# UJI TOKSISITAS SENYAWA AKTIF FRAKSI n-HEKSANA, KLOROFORM dan n-BUTANOL *Hydrilla verticillata* HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL dari PERAIRAN DANAU RANU PASURUAN

**SKRIPSI**

**Oleh:**
**NUR FITRIANI KHASANAH**
**NIM. 14630005**

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

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# UJI TOKSISITAS SENYAWA AKTIF FRAKSI n-HEKSANA, KLOROFORM dan n-BUTANOL *Hydrilla verticillata* HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL dari PERAIRAN DANAU RANU PASURUAN

**SKRIPSI**

**Oleh:**
**NUR FITRIANI KHASANAH**
**NIM. 14530005**

**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**



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

**UJI TOKSISITAS SENYAWA AKTIF FRAKSI n-HEKSANA, KLOROFORM dan n-BUTANOL *Hydrilla verticillata* HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL dari PERAIRAN DANAU RANU PASURUAN**

**SKRIPSI**


**Oleh:**
**NUR FITRIANI KHASANAH**
**NIM. 14630005**


**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji**
**Tanggal: 03 Desember 2018**

| Pembimbing I | Pembimbing II |
|---|---|
| A. Ghanaim Fasya, M.Si | Ahmad Abthoki, M.Pd |
| NIP. 19820616 200604 1 002 | NIP. 19761003 200312 1 004 |

**Mengetahui,**
**Ketua Jurusan**

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



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

**UJI TOKSISITAS SENYAWA AKTIF FRAKSI n-HEKSANA, KLOROFORM dan n-BUTANOL *Hydrilla verticillata* HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL dari PERAIRAN DANAU RANU PASURUAN**

**SKRIPSI**


**Oleh:**
**NUR FITRIANI KHASANAH**
**NIM. 14630005**


**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi**
**Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan**
**Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**
**Tanggal: 11 Desember 2018**

| | | |
|---|---|---|
| **Penguji Utama** | **: Suci Amalia, M.Sc**<br>**NIP. 19821101 200901 2 007** | (.....) |
| **Ketua Penguji** | **: Rachmawati Ningsih, M.Si**<br>**NIP. 19810811 200801 2 010** | (.....) |
| **Sekretaris Penguji** | **: A. Ghanaim Fasya, M.Si**<br>**NIP. 19820616 200604 1 002** | (.....) |
| **Anggota Penguji** | **: Ahmad Abthoki, M.Pd**<br>**NIP. 19761003 200312 1 004** | (.....) |

**Mengetahui,**
**Ketua Jurusan**

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



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

| | |
|---|---|
| Nama | : Nur Fitriani Khasanah |
| NIM | : 14630005 |
| Jurusan | : Kimia |
| Fakultas | : Sains dan Teknologi |
| Judul Penelitian | : Uji toksisitas senyawa aktif fraksi n-heksana, kloroform dan n-butanol *Hydrilla verticillata* hasil hidrolisis ekstrak metanol dari perairan danau ranu Pasuruan |

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 sendiri, 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, 11 Desember 2018
Yang membuat pernyataan,

Nur Fitriani Khasanah
NIM. 14630005



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## HALAMAN PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada:

1) Allah SWT yang selalu memberikan rahmat dan ridha-Nya dalam memudahkan proses thalabul ‘ilmi
2) Bapak dan Ibu (Jemadi dan Poniyem) tercinta, yang senantiasa melantunkan do’anya untuk kesuksesan saya. Saudara (Siti Isa Alviah, Sutomo, Chelsea Fifa Aulia), yang selalu memberikan dukunganya untuk keberhasilan saya. Cinta kalian memberikan semangat yang luar biasa.
3) Teman-teman kimia angkatan 2014 khususnya kelas A, tanpa ada kalian perkuliahan tidak akan terasa menyenangkan. Terima kasih sudah saling menjaga dan melengkapi satu sama lain dan terimah kasih untuk semangat dan canda tawa yang kita lewati bersama. Sahabat hydrilla squad (Sofi, Laili, Niko) dan teman-teman organik (Citra, Vivin, Baitsa, Mahsunah, Yani, Alfatchu, Huda, Faris dan Habib) yang telah membantu dan mendukung saya dalam proses penyelesaian skripsi ini. Dan juga sahabat-sahabat saya (Mahmudah, Umi, Uly, Nanda, Ila) yang telah setia mendengarkan keluh kesah saya selama ini.



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## KATA PENGANTAR

Puji syukur bagi Allah yang maha pengasih lagi maha penyayang, atas segala nikmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi yang berjudul "**Uji toksisitas senyawa aktif fraksi n-heksana, kloroform dan n-butanol *Hydrilla verticillata* hasil hidrolisis ekstrak metanol dari perairan danau ranu Pasuruan**" dengan sebaik mungkin. Shalawat serta salam selalu penulis haturkan kepada Nabi Muhammad SAW, sosok teladan dalam membangun peradaban dan budaya pemikiran. Iringan doa dan ucapan teima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada:

1. Kedua orang tua yang telah memberikan dukungan baik spiritual maupun materiil.
2. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si, Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si selaku dosen pembimbing dan konsultan, karena atas bimbingan dan pengarahan yang diberikan, penulisan laporan hasil penelitian ini dapat terselesaikan.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si, selaku Ketua Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Seluruh dosen pengajar kimia yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat bagi penulis.
5. Seluruh laboran dan staff administrasi Jurusan Kimia yang telah membantu dalam proses penelitian.
6. Teman-teman mahasiswa angkatan 2014 terutama *Hydrilla Team* yang telah banyak membantu dan memberikan dukungan dalam menyusun skripsi.
7. Semua pihak yang telah membantu.



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan laporan hasil penelitian ini baik dalam teknik penyajian materi maupun pembahasan. Demi kesempurnaan proposal penelitian ini, saran dan kritik yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Semoga laporan hasil penelitian ini bermanfaat dan dapat menambah ilmu pengetahuan bagi para pembaca.

Malang, Desember 2018

Penulis



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

**DAFTAR ISI**

**HALAMAN JUDUL** ..... **i**
**HALAMAN PENGESAHAN** ..... **ii**
**HALAMAN PERSETUJUAN** ..... **iii**
**LEMBAR ORISINALITAS……** ..... **iv**
**HALAMAN PERSEMBAHAN** ..... **v**
**KATA PENGANTAR** ..... **vi**
**DAFTAR ISI** ..... **viii**
**DAFTAR GAMBAR** ..... **x**
**DAFTAR TABEL** ..... **xi**
**DAFTAR LAMPIRAN** ..... **xii**
**ABSTRAK.** ..... **xiii**
**ABSTRACT.** ..... **xiv**
**ملخص البحث.** ..... **xv**

**BAB I PENDAHULUAN**
1.1 Latar Belakang ..... 1
1.2 Rumusan Masalah ..... 4
1.3 Tujuan Penelitian ..... 5
1.4 Batasan Masalah ..... 5
1.5 Manfaat Penelitian ..... 6

**BAB II TINJAUAN PUSTAKA**
2.1 Tumbuhan dalam Al-Qur'an ..... 7
2.2 Hydrilla verticillata. ..... 8
2.3 Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif *Hydrilla Verticillata* ..... 10
2.3.1 Ekstraksi Senyawa Aktif ..... 10
2.3.2 Hidrolisis dan Partisi ..... 12
2.4 Uji Toksisitas Senyawa Steroid dengan *Brine Shirmp Lethality Test* (BSLT) Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach ..... 13
2.5 Uji Fitokimia ..... 16
2.5.1 Flavonoid. ..... 16
2.5.2 Tanin. ..... 17
2.5.3 Alkaloid. ..... 18
2.5.4 Triterpenoid/steroid. ..... 19
2.5.5 Saponin. ..... 21
2.6 Identifikasi Menggunakan *Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry (LC-MS)*. ..... 22

**BAB III METODOLOGI**
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian…. ..... 26
3.2 Alat dan Bahan. ..... 26
3.2.1 Alat-alat Penelitian ..... 26
3.2.2 Bahan ..... 26
3.3 Rancangan penelitian. ..... 27



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

3.4 Tahapan penelitian.....28
3.5 Pelaksanaan penelitian.....28
3.5.1 Preparasi Sampel (biomassa *Hydrilla verticillata*).....28
3.5.2 Analisis Kadar Air Biomassa *Hydrilla verticillata*. .....28
3.5.3 Ekstraksi Komponen Aktif. .....29
3.5.4 Hidrolisis Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata*.....30
3.5.5 Partisi Ekstrak metanol *Hydrilla verticillata*.....30
3.5.6 Uji toksisitas Biomassa Hydrilla Terhadap Larva Udang *Artemia salina* leach.. .....30
3.5.6.1 Penetasan Larva Udang Artemia salina Leach. .....30
3.5.6.2 Uji toksisitas.....31
3.5.7 Uji Fitokimia.....32
3.5.7.1 Uji Flavonoid…… .....32
3.5.7.2 Uji Tanin. .....32
3.5.7.3 Uji Alkaloid. .....32
3.5.7.4 Uji Triterpenoid dan Steroid. .....33
3.5.7.5 Uji Saponin. .....33
3.5.8 Identifikasi dengan LC-MS/MS. .....33
3.6 Analisa data .....34

**BAB IV PEMBAHASAN**
4.1 Preparasi Sampel Hydrilla verticillata. .....35
4.2 Analisis Kadar Air Hydrilla verticillata.....36
4.3 Ekstraksi Komponen Aktif. .....36
4.4 Hidrolisis Ekstrak Metanol Hydrilla verticillata.....37
4.5 Partisi Ekstrak Metanol Hydrilla verticillata. .....39
4.6 Uji Toksisitas Ekstrak *Hydrilla verticillata* terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. .....41
4.6.1 Penetasan Larva Udang Artemia salina. .....41
4.6.2 Uji Toksisitas. .....41
4.7 Uji fitokimia dengan reagen . .....44
4.7.1 Uji Tanin. .....45
4.7.3 Uji Alkaloid. .....46
4.7.4 Uji Triterpenoid dan Steroid. .....47
4.7.5 Uji Saponin. .....47
4.8 Identifikasi menggunakan LC-MS/MS . .....48
4.9 Pemanfaatan *Hydrilla verticillata* dalam Prespektif Islam.....53

**BAB V PENUTUP**
5.1 Kesimpulan. .....56
5.2 Saran. .....56

**DAFTAR PUSTAKA. .....57**
**LAMPIRAN. .....62**



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 *Hydrilla verticillata* .....9
Gambar 2.2 Reaksi Hidrolisis Ikatan O-glikosida .....12
Gambar 2.3 Struktur Dasar Senyawa Flavonoid.....17
Gambar 2.4 Struktur Dasar Senyawa Tanin.....18
Gambar 2.5 Struktur Dasar Senyawa Alkaloid......19
Gambar 2.6 Reaksi Senyawa Triterpenoid/Steroid dengan Lieberan-Burchard ...20
Gambar 2.7 Struktur Dasar Senyawa Saponin.....21
Gambar 2.8 Hasil Identifikasi Senyawa Steroid dari Alga Coklat Menggunakan APCI Positif Mode LC-MS/MS……..24
Gambar 2.9 Kromatografi LC-MS/MS Isolat Steroid 2 Hasil KLTP. .....25
Gambar 4.1 Reaksi Hidrolisis Ikatan O-glikosida. .....38
Gambar 4.2 Dugaan Reaksi Antara Tanin dan Gelatin.....45
Gambar 4.3 Dugaan Reaksi antara Alkaloid dengan Mayer.....46
Gambar 4.4 Dugaan Reaksi Triterpenoid/Steroid dengan Libermann-Burchard...47
Gambar 4.5 Reaksi Hidrolisis Saponin dalam Air. .....48
Gambar 4.6 Kromatografi LC-MS/MS Fraksi n-heksana.....50
Gambar 4.7 Struktur Senyawa Steroid *ß*-sitosterol, kampesterol, stigmasterol, fukosterol dan kolesterol.....52



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Ion steroid yang terdeteksi oleh LC-MS .....25
Tabel 3.1 Sistem Elusi pada LC-MS/MS. .....34
Tabel 4.1 Rendemen Hasil Partisi. .....40
Tabel 4.2 Hasil Uji Toksisitas Fraksi n-heksana, kloroform, dan n-butanol. .....43
Tabel 4.3 Nilai $LC_{50}$ Masing-Masing Ekstrak Hydrilla. .....43
Tabel 4.4 Hasil Fitokimia Masing-Masing Ekstrak. .....44
Tabel 4.5 Hasil Identifikasi LC-MS/MS Senyawa Steroid. ..... 51



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian .....62
Lampiran 2. Diagram Alir.....63
Lampiran 3. Pembuatan Larutan.....70
Lampiran 4. Data pengamatan dan perhitungan. .....77
Lampiran 5. Hasil identifikasi menggunakan LC-MS/MS fraksi n-heksana.....86
Lampiran 6. Dokumentasi.....88



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# ABSTRAK

Khasanah, N.F. 2018. **Uji Toksisitas Senyawa Aktif Fraksi *n*-Heksana, Kloroform dan *n*-Butanol *Hydrilla verticillata* Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol dari Perairan Danau Ranu Pasuruan.** Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Ahmad Abtokhi, M.Pd; Konsultan: Rachmawati Ningsih, M.Si

**Kata kunci**: *Hydrilla verticillata*, toksisitas, *Brine Shrimp Lethal Test*, LC-MS/MS

*Hydrilla verticillata* merupakan suku Hydrocharitaceae yang banyak tersebar di danau Ranu Pasuruan. Tumbuhan hydrilla mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu steroid, alkaloid, saponin, tanin, flavonoid dan triterpenoid yang terbukti memiliki kemampuan sebagai obat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat toksisitas fraksi n-heksana; kloroform dan n-butanol serta mengetahui golongan senyawa aktif yang memiliki toksisitas tertinggi terhadap *Artemia salina* Leach.

Tumbuhan hydrilla diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol p.a. Ekstrak metanol dihidrolisis dengan larutan HCl 2 N kemudian dipartisi tidak bertingkat dengan variasi pelarut yaitu n-heksana, kloroform dan n-butanol. Masing-masing fraksi diuji toksisitasnya menggunakan metode *Brine Shrimp Lethal Test* dengan parameter nilai $LC_{50}$. Identifikasi senyawa aktif dilakukan dengan uji fitokimia dilanjutkan dengan identifikasi menggunakan LC-MS/MS.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi n-heksana memiliki toksisitas tertinggi terhadap larva udang *Artemia salina* Leach yaitu yang memiliki nilai $LC_{50}$ terendah. Nilai $LC_{50}$ masing-masing fraksi yaitu: fraksi n-heksana (30,8615 ppm), fraksi kloroform (34,6766 ppm), dan fraksi n-butanol (39,1573 ppm). Uji fitokimia pada ekstrak metanol menunjukkan adanya alkaloid, saponin, steroid dan tanin. Fraksi n-heksana menunjukkan adanya saponin dan steroid, fraksi kloroform mengandung alkaloid, saponin, triterpenoid dan steroid, sedangkan untuk fraksi n-butanol mengandung alkaloid, saponin, steroid dan tanin. Hasil pengujian steroid fraksi n-heksana dengan LC-MS/MS diperoleh yaitu 397, 383, 395, 369, dan 369 menunjukkan adanya steroid jenis ß-sitosterol, campesterol, stigmasterol, fukosterol dan kolesterol.



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## ABSTRACT

Khasanah, N. F. 2018. **Toxicity Test of Active Compounds fraction n-Hexane, Chloroform and n-Butanol Hydrilla verticillata of Hydrolysis Result of Methanol Extract from the Waters of Ranu Lake Pasuruan.** Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si. Supervisor II: Ahmad Abtokhi, M.Pd. Consultant: Rachmawati Ningsih, M.Si



**Keywords**: Hydrilla verticillata, toxicity, Brine Shrimp Lethal Test, steroids, LC-MS /MS



*Hydrilla verticillata* is a tribe of Hydrocharitaceae which is widely spread on Ranu Lake Pasuruan. Hydrilla plants contain secondary metabolites that is steroids, alkaloids, saponins, tannins, flavonoids and triterpenoids which has proven ability as a medicine. This study aims to determine the level of toxicity of the n-hexane fraction; chloroform and n-butanol and know the class of active compounds that have the highest toxicity to Artemia salina Leach.

*Hydrilla* plant is extracted by maceration method using methanol solvent p.a. Methanol extract was hydrolyzed with 2 N HCl solution then partitioned non-level with variations of solvents namely n-hexane, chloroform and n-butanol. Each of the fractions was tested for toxicity using the Brine Shrimp Lethal Test method with a parameter value of $LC_{50}$. Identification of active compounds was carried out by phytochemical test followed by identification using LC-MS / MS.

The results showed that the n-hexane fraction had the highest toxicity to shrimp larvae Artemia salina Leach which had the lowest $LC_{50}$ value. The $LC_{50}$ values of each fraction were: n-hexane fraction (30.8615 ppm), chloroform fraction (34.6766 ppm), and n-butanol fraction (39.1573 ppm). Phytochemical test on methanol extract showed the presence of alkaloids, saponins, steroids and tannins. The n-hexane fraction showed the presence of saponins and steroids, chloroform fraction contained alkaloids, saponins, triterpenoids and steroids, whereas for the n-butanol fraction contained alkaloids, saponins, steroids and tannins. The results of steroid testing of n-hexane fraction with LC-MS / MS obtained were 397, 383, 395, 369, and 369 indicating the presence of ß-sitosterol, campesterol, stigmasterol, fukosterol and cholesterol steroids.





CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## ملخص البحث

حسنة، ن.ف. ٢٠١٨. اختبار السمية المركب النشط ***n***-هكسان، كلوروفورم و ***n***-بوتانول هيدريلا فيرتيسيلاتا (***Hydrilla verticillata***) للنتائج المائي الاستخراج الميثانول من بحيرة رانو فاسوروان.

المشرف: أ. غنائم فشى، الماجستير، أحمد أبطخي، الماجستير، ورحمواتى نينغسيه، الماجستير

الكلمات الرئيسية: هيدريلا فيرتيسيلاتا ، السمية، *Brine Shrimp Lethal Test*، LC-MS / MS

هيدريلا فيرتيسيلاتاهي قبيلة من هيدروجريتاجيي (Hydrocharitaceae) التي تنتشر في بحيرة رانو فاسوروان. تحتوي نباتات هيدريلا المركب المستقلب الثانوية، فهي الستيرويدات والقلويد، والصابونين، والتانين، والفلافونويد، والتريتربينويد التي أثبتت كدواء. يهدف هذا البحث إلى تحديد مستوى السمية للكسر النشط ن-هكسان، كلوروفورم و ن-بوتانول، ومعرفة مجموعة مركب نشط الذي لديه أعلى السمية لأرتيميا سالينا ليتش (*Artemia salina* Leach)

تم استخرج نبات هيدريلا بطريقة التهدئة باستخدام مذيب ميثانول ف.أ. حلل استخراج ميثانول بمحلول HCl 2 N ثم انقسم غير مستوي مع مذيبات مختلفة وهي ***n***-هكسان، كلوروفورم و ***n***-بوتانول، اختبر كل جزء للتسمم باستخدام طريقة اختبار *Brine Shrimp Lethal Test* مع قيمة المعلمة $LC_{50}$ . قد اجري تحديد للمركب النشط بواسطة اختبار كيميائي نباتي واستمر باستخدام LC-MS / MS

دلت النتائج البحث أن الجزء ***n***-هكسان له أعلى سمية ليرقات الجمبري لأرتيميا سالينا ليتش التي لديها أدنى قيمة $LC_{50}$. كان قيم $LC_{50}$ لكل جزء: فهي جزء ن-هكسان هو (30.8615 ppm)، و جزء الكلوروفورم هو (٣٤,٦٧٦٦ ppm) ، و جزء ***n***-بوتانول هو (39.1573 ppm) . دل الاختبار الكيميائي النباتي في استخراج الميثانول على وجود الستيرويدات والقلويد، والصابونين، والتانين. دل جزء ***n***-هكسان على وجود الصابونين والستيرويدات، يحتوي جزء الكلوروفورم على قلويدات و الصابونين و التريتربينويد والستيرويد، يحتوي جزء ***n***-بوتانول على قلويد و الصابونين و الستيرويد والتانين. حصلت نتائج اختبار الستيرويد لجزء ***n***- هكسان مع LC-MS / MS وهي ٣٩٧ و ٣٨٣ و ٣٩٥ و ٣٦٩ و ٣٦٩ التى تشير إلى وجود الستيرويد لنوع $\beta$ –سيتوستيرول و كامفيستيرول وستغماستيرول وفوكوستيرول وكولسترول.



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# BAB I

# PENDAHULUAN

## 1.1. Latar Belakang

Senyawa metabolit sekunder dapat diperoleh dari alam baik dari tumbuhan maupun hewan yang melewati proses biosintesis. Senyawa aktif ini memiliki aktifitas farmakologi dan biologi. Diastutik dan Warsinah (2010) dalam jurnalnya bahwa pada kulit batang *Rhizopora mucronata* yang mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu steroid yang memiliki sifat toksik terhadap sel *Myeloma* (tumor ganas). Senyawa metabolit sekunder yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu diisolasi dari tumbuhan. Sebagaimana firman Allah SWT dalam surat Thahaa ayat 7:

ٱلَّذِى جَعَلَ لَكُمُ ٱلْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنزَلَ مِنَ ٱلسَّمَآءِ مَآءً فَأَخْرَجْنَا بِهِۦٓ أَزْوَٰجًا مِّن نَّبَاتٍ شَتَّىٰ ﴿٥٣﴾

Artinya: *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 (Q.S Thaha ayat 53)*

Surat Thaha ayat 53 menjelaskan bahwa di bumi ini telah ditumbuhkan berbagai macam tumbuhan yang dapat bermanfaat bagi manusia., Tumbuhan itu mulia dengan segala kehidupan yang ada di dalamnya yang bersumber dari Allah SWT Yang Maha Mulia (Quthb, 2004). Ungkapan ini mengisyaratkan kepada jiwa untuk menerima dan merespon ciptaan Allah SWT dengan sikap yang memuliakan, memperhatikan dan memperhitungkannya. Ayat ini menjelaskan bahwa manusia dianjurkan untuk memperhatikan bumi dan isinya, karena di bumi



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

telah ditumbuhkan berbagai macam tumbuhan yang bermanfaat. Salah satu tumbuhan yang mengandung senyawa metabolit sekunder adalah *Hydrilla verticillata*.

*Hydrilla verticillata* merupakan tumbuhan air berwarna hijau yang tumbuh di bawah permukaan air. Tumbuhan hydrilla dapat tumbuh di kedalaman 10-15 m di bawah permukaan air pada habitat air tawar seperti sungai, kolam dan danau (Marer dan Garvey, 2001). Hydrilla awalnya kurang diharapkan, karena tumbuhan tersebut merupakan gulma yang mengganggu berbagai penggunaan air. Salah satu danau yang didominasi tumbuhan hydrilla adalah danau Ranu Kabupaten Pasuruan. Menurut UPT Dinas Pariwisata Kab.Pasuruan danau Ranu Grati memiliki luas memiliki sekitar 1,085 HA dan memiliki persentase lebih dari 77% di dominasi oleh tumbuhan hydrilla. Hydrilla mempunyai manfaat diantaranya dapat memberikan aktivitas antioksidan (Pal dan Nimse, 2006) antimikroba (Prabha dan Rajkumar, 2015), antimalaria (Annie, dkk., 2016), dan juga biosorben logam berat seperti Cd dan Cr (Phukan, dkk., 2015).

Manfaat-manfaat tersebut disebabkan oleh kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam tumbuhan hydrilla seperti β-karoten, saponin, vitamin, mineral, mikro dan makronutrien (Pal dan Nimse, 2006). Ikfi, dkk., (2017) dalam penelitiannya menyatakan bahwa ekstrak metanol hydrilla positif terhadap uji steroid, alkaloid, flavonoid, saponin, triterpeneoid dan tanin (gelatin). Ekstrak kloroform dan n-heksana hydrilla juga mengandung senyawa aktif triterpenoid dan steroid.

Ekstraksi meserasi dengan pelarut metanol merupakan metode yang digunakan untuk mengekstrak senyawa aktif hydrilla. Dilakukan ekstraksi

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

meserasi dengan pelarut metanol karena metanol lebih efisiensi untuk penetrasi ke dalam dinding sel, sehingga dapat menghasilkan metabolit sekunder lebih banyak (Bariyyah, dkk., 2013). Hafiz, dkk., (2017) dalam penelitiannya menghasilkan rendemen ekstrak metanol hydrilla lebih banyak (12,72%) daripada ekstrak kloroform (4,96%) dan n-heksana (3,80). Sementara Nurjanah, dkk., (2012) dalam penelitiannya juga menyebutkan bahwa ekstrak metanol semanggi air (11,98%) menghasilkan rendemen yang lebih banyak dibandingkan ekstrak kloroform (0,31%) dan etil asetat (1,37%).

