya (Marer dan Garvey, 2001).

Hydrilla verticillata di Indonesia biasanya disebut sebagai lumut air (Walukow, 2011) ganggang (Suryandari dan sugianti, 2009) atau ganggeng (Jawa). *Hydrilla verticillata* banyak tumbuh di wilayah perairan danau Indonesia, seperti di Danau Limboto, Danau Sentani, Danau Rawa Pening, Danau Ranu Grati (Hafiz, 2017), dan lain sebagainya. Pemanfaatannya masih terbatas sebagai hiasan akuarium, media percobaan Ingenhousz, sumber hara pada sistem budidaya kacang tanah, dan tempat berkembang biak ikan (Suryandari dan sugianti, 2009).

Tumbuhan *Hydrilla verticillata* memiliki klasifikasi sebagai berikut (Ramesh, dkk., 2014):

Kingdom	: Plantae.
Divisi	: Magnoliophyta.
Kelas	: Liliopsida.
Ordo	: Hydrocharitales.
Suku	: Hydrocharitaceae.
Genus	: Hydrilla.
Spesies	: <i>Hydrilla verticillata</i> (L.f.) Royle.

Allah SWT berfirman dalam Al-Qur'an Surat asy-Syu'araa' ayat 7-8:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ (٧) إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً وَمَا كَانَ أَكْثَرُهُمْ مُؤْمِنِينَ (٨)

“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik? Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat suatu tanda kekuasaan Allah, dan kebanyakan mereka tidak beriman”

Berdasarkan tafsir Shihab (2005), dijelaskan bahwa Allah SWT telah memerintahkan hamba-Nya untuk mengamati berbagai jenis tumbuhan yang telah diciptakan-Nya, agar diketahui manfaat yang bersumber dari kandungan senyawa didalamnya.

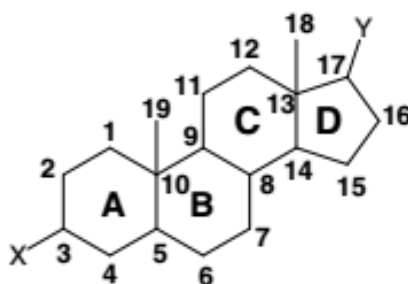
Menurut Kurniawan, dkk., (2010) Tumbuhan *Hydrilla verticillata* memiliki kandungan klorofil total sebesar 4,43 mg/L, karotenoid 0,92 mg/L dan vitamin C 4,70 mg/30 gram, juga mempunyai kandungan nutrisi yang tinggi seperti saponin, β -karoten, polisakarida, asam amino, mikro dan makronutrien, antioksidan agen detoksifikasi, dan kandungan senyawa kimia yang lain terangkum pada Tabel 2.1. Kensa dan Neelamegum (2016) juga melaporkan adanya beberapa senyawa aktif dari ekstrak etanol *Hydrilla verticillata* yaitu, asam stearat, senyawa *plastizer*, asam linoleat, diterpen, sesquiterpen dan steroid.

Tabel 2.1 Kandungan nutrisi pada *Hydrilla verticillata* (Das, dkk., 2015)

Nutrisi atau mineral	Jumlah (mg/10,5 gram)	Nutrisi atau mineral	Jumlah (mg/10,5 gram)
Vitamin B-1	26,25	Kalium	244,65
Vitamin B-2	0,084	Fosfor	29,74
Vitamin B-3	5,25	Besi	35,8
Vitamin B-5	11,36	Timah	6,3
Vitamin B-6	35,91	Tembaga	0,22
Vitamin B-12	1,05	Kobalt	0,43
Kalsium	1460,7	Molibdenum	14,7
Magnesium	76,13	Beta karoten	29593 IU

2.2 Senyawa Steroid

Steroid merupakan senyawa yang tergolong dalam senyawa lemak yang terdiri dari rantai karbon dengan 4 cincin, 3 cincin utama sikloheksana dan 1 cincin siklopentana, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.2. Pengelompokan senyawanya berdasarkan pada gugus yang terikat pada kerangka dasar rantai karbon (Kristanti, 2008).



Gambar 2.2 Struktur dasar steroid (Pozo, dkk., 2008)

Turunan senyawa steroid yang banyak keberadaannya adalah sterol (Poedjiadi, 2012). Senyawa steroid yang berada ditumbuhan disebut dengan fitosterol (Vembriarto, 2013). Fungsi dari senyawa steroid selain sebagai pelindung diri, juga berfungsi sebagai hormon, kolesterol, Ergosterol, progesterone, dan estrogen, yang semuanya merupakan senyawa turunan steroid (Poedjiadi, 2012). Senyawa steroid dapat digunakan sebagai senyawa antioksidan (Krisna, 2014), antidiabet (Kensa dan Neelamegum, 2016) (Diastuti, 2010) (Zhang, dkk. 2012), serta digunakan sebagai senyawa toksik (Sapar, 2004) (Dinan, dkk., 2001).

2.3 Isolasi Senyawa Steroid

Isolasi senyawa steroid dari *Hydrilla verticillata* dapat dilakukan dengan beberapa tahapan sebagai berikut,

2.3.1 Ekstraksi Senyawa Steroid

Metode ekstraksi maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut berdasarkan prinsip *like dissolve like* yaitu senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar sedangkan senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut non polar. Pada proses maserasi, perlu dilakukan pengadukan.

Pengadukan untuk meratakan konsentrasi larutan di luar serbuk, sehingga dengan pengadukan tersebut tetap terjaga adanya derajat perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan di dalam sel dengan larutan di luar sel (Lenny, 2006).

Keuntungan dari metode ini adalah peralatannya mudah ditemukan dan pengerjaannya sederhana (Mustofa, 2008). Metode ini tidak menggunakan pemanasan, sehingga zat aktif yang terkandung dalam bahan tidak rusak (Voight, 1994). Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut (Lenny, 2006). Pelarut yang digunakan pada penelitian ini yaitu n-heksana dan petroleum eter didasarkan pada pemilihan variasi pelarut yang sesuai dengan senyawa target. Pelarut tersebut digunakan karena memenuhi beberapa syarat-syarat pelarut, diantaranya memiliki titik didih yang cukup rendah, bersifat inert, dapat melarutkan senyawaan yang sesuai kepolarannya, serta memiliki harga yang terjangkau (Guenther, 1987).

Hafiz (2017) dan Hasanah (2017) telah mengekstrak *Hydrilla verticillata* dengan pelarut n-heksana dan petroleum eter. nilai rendemen yang diperoleh pada masing-masing ekstrak tersebut adalah sebesar 3,80% dan 2,14%. Berdasarkan penelitian tersebut ekstrak *Hydrilla verticillata* positif menunjukkan adanya senyawa steroid pada masing-masing ekstrak saat dilakukan pengujian fitokimia menggunakan reagen Liebermann-Burchard, yang ditandai dengan warna hijau-biru pada larutannya.

2.3.2 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT.

Pemisahan senyawa dapat dilakukan dengan teknik kromatografi lapis tipis (KLT) (Hayati dkk, 2013). KLT merupakan teknik pemisahan campuran senyawa berdasarkan fasa diam yang dilapiskan pada pelat kaca atau alumunium dengan suatu pelarut. Proses pengaliran pelarut yang naik sepanjang permukaan pelat KLT oleh gaya kapiler disebut dengan elusi (Atun, 2014). Sebelum melakukan KLT, pelarut yang akan digunakan sebagai fasa gerak harus dijenuhkan terlebih dahulu sampai terbentuk uap (Rohman, 2007). Jumlah sampel yang dibutuhkan sangat sedikit (Cairns, 2009), dan sudah dilarutkan dalam pelarutnya sebelum ditotolkan pada plat menggunakan pipa kapiler.

Fase gerak (eluen) yang digunakan berdasarkan pada hasil eksperimen sendiri dengan mempertimbangkan sifat dari eluen dan senyawa target (Atun, 2014), semakin dekat kepolaran senyawa target dengan eluen maka senyawa akan semakin mudah terelusi (Skoogda, dkk., 1996). Pemilihan eluen sebaiknya menggunakan pelarut non polar seperti n-heksana, kemudian ditingkatkan kepolarannya dengan pelarut yang lebih polar (Sidora, dkk., 2017). Campuran eluen n-heksana dan etil asetat adalah eluen universal yang paling banyak digunakan untuk kromatografi karena sifatnya yang mudah diuapkan dan mudah diatur kepolarannya dengan penambahan volume pada salah satu pelarutnya (Sundari dan Wibowo, 2015). Eluen yang akan digunakan pada penelitian ini adalah n-Heksana dan etil asetat dengan beberapa perbandingan volume berdasarkan beberapa hasil penelitian terdahulu.

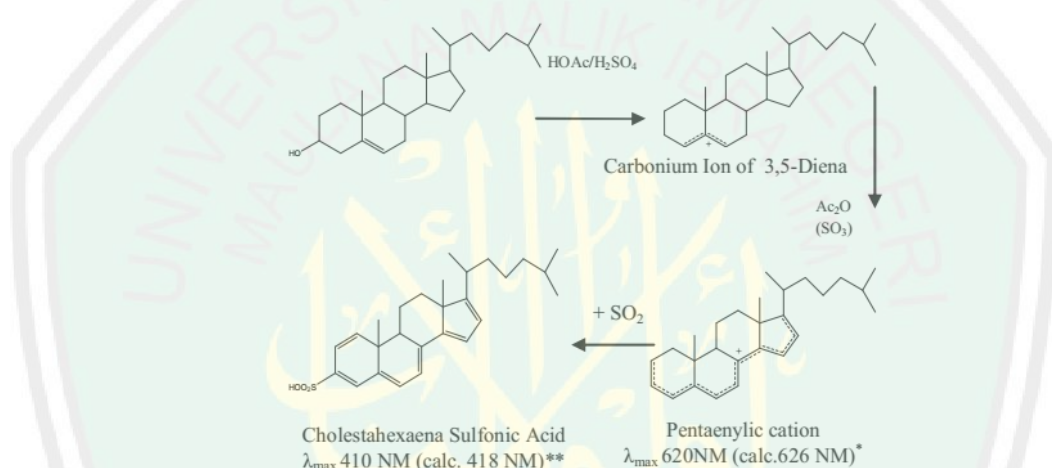
Muharram (2010) melakukan isolasi senyawa metabolit sekunder pada ekstrak n-heksana daun Pare dengan perbandingan eluen KLT 4,75: 0,25 dan

menghasilkan pemisahan noda dan komponen yang jelas setelah disemprot dengan reagen. Zahra, dkk., (2013) memperoleh perbandingan eluen terbaik pada 4,5: 0,5 saat KLT yang akan digunakan sebagai eluen untuk fraksinasi lanjutan dan uji kemurnian ekstrak n-heksana umbi lobak. Azizah, (2016) mengidentifikasi adanya senyawa steroid dari fraksi petroleum eter ekstrak metanol alga merah menggunakan perbandingan eluen 17:3, yang menghasilkan 8 noda dengan 3 diantaranya positif steroid. Hayati, dkk., (2013) mengidentifikasi adanya senyawa steroid dari ekstrak n-Heksana batang kesembukan dengan perbandingan eluen KLT 4: 1, yang menghasilkan 5 noda dengan 4 diantaranya positif steroid. Dukomalamo. dkk., (2016) melakukan pengujian pendahuluan untuk isolasi senyawa dari ekstrak etanol tepung pelepah batang aren menggunakan perbandingan eluen KLT 3,75: 1,25 yang menunjukkan terjadinya pemisahan terbaik dengan 6 noda.

Fasa diam yang digunakan pada KLT mengandung substansi yang dapat berpendar pada sinar ultraviolet (Solihat, 2004), salah satu plat yang sering digunakan dan yang dapat berpendar warna adalah silika G60F254 (Kristanti, 2008). Penotolan sampel pada KLT harus dilakukan dengan hati-hati, agar didapatkan pemisahan yang optimal. Cara yang dapat dilakukan adalah dengan membuat ukuran bercak sempit dan melebar, dengan pengeringan pada setiap totolan (Rohman, 2007). Identifikasi senyawa yang telah terpisah pada lapisan tipis dapat dilakukan menggunakan reaksi penampak noda maupun dideteksi menggunakan lampu UV (254 atau 366 nm) untuk senyawa-senyawa yang dapat menyerap warna (Atun, 2014).

2.3.3 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Uji fitokimia merupakan pengujian kandungan senyawa-senyawa di dalam tumbuhan. Tumbuhan umumnya mengandung senyawa aktif dalam bentuk metabolit sekunder yang salah satunya adalah steroid (Lenny, 2006). Identifikasi steroid dapat dilakukan dengan menggunakan pereaksi warna. Pereaksi yang dapat digunakan adalah reagen Lieberman-Burchard yang menghasilkan warna hijau biru. Berikut adalah dugaan reaksi Lieberman-Burchard yang tergambar pada gambar 2.3.



Gambar 2.3 Dugaan reaksi Liebermann-Burchard (Nafisah, dkk., 2014)

Dengan adanya penambahan asam kuat dari reagen menyebabkan dehidrasi pada senyawa steroid, sehingga membentuk garam yang dapat memberikan warna (Masroh, 2010). Qalbi, dkk., (2017) mengidentifikasi senyawa steroid menggunakan reagen Lieberman-Burchard pada isolat hasil fraksinasi dari ekstrak kloroform daun tumbuhan iler dan menghasilkan perubahan warna isolat menjadi hijau.

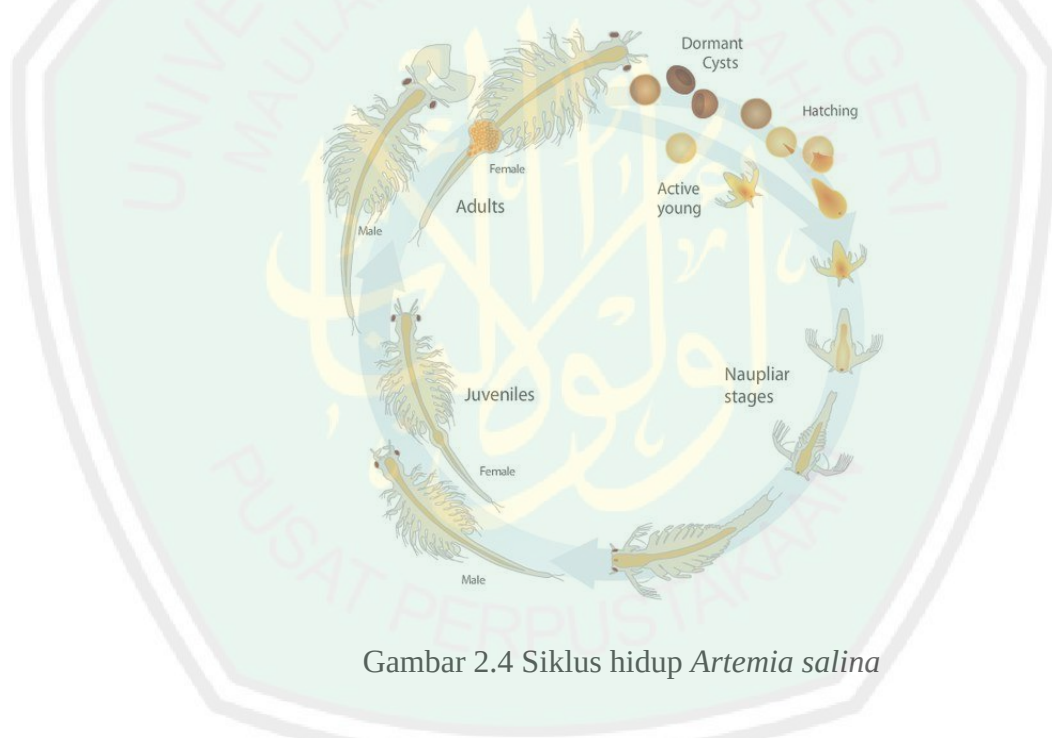
2.4 Uji Toksisitas dengan Metode BSLT

Uji toksisitas bertujuan untuk memaparkan adanya efek toksik dan atau menilai batas keamanan dalam kaitannya dengan penggunaan suatu senyawa. Kadar racun suatu zat kimia salah satunya dapat dinyatakan dengan LC_{50} . Senyawa bioaktif hampir selalu toksik dalam dosis tinggi. Oleh karena itu, daya bunuh *in vivo* dari senyawa terhadap organisme hewan dapat digunakan untuk menguji ekstrak tumbuhan yang mempunyai bioaktivitas. Salah satu organisme yang sangat sesuai untuk uji toksisitas adalah udang laut (Lenny, 2006).

BSLT merupakan salah satu metode uji toksisitas yang banyak digunakan dalam penelusuran senyawa bioaktif yang bersifat toksik dari bahan alam. Metode ini digunakan sebagai *bioassay-guided fractionation* dari bahan alam, karena mudah, cepat, murah, dan cukup *reproducible*. Bioaktivitas yang dapat dideteksi dari skrining awal dengan metode BSLT diantaranya adalah antikanker, antitumor, antimalaria, dan antimikroba (Colegate dan Molyneux, 2007). Jenis udang laut yang artemibiasa digunakan untuk uji toksisitas adalah *Artemia salina*. Uji toksisitas dengan hewan uji dimaksudkan untuk ekstrapolasi hasil terhadap manusia untuk mencari dosis yang aman. Parameter yang ditunjukkan untuk menunjukkan adanya aktivitas biologi pada suatu senyawa pada *Artemia salina* adalah kematiannya (Meyer, dkk., 1982). Klasifikasi *Artemia salina* adalah sebagai berikut (Mudjiman, 1985):

Kerajaan	: <i>Animalia</i>
Divisi	: Arthropoda
Subdivisi	: Crustacea
Kelas	: Branchiopoda
Bangsa	: Anostraca
Suku	: Artemiidae
Marga	: <i>Artemia</i> L.
Jenis	: <i>Artemia salina</i> Leach

Artemia salina termasuk *Crustaceae* yang berukuran 1-2 cm dan sering digunakan sebagai hewan uji. Telur *Artemia salina* dapat bertahan dalam kondisi kering dan dapat disimpan dalam waktu yang cukup lama. *Artemia salina* biasanya diperjual-belikan dalam bentuk kista atau telur istirahat (Farihah, 2008), telur ini dapat menetas apabila diberi air laut pada suhu ruang dalam 1-2 hari dan dapat langsung digunakan untuk uji toksisitas. Siklus hidup *Artemia salina* memerlukan waktu sekitar 25 hari. Kecepatan daur hidup dipengaruhi oleh pH, suhu dan salinitas. Suhu kematian di atas 35°C (Kristanti, dkk. 2008). Siklus hidup *Artemia salina* dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Siklus hidup *Artemia salina*

Tingkat toksisitas dari ekstrak tanaman dapat dilakukan dengan menentukan harga LC_{50} nya. Apabila harga LC_{50} lebih kecil dari 1000 $\mu\text{g/mL}$ dikatakan toksik, sebaliknya apabila harga LC_{50} lebih besar dari 1000 $\mu\text{g/mL}$ dikatakan tidak toksik. Tingkat toksisitas tersebut akan memberi makna terhadap potensi aktivitasnya. Adapun nilai LC_{50} dan potensinya dalam Tabel 2.2 (Meyer, dkk., 1982).

Tabel 2.2. Nilai LC₅₀ ekstrak berpotensi sebagai senyawa bioaktif

LC ₅₀ (ppm)	Potensi
< 30	Antitumor atau anti kanker
30 – 200	Antimikroba
200 > x < 1000	Pestisida

Azizah (2016) melakukan uji toksisitas isolat steroid hasil KLTP fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah dan menghasilkan nilai LC₅₀ terbaik sebesar 18,879 ppm. Hartini dan Suyatno (2016) juga melakukan uji toksisitas isolat steroid ekstrak n-heksana batang ashitaba dengan nilai LC₅₀ sebesar 119,048 ppm.

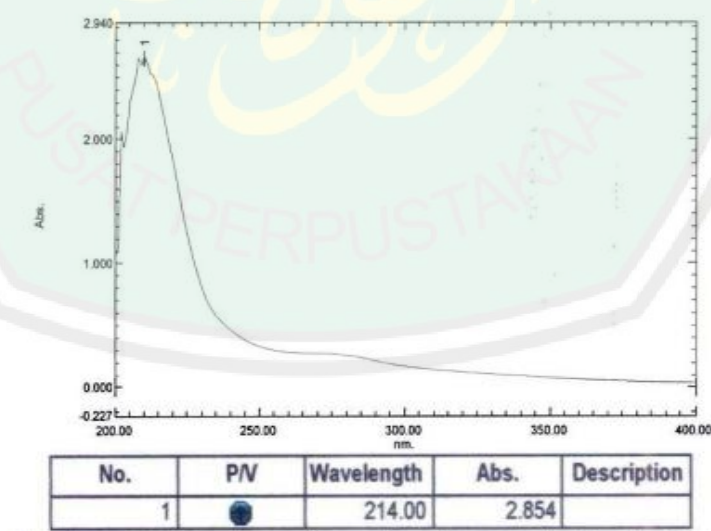
2.5 Identifikasi Isolat Steroid

2.5.1 Identifikasi Isolat Steroid Menggunakan UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis merupakan salah satu jenis spektroskopi yang sering digunakan dalam analisis kimia dan biologi. Spektrofotometer ini didasarkan pada interaksi antara materi dengan radiasi elektromagnetik. Apabila seberkas radiasi (cahaya) dikenakan pada cuplikan (larutan sampel), maka sebagian dari cahaya diserap molekul tersebut. Setiap senyawa dalam sampel memiliki tingkatan energi yang spesifik. Cahaya mempunyai perbedaan energi antara tingkatan dasar dan tingkatan tereksitasi dan sebagian energi cahaya yang sesuai diserap dengan panjang gelombang yang diperoleh. Elektron yang tereksitasi melepaskan energi melalui proses radiasi panas dan akan kembali pada tingkatan dasar lagi. Perbedaan energi antara tingkat dasar dengan tingkat tereksitasi yang spesifik untuk tiap-tiap bahan atau senyawa menyebabkan frekuensi yang diserap juga berbeda-beda (Sastrohamidjojo, 2007). Sinar ultraviolet mempunyai panjang gelombang

antara 200-400 nm, sementara sinar tampak mempunyai panjang gelombang 400-750 nm (Gandjar dan Rohman, 2007).

Jain dan Bari (2010) melakukan isolasi senyawa turunan steroid dari ekstrak petroleum eter batang kayu *Wrightia tinctoria* yang kemudian dianalisis dengan spektrofotometer UV-vis dan berhasil mengidentifikasi adanya senyawa stigmasterol dengan panjang gelombang 257 nm dan kampesterol dengan panjang gelombang 251 nm. Panjang gelombang 257 nm menunjukkan adanya eksitasi elektron dari $\pi \rightarrow \pi^*$ yang merupakan kromofor khas untuk suatu sistem ikatan rangkap terkonjugasi ($-C=C-C=C-$) dari suatu cincin aromatik (Jayanti, dkk., 2012). Rahmawati dan Hidajati (2017) melakukan isolasi dan identifikasi dari ekstrak kulit batang tumbuhan mengkudu dan memperoleh hasil yang diduga adalah senyawa digitoksigenin yang merupakan salah satu senyawa steroid pada tumbuhan dengan panjang gelombang 214 nm yang tergambar pada Gambar 2.5. Transisi elektronik pada rentang 200-400 nm adalah $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$, dan $\pi \rightarrow \pi^*$ (Pitriyana, dkk., 2017)



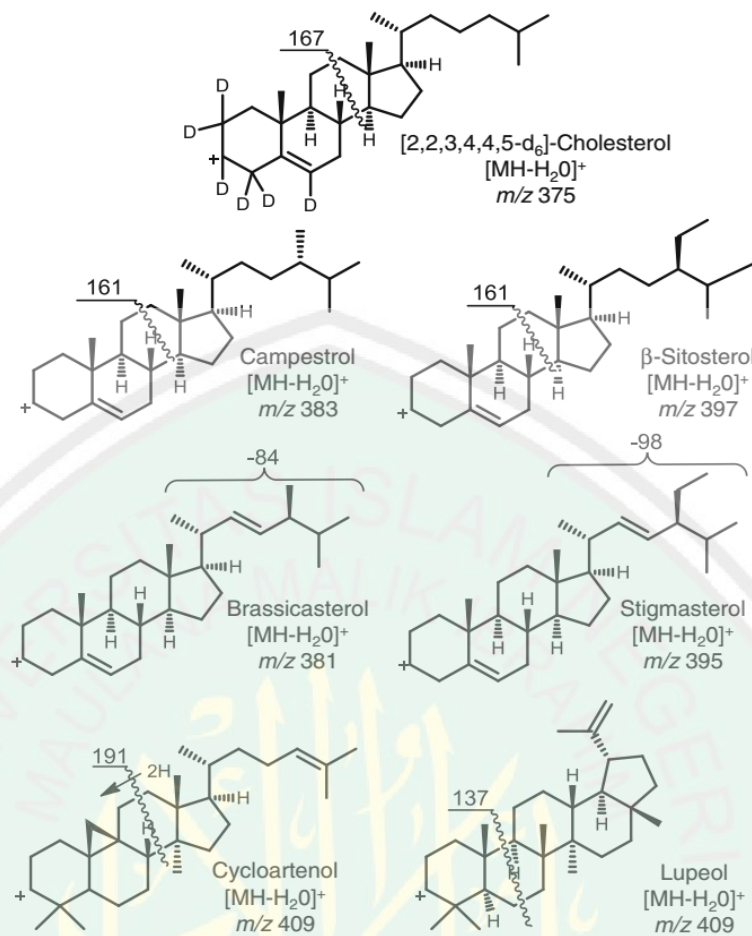
Gambar 2.5 Hasil spektra UV-Vis isolat batang mengkudu (Rahmawati dan Hidajati, 2017)

2.5.2 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan LC-MS/MS

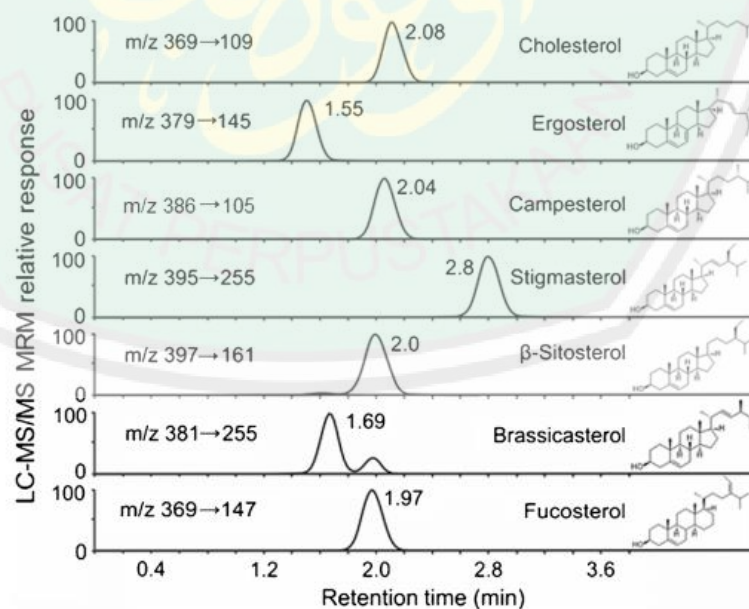
LC-MS/MS adalah teknik analisis yang menggabungkan kemampuan fisik dari kromatografi cair dengan spesifitas deteksi spektrometri massa. Kromatografi cair memisahkan komponen-komponen sampel dan mendeteksi ion-ion bermuatan dengan spektrometer massa. Data yang diperoleh dapat digunakan untuk memberikan informasi tentang berat molekul, struktur, identitas dan kuantitas komponen sampel tertentu (Agilent, 2010). Keuntungan dari LC-MS/MS yaitu dapat menganalisis lebih luas berbagai komponen, seperti senyawa yang volatil, polaritas tinggi atau bermassa molekul tinggi. Senyawa dipisahkan atas dasar interaksi relatif dengan lapisan kimia partikel-partikel (fase diam) dan elusi pelarut melalui kolom (fase gerak). Komponen elusi dari kolom kromatografi kemudian diteruskan ke spektrometer massa melalui antarmuka khusus (Gates 2005). Mo, *et al.*, (2013) mengidentifikasi adanya 6 jenis senyawa dari minyak goreng yang terangkum pada Tabel 2.3, menggunakan metode pengamatan ion secara *Selected Reaction Monitoring* (SRM) dengan metode ionisasi *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI) mode positif yang tergambar pada Gambar 2.6. Pereira, *et al.*, (2016) mengidentifikasi adanya 7 senyawa turunan steroid dari alga cokelat yang tergambar pada Gambar 2.7.

Tabel 2.3 Hasil deteksi senyawa (Mo, *et al.*, 2013)

Jenis Steroid	Waktu Retensi (Menit)	Massa (<i>m/z</i>)	
		Ion Prekursor	Ion Produk
Kolesterol	2	375	161
Brassikasterol	1,9	381	297
Kampesterol	2,3	383	161
Stigmasterol	1,9	395	297
β-sitosterol	2,7	397	161
Sikloartenol	2,1	409	191



Gambar 2.6 Struktur ion prekursor dan ion produk (Mo, *et al.*, 2013)



Gambar 2.7 Spektra LC-MS/MS/MS Alga cekelat (Pereira, *et al.*, 2016)

BAB III

METODOLOGI

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Edukasi Organik, Jurusan Kimia, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, pada bulan April sampai September 2018.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Erlenmeyer 500 ml, gelas pengaduk, gelas arloji, Erlenmeyer vakum, corong Buchner, Gelas ukur 250 ml, *beaker glass*, botol *vial*, pipet tetes, pipet ukur 1 mL, pipet ukur 5 mL, pipet ukur 10 mL, pipa kapiler, bejana pengembang, kertas saring, corong gelas, labu ukur 10 mL, labu ukur 5 mL, bola hisap, spatula, *micropipet*, neraca analitik, desikator, *shaker*, *rotary vacuum evaporator*, lampu UV, *centrifuge*, instrumentasi UV-vis dan LC-MS/MS.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tumbuhan *Hidrilla verticillata* yang berasal dari Danau Ranu Grati, Desa Grati, Kabupaten Pasuruan, telur *Artemia salina*, n-Heksana p.a, petroleum eter p.a, asam asetat anhidrida, Kloroform, etil asetat, asam sulfat, dimetil sulfoksida, aquades, plat silika G60F₂₅₄.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian di laboratorium. Tumbuhan *Hidrilla verticillata* yang telah diambil, dibersihkan, kemudian dikeringkan untuk mengetahui nilai kadar airnya. Sampel dihaluskan dan dimaserasi dengan pelarut n-heksana p.a dan petroleum eter p.a sampai dimungkinkan semua senyawa didalamnya terekstrak oleh pelarut. Hasil maserasi yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator*, dan hasil yang diperoleh dipisahkan senyawanya menggunakan KLTP dengan pemilihan eluan terbaik menggunakan KLTA, noda yang terbentuk dianalisis senyawa steroidnya dengan uji fitokimia, kemudian diamati dengan lampu UV, selanjutnya dikerok dan diuji toksisitasnya menggunakan metode BSLT, dengan konsentrasi sebagai berikut (Astuti, dkk., 2005),

M ₁	: 0 ppm
M ₂	: 1 ppm
M ₃	: 2 ppm
M ₄	: 3 ppm
M ₅	: 4 ppm
M ₆	: 5 ppm

kemudian dilakukan ulangan sebanyak 5 kali. Hasil uji toksisitas tersebut diamati jumlah larva udang yang mati dari total larva uji, kemudian dihitung nilai LC₅₀ dengan memasukkan nilai probit, nilai terendah menunjukkan aktivitas toksik isolat yang terbaik, dan diidentifikasi menggunakan UV-Vis dan LC-MS/MS.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui tahapan berikut:

1. Preparasi sampel.
2. Penentuan kadar air secara termogravimetri.
3. Ekstraksi sampel.
4. Uji Fitokimia.
5. Pemisahan senyawa steroid dengan KLTA.
6. Pemisahan senyawa steroid dengan KLTP.
7. Uji toksisitas senyawa steroid menggunakan metode BSLT.
8. Identifikasi dengan spektrofotometri UV-Vis dan LC-MS/MS.
9. Analisa data.

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Preparasi Sampel (Hafiz, 2017)

Pengambilan sampel di Danau Ranu dilakukan di permukaan air dimana jarak antara permukaan dengan dasar air ± 2 m. Sampel diambil sebanyak 8 Kg dan dicuci dengan air. Selanjutnya dikeringkan di bawah sinar matahari tidak langsung atau dengan naungan sampai kering. Setelah itu, sampel yang sudah kering dihaluskan dengan ukuran ± 90 mesh di Materia Medika Kota Batu.

3.5.2 Penentuan Kadar Air (Hafiz, 2017)

Cawan porselen disiapkan terlebih dahulu, lalu dipanaskan dalam oven pada suhu 100-105 °C sekitar ± 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya. Selanjutnya cawan disimpan dalam desikator sekitar ± 10 menit, lalu ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Setelah itu,

sebanyak 5 g sampel dimasukkan dalam cawan porselen, kemudian dimasukkan dalam oven dan dikeringkan pada suhu 100-105 °C sekitar $\pm$ 15 menit, lalu sampel disimpan dalam desikator sekitar $\pm$ 10 menit dan ditimbang. Sampel tersebut dipanaskan kembali dalam oven $\pm$ 15 menit, didinginkan dalam desikator sekitar $\pm$ 10 menit dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi hingga tercapai berat konstan. Kadar air dalam *Hydrilla verticillata* dihitung menggunakan persamaan (3.1).

$$\text{Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\% \dots\dots\dots(3.1)$$

Dimana : a = bobot cawan kosong

b = bobot sampel + cawan sebelum dikeringkan

c = bobot cawan + sampel setelah dikeringkan

3.5.3 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi komponen aktif dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi. Sampel *Hidrilla verticillata* yang telah dihaluskan kemudian ditimbang masing-masing sebanyak 50 g dan diekstraksi secara maserasi menggunakan 250 mL n-heksana dan 250 mL petroleum eter dalam wadah yang berbeda, dilakukan sebanyak 5 kali dan dilakukan pengocokan menggunakan *shaker* selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm (*rotation per minutes*). Setelah itu, dilakukan penyaringan menggunakan corong Buchner. Ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut yang sama sebanyak 5 kali pengulangan dengan perlakuan yang sama. Kelima filtrat yang telah diperoleh digabung menjadi satu dan dipekatkan dengan *rotary vacum evaporator*. Ekstrak pekat ditimbang lalu dihitung rendemennya dengan persamaan 3.2.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \dots\dots\dots(3.2).$$

3.5.4 Uji Fitokimia Steroid Ekstrak Kasar *Hydrilla verticillata* (Hafiz, 2017)

Ekstrak *Hydrilla verticillata* dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, lalu ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Campuran ini ditambah dengan 1-2 mL H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung tersebut. Hasil uji positif jika terbentuk warna hijau kebiruan.

3.5.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTA (Azizah, 2016)

Pemisahan dengan KLTA dengan menggunakan plat silika G60F₂₅₄ dengan ukuran 1 cm x 10 cm yang sudah diaktifkan dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100 °C selama 10 menit. Ditotolkan Ekstrak kasar yang sudah dilarutkan dengan pelarutnya pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler di masing-masing plat dengan ukuran 1 cm x 10 cm, kemudian dikeringkan dan dielusi dengan fase gerak n-heksana : etil asetat dengan perbandingan tertentu, pada percobaan ini digunakan 5 macam variasi sebagai berikut,

V1 = 4,75 : 0,25 (n-heksana : etil asetat) (Muharram, 2010)

V2 = 4,5 : 0,5 (n-heksana : etil asetat) (Zahra, dkk., 2013)

V3 = 4,25 : 0,75 (n-heksana : etil asetat) (Azizah, 2016)

V4 = 4 : 1 (n-heksana : etil asetat) (Hayati, dkk., 2013)

V5 = 3,75 : 1,25 (n-heksana : etil asetat) (Dukomalomo, dkk., 2016)

Setelah eluen mencapai garis batas, elusi dihentikan. Diamati pemisahan noda yang terbentuk dengan lampu UV pada panjang gelombang 366 nm dan dihitung nilai R_f-nya.

3.5.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP dan Uji fitokimia

Pemisahan senyawa steroid dilakukan dengan KLTP menggunakan plat silika gel G60F₂₅₄ dengan ukuran 10 x 20 cm. ekstrak kasar hasil ekstraksi yang sudah

dilarutkan pada pelarutnya ditotolkan sepanjang plat pada jarak 1 cm dari garis bawah. Sampel dikeringkan dan dielusi dengan menggunakan eluen yang memberikan pemisahan terbaik pada tahap KLTA. Setelah gerakan fase gerak sampai pada garis batas atas, elusi dihentikan. Plat dikeringkan, noda-noda pada permukaan plat diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm, kemudian diamati pada masing-masing spot yang terbentuk. Noda yang diduga senyawa steroid dihitung nilai Rf nya. Masing-masing noda dikerok kemudian dilarutkan dalam pelarutnya, selanjutnya divortex untuk melarutkan, dan disentrifugasi untuk mengendapkan silikanya. Dipisahkan silika dari supernatannya dan diulangi sampai tiga kali, kemudian diuapkan pelarutnya.

Uji fitokimia dilakukan dengan menyemprotkan reagen Lieberman-Burchard, pada potongan plat hasil KLTP berukuran 1 x 20 cm. Hasil uji positif jika spot menghasilkan warna hijau-biru, yang menunjukkan adanya senyawa golongan steroid. Pengamatan dilakukan secara langsung (Suhaenah dan Nuryanti, 2017).

3.5.7 Uji Toksisitas Isolat Steroid Menggunakan Metode BSLT

3.5.7.1 Penetasan Larva Udang (Hafiz, 2017)

Sebanyak 250 mL air laut dimasukkan dalam wadah penetasan, dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina*. Selanjutnya diaerasi dan telur akan menetas dalam waktu $\pm$ 48 jam dengan bantuan sinar lampu pijar 40-60 watt agar suhu penetasan 25-30 °C tetap terjaga, dan siap digunakan sebagai target uji toksisitas.

3.5.7.2 Uji Toksisitas

Perlakuan uji toksisitas dilakukan sebanyak 5 kali ulangan pada masing-masing ekstrak sampel. Konsentrasi larutan uji masing-masing ekstrak dibuat 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm dan 0 ppm sebagai kontrol, kemudian larutan uji

tersebut dimasukkan ke dalam botol vial dan pelarutnya diuapkan hingga kering. Selanjutnya dimasukkan 100 μ L dimetil sulfoksida (DMSO) dan dikocok sampai sampel kira-kira dapat larut, ditambahkan 1 mL air laut, setetes larutan ragi roti kemudian dikocok kembali, dan ditanda bataskan dengan 10 ekor larva udang *Artemia salina* dan air laut sampai volumenya 5 mL, dan dilakukan pengamatan setelah 24 jam terhadap kematian larva udang (Azizah, 2016).

Kontrol pelarut dibuat dengan dua variasi, yaitu pertama kontrol pelarut, dengan cara 200 μ L masing-masing pelarut dimasukkan kedalam botol vial dan diuapkan hingga kering. Kedua, kontrol DMSO dengan cara 200 μ L DMSO dimasukkan ke dalam botol vial. Selanjutnya pada masing-masing kontrol ditanda bataskan sampai volume totalnya menjadi 5 mL dengan air laut, larva udang dan setetes larutan ragi roti. Masing-masing larutan kontrol dilakukan sebanyak 5 kali ulangan. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam terhadap kematian larva udang, kemudian dianalisa probit untuk menunjukkan nilai LC_{50} , dengan menghitung nilai mortalitasnya.

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva (10)}} \times 100\% \dots \dots \dots (3.3).$$

$$\text{Mortalitas} = \% \text{ mortalitas} \times \text{jumlah larva (50)} \dots \dots \dots (3.4).$$

3.5.8 Identifikasi Isolat Steroid

3.5.8.1 Identifikasi Isolat Steroid Menggunakan UV-Vis (Rahmawati, 2016)

Hasil Isolat steroid dengan aktivitas toksisitas paling tinggi diidentifikasi menggunakan UV-Vis. Pelarut dan Isolat steroid yang telah dilarutkan dalam pelarutnya dianalisis pada panjang gelombang 200-800 nm.

3.5.8.2 Identifikasi Isolat Steroid Menggunakan LC-MS/MS (Azizah, 2016)

Isolat senyawa steroid yang memiliki sifat paling toksik atau nilai LC_{50} terendah dianalisa menggunakan LC-MS/MS. Kolom yang digunakan dengan spesifikasi *hypersil gold* (50 mm x 2.1 mm x 1,9 μ m). UHPLC merk ACCELLA type 1250 buatan *Thermo Scientific* yang terdiri dari *degasser* vakum, pompa *quartener*, *autosampler* thermostatik yang dikendalikan oleh komputer melalui program x-calibur 2.1. Fasa gerak yang digunakan adalah 0,1% asam format dalam air (fasa A) dan 0,1% asam format dalam asetonitril (fase B). Pengaturan eluen secara gradien linier 100% (A) : 0% (B) sampai 0% (A) : 100% (B) yang diatur selama 5 menit dengan laju alir 500 μ L/menit. Volume yang diinjeksikan 2 μ L. Kolom dikontrol pada suhu 30 °C, dan kompartemen auto sampler ditetapkan untuk 10 °C. MS yang digunakan adalah MS/MS triple Q (*Quadrupole*) spektrometer massa TSQ QUANTUM ACCESS MAX dari Thermo Finnigan dengan sumber ionisasi APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) dikendalikan oleh software TSQ Tune yang dikendalikan dengan mode positif. Kondisi ion APCI 41 adalah sebagai berikut: Arus yang digunakan 4 μ A, Suhu penguapan 250 °C, Suhu kapiler 300 °C, sheat gas pressure 45 arbitrary units, dan Aux gas pressure 15 arbitrary units. Senyawa aktif yang ditargetkan terangkum dalam Tabel 3.1,

Tabel 3.1 Senyawa target identifikasi dengan LC-MS/MS

Jenis Senyawa	Massa Induk	Massa Anak	Jenis Senyawa	Massa Induk	Massa Anak
β- Sitosterol	397	160,50-161,50	Fukosterol	369	80,50-81,50
Kampesterol	383	160,50-161,50	Ergosterol	379	144,50-145,50
Stigmasterol	395	296,50-297,50	Brassicasterol	381	296,50-297,50
Kolesterol	369	94,50-95,50	Uvaol	409,5	108,50-109,50
Desmosterol	367	160,50-161,50	Eritrodiol	425	216,50-217,50

3.6 Analisa Data

Analisis data dilakukan dengan memperhatikan hasil pada beberapa perlakuan, yakni dengan analisis secara deskriptif dengan memperhatikan pola pemisahan pada masing-masing plat KLT dan penampakan noda pada masing-masing variasi eluen serta warna hijau kebiruan pada noda yang diamati dibawah lampu UV pada 366 nm. Analisa hasil uji toksisitas isolat steroid terhadap larva udang *Artemia salina* menggunakan metode BSLT, dengan di hitung nilai LC₅₀ menggunakan metode analisis probit pada program Minitab dengan tingkat kepercayaan 95%. Analisa hasil identifikasi isolat steroid yang memiliki sifat paling toksik atau nilai LC₅₀ terendah yang didukung dari hasil spektra UV-Vis yang menunjukkan panjang gelombang maksimum (λ maks) dari suatu senyawa dan hasil spektra LC-MS/MS yang menunjukkan nilai rasio massa terhadap muatan (m/z) dari suatu senyawa.

BAB IV

PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Preparasi sampel *Hydrilla verticillata* meliputi pencucian untuk menghilangkan pengotor. Pengeringan dibawah naungan untuk mengurangi kadar air, menghentikan reaksi enzimatik dan mencegah timbulnya mikroba (Manoi, 2015). Tahap terakhirnya adalah penghalusan sampel untuk menghomogenkan ukuran sampel dan memperluas kontak antara serbuk sampel dengan pelarut, sehingga mempermudah proses ekstraksi komponen aktif di dalamnya (Deskawi, dkk., 2015). Semakin besar kontak antara serbuk sampel dengan pelarut dapat mempercepat rusaknya dinding sel, sehingga mempermudah pengambilan kandungan senyawa di dalamnya, dengan pelarut tertentu. Sampel kering *Hydrilla verticillata* yang telah digiling dan diayak dengan ayakan berukuran ± 90 mesh, menghasilkan sebanyak 435 gram serbuk kering dari 8 Kg sampel basah.

4.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri

Penentuan kadar air sampel kering *Hydrilla verticillata* bertujuan untuk mengetahui besarnya kandungan air di dalamnya. Hal ini berkaitan dengan kemurnian dan kemungkinan terjadinya kontaminasi (Azizah dan Salamah, 2013). Metode yang digunakan adalah termografimetri, yaitu metode penghilangan sebagian air dari sampel menggunakan panas pada suhu 100-105 °C selama waktu tertentu sampai diperoleh berat konstan (Jung dan Wells, 1997).

Nilai penentuan kadar air merupakan selisih berat sampel dalam cawan sebelum dan sesudah dioven. Hasil penentuan kadar air pada sampel kering *Hydrilla verticillata* sebesar 9,64%. Nilai tersebut sesuai dengan Peraturan Depkes RI (1994), bahwa kadar air dalam sediaan obat tradisional termasuk ekstrak tidak melebihi batas 10%. Artinya kadar air sampel kering *Hydrilla verticillata* tidak melebihi ambang batas maksimum kadar air yang disyaratkan untuk proses ekstraksi. Hal ini bertujuan agar kandungan air dalam sampel yang telah berbentuk ekstrak tidak ditumbuhi jamur saat disimpan (Ratnani, dkk., 2015).