Pemisahan senyawa metabolit sekunder yang lebih spesifik dalam penelitian ini dilakukan dengan cara hidrolisis menggunakan HCl 2 N dan partisi dengan pelarut n-heksan, kloroform, dan n-butanol. Pemilihan pelarut tersebut untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder berdasarkan sifat kepolarannya. Senyawa polar akan terekstrak dalam pelarut n-heksan, senyawa semipolar akan terekstrak dalam pelarut kloroform dan senyawa non polar akan terekstrak dalam pelarut n-butanol. Desianti (2014) pada penelitiannya menggunakan metode hidrolisis dan partisi menyebutkan bahwa fraksi n-heksana memiliki rendemen yang lebih banyak sebesar (32,7809%) dan memiliki nilai $LC_{50}$ lebih rendah (34,2133 ppm) dibandingkan ekstrak sebelum dihidrolisis (38,9697 ppm). Afif (2015) dalam penelitiannya menggunakan metode hidrolisis dengan HCl 2 N sebagai katalis terhadap alga merah *E. cottoni* menyebutkan bahwa fraksi kloroform memiliki rendemen yang lebih banyak sebesar 16,98% dan ekstrak setelah dihidrolisis dan dipartisi memiliki nilai $LC_{50}$ lebih rendah untuk fraksi 1-butanol (70,32 ppm) dibandingkan ekstrak sebelum dihidrolisis (194,40 ppm). Penelitian yang dilakukan Amaliyah, dkk., (2013) melakukan uji toksisitas pada

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat mikroalga *chlorella sp*. menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach menunjukkan bahwa ekstrak metanol menghasilkan nilai $LC_{50}$ lebih rendah 20,516 ppm dibandingkan dengan ekstrak etil asetat 167,417 ppm. Berdasarkan penelitian tersebut bahwa ekstrak setelah dihidrolisis dan dipartisi lebih bersifat toksik.

Hasil partisi dilanjutkan uji toksisitas dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva udang jenis *Artemia salina* Leach. Isolat senyawa yang memiliki sifat paling toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dilakukan uji kandungan golongan senyawa aktif dengan uji reagen pada ekstrak *hydrilla verticillata* dan dianalisis menggunakan LC-MS. Mardaneni, (2017) mengidentifikasi fraksi etil asetat alga merah (*Eucheuma cottonii*) dengan LC-MS menunjukkan bahwa terdapat lima senyawa steroid dengan berat molekul 397, 395, 369, 383, dan 367 gram/mol.

## 1.1 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana tingkat toksisitas fraksi n-heksan, kloroform, dan n-butanol hasil hidrolisis ekstrak metanol *Hydrilla verticillata* terhadap larva udang *Artemia salina Leach*?
2. Bagaimana hasil identifikasi isolat senyawa aktif yang memiliki sifat paling toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach mengggunakan instrumentasi LC-MS/MS?

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## 1.2 Tujuan Masalah

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui tingkat toksisitas fraksi n-heksana, kloroform, dan n-butanol hasil hidrolisis ekstrak metanol *Hydrilla verticillata* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach
2. Untuk mengetahui hasil identifikasi isolat senyawa aktif yang memiliki sifat paling toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach mengggunakan LC-MS/MS

## 1.3 Batasan Masalah

1. *Hydrilla verticillata* yang digunakan adalah *hydrilla verticillata* dari Ranu Grati Pasuruan
2. *Hydrilla verticillata* diekstraksi dengan metode meserasi dengan pelarut metanol p.a,
3. Hidrolisis ekstrak pekat dilakukan dengan menggunakan HCl 2 N;
4. Ekstrak hasil hidrolisis dipartisi dengan pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu n-heksana, kloroform, dan n-butanol.
5. Uji aktivitas toksisitasnya diuji menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test)* yang dinyatakan dengan nilai $LC_{50}$.
6. Identifikasi senyawa aktif dilakukan dengan uji reagen yaitu steroid;
7. Identifikasi senyawa aktif yang memiliki sifat paling toksik diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## 1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai cara isolasi, tingkat ketoksikan, dan cara identifikasi senyawa aktifyang terkandung dalam *hydrilla verticillata* dari Danau Ranu Grati Kabupaten Pasuruan. Serta dapat dikembangkan untuk meningkatkan ilmu pengetahuan yang nantinya dapat diaplikasikan penggunaannya untuk masyarakat.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# BAB II

# TINJAUAN PUSTAKA

## 2.1 Tumbuhan dalam Al-Qur'an

أَلَمْ تَرَ أَنَّ ٱللَّهَ أَنزَلَ مِنَ ٱلسَّمَآءِ مَآءً فَسَلَكَهُۥ يَنَٰبِيعَ فِى ٱلْأَرْضِ ثُمَّ يُخْرِجُ بِهِۦ زَرْعًا مُّخْتَلِفًا أَلْوَٰنُهُۥ ثُمَّ يَهِيجُ فَتَرَىٰهُ مُصْفَرًّا ثُمَّ يَجْعَلُهُۥ حُطَٰمًا ۚ إِنَّ فِى ذَٰلِكَ لَذِكْرَىٰ لِأُو۟لِى ٱلْأَلْبَٰبِ ﴿٢١﴾

*Apakah kamu tidak memperhatikan, bahwa Sesungguhnya Allah menurunkan air dari langit, Maka diaturnya menjadi sumber-sumber air di bumi kemudian ditumbuhkan-Nya dengan air itu tanam-tanaman yang bermacam-macam warnanya, lalu menjadi kering lalu kamu melihatnya kekuning-kuningan, kemudian dijadikan-Nya hancur berderai-derai. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terapat pelajaran bagi orang-orang yang mempunyai akal (QS. Az-zumar: 21).*

Dalam tafsir Al-Maraghi menjelaskan bahwa Allah SWT menurunkan air dari langit, lalu mengalir sebagai hujan dengan air itu, maka dialirilah bermacam tumbuh-tumbuhan seperti gandum, padi dan lain-lain. Kemudian mereka masak, kering menjadi kuning yang asalnya hijau segar, sesudah itu menjadi hancur berderai-derai. Alangkah mirip keadaan tumbuh-tumbuhan tersebut dengan keadaan dunia ini, yang begitu cepat selesai dan sirna. Maka, hal itu hendaklah mengambil pelajaran oleh orang-orang yang berakal (Al-Maraghi, 1980).

خَلَقَ ٱلسَّمَٰوَٰتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۖ وَأَلْقَىٰ فِى ٱلْأَرْضِ رَوَٰسِىَ أَن تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِن كُلِّ دَآبَّةٍ ۚ وَأَنزَلْنَا مِنَ ٱلسَّمَآءِ مَآءً فَأَنۢبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿١٠﴾



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

*Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembangkan biakkan padanya segala macam jenis binatang. Dan kami turunkan air hujan dari langit, lalu kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik (Qs. Luqman: 10).*

Al jazairi (2008) dalam tafsir al Aisar menjelaskan bahwa pada surat Luqman ayat 10 menunjukkan setiap jenis dari tumbuh-tumbuhan yang baik adalah tidak berbahaya. Jenis tumbuhan yang baik yang beraneka ragam dengan warna yang indah memiliki banyak manfaat (DEPAG, 2010). Berdasarkan ayat Al-qur'an tersebut, Allah SWT menciptakan segala sesuatu yang ada di dunia ini tidaklah sia-sia. Salah satu ciptaan yang memiliki banyak manfaat adalah tumbuh-tumbuhan dengan bermacam bentuk, ukuran, manfaat, warna, rasa, bau, dan lain-lain yang mempunyai hikmah yang besar. Salah satu tanaman yang diciptakan oleh Allah SWT dengan manfaat didalamnya adalah *Hydrilla verticillata*. Hydrilla mempunyai manfaat diantaranya dapat memberikan aktivitas antioksidan (Pal dan Nimse, 2006) antimikroba (Prabha dan Rajkumar, 2015), antimalaria (Annie, dkk., 2016), dan juga biosorben logam berat seperti Cd dan Cr (Phukan, dkk., 2015).

## 2.2 *Hydrilla verticillata*

Tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini merupakan *hydrilla verticillata* dari ranugrati Grati Pasuruan. Menurut Hasanah (2017) telah melakukan uji taksonomi terhadap tumbuhan hydrilla, adapun klasifikasi hydrilla menurut penelitian yang dilakukan antara lain:

Kingdom : Plantae
Super Divisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Liliopsida
Ordo : Hydrocharitales
Famili : Hydrocharitaceae

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Genus : Hydrilla
Spesies : *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle

Batang *hydrilla verticillata* berwarna hijau, tegak, ramping, bercabang dan dapat tumbuh sepanjang 7 m. Jarang memiliki bunga, apabila ada akan tumbuh pada ketiak daun menuju permukaan air melalui tangkai bunga yang panjang, berwarna putih dengan 3 mahkota dan 3 kelopak. *Hydrilla verticillata* memiliki daun yang berwarna hijau tipis, dengan tepi bergerigi dan berduri, memiliki lebar 2-4 mm dan panjang 6-20 mm, setiap tiga atau empat helai daun tumbuh melingkar dan membentuk ruas-ruas pada batang tanaman. Tangkai daun berwarna hijau dan berdiameter 0,1 mm. Pelepah daun sering berwarna merah dan memiliki satu duri di bawah permukaannya (Marer dan Garvey, 2001).

Gambar 2.1. *Hydrilla verticillata*

Pal dan Nimse (2006) menyebutkan bahwa tumbuhan hydrilla memiliki kandungan kimia seperti β-karoten, saponin, vitamin, mineral, mikro dan makronutrien. Ikfi (2017) menyebutkan bahwa terdapat beberapa senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak *hydrilla verticillata* yakni, ekstrak metanol positif terhadap uji steroid, alkaloid, flavonoid, saponin, triterpenoid dan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

tanin, ekstrak kloroform dan n-heksana mengandung senyawa aktif triterpenid dan steroid.

## 2.3 Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif *Hydrilla verticillata*

### 2.3.1 Ekstraksi Senyawa Aktif *Hydrilla verticillata*

Pemisahan senyawa metabolit sekunder pada tanaman *Hydrilla verticillata* dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi. Ekstraksi merupakan suatu proses penarikan komponen (zat terlarut) dari larutannya dalam air oleh suatu pelarut lain yang tidak bercampur dengan air (Soebagio, 2005). Ekstraksi pelarut menyangkut distribusi solute di antara dua fasa cair yang tidak bercampur (Day dan Underwood, 2002). Salah satu metode ekstraksi yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah ekstraksi maserasi.

Metode ekstraksi maserasi digunakan untuk memisahkan senyawa pada bahan alam. Meserasi merupakan proses peredaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan dalam temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan untuk isolasi bahan alam yang mempunyai sifat tidak tahan pada suhu tinggi, karena pada suhu tinggi dugaan senyawa aktif yang terkandung dalam sampel akan hilang. Kelebihan lain dari meserasi adalah prosesnya yang mudah dan sederhana. Penekanan utama pada meserasi adalah tersedianya waktu kontak yang cukup antara pelarut dan jaringan yang diekstrak (Guenther, 1987). Adapun proses yang mempengaruhi proses ekstraksi adalah lama ekstraksi, suhu dan jenis pelarut yang digunakan. Adapun hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan jenis pelarut adalah daya melarutkan, titik didih, sifat toksik, mudah tidaknya terbakar dan sifat korosif terhadap peralatan ekstraksi (Karger, *et al*., 1973).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi meserasi adalah metanol. Pemilihan pelarut metanol dalam ekstraksi meserasi yang akan dilakukan tidak lepas dari hasil penelitian sebelumnya. Pelarut golongan alkohol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam untuk melarutkan seluruh senyawa metabolit sekunder. Metanol termasuk golongan alkohol yang mempunyai berat molekul rendah (Lenny, 2006). Kondisi ini mempermudah pembentukan ikatan hidrogen dengan molekul air jaringan bahan yang diekstrak sehingga senyawa-senyawa dalam jaringan bahan akan mudah terekstrak (Hart, 1987). Metanol merupakan suatu pelarut yang baik untuk tujuan ekstraksi awal (Harborne. 1987).

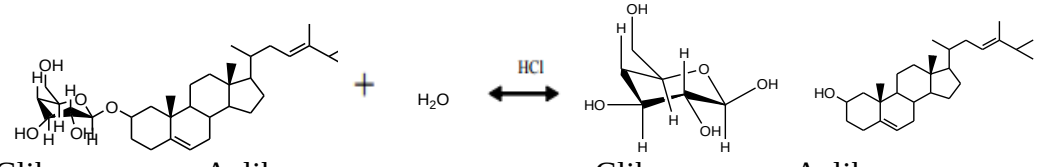
Agustian, dkk., (2013) melakukan uji toksisitas dengan mengekstrak mikroalga *Spirulina platensis* dengan pelarut metanol dan gabungan pelarut metanol;aseton (7:3) menghasilkan bahwa ekstrak yang memiliki aktivitas tertinggi adalah ekstrak metanol. Hafiz, dkk., (2017) dalam penelitiannya menyatakan bahwa ekstrak metanol *hydrilla verticillata* menghasilkan rendemen yang lebih banyak (12,72%) dibandingkan ekstrak kloroform (4,96%) dan *n*-heksana (3,80%). Desianti, dkk., (2014) dalam penelitiannya bahwa ekstrak metanol *Chorella sp.* juga mengandung senyawa steroid yang merupakan dugaan senyawa dengan toksisitas tertinggi terhadap *Artemia salina* L. Oleh karena itu, pelarut metanol digunakan dalam proses ekstraksi *hydrilla verticillata* dan untuk memperoleh senyawa metabolit sekunder yang lebih spesifik dilakukan proses hidrolisis dan partisi.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

### 2.3.2 Hidrolisis Dan Partisi

Senyawa organik dalam tanaman umumnya berbentuk glikosida, yaitu merupakan senyawa yang terdiri dari gabungan bagian gula (glikon) yang bersifat polar dan bagian bukan gula (aglikon) yang bersifat polar, semipolar maupun non polar. Senyawa metabolit sekunder tergolong dalam senyawa aglikon dengan mengubah struktur membentuk glikosida suatu senyawa akan mengalami perubahan sifat fisika, kimia, dan aktivitas biologi yang berbeda dimana senyawa tersebut akan bersifat lebih polar sehingga diharapkan bila masuk kedalam tubuh secara peroral senyawa tersebut akan lebih cepat diabsorbsi. Jika dalam suatu senyawa terdapat banyak ikatan glikosidanya maka senyawa tersebut cenderung bersifat lebih polar (Saifudin, dkk., 2006).

Hidrolisis dilakukan dengan penambahan katalis asam untuk mempercepat reaksi pemutusan. Handoko (2006) menyebutkan bahwa pemilihan asam kuat seperti HCl sebagai katalis disebabkan karena asam kuat akan lebih mudah melepas proton ($H^+$) secara sempurna di dalam air, sedangkan asam lemah relatif lebih sukar sehingga asam lemah memiliki kecenderungan terionissi sebagian dalam pelepasan ion $H^+$. Semakin banyak proton yang terionisasi dalam air, maka semakin kuat peranan proton dalam pemutusan ikatan glikosida. Gambar 2.2 menunjukkan reaksi dugaan pemutusan ikatan glikosida pada proses hidrolisis.




Glikon Aglikon Glikon Aglikon

Gambar 2.2 Reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida (Lawoko, *et all*., 2009)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Hasil hidrolisis akan dilakukan partisi menggunakan pelarut dari yang non polar ke yang polar, pelarut yang digunakan adalah n-heksana, kloroform, dan n-butanol. Prinsip partisi adalah pemisahan kimia berdasarkan perbedaan distribusi diantara dua fase pelarut yang tidak saling bercampur dengan tingkat kepolaran berbeda. Berdasarkan penelitian Desianti., (2014) pada penelitiannya menggunakan metode hidrolisis dan partisi menyebutkan bahwa fraksi n-heksana memiliki rendemen yang lebih banyak sebesar (32,7809%) dan memiliki nilai $LC_{50}$ lebih rendah (34,2133 ppm) dibandingkan ekstrak sebelum dihidrolisis (38,9697 ppm). Khoiriyah, dkk., (2014) dalam penelitiannya pelarut kloroform memiliki hasil rendemen tertinggi sebesar (27%) dibandingkan etil asetat (26,3%) dan petroleum eter (25,3%) dan golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak metanol fraksi etil asetat alga cokelat *S. vulgare* yang mempunyai aktivitas antibakteri tertinggi ditunjukkan oleh senyawa steroid. Afif, dkk., (2015) fraksi 1-butanol fraksi ini mengandung metabolit sekunder yang terdiri atas steroid dan alkaloid.

## 2.4 Uji Toksisitas Senyawa Steroid dengan *Brine Shirmp Lethality Test* (BSLT) Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach

Soemirat, (2005) toksisitas merupakan ukuran relatif derajat racun antara satu bahan kimia terhadap bahan kimia lain pada organisme yang sama kemampuan racun (molekul) untuk menimbulkan kerusakan apabila masuk ke dalam tubuh dan lokasi organ yang rentan terhadapnya. Uji toksisitas dilakukan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Metode pengujian dengan BSLT menggunakan *Artemia Salina* Leach sering dilakukan untuk screening awal pencarian senyawa

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

antikanker karena dianggap memiliki korelasi dengan daya sitotoksik senyawa-senyawa antikanker. Beberapa kelebihan dari uji bioaktivitas dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva udang adalah cepat waktu ujinya, sederhana (tanpa teknik aseptik), murah (tidak perlu serum hewan), jumlah organisme banyak, memenuhi kebutuhan validasi statistik dengan sedikit sampel (Meyer, *et al*., 1982).

Artemia adalah sejenis udang-udangan primitif yang temasuk dalam filum Arthropoda, mula-mula nama speciesnya Cancer salinus yang diberikan oleh Linnaeus tahun 1778, tetapi kemudian diubah oleh Leach pada tahun 1819 menjadi *Artemia salina* Leach. Artemia hidup planktonik di perairan yang berkadar garam tinggi (antara 15 - 300 per mil). Suhu yang dikehendaki berkisar antara 26 - 31°C. pH antara 7,3 - 8,4 dan oksigen terlarut sekitar 3 mg/L. Keistimewaan Artemia sebagai plankton adalah memiliki toleransi (kemampuan beradaptasi dan mempertahankan diri) pada kisaran kadar garam yang sangat luas. Pada kadar garam yang sangat tinggi dimana tidak ada satupun organisme lain mampu bertahan hidup, ternyata Artemia mampu mentolerirnya (Farihah, 2008).

Telur *Artemia salina* dapat bertahan dalam kondisi kering dan dapat disimpan cukup lama. Artemia diperdagangkan dalam bentuk telur istirahat yang disebut kista. Kista ini dapat dilihat dengan mata telanjang dan berbentuk bulat-bulatan kecil berwarna kelabu kecoklatan dengan diameter sekitar 300 mikron, berat kering sekitar 3,6 µg. Makanan Artemia terdiri atas ganggang renik, bakteri dan cendawan. Artemia memiliki beberapa tahapan proses penetasan yaitu tahap hidrasi, pecah cangkang, dan tahap payung atau tahap pengeluaran. Tahap hidrasi terjadi penyerapan air sehingga kista yang diawetkan dalam bentuk kering

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

tersebut akan menjadi bulat dan aktif bermetabolisme. Tahap selanjutnya adalah tahap pecah cangkang dan disusul dengan tahap pecah payung yang terjadi beberapa saat sebelum nauplius keluar dari cangkang (Farihah, 2008). Telur ini bila diberi air laut pada suhu ruang maka telur akan menetas dalam 1 - 2 hari dan dapat langsung digunakan dalam uji toksisitas. Siklus hidup *Artemia salina* memerlukan waktu sekitar 25 hari. (Kristanti, dkk., 2008).

Daya toksisitas suatu senyawa dapat diketahui dengan menghitung jumlah kematian larva *Artemia salina* Leach dengan parameter $LC_{50}$ (*Lethal Concentration-50*). $LC_{50}$ merupakan kadar atau konsentrasi suatu zat yang dinyatakan dalam milligram bahan kimia per meter kubik media uji (part per million atau ppm) yang dapat menyebabkan 50% kematian pada binatang percobaan terpapar dalam waktu tertentu (Cahyono, 2004). Suatu ekstrak dikatakan bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach apabila mempunyai nilai $LC_{50}$ < 1000 µg/mL dan dikatakan tidak toksik bila nilai $LC_{50}$ > 1000 µg/ mL (Meyer, *et al*., 1982). Parameter yang digunakan untuk menunjukkan adanya aktifitas biologi suatu senyawa pada *Artemia salina* adalah kematian. Kriteria ketoksikan untuk harga $LC_{50}$ dibedakan menjadi (Meyer, *et al*., 1982):

1. Sangat Toksik ($LC_{50} \leq 30$ µg/mL)
2. Toksik ($LC_{50} \leq 1000$ µg/mL)
3. Tidak Toksik ($LC_{50} > 1000$ µg/mL)

Marraskuranto, dkk. (2008) melaporkan bahwa fraksi heksan *U. fasciata* bersifat sangat toksik terhadap *Artemia salina* Leach dengan nilai $LC_{50}$ sebesar 19,12 ppm dan bersifat toksik terhadap sel kanker HeLa ($IC_{50}$= 25,6 ppm) dan sel

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

kanker T47D ($IC_{50}$=28,7 ppm). Sedangkan penelitian Desianti, dkk. (2014) menunjukkan bahwa keempat fraksi Chlorella sp. bersifat toksisitas larva udang *Artemia salina* Leach dengan nilai $LC_{50}$ 43,3044 ppm (fraksi etil asetat); 32,9023 ppm (fraksi kloroform); 32,6710 ppm (fraksi petroleum eter) dan 34,2133 ppm (fraksi n-heksana). Afif, dkk., (2015) fraksi 1-butanol memiliki nilai toksisitas tertinggi dengan nilai $LC_{50}$ 70,32 ppm dan fraksi ini mengandung metabolit sekunder yang terdiri atas steroid dan alkaloid.

## 2.5 Uji Fitokimia

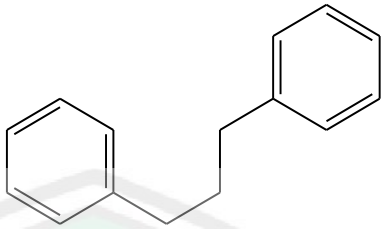
Uji fitokimia merupakan pengujian kandungan senyawa-senyawa kimia di dalam tumbuhan dengan menggunakan reagen-reagen tertentu. Tumbuhan umumnya mengandung senyawa aktif dalam bentuk metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, steroid, tanin, triterpenoid dan lain-lain. Lenny, (2006) menjelaskan bahwa senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang umumnya mempunyai kemampuan bioaktivitas dan berfungsi sebagai pelindung tumbuhan.

### 2.5.1 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang tersebar luas di alam. Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa $C_6$-$C_3$-$C_6$ yang artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus $C_6$ (cincin benzena tersubtitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga-karbon. Pengelompokan flavonoid dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan pada rantai $C_3$, sesuai struktur

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

kimianya yang termasuk flavonoid yaitu flavonol, flavon, flavanon, kaekin, antosianidin dan kalkon (Robinson, 1995).



Gambar 2.3 Struktur dasar senyawa flavonoid (Robinson, 1995)

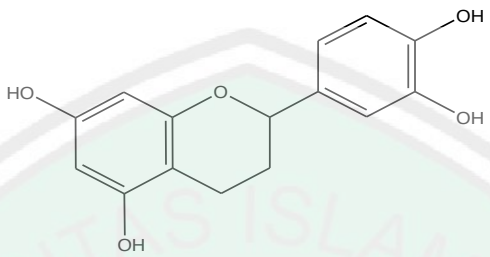
Gambar 2.3. merupakan gugus flavonoid yang kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus $C_6$ (cincin benzena tersubtitusi) yang disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon. Flavonoid sering terdapat sebagai glikosida. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenol yang memiliki banyak gugus –OH dengan adanya perbedaan keelektronegatifan yang tinggi, sehingga sifatnya polar. Golongan senyawa ini mudah terekstrak dalam pelarut etanol yang memiliki sifat polar karena adanya gugus hidroksil, sehingga akan terbentuk ikatan hidrogen. Uji flavonoid dilakukan dengan penambahan logam Mg dan HCl. Reduksi dengan Mg dan HCl pekat ini menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah atau jingga pada flavonol, flavanon, flavanonol dan xanton (Robinson, 1995). Beberapa flavonoid mempunyai sifat antioksidan, antiinflamasi, antitumor, dan antimikroba. Sifat antioksidan flavonoid yang ada pada tumbuh-tumbuhan diduga berkontribusi pada kemampuannya untuk melindungi tubuh terhadap penyakit kanker (Sarker & Nahar, 2009).