4.3 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi sampel *Hydrilla verticillata* dilakukan untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar, menggunakan metode ekstraksi maserasi, yang dilakukan dengan merendam sampel menggunakan pelarut organik dengan pengadukan pada suhu ruang (Lenny, 2006). Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk *Hydrilla verticillata* sebanyak 50 gr ke dalam masing-masing pelarutnya dengan perbandingan 1: 5 (sampel: pelarut). Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini berfungsi untuk mengekstrak senyawa-senyawa nonpolar, sehingga digunakan pelarut yang memiliki sifat kepolaran yang sesuai dengan senyawa target, yaitu n-heksana dan petroleum eter. Pengadukan juga dilakukan untuk memaksimalkan kontak sampel dengan pelarut sehingga dapat mempercepat proses ekstraksi. Senyawa-senyawa non polar yang ada di dalam sitoplasma sel sampel akan larut dalam pelarut organik setelah mengalami plasmolisis. Plasmolisis menyebabkan terjadinya pemecahan dinding sel akibat adanya perbedaan tekanan didalam dan diluar sel, sehingga senyawa didalam sitoplasma akan larut pada

pelarut organik selama proses ekstraksi (Ningsih, dkk., 2016). Hasil ekstraksi berupa ekstrak kasar, yang terangkum pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil rendemen ekstrak kasar *Hydrilla verticillata*

Pelarut	Warna Filtrat	Warna Ekstrak Pekat	Berat Ekstrak (gram)	Rendemen (%) (b/b)
n-heksana	Coklat Bening	Coklat Pekat	0,51	1,02
Petroleum Eter	Coklat Bening	Coklat Pekat	0,46	0,92

Berdasarkan hasil rendemen pada Tabel 4.1, dapat diketahui bahwa kadar senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar dalam *Hydrilla verticillata* relatif rendah. Hafiz (2017) dan Hasanah (2017) telah melakukan ekstraksi pada *Hydrilla verticillata* menggunakan metode maserasi, dengan pelarut n-heksana dan petroleum eter. Nilai rendemen yang diperoleh pada masing-masing ekstrak tersebut adalah sebesar 3,80% dan 2,14% dengan berat ekstrak 1,9 gram dan 1,07 gram dari 50 gram sampel kering, dengan warna ekstrak pekat keduanya berwarna coklat pekat. Adanya perbedaan nilai rendemen dengan penelitian terdahulu dimungkinkan dikarenakan perbedaan waktu pengambilan, dan kondisi lingkungan lingkungan

4.4 Uji Fitokimia Steroid Ekstrak Kasar *Hydrilla verticillata*

Uji fitokimia pada ekstrak kasar dilakukan untuk mengetahui adanya kandungan steroid di dalamnya. Pengujian ini dilakukan dengan penambahan reagen Liebermann-Burchard. Hasil pengujian ekstrak kasar n-heksana dan petroleum eter *Hydrilla verticillata* positif mengandung steroid. Hasil uji positif kedua ekstrak ditandai dengan adanya warna hijau kebiruan. Perubahan yang terjadi dikarenakan adanya reaksi oksidasi golongan senyawa steroid melalui

pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi (Robertino, dkk., 2015). Hafiz (2017) dan Hasanah (2017), juga menyatakan bahwa ekstrak kasar n-heksana dan petroleum eter *Hydrilla verticillata* positif mengandung steroid.

4.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTA

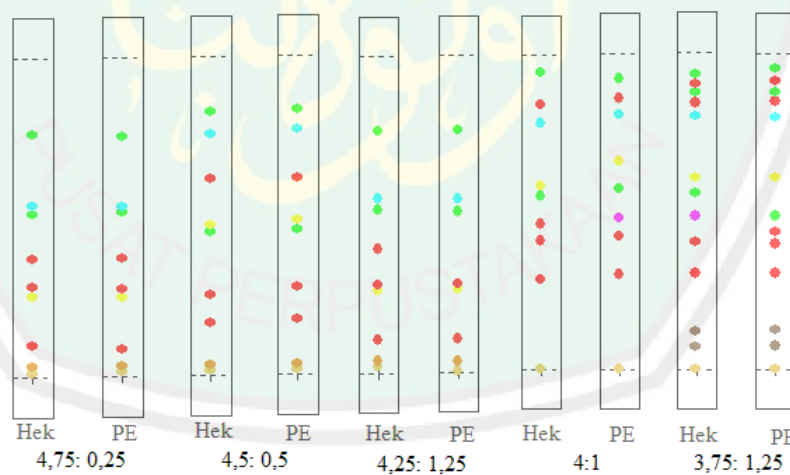
Pemisahan senyawa steroid dengan KLTA dilakukan untuk mencari variasi eluen terbaik yang dapat memisahkan komponen senyawa dari ekstrak *Hydrilla verticillata*. Eluen terbaik merupakan eluen yang dapat memisahkan senyawa dengan baik dan dalam jumlah banyak, ditandai dengan munculnya banyak noda dengan pemisahan noda yang baik (Ramadhani, dkk., 2013). Noda yang terbentuk tidak berekor dan adanya jarak yang jelas antar noda (Zirconia, dkk., 2015). Penggunaan beberapa variasi eluen dilakukan untuk mengatur kepolaran, yang dianggap sudah mewakili kepolaran dari setiap senyawa yang akan dipisahkan. Lima macam perbandingan eluen digunakan sebagai variasi eluen untuk KLTA dengan beberapa sifat yang cenderung ke arah semi polar dan beberapa lainnya non polar.

Plat yang digunakan berukuran 1×10 cm, menggunakan variasi eluen yang telah ditentukan. Pengamatan pola pemisahan noda dilakukan dibawah lampu UV pada panjang gelombang 366 nm. Pemisahan senyawa akan menghasilkan berkas noda dengan warna tertentu yang menunjukkan golongan senyawanya. Senyawa steroid akan menghasilkan warna biru dan hijau saat diamati dibawah lampu UV 366 nm (Pratiwi, 2014). Jumlah noda yang terbentuk dari penggunaan beberapa variasi eluen terangkum pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Jumlah noda yang terbentuk pada KLTA

Variasi Eluen (n-heksana: Etil Asetat)	Ekstrak	Jumlah noda atau noda pada 366 nm
4,75 : 0,25	n-heksana	9
	Petroleum Eter	9
4,5 : 0,5	n-heksana	9
	Petroleum Eter	9
4,25 : 0,75	n-heksana	9
	Petroleum Eter	8
4 : 1	n-heksana	9
	Petroleum Eter	9
3,75 : 1,25	n-heksana	13
	Petroleum Eter	13

Berdasarkan Tabel 4.2, dari kelima variasi eluen yang digunakan, empat diantaranya rata-rata menghasilkan jumlah noda yang sama, dengan satu variasi eluen yaitu 3,75: 1,25 menghasilkan jumlah noda terbanyak. Hasil pola pemisahan variasi eluen pada KLTA saat diamati di bawah lampu UV 366 nm tergambar pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Ilustrasi Penampakan Noda KLTA pada 366 nm

Gambar 4.1, menunjukkan bahwa terdapat beberapa noda terduga steroid dengan pola pemisahan yang berbeda-beda pada masing-masing plat variasi eluen. Pola pemisahan 3,75: 1,25 menghasilkan jumlah noda dan jumlah noda terduga steroid

terbanyak dengan pola pemisahan terbaik, karena adanya jarak yang jelas antar noda yang terbentuk, dengan tidak adanya ekor pada noda yang terduga steroid.

Perbedaan jumlah noda dan pola pemisahan hasil KLTA pada berbagai variasi eluen yang digunakan, dikarenakan adanya perbedaan tingkat kepolaran. Noda yang cenderung memiliki sifat kepolaran tinggi akan menghasilkan nilai R_f lebih rendah, karena senyawa lebih terdistribusi ke fase diam (silika) yang bersifat polar, sementara yang bersifat kepolaran rendah, akan menghasilkan nilai R_f lebih besar, karena lebih terdistribusi ke fase geraknya. Berdasarkan hasil tersebut, maka eluen 3,75: 1,25 digunakan untuk analisa lebih lanjut menggunakan KLTP.

4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP dan Uji Fitokimia

Pemisahan senyawa steroid dengan KLTP dilakukan untuk mendapatkan isolat steroid menggunakan plat berukuran 10×20 cm. Elusi dilakukan dengan perbandingan eluen 3,75: 1,25. Noda yang terbentuk diamati dan diidentifikasi dibawah lampu UV. Uji fitokimia juga dilakukan untuk memvalidasi jenis senyawa pada noda yang terbentuk.

Berdasarkan Tabel 4.3 dapat diketahui bahwa, saat diamati dibawah lampu UV terdapat 2 noda pada ekstrak n-heksana dan 1 noda pada petroleum eter, yang diduga sebagai senyawa steroid, namun terdapat beberapa noda yang memiliki nilai R_f yang hampir sama dengan noda terduga steroid pada plat KLTA, sehingga dilakukan uji fitokimia menggunakan reagen Liebermann-Burchard, dengan cara menyemprotkannya ke potongan plat hasil KLTP ukuran 1×20 cm. Hasil uji positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau dan biru pada noda terduga steroid saat diamati secara langsung (Suhaenah dan Nuryanti, 2017). Pengamatan secara

langsung menghasilkan 3 noda positif steroid pada nomor 10, 15 dan 16 ekstrak n-heksana dan 2 noda pada nomor 10 dan 14 ekstrak petroleum eter. Noda positif steroid pada masing-masing plat dikumpulkan, kemudian dilarutkan dengan pelarutnya dan diuapkan. Hasil penguapan tersebut disebut sebagai isolat steroid. Isolat tersebut kemudian diuji toksisitasnya menggunakan metode BSLT.

Tabel 4.3 Hasil uji fitokimia KLTP

No	Warna Noda Ekstrak									
	n-heksana					Petroleum Eter				
	Rf	Setelah Elusi		Setelah Disemprot Lieberman-Burchard		Rf	Setelah Elusi		Setelah Disemprot Lieberman-Burchard	
		Visual	UV 366 nm	Visual	UV 366 nm		Visual	UV 366 nm	Visual	UV 366 nm
1	0,005	Orange	Orange	Orange	Orange	0,005	Orange	Orange	Orange	Orange
2	0,12	Putih	Merah	Putih	Merah	0,12	Putih	Merah	Putih	Merah
3	0,18	Putih	Putih	Putih	Putih	0,18	Kuning	Putih	Putih	Putih
4	0,26	Putih	Merah	Kuning	Merah	0,26	Kuning	Putih	Putih	Putih
5	0,4	Kuning	Coklat tua	Kuning	Coklat tua	0,41	Putih	Coklat tua	Hijau	Coklat tua
6	0,5	Putih	Merah	Putih	Merah	0,51	Kuning	Merah	Putih	Merah
7	0,54	Putih	Merah	Putih	Merah	0,56	Putih	Merah	Putih	Merah
8	0,58	Putih	Merah	Kuning	Merah	0,58	Hijau	Merah	Hijau Gelap	Merah
9	0,63	Hijau	Merah	Hijau Gelap	Merah	0,61	Hijau	Merah	Hijau Gelap	Merah
10	0,7	Hijau	Hitam	Hijau	Hitam	0,64	Putih	Hijau	Hijau	Hijau
11	0,75	Putih	Kuning	Kuning	Kuning	0,7	Putih	Merah	Putih	Merah
12	0,77	Kuning	Orange	Kuning	Orange	0,78	Putih	Ungu	Putih	Ungu
13	0,88	Putih	Ungu	Kuning	Ungu	0,89	Putih	Merah	Hijau	Merah
14	0,92	Kuning	Orange	Kuning	Orange	0,92	Kuning	Hitam	Putih	Hitam
15	0,93	Kuning	Hitam	Hijau	Hitam	0,94	Putih	Merah	Putih	Merah
16	0,95	Kuning	Hijau	Hijau	Hijau					

4.7 Uji toksisitas Steroid Menggunakan Metode BSLT

Uji toksisitas dilakukan untuk mengetahui aktivitas toksik pada suatu sampel yang digunakan sebagai tahapan awal senyawa yang berpotensi memiliki aktivitas (Vitalia, dkk., 2013). Parameter yang digunakan adalah tingkat kematian udang *Artemia salina*. Tahapan yang dilakukan yaitu,

4.7.1 Penetasan Larva Udang

Penetasan larva udang dilakukan dengan memasukkan sedikit larva udang ke dalam tempat penetasan yang berisi air laut sebagai media tumbuh udang *Artemia salina*. Lampu diletakkan diatas bejana sebagai penghangat suhu selama penetasan,

dan diaerasi selama 48 jam. Menetasnya larva udang *Artemia salina* melalui 3 tahap, yaitu tahap hidrasi, yaitu terjadinya penyerapan air oleh telur yang diawetkan dalam bentuk kering, sehingga menjadi bulat dan aktif bermetabolisme. Tahap pecahnya cangkang dan yang terakhir adalah tahap payung atau pengeluaran sesaat sebelum naupli (larva) keluar dari cangkang (Kristanti, dkk., 2008).

Larva udang *Artemia salina* dapat digunakan sebagai hewan uji toksisitas saat berumur 48 jam. Hal ini dikarenakan pada umur tersebut udang dalam keadaan yang peka, organ-organ tubuh larva yang sudah terbentuk lengkap, yang salah satu contoh organ yang telah terbentuk adalah mulut, seiring dengan terbentuknya mulut larva, maka larva dapat meminum air yang mengandung senyawa steroid *Hydrilla verticillata*, dan cadangan makanannya sudah habis. Makanan larva biasanya berupa ragi roti yang telah dilarutkan dalam aquades, yang berfungsi untuk kelangsungan hidupnya.

4.7.2 Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan dengan menguapkan beberapa mL isolat steroid ekstrak n-heksana dan petroleum eter dengan berbagai variasi konsentrasi dan ulangan yang telah ditentukan. Kedua isolat steroid dari masing-masing ekstrak diuji untuk membandingkan aktivitas antar isolat. Kontrol yang digunakan adalah kontrol pelarut, kontrol DMSO dan kontrol media, pada masing-masing ekstrak. Kontrol pelarut berisi masing-masing pelarutnya, kontrol DMSO berisi cairan DMSO, dan kontrol media berisi air laut.

Hasil pengamatan yang dilakukan selama uji toksisitas menunjukkan bahwa untuk memastikan masing-masing isolat ekstrak larut dalam media uji yang berupa air laut, maka dilakukan penambahan DMSO. DMSO digunakan sebagai surfaktan

karena senyawa uji yang berupa steroid (non polar) memiliki sifat kepolaran yang berbeda dengan air laut (polar). Surfaktan merupakan senyawa yang memiliki ujung hidrofilik dan hidrofobik sehingga dapat melarutkan isolat dalam air laut. Pengamatan terhadap kematian larva udang *Artemia salina* dilakukan 24 jam setelahnya.

Aktivitas toksik suatu senyawa ditandai dengan kematian larva udang *Artemia salina*. Kematian larva udang *Artemia salina* disebabkan adanya senyawa steroid yang masuk kedalam tubuh larva melalui sistem pencernaan. Cara kerja senyawa-senyawa steroid tersebut adalah sebagai racun perut, jika senyawa masuk ke dalam tubuh larva, maka senyawa akan menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva. Hal ini menyebabkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga larva tidak mampu mengenali makanannya, dan akibatnya larva akan mati kelaparan (Vitalia, dkk., 2013).

Tingkat aktivitas toksik suatu senyawa dapat dihitung dengan metode perhitungan LC_{50} . Tabel 4.4 menunjukkan hasil perhitungan nilai LC_{50} pada isolat steroid n-heksana dan petroleum eter.

Tabel 4.4 Nilai LC_{50} isolat steroid

Isolat Ekstrak n-heksana			Isolat Ekstrak Petroleum Eter		
	Nilai LC_{50} (ppm)	Kategori		Nilai LC_{50} (ppm)	Kategori
Isolat 10	2,82	Sangat toksik	Isolat 10	2,71	Sangat toksik
Isolat 15	0,28	Sangat toksik	Isolat 14	2,20	Sangat toksik
Isolat 16	0,37	Sangat toksik			

Berdasarkan Tabel 4.4, kategori LC_{50} masing-masing isolat steroid dari kedua ekstrak bersifat sangat toksik, dengan nilai LC_{50} isolat steroid ekstrak n-heksana lebih rendah dari pada ekstrak petroleum eter. Hal ini menunjukkan isolat steroid ekstrak n-heksana memiliki aktivitas toksik yang lebih tinggi. Aktivitas toksik

tersebut berpotensi sebagai antikanker dan antitumor. Penelitian yang dilakukan oleh Kumala dan Sapitri (2011) menyebutkan bahwa senyawa steroid yang ada dalam ekstrak n-heksana dan petroleum eter menyebabkan kematian larva udang *Artemia salina*. Senyawa steroid yang ada dalam tumbuhan air memiliki sifat toksik atau racun yang dapat membunuh larva udang *Artemia salina* (Azizah, 2016), dan juga dapat menghambat pertumbuhan sel tumor dan kanker (Vickery dan Bickery, 1991).

Berdasarkan hasil uji toksisitas isolat steroid *Hydrilla verticillata* dapat berfungsi sebagai obat. Obat-obatan dan pengobatan adalah salah satu bentuk usaha yang dilakukan untuk mendapatkan kesembuhan dari penyakit. Kedua hal tersebut juga diperbolehkan dalam syariat islam, dan telah dijelaskan sejak zaman Rosulullah SAW dalam suatu hadist yang berbunyi,

عَنْ أُسَامَةَ بْنِ شَرِيكٍ قَالَ كُنْتُ عِنْدَ النَّبِيِّ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ وَجَاءَتْ الْأَعْرَبُ فَقَالُوا يَا رَسُولَ اللَّهِ، أَنْتَ دَاوَى فَقَالَ: نَعَمْ يَا عِبَادَ اللَّهِ، تَدَاوُوا، فَإِنَّ اللَّهَ عَزَّ وَجَلَّ لَمْ يَصْغِ دَاءً إِلَّا وَضَعَ لَهُ شِفَاءً غَيْرَ دَاءٍ وَاحِدٍ. قَالُوا: مَا هُوَ؟ قَالَ: الْهَرَمُ

“Dari Usamah bin Syarik berkata, “ bahwa saya pernah berada di sisi Rasulullah, lalu datang sekelompok Arab badui. Mereka berkata, “Wahai Rasulullah, apakah kami bisa berobat?” Nabi menjawab, “Ya, berobatlah, karena Allah SWT tidak pernah menyimpan satu penyakit, melainkan Dia juga menyediakan penyembuhannya, kecuali untuk satu penyakit saja, lalu mereka berkata, “Apa itu wahai Rasulullah?” Beliau menjawab, “Penyakit usia/masa tua”,”(HR. Ahmad, Al-Bukhari dalam Al-Adabul Mufrad, Abu Dawud, Ibnu Majah, dan At-Tirmidzi, beliau berkata bahwa hadits ini hasan shahih. Syaikhuna Muqbil bin Hadi Al-Wadi’i menshahihkan hadits ini dalam kitabnya Al-Jami’ Ash Shahih mimma Laisa fish Shahihain, 4/486).

Berdasarkan hadist tersebut Rosululloh SAW memposisikan obat dan penyakit sebagai sesuatu yang saling berlawanan, dan setiap penyakit pasti memiliki obat yang telah disediakan oleh Alloh SWT. Obat dapat diperoleh dengan memanfaatkan dan memperhatikan berbagai potensi jenis tumbuhan yang ada dilingkungan sekitar. Proses untuk memanfaatkan tumbuhan sebagai obat merupakan salah satu

sarana untuk berfikir dan mengambil pelajaran atas kekuasaan dan kebaikan Alloh SWT, karena Alloh tidak akan memberikan penyakit kepada mahluk-Nya tanpa menyediakan obatnya. Hal ini berkorelasi dengan ayat Al-Qur'an Surat Asy-Syuara ayat 80.

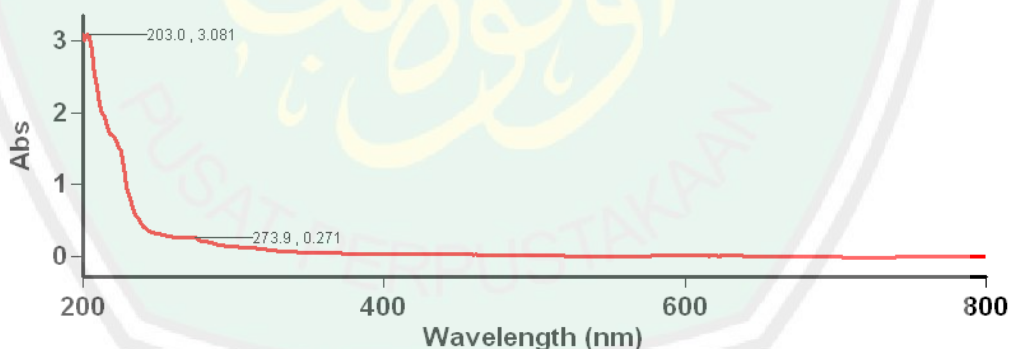
وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ

“Dan apabila aku sakit, Dialah (Allah SWT) yang menyembuhkan aku”

4.8 Identifikasi Isolat Steroid

Identifikasi isolat dilakukan untuk memperkuat dugaan senyawa dari uji fitokimia dan untuk mengetahui jenis senyawanya. Sampel yang diidentifikasi adalah isolat 15 ekstrak n-heksana. Hal ini dikarenakan sampel tersebut mempunyai aktivitas toksik paling tinggi atau nilai LC_{50} terendah, dan dilakukan dengan menggunakan dua macam alat identifikasi yaitu,

4.8.1 Identifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis



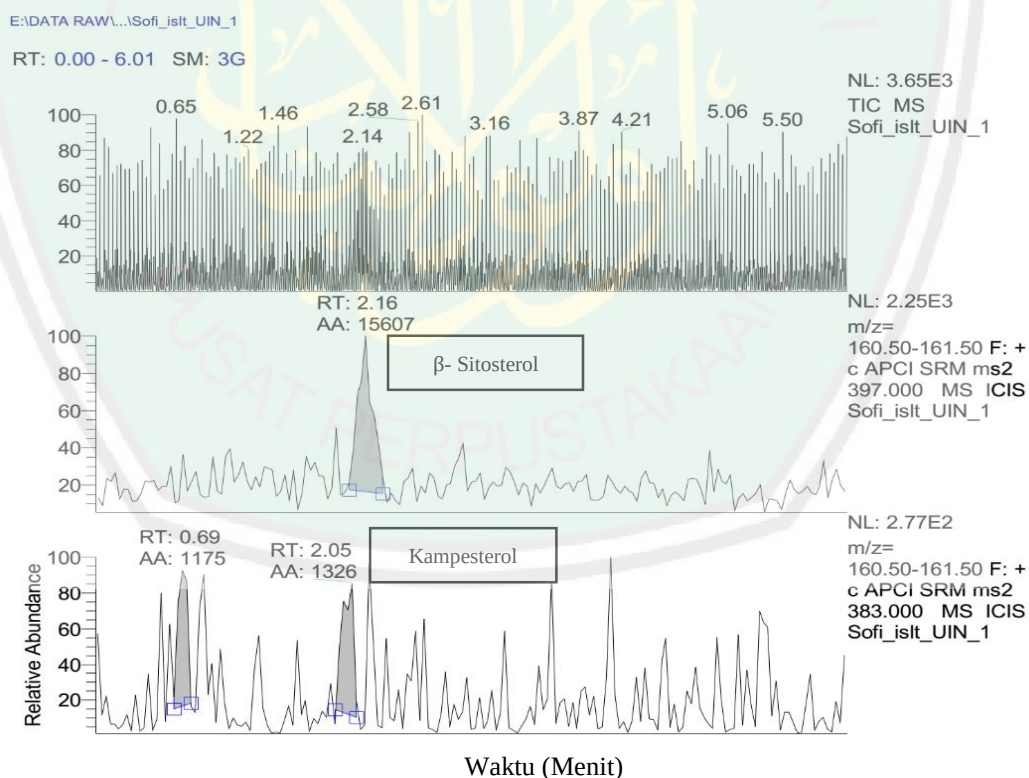
Gambar 4.2 Spektra UV-Vis isolat steroid

Berdasarkan Gambar 4.2, isolat 15 ekstrak n-heksana menghasilkan serapan maksimum pada panjang gelombang 203, dan 273,9 nm. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Aprelia dan suyatno (2013), menunjukkan adanya

serapan maksimum pada 203 nm dari tumbuhan paku yang menunjukkan adanya senyawa β -sitosterol. Sedangkan pada panjang gelombang 273,9 nm diduga terjadi transisi elektronik dari $n-\pi^*$ (Murdianto, dkk., 2010).