### 2.5.2 Tanin

Tanin adalah senyawa polifenol yang memiliki berat molekul cukup tinggi (lebih dari 1000) dan dapat membentuk kompleks dengan protein. Tanin juga merupakan golongan senyawa aktif tumbuhan yang termasuk golongan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

flavonoid.. Sebagian besar tumbuhan yang banyak mengandung tanin dihindari oleh hewan pemakan tumbuhan karena rasanya sepat, sehingga mungkin mempunyai arti sebagai pertahanan bagi tumbuhan (Hagerman, 2002; Harbone, 1987).




Gambar 2.4 Contoh struktur senyawa tanin (Robinson, 1995).

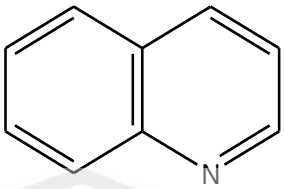
Gambar 2.4 merupakan struktur tanin yang mempunyai 4 gugus fungsi hidroksi fenolik. Terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru tinta pada ekstrak setelah ditambahkan dengan $FeCl_3$ karena tanin akan membentuk senyawa kompleks dengan $FeCl_3$ (Halimah, 2010). Selain pengujian dengan $FeCl_3$ juga dapat dilakukan dengan uji gelatin. Terbentuknya endapan setelah ditambahkan larutan gelatin menyatakan bahwa pada ekstrak mengandung tanin. Semua tanin menimbulkan endapan sedikit atau banyak jika ditambahkan dengan gelatin (Harborne, 1987)

### 2.5.3 Alkaloid

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam. Semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom nitrogen yang biasanya bersifat basa dan dalam sebagian besar atom nitrogen ini merupakan bagian dari cincin heterosiklik (Lenny, 2006). Hampir seluruh alkaloid berasal dari tumbuh-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan, tetapi

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

sering kali kadar alkaloid dalam jaringan tumbuhan ini kurang dari 1% (Kristanti, dkk., 2008).




Gambar 2.5 Contoh Struktur Senyawa Alkaloid (Robinson. 1995)

Gambar 2.5 merupakan suatu alkaloid yang mengandung nitrogen dan terdapat dalam cincin heterosiklik. Pelarut atau pereaksi alkaloid biasanya menggunakan kloroform, aseton, amoniak dan metilena klorida. Pereaksi Mayer (kalium tetraiodomerkurat) paling banyak untuk mendeteksi alkaloid karena pereaksi ini mengendapakan hampir semua alkaloid. Pereaksi lain yang sering digunakan seperti pereaksi Wagner (iodium dalam kalium iodida), asam silikotungstat 5%, asam tanat 5%. Pereaksi Dragendorff (kalium tetraiodobismutat), iodoplatinat dan larutan asam pikrat jenuh (Robinson, 1995). Bukti kualitatif untuk menunjukkan adanya alkaloid dapat diperoleh dengan menggunakan pereaksi Dragendorff (kalium tetraiodobismutat). Alkaloid akan membentuk warna jingga akibat reaksi dengan HCl dan reagen Dragendorff (Vogel, 1978).

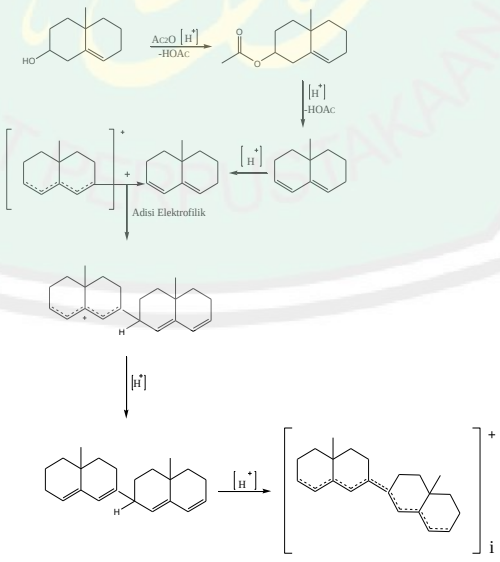
### 2.5.4 Triterpenoid dan Steroid

Triterpenoid merupakan komponen tumbuhan yang mempunyai bau dan dapat diisolasi dari bahan nabati dengan penyulingan. Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari 6 satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon $C_{30}$ asiklik yaitu skualena. Senyawa ini berstruktur siklik yang kebanyakan berupa alkohol, aldehida, atau asam karboksilat (Harborne, 1987). Triterpenoid dalam jaringan tumbuhan dapat

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

dijumpai dalam bentuk bebasnya, tetapi juga banyak dijumpai dalam bentuk glikosidanya (Kristanti, dkk., 2008). Peraksi Lieberman-Burchard secara umum digunakan untuk mendeteksi triterpenoid menghasilkan warna violet (Robinson, 1995).

Steroid merupakan golongan lipid turunan dari senyawa jenuh yang dinamakan siklopentanoperhidrofenantrena, yang mempunyai inti 3 cincin sikloheksana terpadu dan 1 cincin siklopentana yang tergabung pada cincin sikloheksana tersebut. Ada beberapa turunan steroid yang penting diantaranya steroid alkohol dan sterol (Poedjiadi, 1994). Senyawa steroid terdapat dalam setiap makhluk hidup. Steroid bersifat non-polar, karenanya steroid merupakan suatu lipid. Karakter non-polarnya memungkinkannya untuk melewati membran sel, dengan demikian steroid dapat meninggalkan sel, dalam mana steroid-steroid tersebut disintesis dan memasuki sel-sel targetnya (Sarker & Nahar, 2007). Berikut dugaan reaksi antara senyawa triterpenoid/steroid dengan reagen Lieberman-burchar dapat dilihat pada Gambar 2.6.

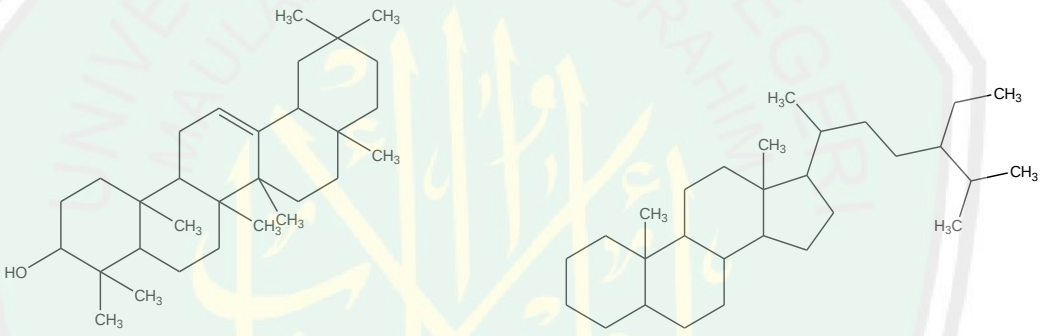



Gambar 2.6 Dugaan reaksi senyawa triterpenoid/steroid dengan reagen Liebermann-Burchard (Siadi, 2012)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

### 2.5.5 Saponin

Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat, menimbulkan busa jika dikocok dengan air. Dua jenis saponin yang dikenal yaitu glikosida triterpenoid alkohol dan glikosida struktur steroid. Aglikonnya disebut sapogenin yang diperoleh dengan hidrolisis dalam asam atau menggunakan enzim. Berdasarkan struktur aglikonnya atau sapogenin, saponin dapat dibedakan menjadi dua tipe yaitu tipe steroid dan triterpenoid. Kedua senyawa tersebut memiliki hubungan glikosidik pada atom C-3 dan memiliki asal usul biogenetika yang sama lewat asam mevalonat dan satuan-satuan isoprenoid (Robinson, 1995).




(a) (b)

Gambar 2.7 (a) struktur dasar saponin tipe triterpenoid dan gambar (b) merupakan struktur dasar saponin tipe steroid. Kedua jenis saponin ini larut dalam air dan etanol (Robinson, 1995).

Pengujian saponin dilakukan dengan penambahan HCl. Timbulnya busa pada uji tersebut menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Rusdi, 1990).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## 2.6 Identifikasi Menggunakan *Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry (LC-MS)*

LC-MS/MS merupakan pemisahan kromatografi cair (HPLC) dengan analisis massa spektrometri. Analisis menggunakan alat ini memiliki hasil data baik kuantitatif maupun kualitatif diantarannya untuk mengidentifikasi senyawa yang tidak diketahui, menentukan struktur senyawa dengan mengamati fragmentasinya dan menghitung jumlah senyawa dalam sampel. Menurut Michael (2008) LC-MS/MS memiliki beberapa kelebihan dibandingkan alat lain, yaitu :

1. Aplikasikan alat yang luas, tidak terbatas untuk molekul yang bersifat volatil, sangat polar dan persiapan sederhana tanpa *derivtisasi*.
2. Hasil analisa sangat khas dan spesifik dari adanya spektrometer massa yang tandem dengan alat.
3. Pengujian berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas yang tinggi dengan waktu analisa yang singkat.
4. Sejumlah data kuantitatif maupun kualitatif dapat diperoleh disebabkan seleksi ion yang cepat dengan banyak parameter.

MS (*Spektrometer massa*) bekerja dengan molekul pengion dan memilah dan mengidentifikasi ion menurut massa, berdasarkan rasio fragmentasi (*m/z*). Beberapa komponen yang harus terdapat dalam MS yaitu sumber ion (*ion source*) dan analisis massa (*mass analyzer*) yang menseleksi ion. Komponen tersebut memiliki berbagai jenis yang akan disesuaikan berdasarkan kepolaran senyawa serta memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing. Sumber ion yang digunakan dalam penelitian yaitu sumber ion jenis Ionisasi Kimia Tekanan Atmosfer (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*/APCI), menurut pedoman Agilent Tech (2011) metode ini eluen LC disemprotkan melalui pemanas bersuhu

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

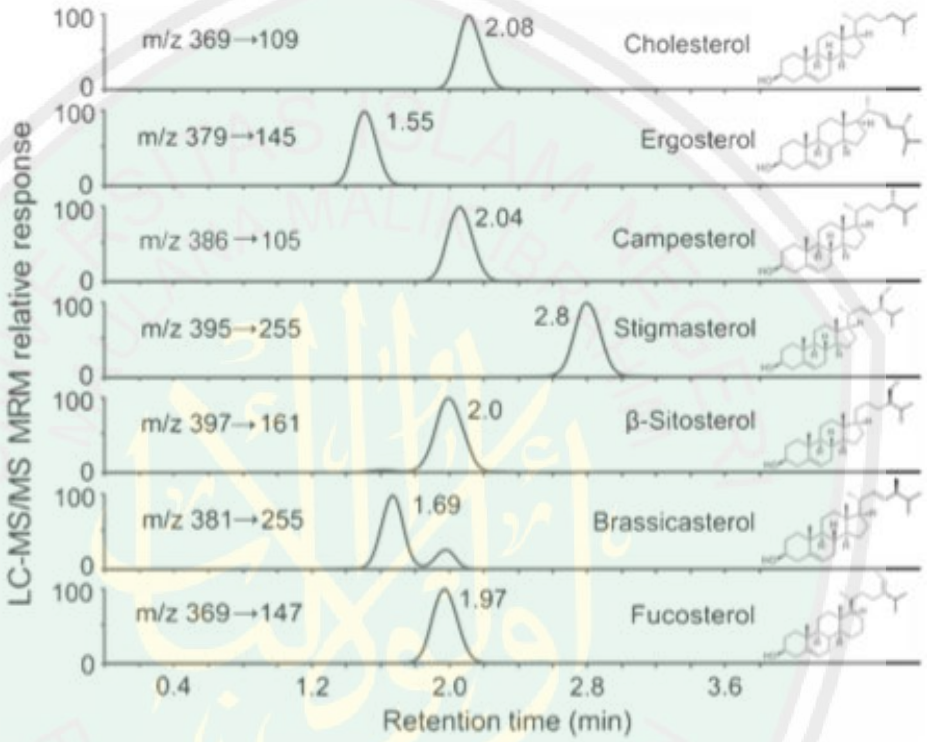
tinggi (200–400$^{o}$C) pada tekanan atmosfer. Cairan akan menguap karena adanya uap panas yang timbul dari pemanas. Fase gas pelarut yang dihasilkan akan terionsasi dan ion-ionnya akan mentransfer muatan pada molekul analit. Ion analit akan melewati pipa kapiler menuju spektrometer massa. APCI biasanya digunakan pada kromatografi fase normal karena analit yang digunakan merupakan fasa normal.

Proses identifikasi steroid menggunakan LC-MS/MS dengan dilengkapi APCI mode positif sebagai sumber ionisasi. Menurut Diaz (2006) APCI dapat menganalisa m/z dengan range 70-1000. Sistem LC menggunakan alliance 2695 lengkap dengan *autosampler*, *degasser*, dan pemanas kolom. Sistem MS menggunakan ZQ 2000 *single quardropole*. Sehinngga diperoleh data dengan menggunakan *softwere* MassLynx 4.0. Kolom yang digunakan adalah C18 150 x 2,1 mm dengan fase gerak asetonitril/air (0,01% asam asetat) dengan laju alir 0,5 mL/menit.

Ion yang dihasilkan kemudian menuju pipa kapiler dan menuju penganalisa masa. LC-MS/MS digunakan untuk menganalisa senyawa yang sangat nonpolar dengan laju alir rendah. Penganalisa massa yang digunakan yaitu analisa massa *Quandropole*, metode ini terdiri atas empat batang paralel yang diatur dalam persegi yang ditengah persegi dialirkan ion analit. Tegangan yang dialirkan pada batang menghasilkan bidang elektromagnetik. Bidang ini digunakan untuk menentukan rasio massa dari senyawa yang dianalisa dapat melewati bagian filter pada waktu tertentu. Hasil identifikasi steroid dalam penelitian Pereira, dkk. (2016) dengan alga coklat sebagai sampel menggunakan metode APCI terdapat 7 puncak senyawa dengan *retention time* yang berbeda. Puncak yang dihasikan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

beberapa diantaranya merupakan senyawa kampestrol dengan *m/z* 383, *ß*-sitosterol *m/z* 397, brassikasterol dengan *m/z* 381, stigmasterol dengan *m/z* 395, fukosterol dengan *m/z* 369, kolesterol dengan *m/z* 369, dan ergosterol dengan *m/z* 379. Hasil kromatogram steroid alga coklat dapat dlihat pada Gambar 2.9.



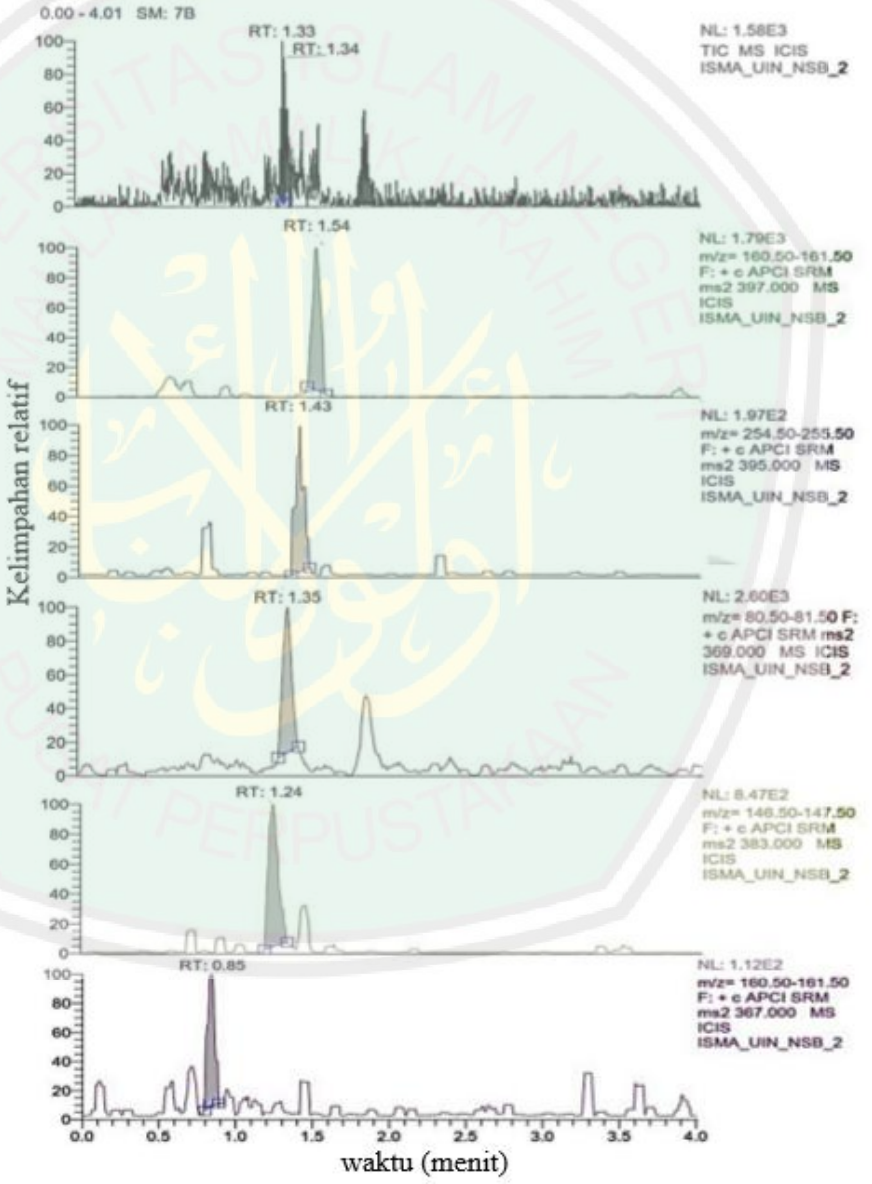

Gambar 2.8 Hasil identifikasi senyawa steroid dari alga coklat menggunakan APCI positif mode LC-MS/MS (Pereira, dkk., 2016)

Menurut penelitian Mardaneni, 2017 telah dilakukan penelitian pada alga merah (*Eucheuma cottonii*) berikut ion-ion steroid yang terdeteksi dengan LC-MS/MS disajikan pada Tabel 2.1.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Tabel 2.1 Ion steroid yang terdeteksi oleh LC-MS/MS

| Steroid | Waktu retensi (menit) | Massa (*m/z*) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | M | M-H2O | M-$H_2O$+$H^+$ | Daughter mass |
| ß- sitosterol | 1,5 | 414 | 396 | 397 | 160,5-161,5 |
| Stigmasterol | 1,43 | 412 | 394 | 395 | 254-255 |
| Fukosterol | 1,35 | 386 | 368 | 369 | 80,5-81,5 |
| Kampesterol | 1,24 | 400 | 382 | 383 | 146,5-147,5 |
| Desmosterol | 0,85 | 384 | 366 | 367 | 160,5-161,5 |




Gambar 2.9 Kromatografi LC-MS/MS isolat steroid 2 hasil KLTP (Mardaneni, 2017)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# BAB III

# METODE PENELITIAN

## 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April - September 2018 di Laboratorium Kimia Organik, Kimia Analitik, Bioteknologi Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

## 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

### 3.2.1 Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain timbangan analitik, *hotplate*, corong pisah, statif, desikator, lemari asam, oven, wadah penetasan, aerator, lampu penetasan, pengaduk kaca, spatula, lampu TL 36 Watt, *shaker*, pipet tetes, pipet ukur 1 mL, pipet ukur 5 mL, pipet ukur 10 mL, pipet mikro, labu ukur 10 mL, *beakerglass* 100 mL, *beakerglass* 500 mL, bola hisap, Erlenmeyer 1000 mL, gelas ukur 100 mL, saringan, corong kaca, corong *Buchner*, *rotary evaporator vacum*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, aluminium foil, kertas saring, botol vial, dan seperangkat alat LC-MS.

### 3.2.2 Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Hydrilla verticillata* yang berasal dari Danau Ranu Pasuruan dan hewan uji *Artemia salina* Leach yang berasal dari telur *Artemia salina* Leach.

Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah metanol p.a, kloroform p.a, n-heksana p.a, n-butanol p.a, HCl 2 N, air laut, ragi roti, natrium bikarbonat, dimetil sulfoksida (DMSO), etil asetat, HCl 37%, HCl 1N, HCl 2%, metanol 50%,



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

$H_2SO_4$, asam asetat anhidrida, aseton, $FeCl_3$ 1%, gelatin, pereaksi Mayer dan Dragendorff, serbuk logam Mg, NaCl, pereaksi Liberman-Burchard, aquades, air.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini diawali dengan pengambilan sampel diranugrati Grati Pasuruan. Tahap pertama adalah *Hydrilla verticillata* dipreparasi dengan dikeringanginkan pada suhu ruang (25 - 30 $^oC$) setelah kering hydrilla dihaluskan. Selanjutnya *Hydrilla verticillata* diekstraksi dengan metode meserasi menggunakan pelarut methanol *p.a* masa perendaman 24 jam dengan perbandingan 1:5 sehingga didapatkan ekstraksi kasar *Hydrilla verticillata*.

Ekstrak *Hydrilla verticillata* selanjutnya dihidrolisis dengan menggunakan HCl 2 N. Pertama-tama ekstrak yang diperoleh dari hasil pemekatan ditimbang masing-masing sebanyak 1,5 gram kemudian dihidrolisis dengan HCl 2 N sebanyak 3 mL kemudian distirer selama 1 jam dengan menggunakan *hotplate stirrer*. Selanjutnya ditambahkan natrium bikarbonat hingga pH-nya netral. Ekstrak hasil hidrolisis kemudian dipartisi dengan menggunakan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya yaitu n-heksana, kloroform, dan n-butanol.

Masing-masing fraksi kemudian diuji fitokimia dan uji toksisitasnya terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan variasi konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm. Setelah itu dihitung nilai $LC_{50}$ masing-masing fraksi dengan menggunakan analisis probit. Fraksi yang memiliki nilai $LC_{50}$ paling rendah atau paling toksik selanjutnya dilakukan identifikasi menggunakan spektrofotometer LC-MS.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## 3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui tahapan-tahapan berikut:

1. Preparasi sampel;
2. Analisis kadar air *hydrilla verticillata;*
3. Ekstraksi komponen aktif sampel *hydrilla verticillata* dengan pelarut metanol p.a menggunakan metode maserasi;
4. Hidrolisis ekstrak pekat *hydrilla verticillata* dengan menggunakan HCl 2N;
5. Partisi ekstrak pekat hasil hidrolisis *hydrilla verticillata* dengan menggunakan variasi pelarut n-heksan, kloroform, dan n-butanol;
6. Uji toksisitas fraksi biomassa *hydrilla verticillata* dengan menggunakan larva udang *artemia salina* Leach;
7. Uji kandungan golongan senyawa aktif;
8. Identifikasi golongan senyawa aktif dengan menggunakan LC-MS;
9. Analisis data dengan menggunakan minitab.

## 3.5 Pelaksanaan Penelitian

### 3.5.1 Preparasi Sampel (biomassa *Hydrilla verticillata*)

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 dikeringanginkan pada suhu ruang. Sampel yang sudah kering dihaluskan dengan ukuran kurang lebih 90 mesh di Materia Medika Kota Batu.

### 3.5.2 Analisis Kadar Air Biomassa *Hydrilla verticillata*

Analisis kadar air dilakukan pada sampel kering *Hydrilla verticillata* dengan cara sampel ditimbang sebanyak 5 gram, dimasukkan dalam cawan yang

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

sebelumnya telah dihitung berat konstannya, kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 100-105 $^{o}$C selama ±15 menit. selanjutnya sampel didinginkan dalam desikator ± 10 menit dan ditimbang. Sampel tersebut dipanaskan kembali dalam oven ±15 menit, didinginkan dalam desikator sekitar ±10 menit dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi hingga tercapai berat konstan. Kadar air dalam hydrilla dihitung menggunakan Persamaan (3.1)

$$kadar\ air = \frac{b-c}{b-a} x\ 100\% \quad \text{.....(3.1)}$$

Keterangan: a = berat cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat cawan + sampel setelah dikeringkan

### 3.5.3 Ekstraksi Komponen Aktif

Ekstraksi meserasi komponen aktif *Hydrilla verticillata* dilakukan dengan cara menimbang 100 gram *Hydrilla verticillata* kering, dimasukkan dalam Erlenmeyer kemudian direndam dengan pelarut metanol *p.a* sebanyak 500 mL. Ekstraksi dilakukan selama 24 jam dengan pengocokan menggunakan shaker dengan kecepatan 120 rpm pada suhu kamar. kemudian disaring dengan corong *Buchner* menghasilkan residu dan filtrat. Bagian residu dimeserasi kembali hingga 5 kali meserasi. Filtrat yang diperoleh digabung menjadi satu kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* vacuum hingga diperoleh ekstrak pelat metanol *Hydrilla verticillata* dihitung randemennya dengan menggunakan persamaan (Khopkar, 2003):

$$\%\ randemen = \frac{\text{berat ekstrak kasar yang diperoleh}}{berat\ sampel} x\ 100\% \quad \text{.....(3.2)}$$

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

### 3.5.4 Hidrolisis Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata*

Hidrolisis ekstrak metanol *Hydrilla verticillata* dilakukan dengan cara menambahkan 3 mL HCl 2 N dalam 1,5 gram ekstrak pekat metanol dan distirer dengan hot plate stirrer selama 1 jam pada suhu ruang. Selanjutnya dinetralkan pH-nya dengan menambahkan natrium bikarbonat.