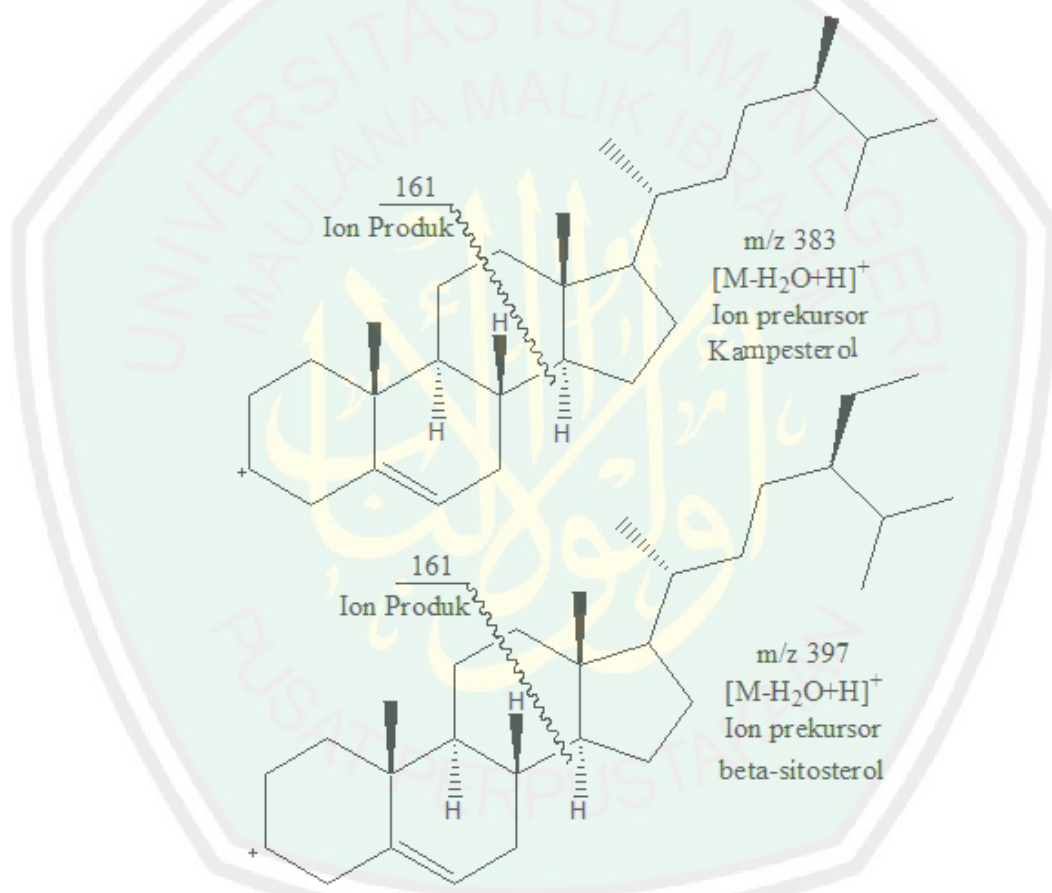
4.8.2 Identifikasi Menggunakan LC-MS/MS

Identifikasi dilakukan pada isolat steroid ekstrak n-heksana yang tergambar pada Gambar 4.3 dan ekstrak kasar n-heksana *Hydrilla verticillata* yang tergambar pada Lampiran 7.2.2. LC-MS/MS merupakan instrumen yang berfungsi untuk memisahkan senyawa berdasarkan berat dan struktur molekul, serta distribusi kepolarannya terhadap fasa diam dan fasa gerak yang digunakan. Hasil data identifikasi berupa kromatogram yang menunjukkan puncak, waktu retensi (RT), dan nilai m/z .



Gambar 4.3 Kromatogram LC-MS/MS isolat steroid *Hydrilla verticillata*

Berdasarkan Gambar 4.3, isolat steroid ekstrak n-heksana menghasilkan dua spektra senyawa. Puncak senyawa β -Sitosterol menunjukkan bentuk puncak tunggal, tinggi dengan ukuran yang lebih besar dari pada puncak-puncak senyawa lain. Puncak senyawa kampesterol menghasilkan puncak lebih kecil dari puncak senyawa β -Sitosterol, berjumlah dua puncak yang berbentuk lurus dengan dugaan sebagai isomernya. Sedangkan, puncak-puncak lain yang ada disebelah puncak senyawa adalah *noise*.



Gambar 4.4 Struktur ion prekursor dan ion produk

Senyawa steroid saat diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS berada pada kondisi ionisasi, sehingga semua senyawa target akan melepaskan molekul air saat terprotonasi (Mo, dkk., 2013) sehingga ion yang terdeteksi berbentuk $[M-H_2O+H]^+$ yang disebut sebagai ion prekursor, dan ion produk yang merupakan hasil

fragmentasi dari ion prekursor dengan nilai m/z nya lebih kecil, dan hanya terdeteksi sebagian dari massa ion prekursornya (Khalaf, dkk., 2011). Struktur ion prekursor dan ion produk tergambar pada Gambar 4.4.

Tabel 4.5 Hasil Deteksi Ion Steroid oleh LC-MS/MS

Jenis Steroid	Waktu Retensi (Menit)	Massa (m/z)				
		M	M-H ₂ O	Ion Prekursor	Ion Produk	Kelimpahan
β -Sitosterol	2, 16	414	396	397	160, 5 – 161, 5	15607
Kampesterol	0, 69 dan 2, 05	400	382	383	160, 5 – 161, 5	1175 & 1326

Tabel 4.5 menunjukkan kelimpahan, kepolaran dan berat molekul senyawa pada isolat steroid ekstrak n-heksana *Hydrilla verticillata*. Senyawa dengan kelimpahan terbesar adalah senyawa β -Sitosterol. Nilai kelimpahan diperoleh dari nilai luas areanya atau *Automatic Area* (AA) dengan nilai sebesar 15607. Kepolaran dari suatu senyawa dapat dilihat dari waktu retensinya, semakin tinggi waktu retensi maka senyawa semakin non polar dan sebaliknya. Senyawa β -Sitosterol memiliki waktu retensi yang lebih besar dari senyawa kampesterol, artinya senyawa β -Sitosterol lebih non polar dibandingkan senyawa kampesterol. Berat molekul senyawa β -Sitosterol sebesar 397 m/z dan kampesterol 383 m/z . Hasil tersebut juga memiliki kemiripan dengan penelitian yang dilakukan oleh Mardaneni (2017), yang telah berhasil mengidentifikasi lima senyawa golongan steroid yang beberapa diantaranya adalah senyawa β -Sitosterol dan kampesterol dari isolat steroid fraksi etil asetat alga merah dengan nilai m/z masing sebesar 397 dan 383.

Kazlowska, dkk., (2013) menyatakan bahwa senyawa β -Sitosterol dan kampesterol ekstrak alga merah dapat mengurangi penyebaran penyakit kanker payudara pada tikus. Woyeongo, dkk., (2009) juga menyatakan bahwa makanan

yang mengandung senyawa filosterol dengan kombinasi β -Sitosterol dan kampesterol dapat menghambat perkembangan sel kanker. Berdasarkan hal tersebut maka kedua senyawa hasil isolasi senyawa steroid ekstrak n-heksana *Hydrilla verticillata* diduga dapat berpotensi sebagai obat antikanker.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan yaitu,

1. Senyawa steroid *Hydrilla verticillata* bersifat sangat toksik, dengan nilai LC₅₀ terbaik dari hasil isolat 15 ekstrak n-heksana sebesar 0,28 ppm.
2. Hasil identifikasi isolat senyawa steroid *Hydrilla verticillata* dengan UV-Vis dan LC-MS/MS, menunjukkan serapan pada panjang gelombang 203 dan 273,9 nm, dan pada LC-MS/MS menghasilkan dua nilai m/z yaitu 397, dan 383 yang menunjukkan adanya senyawa steroid jenis β -Sitosterol dan Kampesterol.

5.2 Saran

Isolasi senyawa steroid dari *Hydrilla verticillata* perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom agar diketahui jenis steroid pada isolat atau perlu dilakukan pengabungan isolat steroid dari beberapa noda terduga steroid jika menggunakan KLT, dan analisa senyawa target yang lebih banyak untuk mengetahui kandungan senyawa steroid secara menyeluruh.

DAFTAR PUSTAKA

- Agilent Technologies. 2010. Basic of LC-MS. USA.
- Ahmed, Y., Rahman, S., Akhtar, P., Islam, F., Rahman, M. dan Yaakob, Z. 2013. Isolation of steroids from n-hexane extract of the leaves of *Saurauinia roxburghii*. *Internatinal Food Research Journal*. 20 (5): 2939-2943.
- Aprelia, F. dan Suyatno, 2013. Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etil Asetat Tumbuhan Paku *Christella arida* dan Uji Pendahuluan Sebagai Antikanker. *UNESA Journal of Chemistry*. 2 (3): 93-99.
- Arnida., Sutomo., Sari, N. dan Fadlilaturrahmah. 2018. Isolasi Senyawa Antioksidan Fraksi Etil Asetat Daun Bilaran Tapah (*Argyrevia nervosa*) Asal Rantau Kalimantan Selatan. *Jurnal Pharmascience*. Vol. 05. No. 01. Hal 45-44.
- Astuti, P., Alam, Gemini., W. Hartati, M, S., Sari, D. dan Wahyuono, S. 2005. Uji Sittotoksik Senyawa Alkaloid dari Spons Petrosia sp: potensial pengembangan sebagai antikanker. *Majalah Farmasi Indonesia*. 16 (1). 58-62.
- Atun, S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Konservasi Cagar Budaya Borobudur*. Volume 8, Nomor 2. 53 – 61.
- Azizah, B. dan Salamh, N. 2013. Standarisasi Parameter Non Spesifik dan Perbandingan Kadar Kurkumin Ekstrak Etanol dan Ekstrak Terpurifikasi Rimpang Kunyit. *J urnal Ilmiah Kefarmasian*. Vol. 3, No. 1. Hal 21-30.
- Azizah, L. N. 2016. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah. *Skripsi*. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Baniszewski, J., Weeks, E. dan Gezan, S.A. 2016. Stem Fragment Regrowth of Hidrilla Verticillata Following Desiccation. *Journal Aquatic Plant Manage*. 54: 53-60.

- Byju, K., Anuradha, V., Rosmine, E., Kumar, N. C., & Nair, S. M. (2013). Chemical characterization of the lipophilic extract of *Hydrilla verticillata*: a widely spread aquatic weed, 22 (September), 304–311. <https://doi.org/10.1007/s13562-012-0159-5>
- Colegate, S. M, dan Molyneux, R. J. 2007. *Bioactive Natural Products: Determination, Isolation and Structural Determination Second Edition*. Prancis: CRC Press.
- Crow, G.E., dan Hellquist, C.B. (2000). *Aquatic and wetland plants of Noretheastern North America*. Volume Two. US: University of Winsconsin.
- Dass, B., D, Pall. Dan A, H. 2015. Pharmacognostical and Physiochemical Study of the Aquatic Weed *Hydrilla Verticillata* (L.F) Royale known as Nutrient Power House. *International Journal of Research in Pharmacy and Science*. 5(1). Hal: 1-5.
- Deskawi, O., Ningsih, R., Avisena, N. Dan Hastitu, E. 2015. Potensi Ekstrak Kasar The Hitam (*Camella sinesis O.K. var. Assamica*) sebagai Pewarna (Dye) pada Pembuatan Sel Surya Tersensitisasi (SSPT). *ALCHEMY*. Vol. 4 No.1. Hal: 50-59.
- Diastuti, H, dan Warsinah. 2010. Identifikasi Senyawa Antikanker dari Ekstrak Kloroform Kulit Batang *Rhizophora mucronata*. *Majalah Farmasi Indonesia*. 21 (4), 266 – 271.
- Dinan, L., Harmatha, J., Lafont, R. 2001. Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. *Journal of Chromatography A*. 935. Hal 105-123.
- Dukomalamo, I., Sangi, M. S. dan Rorong, J. A. 2016. Analisis Senyawa Toksik Tepung Pelepah Batang Aren (*Arenga Pinnata*) dengan Spektroskopi UV-Vis dan Inframerah. *Jurnal MIPA online*. 5 (1). Hal. 54-59.
- Farihah. 2008. Uji Toksisitas Ekstrak Daun *Ficus benjamina* L. Terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Gandjar, I. G dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

- Gates, P. 2005. *High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry (HPLC/MS)*. <http://www.bris.ac.uk/nerclsmf/technique/hplcms.html> diakses pada 03 Desember 2017.
- Goltenboth, F., Timotius, K.H., Milan, P.P., & Margraf, J. (2012). *Ekologi asia tenggara*. Jakarta: Salemba Teknika.
- Guenther, E. 1987. *Minyak Atsiri Jilid I (Terjemahan)*. Jakarta : UI Press. Hal. 44-484.
- Hafiz, M. 2017. Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Metanol, Kloroform Dan N-Heksana Hydrilla Verticillata (L.F) Royle Dari Danau Ranu Kab. Pasuruan Terhadap Larva Udang Artemia Salina Leach. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Harborne. J.B. (1987). *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan Kosasih Padmawinta dan Iwang Soediro. Bandung: ITB
- Hartini, R. S. Dan Suyatno. 2016. Non Fenolik Dari Ekstrak Diklorometana Batang Tumbuhan Ashitaba (*Angelica Keiskei*) Identification And Preliminary Testing Anticancer Activity From The Stems Ashitaba (*Angelica Keiskei*) Of Dicloromethane Extract, (September), 81–86.
- Hasanah, F. 2017. Uji Toksisitas Ekstrak Kasar etanol, Etil Asetat Dan Petroleum Eter Hydrilla Verticillata (L.F) Royle Dari Danau Ranu Kab. Pasuruan Terhadap Larva Udang Artemia Salina Leach. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hayati, E. K., Muti'ah, R. dan Chusna, I. 2013. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak n-Heksana Batang Kesembukan (*Paederia foetida* Linn). *Alchemy*. 2(1): 150-153.
- Hermawan, S. Nasution, Y. R. A. dan Hasibuan, R. 2012. Penentuan Efisiensi Inhibisi Korosi Baja Menggunakan Ekstrak Kulit Buah Kakao. *Jurnal Teknik Kimia*. Vol. 1. N0. 2.

- Jain, P. S. and Bari, S. B. 2010. Isolation of lupeol, stigmasterol and campesterol from petroleum ether extract of woody stem of *Wrightia tinctoria*. *Asian J. Plant Sci.* 9: 163-167.
- Jayanti, N.W., Astitu.M.D., Komari, N. dan Rosyidah, K. 2012. Isolasi dan Uji Toksisitas Senyawa Aktif dari Ekstrak Metilena Klorida (MTC) Lengkuas Putih (*Alpinia galanga (L) Wild*). Vol. 5, No. 2. Hal: 100-108.
- Jung, H. C. dan Wells, W. W. 1997. *Spontaneous Conversion of L-Dehydroascorbic Acid to L-Ascorbic Acid and L-Erythroascorbic Acid*. *Biochemistry & Biophysic Article*. 3559-14.
- Kabinawa, I. N. K. dan Sugiharto, A. 2006. *Spirulina: Ganggang Penggempur Aneka Penyakit*. Agro Media Pustaka: Jakarta.
- Kazlowska, K., Lin, H. T.N., Chang, S. H., dan Tsai G. J. 2013. In Vitro and In Vivo Anticancer Effects of Sterol Fraction From Red Algae *Porphyra Dentata*. *Hindawi Publishing Corporation*. ID 493869.
- Kensa, V. M. dan Neelamegum, R. 2016. GC-MS Determination of Bioactive Constituents of *Hydrilla Verticillata (L.F) Royle*. Collected from Unpolluted and Polluted Water Sources. *Asian Journal of Biology*. 1 (1). Hal: 2-6.
- Krisna, I. G. 2014. Senyawa Steroid pada Daun Gayam (*Inocarpus fagiferus Fosb*) dan Aktivitasnya Sebagai Antioksidan Terhadap Difenil Hidrazil (DPPH). *JURNAL KIMIA* 8, 251-256.
- Kristianti, P. A. 2008. Isolasi dan identifikasi glikosida saponin pada herba krokor (*Portulaca oleracea L.*). *Skripsi*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.
- Kumala, S. dan Sapitri, D. W. 2011. Phytochemical Screening and Toxicological Evaluation Using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) of Some Fractions of Prasman Leaves (*Eupatorium triplinerve V*) Extract. *Indonesia Journal of Cancer Chemoprevention*. 2 (1). Hal: 193-197.
- Kurniawan, M., Izzati, M., & Nurchayati, Y. 2010. Kandungan klorofil, karotenoid, dan vitamin c pada beberapa spesies tumbuhan akuatik. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*. 18(1): 32.

- Langeland, A., Hesthagen, T., & Berger, H.M. (1996). Effects of acidification due to emissions from the Kola Peninsula on fish populations in lakes near the Russian border in northern Norway. *Water, Air and Soil Pollution*. 102:17-36.
- Lee, G.Y., Kim, D.H. dan Kim, D. 2014. Functional Characterization of Steroid Hydroxylase CYP106A1 Derived from *Bacillus megaterium*. *Archives of Pharmacal Research*.
- Lenny, S. (2006). Senyawa Flavonoida, Fenilpropanoida dan Alkaloida. *Usu Repository*, 1–25.
- Manoi, F. 2015. Pengaruh Kehalusan Bahan dan Lama Ekstraksi Terhadap Mutu Ekstrak Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.). *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*. Vol 15 (2): 156-161. Hal: 156-161.
- Marer, P.J., dan Garvey, K.K. 2001. *Aquatic pest control*. USA: University of California.
- Masroh, L. F. 2010. Isolasi Senyawa Aktif dan Uji Toksisitas Ekstrak Heksana Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L Vahl). skripsi. Malang : UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Menteri Kesehatan Republik Indonesia Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor: 661/MENKES/SK/VII/1994 Tentang Persyaratan Obat Tradisional.
- Meyer, B. ., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & McLaughlin, J. L. (1982). Brine shrimp : A Convinient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*, 45(February), 31–34.
- Mo, S., Dong, L., Hurst, W. J. dan Breemen, R. B. v. 2013. Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Springers*. Hal 949-956.
- Mofanato, S. K., Kumari, K. dan Kumari, B. V. 2013. *In vitro* Antibacterial Activity and Phytochemical Analysis of Three Aquatic Plants. *Journal of Theoretical and Experimental Biology*. ISSN: 0972-9720: 27-31. Hal:657-671.

- Mudjiman, A. 1995. *Udang Renik Air Asin (Artemia salina)*. Jakarta: Bhatara Karya Aksara.
- Muharram. 2010. Isolasi dan Uji Bioaktivitas Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak *N-Heksana Daun Pare (Momordica charantia L)*. *Bionature*. Vol. 11 (2). ISSN: 1411-4720. Hal 70-78.
- Murdianto, A. R., Fachriyah, E. dan Kusriani, D. 2013. Isolasi, Identifikasi Serta Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Golongan Triterpenoid Dari Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia (Ten.) Steen*) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *UNDIP Chem Info*. Vol 1, No 1
- Mustofa. 2008. *Fitofarmaka*. <http://fkuii.org>. Diakses pada tanggal 8 April 2017.
- Nafisah, M., Tukiran., Suyatno dan Nurul, H. 2014. Uji Skrining Fitokimia pada Ekstrak Heksan, Kloroform dan metanol dari Tanaman Patikan Kebo (*Euphorbiae hirtae*). *Prosiding seminar Nasional Kimia*. ISBN: 978-602-0951-00-3.
- Ningsih, D. R., Zufahair. Dan Kartika, D. 2016. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder serta Uji Aktivitas Ekstrak Daun Sirsak sebagai Antibakteri. *Molekul*. Vol. 11. No. 1. Hal: 101-111.
- Oliveira, N. M., Meira, C. L. C., Aguiar, R. M., De Oliveira, D. M., Moura, C.W.N., dan Filho, S.A.V. 2015. Biological Activities Of Extracts From *Padina Boergesii* And *Sargassum Stenophyllum*, Seaweeds Naturally Found In Baia De Todos Os Santos Brazil. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 7, Issue 1. ISSN-0975-1491.
- Pereira, C. M.P., Nunes, C. F. P., Villela, L. Z., Streit, N. M., Dias, D., Pinto, E., Gomes, C.B., dan Colepicolo, P. 2016. Extraction Of Sterols In Brown Macroalgae From Antartica And Their Identification By Liquid Chromathigraphy Coupled With Tandem Mass Spectrometry. *J. appl Phycol*.
- Pitriyana, Widiyantoro, A. dan Susanti, R. 2017. Karakterisasi Senyawa Flavonoid dari Fraksi Etil Asetat Bunga Nusa Indah (*Mussaenda erythrophylla*) dan Aktivitas Sitotoksik terhadap Sel Kanker Payudara T47D. *JKK*. Vol. 6(2). Hal: 83-88.