### 3.5.5 Partisi Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata*

Ekstrak pekat metanol 96% *Hydrilla verticillata* yang diperoleh dibagi menjadi 3 bagian masing-masing bagian 1,5 gram. Masing-masing ekstrak pekat metanol diekstraksi cair-cair dengan menggunakan pelarut n-heksana, kloroform, dan n-butanol dilakukan dengan cara ditambahkan 7,5 mL pelarut dalam corong pisah, dikocok selama 15 menit dan didiamkan beberapa saat sampai diperoleh fase air dan fase organik secara maksimal. Perlakuan ini diulangi hingga tidak terbentuk 2 lapisan yaitu 3 kali pengulangan, kemudian masing-masing fraksi yang diperoleh dikumpulkan menjadi satu dan dipekatkan dengan *rotary evaporator vaccum*. Masing-masing fraksi hasil partisi ditimbang kemudian dihitung rendemennya menggunakan persamaan 3.2.

### 3.5.6 Uji Toksisitas Biomassa *Hydrilla verticillata* Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach

#### 3.5.6.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina* Leach

Penetasan Larva Udang *Artemia Salina* Leach dilakukan dengan cara dimasukkan 250 mL air laut dalam wadah penetasan, kemudian dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina* Leach lalu diaerasi dan diberi pencahayaan dengan bantuan sinar lampu pijar 40-60 watt agar suhu penetasan 25-30$^{\circ}$C tetap terjaga. Telur akan menetas dalam waktu ± 48 jam dan siap untuk digunakan sebagai target uji toksisitas (Halimah, 2010).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

### 3.5.6.2 Uji Toksisitas

Perlakuan uji toksisitas dilakukan sebanyak 5 kali ulangan pada masing-masing ekstrak sampel. Ekstrak fraksi n-heksana, kloroform, dan n-butanol masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan menggunakan pelarutnya masing-masing sebanyak 10 mL sehingga diperoleh larutan stok 1000 ppm. Larutan yang diperoleh selanjutnya dipipet masing-masing sebanyak 50 µL, 100 µL, 150 µL, 200 µL, dan 250 µL kemudian dimasukkan ke dalam botol vial dan pelarutnya diuapkan hingga kering. Selanjutnya dimasukkan 100 µL dimetilsulfoksida (DMSO), setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut, kemudian dikocok sampai ekstrak dapat larut. Ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL. Konsentrasi masing-masing larutan menjadi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm. Selanjutnya dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* dan dilakukan pengamatan selama 24 jam terhadap kematian larva udang.

Kontrol pelarut dibuat tanpa penambahan ekstrak dengan cara 200 µL masing-masing pelarut (n-heksana, kloroform dan n-butanol) dimasukkan ke dalam botol vial dan diuapkan hingga kering. Selanjutnya ditambahkan 100 µL DMSO, setetes larutan ragi roti, dan 2 mL air laut kemudian dikocok. Ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL. Selanjutnya dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* dan dilakukan pengamatan selama 24 jam terhadap kematian larva udang.

Selanjutnya dihitung jumlah larva udang yang mati. Analisis data dilakukan untuk mencari nilai $LC_{50}$ dengan menggunakan analisis probit. Bila ada kematian pada kontrol dikoreksi dengan menggunakan persamaan 3.4 (Meyer, *et al*., 1982):

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

$$\%\ kematian = \frac{\text{tes}-\text{kontrol}}{jumlah\ larva\ uji\ (10\ ekor)}\ x\ 100\% \quad \text{.....(3.3)}$$

### 3.5.7 Uji Fitokimia (Kristanti, dkk., 2008)

Isolat senyawa yang memiliki sifat paling toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach diuji kandungan golongan senyawa aktif alkaloid, flavonoid, terpenoid, steroid, saponin dan tanin.

#### 3.5.7.1 Uji Flavonoid (Kristanti, dkk., 2008)

Ekstrak hydrilla dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam 1-2 mL metanol panas 50%. Setelah itu ditambah logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid.

#### 3.5.7.2 Uji Tanin (Sarker & Nahar, 2009)

a. Uji dengan $FeCl_3$

Ekstrak hydrilla ditambahkan dengan 3 tetes larutan $FeCl_3$ 1%. Jika larutan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tinta maka mengandung tanin.

b. Uji dengan Larutan Gelatin

Ekstrak hydrilla sebanyak 2 mg dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah dengan larutan gelatin. Jika terbentuk endapan putih menunjukkan adanya tanin.

#### 3.5.7.3 Uji Alkaloid (Kristanti, dkk., 2008)

Ekstrak hydrilla dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 0,5 mL HCl 2% dan larutan dibagi dalam dua tabung. Tabung I ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorff, tabung II ditambahkan 2-3 reagen Mayer. Jika tabung I terbentuk endapan jingga dan pada tabung II terbentuk endapan kekuning-kuningan menunjukkan adanya alkaloid.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

### 3.5.7.4 Uji Triterpenid/steroid (Kristanti, dkk., 2008)

Ekstrak hydrilla dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Campuran ini ditambah dengan 1-2 mL $H_2SO_4$ pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid.

### 3.5.7.5 Uji Saponin (Harborne, 1987)

Ekstrak hydrilla dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambah air (1:1) sambil dikocok selama 1 menit, apabila menimbulkan busa ditambahkan HCl 1 N, busa yang terbentuk dapat bertahan selama 10 menit dengan ketinggian 1-3 cm, maka ekstrak positif mengandung saponin.

### 3.5.8 Identifikasi dengan LC-MS

Isolat senyawa yang memiliki sifat paling toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dianalisi menggunakan LC-MS/MS. kolom yang digunakan dengan spesifikasi *hypersial gold* atau C18 (50 mm x 2.1 mm x 1,9 µm). UHPLC merc ACCELLA *type* 1250 buatan *Thermo Scientific* yang terdiri dari *degasser* vakum, pompa quartener, autosampler thermostatik yang dikendalikan oleh computer melalui program x-calibur 2.1. Fasa gerak yang digunakan adalah 0,1 % asam format dalam air (fasa A) dan 0,1 % asam format asetonitril (fase B). Eluen diatur pada laju aliran 300 µL/menit selama 6 menit. Volume yang diinjeksikan 2 µL. Kolom dikontrol pada suhu 30$^{o}$C, dan kompartemen autosampler ditetapkan untuk 10 $^{o}$C. Sistem elusi dijalankan secara gradient linier yaitu terdapat pada Tabel 3.1.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Tabel 3.1 Sistem elusi pada LC-M/MS

| Waktu | Perbandingan |
|---|---|
| 0 - 0,6 | 50% (B) : 50% (A) |
| 0,6 - 4 | 90% (B) : 10% (A) |
| 4 – 4,5 | 90% (B) : 10% (A) |
| 4,5 - 6 | 50% (B) : 50% (A) |

MS yang digunakan adalah MS/MS triple Q (Quadrupole) spectrometer massa TSQ QUANTUM ACCESS MAX dari Thermo Finnigan dengan sumber ionisasi APCI (*Atmospheric Pressue Chemica Ionization*) dikendalikan oleh siftware TSQ Tune yang dikendalikan dengan mode positif. Kondisi ion APCI adalah sebagai berikut: Arus yang digunakan 4µA, suhu penguapan 250 $^{o}$C, suhu kapiler 300 $^{o}$C, sheat gas pressure 45 arbitrary units, dan Aux gas pressure 15 arbitary units. Senyawa yang ditargetkan yaitu *ß*-sitosterol, campesterol, desmosterol, fukosterol, stigmasterol, kolesterol, eritrosiol, ergosterol, brassicasterol, dan lupeol.

### 3.6 Analisa Data

Data yang diperoleh berupa nilai hasil uji toksisitas pada larva udang *Artemia salina* Leach yang dianalisis untuk mencari nilai $LC_{50}$ dengan menggunakan MINITAB.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# BAB IV

# PEMBAHASAN

## 4.1 Preparasi Sampel *Hydrilla verticillata*

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Hydrilla yang diperoleh dari danau Ranu Grati, Pasuruan. Preparasi sampel terdiri dari beberapa tahap diantaranya, pencucian, pengeringan, dan penghalusan. Pencucian bertujuan untuk membersihkan sampel dari kotoran yang menempel pada Hydrilla, selanjutnya dilakukan pengeringan yang bertujuan untuk mengurangi kandungan air di dalam sampel dan dapat meminimalisir dan mencegah tumbuhnya jamur sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Proses pengeringan sampel dilakukan dengan cara dianginanginkan tanpa pemanasan sinar matahari langsung. Pengeringan tanpa menggunakan pemanasan matahari ini dilakukan agar senyawa aktif yang diinginkan tidak mengalami kerusakan akibat suhu yang tinggi. Sampel basah memiliki warna yang hijau segar, dan pengeringan dihentikan ketika sampel sudah berwarna cokelat dan layu.

Selanjutnya proses penghalusan dan pengayakan dimaksudkan untuk memperluas permukaan bahan sehingga mempermudah pada tahap ekstraksi. Menurut Voight (1995) semakin kecil bentuk sampel maka luas permukaannya akan semakin besar sehingga kontak yang terjadi antara sampel dengan pelarut akan semakin besar, maka proses ekstraksi akan semakin cepat. Sampel dalam bentuk serbuk dengan tingkat penghalusan yang tinggi, kemungkinan terjadinya kerusakan sel-sel akan semakin besar sehingga memudahkan pelarut mengambil



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

kandungan yang terdapat dalam sampel. Sampel basah hydrilla dari berat 8 Kg diperoleh serbuk keringnya sebanyak 435 g.

## 4.2 Analisis Kadar Air *Hydrilla verticillata*

Dilakukan proses analisis kadar air karena kandungan air dalam sampel memiliki pengaruh besar terhadap proses ekstraksi. Menurut Khoiriyah, dkk. (2014) menyatakan kadar air yang rendah dapat mempermudah proses penarikan zat aktif dalam sampel karena pelarut mudah menembus dinding sel sampel tanpa adanya gangguan dari molekul air. Kadar air dalam sampel harus seminimal mungkin, agar kerusakan akibat degradasi oleh mikroorganisme dapat diminimalkan serta mencegah tumbuhnya jamur sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama dan tidak merusak komposisi kimia di dalamnya.

Hasil penentuan kadar air sampel pada penelitian ini sebesar 9,4 %. Kadar air maksimum yang disyaratkan untuk berlangsungnya ekstraksi secara maksimal yaitu sebesar 11 % (Nurmillah, 2009). Berdasarkan hasil penentuan kadar air tersebut yaitu tidak melebihi batas maksimum kadar air yang ditentukan sehingga tidak mengganggu proses ekstraksi.

## 4.3 Ekstraksi Komponen Aktif

Senyawa metabolit sekunder di alam berikatan dengan glikosida sehingga bersifat polar. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan dengan proses ekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol p.a yang bersifat polar. Dengan harapan senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam hydrilla dapat terekstrak sesuai dengan sifat polar dari metanol. Proses maserasi dihentikan ketika warna

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

filtrat dari sampel sudah berubah, yaitu dari hijau pekat menjadi hijau yang lebih bening yang diasumsikan senyawa di dalam hydrilla telah terekstrak secara maksimal. Filtrat hasil maserasi menggunakan metanol yang telah diperoleh dijadikan satu dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* untuk memperoleh ekstrak kasar metanol. Hasil pemekatan ekstrak kasar metanol hydrilla memiliki warna hijau kehitam-hitaman dan kental.

Randemen yang dihasilkan dari penelitian ini adalah sebesar 6,5 %. Hasil penelitian Hafiz (2017) randemen yang diperoleh untuk ekstrak metanol dari hydrilla sebesar 12,72 %. Perbedaan rendemen terjadi karena perbedaan kadar air yang terkandung di dalam sampel. Pada penelitian Hafiz (2017) kadar air yang dihasilkan sebesar 8,218 % sedangkan pada penelitian ini kadar air yang dihasilkan sebesar 9,4 %. Kandungan air di dalam sampel akan mempengaruhi proses ekstraksi. Kadar air yang terlalu tinggi akan menghalangi masuknya pelarut ke dalam dinding sel. Pelarut metanol akan berikatan hidrogen dengan air yang terdapat pada sampel, sehingga kandungan air di dalam sampel juga ikut terekstrak.

### 4.4 Hidrolisis Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata*

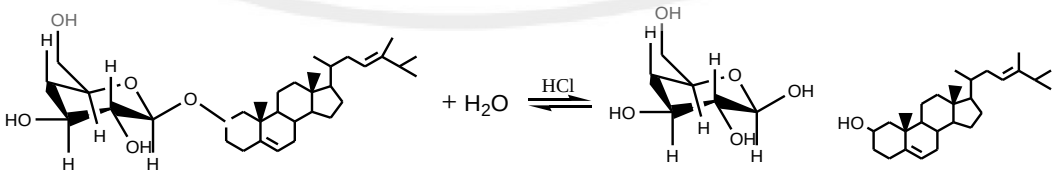
Senyawa organik pada tanaman umumnya terdapat dalam bentuk ikatan glikosida yaitu gabungan dua bagian senyawa antara gugus gula dan gugus bukan gula. Proses hidrolisis akan memutuskan ikatan glikosida menjadi glikon dan aglikon dengan bantuan katalis asam. Hidrolisis senyawa aktif ekstrak metanol dilakukan dengan menggunakan katalis asam HCl 2 N. Dimana setelah

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

penambahan katalis asam tersebut senyawa metabolit sekunder yang terikat pada gugus aglikon akan terputus.

Pemutusan gugus aglikon dilakukan dengan menggunakan asam kuat karena berfungsi untuk mempercepat reaksi pemutusan ikatan glikosida, selain itu sifat garam yang terbentuk pada penetralan (NaCl) tidak menimbulkan gangguan. Handoko (2012) menyebutkan pemilihan asam kuat seperti HCl sebagai katalis karena asam kuat akan lebih mudah melepas proton ($H^+$) secara sempurna di dalam air, sedangkan asam lemah relatif lebih sukar sehingga asam lemah memiliki kecenderungan terionisasi sebagian dalam pelepasan ion $H^+$. Semakin banyak proton yang terionisasi dalam air, maka semakin kuat peranan proton dalam pemutusan ikatan glikosida.

Penetralan dilakukan dengan larutan basa lemah natrium bikarbonat bertujuan untuk menghentikan reaksi hidrolisis yang ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung yaitu gas $CO_2$ yang mengidentifikasi bahwa HCl dan $NaHCO_3$ sudah bereaksi. Reaksi hidrolisis merupakan reaksi yang bersifat *reversible* (bolak-balik), sehinga apabila tidak dilakukan penetralan maka reaksi pembentukan ikatan glikosida antara glikon dan aglikon akan terbentuk kembali. Adapun reaksi pemutusan ikatan glikosida ketika penambahan HCl dan penetralan dengan $NaHCO_3$ ditunjukkan pada Gambar 4.1 dan Persamaan 4.1.




Gambar 4.1 Reaksi Hidrolisis Ikatan O-glikosida

$$HCl + NaHCO_3 \longrightarrow NaCl + CO_2 + H_2O$$

Persaman 4.1 Reaksi Antara HCl dan $NaHCO_3$

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## 4.5 Partisi Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata*

Partisi merupakan tahapan untuk memisahkan senyawa metabolit sekunder yang telah terlepas ikatannya dari gugus gula, berdasarkan distribusi komponen target pada dua pelarut yang tidak saling bercampur. Partisi komponen aktif ekstrak metanol Hydrilla dilakukan dengan menggunakan variasi pelarut yaitu n-heksana, kloroform dan n-butanol. Pengekstrakan senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan variasi pelarut karena senyawa metabolit sekunder dapat bersifat polar, semipolar maupun non polar. n-Heksana merupakan pelarut organik yang bersifat non polar, kloroform bersifat semipolar dan n-butanol merupakan pelarut organik yang bersifat polar. Masing-masing pelarut akan melarutkan senyawa metabolit sekunder yang memiliki kepolaran yang sama.

Partisi senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan cara partisi tidak bertingkat. Proses partisi ini dilakukan sampai ekstrak pada fase air berwarna pucat. Partisi menggunakan pelarut n-heksana, kloroform dan n-butanol menghasilkan dua lapisan yang tidak saling bercampur. Partisi dengan pelarut n-heksana dan n-butanol pada lapisan atas merupakan fase organik dan pada lapisan bawah merupakan fase air. Sedangkan partisi dengan pelarut kloroform pada lapisan atas merupakan fase air dan pada lapisan bawah merupakan fase organik. Lapisan pada fase air berisi sisa-sisa pelarut metanol yang kemungkinan masih tersisa pada ekstrak dan garam serta air yang dihasilkan pada proses hidrolisis. Sedangkan lapisan bawah merupakan fase organik, yang berisi pelarut dan komponen yang terlarut pada pelarut tersebut. Fase organik pada fraksi n-heksana dan n-butanol berada pada lapisan atas karena berat jenis n-heksana (0,655 g/mL) dan n-butanol (0,81 g/mL) lebih kecil dibandingkan berat jenis air (1 g/mL).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

sedangkan pada fraksi kloroform fase organik berada pada lapisan bawah karena berat jenis kloroform (1,498 g/mL) lebih besar dibandingkan berat jenis air (1 g/mL).

Pembentukan dua lapisan yang tidak saling bercampur pada setiap pelarut disebabkan karena adanya perbedaan sifat kepolaran. Tingkat kepolaran suatu pelarut dapat ditunjukkan dengan nilai konstanta dielektrik, dimana semakin besar nilai konstanta dielektrik maka semakin polar suatu pelarut. Konstanta dielektrik air yaitu sebesar 80; n-heksana sebesar 1,9; kloroform sebesar 4,8; dan n-butanol 18. Perbedaan nilai konstanta dielektrik antara air dengan masing-masing pelarut yang cukup jauh mengakibatkan pelarut-pelarut tersebut tidak dapat saling bercampur dengan air dan menyebabkan terbentuknya dua lapisan.

Masing-masing fraksi pelarut yang didapatkan diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *rotary evaporator vacum* untuk mendapatkan ekstrak pekat. Hasil rendemen masing-masing ekstrak ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Rendemen Hasil Partisi

| Pelarut | Warna Filtrat | Warna Ekstrak Pekat | Rendemen (%) |
|---|---|---|---|
| n-heksana | Hijau | Hijau kehitaman | 90,66 |
| Kloroform | Hijau | Hijau kehitaman | 40,66 |
| n-butanol | Hijau | Hijau kehitaman | 76,00 |

Berdasarkan hasil penelitian, rendemen ekstrak Hydrilla pada fraksi n-heksana cenderung lebih besar dibandingkan fraksi kloroform dan juga n-butanol. Diduga senyawa metabolit sekunder dalam *Hydrilla* lebih bersifat non polar. Haryadi (2012) menyebutkan berdasarkan hasil uji fitokimia, senyawa-senyawa

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

yang bersifat non polar seperti steroid akan terekstrak ke dalam pelarut yang bersifat non polar seperti n-heksana.

## 4.6 Uji Toksisitas *Hydrilla verticillata* Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

### 4.6.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina* Leach

*Artemia salina* Leach digunakan sebagai bahan pengujian toksisitas yang tersedia dalam bentuk telur. Sehingga sebelum pengujian, maka dilakukan penetasan telur dalam air laut dengan bantuan pencahayaan dan aerasi selama 48 jam. Fungsi pencahayaan adalah untuk memberikan rangsangan terhadap *Artemia* untuk menetas karena *Artemia* termasuk dalam organisme fototropik (Amaliyah, dkk., 2013). Penambahan aerator bertujuan untuk memberikan oksigen yang cukup bagi kelangsungan hidup *Artemia* sehingga apabila terdapat *Artemia* yang mati hal tersebut bukan disebabkan karena kekurangan oksigen.

Larva yang digunakan dalam penelitian ini yaitu larva *Artemia salina* Leach yang berumur 48 jam. Karena pada fase ini organ-organ *Artemia* sudah terbentuk lengkap, salah satunya adalah terbentuknya mulut. Terbentuknya mulut pada *Artemia*, sehingga dapat meminum air laut yang berisi ekstrak *Hydrilla* dengan berbagai konsentrasi yang menyebabkan kematian pada *Artemia*.

### 4.6.2 Uji Toksisitas

Uji toksisitas merupakan uji pendahuluan untuk mengetahui bioaktivitas dari suatu senyawa. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah fraksi n-heksana, fraksi kloroform dan fraksi n-butanol *Hydrilla*. Ekstrak Hydrilla dengan berbagai konsentrasi diuapkan pelarutnya sampai ekstrak kering dan ditambahkan DMSO. Penguapan pelarut bertujuan agar kematian larva benar-benar disebabkan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

oleh ekstrak *Hydrilla*. Penambahan DMSO (dimetil sulfoksida), digunakan sebagai surfaktan yang memiliki ujung hidrofilik dan hidrofobik sehingga dapat melarutkan ekstrak dalam air laut. DMSO memiliki struktur yang terdiri atas ikatan S=O yang bersifat polar dan dua alkil $CH_3$ yang bersifat nonpolar. Gugus polar akan memisahkan air laut sedangkan gugus nonpolar akan memisahkan ekstrak yang bersifat semipolar dan ekstrak yang bersifat nonpolar.

Ekstrak yang telah dilarutkan dengan DMSO kemudian ditambahkan larutan ragi roti berfungsi sebagai sumber makanan. Pemberian makanan tersebut berfungsi untuk memastikan bahwa kematian larva *Artemia* bukan disebabkan karena kekurangan makanan. Larva *Artemia salina* Leach yang ada di dalam botol didiamkan selama 24 jam dan nilai yang sering muncul (modus) dinyatakan sebagai banyaknya larva yang mati.

Mekanisme kematian larva berhubungan dengan fungsi senyawa-senyawa yang terkandung dalam sel yang dapat menghambat daya makan larva. Senyawa-senyawa tersebut bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut. Oleh karena itu, apabila senyawa-senyawa tersebut masuk ke dalam tubuh larva maka alat pencernaan larva akan terganggu. Selain itu, senyawa-senyawa tersebut dapat menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva yang mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga larva tidak dapat mengenali makanannya, akibatnya larva akan mati kelaparan. Hasil uji toksisitas fraksi n-heksana, fraksi kloroform, dan fraksi n-butanol disajikan dalam Tabel 4.2.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Tabel 4.2 Hasil Uji Toksisitas fraksi n-heksana, kloroform dan n-butanol

| Konsentrasi (ppm) | Modus larva yang mati (ekor) | | | % mortalitas | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Fraksi n-Heksana | Fraksi Kloroform | Fraksi n-Butanol | Fraksi n-Heksana | Fraksi Kloroform | Fraksi n-Butanol |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 1 | 1 | 1 | 10 | 10 | 10 |
| 10 | 2 | 1 | 1 | 20 | 10 | 10 |
| 15 | 2 | 2 | 2 | 20 | 20 | 20 |
| 20 | 3 | 3 | 2 | 30 | 30 | 20 |
| 25 | 4 | 3 | 3 | 40 | 30 | 30 |

Keterangan : Jumlah total hewan uji 50 ekor *Artemia salina* Leach (0 : kontrol pelarut, 0* : kontrol media)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga fraksi *Hydrilla* (Lampiran 4) bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Nilai $LC_{50}$ dari masing-masing ekstrak Hydrilla ditunjukkan pada Lampiran 4 dan Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Nilai $LC_{50}$ masing-masing ekstrak Hydrilla

| **Ekstrak** | **Nilai $LC_{50}$ (ppm)** |
|---|---|
| n-heksana | 30,8615 |
| kloroform | 34,6766 |
| n-butanol | 39,1573 |

Berdasarkan Tabel 4.3 nilai $LC_{50}$ fraksi n-heksana (30,8615 ppm), kloroform (34,6766 ppm), dan n-butanol (39,1573 ppm) cenderung lebih rendah dibandingkan dengan nilai $LC_{50}$ ekstrak metanol (633,171 ppm) yang dilakukan oleh Hafiz (2017). Hal tersebut menunjukan bahwa hasil partisi dari ketiga pelarut cenderung bersifat lebih toksik dibanding hasil ekstrak kasar (ekstrak metanol) Hydrilla. Sedangkan pada ketiga fraksi, fraksi n-heksana memiliki nilai $LC_{50}$ yang lebih rendah dibandingkan fraksi kloroform dan n-butanol. Hal ini dimungkinkan di dalam sampel yang sama, kadar senyawa steroid fraksi n-heksana paling banyak dibandingkan dengan fraksi kloroform dan n-butanol, karena di dalam

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

fraksi kloroform dan n-butanol terkandung berbagai senyawa campuran, sehingga kadar steroid lebih sedikit.

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa senyawa steroid bersifat sangat toksik seperti pada penelitian (Diastutik dan Warsinah, 2010) menyebutkan bahwa pada kulit batang *Rhizopora mucronata* yang mengandung senyawa steroid memiliki sifat toksik terhadap sel *Myeloma* (tumor ganas). Desianti., (2014) pada penelitiannya bahwa Mikroalga *Chlorella sp*. hasil fraksi n-heksana senyawa steroid bersifat toksik dengan $LC_{50}$ sebesar 34,2133 ppm. Penelitian menggunakan alga merah *Eucheuma cottoni* menyebutkan bahwa pada fraksi 1-butanol juga memiliki nilai $LC_{50}$ sebesar 70,32 ppm yang bersifat toksik (Afif, 2015).

### 4.7 Uji Fitokimia dengan Reagen

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif pada tanaman. Hasil pengujian fitokimia dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Hasil Uji Fitokimia Masing-Masing Ekstrak

| Golongan Senyawa Aktif | Ekstrak | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Methanol | n-heksana | Kloroform | n-butanol |
| Flavonoid | - | - | - | - |
| Tanin | | | | |
| - $FeCl_3$ | - | - | - | - |
| - Gelatin | + | - | - | + |
| Alkaloid | | | | |
| - Mayer | + | - | + | + |
| - Dragendorff | - | - | - | - |
| Triterpenoid | - | - | + | - |
| Steroid | + | + | + | + |
| Saponin | + | + | + | + |

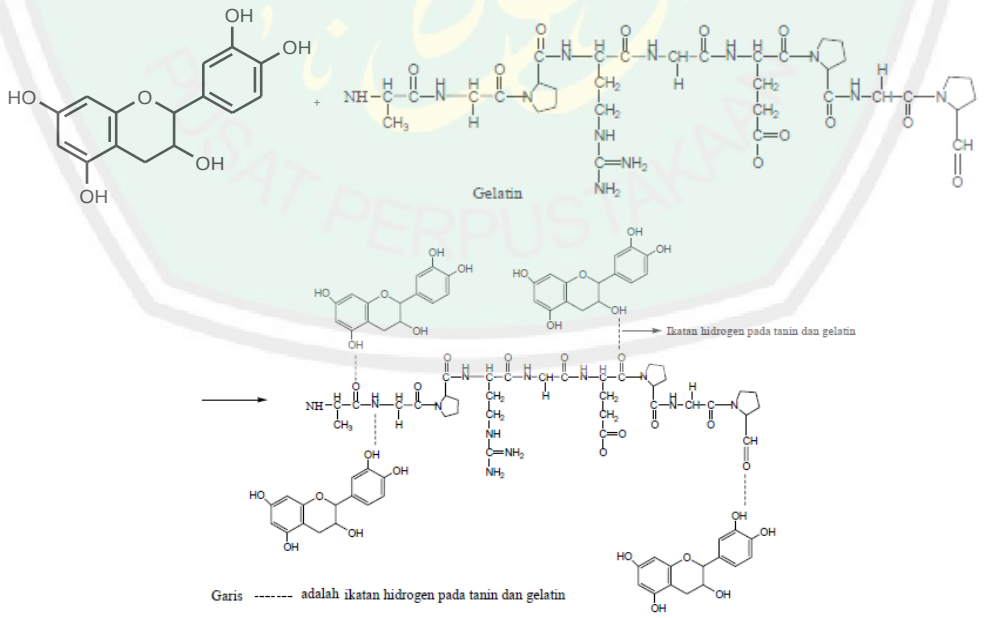
Keterangan: + = positif mengandung senyawa
- = tidak mengandung senyawa

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

### 4.7.1 Uji Tanin

Uji tanin pada penelitian ini dilakukan dengan 2 cara yaitu menambahkan ekstrak dengan larutan $FeCl_3$ dan gelatin. Uji positif tanin ditunjukkan denganterbentuknya warna hijau kehitaman setelah ditambahkan larutan $FeCl_3$. Hal ini apakah suatu bahan atau sampel mengandung gugus fenol. Sedangkan, uji positif tanin pada penambahan gelatin ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih pada larutan uji.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa uji tanin dengan menggunakan $FeCl_3$ memberikan hasil negatif untuk semua ekstrak sedangkan uji tanin menggunakan larutan gelatin menghasilkan reaksi positif terhadap ekstrak metanol dan fraksi n-butanol. Tanin merupakan himpunan polihidroksi fenol, gugus hidroksi dari tanin akan membentuk ikatan hidrogen dengan gelatin sehingga terbentuk endapan putih (Leemensand, 1991). Dugaan reaksi senyawa tanin dengan gelatin dapat dilihat pada Gambar 4.2.




Endapan putih

Gambar 4.2 Dugaan reaksi antara tanin dan gelatin (Leemensand, 1991)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

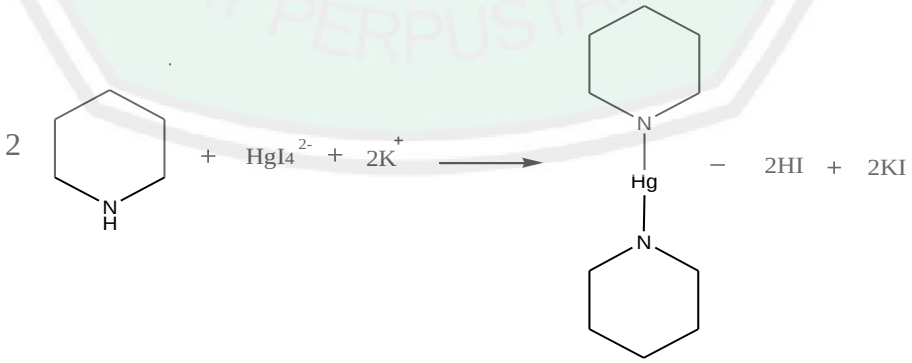
### 4.7.2 Uji Alkaloid

Uji senyawa alkaloid dilakukan dengan penambahan HCl pada ekstrak sampel, bertujuan untuk mengekstrak senyawa alkaloid dikarenakan sifat alkaloid yang basa. Analisis kualitatif untuk menunjukkan adanya alkaloid dapat diperoleh dengan menggunakan reagen Dragendorrf dan Mayer. Adanya alkaloid ditandai dengan terbentuk endapan jingga setelah diberi pereaksi Dragendorf, sedangkan pada uji Mayer didapatkan endapan kekuning-kuningan. Uji positif alkaloid dengan reagen mayer yaitu metanol, kloroform, dan n-butanol.

Alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan ion logam. Senyawa alkaloid dapat mengkoordinasikan pasangan elektron bebas atom nitrogennya pada atom pusat Hg. Kompleks Hg dengan ligan iodin disubstitusi oleh senyawa alkaloid membentuk kompleks dengan BK (Bilangan koordinasi) 2. Reaksi dugaan yang terjadi pada uji alkaloid disajikan pada Gambar 4.3.

$HgCl_2 + 2\ KI \longrightarrow HgI_2 \downarrow + 2\ KCl$

$HgI_2 + 2\ KI \longrightarrow [HgI_4]^{2-} + 2\ K^+$

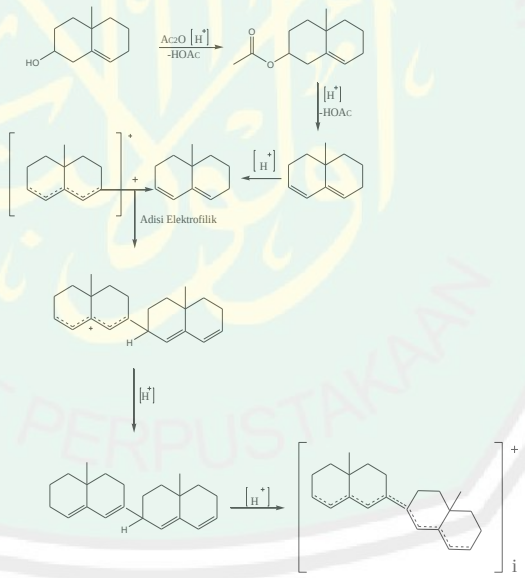



Gambar 4.3 Dugaan reaksi antara alkaloid dengan reagen Mayer (Sumaryanto, 2009)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

### 4.7.3 Uji triterpenoid/steroid

Uji senyawa triterpenoid/steroid menggunakan reagen Liebermann-Burchard yaitu menggunakan asam asetat anhidrat dan asam sulfat. Ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana, kloroform dan n-butanol menunjukkan adanya senyawa steroid yang ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau kebiruan pada larutannya. Sedangkan adanya senyawa triterpenoid yang ditandai dengan terbentuknya cincin kecoklatan pada perbatasan dua pelarut hanya dimiliki oleh fraksi kloroform. Perubahan warna yang terjadi disebabkan adanya reaksi oksidasi golongan senyawa steroid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi (senyawa pentaenilik) (Sriwahyuni, 2010). Dugaan reaksi antara senyawa triterpenoid/steroid dapat dilihat pada Gambar 4.4.



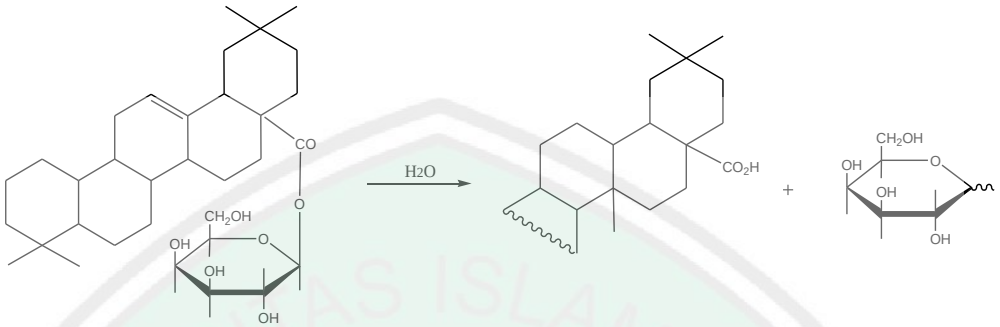

Gambar 4.4 Dugaan reaksi senyawa triterpenoid/steroid dengan reagen Liebermann-Burchard (Siadi, 2012)

### 4.7.4 Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan uji busa yaitu dengan penambahan air dan dilakukan pengocokan. Adanya senyawa saponin ditunjukkan dengan timbulnya

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

busa yang bertahan selama 10 menit. Reaksi pada uji saponin disajikan pada Gambar 4.5.




Gambar 4.5 Reaksi hidrolisis saponin dalam air (Rusdi, 1990)

Saponin merupakan suatu glikosida dengan gugus hidroksil pada molekulnya dan mengandung gugus hidrofilik dan hidrofobik. Adanya glikosida mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Rusdi, 1990). Busa yang dihasilkan diuji kestabilannya dengan penambahan HCl. Hasil pengujian menunjukkan ekstrak metanol, fraksi n-heksana, kloroform dan n-butanol positif mengandung saponin.

## 4.8 Identifikasi menggunakan LC-MS/MS

Identifikasi senyawa steroid *Hydrilla veticillata* yaitu dengan LC-MS/MS. LC-MS/MS yang digunakan pada penelitian ini yaitu UHPLC-MS/MS. HPLC yang digunakan menggunakan tenaga ultra dengan detektor ganda yaitu MS/MS sehingga memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi. UHPLC dapat memisahkan senyawa berdasarkan distribusi kepolaran senyawa terhadap fasa diam dan fasa gerak yang digunakan. Sedangkan MS (*mass spectrometry*) sebagai detektor yang digunakan untuk mengidentifikas senyawa berdasarkan berat molekul. Detektor ganda (MS/MS) yang digunakan akan menghasilkan beberapa *m/z* diantaranya

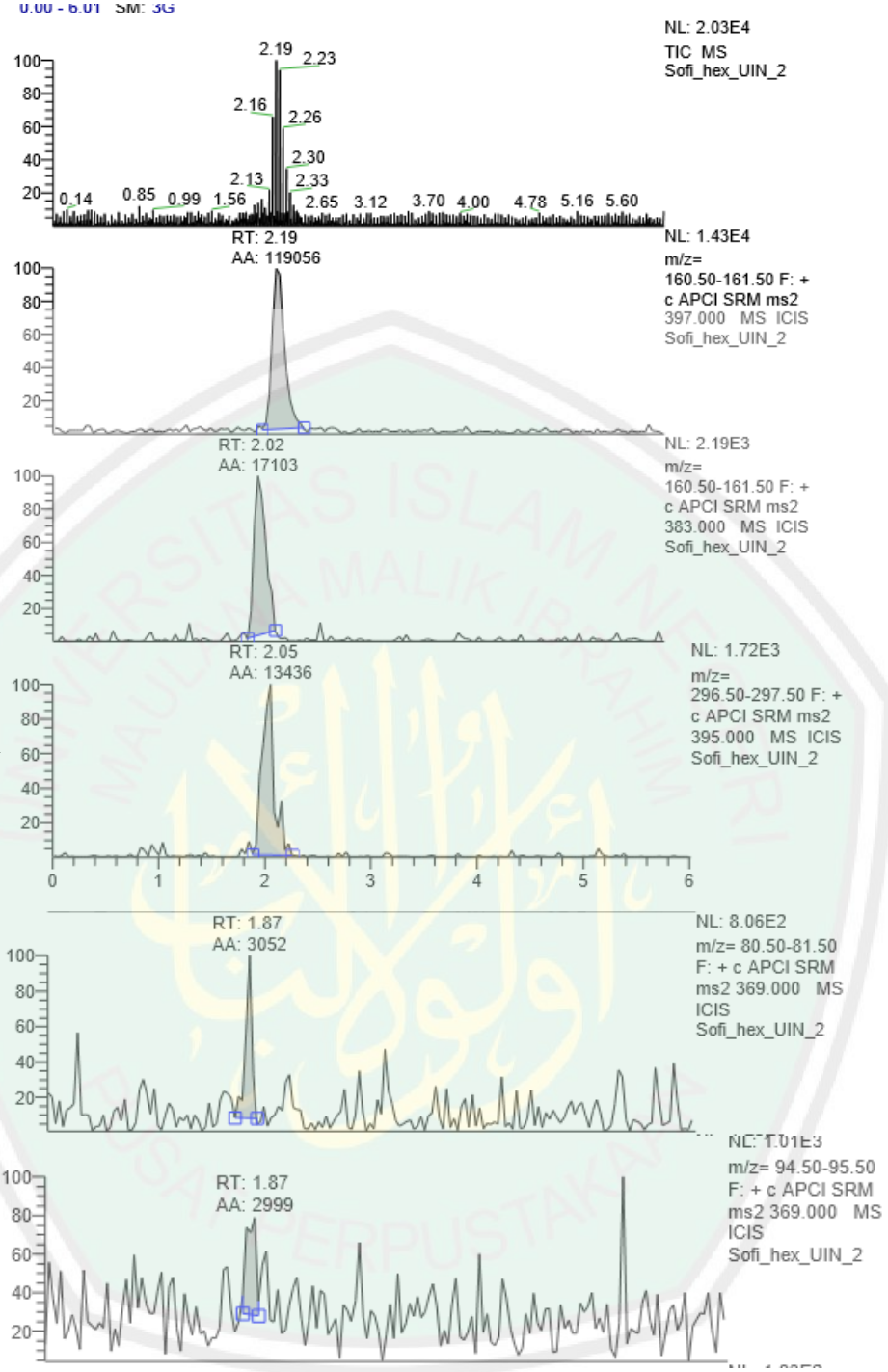
CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

massa induk (*parent mass*) dan massa anak (*daughter mass*) atau massa ion hasil pecahan dari massa induk. MS/MS yang digunakan triple Q (Quadropole) yaitu spektrometer massa yang hanya dapat mendeteksi senyawa target. Data yang dihasilkan dari identifikasi LC-MS/MS yaitu berupa kromatogram yang menunjukkan puncak, waktu retensi (Rt), luas area (AA), serta data nilai *m/z*. Berdasarkan kromatogram yang diperoleh, hasil pemisahan steroid dari fraksi n-heksana dapat dilihat pada Gambar 4.6.

Hasil kromatogram berdasarkan waktu retensi dan luas area dari 10 steroid yang ditarget (ß-sitosterol, campesterol, desmosterol, fukosterol, stigmasterol, kolesterol, eritrosiol, ergosterol, brassicasterol, dan lupeol) hanya ada 5 steroid yang menujukkan hasil positif yaitu pada waktu retensi 2,19 menit dan luas area 119056, 2,02 menit luas area 17103, 2,05 menit luas area 13436, 1,87 menit luas area 3052 dan 1,87 menit luas area 2999.

Hasil *m/z* yang diperoleh dari identifikasi dapat dibuktikan dengan penelitian sebelumnya. Mardaneni, (2017) pada penelitiannya menyatakan bahwa alga merah Eucheuma cottoni mengandung ß-sitosterol, stigmasterol, fukosterol, dan kampesterol dengan berat molekul sebesar 397, 395, 369, dan 383 *m/z*. Penelitian yang dilakukan Pereira, dkk (2016) menyebutkan bahwa identifikasi steroid pada alga coklat mengandung ß-sitosterol, kampesterol, stigmasterol, fukosterol, dan kolesterol dengan berat molekul sebesar 397, 386, 395, 369, dan 369 *m/z*.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG




Gambar 4.6 Kromatogram LC-MS/MS Fraksi n-Heksana

Khalaf, dkk., (2011) menyatakan bahwa senyawa steroid berada pada kondisi ionisasi sehingga setiap senyawa kehilangan satu molekul air. Ion yang

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

terdeteksi oleh spektrometer selalu berbentuk $[M-H_2O+H]^+$ untuk massa induk (*parenst mass*) dan massa anak (*daughter mass*) akan terdeteksi sebagian massa induk. Berikut hasil identifikasi dengan LC-MS/MS pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Hasil Identifikasi LC-MS/MS Senyawa Steroid

| Jenis Steroid | Waktu Retensi (min) | Massa Molekul (g/mol) | Massa Induk (parent mass) | Massa Ion Produk (daughter mass) | Luas Area (AA) | Nilai NL (neutral loss) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ß-sitosterol | 2,19 | 414 | 397 | 160,50-161,50 | 119056 | $1,43x10^4$ |
| Campesterol | 2,02 | 400 | 383 | 160,50-161,50 | 17103 | $2,19x10^3$ |
| Stigmasterol | 2,05 | 412 | 395 | 296,50-297.,50 | 13436 | $1,7x10^3$ |
| Fukosterol | 1,87 | 386 | 369 | 80,50-81,50 | 3052 | $8,06x10^2$ |
| Kolesterol | 1,87 | 386 | 369 | 94,50-95,50 | 2999 | $1,01x10^3$ |

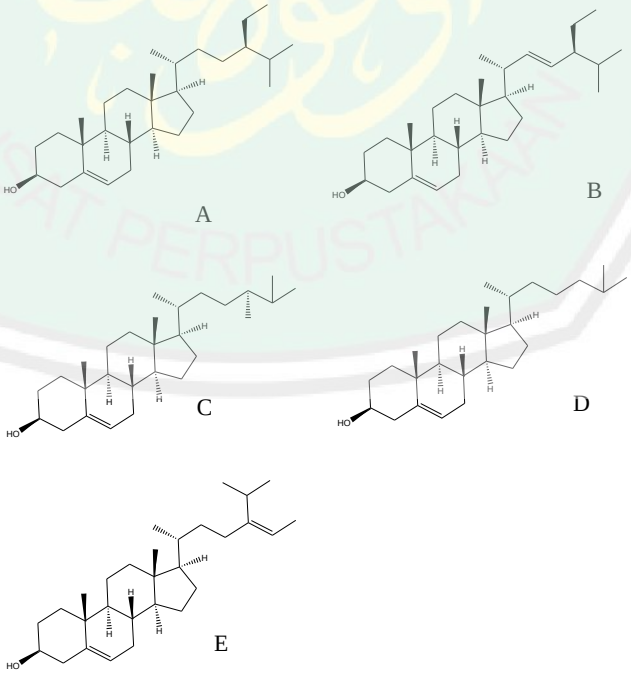
Hasil pemisahan senyawa steroid yang baik dapat dilihat dari bentuk puncak yang dihasilkan. Hasil dari kromatogram dapat dilihat bahwa puncak pada retensi waktu 2,19 menit dengan berat molekul 397 *m/z* senyawa ß-sitosterol merupakan senyawa yang pemisahannya cukup baik. Senyawa ß-sitosterol menunjukkan puncak yang tunggal/lurus, sedangkan puncak dengan waktu retensi 2,02 dan 2,05 menit menghasilkan puncak yang lurus tetapi disekitar puncak terdapat puncak yang lain. Puncak retensi waktu 1,87 menit pada kedua puncak menunjukkan masih banyak terdapat puncak-puncak disekitarnya, sehingga diasumsikan bahwa senyawa tersebut masih terkandung senyawa steroid yang lain dan senyawa selain steroid.

Berdasarkan kromatogram yang diperoleh dilihat dari luas area dan juga nilai NL (*Neutral Loss*) bahwa senyawa ß-sitosterol adalah jenis steroid yang paling dominan dengan kelimpahan paling banyak pada tanaman *Hydrilla verticillata* yang ada di Danau Ranugrati Pasuruan. Berdasarkan nilai luas area dan juga NL senyawa ß-sitosterol memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa-senyawa lain yaitu NL ($1,43x10^4$) dan luas area 119056.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Semakin tinggi nilai NL dan juga luas area maka semakin banyak kandungan senyawa pada suatu tanaman, yaitu dengan urutan : ß-sitosterol > kampesterol > stigmasterol > fukosterol > kolesterol.

Kepolaran senyawa steroid dapat dilihat dari waktu retensi yang didapat, yaitu semakin rendah waktu retensi maka senyawa tersebut semakin polar dan sebaliknya. Fase gerak yang digunakan bersifat polar dan kolom LC/MS bersifat nonpolar, menyebabkan senyawa yang lebih polar akan keluar terlebih dahulu dan menyebabkan waktu retensinya kecil. Berikut senyawa steroid jika diurutkan dari yang polar hingga sedikit polar yaitu fukosterol, kolesterol, kampesterol, stigmasterol dan ß-sitosterol. Sedangkan pada kolesterol dan fukosterol memiliki waktu retensi yang sama yaitu 1,87 menit. Hal tersebut dikarenakan kecepatan waktu yang diatur kurang maksimal sehingga memiliki persamaan pada waktu retensi. Struktur-struktur senyawa steroid yang didapatkan ditunjukkan pada Gambar 4.7




Gambar 4.7 (A) ß-sitosterol, (B) Stigmasterol, (C) Campesterol, (D) Kolesterol (E) Fucosterol

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## 4.9 Pemanfaatan *Hydrilla verticillata* dalam Prespektif Islam

Penelitian ini mengkaji tentang isolasi senyawa steroid yang terkandung di dalam tumbuhan *Hydrilla verticillata*. Di dalam ayat-ayat Al-qur'an Allah SWT sering menyeru kepada manusia untuk memperhatikan dan merenungkan ciptaan-ciptaanNya yang begitu amat banyak. Agar manusia senantiasa selalu berfikir dan memperhatikan serta menjadi hamba Allah yang tunduk dan patuh kepada Allah SWT. Sebagaimana firman Allah SWT di dalam surat Ali Imron ayat 190-191 yaitu :

إِنَّ فِي خَلْقِ ٱلسَّمَٰوَٰتِ وَٱلْأَرْضِ وَٱخْتِلَٰفِ ٱلَّيْلِ وَٱلنَّهَارِ لَأٓيَٰتٍ لِّأُو۟لِى ٱلْأَلْبَٰبِ ﴿١٩٠﴾
ٱلَّذِينَ يَذْكُرُونَ ٱللَّهَ قِيَٰمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ ٱلسَّمَٰوَٰتِ
وَٱلْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَٰذَا بَٰطِلًا سُبْحَٰنَكَ فَقِنَا عَذَابَ ٱلنَّارِ ﴿١٩١﴾

Artinya :

"*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal, (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi*" (Qs. Ali 'Imron: 190-191).