- Poedjiadi, A. 2012. *Dasar-dasar biokimia*. Jakarta: UI Press
- Pozo, O.J., Eenoo, P.V., Deventer, K. dan Delbeke, F.T. 2008. Detection and Characterization of Anabolic Steroids in Doping Aanalysis by LC-MS. *Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 27, No. 8.
- Prabha, S, P., & Rajkumar, J. 2015. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research , 2015 , 7 (3): 1809-1815 Research Article Phytochemical screening and bioactive potential of Hydrilla verticillata, 7(3), 1809–1815.
- Pratiwi, D. A. N. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pacar Kuku (*Lawsonia Inermis L*) dan Bioautografi terhadap *Bacillus Subtilis* dan *shigella Sonnei*. *Skripsi Thesis*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Putri, M. E. 2015. Analisis Parameter Optimum Penyerapan Kation Zn (II) Oleh Biomassa Hydrilla Verticillata. *Widyariset*. Volume 17, Nomor 3: 373-380.
- Qalbi BM, A.N., Djangi, J. dan Muhaedah. 2017. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Kloroform Daun Tumbuhan Iler (*Coleus scutellarioides*, Linn, Benth). *Journal Chemica*. Vol 18. Hal: 48-55.
- Rahmawati, L. M. 2016. Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Senyawa Steroid Isolat Hasil KLTP Fraksi Ptroleum Eter Mikroalga *Chlorella sp*. Menggunakan Uv-Vis. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Rahmawati, M. dan Hidajati, N. 2017. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Metanol Kulit BATANG Tumbuhan Mengkudu. *UNESA Journal of Chemistry*. Vol. 6, No. 2. Hal: 113-118.
- Ramadhani, R. A., Kusriani, D. dan Fachriyah, E. 2013. Isolasi, Identikasi dan Uji Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Etil Asetat Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis L*). *Chem Info*. Vol 1, No 1. Hal 247-255.
- Ramesh, S., Rajan, R., & Santhanam, R. 2014. *Freshwater phytopharmaceutical compounds*. US: CRC Press.
- Ratnani, R. D., Hartati, I., Anas, Y., P, D. E. dan Khilyati, D. D. D. 2015. Standarisasi Spesifik dan Non Spesifik Ekstraksi Hidrotropi *Andrographolid*

- dari Sambiloto. Prosiding Seminar Nasional Peluang Herbal sebagai Alternatif Medicine. ISBN: 978-602-19556-2-8. Hal: 147-155.
- Robertino, I., Widyastuti, S. K. dan Setiasih, N. L. K. 2015. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor (*Moringa Oleifera*). *Indonesia Medicus Veterinus*. ISSN: 2301-7848. Hal: 71-79.
- Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka pelajar.
- Sastrohamidjojo, H. 2007. *Kromatografi*. Yogyakarta: UGM Press.
- Sapar, A. A.S. Kumanireng. N.de Voogd, dan Alfian, N. 2004. Isolasi dan Penentuan Struktur Metabolit Sekunder Atif dari Spons *Biemna triraphis* Asal Pulau Kapodasang (Kepulauan Spermonde). *Marina chimica Acta*. ISSN. 1411-2132. 2-5.
- Seilgazy, M., Li, J. dan Aisa, H. A. 2017. Isolation of Steroidal Esters from Seeds of *Saussurea Involucrata*. *Chemistry of Natural Compounds*. Vol. 53, No. 6. Hal: 1196-1198.
- Shihab, M. Q., 2002. *Tafsiral-Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati.
- Skoog, D. Holler, F. dan Nieman, T. 1996Introduction. In *Principles of Instrumental Analysis*, 5th edition; Brooks/Cole Publishing: Belmont, CA,; pp 15-18.
- Soemirat, J. S. (2005). *Epidemiologi lingkungan*. Yogyakarta : Gadjah Mada University Press
- Solihat, U. 2004. Analisis Kromatografi Tipis dan Kromatografi Kertas. Bandung: Dinas Pendidikan Program Analisis Kimia.
- Suhaenah, S, dan Nuryanti, Siska. 2017. Skrining Fitokimia Ekstrak Jamur Kancing. *Jurnal Fitofarmaka*. Vol. 4. No. 1.
- Suryandari, A. dan Sugianti, Y. 2009. Tumbuhan Air di Danau Limboto, Gorontalo: Manfaat dan Permasalahannya. *BAWAL*. Vol. 2, No. 4. Hal 151-154.
- Tranggono, R. I. dan Latifah, F. 2007. Buku Pegangan Ilmu Pengetahuan Kosmetik. Gramedia Pustaka Utama: Jakarta.

United States Department of Agriculture (USDA). 2012. Federal Noxious Weeds List | USDA PLANTS. <https://plants.usda.gov/java/noxious>

Vembriarto, J. 2013. *Kimia Steroid*. Malang : Universitas Negeri Malang.

Vickery M.L., and Vickery B. 1981. . Secondary Plant Metabolism. London: The McMillan Pr Ltd and Basingtoke. 1981 quoted from Meilani SW. Wood Extractive Substances bioactivity test Suren (*Toona sureni* Merr.) and Ki Bonteng (*Platea latifolia* BL.) Using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT), Faculty of Forestry. Bogor Agricultural University, Bogor 2006, 26-37.

Vitalia, N., Najib, A. dan Ahmad, A. R. 2013. Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pletekan dengan Menggunakan etode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. Vol. 3, No. 1. Hal 124-129.

Voigt, R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi Edisi 5*, Yogyakarta: Gadjah Mada. University Press.

Walukow, A. F. 2011. Kondisi Parameter Biologi Plankton dan Ikan di Perairan Danau Sentani. *Jurnal Biologi Indonesia* 7 (1): 187-193.

Woyengo, T. A., Ramprasath, V. R. dan Jones, P. J. H. 2009. Anticancer Effects of Phytosterol. *European Journal of Clinical Nutrition*. 63. Hal 813-820.

Yang, D.J., Lu, T.J. dan Hwang, L.S. 2003. Isolation and Identification of Steroidal Saponins in Taiwanese Yam Cultivar (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto). *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 51, hal. 6438-6444.

Zahra, U. Muharram, dan Ilyas, A. 2013. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak n-Heksana dari Umbi Lobak. *Al-Kimia*.

Zhang Q, Xu YS, Huang L, Xue W, Sun GQ, Zhang MX, Yu FH. 2012. Does mechanical disturbance affect the performance and species composition of submerged macrophyte communities? *Sci. Rep.* 4(4888):1–6

Zhu, J., Xu, X., Tao, Q., Yi, P., Yu, D., & Xu, X. (2017). High invasion potential of *Hydrilla verticillata* in the Americas predicted using ecological niche modeling combined with genetic data, (April), 1–9. <https://doi.org/10.1002/ece3.3072>.

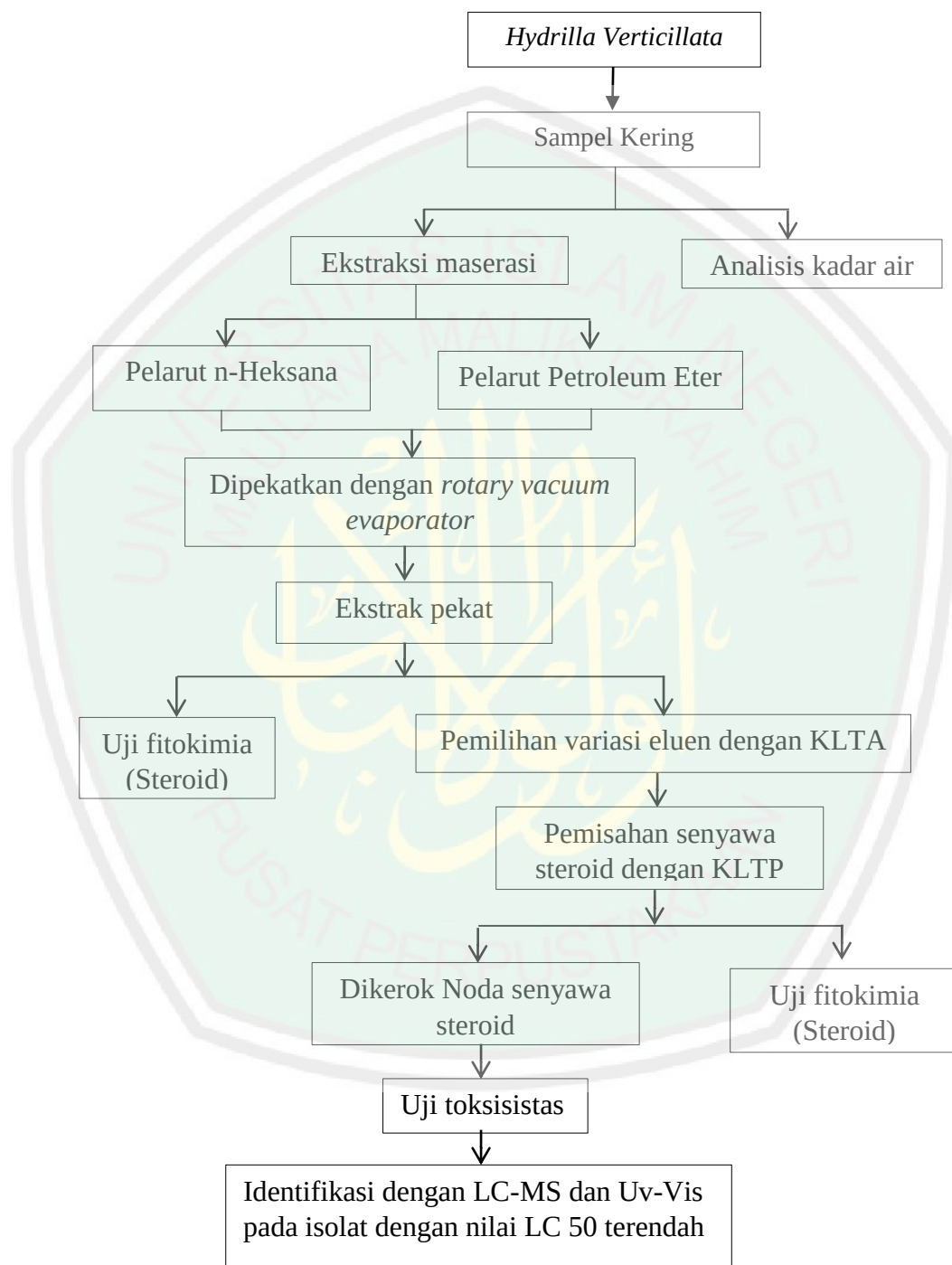
Zirconia, A., Kurniasih, N. dan Amalia, V. 2015. Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Daun Kembang Bulan (*Tithonia Diversifolia*) dengan Metode Pereaksi Geser. *Al Kimiya*. Vol 2, no 1. Hal 9-17.

Zhu, J., Xu, X., Tao, Q., Yi, P., Yu, D. dan Xu, X. 2017. High Invasion Potential of *Hydrilla verticillata* in the Americas Predicted Using Ecological Niche Modeling Combined With Genetic Data. *WILEY*. Hal 1-9.



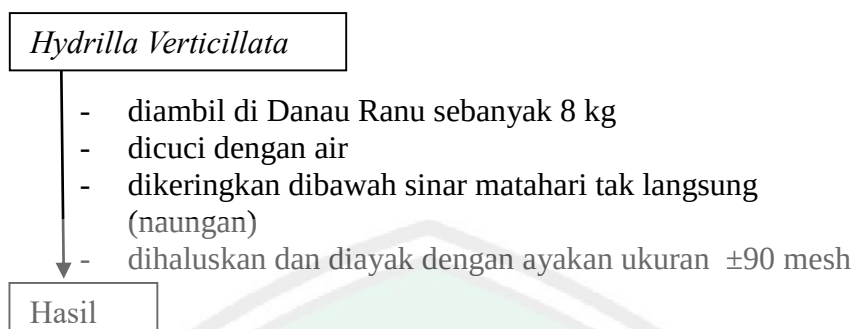
LAMPIRAN

1. Rancangan penelitian

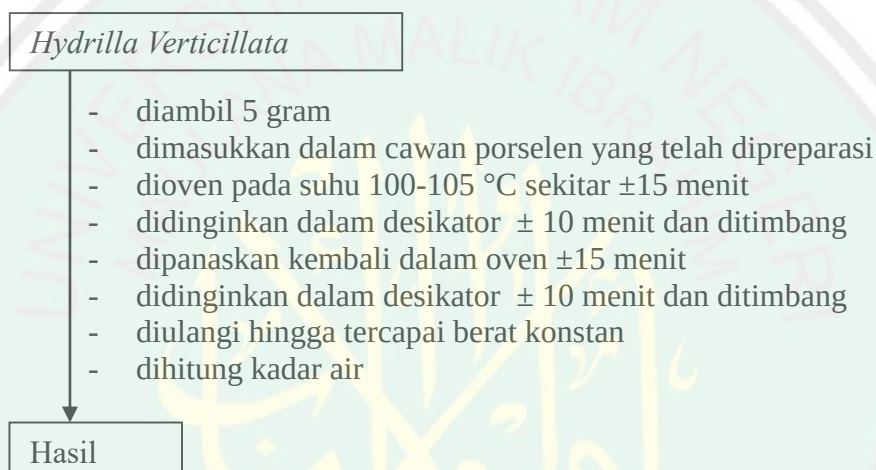


2. Diagram Alir

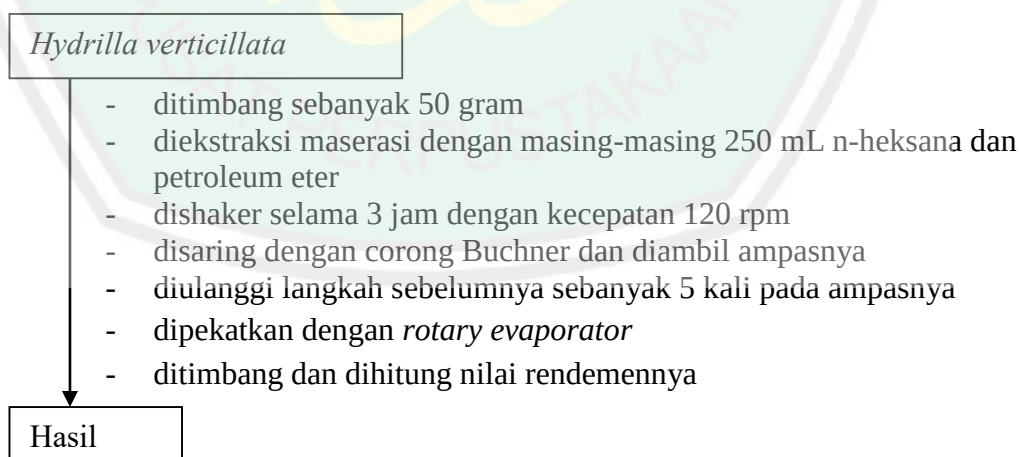
2.1 Preparasi sampel.



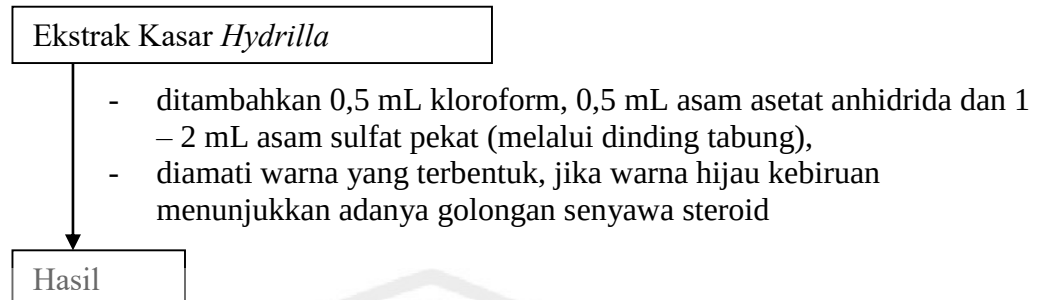
2.2 Penentuan kadar air secara termogravimetri.



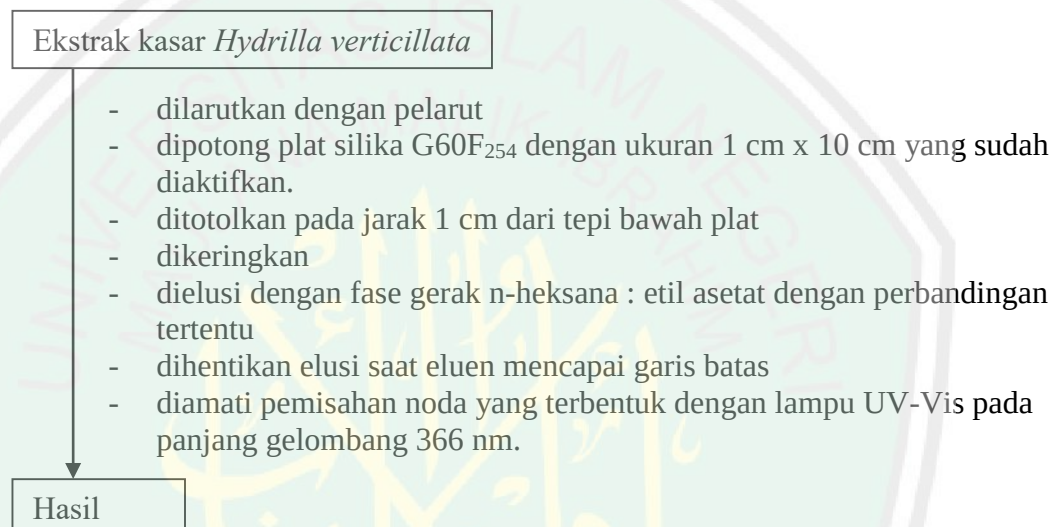
2.3 Ekstraksi maserasi *Hydrilla verticillata*.



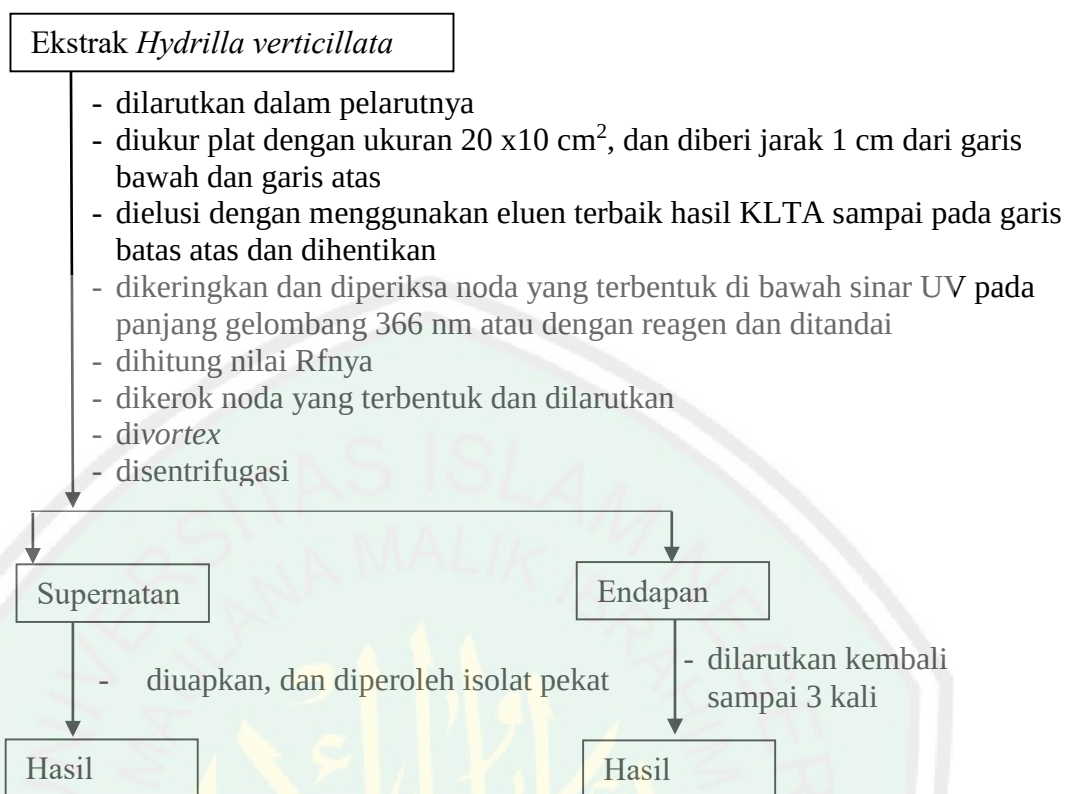
2.4 Uji fitokimia



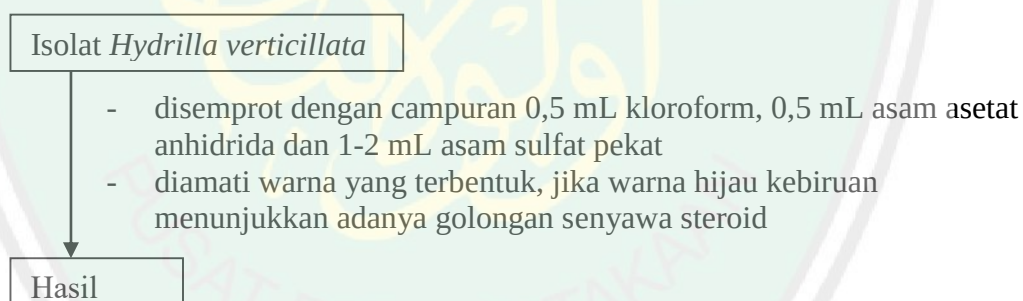
2.5 Pemisahan senyawa steroid dengan KLTA



2.6 Pemisahan senyawa steroid dengan KLTP.

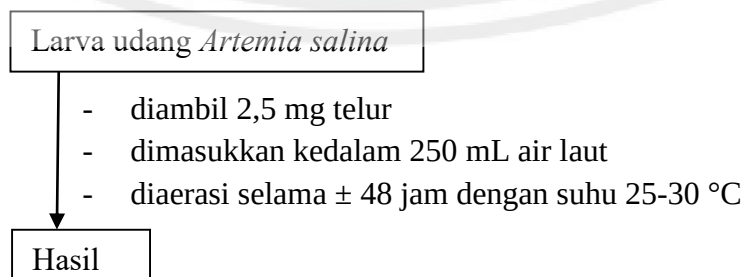


2.7 Uji fitokimia isolat steroid KLTP

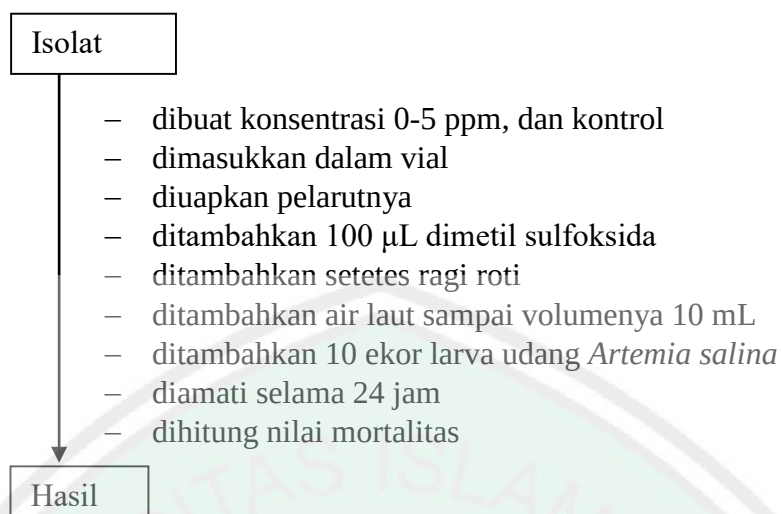


2.8 Uji toksisitas

2.8.1 Penetasan Larva Udang

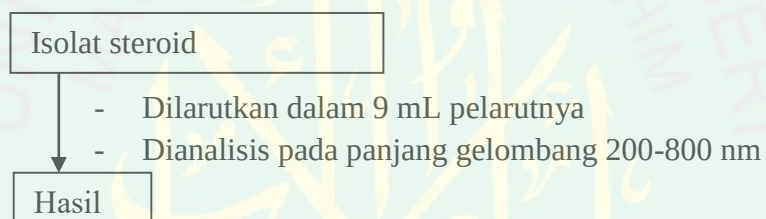


2.8.2 Uji Toksisitas



2.9 Identifikasi Isolat Steroid

2.9.1 Identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis



2.9.2 Identifikasi menggunakan LC-MS/MS



3. Perhitungan

3.1 Pembuatan Reagen *Lieberman-Burchard*

2.9.3 Kloroform = 0,5 mL

2.9.4 Asam asetat anhidrida = 0,5 mL

2.9.5 Asam sulfat pekat = 1 mL

Cara pembuatannya adalah Kloroform 0,5 mL dan asam asetat anhidrida 0,5 mL dicampur ke dalam asam sulfat pekat 1 mL. Penggunaan reagen ini digunakan langsung setelah pembuatan

3.2 Pembuatan Konsentrasi Larutan Isolat untuk uji Toksisitas

3.2.1 Pembuatan Larutan Stok Isolat 10 n-Heksana dan Petroleum Eter

$$\text{Ppm} = \text{mg/L}$$

Larutan stok (ppm) = 4,3 mg/L dalam 5 mL pelarutnya

$$\text{ppm} = \frac{4,3}{0,005 \text{ L}}$$

$$\text{ppm} = 860 \text{ ppm}$$

Jadi, larutan stok 860 ppm pada masing-masing ekstrak dan isolat dibuat dengan dilarutkan 4,3 mg isolat kedalam 5 mL pelarutnya.

Pembuatan Larutan 1 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 860 \text{ ppm} = 0,005 \text{ L} \times 1 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{0,005 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{860 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 0,0000058 \text{ L}$$

$$= 5,8 \mu\text{L}$$

Pembuatan larutan 3 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 300 \text{ ppm} = 0,005 \text{ L} \times 3 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{0,015 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{860 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 0,000017 \text{ L}$$

$$= 17 \mu\text{L}$$

Pembuatan larutan 2 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 260 \text{ ppm} = 0,005 \text{ L} \times 2 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{0,01 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{860 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 0,0000116 \text{ L}$$

$$= 11,6 \mu\text{L}$$

Pembuatan larutan ekstrak 4 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 300 \text{ ppm} = 0,005 \text{ L} \times 4 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{0,00002 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{860 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 0,000023 \text{ L}$$

$$= 23 \mu\text{L}$$

Pembuatan larutan 5 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 300 \text{ ppm} = 0,005 \text{ L} \times 5 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{0,025 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{860 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 0,000029 \text{ L}$$

$$= 29 \mu\text{L}$$

3.2.2 Pembuatan Larutan Stok Isolat 16 n-Heksana

$$\text{Ppm} = \text{mg/L}$$

Larutan stok (ppm) = 6 mg/L dalam 5 mL pelarutnya

$$\text{ppm} = \frac{6}{0,005 \text{ L}}$$

$$\text{ppm} = 1200 \text{ ppm}$$

Jadi, larutan stok 1200 ppm pada masing-masing ekstrak dan isolat dibuat dengan dilarutkan 6 mg isolat kedalam 5 mL pelarutnya.

Pembuatan Larutan 1 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 860 \text{ ppm} &= 0,005 \text{ L} \times 1 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0,005 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{1200 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0,0000041 \text{ L} \\ &= 4,1 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan 2 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 260 \text{ ppm} &= 0,005 \text{ L} \times 2 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0,01 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{1200 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0,0000083 \text{ L} \\ &= 8,3 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan 3 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 300 \text{ ppm} &= 0,005 \text{ L} \times 3 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0,015 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{1200 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0,0000125 \text{ L} \\ &= 12,5 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan ekstrak 4 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 300 \text{ ppm} &= 0,005 \text{ L} \times 4 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0,00002 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{1200 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0,000016 \text{ L} \\ &= 16 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan 5 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 300 \text{ ppm} &= 0,005 \text{ L} \times 5 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0,025 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{1200 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0,000020 \text{ L} \\ &= 20 \mu\text{L} \end{aligned}$$

3.2.3 Pembuatan Larutan Stok Isolat 15 n-Heksana

$$\text{Ppm} = \text{mg/L}$$

Larutan stok (ppm) = 2,8 mg/L dalam 5 mL pelarutnya

$$\text{ppm} = \frac{2,8}{0,005 \text{ L}}$$

$$\text{ppm} = 560 \text{ ppm}$$

Jadi, larutan stok 560 ppm pada masing-masing ekstrak dan isolat dibuat dengan dilarutkan 2,8 mg isolat kedalam 5 mL pelarutnya.

Pembuatan Larutan 1 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 860 \text{ ppm} &= 0.005 \text{ L} \times 1 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0.005 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{860 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0.0000058 \text{ L} \\ &= 5.8 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan 3 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 300 \text{ ppm} &= 0.005 \text{ L} \times 3 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0.015 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{300 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0.00005 \text{ L} \\ &= 50 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan 5 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 300 \text{ ppm} &= 0.005 \text{ L} \times 5 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0.025 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{300 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0.000083 \text{ L} \\ &= 83 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan 2 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 260 \text{ ppm} &= 0.005 \text{ L} \times 2 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0.01 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{260 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0.000038 \text{ L} \\ &= 38 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan ekstrak 4 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 300 \text{ ppm} &= 0.005 \text{ L} \times 4 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0.020 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{300 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0.000067 \text{ L} \\ &= 67 \mu\text{L} \end{aligned}$$

3.2.4 Pembuatan Larutan Stok Isolat 14 Petroleum Eter

$$\text{Ppm} = \text{mg/L}$$

Larutan stok (ppm) = 2,6 mg/L dalam 5 mL pelarutnya

$$\text{ppm} = \frac{2.6}{0.005 \text{ L}}$$

$$\text{ppm} = 520 \text{ ppm}$$

Jadi, larutan stok 520 ppm pada masing-masing ekstrak dan isolat dibuat dengan dilarutkan 2,6 mg isolat kedalam 5 mL pelarutnya.

Pembuatan Larutan 1 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 860 \text{ ppm} &= 0.005 \text{ L} \times 1 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0.005 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{860 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0.0000058 \text{ L} \\ &= 5.8 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan 3 ppm

Pembuatan larutan 2 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 260 \text{ ppm} &= 0.005 \text{ L} \times 2 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0.01 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{260 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0.000038 \text{ L} \\ &= 38 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan ekstrak 4 ppm

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 V_1 \times 300 \text{ ppm} &= 0,005 \text{ L} \times 3 \text{ ppm} \\
 V_1 &= \frac{0,015 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{520 \text{ ppm}} \\
 V_1 &= 0,000029 \text{ L} \\
 &= 29 \mu\text{L}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 V_1 \times 300 \text{ ppm} &= 0,005 \text{ L} \times 4 \text{ ppm} \\
 V_1 &= \frac{0,00002 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{520 \text{ ppm}} \\
 V_1 &= 0,000038 \text{ L} \\
 &= 38 \mu\text{L}
 \end{aligned}$$

Pembuatan larutan 5 ppm

$$\begin{aligned}
 V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\
 V_1 \times 300 \text{ ppm} &= 0,005 \text{ L} \times 5 \text{ ppm} \\
 V_1 &= \frac{0,025 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{520 \text{ ppm}} \\
 V_1 &= 0,000048 \text{ L} \\
 &= 48 \mu\text{L}
 \end{aligned}$$

4. Data Pengukuran Kadar Air dan Perhitungan Rendemen

4.1 Data Pengukuran Kadar Air Sampel *Hydrilla Verticillata* Kering

Berat cawan kosong						Berat konstan (g)
Sebelum dioven	P1	P2	P3	P4	P5	
43, 23	43, 23	43, 23	43, 23	43,23	43, 23	43, 23

Berat konstan (g)						Berat konstan (g)
Sebelum dioven	P1	P2	P3	P4	P5	
48, 23	47, 77	47, 75	47,74	47,74	47,74	47, 748

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar Air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\
 &= \frac{48,23 - 47,748}{5} \times 100\% \\
 &= 9,64 \%
 \end{aligned}$$

4.2 Perhitungan Rendemen

4.2.1 Ekstrak n-Heksana

$$\begin{aligned}
 \text{Berat alas bulat kosong} &= 109,78 \text{ gram} \\
 \text{Berat alas bulat + ekstrak pekat} &= 110,292 \text{ gram} \\
 \text{Berat ekstrak pekat} &= 0,512 \text{ gram}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat Sampel}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,512 \text{ gram}}{50 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 1,204\%
 \end{aligned}$$

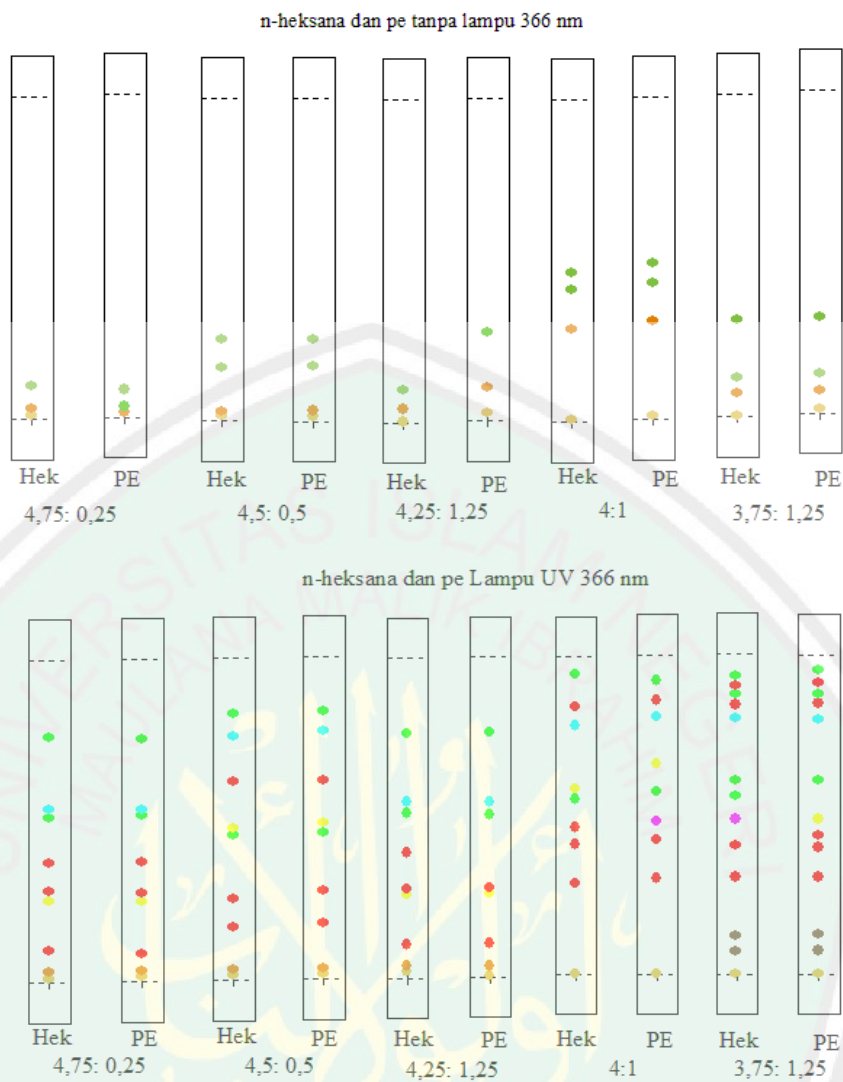
4.2.2 Ekstrak Petroleum Eter

$$\begin{aligned}
 \text{Berat alas bulat kosong} &= 101,26 \text{ gram} \\
 \text{Berat alas bulat + ekstrak pekat} &= 101,722 \text{ gram} \\
 \text{Berat ekstrak pekat} &= 0,462 \text{ gram} \\
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat Sampel}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,462 \text{ gram}}{5 \text{ gram}} \times 100\% \\
 &= 0,924\%
 \end{aligned}$$

5. Hasil KLTA, KLTP dan Perhitungan Rf

5.1 Hasil KLTA

Variasi Eluen	Ekstrak	Jumlah Noda atau Noda pada 366 nm	Jumlah Noda Terduga Steroid
4,75 : 0,25	n-Heksana	9	3
	Petroleum Eter	9	3
4,5 : 0,5	n-Heksana	9	3
	Petroleum Eter	9	3
4,25 : 1,75	n-Heksana	9	3
	Petroleum Eter	8	3
4 : 1	n-Heksana	9	3
	Petroleum Eter	9	3
3,75 : 1,25	n-Heksana	13	5
	Petroleum Eter	13	4



Gambar 5.1 Penampakan Noda KLTA

5.1.1 Hasil KLTA dengan Eluen 4, 75 : 0, 25

Noda	Warna Noda					
	n-Heksana			Petroleum Eter		
	Rf	Tanpa Lampu UV	Lampu UV 366	Rf	Tanpa Lampu UV	Lampu UV 366
1	0,013	Kuning	Oranye	0,013	Kuning	Oranye
2	0,038	Kuning	Oranye	0,038	Kuning	Oranye
3	0,01	Hijau	Merah	0,088	Hijau	Merah
4	0,25	Hijau	Kuning	0,25	Hijau	Kuning
5	0,28	Putih	Merah	0,28	Putih	Merah
6	0,38	Putih	Merah	0,38	Putih	Merah
7	0,50	Putih	Hijau	0,51	Putih	Hijau
8	0,53	Putih	Biru	0,54	Putih	Biru
9	0,75	Kuning	Hijau	0,76	Kuning	Hijau

5.1.2 Hasil KLTA dengan Eluen 4, 5 : 0,5

Noda	Warna Noda					
	n-Heksana			Petroleum Eter		
	Rf	Tanpa Lampu UV	Lampu UV 366	Rf	Tanpa Lampu UV	Lampu UV 366
1	0,013	Kuning	Oranye	0,013	Kuning	Oranye
2	0,038	Kuning	Oranye	0,038	Kuning	Oranye
3	0,17	Hijau	Merah	0,17	Hijau	Merah
4	0,25	Hijau	Merah	0,27	Hijau	Merah
5	0,45	Putih	Hijau	0,45	Putih	Hijau
6	0,47	Putih	Kuning	0,48	Putih	Kuning
7	0,61	Putih	Merah	0,61	Putih	Merah
8	0,75	Putih	Biru	0,77	Putih	Biru
9	0,82	Kuning	Hijau	0,83	Kuning	Hijau

5.1.3 Hasil KLTA dengan Eluen 4, 25 : 0, 75

Noda	Warna Noda					
	n-Heksana			Petroleum Eter		
	Rf	Tanpa Lampu UV	Lampu UV 366	Rf	Tanpa Lampu UV	Lampu UV 366
1	0,025	Kuning	Oranye	0,006	Kuning	Oranye
2	0,44	Kuning	Oranye	0,038	Kuning	Oranye
3	0,1	Hijau	Merah	0,1	Hijau	Merah
4	0,26	Hijau	Kuning	0,25	Hijau	Kuning
5	0,28	Putih	Merah	0,28	Putih	Merah
6	0,39	Putih	Merah	0,5	Putih	Hijau
7	0,51	Putih	Hijau	0,54	Putih	Biru
8	0,55	Putih	Biru	0,76	Kuning	Hijau
9	0,77	Kuning	Hijau			

5.1.4 Hasil KLTA dengan Eluen 4 : 1

Noda	Warna Noda					
	n-Heksana			Petroleum Eter		
	Rf	Tanpa Lampu UV	Lampu UV 366	Rf	Tanpa Lampu UV	Lampu UV 366
1	0,001	Kuning	Oranye	0,006	Kuning	Oranye
2	0,3	Kuning	Merah	0,3	Kuning	Merah
3	0,41	Hijau	Merah	0,42	Hijau	Merah
4	0,46	Hijau	Merah	0,48	Hijau	Ungu
5	0,55	Putih	Hijau	0,57	Putih	Hijau
6	0,57	Putih	Kuning	0,6	Putih	Kuning
7	0,78	Putih	Biru	0,8	Putih	Biru
8	0,84	Putih	Merah	0,85	Putih	Merah
9	0,94	Kuning	Hijau	0,92	Kuning	Hijau

5.1.5 Hasil KLTA dengan Eluen 3,75 : 1, 25

Noda	Warna Noda					
	n-Heksana			Petroleum Eter		
	Rf	Tanpa Lampu UV	Lampu UV 366	Rf	Tanpa Lampu UV	Lampu UV 366
1	0,006	Kuning	Oranye	0,006	Kuning	Oranye
2	0,075	Kuning	Hitam Kecoklatan	0,075	Kuning	Hitam Kecoklatan
3	0,12	Hijau	Hitam Kecoklatan	0,12	Hijau	Hitam Kecoklatan
4	0,3	Hijau	Merah	0,3	Hijau	Merah
5	0,4	Putih	Merah	0,4	Putih	Merah
6	0,43	Putih	Merah	0,49	Putih	Ungu
7	0,48	Putih	Hijau	0,55	Putih	Hijau
8	0,6	Putih	Kuning	0,6	Putih	Kuning
9	0,8	Putih	Biru	0,8	Putih	Biru
10	0,85	Putih	Merah	0,84	Putih	Merah
11	0,875	Putih	Hijau	0,87	Putih	Hijau
12	0,91	Putih	Merah	0,9	Putih	Merah
13	0,94	Kuning	Hijau	0,93	Kuning	Hijau

5.2 Hasil KLTP

No	Warna Noda Ekstrak									
	n-heksana					Petroleum Eter				
	Rf	Setelah Elusi		Setelah Disemprot Lieberman-Burchard		Rf	Setelah Elusi		Setelah Disemprot Lieberman-Burchard	
		Visual	UV 366 nm	Visual	UV 366 nm		Visual	UV 366 nm	Visual	UV 366 nm
1	0,005	Orange	Orange	Orange	Orange	0,005	Orange	Orange	Orange	Orange
2	0,12	Putih	Merah	Putih	Merah	0,12	Putih	Merah	Putih	Merah
3	0,18	Putih	Putih	Putih	Putih	0,18	Kuning	Putih	Putih	Putih
4	0,26	Putih	Merah	Kuning	Merah	0,26	Kuning	Putih	Putih	Putih
5	0,4	Kuning	Coklat tua	Kuning	Coklat tua	0,41	Putih	Coklat tua	Hijau	Coklat tua
6	0,5	Putih	Merah	Putih	Merah	0,51	Kuning	Merah	Putih	Merah
7	0,54	Putih	Merah	Putih	Merah	0,56	Putih	Merah	Putih	Merah
8	0,58	Putih	Merah	Kuning	Merah	0,58	Hijau	Merah	Hijau Gelap	Merah
9	0,63	Hijau	Merah	Hijau Gelap	Merah	0,61	Hijau	Merah	Hijau Gelap	Merah
10	0,7	Hijau	Hitam	Hijau	Hitam	0,64	Putih	Hijau	Hijau	Hijau
11	0,75	Putih	Kuning	Kuning	Kuning	0,7	Putih	Merah	Putih	Merah
12	0,77	Kuning	Orange	Kuning	Orange	0,78	Putih	Ungu	Putih	Ungu
13	0,88	Putih	Ungu	Kuning	Ungu	0,89	Putih	Merah	Hijau	Merah
14	0,92	Kuning	Orange	Kuning	Orange	0,92	Kuning	Hitam	Putih	Hitam
15	0,93	Kuning	Hitam	Hijau	Hitam	0,94	Putih	Merah	Putih	Merah
16	0,95	Kuning	Hijau	Hijau	Hijau					

6 Data Hasil Uji Toksisitas

6.1 Data Hasil Uji Toksisitas Isolat Ekstrak n-Heksana

6.1.1 Data Hasil Uji Toksisitas Isolat 10

Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva yang Mati (Ekor)					Modus	% Mortalitas
	I	II	III	IV	V		
0 ₁	0	0	0	0	0	0	0
0 ₂	0	0	0	0	0	0	0
0 ₃	0	0	0	0	0	0	0
1	3	3	3	5	5	3	30
2	4	4	4	7	7	4	40
3	3	5	5	8	7	2	50
4	6	6	8	4	9	6	60
5	8	5	8	7	6	8	80

0₁ = pelarut, 0₂ = DMSO, 0₃ = 0 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{modus}}{10} \times 100\%$$

Konsentrasi (ppm)	Jumlah hewan uji (ekor)	Mortalitas
0 ₁	50	0
0 ₂	50	0
0 ₃	50	0
1	50	15
2	50	20
3	50	25
4	50	30
5	50	40

$$\text{Mortalitas} = \frac{\% \text{ mortalitas}}{100} \times \text{jumlah hewan uji (50)}$$

Probit Analysis: mortalitas 10 hek, N versus Konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas 10 hek	Event	130
	Non-event	120
N	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-0.901288	0.195656	-4.61	0.000
Konsentrasi	0.319409	0.0598808	5.33	0.000

Natural
Response 0

Log-Likelihood = -158.122
Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	1.18747	3	0.756
Deviance	1.20034	3	0.753

Tolerance Distribution

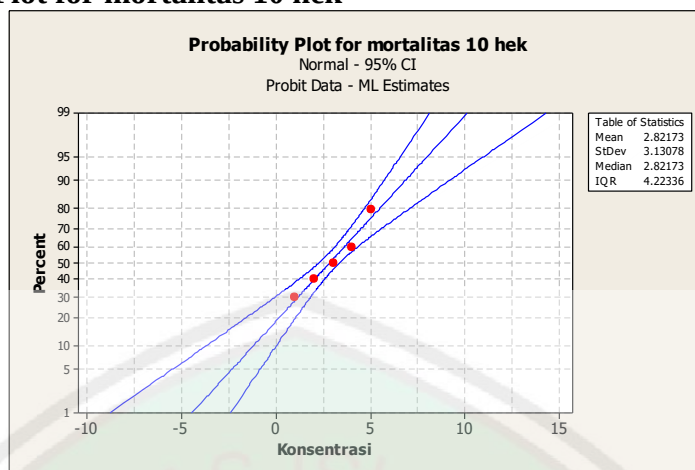
Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	2.82173	0.258876	2.31435	3.32912
StDev	3.13078	0.586939	2.16808	4.52096

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-4.46155	1.41584	-8.82168	-2.41973
2	-3.60810	1.25885	-7.47839	-1.78969
3	-3.06662	1.15967	-6.62695	-1.38912
4	-2.65928	1.08534	-5.98702	-1.08722
5	-2.32794	1.02510	-5.46692	-0.841207
6	-2.04592	0.974017	-5.02460	-0.631444
7	-1.79864	0.929389	-4.63710	-0.447195
8	-1.57724	0.889580	-4.29044	-0.281924
9	-1.37588	0.853516	-3.97544	-0.131337
10	-1.19052	0.820453	-3.68576	0.0075473
20	0.186803	0.580965	-1.54563	1.05203
30	1.17995	0.422203	-0.0309684	1.83371
40	2.02856	0.311611	1.20969	2.55518
50	2.82173	0.258876	2.25341	3.34542
60	3.61491	0.284878	3.10753	4.32526
70	4.46352	0.381115	3.86093	5.53399
80	5.45667	0.533429	4.65610	7.03515
90	6.83399	0.769726	5.70704	9.16882
91	7.01935	0.802558	5.84639	9.45804
92	7.22071	0.838399	5.99742	9.77259
93	7.44211	0.877994	6.16312	10.1188
94	7.68939	0.922414	6.34778	10.5059
95	7.97141	0.973296	6.55795	10.9478
96	8.30275	1.03333	6.80437	11.4675
97	8.71009	1.10745	7.10668	12.1071
98	9.25157	1.20641	7.50769	12.9580
99	10.1050	1.36315	8.13822	14.3008

Probability Plot for mortalitas 10 hek



6.1.2 Data Hasil Uji Toksisitas Isolat 15

Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva yang Mati (Ekor)					Modus	% Mortalitas
	I	II	III	IV	V		
0 ₁	0	0	0	0	0	0	0
0 ₂	0	0	0	0	0	0	0
0 ₃	0	0	0	0	0	0	0
1	5	5	3	5	4	5	50
2	7	2	6	5	6	6	60
3	8	7	6	7	5	7	70
4	6	4	7	7	6	7	70
5	5	7	7	8	7	7	70

0₁ = pelarut, 0₂ = DMSO, 0₃ = 0 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{modus}}{10} \times 100\%$$

Konsentrasi (ppm)	Jumlah hewan uji (ekor)	Mortalitas
0 ₁	50	0
0 ₂	50	0
0 ₃	50	0
1	50	25
2	50	30
3	50	35
4	50	35
5	50	35

$$\text{Mortalitas} = \frac{\% \text{ mortalitas}}{100} \times \text{jumlah hewan uji (50)}$$

Probit Analysis: mortalitas 15 hek, N versus Konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas 15 hek	Event	160
	Non-event	90
N	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-0.0378368	0.188428	-0.20	0.841
Konsentrasi	0.134139	0.0578665	2.32	0.020
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -160.643

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	1.40104	3	0.705
Deviance	1.41069	3	0.703

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

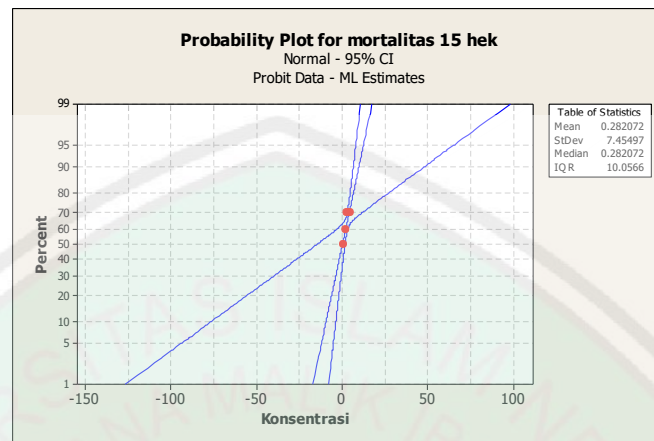
Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI Lower	Upper
Mean	0.282072	1.29615	-2.25833	2.82248
StDev	7.45497	3.21602	3.20069	17.3640

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI Lower	Upper
1	-17.0608	8.64718	-126.538	-7.85803
2	-15.0286	7.77292	-113.388	-6.75210
3	-13.7392	7.21853	-105.045	-6.04983
4	-12.7692	6.80169	-98.7697	-5.52114
5	-11.9803	6.46277	-93.6654	-5.09079
6	-11.3087	6.17442	-89.3211	-4.72426
7	-10.7199	5.92170	-85.5122	-4.40266
8	-10.1927	5.69552	-82.1019	-4.11451
9	-9.71322	5.48990	-79.0006	-3.85228
10	-9.27186	5.30072	-76.1461	-3.61072
20	-5.99219	3.89866	-54.9416	-1.80835
30	-3.62732	2.89539	-39.6673	-0.493160
40	-1.60662	2.05140	-26.6434	0.658083
50	0.282072	1.29615	-14.5449	1.80875
60	2.17077	0.692445	-2.92549	3.43845
70	4.19146	0.815591	2.99647	11.6916
80	6.55634	1.67709	4.66665	26.6110
90	9.83600	3.03906	6.55222	47.7322
91	10.2774	3.22582	6.79865	50.5819
92	10.7568	3.42917	7.06544	53.6786
93	11.2841	3.65321	7.35787	57.0846
94	11.8729	3.90389	7.68353	60.8894

95	12.5444	4.19029	8.05396	65.2298
96	13.3334	4.52730	8.48810	70.3304
97	14.3033	4.94225	9.02056	76.6021
98	15.5927	5.49466	9.72674	84.9408
99	17.6249	6.36669	10.8371	98.086

Probability Plot for mortalitas 15 hek



6.1.3 Data Hasil Uji Toksisitas Isolat 16

Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva yang Mati (Ekor)						% Mortalitas
	I	II	III	IV	V	Modus	
0 ₁	0	0	0	0	0	0	0
0 ₂	0	0	0	0	0	0	0
0 ₃	0	0	0	0	0	0	0
1	5	5	4	6	8	5	50
2	7	8	3	7	7	7	70
3	7	8	4	8	8	8	80
4	3	4	6	8	6	6	60
5	9	6	5	9	3	9	90

0₁ = pelarut, 0₂ = DMSO, 0₃ = 0 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{modus}}{10} \times 100\%$$

Konsentrasi (ppm)	Jumlah hewan uji (ekor)	Mortalitas
0 ₁	50	0
0 ₂	50	0
0 ₃	50	0
1	50	25
2	50	35
3	50	40
4	50	30
5	50	45

$$\text{Mortalitas} = \frac{\% \text{ mortalitas}}{100} \times \text{jumlah hewan uji (50)}$$

Probit Analysis: mortalitas 16 hek, N versus Konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas 16 hek	Event	175
	Non-event	75
N	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-0.0772717	0.193325	-0.40	0.689
Konsentrasi	0.208083	0.0612364	3.40	0.001
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -146.766

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	13.9894	3	0.003
Deviance	13.2811	3	0.004

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

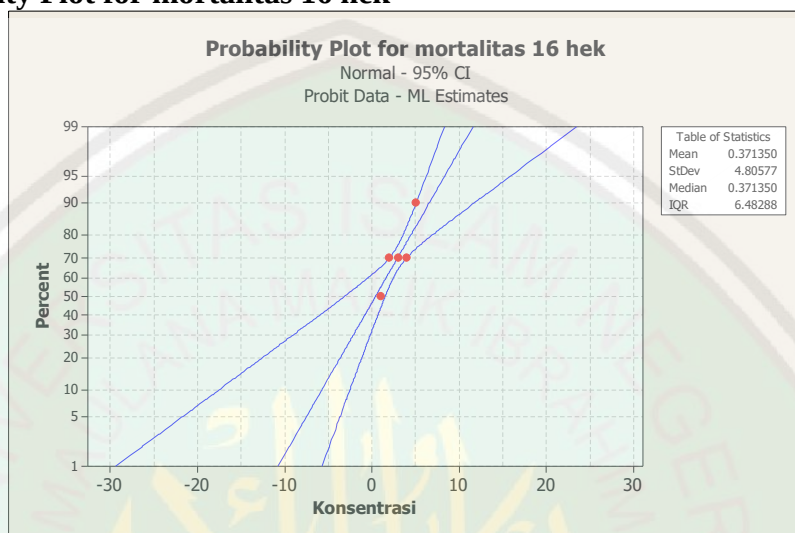
Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI Lower	95.0% Normal CI Upper
Mean	0.371350	0.832248	-1.25983	2.00253
StDev	4.80577	1.41428	2.69938	8.55580

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI Lower	95.0% Fiducial CI Upper
1	-10.8085	4.03635	-29.4467	-5.77649
2	-9.49849	3.65300	-26.3555	-4.94138
3	-8.66730	3.41003	-24.3947	-4.41103
4	-8.04204	3.22742	-22.9200	-4.01175
5	-7.53343	3.07900	-21.7207	-3.68672
6	-7.10053	2.95277	-20.7000	-3.40987
7	-6.72096	2.84218	-19.8053	-3.16696
8	-6.38110	2.74323	-19.0044	-2.94931
9	-6.07201	2.65331	-18.2761	-2.75122
10	-5.78749	2.57061	-17.6058	-2.56876
20	-3.67328	1.95878	-12.6306	-1.20747
30	-2.14880	1.52282	-9.05360	-0.215419
40	-0.846177	1.15802	-6.01287	0.647944
50	0.371350	0.832248	-3.20280	1.48693
60	1.58888	0.548663	-0.489480	2.42267
70	2.89150	0.407877	1.93965	3.89764
80	4.41598	0.618076	3.52424	6.88210

90	6.53019	1.16075	5.03281	11.7100
91	6.81470	1.23950	5.22331	12.3723
92	7.12379	1.32574	5.42883	13.0931
93	7.46366	1.42125	5.65341	13.8871
94	7.84323	1.52859	5.90284	14.7753
95	8.27613	1.65173	6.18589	15.7897
96	8.78474	1.79716	6.51689	16.9831
97	9.41000	1.97681	6.92207	18.4519
98	10.2412	2.21674	7.45846	20.4067
99	11.5512	2.59666	8.30036	23.4911

Probability Plot for mortalitas 16 hek



6.2 Data Hasil Uji Toksisitas Isolat Ekstrak Petroleum Eter

6.2.1 Data Hasil Uji Toksisitas Isolat 10

Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva yang Mati (Ekor)					Modus	% Mortalitas
	I	II	III	IV	V		
0 ₁	0	0	0	0	0	0	0
0 ₂	0	0	0	0	0	0	0
0 ₃	0	0	0	0	0	0	0
1	5	5	4	4	7	4	40
2	7	4	3	6	4	4	40
3	6	6	6	5	8	6	60
4	6	5	4	5	7	5	50
5	7	4	5	7	7	7	70

0₁ = pelarut, 0₂ = DMSO, 0₃ = 0 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{modus}}{10} \times 100\%$$

Konsentrasi (ppm)	Jumlah hewan uji (ekor)	Mortalitas
0 ₁	50	0
0 ₂	50	0
0 ₃	50	0
1	50	20
2	50	20
3	50	30
4	50	25
5	50	35

$$\text{Mortalitas} = \frac{\% \text{ mortalitas}}{100} \times \text{jumlah hewan uji (50)}$$

Probit Analysis: mor 11 pe, N versus Konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mor 11 pe	Event	130
	Non-event	120
N	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-0.485266	0.188757	-2.57	0.010
Konsentrasi	0.179090	0.0572581	3.13	0.002
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -168.118

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	3.93854	3	0.268
Deviance	3.93184	3	0.269

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

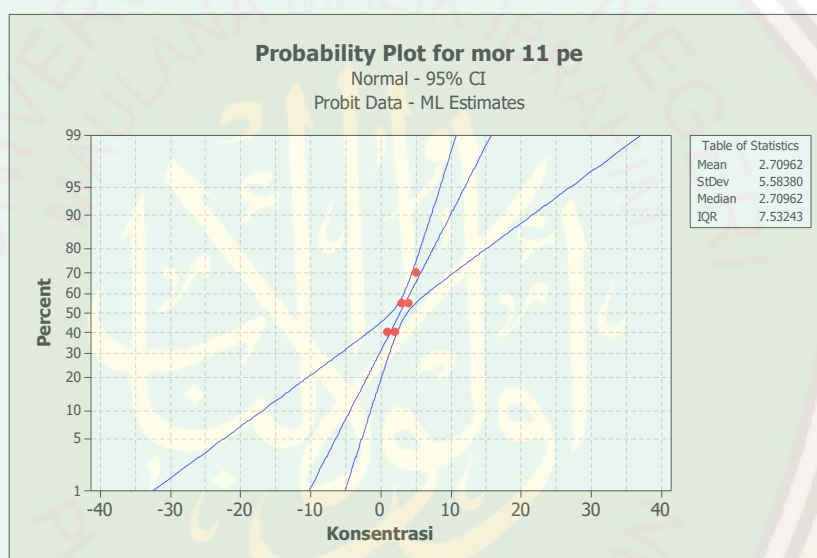
Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	2.70962	0.456485	1.81493	3.60432
StDev	5.58380	1.78524	2.98391	10.4490

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-10.2802	4.26441	-32.5885	-5.12409
2	-8.75809	3.78079	-28.5177	-4.18236
3	-7.79234	3.47439	-25.9357	-3.58399
4	-7.06585	3.24420	-23.9940	-3.13327
5	-6.47490	3.05718	-22.4151	-2.76619
6	-5.97191	2.89820	-21.0715	-2.45336
7	-5.53089	2.75898	-19.8938	-2.17871

8	-5.13601	2.63448	-18.8396	-1.93249
9	-4.77688	2.52141	-17.8812	-1.70825
10	-4.44630	2.41747	-16.9993	-1.50155
20	-1.98982	1.65212	-10.4598	0.0484878
30	-0.218522	1.11762	-5.78028	1.20200
40	1.29498	0.701638	-1.87226	2.27813
50	2.70962	0.456485	1.37053	3.69390
60	4.12426	0.577567	3.23254	6.49045
70	5.63777	0.959455	4.39272	10.3144
80	7.40906	1.48400	5.56743	14.9728
90	9.86554	2.24529	7.12571	21.5040
91	10.1961	2.34895	7.33297	22.3853
92	10.5553	2.46176	7.55773	23.3432
93	10.9501	2.58601	7.80446	24.3969
94	11.3912	2.72499	8.07958	25.5741
95	11.8941	2.88374	8.39288	26.9172
96	12.4851	3.07052	8.76043	28.4957
97	13.2116	3.30048	9.21161	30.4370
98	14.1773	3.60663	9.81046	33.0184
99	15.6995	4.08997	10.7528	37.0887

Probability Plot for mor 11 pe



6.2.2 Data Hasil Uji Toksisitas Isolat 14

Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva yang Mati (Ekor)					Modus	% Mortalitas
	I	II	III	IV	V		
0 ₁	0	0	0	0	0	0	0
0 ₂	0	0	0	0	0	0	0
0 ₃	0	0	0	0	0	0	0
1	5	4	4	8	6	4	0
2	4	8	3	5	5	5	10
3	4	5	6	8	6	6	10
4	4	6	6	8	3	6	10
5	9	6	5	8	6	6	20

0₁ = pelarut, 0₂ = DMSO, 0₃ = 0 ppm

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{modus}}{10} \times 100\%$$

Konsentrasi (ppm)	Jumlah hewan uji (ekor)	Mortalitas
0 ₁	50	0
0 ₂	50	0
0 ₃	50	0
1	50	20
2	50	25
3	50	30
4	50	30
5	50	30

$$\text{Mortalitas} = \frac{\% \text{ mortalitas}}{100} \times \text{jumlah hewan uji (50)}$$

Probit Analysis: mor 14 pe, N versus Konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mor 16 pe	Event	150
	Non-event	100
N	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-0.632335	0.192952	-3.28	0.001
Konsentrasi	0.303890	0.0608086	5.00	0.000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -155.098

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	6.31016	3	0.097
Deviance	6.46991	3	0.091

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

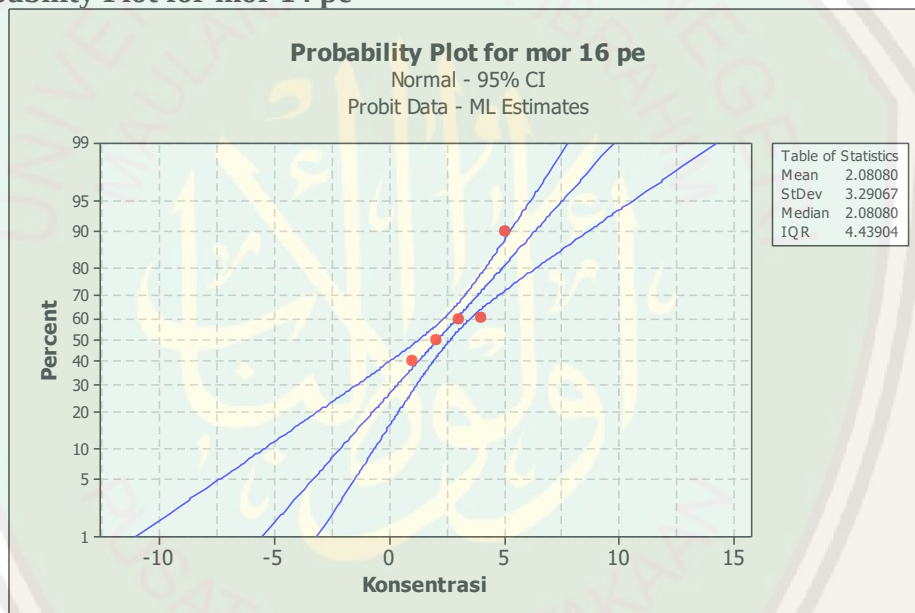
Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
Mean	2.08080	0.314827	1.46376	2.69785
StDev	3.29067	0.658466	2.22309	4.87091

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-5.57443	1.71065	-11.0630	-3.15399
2	-4.67740	1.53372	-9.59219	-2.50461
3	-4.10826	1.42180	-8.65967	-2.09194
4	-3.68012	1.33782	-7.95861	-1.78108
5	-3.33186	1.26968	-7.38868	-1.52788

6	-3.03544	1.21182	-6.90385	-1.31210
7	-2.77553	1.16121	-6.47899	-1.12266
8	-2.54282	1.11600	-6.09880	-0.952821
9	-2.33118	1.07498	-5.75323	-0.798161
10	-2.13636	1.03732	-5.43532	-0.655607
20	-0.688692	0.761675	-3.08136	0.412054
30	0.355176	0.571589	-1.40155	1.19947
40	1.24712	0.423437	0.0041183	1.90196
50	2.08080	0.314827	1.25249	2.62403
60	2.91449	0.273114	2.34150	3.50547
70	3.80643	0.331635	3.25053	4.70459
80	4.85030	0.481987	4.12266	6.29969
90	6.29797	0.739177	5.22793	8.61604
91	6.49278	0.775539	5.37308	8.93135
92	6.70443	0.815316	5.53022	9.27445
93	6.93714	0.859337	5.70243	9.65227
94	7.19705	0.908802	5.89415	10.0748
95	7.49347	0.965543	6.11217	10.5574
96	7.84173	1.03258	6.36757	11.1252
97	8.26987	1.11543	6.68066	11.8240
98	8.83901	1.22617	7.09567	12.7542
99	9.73604	1.40173	7.74775	14.2223

Probability Plot for mor 14 pe

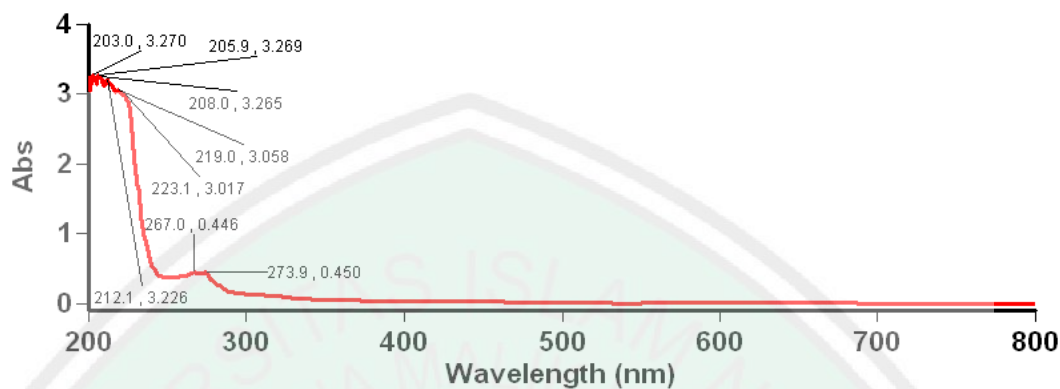


7 Data Hasil Uji Isolat Steroid

7.1 Data Hasil Spektrofotometer Uv-Vis

Lamdha Maks Isolat 10 Heksana A

Tanggal Analisa : 16 Oktober 2018



Scan Analysis Report

Report Time : Tue 16 Oct 03:50:43 PM 2018

Method:

Batch: D:\Sofia\Lamdha maks isolat 1 heksana A (16-10-2018).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Susi

Sample Name: Isolat 10 heksana A

Collection Time 10/16/2018 3:50:53 PM

Peak Table

Peak Style

Peak Threshold

Range

Peaks

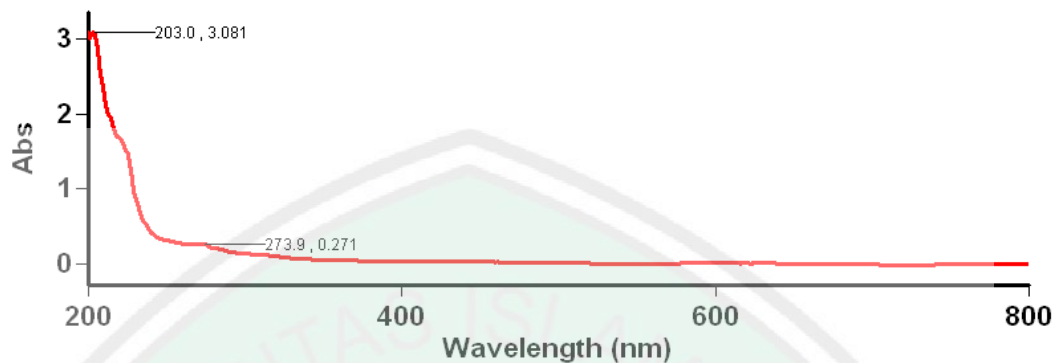
0.0100

800.0nm to 200.0nm

Wavelength (nm)	Abs
273.9	0.450
267.0	0.446
223.1	3.017
219.0	3.058
212.1	3.226
208.0	3.265
205.9	3.269
203.0	3.270

Lamdha Maks Isolat 15 Heksana A

Tanggal Analisa : 16 Oktober 2018



Scan Analysis Report

Report Time : Tue 16 Oct 03:57:22 PM 2018

Method:

Batch: D:\Sofia\Lamdha maks isolat hitam heksana A (16-10-2018).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Susi

Sample Name: Isolat 15 heksana A

Collection Time 10/16/2018 3:57:35 PM

Peak Table

Peak Style

Peak Threshold

Range

Peaks

0.0100

800.0nm to 200.0nm

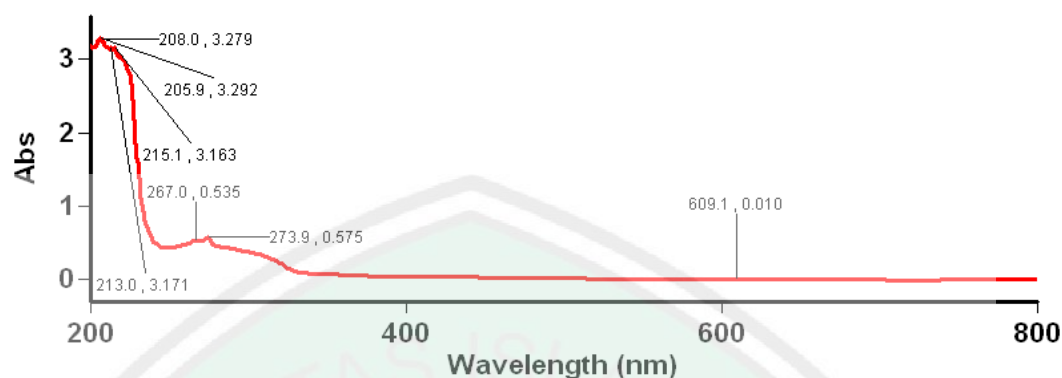
Wavelength (nm)

Abs

273.9	0.271
203.0	3.081

Lamdha Maks Isolat 16 Heksana A

Tanggal Analisa : 16 Oktober 2018



Scan Analysis Report

Report Time : Tue 16 Oct 03:53:10 PM 2018

Method:

Batch: D:\Sofia\Lamdha maks isolat 2 heksana A (16-10-2018).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Susi

Sample Name: Isolat 16 heksana A

Collection Time 10/16/2018 3:53:24 PM

Peak Table

Peak Style

Peak Threshold

Range

Peaks

0.0100

800.0nm to 200.0nm

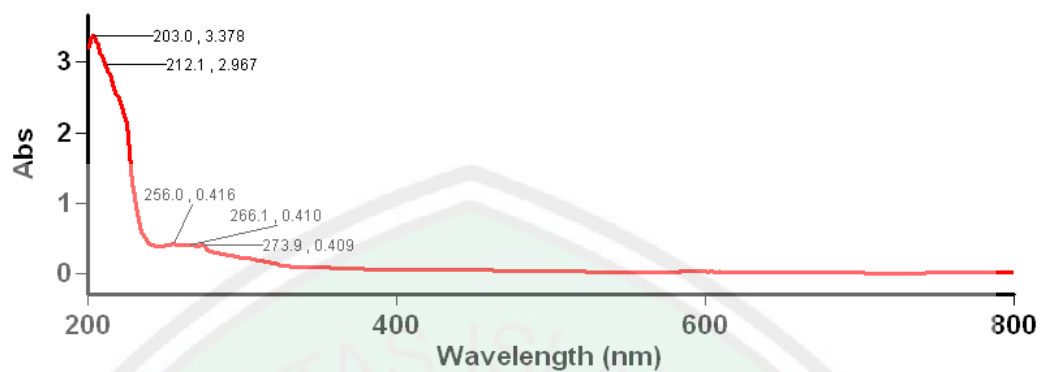
Wavelength (nm)

Abs

609.1	0.010
273.9	0.575
267.0	0.535
215.1	3.163
213.0	3.171
208.0	3.279
205.9	3.292

Lamdha Maks Isolat 10 PE A

Tanggal Analisa : 16 Oktober 2018



Scan Analysis Report

Report Time : Tue 16 Oct 04:14:05 PM 2018
 Method:
 Batch: D:\Sofia\Lamdha maks isolat 1 PE A (16-10-2018).DSW
 Software version: 3.00(339)
 Operator: Susi

Sample Name: Isolat 11 PE A

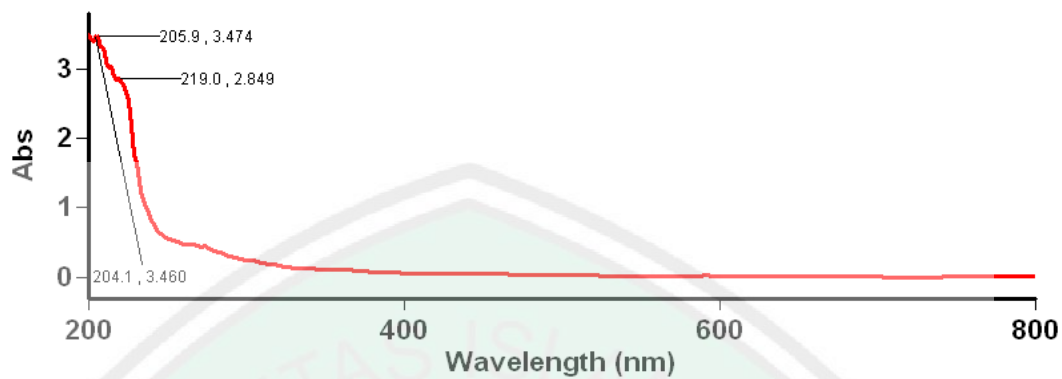
Collection Time 10/16/2018 4:14:30 PM

Peak Table
 Peak Style Peaks
 Peak Threshold 0.0100
 Range 800.0nm to 200.0nm

Wavelength (nm)	Abs
273.9	0.409
266.1	0.410
256.0	0.416
212.1	2.967
203.0	3.378

Lamdha Maks Isolat 14 PE A

Tanggal Analisa : 16 Oktober 2018



Scan Analysis Report

Report Time : Tue 16 Oct 04:16:14 PM 2018
 Method:
 Batch: D:\Sofia\Lamdha maks isolat hitam PE A (16-10-2018).DSW
 Software version: 3.00 (339)
 Operator: Susi

Sample Name: Isolat 16 PE A

Collection Time 10/16/2018 4:16:25 PM

Peak Table
 Peak Style Peaks
 Peak Threshold 0.0100
 Range 800.0nm to 200.0nm

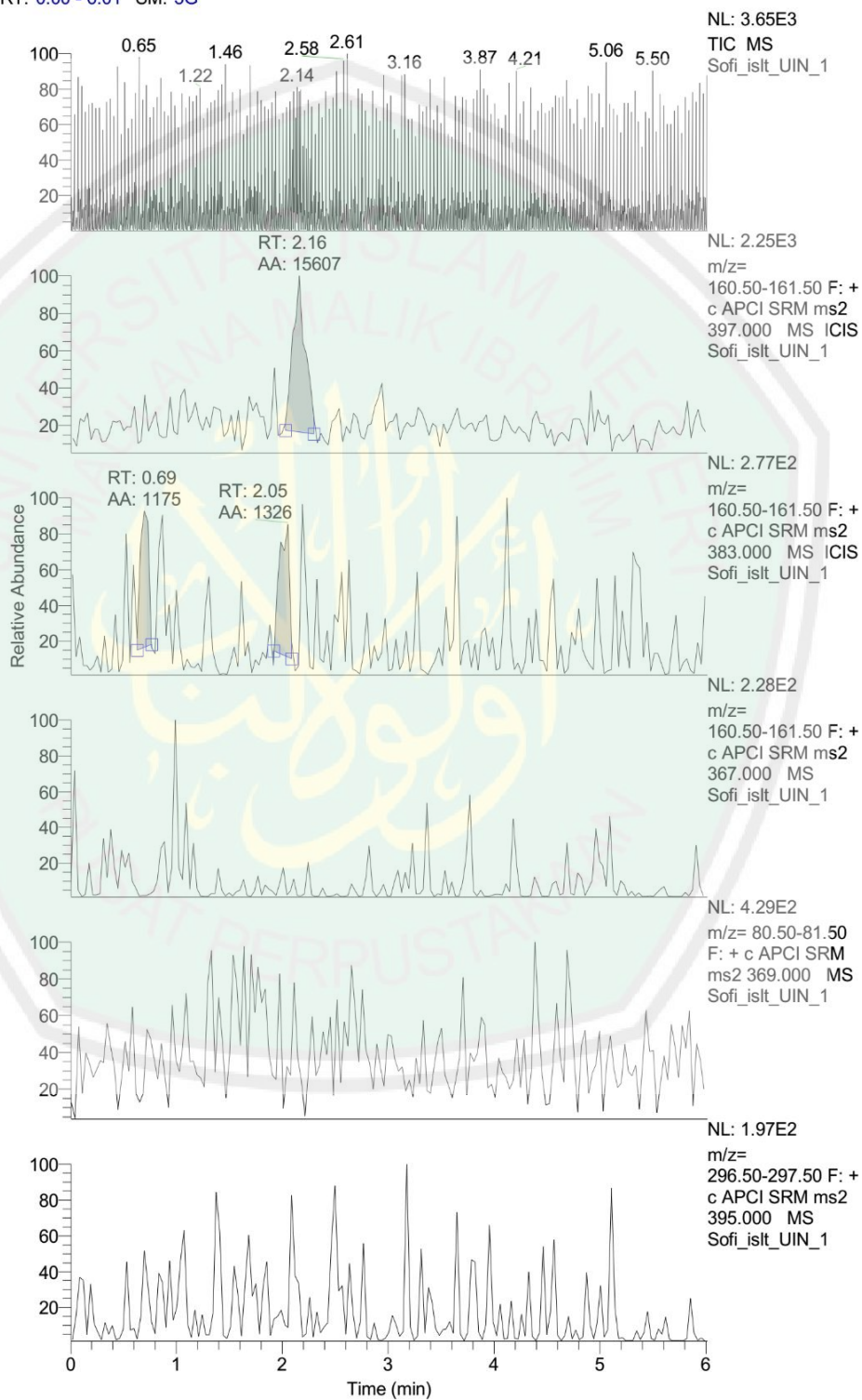
Wavelength (nm)	Abs
219.0	2.849
205.9	3.474
204.1	3.460

7.2 Data Hasil LC-MS/MS

7.2.1 Data Hasil LC-MC/MS Isolat Ekstrak n-Heksana

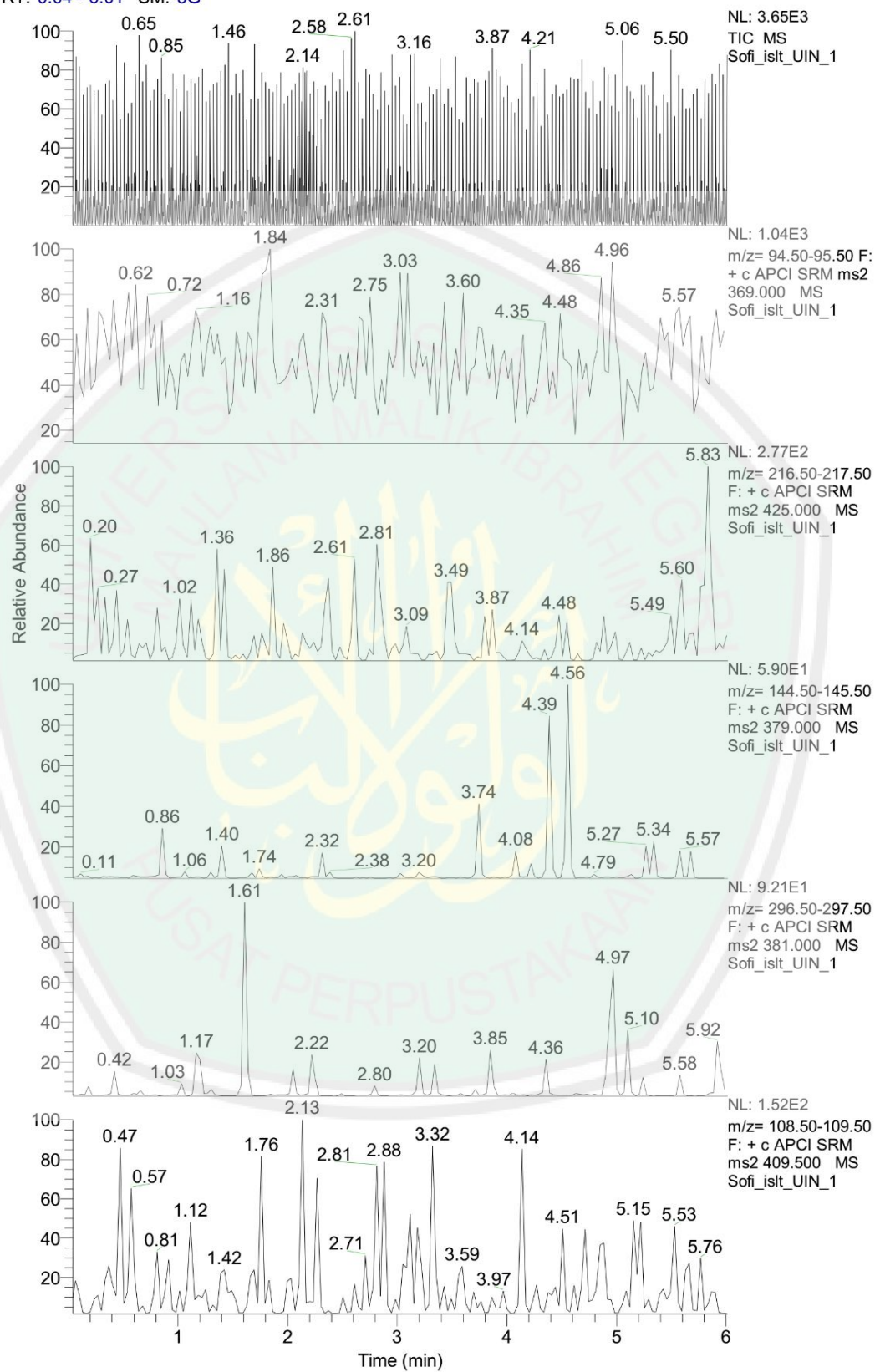
E:\DATA RAW\...\Sofi_islt_UIN_1

RT: 0.00 - 6.01 SM: 3G



E:\DATA RAW\...\Sofi_islt_UIN_1

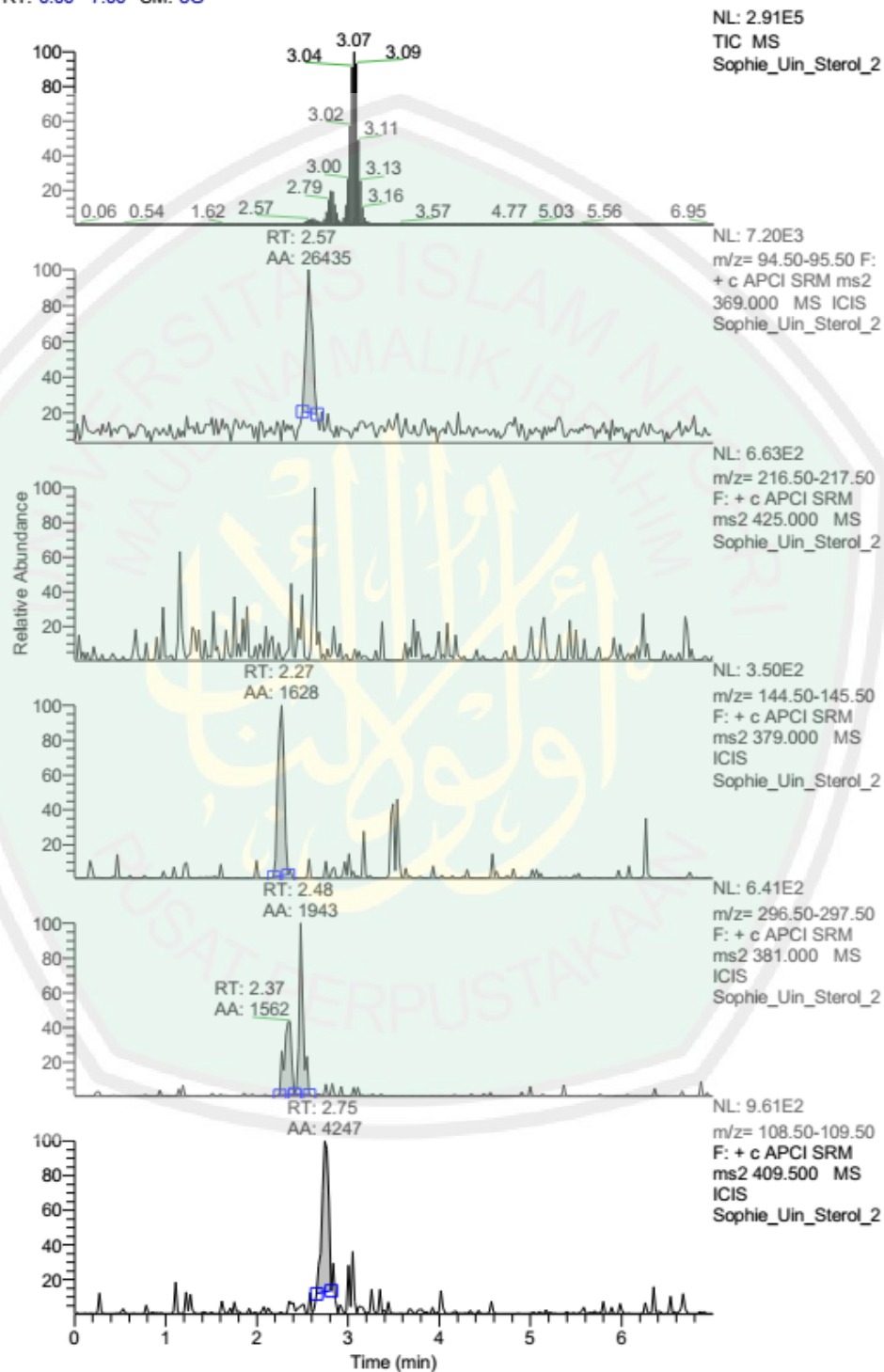
RT: 0.04 - 6.01 SM: 3G



7.2.2 Data Hasil LC-MS/MS Ekstrak Kasar n-Heksana

E:\DATA RAW\Des_18_2\Sophie_Ulin_Sterol_2

RT: 0.00 - 7.00 SM: 3G



8 Dokumentasi



Hydrilla Verticillata
Basah



Pengeringan



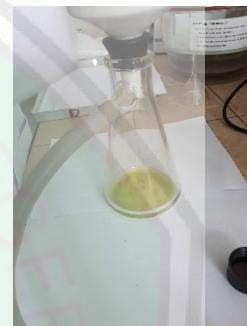
Hydrilla Verticillata Kering



Hydrilla Verticillata
Serbuk



Maserasi *Hydrilla*
Verticillata Serbuk



Filtrat *Hydrilla*
Verticillata Serbuk



Uji Liebermann *Hydrilla*
Verticillata ekstrak Pe



Uji Liebermann *Hydrilla*
Verticillata ekstrak n-
heksana



KLTA



KLTP



n-heksana setelah elusiv



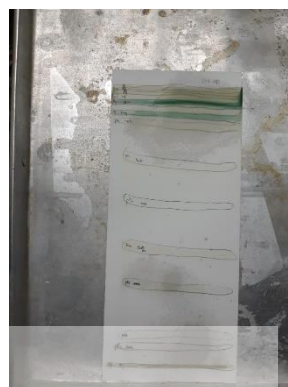
pe setelah elusi



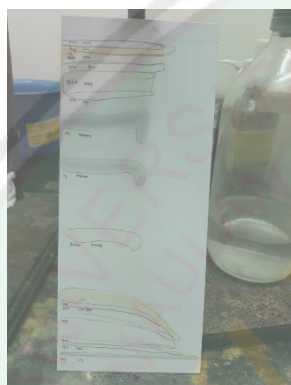
n-heksana setelah elusi di 366 nm



Pe setelah elusi di 366 nm



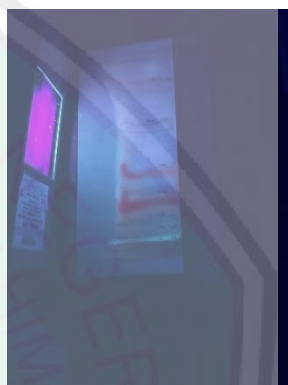
n-heksana setelah disemprot LB



PE setelah disemprot LB



n-heksana setelah disemprot LB di 366 nm



Pe setelah disemprot LB di 366 nm

9 Kartu Konsultasi



KEMENTERIAN AGAMA RI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MALIKI MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN KIMIA

Gedung Sains Dan Teknologi UIN Malang Lt. 2 Jl Gajayana 50 Malang Telp./Fax +62341558933
www.uin-malang.ac.id Email: info uin@uin-malang.ac.id, kimia@uin-malang.ac.id

KARTU KONSULTASI PENELITIAN

Nama : Sofia Ning Azah
NIM : 14630004
Judul Skripsi : Uji Toksisitas dan Identifikasi Isolat Steroid Ekstrak n-Heksana dan Petroleum Eter *Hydrilla Verticillata* Menggunakan UV-Vis dan LC-MS/MS
Pembimbing Utama : A. Ghanaïm Fasya, M.Si
Pembimbing Agama : Akyunul Jannah, S.Si, M.P.
Konsultan : Ahmad Hanapi, M.Sc

No	Tanggal	Materi Konsultasi	Catatan	Dosen
1	24-03-2017	Tema penelitian	Jurnal dan outline	A. Ghanaïm F
2	31-03-2017	Kelompok penelitian	Outline	A. Ghanaïm F
3	07-04-2017	Penentuan judul	Bab I	A. Ghanaïm F
4	07-05-2017	Bimbingan Bab I	Revisi	A. Ghanaïm F
5	10-05-2017	Sampling	Revisi	A. Ghanaïm F
6	12-06-2017	Konsultasi Bab I	Revisi	A. Ghanaïm F
7	04-01-2017	Konsultasi Bab I	Revisi	A. Ghanaïm F
8	16-01-2017	Konsultasi Bab I	Revisi	A. Hanapi
9	17-01-2018	Kosultasi Bab I	Revisi	A. Hanapi
10	18-01-2018	Konsultasi judul & metode	Revisi	A. Ghanaïm F
11	24-01-2018	Konsultasi Bab I & II	Revisi	A. Hanapi
12	24-01-2018	Konsultasi judul & metode	Revisi	A. Ghanaïm F
13	02-02-2018	Konsultasi Bab II	Revisi	A. Hanapi
14	06-02-2018	Konsultasi Bab II	Revisi	A. Hanapi
15	06-02-2018	Konsultasi metode	Revisi	A. Ghanaïm F

16	07-02-2018	Konsultasi Instrumen	Revisi	A. Ghanaim F
17	08-02-2018	Konsultasi Bab III	Revisi	A. Hanapi
18	14-02-2018	ACC (Sempro)	ACC	A. Hanapi
19	14-02-2018	ACC (Sempro)	ACC	A. Ghanaim F
20	17-03-2018	Konsultasi konsentrasi uji	Revisi	A. Ghanaim F
21	19-03-2018	Konsultasi Bab I, II, III	ACC	A. Ghanaim F
22	21-03-2018	Konsultasi konsentrasi uji	Revisi	A. Ghanaim F
23	23-03-2018	Konsultasi Bab I, II, III	Revisi	A. Hanapi
24	09-10-2018	Konsultasi Bab IV	Revisi	A. Hanapi
25	09-10-2018	Konsultasi Bab IV	Revisi	A. Ghanaim F
26	18-10-2018	Konsultasi Bab IV	Revisi	A. Hanapi
27	18-10-2018	ACC (Semhas)	ACC	A. Ghanaim F
28	19-10-2018	ACC (Semhas)	ACC	A. Hanapi
29	13-11-2018	Konsultasi Bab IV	Revisi	A. Ghanaim F
30	27-11-2018	ACC (Skripsi)	Revisi	A. Hanapi
31	28-11-2018	ACC (Skripsi)	Revisi	A. Ghanaim F