Tafsir Ibnu Kasir bahwa lafadz فِي خَلْقِ ٱلسَّمَٰوَٰتِ وَٱلْأَرْضِ menjelaskan kekuasaan dan kebesaran Allah SWT yang telah menciptakan alam beserta isinya seperti tumbuhan dan hewan. Allah SWT menciptakan segala sesuatu tidak ada yang sia-sia, melainkan terdapat hikmah-hikmah dan manfaatnya. Sedangkan pada lafadz لَأٓيَٰتٍ لِّأُو۟لِى ٱلْأَلْبَٰبِ "terdapat tanda-tanda bagi orang-orang berakal" menjelaskan bahwa akal manusia sangatlah sempurna dan memiliki kecerdasan, karena dengan akal manusia dapat mengetahui segala sesuatu secaa langsung dan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

jelas sehingga dapat merenungi tanda-tanda kekuasaan Allah SWT (Ad-Dymasyqy, 2000). Lajnah (2015) melansir ayat tersebut menyebutkan bahwa manusia sejak dulu sudah tergugah nalurinya untuk tahu lebih banyak keadaan alam semesta dan isinya, termasuk Bumi.

Perkembangan ilmu sains dan teknologi, para peneliti sedikit demi sedikit membuka rahasia alam semesta. Berdasarkan beberapa penelitian menyebutkan bahwa tanaman dapat dimanfaakan sebagai obat. Sebagaimana Allah SWT berfirman dalam Qs. Asy Syu'araa ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا۟ إِلَى ٱلْأَرْضِ كَمْ أَنۢبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ۝٧

Artinya :

"*Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di Bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?" (Qs. Asy-Syu'araa:7*)

Tumbuhan yang baik adalah tumbuhan yang subur dan bermanfaat bagi mahkluk hidup. Shihab, (2002) menjelaskan tumbuhan yang bermacam-macam jenisnya dapat dimanfaatkan sebagai obat berbagai penyakit. Salah satu tumbuhan yang memiliki manfaat yaitu *Hydrilla verticillata*. Hydrila merupakan salah satu tumbuhan dalam air yang Allah SWT ciptakan yang merupakan komponen abiotik yang diciptakan di Bumi. Selain air, Allah SWT juga menciptakan komponen abiotik lainnya seperti angin, cahaya, tanah, garam mineral, suhu dan lain-lain. Komponen-komponen abiotik tersebut dapat membantu kehidupan komponen biotik, seperti Hydrilla. Air yang mengandung garam-garam mineral seperti K, P, Ca, Mg dan lain sebbagainya (Marer dan Gaevey, 2012) yang terkandung di dalamnya dapat membantu pertumbuhan hydrilla sehingga hydrilla dapat hidup dan menghasilkan senyawa-senyawa yang bermanfaat.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Senyawa-senyawa yang bermanfaat yang terkandung di dalam tumbuhan hydrilla dalam penelitian ini terbukti memiliki kemampuan sebagai obat. Penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa metabolit sekunder pada tanaman *Hydrilla verticillata* yang diekstrak memiliki bioaktivitas. Fraksi n-heksana *Hydrilla verticlata* menunjukkan nilai $LC_{50}$ sebesar 30,8615 ppm dimana bahwa senyawa tersebut bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Ekstrak n-heksana *Hydrilla verticillata* mengandung senyawa aktif berupa senyawa steroid yang dapat dimanfaatkan dan menjadi acuan di bidang farmasi dan kedokteran. Menurut (Mayer, dkk., 1982) nilai $LC_{50}$ 30 – 200 ppm dapat berpotensi sebagai antimikroba.

Hasil penelitian tersebut merupakan salah satu bukti kekuasaan Allah SWT. Hydrilla yang selama ini hanya dianggap sebagai gulma yang mengganggu penggunaan air, ternyata memilki manfaat yang luar biasa. Hal ini menunjukkan kebenaran ayat-ayat Al-qur'an yang banyak menjelaskan bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu tidak ada yang sia-sia. Semua yang Allah SWT ciptakan memiliki manfaat, kegunaan dan hikmah. Dengan adanya penelitian ini kita dapat menemukan dan mengetahui rahasia alam tumbuhan. Di dalam surat al An'am Ayat 99 Allah SWT menutup ayatNya dengan "sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman", karena pada dasarnya orang-orang yang beriman hidup, bekerja, berfikir tentang kebesaran dan kekuasaan Allah SWT.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# BAB V

# PENUTUP

## 5.1 Kesimplan

1. Fraksi hasil n-heksana memiliki toksisitas paling tinggi dibandingkan dengan fraksi lainnya. Nilai $LC_{50}$ fraksi n-heksana adalah 30,8615 ppm, fraksi kloroform sebesar 34,6766 dan fraksi n-butanol sebesar 39,1573 ppm.
2. Hasil analisis spektrofotometer LC-MS/MS fraksi n-heksana dari *Hydrilla verticilata* memunculkan beberapa berat molekul yaitu massa induk 397 *m/z* dengan massa ion produk 160,50-161,50; massa induk 383 *m/z* dengan massa ion produk 160,50-16150; massa induk 395 *m/z* dengan massa ion produk 296,50-297,50; massa induk 369 *m/z* dengan massa ion produk 80,50-81,50 dan massa induk 369 *m/z* dengan massa ion produk 94,50-95,50 yang menunjukkan adanya senyawa steroid jenis *ß*-sitosterol, kampesterol, stigmasterol, fukosterol dan kolesterol.

## 5.2 Saran

1. Hasil partisi dilakukan pemisahan menggunakan KLT ataupun kolom agar mendapatkan hasil yang lebih spesifik.
2. Perlu adanya penelitian lebih lanjut dengan LC-MS/MS untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder apa saja yang terkandung di dalam *Hydrilla verticillata* selain senyawa steroid.



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# DAFTAR PUSTAKA


Ad-Dimasyqi, A.A.F.I.I.K. (2001). Tafsir Ibnu Kasir Juz 7. Bandung: Sinar Baru Algesindo.

Afif, S., Fasya, A.G & Ningsih, R. 2015. Extraction Toxicity Assay and Identification of Active Compounds of Red Algae *(Eucheuma cottoni)*from Sumenep Madura. *ALCHEMY*, 4( 2): 101-106.

Agilent Technologies, (2001), Agilent LC-MS Primer. U.S.A 5988-2045EN.

Agustian, R., Yudiati, E., dan Sedjati, S. 2013. Uji Toksisitas Ekstrak Pigmen Kasar Mikroalga *Spirulina Platensis* dengan Metode Uji BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). *Journal Of Marine Research Volume 2, Nomor 1, Halaman 25-31.*

Al-Maraghi, A.M. (1980). *Terjemah Tafsir Al-Maraghi 7*. Semarang: CV. Toha Putra Semarang.

Amaliyah, S. (2013). Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.

Annie, S.W., Raveen, R., Paulraj, M.G., Samuel, T & Arivoli, S. 2016. Screening of *Hydrilla verticillata* (L. F.) Royle (Hydrocharitaceae) crude leaf extracts for larvicidal efficacy against the filarial vector *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). *International Journal of Entomology Research*. 1(3): 43-48.

AOAC. 1984. *Official Methods Of Analysis Of The Association Of Official Analytical Chemist*, Inc. Washington Dc.

Bariyyah, S.K., Fasya, A.G., Abidin, M & Hanapi, A. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *chlorella sp*. Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Cahyono, A.B. 2004. *Keselamatan kerja bahan kimia di industri*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Day, R.A. A.L. Underwood. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Jakarta : Erlangga.

Desianti, N., Fasya, A.G., & Adi, T.K. 2014. Uji toksisitas dan identifiaksi golongan senyawa aktif fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter, dan




CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

n-heksana hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga Chlorella sp. Skripsi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Kimia.

Diastutik, H & Warsinah. 2010. Identifikasi Senyawa Antikanker dari Ekstrak Kloroform Kulit Batang *Rhizopora Mucronata*. *Majalah farmasi Indonesia, 21(4), 266-271*.

Diaz, B C, A. Segura Carretero, A. Fernandez-Gutierrez, A. Belmonte Vega, A.

Farihah. 2008. Uji toksisitas ekstrak daun *ficus benjamina* l. terhadap *Artemia salina* leach dan profil kromatografi lapis tipis. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Guenther, E. 1987. Minyak Atsiri Jilid I. (K. S, Trans.) Jakarta: UI Press.

Hafiz, Nur, 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: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Hagerman, A.E. (2002). *Condensed Tannin structural chemistry. department of chemistry and biochemistry*, Miami University, Oxford, OH 45056.

Halimah, N. (2010). Uji fitokimia dan uji toksisitas ekstrak tanaman anting-anting (Acalypha indica Linn) terhadap larva udang (Artemia salina Leach). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.

Handoko, D. S. (2006). Kinetika hidrolisis maltosa pada variasi suhu dan jenis asam sebagai katalis. SIGMA: Jurnal Sains dan Teknologi, 9(1).

Handoko, D.S.P. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis. Jurnal SIGMA, Volume 9, Nomor 1, ISSN 1410-5888. Jember: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember.

Harbone, J.B. 1987. *Metode Fitokimia :Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan.* Terjemahan K. Padmawinata& I. Sudiro. Bandung: ITB.

Hart, H. 1987. Kimia Organik Suatu Kuliah Singkat. Penerjemah. Achmadi, S. Jakarta: Erlangga.

Haryadi, D. 2012. Senyawa Fitokimia dan Sitotoksitas Ekstrak Daun Surian (Toona sinensia) terhadap Sel Vero dan MCF-7. Skripsi. Bogor: Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Hasanah, F. 2017. Uji Toksisitas Ekstrak Etanol, Etil Asetat dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata* (L.f) Royle dari Ranu Grati Pasuruan Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. Skripsi. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Ikfi, S. 2017. Uji Antioksidan Ekstrak Kasar Metanol, Kloroform dan n-Heksana *Hydrilla Verticillata* (L.F) Royle dari Danau Ranu Pasuruan Menggunakan Metode Difenil Hidrazil (DPPH). Skripsi. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Karger, BL., Synder, L., dan Hosvarth C. 1973. *An Introduction to Separation*. Brisbane: John dan Sons.

Khalaf, I., Corciovia, A., Vlase, L., Ivanescu, B., Lazar, D. 2011. LC/MS Analysis of Sterolic Compound from *Glycyrrhiza Glabra*. *Journal STUDIA UBB CHEMIA*, 3(1): 97-102.

Khoiriyah, S. Hanapi, A., dan Fasya, A. G. 2014. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat, Kloroform dan Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga Coklat *Sargassum Vulgare* dari Pantai Kapong Pamekasan Madura. *ALCHEMY. Vol. 3 No. 2*. Hal 133-144.

Khopkar, S.M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta : UI Press.

Kristanti, A.N., Aminah, N,S., Tanjung, M., & Kurniadi, B. 2008 *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: UNAIR Press.

Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Quran. 2015. *Jasad Renik dalam Perspektif AL-Qur'an dan Sains*. Jakarta: LIPI.

Lawoko, M., Deshpande, S. & Heiningen A.R.P. 2009. Pre-Hydrolysis of the Phenyl Glycosidic Bond in a Model Compound. Lenzinger Berichte 87 (2009) 77-87.

Leemensand, 1991. Plant Resources of South East Asia 3 Dye and Tanin Production Plant. Netherland, Pudoc Wagengan.

Lenny, S. 2006. *Senyawa Terpenoid dan Steroid*. Sumatera Utara :Universitas Sumatera Utara.

Mardaneni, I., Fasya, A.G., Amalia, S., & Aini. N. 2017. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Fraksi Etil Asetat Perairan Wongsorejo-Banyuwangi dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan LC-MS/MS. *Skripsi*. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Marer, P.J., dan Garvey, K.K. 2001. *Aquatic pest control*. USA: University of California.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Marraskuranto, E., Nurrahmi, D, F., Hedi, I, J., & Thamrin, W. 2008. Aktivitas Antitumor (Hela dan T47D) dan Antioksidan Ekstrak Makroalga Hijau Ulva Fasciata. Jurnal pascapanen dan bioteknologi kelautan dan perikanan, Vol. 3 No.2.

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. doi:10.1055/s-2007-971236.

Michael Vogeser, Christoph Seger. A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory-goals for futher development. Clinical Biochemistry Rev 2008; 41; 649-662.

Nurjanah., Azka, A., & Abdullah, A. 2012. Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Semanggi Air (*Marsilea Crenata). Jurnal inovasi dan kewirausahaan. Vol.1 (3): 152-158.*

Nurmillah, O. Y. (2009). Kajian Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Ekstrak Biji, Kulit buah, Batang dan Daun Tanaman Jarak Pagar (Jatropha curcas L.). *Skripsi diterbitkan.* Bogor : Fakultas Teknologi Pertanian IPB.

Pal, D. K., & Nimse, S. B. 2006. Little known uses of common aquatic plant ,Hydrilla verticillata ( Linn . f .) Royle.

Pereira *et al*. 2016. Ekstraction of Strerols in Brown Macroalga from Antartica and Their Identification by Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry. *Journal Appl Phycol*, DOI 10.1007/s10811-016-0905-5.

Phukan, P., Phukan, R., & Phukan, S. N. 2015. Heavy metal uptake capacity of Hydrilla verticillata: A commonly available Aquatic Plant. *International Research Journal of Environment Science ISSN*, *4*(3), 2319–1414.

Poedjiadi, A. (1994). *Dasar-dasar biokimia*. Jakarta: UI Press.

Prabha, P., & Rajkumar, J. 2015. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 7(3): 1809-1815 Research Article Phytochemical screening and bioactive potential of Hydrilla verticillata, *7*(3), 1809–1815.

Quthb, S. (2004). *Tafsir fi zhilalil Qur'an di bawah naungan Al-Qur'an Jilid VII.* Jakarta: Gema Insani.

Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Bandung: Penerbit ITB.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Rusdi. (1990). *Tetumbuhan sebagai sumber bahan obat.* Padang: Pusat Penelitian Universitas Andalas.

Saifudin, A, Suparti, Fuad, & AnangdanDa'I, M. 2006. *Biotransformasi Kurkumin Melalui Kultur Suspensi Sel Daun Catharanthusroseus (L) G. Dan Berbunga Merah*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Sarker, S.D., & Nahar, L. 2009. *Kimia untuk mahasiswa farmasi bahan kimia organik, alam dan umum*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

Shihab, Q. (2002). *Tafsir Al-Mishbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an* Vol.11 dan 12. Jakarta: Penerbit Lentera Hati.

Siadi, K. 2012. Ekstrak Bungil Biji Jarak Pagar (Jatropa Curcas) Sebagai Biopestisida yang Efektif dengan Penambahan Larutan NaCl. *Jurnal Mipa* 35(2): 77-83.

Soebagio, Budiasih, E., Ibnu, M.S., Widarti, H.R. & Munzil. 2005. *Kimia Analitik II*. Malang: UM Press.

Soemirat, J. S. 2005. *Epidemiologi lingkungan.* Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.

Sriwahyuni, I. (2010). Uji Fitokimia Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn) dengan Variasi Pelarut dan Uji Toksisitas Menggunakan Brine Shrimp (*Artemia salina* Leach). *Skripsi.* Malang: Jurusan Kimia Fakultas Saintek Universitas Islam Negeri Malang.

Sumaryanto, A. (2009). Isolasi Karakterisasi Senyawa Alkaloid Dari Kulit Batang Tanaman Angsret (*Spathoda campanulata* Beauv) Serta Uji Aktivitas Biologisnya Dengan Metode Uji Brine Shrimp. *Skripsi*. Jurusan Kimia. *Fakultas* MIPA. Malang: Universitas Brawijaya.

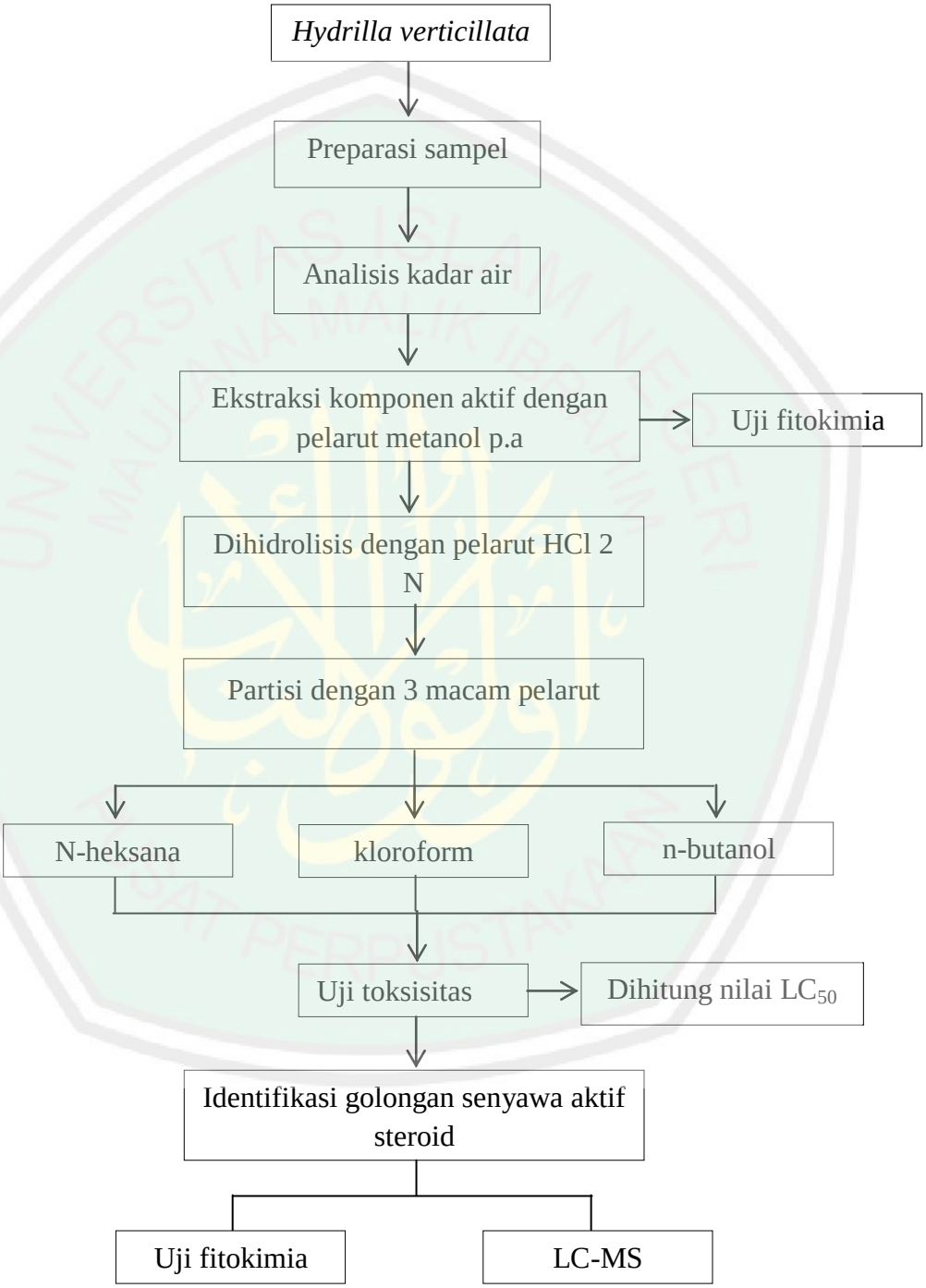
Vogel, A.I. (1978). *Textbook of practical organic chemistry*. London: Longmans.

Voigt, R. (1994). *Buku pelajaran teknologi farmasi edisi 5*, Gadjah Mada. University Press, Yogyakarta.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# LAMPIRAN

## 1. Rancangan Penelitian






CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

**2. Diagram Alir**

**1. Preparasi Sampel**

Sampel

- dicuci *H. verticillata*
- dikeringkan tanpa menggunakan sinar matahari langsung
- dihaluskan dengan ukuran 90 mesh

Hasil

**2. Analisis Kadar Air**

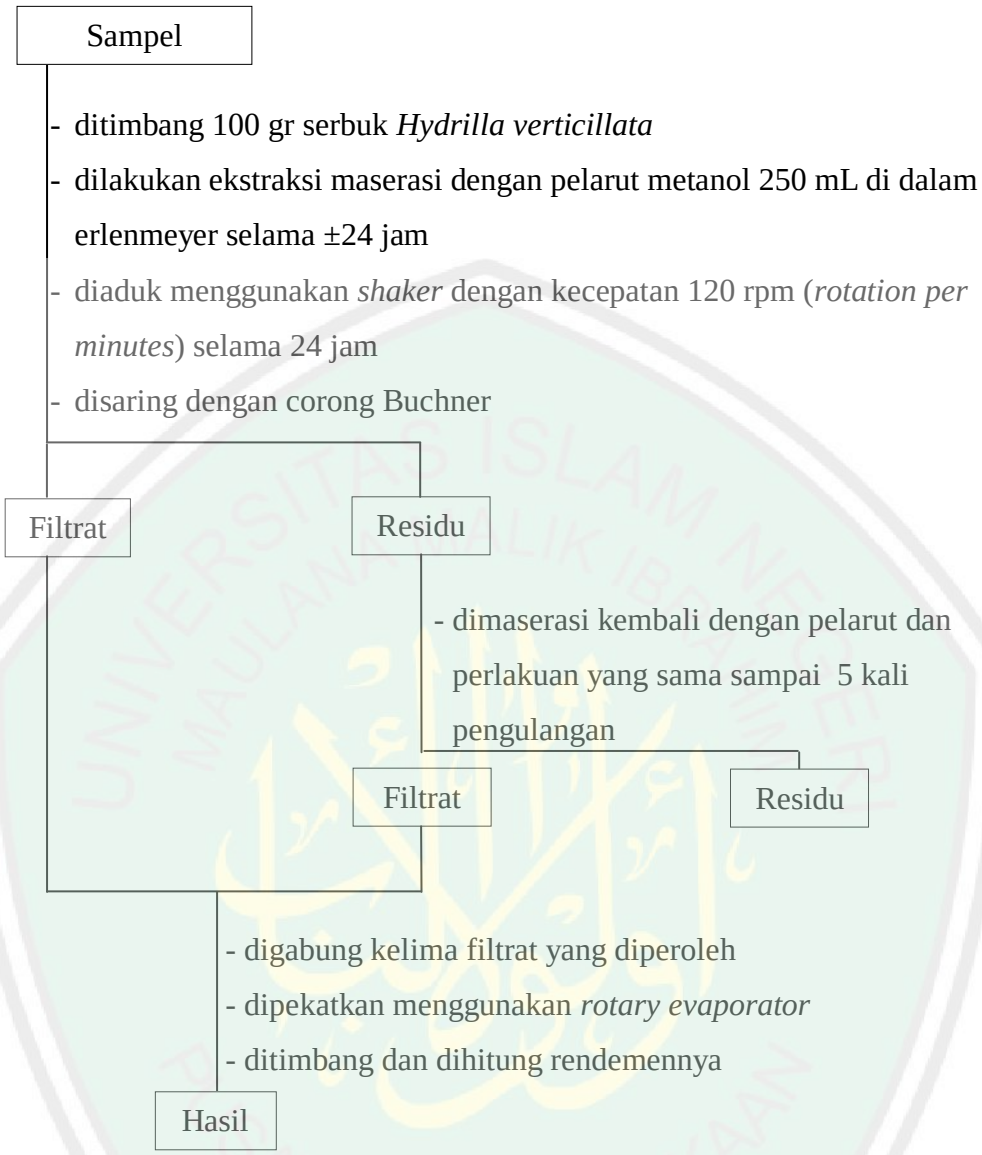
Sampel

- dimasukkan cawan porselen dalam oven pada suhu 100—105$^{o}$C selama 15 menit
- didinginkan cawan dalam desikator selama 10 menit
- ditimbang
- dilakukan perlakuan yang sama hingga diperoleh berat cawan konstan
- dimasukkan 5 gram serbuk *Hydrilla verticillata* ke dalam cawan yang sudah diketahui berat konstannya
- dimasukkan dalam oven pada suhu 100 — 105$^{o}$C selama 15 menit
- didinginkan dalam desikator selama 10 menit
- ditimbang
- dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat konstan
- dihitung kadar air *H. verticillata*

Hasil

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

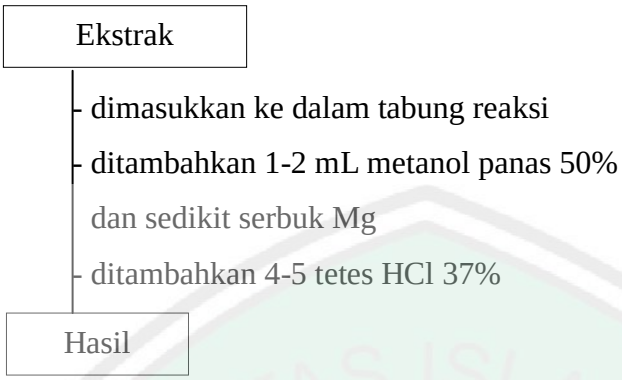
**3. Ekstraksi Senyawa Aktif**




CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

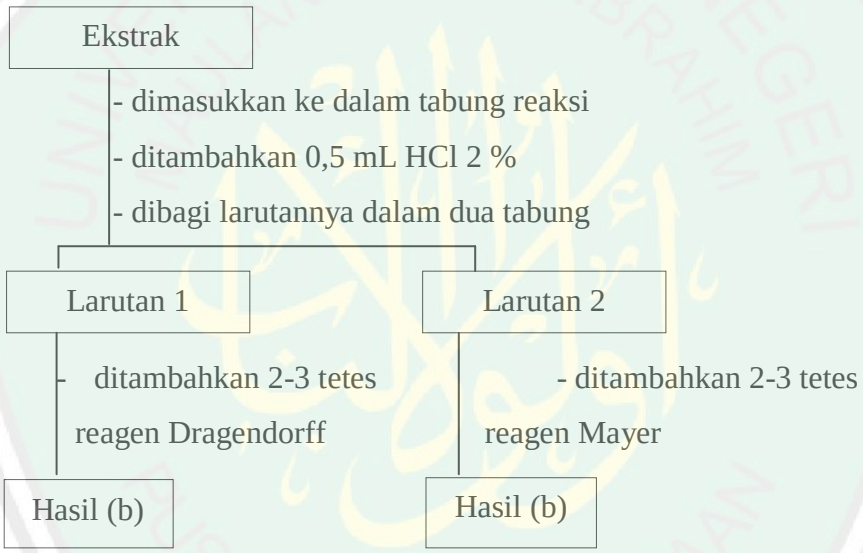
**4. Uji Fitokimia**

**4.1 Identifikasi Flavonoid**




**Ket**: Uji positif ditandai terbentuknya warna merah, kuning atau jingga

**4.2 Identifikasi Alaloid**




**Ket**: Uji positif pada (a) ditandai terbentuknya endapan jingga
Uji positif pada (b) ditandai terbentuknya endapan kekuning-kuningan.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

### 4.3 Identifikasi Saponin

Ekstrak

- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambah air (1:1) sambil dikocok selama 1 menit
- apabila menimbulkan busa ditambahkan HCl 1 N
- dibiarkan selama 10 menit

Hasil

**Ket**: Uji positif ditandai terbentuknya warna coklat

### 4.4 Identifikasi Triterpenoid dan Steroid

Ekstrak

- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform
- ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrida dan 1-2 tetes $H_2SO_4$ pekat

Hasil (a) | Hasil (b)

**Ket** : Pada (a) jika terbentuk warna coklat atau violet berbentuk cincin di perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid
Pada (b) jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid

### 4.5 Identifikasi Tanin

a. Uji dengan $FeCl_3$

Ekstrak

- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan 2-3 tetes larutan $FeCl_3$

Hasil

**Ket:** Uji positif ditandai terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru tinta

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

b. Uji dengan Gelatin

Ekstrak

- dimasukkan ekstrak ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan larutan gelatin

Hasil

**Ket:** Uji positif ditandai terbentuknya endapan putih

**5. Hidrolisis Ekstrak metanol hydrilla verticillata**

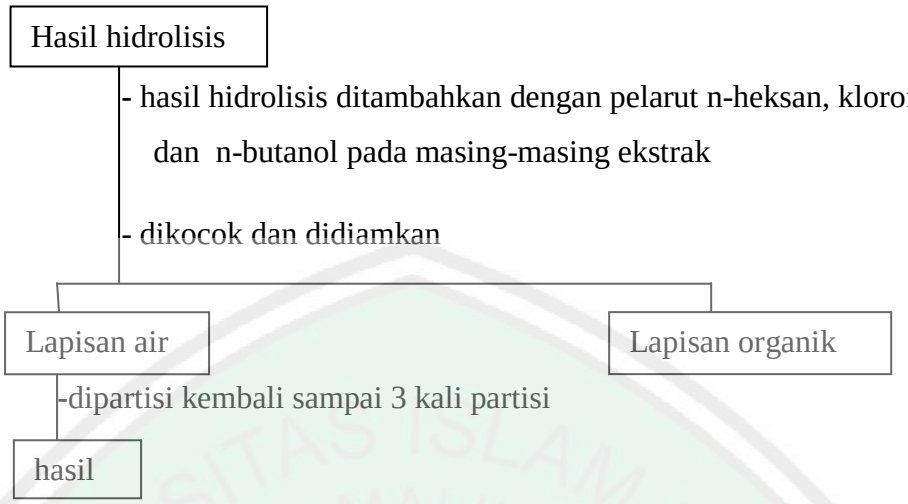
Ekstrak metanol

- 1,5 gram ekstrak pekat metanol
- Ditambahkan 3 mL HCl 2 N
- Distirer dengan hot plate selama 1 jam pada suhu ruang
- Dinetralkan pHnya dengan natrium bikarbonat

hasil

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

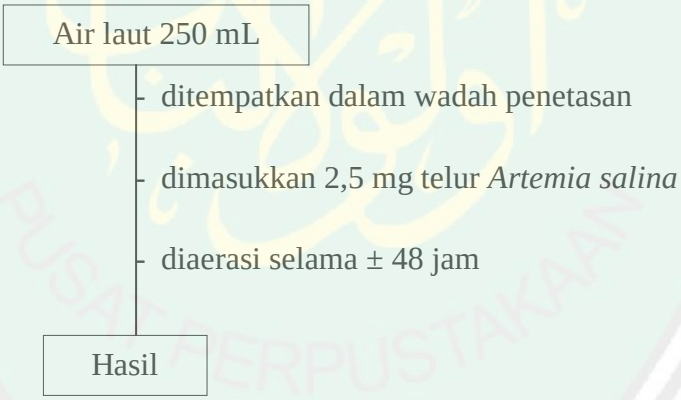
**6. Partisi Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata***




- Ekstrak hasil partisi dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian ditimbang dan dihitung randemennya.

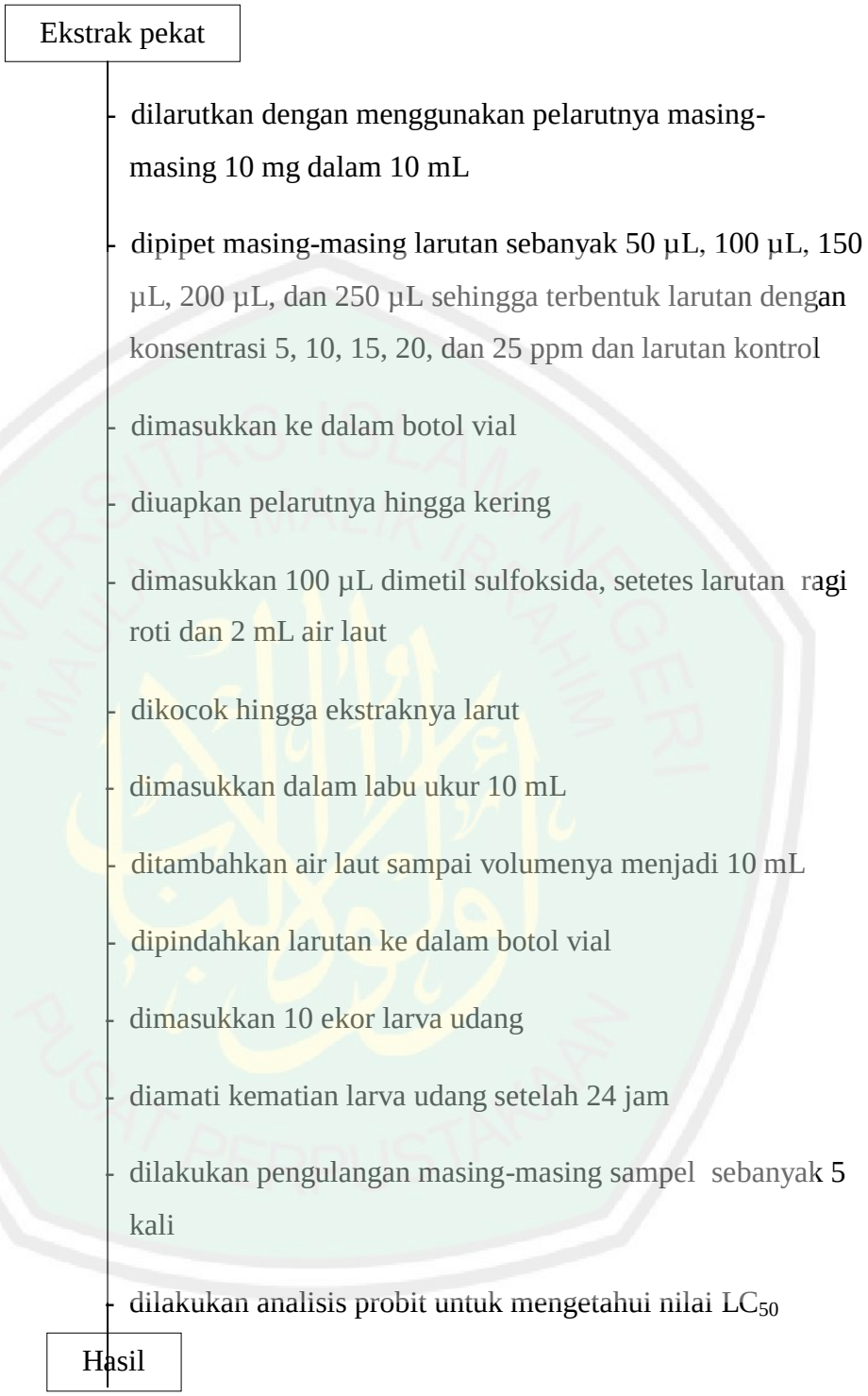
**7. Uji Toksisitas dengan Larva Udang *Artemia salina***

**7.1 Penetasan Telur**




CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## 7.2 Uji Toksisitas




CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

**3. Pembuatan Larutan**

**3.1 Pembuatan HCl 2 N**

BJ HCl pekat = 1,19 g/mL

Konsentrasi = 37%

BM HCl = 36,42 g/mol

Caranya: $\frac{1{,}19\ g}{1mL} = \frac{100\ g}{x\ mL}$

$$X = \frac{100\ g.1\ mL}{1{,}19\ g}$$

= 84,0336 mL

= 0,08430336 L

Mol $= \frac{g}{Mr}$

$= \frac{37}{36{,}42}$

= 1,0159 mol

Molaritas $= \frac{mol}{V}$

$= \frac{1{,}0159\ mol}{0{,}084033\ L}$

= 12,09 M

Normalitas = M x valensi

= 12,09 x 1

= 12,09

$N_1 . V_1 = N_2 . V_2$

12,09 N . $V_1$ = 2 N . 100 mL

$V_1$ = 16,54 mL

Adapun prosedur pembuatannya adalah diambil larutan HCl 37% sebanyak 16,54 mL. dimasukkan kedalam labu takar 100 mL yang telah terisi akuades

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

15 mL. kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas dan dihomogenkan.

### 3.2 Larutan HCl 1 N

BJ HCl pekat = 1,19 g/mL

Konsentrasi = 37 %

BM HCl = 36,42 g/mol

Caranya: $\frac{1{,}19\ g}{1\ mL} = \frac{100\ g}{X\ mL}$

$$X = \frac{100\ g\ .\ 1\ mL}{1{,}19\ g}$$

$$= 84{,}0336\ mL$$

$$= 0{,}0840336\ L$$

mol $= \frac{gr}{Mr}$

$$= \frac{37}{36{,}42}$$

$$= 1{,}0159\ mol$$

Molaritas $= \frac{mol}{V}$

$$= \frac{1{,}0159\ mol}{0{,}0840336\ L}$$

$$= 12{,}09\ M$$

Normalitas = M x valensi

$$= 12{,}09 \times 1$$

$$= 12{,}09$$

$$N_1 \,.\, V_1 = N_2 \,.\, V_2$$

$$12{,}09\ N \,.\, V_1 = 1\ N \,.\, 100\ mL$$

$$V_1 = 8{,}3\ mL$$

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Prosedur pembuatannya adalah diambil larutan HCl pekat 37% sebanyak 8,3 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL yang berisi 15 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

### 3.3 Pembuatan HCl 2%

$$\%_1 \times V_1 = \%_2 \times V_2$$

$$37\% \times V_1 = 2\% \times 10mL$$

$$V_1 = 0{,}5\ mL$$

Prosedur pembuatannya adalah dipipet larutan HCl pekat 37% sebanyak 0,5 mL, kemudian dimasukkan dalam labu takar 10 mLyang berisi 5 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

### 3.4 Pembuatan Reagen Dragendorff

- Larutan I. 0,6 gr $Bi(NH_3)_3.5H_2O$ dalam 2 mL HCl pekat dan 10 mL $H_2O$
- Larutan II. 6 gr KI dalam 10 mL $H_2O$

Cara pembuatannya adalah larutan I dibuat dengan 0,6 gr $Bi(NH_3)_3.5H_2O$ yang dilarutkan ke dalam 2 mL HCl pekat dan 10 mL aquades dan larutan II dibuat dengan 6 gr KI yang dilarutkan ke dalam 10 mL aquades. Kedua larutan tersebut dicampur dengan 7 mL HCl pekat dan 15 mL $H_2O$ (Wagner, 2001).

### 3.5 Pembuatan Reagen Mayer

- Larutan I. 1,358 gr $HgCl_2$ dalam 60 mL $H_2O$
- Larutan II. 5 gr KI dalam 10 mL $H_2O$

Cara pembuatannya adalah larutan I dibuat dengan 1,358 gr $HgCl_2$ yang dilarutkan ke dalam 60 mL aquades dan larutan II dibuat dengan 5 gr KI yang

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

dilarutkan ke dalam 10 mL aquades. Larutan I dituangkan ke dalam larutan II, diencerkan dengan aquades sampai tanda batas pada labu ukur 100 mL (Manan, 2006).

### 3.6 Pembuatan reagen Liebermann-Burchard

- Asam sulfat pekat = 5 mL
- Asam asetat anhidrida = 5 mL
- Etanol absolut = 50 mL

Cara pembuatannya adalah asam sulfat pekat 5 mL dan asam asetat anhidrida 5 mL dicampur ke dalam etanol absolut 50 mL, kemudian didinginkan dalam lemari pendingin. penggunaan reagen ini digunakan langsung setelah pembuatan (Wagner, 2001).

### 3.7 Pembuatan metanol 50% (v/v)

$$\%_1 \times V_1 = \%_2 \times V_2$$

$$99{,}8\ \% \times V_1 = 50\ \% \times 10\ mL$$

$$V_1 = 5\ mL$$

Cara pembuatannya adalah diambil larutan metanol 99,8% sebanyak 5 mL kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang berisi ± 5 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

### 3.8 Pembuatan $FeCl_3$ 1% (b/v) dalam 100 mL

Besi (III) klorida ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan dilarutkan dengan aquades hingga tanda batas

### 3.9 Pembuatan $NH_3$ 10% (v/v)

$$\%_1 \times V_1 = \%_2 \times V_2$$

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

50 % x $V_1$ = 10 % x 10 mL

$V_1$ = 2 mL

Cara pembuatannya adalah diambil larutan $NH_3$ 50% sebanyak 2 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang berisi ± 5 mL aquades. Ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

### 3.10 Pembuatan Larutan Gelatin

Cara pembuatannya adalah 2,5 g serbuk gelatin dicampur dengan 50 mL larutan garam NaCl jenuh, kemudian dipanaskan sampai gelatin larut seluruhnya. Setelah dingin, ditambah larutan garam NaCl jenuh dalam labu ukur 100 mL sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen (Sudarmaji, 2007).

### 3.11 Perhitungan Konsentrasi Larutan Ekstrak Untuk Uji Toksisitas

**a. Pembuatan larutan stok 1000 ppm ekstrak hydrilla**

ppm = mg/L

larutan stok 1000 ppm = mg/L dalam 10 mL pelarutnya

$$1000 \text{ ppm} = \frac{\text{mg}}{0{,}01 \text{ L}}$$

mg = 1000 mg/L. 0,01 L

= 10 mg

Jadi, larutan stok 1000 ppm pada masing-masing ekstrak dibuat dengan memasukkan 10 mg sampel ke dalam labu ukur 10 mL dan dilarutkan dengan pelarutnya sampai tanda batas.

**b. Pembuatan larutan ekstrak 25 ppm**

$V_1 \times ppm_1 = V_2 \times ppm_2$

$V_1 \times 1000$ ppm = 0,01 L x 25 ppm

$V_1$ = 0,25 L.ppm/1000 ppm

$V_1$ = 0,00025 L = 0,25 mL = 250 µL

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Jadi, larutan ekstrak 25 ppm dibuat dengan memipet 250 µL larutan stok kmudian dilarutkan dalam 10 mL pelarutnya.

**c. Pembuatan larutan ekstrak 20 ppm**

$V_1$ x $ppm_1$ = $V_2$ x $ppm_2$

$V_1$ x 1000 ppm = 0,01 L x 20 ppm

$V_1$ = 0,2 L.ppm/1000 ppm

$V_1$ = 0,0002 L = 0,2 mL = 200 µL

Jadi, larutan ekstrak 20 ppm dibuat dengan memipet 200 µL larutan stok kmudian dilarutkan dalam 10 mL pelarutnya.

**d. Pembuatan larutan ekstrak 15 ppm**

$V_1$ x $ppm_1$ = $V_2$ x $ppm_2$

$V_1$ x 1000 ppm = 0,01 L x 15 ppm

$V_1$ = 0,15 L.ppm/1000 ppm

$V_1$ = 0,00015 L = 0,15 mL = 150 µL

Jadi, larutan ekstrak 15 ppm dibuat dengan memipet 150 µL larutan stok kmudian dilarutkan dalam 10 mL pelarutnya.

**e. Pembuatan larutan ekstrak 10 ppm**

$V_1$ x $ppm_1$ = $V_2$ x $ppm_2$

$V_1$ x 1000 ppm = 0,01 L x 10 ppm

$V_1$ = 0,1 L.ppm/1000 ppm

$V_1$ = 0,0001 L = 0,1 mL = 100 µL

Jadi, larutan ekstrak 10 ppm dibuat dengan memipet 100 µL larutan stok kmudian dilarutkan dalam 10 mL pelarutnya.

**f. Pembuatan larutan ekstrak 5 ppm**

$V_1$ x $ppm_1$ = $V_2$ x $ppm_2$

$V_1$ x 1000 ppm = 0,01 L x 5 ppm

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

$V_1$ = 0,05 L.ppm/1000 ppm

$V_1$ = 0,00005 L = 0,05 mL = 50 µL

Jadi, larutan ekstrak 5 ppm dibuat dengan memipet 50 µL larutan stok kmudian dilarutkan dalam 10 mL pelarutnya.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## 4. Data Pengamatan dan Perhitungan

### 4.1 Data Pengukuran Kadar Air

| Ulangan Cawan | Berat Cawan Kosong | | | | | | Berat Konstan (g) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Sebelum Dioven | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | |
| A1 | 43,23 | 43,23 | 43,23 | 43,23 | 43,23 | 43,23 | 43,23 |
| A2 | 55,76 | 55,76 | 55,76 | 55,76 | 55,76 | 55,76 | 55,76 |

| Ulangan Cawan | Berat Cawan + Sampel | | | | | | Berat Konstan (g) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Sebelum Dioven | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | |
| A1 | 48,23 | 47,77 | 47,75 | 47,74 | 47,74 | 47,74 | 47,748 |
| A2 | 60,76 | 60,318 | 60,298 | 60,298 | 60,298 | 60,298 | 60,302 |

**1. Kadar air ulangan ke-1**

$$\text{Kadar air} = \frac{(berat\ cawan+sampel\ sebelum\ dioven)-(berat\ cawan+sampel\ setelah\ dioven)}{berat\ sampel} \text{ x } 100\ \%$$

$$= \frac{(48{,}23-47{,}748)\ g}{5\ g} \text{ x } 100\ \%$$

$$= \frac{0{,}482\ g}{5\ g} \text{ x } 100\ \%$$

$$= 9{,}64\ \%$$

**2. Kadar air ulangan ke-2**

$$\text{Kadar air} = \frac{(berat\ cawan+sampel\ sebelum\ dioven)-(berat\ cawan+sampel\ setelah\ dioven)}{berat\ sampel} \text{ x } 100\ \%$$

$$= \frac{(60{,}76-60{,}302)\ g}{5\ g} \text{ x } 100\ \%$$

$$= \frac{0{,}458\ g}{5\ g} \text{ x } 100\ \%$$

$$= 9{,}16\ \%$$

Kadar air kering rata-rata pada sampel *Hydrilla verticillata* adalah: 9,4 %

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## 4.2 perhitungan rendemen dan data

### 4.2.1 Ekstrak Metanol

| Berat sampel (g) | Berat wadah (g) | Berat wadah + ekstrak pekat (g) | Berat ekstrak pekat (g) |
|---|---|---|---|
| 100 g | 161,7 g | 168,2 g | 6,5 g |

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \text{ x } 100\ \%$$

$$= \frac{6{,}5\ g}{100\ g} \text{ x } 100\ \%$$

$$= 6{,}5\ \%$$

### 4.2.2 Hasil partisi

- **Partisi fraksi n-Heksana**

| Berat sampel (g) | Berat wadah (g) | Berat wadah + ekstrak pekat (g) | Berat ekstrak pekat (g) |
|---|---|---|---|
| 1,5 g | 106,98 g | 108,34 g | 1,36 g |

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \text{ x } 100\ \%$$

$$= \frac{1{,}36\ g}{1{,}5\ g} \text{ x } 100\ \%$$

$$= 90{,}66\ \%$$

- **Partisi fraksi kloroform**

| Berat sampel (g) | Berat wadah (g) | Berat wadah + ekstrak pekat (g) | Berat ekstrak pekat (g) |
|---|---|---|---|
| 1,5 g | 101,26 g | 101,87 g | 0,61 g |

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \text{ x } 100\ \%$$

$$= \frac{0{,}61\ g}{1{,}5\ g} \text{ x } 100\ \%$$

$$= 40{,}66\ \%$$

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

➢ **Partisi fraksi n-Butanol**

| Berat sampel (g) | Berat wadah (g) | Berat wadah + ekstrak pekat (g) | Berat ekstrak pekat (g) |
|---|---|---|---|
| 1,5 g | 109,75 g | 110,81 g | 1,14 g |

Rendemen $= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}}$ x 100 %

$= \frac{1{,}14\ g}{1{,}5\ g}$ x 100 %

= 76 %

## 4.3 Data Kematian Larva dan Perhitungan $LC_{50}$ Uji Toksisitas Fraksi n-Heksana, Kloroform dan n-Butanol

$$\%\ \textbf{mortalitas} = \frac{\textbf{Tes}-\textbf{kontrol}}{\textbf{jumlah larva uji (10 ekor)}}\ \textbf{x 100\%}$$

**Mortalitas = %Mortalitas x jumlah hewan uji**

### 4.3.1 Fraksi n-Heksana

| Konsentrsi (ppm) | Jumlah larva yang mati (ekor) | | | | | | % Mortalias |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | I | II | III | IV | V | Modus | |
| 0* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10 |
| 10 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 20 |
| 15 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 20 |
| 20 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 30 |
| 25 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 | 4 | 40 |

$$\%\ \textbf{mortalitas} = \frac{\textbf{Tes}-\textbf{kontrol}}{\textbf{jumlah larva uji (10 ekor)}}\ \textbf{x 100\%}$$

| Konsentrasi (ppm) | Jumlah hewan uji (ekor) | Mortalitas |
|---|---|---|
| 0 | 50 | 0 |
| 5 | 50 | 5 |
| 10 | 50 | 10 |
| 15 | 50 | 10 |
| 20 | 50 | 15 |
| 25 | 50 | 20 |

**Mortalitas = %Mortalitas x jumlah hewan uji**

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

### 4.3.2 Fraksi kloroform

| Konsentrasi (ppm) | Jumlah larva yang mati (ekor) | | | | | | % Mortalias |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | I | II | III | IV | V | Modus | |
| 0* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10 |
| 10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10 |
| 15 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 20 |
| 20 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 30 |
| 25 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 30 |

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{\text{Tes} - \text{kontrol}}{\text{jumlah larva uji (10 ekor)}} \text{ x } 100\%$$

| Konsentrasi (ppm) | Jumlah hewan uji (ekor) | Mortalitas |
|---|---|---|
| 0 | 50 | 0 |
| 5 | 50 | 5 |
| 10 | 50 | 5 |
| 15 | 50 | 10 |
| 20 | 50 | 15 |
| 25 | 50 | 15 |

**Mortalitas = %Mortalitas x jumlah hewan uji**

### 4.3.3 Fraksi n-Butanol

| Konsentrasi (ppm) | Jumlah larva yang mati (ekor) | | | | | | % Mortalias |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | I | II | III | IV | V | Modus | |
| 0* | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10 |
| 10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 10 |
| 15 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 20 |
| 20 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 20 |
| 25 | 3 | 3 | 2 | 2 | 3 | 3 | 30 |

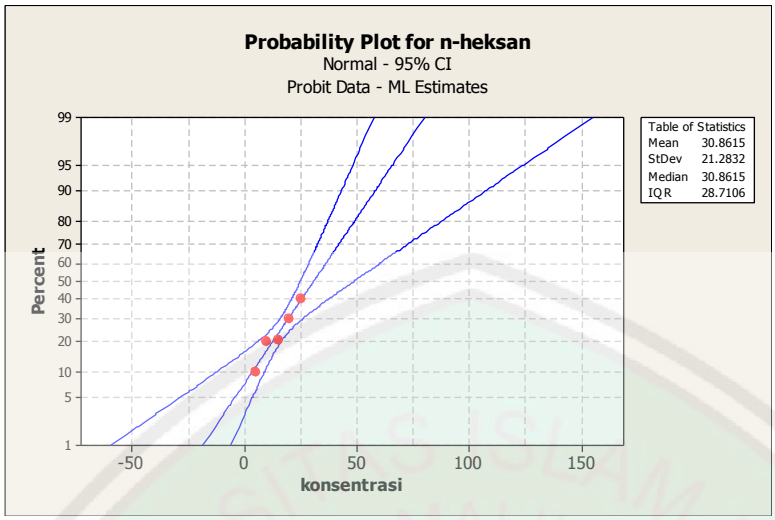
$$\% \text{ mortalitas} = \frac{\text{Tes} - \text{kontrol}}{\text{jumlah larva uji (10 ekor)}} \text{ x } 100\%$$

| Konsentrasi (ppm) | Jumlah hewan uji (ekor) | Mortalitas |
|---|---|---|
| 0 | 50 | 0 |
| 5 | 50 | 5 |
| 10 | 50 | 5 |
| 15 | 50 | 10 |
| 20 | 50 | 10 |
| 25 | 50 | 15 |

**Mortalitas = %Mortalitas x jumlah hewan uji**

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## 1. Hasil Uji Toksisitas Fraksi n-heksana




**Probit Analysis: n-heksan, N versus konsentrasi**

Distribution: Normal

Response Information

| Variable | Value | Count |
|---|---|---|
| n-heksan | Success | 60 |
| | Failure | 190 |
| N | Total | 250 |

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

| Variable | Coef | Standard Error | Z | P |
|---|---|---|---|---|
| Constant | -1.45004 | 0.228211 | -6.35 | 0.000 |
| konsentrasi | 0.0469854 | 0.0129198 | 3.64 | 0.000 |
| Natural Response | 0 | | | |

Log-Likelihood = -130.883

Goodness-of-Fit Tests

| Method | Chi-Square | DF | P |
|---|---|---|---|
| Pearson | 0.805819 | 3 | 0.848 |
| Deviance | 0.789071 | 3 | 0.852 |

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

| Parameter | Estimate | Standard Error | 95.0% Normal CI Lower | Upper |
|---|---|---|---|---|
| Mean | 30.8615 | 4.43754 | 22.1641 | 39.5589 |
| StDev | 21.2832 | 5.85236 | 12.4159 | 36.4835 |

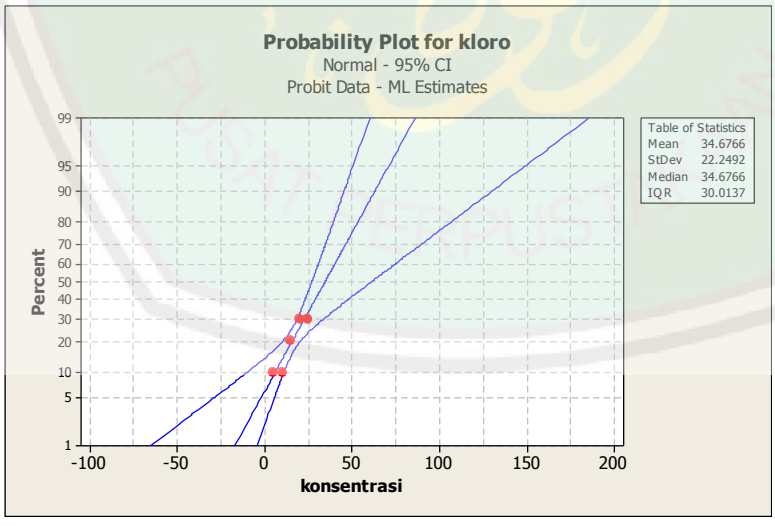
CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Table of Percentiles

| Percent | Percentile | Standard Error | 95.0% Fiducial CI Lower | Upper |
|---|---|---|---|---|
| 1 | -18.6506 | 9.78620 | -59.8293 | -6.05922 |
| 2 | -12.8489 | 8.22679 | -47.3168 | -2.21811 |
| 3 | -9.16781 | 7.24551 | -39.3943 | 0.235238 |
| 4 | -6.39871 | 6.51357 | -33.4471 | 2.09339 |
| 5 | -4.14625 | 5.92369 | -28.6207 | 3.61603 |
| 6 | -2.22906 | 5.42678 | -24.5233 | 4.92264 |
| 7 | -0.548057 | 4.99619 | -20.9412 | 6.07886 |
| 8 | 0.957080 | 4.61585 | -17.7448 | 7.12498 |
| 9 | 2.32594 | 4.27536 | -14.8492 | 8.08782 |
| 10 | 3.58598 | 3.96768 | -12.1961 | 8.98640 |
| 20 | 12.9491 | 2.10164 | 6.51606 | 16.6663 |
| 30 | 19.7006 | 2.11582 | 15.9866 | 26.2264 |
| 40 | 25.4695 | 3.16056 | 20.9741 | 37.4998 |
| 50 | 30.8615 | 4.43754 | 24.9069 | 48.7656 |
| 60 | 36.2536 | 5.81301 | 28.6277 | 60.2435 |
| 70 | 42.0224 | 7.33104 | 32.5127 | 72.6194 |
| 80 | 48.7739 | 9.13713 | 36.9997 | 87.1629 |
| 90 | 58.1371 | 11.6681 | 43.1701 | 107.385 |
| 91 | 59.3971 | 12.0101 | 43.9977 | 110.109 |
| 92 | 60.7660 | 12.3819 | 44.8961 | 113.069 |
| 93 | 62.2711 | 12.7911 | 45.8835 | 116.324 |
| 94 | 63.9521 | 13.2484 | 46.9854 | 119.960 |
| 95 | 65.8693 | 13.7704 | 48.2415 | 124.108 |
| 96 | 68.1217 | 14.3841 | 49.7162 | 128.983 |
| 97 | 70.8909 | 15.1393 | 51.5279 | 134.976 |
| 98 | 74.5719 | 16.1440 | 53.9345 | 142.945 |
| 99 | 80.3737 | 17.7294 | 57.7242 | 155.509 |

## Probability Plot for n-heksan

## 2. Hasil Uji Toksisitas Fraksi Kloroform




**Probit Analysis: kloro, N versus konsentrasi**

Distribution: Normal

Response Information

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

| Variable | Value | Count |
|---|---|---|
| kloro | Success | 50 |
| | Failure | 200 |
| N | Total | 250 |

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

| Variable | Coef | Standard Error | Z | P |
|---|---|---|---|---|
| Constant | -1.55856 | 0.240344 | -6.48 | 0.000 |
| konsentrasi | 0.0449455 | 0.0134704 | 3.34 | 0.001 |
| Natural Response | 0 | | | |

Log-Likelihood = -119.302

Goodness-of-Fit Tests

| Method | Chi-Square | DF | P |
|---|---|---|---|
| Pearson | 1.35048 | 3 | 0.717 |
| Deviance | 1.37352 | 3 | 0.712 |

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

| Parameter | Estimate | Standard Error | 95.0% Normal CI Lower | Upper |
|---|---|---|---|---|
| Mean | 34.6766 | 5.83172 | 23.2466 | 46.1065 |
| StDev | 22.2492 | 6.66820 | 12.3653 | 40.0335 |

Table of Percentiles

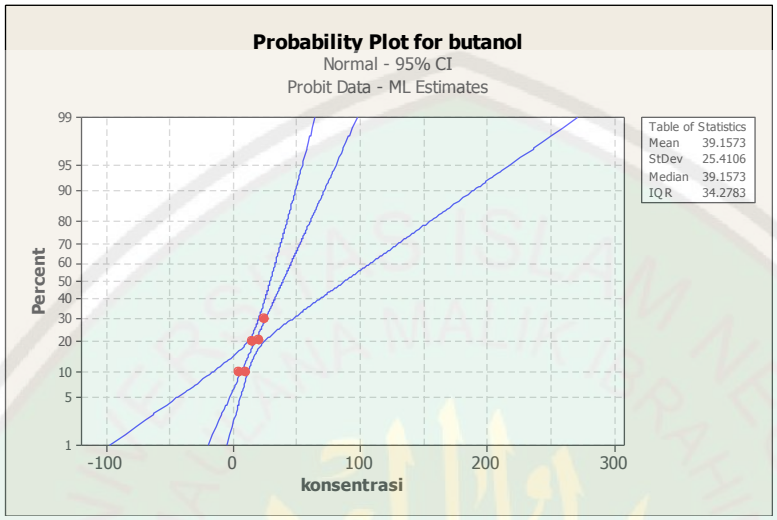
| Percent | Percentile | Standard Error | 95.0% Fiducial CI Lower | Upper |
|---|---|---|---|---|
| 1 | -17.0827 | 10.2640 | -65.2611 | -4.25740 |
| 2 | -11.0176 | 8.49093 | -50.6497 | -0.347897 |
| 3 | -7.16951 | 7.37729 | -41.4021 | 2.15537 |
| 4 | -4.27473 | 6.54859 | -34.4639 | 4.05696 |
| 5 | -1.92005 | 5.88278 | -28.8374 | 5.62085 |
| 6 | 0.0841585 | 5.32418 | -24.0652 | 6.96891 |
| 7 | 1.84145 | 4.84268 | -19.8986 | 8.16850 |
| 8 | 3.41490 | 4.42032 | -16.1868 | 9.26150 |
| 9 | 4.84589 | 4.04564 | -12.8319 | 10.2764 |
| 10 | 6.16312 | 3.71114 | -9.76711 | 11.2340 |
| 20 | 15.9512 | 2.06301 | 10.6746 | 20.6820 |
| 30 | 23.0091 | 2.84141 | 18.7588 | 34.1504 |
| 40 | 29.0398 | 4.29252 | 23.3364 | 47.9886 |
| 50 | 34.6766 | 5.83172 | 27.1960 | 61.3419 |
| 60 | 40.3133 | 7.43641 | 30.9173 | 74.8334 |
| 70 | 46.3440 | 9.18693 | 34.8298 | 89.3368 |
| 80 | 53.4019 | 11.2585 | 39.3626 | 106.357 |
| 90 | 63.1900 | 14.1528 | 45.6061 | 130.003 |
| 91 | 64.5072 | 14.5435 | 46.4440 | 133.187 |
| 92 | 65.9382 | 14.9682 | 47.3537 | 136.647 |
| 93 | 67.5117 | 15.4354 | 48.3534 | 140.452 |
| 94 | 69.2690 | 15.9575 | 49.4694 | 144.703 |
| 95 | 71.2732 | 16.5534 | 50.7415 | 149.551 |
| 96 | 73.6279 | 17.2538 | 52.2352 | 155.248 |

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 97 | 76.5227 | 18.1155 | 54.0703 | 162.252 |
| 98 | 80.3708 | 19.2618 | 56.5083 | 171.565 |
| 99 | 86.4359 | 21.0700 | 60.3477 | 186.247 |

**Probability Plot for kloroform**

## 3. Uji Toksisitas Fraksi n-Butanol




**Probit Analysis: butanol, N versus konsentrasi**

```
Distribution:   Normal


Response Information

Variable  Value    Count
butanol   Success     45
          Failure    205
N         Total      250

Estimation Method: Maximum Likelihood


Regression Table

                              Standard
Variable          Coef         Error       Z       P
Constant     -1.54098      0.242419   -6.36   0.000
konsentrasi  0.0393537     0.0136342    2.89   0.004
Natural
Response             0

Log-Likelihood = -113.538


Goodness-of-Fit Tests

Method     Chi-Square  DF      P
Pearson      0.882464   3  0.830
Deviance     0.892254   3  0.827

Tolerance Distribution
```

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Parameter Estimates

| Parameter | Estimate | Standard Error | 95.0% Normal CI Lower | Upper |
|---|---|---|---|---|
| Mean | 39.1573 | 8.24731 | 22.9928 | 55.3217 |
| StDev | 25.4106 | 8.80357 | 12.8859 | 50.1090 |

Table of Percentiles

| Percent | Percentile | Standard Error | 95.0% Fiducial CI Lower | Upper |
|---|---|---|---|---|
| 1 | -19.9566 | 12.8148 | -97.2743 | -4.81662 |
| 2 | -13.0297 | 10.4669 | -75.7962 | -0.587688 |
| 3 | -8.63479 | 8.99152 | -62.1980 | 2.12438 |
| 4 | -5.32868 | 7.89345 | -51.9930 | 4.18894 |
| 5 | -2.63942 | 7.01144 | -43.7154 | 5.89169 |
| 6 | -0.350435 | 6.27204 | -36.6940 | 7.36515 |
| 7 | 1.65656 | 5.63574 | -30.5638 | 8.68324 |
| 8 | 3.45358 | 5.07915 | -25.1043 | 9.89284 |
| 9 | 5.08790 | 4.58772 | -20.1732 | 11.0270 |
| 10 | 6.59229 | 4.15222 | -15.6746 | 12.1115 |
| 20 | 17.7712 | 2.44457 | 12.3275 | 25.5963 |
| 30 | 25.8319 | 4.05808 | 20.3993 | 47.4395 |
| 40 | 32.7196 | 6.14745 | 25.1400 | 68.2601 |
| 50 | 39.1573 | 8.24731 | 29.2409 | 88.0507 |
| 60 | 45.5950 | 10.4016 | 33.2277 | 107.955 |
| 70 | 52.4826 | 12.7355 | 37.4340 | 129.310 |
| 80 | 60.5433 | 15.4872 | 42.3159 | 154.343 |
| 90 | 71.7222 | 19.3229 | 49.0476 | 189.099 |
| 91 | 73.2266 | 19.8401 | 49.9513 | 193.778 |
| 92 | 74.8609 | 20.4023 | 50.9326 | 198.862 |
| 93 | 76.6580 | 21.0207 | 52.0111 | 204.453 |
| 94 | 78.6650 | 21.7117 | 53.2151 | 210.697 |
| 95 | 80.9539 | 22.5000 | 54.5875 | 217.819 |
| 96 | 83.6432 | 23.4266 | 56.1992 | 226.188 |
| 97 | 86.9493 | 24.5663 | 58.1796 | 236.477 |
| 98 | 91.3442 | 26.0821 | 60.8105 | 250.156 |
| 99 | 98.2711 | 28.4726 | 64.9543 | 271.720 |

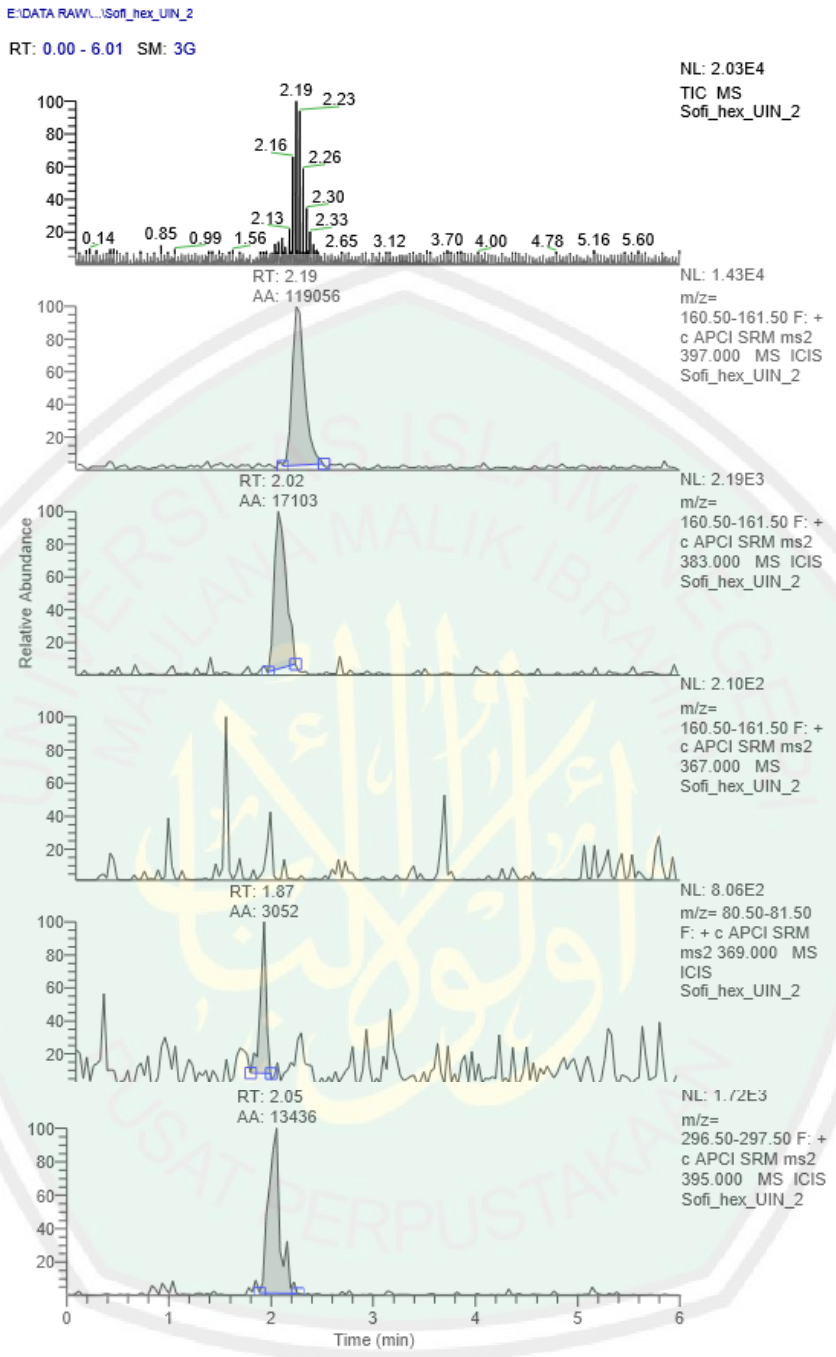
Probability Plot for butanol

**10/4/2018 12:02:26 PM**

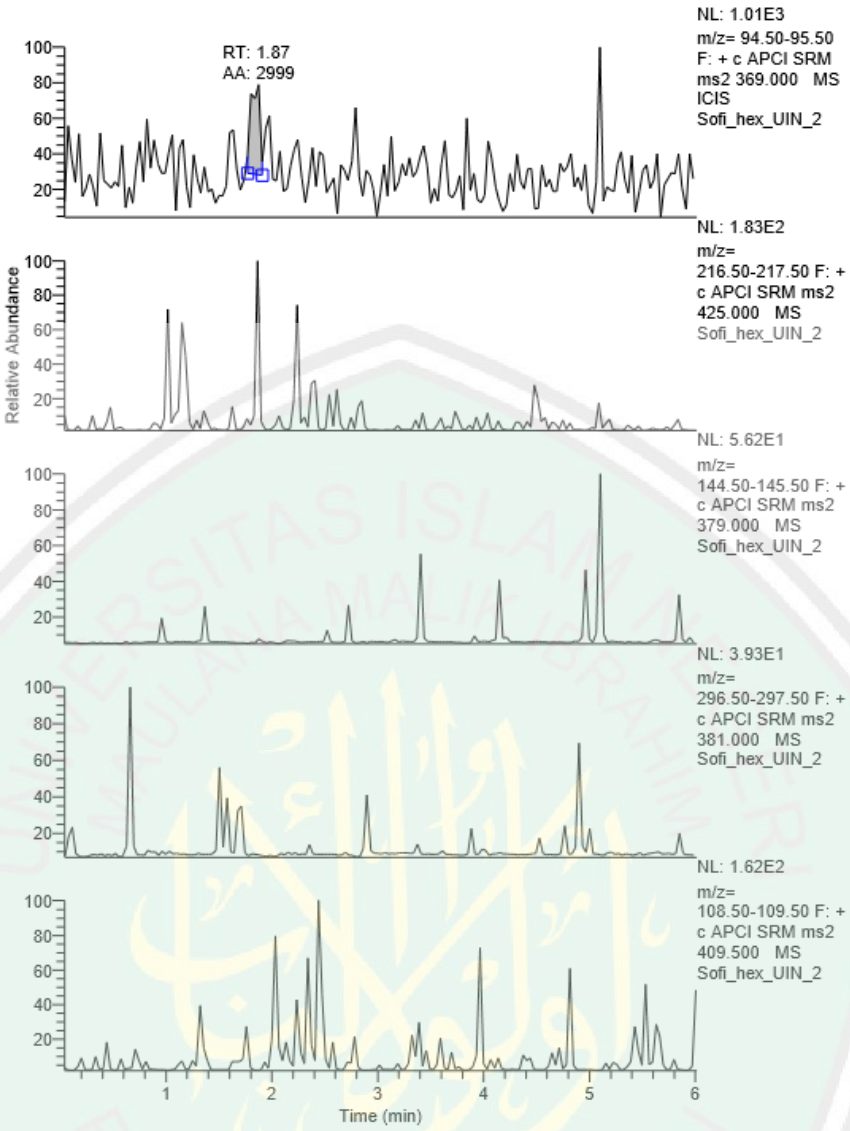
Welcome to Minitab, press F1 for help.
Retrieving project from file: 'E:\APLIKASI KIMIA\MINITAB 14\MINITAB MAKDOR.MPJ'

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## 5. Hasil Identifikasi menggunakan LC-MS/MS fraksi n-heksana




CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG




CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## 6. Dokumentasi Penelitian

**Gambar 1. Uji kadar air**

Cawan Kosong

Uji Kadar Air

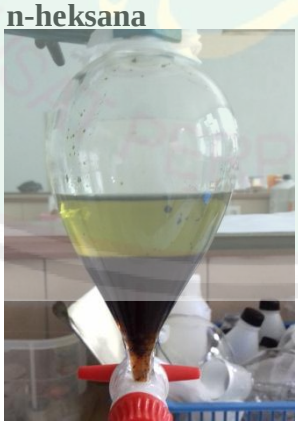
**Gambar 2. Ekstraksi**

Proses Maserasi

Filtrat Metanol

**Gambar 3. Partisi**

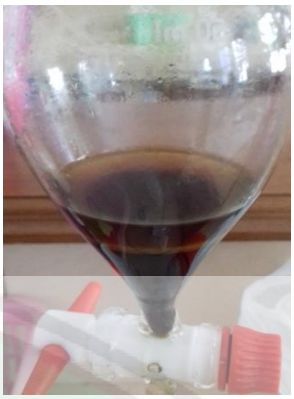
- **n-heksana**



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

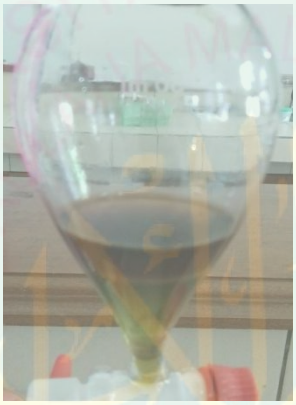
- **kloroform**

(1)


(2)

(3)

- **n-butanol**



**Gambar 4. Uji Fitokimia**

**1.Flavonoid**

Metanol

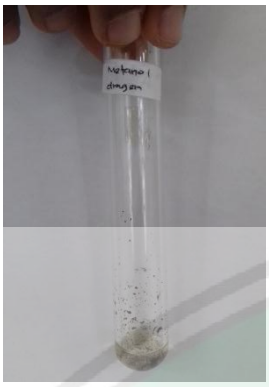
**2.Tanin**

Metanol Gelatin

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

**3.Alkaloid**

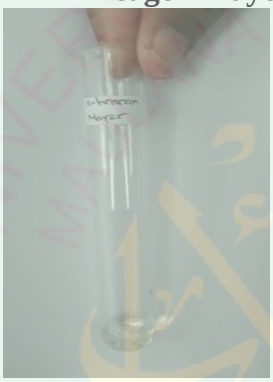
- **Reagen Dragendorff**


Metanol

n-heksana

n-butanol

- **Reagen Mayer**


n-heksana

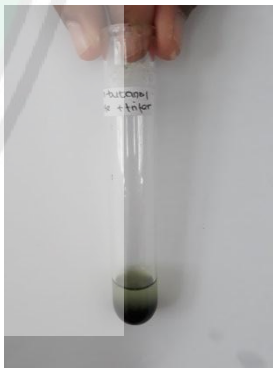
n-butanol

**4.Triterpenoid dan Steroid**

Metanol

n-heksana

kloroform


n-butanol

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

**5.Saponin**

Metanol

n-heksana

kloroform

n-butanol

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG