

**PEMISAHAN STEROID FRAKSI ETIL ASETAT MAKROALGA
Eucheuma cottonii MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI KOLOM
GRADIEN ELUEN SECARA EKSPERIMEN DAN STUDI *IN SILICO*
SERTA UJI ANTIOKSIDANNYA**

SKRIPSI

Oleh:
CITRA ERI LUKI
NIM. 14630035



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

**PEMISAHAN STEROID FRAKSI ETIL ASETAT MAKROALGA
Eucheuma cottonii MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI KOLOM
GRADIEN ELUEN SECARA EKSPERIMEN DAN STUDI *IN SILICO*
SERTA UJI ANTIOKSIDANNYA**

SKRIPSI

Oleh:
CITRA ERI LUKI
NIM. 14630035

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

**PEMISAHAN STEROID FRAKSI ETIL ASETAT MAKROALGA
Eucheuma cottonii MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI KOLOM
GRADIEN ELUEN SECARA EKSPERIMEN DAN STUDI *IN SILICO*
SERTA UJI ANTIOKSIDANNYA**

SKRIPSI

Oleh:
CITRA ERI LUKI
NIM. 14630035

Telah Diperiksa dan Disetujui Untuk Diuji:
Tanggal: 22 November 2018

Pembimbing I

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

Pembimbing II

Umaiatus Syarifah, M.A
NIP. 19820925 200901 2 005

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia



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

**PEMISAHAN STEROID FRAKSI ETIL ASETAT MAKROALGA
Eucheuma cottonii MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI KOLOM
GRADIEN ELUEN SECARA EKSPERIMEN DAN STUDI *IN SILICO*
SERTA UJI ANTIOKSIDANNYA**

SKRIPSI

Oleh:
CITRA ERI LUKI
NIM. 14630035

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 12 Desember 2018

Penguji Utama : Akyunul Jannah, S.Si, M.P (.....)
NIP. 19750410 200501 2 009

Ketua Penguji : Himmatul Baroroh, M.Si (.....)
NIP. 19750730 200312 2 001

Sekretaris Penguji : A. Ghanaim Fasya, M.Si (.....)
NIP. 19820616 200604 1 002

Anggota Penguji : Umayyatus Syarifah, M.A (.....)
NIP. 19820925 200901 2 005

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia


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

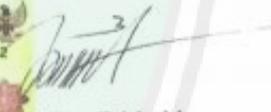
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Citra Eri Luki
NIM : 14630035
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Pemisahan Steroid Fraksi Etil Asetat Makroalga *Eucheuma cottonii* Menggunakan Kromatografi Kolom Gradien Eluen secara Eksperimen dan Studi *In Silico* serta Uji Antioksidannya

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, 12 Desember 2018
Yang membuat pernyataan,

METERAI
TIMPEL
Rp. 37A FF 486094712
6000
SATU RIBU RUPIAH

Citra Eri Luki
NIM. 14630035

MOTTO

*Jalani hidup ini seperti air mengalir, mengikuti arah arus yang membawanya.
Sekalipun terdapat batu yang menghalangi, terjanglah atau lewatlah disetiap celah
yang ada.*



PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirobbil 'alamin, dengan rasa syukur saya persembahkan karya ini untuk orang-orang tersayang :

Ayah dan ibu tercinta, yang senantiasa memberikan doa, motivasi dan inspirasi untuk terus berjuang tanpa menyerah. Kesabaran tiada batas untuk terus mengantarkan saya untuk lebih baik ke depannya, sehingga saya sekarang berada pada titik ini.

Mas dan adikku tersayang, yang selalu menjadi pendengar terbaik dikala suka dan duka melanda di tiap perjalanan untuk sampai ke tahap ini. Terima kasih selalu ada untuk melewati setiap proses, karena kalian berdua saya merasa tidak sendiri.

Bapak dan ibu dosen serta seluruh sivitas akademik jurusan kimia UIN Malang yang telah memberikan pelajaran dan pengalaman yang berarti bagi hidup saya.

Rekan-rekan penelitian organik, keluarga kimia B dan teman-teman kimia 14 yang telah berkenan membagi ilmu, waktu, motivasi, canda, tawa, suka dan duka dalam penyelesaian penelitian.

Sahabat-sahabatku, yang tak bosan-bosannya untuk mengingatkan dan memberikan dukungan untuk penyelesaian studi.

Dan tak lupa keluarga besar Djuri yang menjadi motivasi saya untuk bergerak terus maju ke depan. Serta keluarga besar Pramuka UIN Malang yang senantiasa memberikan pengalaman dan proses kehidupan yang luar biasa.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi. Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW yang telah memberikan petunjuk kebenaran seluruh umat manusia yaitu agama Islam yang kita harapkan syafa'atnya di dunia dan di akhirat. Aamiin.

Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari peran dan dukungan serta bimbingan dan arahan dari segenap pihak terkait. Dengan ini, penulis menyampaikan rasa hormat dan ucapan terima kasih kepada:

1. Ayah Yeri Sukwanto dan Ibu Sulami, kedua orang tuaku yang selalu memberikan doa, restu, semangat, moril dan motivasi dalam menyelesaikan studi ini.
2. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si, selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si selaku dosen pembimbing penelitian, Ibu Umaiyatus Syarifah, M.A selaku dosen pembimbing agama dan Ibu Himmatul Baroroh, M.Si selaku dosen konsultan yang telah banyak memberikan pengarahan dan pengalaman yang berharga.
4. Seluruh Bapak dan Ibu dosen, admin dan laboran Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu pengetahuan dan wawasannya sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
5. Teman-teman seperjuangan penelitian organik bahan alam, keluarga kimia B dan teman-teman jurusan Kimia 2014, terima kasih telah menjadi teman yang selalu ada dalam suka maupun duka, yang telah berjuang bersama-sama saling memberikan motivasi dan informasi dan masukan terhadap penulis.
6. Muchammad Yasin dan Adikku Wiwid Dwi Eri yang selalu menjadi penyemangat untuk penulis, agar kelak penulis bisa menjadi panutan bagi saudara-saudara lainnya.
7. Kelima sahabatku putri dan kedua sahabatku putra yang telah memberikan dukungan, arahan, penyemangat dan kesabaran untuk menyelesaikan penelitian ini.

8. Keluarga angkatan 27 dan keluarga besar Pramuka Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah mendukung dan memotivasi dalam menyelesaikan penelitian.
9. Semua rekan-rekan yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala bantuan dan motivasi dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materil maupun moril.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga penelitian ini bisa memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya penulis secara pribadi.

Malang, 12 Desember 2018

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
MOTTO	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	8
1.3 Tujuan Penelitian	9
1.4 Batasan Masalah	9
1.5 Manfaat Penelitian	10
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Alga merah (<i>Eucheuma cottonii</i>)	11
2.2 Kandungan dan Manfaat <i>Eucheuma cottonii</i>	13
2.3 Senyawa Steroid	13
2.4 Ekstraksi Steroid	15
2.4.1 Prinsip Ekstraksi	15
2.4.2 Ekstraksi Maserasi	16
2.5 Hidrolisis Asam	17
2.6 Uji Fitokimia Senyawa Steroid	18
2.7 Kromatografi Kolom pada Pemisahan Senyawa Aktif <i>E. cottonii</i>	19
2.8 Kromatografi Lapis Tipis pada Monitoring Senyawa Aktif <i>E. cottonii</i>	21
2.9 Antioksidan	22
2.9.1 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH	23
2.10 Identifikasi Senyawa Steroid dengan LC-MS/MS	26
2.11 Teori Dinamika Molekuler	30
2.11.1 Konsep dan Algoritma Dinamika Molekuler (DM)	31
2.11.2 Fungsi Medan Gaya	31
BAB III METODOLOGI	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	42
3.2 Alat dan Bahan	42
3.2.1 Alat	42
3.2.2 Bahan	42
3.3 Rancangan Penelitian	43
3.4 Tahapan Penelitian	44
3.5 Cara Kerja	44

3.5.1 Eksperimen.....	44
a. Isolasi Senyawa Steroid dengan Metode Kromatografi Kolom...	44
b. Monitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik.....	45
c. Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan DPPH	46
d. Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan LC-MS/MS.....	47
3.5.2 Simulasi Dinamika Molekuler (DM) 5 Molekul Steroid <i>Eucheuma cottonii</i> dalam Variasi Gradien Eluen	48
3.6 Analisa Data	49
BAB IV PEMBAHASAN	
4.1 Isolasi Senyawa Steroid dengan Metode Kromatografi Kolom.....	50
4.1.1 Monitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik	52
4.1.2 Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH	55
a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	55
b. Pengukuran Potensi Antioksidan pada Sampel	56
4.1.3 Identifikasi Senyawa Steroid dengan LC-MS/MS	59
4.2 Simulasi Dinamika Molekuler (DM) 5 Molekul Steroid <i>E. cottonii</i> dalam Variasi Gradien Eluen	63
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan.....	84
5.2 Saran	85
DAFTAR PUSTAKA	86
LAMPIRAN.....	94

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Alga merah <i>Eucheuma cottonii</i>	12
Gambar 2.2 Struktur dasar steroid	14
Gambar 2.3 Steroid fraksi etil asetat tumbuhan paku <i>Christella arida</i>	15
Gambar 2.4 Reaksi antara HCl dan NaHCO ₃	18
Gambar 2.5 Reaksi antara DPPH• dengan antioksidan.....	25
Gambar 2.6 Kromatogram LC-MS/MS fitosterol dari minyak goreng.....	27
Gambar 2.7 Kromatogram LC-MS/MS isolat steroid.....	28
Gambar 2.8 Diagram panjang ikatan hasil perubahan energi dari molekul.....	32
Gambar 2.9 Perubahan energi molekul yang disebabkan perubahan sudut.....	33
Gambar 2.10 Variasi energi dengan sudut dihedral	33
Gambar 2.11 Variasi energi molekul dengan pemisahan dari non ikatan atom ..	34
Gambar 4.1 Hasil monitoring senyawa di bawah lampu UV 366 nm	53
Gambar 4.2 Hasil spektra UV-Vis larutan DPPH.....	55
Gambar 4.3 Kromatogram LC-MS/MS isolat 5 hasil kromatografi kolom.....	60
Gambar 4.4 Optimasi jenis steroid desmosterol pada eluen 75:25	69
Gambar 4.5 <i>Input</i> simulasi DM tahap inisial	70
Gambar 4.6 Hasil simulasi DM 298 K β-sitosterol pada eluen 90:10	71
Gambar 4.7 Hasil simulasi DM 700 K β-sitosterol pada eluen 90:10	72
Gambar 4.8 Hasil simulasi DM 298 K β-sitosterol pada eluen 90:10	73
Gambar 4.9 Hasil simulasi DM β-sitosterol pada eluen 90:10 dalam keadaan tiga temperatur terhadap <i>run time</i>	74

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi nilai nutrisi alga merah <i>Eucheuma cottonii</i>	13
Tabel 2.2 Hasil analisis massa metode deteksi SRM.....	29
Tabel 2.3 Ion steroid yang terdeteksi oleh LC-MS/MS	29
Tabel 4.1 Pengelompokkan fraksi hasil isolasi kromatografi kolom basah.....	54
Tabel 4.2 Nilai EC ₅₀ aktivitas antioksidan isolat steroid	56
Tabel 4.3 Hasil isolasi steroid pada masing-masing eluen	57
Tabel 4.4 Hasil identifikasi LC-MS/MS isolat steroid 5	59
Tabel 4.5 Panjang dimensi terpanjang molekul jenis steroid.....	65
Tabel 4.6 Jumlah molekul eluen pada variasi gradien eluen	67
Tabel 4.7 <i>Volume</i> molekul steroid dan eluen	68
Tabel 4.8 Hasil Uji ANOVA.....	75
Tabel 4.9 Data rata-rata energi potensial interaksi steroid-eluen pada masing-masing variasi eluen (kkal/mol)	76
Tabel 4.10 Steroid, energi potensial interaksi steroid-eluen, dan EC ₅₀ pada gradien eluen n-heksana etil asetat 95:5 dan 90:10.....	78
Tabel 4.11 Perbandingan energi potensial interaksi steroid-eluen pada eluen n-heksana etil asetat 90:10 dengan data hasil LC-MS/MS isolat 5	80
Tabel 4.12 Steroid dan energi potensial interaksi steroid-eluen pada perbandingan eluen n-heksana etil asetat 85:15 dan 80:20.....	81
Tabel 4.13 Data energi potensial interaksi steroid-eluen dalam eluen n-heksana etil asetat 75:25 dan 70:30.....	82

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian	94
Lampiran 2 Diagram Alir.....	96
Lampiran 3 Pembuatan Eluen dan Larutan Stok.....	100
Lampiran 4 Pengelompokkan Hasil Monitoring.....	104
Lampiran 5 Perhitungan nilai Rf dan Rendemen Hasil Monitoring	105
Lampiran 6 Pengujian Aktivitas Antioksidan	106
Lampiran 7 Senyawa Steroid yang Ditargetkan.....	113
Lampiran 8 Dokumentasi.....	114



ABSTRAK

Luki, Citra Eri. 2018. Pemisahan Steroid Fraksi Etil Asetat Makroalga *Eucheuma cottonii* Menggunakan Kromatografi Kolom Gradien Eluen secara Eksperimen dan Studi *In Silico* serta Uji Antioksidannya.
Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya M.Si; Pembimbing II: Umaiyatus Syarifah M.A; Konsultan Himmatul Baroroh M.Si.

Kata kunci: Antioksidan, *Eucheuma cottonii*, kromatografi kolom, simulasi dinamika molekuler, steroid

Pemisahan senyawa steroid pada alga merah *Eucheuma cottonii* telah dilakukan secara eksperimen menggunakan kromatografi kolom basah dan konfirmasi secara *in silico* menggunakan simulasi dinamika molekuler. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui profil fraksi golongan senyawa hasil isolasi kromatografi kolom, aktivitas antioksidan isolat steroid, senyawa steroid yang ada di dalam isolat dan profil energi potensial interaksi molekuler antara senyawa steroid dengan kombinasi variasi gradien eluen.

Fraksi etil asetat alga merah dipisahkan menggunakan metode kromatografi kolom basah dengan variasi gradien eluen n-heksana : etil asetat 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30 mL. Isolat hasil kromatografi kolom dimonitoring menggunakan KLTA pada rentang vial ke 5 sampai vial 295. Secara *in silico*, pemisahan steroid pada variasi gradien eluen disimulasikan melalui profil energi interaksi steroid dengan eluennya. Metode yang digunakan yaitu metode simulasi dinamika molekuler menggunakan aplikasi Hyperchem.

Profil fraksi golongan senyawa hasil kromatografi kolom menunjukkan bahwa eluen 95:5 sampai dengan 90:10 memisahkan golongan senyawa 4 isolat steroid (isolat 2,3,4,5) dan eluen 85:15 sampai dengan 70:30 memisahkan golongan senyawa 3 isolat tritepenoid (isolat 6,8,9). Isolat steroid hasil kromatografi kolom diuji antioksidan menghasilkan EC_{50} 20,92 ppm pada isolat 2 dan 5,146 ppm pada isolat 5, sedangkan pada kedua isolat steroid lainnya tidak memiliki aktivitas antioksidan. Hasil isolat dengan aktivitas antioksidan terbaik diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS menunjukkan terdapat 5 jenis steroid yaitu fukosterol, desmosterol, kampesterol, β -sitosterol dan stigmasterol. Profil energi potensial interaksi molekuler antara senyawa steroid dan kombinasi eluen secara *in silico* tampak bahwa, kelima steroid larut dalam seluruh variasi eluen dari 95:5 sampai dengan 70:30 kecuali ada beberapa steroid yang tidak dapat larut pada variasi konsentrasi tertentu yaitu β -sitosterol pada eluen 95:5; 80:20 dan stigmasterol pada eluen 75:25.

ABSTRACT

Luki, Citra Eri. 2018. Isolation of Steroids Ethyl Acetate Fraction Macroalgae *Eucheuma cottonii* Using Column Chromatography Gradient Eluent Experimentally and Study In Silico and Antioxidant Tests.
Supervisor I: A. Ghanaim Fasya M.Si; Supervisor II: Umaiyatus Syarifah M.A; Adviser: Himmatul Baroroh M.Si

Keywords: Antioxidants, *Eucheuma cottonii*, column chromatography, molecular dynamics simulations, steroids

Separation of steroid substances in the red algae *Eucheuma cottonii* has been carried out correctly using column chromatography and confirmation in silico using molecular dynamics simulation. The purpose of this study was to determine the profile of the compound group fraction isolated from column chromatography, antioxidant activity of steroid isolates, steroid compounds in isolates and potential energy profiles of molecular interactions between steroid compounds with a combination of eluent gradient variations.

Ethyl acetate fractions of red algae using chromatography using eluent n-hexane: ethyl acetate 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30 mL. Isolates from column chromatography were monitored using TLCA in the 5 range of the vial to vial 295. In silico, steroid separation in the variation of eluent gradients was simulated through the energy profile of steroid interactions with the eluent. The method used is the method of molecular dynamics simulation using the Hyperchem application.

The profile of the compound group fraction from column chromatography shows that eluents 95: 5 to 90:10 separate the compound groups 4 steroid isolates (isolates 2,3,4,5) and eluents 85:15 to 70:30 separating groups of compounds 3 triterpenoid isolates (isolates 6,8,9). Steroids isolates from antioxidant column chromatography produced EC_{50} 20,92 ppm in isolates 2 and 5,146 ppm in isolates 5, whereas in the other two steroid isolates did not have antioxidant activity. The results of isolation using LC-MS/MS showed that there were 5 types of steroids namely fukosterol, desmosterol, kampesterol, β -sitosterol and stigmasterol. The profile of potential energy molecular interactions between steroid compounds and the combination of eluents in silico appears that, the five steroids dissolve in all eluent variations from 95:5 to 70:30 unless there are some insoluble steroids at certain concentrations of β -sitosterol at eluent 95:5; 80:20 and stigmasterol on eluent 75:25.

الملخص

لوكي، جيترا أيري. ٢٠١٨. تفصيل الستيرويد فرقة إيثيل خلات الطحالب الكبيرة *Eucheuma cottonii* باستخدام تحليل اللون عمود الرطب تدرجات الشايطف تجريبيا ودراسة في سيليكو مع اختبار مضاد الأكسدة. المشرف الأول: أحمد غنائم فشا الماجستير؛ المشرفة الثانية: أمية الشريفة الماجستير؛ المشاركة: همة البررة الماجستير

الكلمات المفتاحية: مضاد الأكسدة، *Eucheuma cottonii*، تحليل اللون عمود الرطب، محاكاة دينامية الجزئية، الستيرويد

أجري تفصيل مركبات الستيرويد تجريبيا في الطحالب الحمراء *Eucheuma cottonii* باستخدام تجربي باستخدام تحليل اللون عمود الرطب وتأكيدي في السيليكو باستخدام محاكاة الديناميكية الجزئية. الغرض من هذا البحث هو لمعرفة ملامح من فرقة مجموعة المركب نتيجة العزل تحليل اللون العمود، النشاط من مضاد الأكسدة لعزلات الستيرويد، مركبات الستيرويد في العزل ملامح الطاقة المحتملة للتفاعل الجزئي بين مركبات الستيرويد مع مزيج من تغيرات الانحدار البطي بتدرجات الشايطف.

فصل فرقة إيثيل خلات الطحالب الأحمر باستخدام طريقة تحليل اللون عمود الرطب مع النوع تدرجات الشايطف -n *heksana:etil asetat* ٥:٩٠؛ ١٠:٩٠؛ ١٥:٨٥؛ ٢٠:٨٠؛ ٢٥:٧٥؛ ٣٠:٧٠ mL رصد العزل نتيجة العمود اللوني باستخدام *KLTA* في النطاق الخامس من قارورة إلى قارورة ٢٩٥. في سيليكو، تفصيلا لستيرويد النوع تدرجات الشايطف بطريقة محاكاة ديناميكية الجزئية باستخدام تطبيق *Hyperchem*.

يوضح ملامح فرقة الجزء المجموع المركب نتيجة من تحليل العمود اللون أن الشايطف ٥:٩٥ إلى ١٠:٩٠ يفصل المجموع المركب الستيرويد في ٤ عزلات و الشايطف ١٥:٨٥ إلى ٣٠:٧٠ يفصل المركب المجموع *tritepenoid* في ٥ عزلات. العزلات الستيرويد نتيجة تحليل العمود اللون اختبر مضاد الأكسدة تنتج EC_{50} ٩٢,٢٠ ppm في عزل ٢ و ١٤٦,٥ ppm في العزل ٥، بينما في العزلين الآخرين الستيرويد لم يكن لديهما النشاط مضاد الأكسدة. نتيجة العزل مع النشاط مضاد الأكسدة باستخدام *LC-MS/MS* أظهرت أن هناك ٥ أنواع الستيرويد وهي *fukosterol*، *ldesmostero*، *kampesterol*، β -*stigmasterol* و *sitosterol*. يظهر ملامح الطاقة القوية للتفاعلات الجزئية بين مركبات الستيرويد ومزيج الشايطف في السيليكو، أنالستيرويد الخمسة تذوب في جميع الأنواع الشايطف من ٥:٩٥ إلى ٣٠:٧٠ إلا أن هناك بعض الستيرويد غير للذواب عند نوع التراكيزات β -*sitosterol* عند الشايطف ٥:٩٥؛ ٢٠:٨٠ و *stigmasterol* عند الشايطف ٢٥:٧٥.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit degeneratif seperti jantung, rematik, penyakit-penyakit pada otak, ginjal, paru-paru, sistem pencernaan dan imun banyak ditemukan di Indonesia. Menurut *World Health Organization* (WHO) hampir sekitar 17 juta orang meninggal dunia akibat penyakit degeneratif setiap tahun (Depkes RI, 2013). Salah satu penyebab banyaknya penyakit tersebut diakibatkan oleh adanya reaksi oksidasi yang berlebih karena radikal bebas. Radikal bebas merupakan suatu molekul yang sangat reaktif dengan elektron yang tidak berpasangan pada orbital luarnya, sehingga mencari reaksi untuk mendapatkan elektron pasangan dan berujung pada kerusakan sel serta jaringan.

Radikal bebas terbentuk di dalam tubuh sebagai produk samping proses metabolisme, selain itu juga berasal dari luar tubuh yang terserap melalui pernafasan atau kulit seperti, asap rokok, polusi, obat, ozon, limbah industri dan sinar ultraviolet (UV). Peningkatan radikal bebas menyebabkan penurunan fungsi dari membran sel, retikulum endoplasma dan dapat mengganggu di tingkat molekul DNA sel. Dari beberapa penelitian penyakit degeneratif mengakibatkan menurunnya kualitas hidup, mengurangi kualitas hidup dan mempercepat proses penuaan (Wahdaningsih, dkk., 2011).

Salah satu dari berbagai macam senyawa yang dapat mencegah terjadinya radikal bebas adalah antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang mampu mencegah terjadinya proses oksidasi. Proses oksidasi dapat menurunkan sistem

kekebalan tubuh dan menyebabkan proses penuaan atau keriput yang lebih cepat dalam tubuh. Adanya antioksidan dalam tubuh dapat menangkal efek negatif radikal bebas, sehingga proses oksidasi pada sel-sel tubuh tidak berlanjut. Antioksidan yang terdapat dalam tubuh atau biasa disebut antioksidan endogen. Selain itu terdapat antioksidan yang berasal dari luar tubuh dan sering dijumpai dari diet sehari-hari atau disebut dengan antioksidan eksogen. Sebagian besar sumber antioksidan eksogen terdapat pada sayur, buah-buahan, biji-bijian dan umbi-umbian dikarenakan mengandung vitamin A, vitamin E, vitamin C dan beta karoten (Zuhra, dkk., 2008).

Banyaknya ciptaan yang telah diciptakan oleh-Nya, salah satu diantaranya adalah tanaman. Dimana tugas manusia sebagai makhluk yang ditunjuk oleh Allah sebagai wakil-Nya di bumi untuk memelihara, menjaga, dan memanfaatkan demi kelangsungan hidup.

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا
مِنْ نَبَاتٍ شَتَّى ○

Artinya :

“(Tuhan) yang telah menjadikan bumi sebagai hamparan bagimu dan menjadikan jalan-jalan di atasnya bagimu dan yang menurunkan air (hujan) dari langit. Kemudian kami tumbuhkan dengannya (air hujan itu) berjenis-jenis aneka macam tumbuh-tumbuhan,” (QS ThaaHaa (20) : 53)

Berdasarkan ayat tersebut, kata *أَزْوَاجًا* menjelaskan bahwa terdapat berbagai macam tumbuhan dalam arti jenis-jenis tumbuhan. Berdasarkan tafsir al Mishbah surat ThaaHaa (20) : 53 menjelaskan bahwa Allah SWT menurunkan air hujan dari langit, sungai, mata air, dan lautan. Kemudian Allah SWT menumbuhkan bermacam-macam jenis tumbuhan dan menunjukkan kepada manusia agar mengambil manfaat pada tumbuh-tumbuhan sebagai tanda mengenai petunjuk Ketuhanan dan Pemeliharaan Allah SWT (Shihab, 2002).

Aneka macam tumbuh-tumbuhan seperti rumput laut merupakan kekayaan laut yang dapat menyediakan sumber daya alam dalam jumlah melimpah, namun belum dimanfaatkan secara maksimal oleh masyarakat. Aslan (2005) mengatakan bahwa rumput laut dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan tepung agar-agar, keraginan dan alginat.

Alga merah (*Rhodopyceae*) merupakan jenis rumput laut yang banyak dimanfaatkan karena mengandung agar-agar, keraginan, porpiran maupun fulcelaran. Alga merah memiliki jumlah terbesar di perairan Indonesia. Hutomo dan Moosa (2005) menyatakan bahwa alga yang tersebar di seluruh wilayah perairan Indonesia meliputi 452 jenis alga merah (*Rhodopyceae*), 196 jenis alga hijau (*Chlorophyceae*) dan 134 jenis alga coklat (*Phaeophyceae*).

Salah satu jenis alga merah yang banyak dibudidayakan di Indonesia yaitu jenis *Eucheuma cottonii*. Menurut Soenardjo (2011) *Eucheuma cottoni* merupakan komoditi laut yang potensial untuk dikembangkan. Budidaya rumput laut ini mempunyai persyaratan lingkungan tertentu antara lain perairan yang tenang. *Eucheuma cottonii* memiliki banyak manfaat dan nilai ekonomi tinggi. Kandungan metabolit sekunder di dalam *Eucheuma cottonii* adalah senyawa steroid dan triterpenoid (Afif, 2013); (Rudiyanto, 2013); (Andriani, 2013); (Muhibbah, 2013); (Aliyatul, 2013). Senyawa steroid memiliki berbagai aktivitas farmakologi, yaitu memiliki potensi bioaktifitas terhadap *Artemia salina* Leach dengan nilai LC_{50} 70,32 ppm (Afif, 2013), sebagai antikanker dengan nilai EC_{50} 5 ppm (Diastuti dan Warsinah, 2010), sebagai antibakteri dengan zona hambat 7,85 mm terhadap *S. aureus* dan *E. coli* (Andriani, 2013) dan sebagai antioksidan dengan EC_{50} 3,714 ppm (Rudiyanto, 2013).

Proses isolasi steroid meliputi empat tahap yaitu ekstraksi, pemisahan, pemurnian dan identifikasi. Metode ekstraksi untuk mengekstrak senyawa aktif yang banyak digunakan adalah metode maserasi dengan pelarut metanol. Kelebihan dari maserasi adalah sederhana, murah dan dapat menghindari kerusakan senyawa karena dilakukan tanpa pemanasan (Voight, 1995). Menurut Kristanti (2008) pelarut metanol merupakan pelarut universal, yang bersifat mampu melarutkan hampir semua komponen baik yang bersifat nonpolar, semi polar dan polar. Selain itu, pemilihan pelarut metanol sebagai pelarut pada tahap ekstraksi berdasarkan prinsip ekstraksi *like dissolved like*. Senyawa steroid yang terkandung pada *Eucheuma cottonii* masih terikat dalam bentuk glikosidanya dengan gugus gula yang bersifat polar. Sehingga untuk mengekstrak senyawa metabolit sekunder menggunakan pelarut yang memiliki sifat kepolaran yang sama dengan glikosidanya (Tyas, 2017). Perendaman sampel menyebabkan tumbuhan mengalami pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara dalam dan luar sel. Sehingga metabolit sekunder pada sitoplasma akan terlarut dalam pelarut (Mardiyah, 2013). Menurut Cannell (1998) dalam Kutsiyah (2012) bahwa metanol dapat menetrasi atau menembus ke dalam dinding sel lebih efisien, sehingga didapatkan ekstrak yang lebih banyak. Hal tersebut dibuktikan oleh Aliyatul (2013) yang telah melakukan ekstraksi maserasi pada *E. cottonii* dengan variasi pelarut dan diperoleh rendemen metanol dan n-heksana berturut-turut 8,85 % dan 1,94 %. Penelitian yang dilakukan oleh Sari (2017) dimana serbuk alga merah jenis *E. cottonii* direndam pada pelarut metanol selama 24 jam, hasil rendemen menunjukkan sebesar 16,649 %. Selama 24 jam filtrat dipisahkan dari ampasnya dilanjutkan dengan proses hidrolisis dan partisi.

Hidrolisis merupakan reaksi yang terjadi antara suatu senyawa dan air dengan membentuk reaksi kesetimbangan (Mulyono, 2006). Asih (2009) menyatakan bahwa untuk memisahkan antara senyawa metabolit sekunder dengan gula hasil ekstrak kasar metanol dilakukan dengan hidrolisis menggunakan HCl 2 N selama 2-3 jam. Pada umumnya senyawa metabolit sekunder masih terdapat dalam bentuk glikosida yang berikatan dengan gugus gula atau glikon. Cara memutus ikatan antara glikon dan aglikon yang berupa metabolit sekunder dengan hidrolisis asam. Setelah ikatan glikosida terputus hasil hidrolisis masih dalam bentuk campuran antara aglikon dan glikonnya, maka perlu dipisahkan dengan partisi berdasarkan tingkat kepolarannya. Aglikon yang berupa steroid dan triterpenoid memiliki sifat non polar, sehingga diperlukan pelarut non polar juga dalam mempartisinya yaitu etil asetat (Septiandari, 2016); (Sholikah, 2016). Pelarut etil asetat bersifat semi polar yang mampu memisahkan senyawa dengan kepolaran yang sama dari hasil hidrolisis. Senyawa metabolit sekunder akan terdistribusi ke fase organik (etil asetat) sedangkan senyawa lain yang bersifat polar akan terdistribusi ke fase air (metanol). Penelitian yang dilakukan oleh Mardaneni (2017) hasil hidrolisis dan partisi menggunakan etil asetat menghasilkan rendemen 13,93 % dan terdapat 6 noda yang diduga steroid pada hasil KLTA, serta pada proses pemisahan KLTP menunjukkan adanya 5 steroid.

Pemisahan lebih lanjut perlu dilakukan untuk mendapatkan senyawa yang lebih murni. Salah satu metode kromatografi yang memberikan cara pemisahan steroid dan triterpenoid paling kuat dan menghasilkan 157 isolat adalah kromatografi kolom (Septiandari, 2016). Kromatografi kolom basah lebih baik dalam isolasi steroid *E. spinosum* dibandingkan metode kering, dibuktikan dengan

hasil pemisahan yaitu 5 fraksi besar steroid dalam cara basah dan hanya 2 fraksi besar dalam cara kering (Sholikhah, 2016). Rahmawati (2017) melakukan pemisahan dan identifikasi senyawa steroid pada fraksi petroleum eter alga merah *E. cottonii* menggunakan berbagai eluen dan menghasilkan pemisahan yang baik pada eluen n-heksana dan etil asetat (18:2). Perbandingan rasio sampel dan silika gel adalah 1:150 (Tyas, 2017) dan diameter kolom yang digunakan adalah 1 cm (Mubarokah, 2017) dengan laju alir kolom 2 mL/menit (Fitri, 2017).

Hasil isolat kromatografi kolom yang mengindikasikan mengandung senyawa steroid dilakukan uji aktivitas antioksidan. Antioksidan adalah senyawa yang dapat menghambat radikal bebas, sehingga dapat menghambat berbagai penyakit yang berhubungan dengan radikal bebas. Menurut Hernani (2005) kegunaan utama antioksidan adalah untuk menghentikan atau memutus reaksi berantai dan radikal bebas yang terdapat dalam tubuh.

Beberapa penelitian yang telah dilakukan terdapat beberapa metode untuk menguji aktivitas antioksidan yang telah digunakan dalam mencegah terjadinya proses oksidasi oleh radikal bebas, diantaranya metode xantin oksidase, deoksiribosa, ABTS dan DPPH. Saat ini metode menguji aktivitas antioksidan yang sering dikembangkan adalah metode DPPH. Dimana metode tersebut sederhana, akurat, cepat dan dapat dilakukan dengan sedikit sampel. Metode DPPH juga merupakan metode yang tidak terbatas untuk mengukur komponen terlarut dalam pelarut yang digunakan dalam analisa (dapat mengukur aktivitas total antioksidan baik dalam pelarut polar maupun non polar) (Hafid, 2003).

Selain dilakukan secara eksperimen, penelitian ini dilakukan secara *in silico*. Tujuan dari *in silico* untuk menunjukkan pola pemisahan jenis steroid pada

berbagai variasi gradien eluen berdasarkan energi solvasi. Energi solvasi akan menunjukkan energi interaksi antara partikel-partikel terlarut dengan pelarutnya. Dimana energi yang rendah akan menunjukkan sampel memiliki kekuatan interaksi dengan pelarutnya. Sehingga dalam proses pemisahannya keluar diakhir dan begitu sebaliknya. Pemilihan metode komputasi *in silico* pada penelitian ini menggunakan simulasi Dinamika Molekuler (DM). Simulasi DM merupakan metode komputasi yang biasa digunakan untuk menghasilkan beberapa konformasi target (Deeb, 2009). Selain itu, DM salah satu metode komputasi fisika yang populer untuk mensimulasikan gerak atom, molekul dan obyek berukuran besar. Metode simulasi DM memerlukan informasi koordinat awal atom, kondisi simulasi antara lain temperatur, tekanan, rapat partikel dan lain-lain. Serta fungsi potensial interaksi antar atom untuk obyek yang akan disimulasikan dan spesifikasi obyek yang disimulasikan seperti massa, muatan, jumlah atom dan lain-lain (Widiasih, 2013). Penelitian Byju (2014) *in vitro* dan *in silico* mengenai aktivitas antikanker dan apoptosis sterol yang diidentifikasi dari karang lunak *Subegorgia reticulata* dalam prediksi *in silico* menunjukkan bahwa sterol memiliki aktivitas agonis apoptosis. Peluang aktivitas agonis apoptosis ditemukan untuk 26,26-Dimetil-5,24 (28)-*S. reticulata* fraksi sterol yang diisolasi ditemukan memiliki aktivitas antikanker.

Berdasarkan uraian diatas, untuk mengetahui pemisahan steroid menggunakan kromatografi kolom dengan variasi gradien eluen secara eksperimen dan *in silico* serta uji antioksidan isolat steroid fraksi etil asetat makroalga *Eucheuma cottonii* perlu dilakukan dengan dua tahapan. Secara *in silico* menggunakan simulasi dinamika molekuler. Sedangkan secara eksperimen

dimulai dari pemisahan senyawa steroid hasil partisi dengan pelarut etil asetat menggunakan kromatografi kolom basah dengan variasi gradien eluen. Fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom dianalisis dengan KLTA dan dilanjutkan proses uji antioksidan. Identifikasi menggunakan *liquid chromatography-tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS) untuk mengetahui jenis steroid dari isolat steroid dengan aktivitas antioksidan terbaik.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana profil fraksi golongan senyawa hasil isolasi kromatografi kolom dari fraksi etil asetat makroalga *E. cottonii* dengan variasi gradien eluen ?
2. Bagaimanakah aktivitas antioksidan isolat steroid hasil kromatografi kolom fraksi etil asetat makroalga *E. cottonii* ?
3. Senyawa steroid apa sajakah yang ada di dalam isolat steroid hasil kromatografi kolom fraksi etil asetat makroalga *E. cottonii* dengan aktivitas antioksidan tertinggi menggunakan LC-MS/MS ?
4. Bagaimanakah profil energi potensial interaksi molekuler antara senyawa steroid yang ada dalam isolat steroid *E. cottonii* dengan eluen kombinasi variasi konsentrasi n-heksana etil asetat secara *in silico* ?

1.3 Tujuan

1. Untuk mengetahui profil fraksi golongan senyawa hasil isolasi kromatografi kolom dari fraksi etil asetat makroalga *E. cottonii* dengan variasi gradien eluen
2. Untuk mengetahui aktivitas antioksidan isolat steroid hasil kromatografi kolom fraksi etil asetat makroalga *E. cottonii*
3. Untuk mengetahui senyawa steroid yang ada di dalam isolat steroid hasil kromatografi kolom fraksi etil asetat makroalga *E. cottonii* dengan aktivitas antioksidan tertinggi menggunakan LC-MS/MS
4. Untuk mengetahui profil energi potensial interaksi molekuler antara senyawa steroid yang ada dalam isolat steroid *E. cottonii* dengan eluen kombinasi variasi konsentrasi n-heksana etil asetat secara *in silico*

1.4 Batasan Masalah

1. Fraksi etil asetat makroalga *E. cottonii* diperoleh dari penelitian sebelumnya
2. Isolasi steroid dengan metode kromatografi kolom basah
3. Variasi gradien eluen yang digunakan adalah n-heksana : etil asetat 95:5; 90:10; 85:15; 80:20, 75:25; 70:30 mL
4. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH
5. Identifikasi steroid menggunakan LC-MS/MS

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi tanaman makroalga *E. cottonii* dari Pantai Wongsorejo Banyuwangi di bidang pengobatan sebagai zat antioksidan alami. Sehingga mampu untuk meningkatkan kesejahteraan masyarakat sekitar dengan mengurangi penggunaan zat antioksidan sintetik. Dan juga memberikan informasi kepada lembaga kesehatan mengenai potensi tanaman makroalga *E. cottonii* pada bidang pengobatan.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga Merah (*Eucheuma cottonii*)

Menurut Doty (1985), *Eucheuma cottonii* merupakan salah satu jenis rumput laut merah (*Rhodophyceae*) dan berubah nama menjadi *Kappaphycus alvarezii* karena karaginan yang dihasilkan termasuk fraksi kappa-karaginan. Maka jenis ini secara taksonomi disebut *Kappaphycus alvarezii* (Doty, 1985). *Eucheuma* salah satu genus dari kelompok rumput laut merah yang merupakan genera dari Famili Solieracea. Klasifikasi *Eucheuma* menurut Doty (1985) adalah sebagai berikut :

Divisi	: Rhodophyta
Kelas	: Rhodophyceae
Ordo	: Gigartinales
Famili	: Solieracea
Genus	: Eucheuma
Spesies	: <i>Eucheuma cottonii</i>

Ciri fisik *Eucheuma cottonii* adalah mempunyai thallus silindris, permukaan licin, *cartilogeneus*. Keadaan warna tidak selalu tetap, kadang-kadang berwarna hijau, hijau kuning, abu-abu atau merah. Perubahan warna sering terjadi hanya karena faktor lingkungan. Kejadian ini merupakan suatu proses adaptasi kromatik yaitu penyesuaian antara proporsi pigmen dengan berbagai kualitas pencahayaan (Aslan, 2005). Penampakan *thalli* bervariasi mulai dari bentuk sederhana sampai kompleks. Duri-duri pada *thallus* runcing memanjang, agak jarang-jarang dan tidak bersusun melingkari *thallus* (Gambar 2.1). Percabangan ke berbagai arah dengan batang-batang utama keluar saling berdekatan ke daerah basal (pangkal). Tumbuh melekat ke substrat dengan alat perekat berupa cakram.

Cabang pertama dan kedua tumbuh dengan membentuk rumpun yang rimbun dengan ciri khusus mengarah ke arah datangnya sinar matahari (Atmadja 1996).

Allah SWT berfirman dalam surat az Zumar (39): 21

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَسَلَكَهُ يَنَابِيعٌ فِي الْأَرْضِ ثُمَّ يُخْرِجُ بِهِ زَرْعًا مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ ثُمَّ يَهْبِجُ فَتَرَاهُ مُصْفَرًّا ثُمَّ يَجْعَلُهُ حُطَامًا إِنَّ فِي ذَلِكَ لَذِكْرًا لِأُولِي الْأَلْبَابِ ○

“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 demikian itu benar-benar terdapat pelajaran bagi orang-orang yang mempunyai akal” (Qs. az-Zumar (39): 21)



Gambar 2.1 Alga merah *Eucheuma cottonii* (Anggadiredja, dkk., 2006)

Berdasarkan tafsir al-Qurthubi (2009) menjelaskan lafadz زَرْعًا مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ yang memiliki arti tanaman-tanaman yang bermacam warnanya. Kata tersebut menunjukkan bahwa terdapat tanaman dengan beragam warna yaitu merah, putih, biru, kuning dan hijau. Alga merah termasuk salah satu contoh tanaman laut dari jenis alga. Adapun jenis alga lainnya antara lain alga hijau dan alga coklat.

2.2 Kandungan dan Manfaat *Eucheuma cottonii*

Kandungan kimia penting lain adalah karbohidrat yang berupa polisakarida seperti agar – agar. Karagenan dan alginat (Atmadja,1996). Rumput laut yang banyak dimanfaatkan adalah dari jenis ganggang merah karena mengandung selain agar – agar. Karagenan pada ganggang merah merupakan senyawa polisakarida yang tersusun dari D –galaktosa dan L.-galaktosa 3,6 anhidrogalaktosa yang dihubungkan yang dihubungkan oleh ikatan 1-4 glikosilik. Beberapa kadungan kimia pada *Eucheuma cottonii* yang disajikan pada Tabel 2.1 berikut :

Tabel 2.1 Komposisi nilai nutrisi alga merah *Eucheuma cottonii*

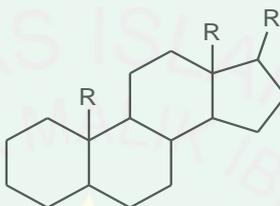
Komponen	Jumlah
Karbohidrat	57,52 %
Protein	3,46 %
Lemak	0,93 %
Air	14,96 %
Abu	16,05 %
Serat kasar	7,08 %
Mineral Ca	22,39 ppm
Mineral Fe	0,121 ppm
Mineral Cu	2.763 ppm
Riboflavin	2.7 mg/100 g
Vitamin C	12 mg/100 mg
Karagenan	61.51 %

Sumber : Yunizal, 2004

2.3 Senyawa Steroid

Steroid merupakan salah satu senyawa bioaktif dalam alga merah *Eucheuma cottonii* dan salah satu manfaatnya bisa dijadikan sebagai antioksidan. Steroid ini termasuk kelompok senyawa bahan alam yang kebanyakan strukturnya

terdiri atas 17 atom karbon dengan membentuk struktur dasar 1,2-siklopentenoperhidrofenantren seperti pada Gambar 2.2. Molekul steroid relative datar/planar, terdapat dua kelompok besar berdasarkan konfigurasi cincin-cincinnya (Kristanti, dkk., 2008).



1,2 siklopentanaperhidrofenantren

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

Berdasarkan efek fisiologis yang ditimbulkan senyawa steroid dapat dikelompokkan melalui perbedaan struktur. Perbedaan antar kelompok diketahui dengan substituen yang terikat pada kerangka dasar (R1, R2 dan R3). Perbedaan senyawa dari satu kelompok dapat dibedakan dari panjang rantai karbon substituen, gugus fungsi, jumlah dan posisi gugus fungsi oksigen, ikatan rangkap pada kerangka dasar serta konfigurasi pusat asimetris pada kerangka dasar (Kristanti, dkk., 2008).

Steroid memiliki beberapa turunan yang penting seperti steroid alkohol atau sterol, terdiri atas β -sitosterol, kampesterol, fukosterol dan sebagainya (Sapar, dkk., 2004). Isolasi steroid dari fraksi etil asetat tumbuhan paku *Christlella arida* menggunakan metode kromatografi kolom dan identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan *gas chromatography-mass spectroscopy* (GC-MS). Hasil penelitian menunjukkan jenis isolat steroid

2.4.2 Ekstraksi Maserasi

Maserasi merupakan perendaman sampel dalam pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruang. Maserasi didasarkan pada perendaman sampel dengan pelarutnya pada suhu ruang. Sampel akan mengalami pemecahan dinding sel dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut pada pelarut (Voight, 1995).

Melalui ekstraksi maserasi diharapkan semua senyawa dapat terekstrak secara maksimal, dilanjutkan dengan partisi untuk memperoleh komponen bioaktif yang lebih spesifik (Rahayu, dkk., 2010). Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan bahan alam dalam pelarut tersebut (Guenther, 2006). Kelebihan maserasi ini adalah cara pengerjaan atau peralatan yang digunakan sederhana dan mudah dilakukan (Vogel, 1978).

Pelarut yang digunakan untuk mengekstrak senyawa aktif pada alga merah adalah metanol. Pelarut metanol merupakan pelarut universal golongan alkohol yang mudah melarutkan senyawaan yang sesuai dengan cukup cepat karena memiliki sifat kepolaran yang sangat tinggi, memiliki titik didih yang cukup rendah sehingga dapat mudah diuapkan tanpa menggunakan suhu yang tinggi, bersifat inert dan memiliki harga yang terjangkau (Guenther, 2006).

Pemekatan filtrat menggunakan rotary evaporator. Prinsip kerja rotary evaporator adalah penurunan tekanan pada labu alas bulat sehingga pelarut dapat menguap lebih cepat dibawah titik didihnya. Pelarut akan menguap menuju

kondensor dan tertampung dalam labu alas bulat penampung sehingga terpisah dari ekstrak (Vogel, 1978).

2.5 Hidrolisis Asam

Hidrolisis merupakan suatu reaksi yang terjadi antara air dengan suatu senyawa hingga membentuk reaksi kesetimbangan (Mulyono, 2006). Hidrolisis dilakukan untuk memutuskan ikatan glikosida pada senyawa organik. Glikosida 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) (Gunawan, 2008).

Reaksi hidrolisis menggunakan air berlangsung sangat lambat sehingga memerlukan bantuan katalisator. Katalisator yang sering digunakan dalam industri adalah asam klorida (HCl) karena akan terbentuk garam NaCl yang tidak berbahaya (Setiyawan, 2015). Asih (2009) menyatakan bahwa untuk memisahkan antara senyawa metabolit sekunder dengan gula hasil ekstrak kasar metanol dilakukan dengan cara hidrolisis menggunakan HCL 2 N selama 2-3 jam.

Proses partisi dilakukan menggunakan pelarut etil asetat, penggunaan fraksi etil asetat berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Mardiyah dan Kholidiyah dkk, 2013) diperoleh fraksi terbaik pada etil asetat. Mardiyah (2014) hasil maserasi hidrolisis menggunakan HCl sebanyak 5 gram kemudian dipartisi menggunakan pelarut etil asetat. Hasil partisi dipekatkan dan menghasilkan rendemen yang cukup besar yaitu 10,62 %.

Afif (2013) menggunakan metode hidrolisis dengan pelarut HCl 2 N sebagai katalis dan ekstraksi cair-cair untuk mengekstrak metabolit sekunder dari

ekstrak metanol alga merah *E. cottonii*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak setelah dihidrolisis dan dipartisi memiliki nilai LC_{50} lebih rendah (70,32 ppm) dibandingkan ekstrak sebelum dihidrolisis (194,40 ppm). Kutsiyah (2012) menguji aktivitas antioksidan ekstrak kasar metanol *E. spinosum* tanpa proses hidrolisis diperoleh nilai EC_{50} pada ekstrak tersebut sebesar 114,3 ppm. Sementara itu, Mardiyah (2014) juga menguji aktivitas antioksidan melalui proses hidrolisis mendapatkan aktivitas antioksidan yang lebih baik yaitu dengan nilai EC_{50} 22,13 ppm. Penggunaan HCl 2 N dikarenakan kecepatan laju reaksi HCl 2 N ($0,052 \text{ mm}^{-1}$) lebih besar dibanding HCl 1N ($0,036 \text{ mm}^{-1}$) dalam proses pemutusan ikatan glikosida (Tasic, dkk., 2009).

Setelah proses pemecahan ikatan glikosida kemudian dilakukan penetralan untuk menghentikan reaksi yang reversible hingga netral atau mencapai pH 7. Hidrolisis menggunakan larutan asam, sehingga untuk menetralkan dibutuhkan larutan basa. Basa yang digunakan adalah Natrium bikarbonat jenuh (NaHCO_3) dikarenakan lebih aman daripada NaOH yang bersifat korosif (Ningsih, 2015). Reaksi penetralan pembentukan garam ditunjukkan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Reaksi antara HCl dan NaHCO_3 (Ningsih, 2015)

2.6 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Identifikasi senyawa steroid hasil fraksi etil asetat perlu dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya senyawa metabolit sekunder didalamnya. Reagen Libermann Burchard merupakan reagen yang spesifik untuk uji senyawa steroid, dengan komposisi kloroform, asam asetat anhidrida dan asam sulfat pekat

(Hanapi, 2013). Prinsip dasar dari uji LB adalah senyawa triterpenoid dapat mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat yang akan membentuk garam dengan memberikan sejumlah reaksi warna (Robinson, 1995).

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa hasil fraksi etil asetat *E. cottonii* dan *E. spinosum* yang ditambahkan dengan pereaksi LB menghasilkan cincin berwarna kecoklatan, yang menandakan fraksi etil asetat mengandung senyawa triterpenoid, dan warna biru-hijau menunjukkan adanya senyawa steroid (Aliyatul, 2013); (Sharo, 2013); (Afif, 2013); (Andriani, 2013); (Rudiyanto, 2013); (Anam, 2015); (Septiandari, 2016); (Sholikhah, 2016); (Mardiyah, 2012); (Miftahurrohmah, 2012). Senyawa steroid ketika direaksikan dengan reagen Lieberman-Burchard akan mengalami perpanjangan konjugasi sehingga terbentuk warna hijau kebiruan dan violet saat uji fitokimia.

2.7 Kromatografi Kolom pada Pemisahan Senyawa Aktif *Eucheuma cottonii*

Kromatografi kolom merupakan metode pemisahan yang didasarkan pada pemisahan daya adsorpsi suatu adsorben terhadap suatu senyawa (Sastrohamidjojo, 2005). Menurut (Rudiyanto, 2013) terdapat dua teori yang menjelaskan efisien kinerja dari kromatografi yaitu teori plat dan teori laju. Teori plat menggambarkan bahwa kolom kromatografi terdiri dari lapisan-lapisan seperti plat yang disebut plat teoritis (*theoretical plates*). Plat-plat tersebut berguna dalam mengukur efisiensi kolom dengan cara menentukan jumlah teoritis dalam kolom yaitu N , dimana semakin besar nilai N maka semakin baik pemisahannya atau dengan menyatakan tinggi ekuivalen dari plat teoritis ($HETP = \text{Height Equivalent to a Theoretical Plate}$) dimana semakin kecil nilai HETP maka

semakin bagus kolomnya. Hal ini berhubungan dengan panjang kolom (L) dalam persamaan berikut:

$$\text{HETP} = L / N$$

Menurut Kondeti (2014), peningkatan teknik kromatografi kolom dari segi kualitas maupun kuantitas perlu dilakukan untuk meminimalisir kekurangan, misalnya dengan mengubah ukuran kolom, ukuran partikel pada fase diam, komposisi fase gerak, dan lain-lain. Sifat-sifat pelarut juga sangat berpengaruh terhadap penentuan mobilitas komponen-komponen campuran. Urutan kekuatan elusi beberapa pelarut air > metanol > etanol > aseton > etil asetat > kloroform > dietil eter > metilen diklorida > benzena > toluena > karbon tetraklorida > heksana > petroleum eter (Atun, 2014).

Silika gel merupakan fase diam (adsorben) yang paling sering digunakan dalam pemisahan produk alam (Cannel, 1998). Permukaan silika gel memiliki luas kurang lebih 500 m²/g dan mengandung gugus silanol. Fase gerak yang digunakan berupa pelarut non polar dan semi polar yaitu n-heksana dan etil asetat. Ketika sampel dimasukkan ke dalam kolom yang berisikan fase diam lalu dialiri fase gerak dengan sifat kepolarannya dari non polar menuju semi polar. Sampel yang memiliki sifat non polar akan melewati fase diam dan sampel yang masih memiliki sifat polar akan tertahan pada gugus hidroksil silanol. Gugus hidroksil pada silanol ini berpotensi kuat dalam membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa yang akan dipisahkan, terutama dengan donor H seperti alkohol, amida, amina dan asam karboksilat (Noviyanti, 2010). Semakin kuat ikatan hidrogen antara silika dan senyawa yang akan dipisahkan, maka semakin kuat akan tertahan pada fase diam/silika. Sehingga kandungan senyawa non polar dapat terpisahkan

dari kandungan senyawa polar pada sampel yang dipisahkan. Dimana sampel yang dipisahkan merupakan steroid yang memiliki sifat kepolaran yaitu non polar.

Penelitian yang dilakukan ini menggunakan kromatografi kolom basah, hal ini sesuai dengan penelitian Sholikah (2016) dan Handoko (2016) yang menyatakan bahwa metode kromatografi kolom dengan pengisian cara basah lebih baik daripada cara kering. Pada pemisahan steroid *Eucheuma sp.* yang dilakukan oleh Sholikah (2016) cara basah lebih menghasilkan 9 kelompok fraksi dengan 5 kelompok fraksi senyawa steroid dan 4 kelompok fraksi senyawa triterpenoid, sedangkan pada cara kering diperoleh 5 kelompok fraksi dengan 2 kelompok steroid dan 3 kelompok triterpenoid.

Pemisahan dapat dilakukan dengan cara isokratik atau gradien. Metode pemisahan pada kromatografi kolom basah menggunakan variasi gradien eluen. Pada variasi gradien eluen, komposisi fase gerak berubah-ubah selama pemisahan. Rohman dan Gandjar (2007) menyatakan bahwa gradien eluen digunakan untuk meningkatkan resolusi campuran yang kompleks, terutama jika sampel memiliki kisaran polaritas yang luas.

2.8 Kromatografi Lapis Tipis pada Monitoring Senyawa Aktif *E. cottonii*

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan salah satu alat pemisah dan alat uji senyawa kimia secara kualitatif dan kuantitatif (Stahl, 1985). Analisis KLT dilakukan untuk menentukan pelarut yang terbaik untuk kromatografi kolom, analisis fraksi-fraksi hasil kolom, identifikasi senyawa, dan memonitor jalannya suatu reaksi kimia (Kristanti, dkk., 2008). Pada penelitian ini, pengujian

KLT dilakukan untuk memonitor hasil pemisahan kromatografi kolom dan identifikasi senyawa steroid dengan bantuan reagen Lieberman Burchard.

Pemilihan fase gerak yang tepat dapat mendukung keberhasilan dalam pemisahan steroid dari komponen yang lainnya. Pada penelitian ini menggunakan campuran pelarut n-heksana dan etil asetat sebagai fase gerak, senyawa n-heksana yang bersifat non-polar dan senyawa etil asetat yang bersifat semi polar. Namun perbandingan dari campuran eluen tersebut, n-heksana mempunyai perbandingan yang lebih besar sehingga memberikan kontribusi yang lebih besar dan campuran senyawa tersebut lebih cenderung bersifat non polar. Senyawa steroid lebih cenderung bersifat non-polar sehingga senyawa steroid lebih terdistribusi pada eluen dibandingkan pada plat KLT yang bersifat polar (Ningsih, 2015). Berdasarkan penelitian Mardaneni (2017), eluen terbaik dari hasil Kromatografi Lapis Tipis Analitik untuk memisahkan senyawa steroid adalah campuran senyawa n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17: 3.

2.9 Antioksidan

Antioksidan merupakan molekul yang berfungsi untuk menetralkan senyawa-senyawa berbahaya atau senyawa yang bersifat toksik bagi tubuh yang dikenal dengan sebutan radikal bebas. Antioksidan dapat diperoleh dari kumpulan enzim-enzim dalam tubuh, vitamin suplemen atau zat-zat aditif (Ardiansyah, 2007).

Penghilangan dari suatu radikal bebas asam lemak bebas peroksida, akan mencegah dan memutuskan rantai reaksi oksidasi pada tahap awal. Antioksidan diharapkan dapat memperlambat waktu terbentuknya produk akhir oksidasi.

Pendeaktifan dari radikal-radikal bebas dilakukan dengan menambahkan zat antioksidan sehingga dapat memperlambat proses oksidasi melalui berbagai mekanisme. Mekanisme terdiri dari mereaksikan dengan radikal bebas, mengikat logam, menangkap singlet oksigen dan sebagai filter radiasi UV (Ardiansyah, 2007).

2.9.1 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Aktivitas antioksidan dari suatu makanan memiliki hasil berbeda bila diuji dengan metode yang berbeda. Metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) digunakan secara luas untuk menguji senyawa yang berperan sebagai pendonor elektron atau hidrogen. Metode pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan DPPH ditemukan pada tahun 1958 oleh Marsden Blois seorang pengajar dari Stanford University. Parameter pengujian ini dengan mengukur nilai *efficient concentration* atau EC_{50} lebih dikenal dengan IC_{50} (*Inhibition Concentration*). Nilai tersebut akan memberikan hasil perbedaan warna dan serapan pada substrat yang telah kehilangan 50% aktivitas dari DPPH. Parameter tersebut pertama kali diperkenalkan oleh Brand Williams *et al* dan telah banyak digunakan oleh peneliti untuk mempresentasikan hasil penelitian mereka (Songklanankarin, 2004).

Keuntungan metode DPPH adalah lebih sederhana dan waktu analisis yang lebih cepat. Prinsip metode DPPH dilihat dari perubahan warna DPPH dalam larutan dari ungu pekat menjadi kuning pucat karena aktivitas sampel yang mengandung antioksidan karena kemampuannya menangkap dan meredam aktivitas radikal bebas. Semakin banyak DPPH yang direndam, warna larutan semakin berubah menjadi pucat. Perubahan warna selain dapat dilihat secara

kualitatif juga bisa menggunakan spektrofotometer dari nilai absorbansinya. Nilai absorbansi yang baik untuk DPPH adalah kurang dari 1. Tinggi rendahnya aktivitas antioksidan pada sampel dilihat dari nilai EC₅₀ atau IC₅₀ yaitu konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan sifat radikal bebasnya. Pengerjaan menggunakan metode DPPH harus dilakukan dengan cepat dan hati-hati karena molekul DPPH mudah terdegradasi oleh cahaya dan oksigen. Akan tetapi metode DPPH lebih sederhana, akurat, cepat dan bisa dilakukan dengan sedikit sampel (Yuhernita, 2014).

Data hasil absorbansi masing-masing sampel digunakan untuk mencari % aktivitas. Rumus mencari % aktivitas adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ aktivitas antioksidan} = \frac{A_o - A_1}{A_o} \times 100\% \dots\dots\dots(2.1)$$

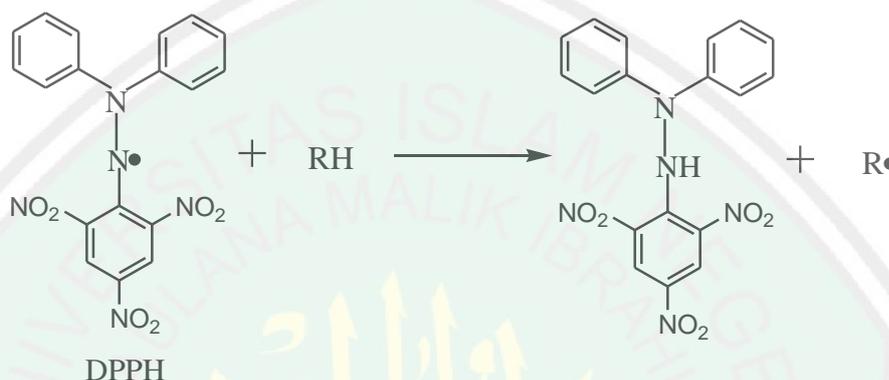
Keterangan:

A_o = Absorbansi kontrol

A₁ = Absorbansi DPPH sisa yang tidak bereaksi dengan sampel

Larutan DPPH yang berisi ekstrak sampel diukur serapan cahayanya dan dihitung aktivitas antioksidannya dengan menghitung presentase inhibisi. Presentase inhibisi yaitu banyaknya aktivitas senyawa antioksidan yang menangkap radikal bebas DPPH. Parameter yang juga digunakan untuk pengukuran aktivitas antioksidan dari sampel formulasi ekstrak adalah IC₅₀. IC₅₀ merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat aktivitas suatu radikal bebas sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀ berarti aktivitas antioksidannya semakin tinggi. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat apabila nilai IC₅₀ kurang dari 50 µg/ml, kuat apabila nilai IC₅₀ antara 50-100 µg/ml, sedang apabila nilai

IC₅₀ berkisar antara 100-150 µg/ml dan lemah apabila nilai IC₅₀ berkisar antara 150-200 µg/ml (Hidajat, 2005). Reaksi yang terjadi antara DPPH dan senyawa antioksidan disajikan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Reaksi antara DPPH• dengan antioksidan membentuk DPPH-H

Reaksi penetralan radikal bebas yang berupa DPPH, membuat senyawa yang mengandung antioksidan dapat bereaksi dengan radikal bebas. Senyawa radikal bebas akan menerima atom hidrogen dari senyawa antioksidan dan menjadi senyawa yang stabil. Sedangkan senyawa antioksidan akan membentuk senyawa radikal yang stabil, akibat adanya sistem terkonjugasi yang mampu mendelokalisasikan elektron radikal (Hafid, 2003). Reaksi penetralan yang terjadi dalam tubuh manusia mampu mengindikasikan bahwa senyawa antioksidan bisa digunakan sebagai obat untuk mencegah penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas. Karena menjaga kesehatan merupakan salah satu anjuran Islam sebagaimana sabda Rasulullah SAW :

إِغْتَنِمَ خَمْسًا قَبْلَ خَمْسٍ : شَبَابًا قَبْلَ هَرَمٍ وَ صِحَّةً قَبْلَ سَقَمٍ وَ غِنًى قَبْلَ فُقْرٍ وَ فَرَاغًا قَبْلَ شُغْلٍ وَ حَيَاتًا قَبْلَ مَوْتٍ ○

“Jagalah olehmu lima perkara sebelum datang lima perkara yang lainnya, jaga masa mudamu sebelum masa tuamu, jaga sehatmu sebelum sakitmu, jaga kayamu sebelum miskinmu, jaga waktu luangmu sebelum sibukmu dan jaga hidup mu sebelum matimu” (HR. Al Hakim dalam Al Mustadroknya 4: 341)

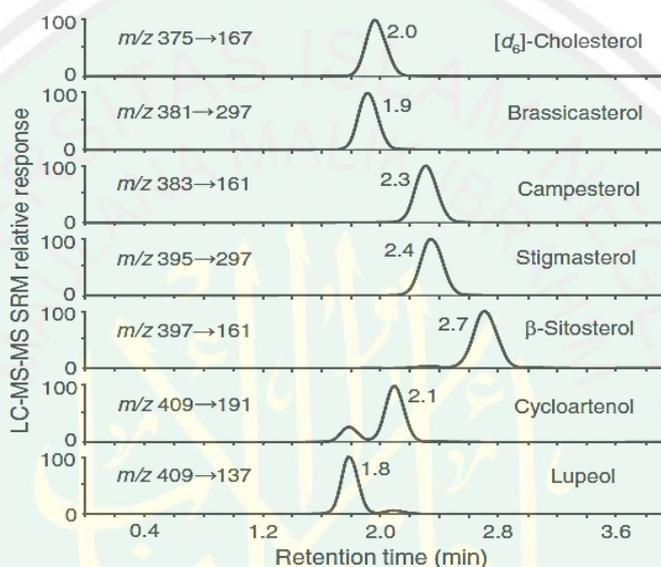
Berdasarkan hadits tersebut, Rasulullah SAW memerintahkan kepada umatnya untuk menjaga kesehatan sebelum masa sakit datang. Karena kesehatan merupakan salah satu nikmat Allah SWT yang diberikan kepada hambanya agar selalu dijaga dan disyukuri. Terkadang sebagian manusia baru menyadari nikmat kesehatan setelah merasakan sakit. Oleh karena itu, lebih baik untuk mencegah daripada mengobati. Sehingga salah satu alternatif yang bisa digunakan untuk mencegah penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas adalah senyawa antioksidan.

2.10 Identifikasi Senyawa Steroid dengan LC-MS/MS

LC-MS/MS merupakan pemisahan kromatografi cair dengan detektor spektrometer massa. LC-MS berguna untuk memisahkan senyawa berdasarkan distribusi kepolaran senyawa terhadap fasa diam dan fasa gerak yang digunakan. Sedangkan MS digunakan untuk identifikasi senyawa berdasarkan berat molekul. LC-MS juga memberikan informasi mengenai pemisahan ion suatu senyawa berdasarkan pola fragmentasi dan perbandingan massa terhadap muatan yang dihasilkan (Rahayu, dkk., 2010).

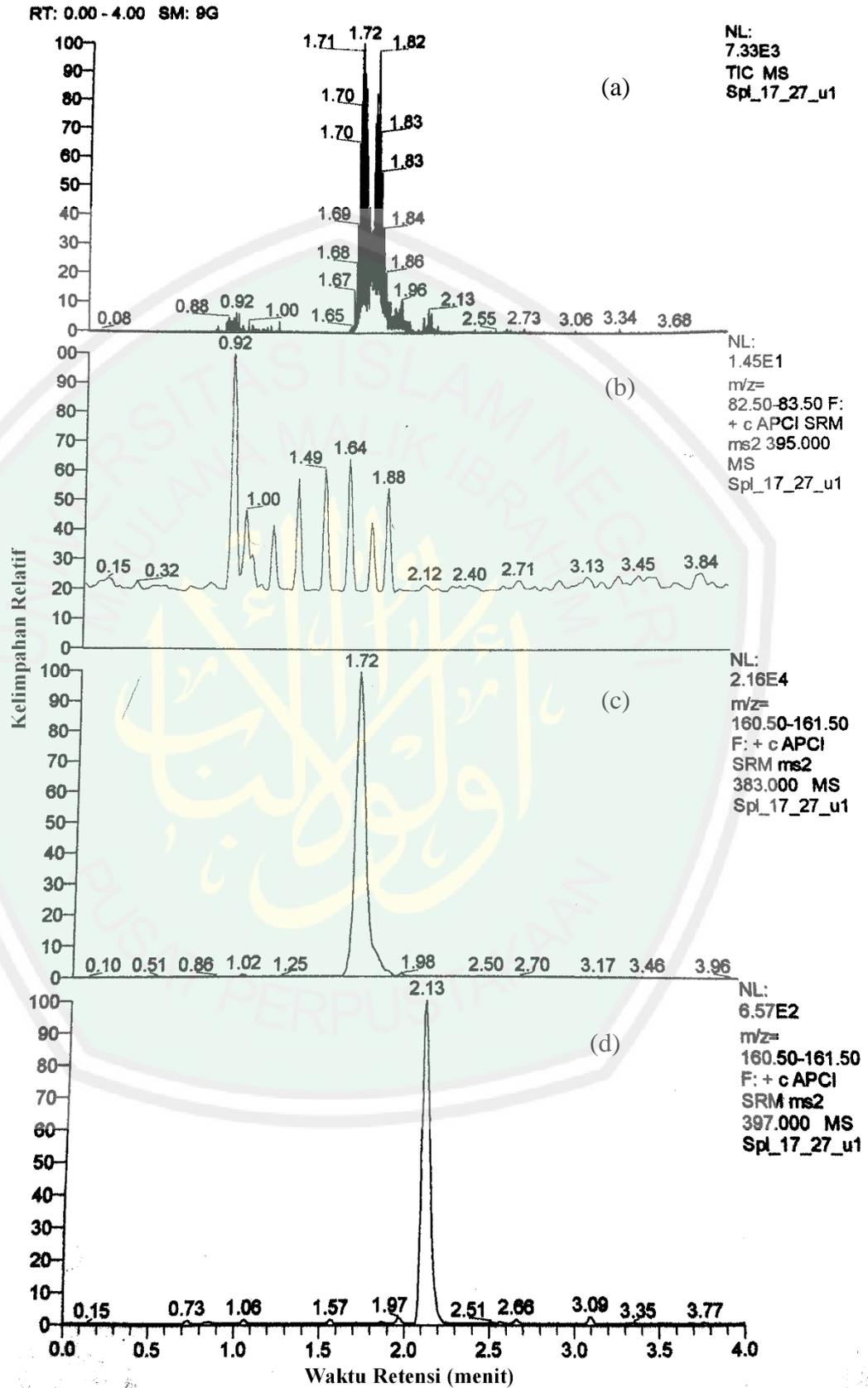
Penelitian Mo, dkk., (2013) analisis fitosterol dari minyak goreng menggunakan LC-MS/MS dengan sumber APCI dan metode SRM menghasilkan

6 puncak senyawa dengan waktu retensi yang berbeda. Puncak-puncak tersebut antara lain [2,2,3,4,4,6-d₆]-kolesterol, brassikasterol, kampeserol, stigmasterol, β -sitosterol dan sikloartenol. Kandungan paling dominan pada semua sampel minyak goreng adalah β -sitosterol. Hasil kromatogram fitosterol dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Kromatogram LC-MS/MS fitosterol dari minyak goreng (Mo, dkk., 2013)

Penelitian Sakdiyah (2017) analisis jenis senyawa steroid yang terdapat pada fraksi etil asetat alga merah *E. spinosum* menggunakan LC-MS/MS sumber ionisasi kimia tekanan atmosfer (APCI) dan analisa massa *triple quadrupole* metode deteksi *selected reaction monitoring* (SRM). Hasil analisa menunjukkan 3 puncak dengan waktu retensi berbeda. Hasil kromatogram isolat steroid ditunjukkan pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Kromatogram LC-MS/MS isolat steroid (a) TIC, (b) stigmasterol, (c) kampesterol, dan (d) β -sitosterol (Sakdiyah, 2017)

Berdasarkan hasil kromatogram LC-MS/MS dapat diketahui puncak-puncak diantaranya yaitu stigmasterol 0,92 menit, kampesterol 1,72 menit dan β -sitosterol 2,13 menit. Kandungan paling dominan pada penelitian tersebut adalah kampesterol. Hasil analisa massa menggunakan metode deteksi SRM ditunjukkan pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Hasil analisis massa metode deteksi SRM

Jenis steroid	Ion molekuler	Massa induk (m/z) [M+H-H ₂ O] ⁺	Massa anakan (m/z)
Stigmasterol	412	395	83
Kampesterol	400	383	161
β -sitosterol	414	397	161

Penelitian Mardaneni (2017) tentang pemisahan senyawa steroid fraksi etil asetat alga merah *E. cottonii* perairan Wongsorejo Banyuwangi menggunakan metode KLT dan LC-MS/MS. Hasil analisa menunjukkan 5 puncak dengan waktu retensi berbeda. Jenis steroid yang diperoleh antara lain β -sitosterol, stigmasterol, fukosterol, kampesterol, desmosterol. Berdasarkan Tabel 2.3 dapat diperoleh kandungan senyawa steroid pada *E. cottonii* yang paling dominan adalah β -sitosterol.

Tabel 2.3 Ion steroid yang terdeteksi oleh LC-MS/MS

Steroid	Waktu retensi (menit)	Massa (m/z)			Daughter mass
		M	M-H ₂ O	M- H ₂ O+H ⁺	
β -sitosterol	1,54	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

2.11 Teori Dinamika Molekuler

Dinamika molekuler adalah suatu metode yang digunakan untuk menyelidiki struktur dari zat padat, cair dan gas. Pada umumnya dinamika molekuler menggunakan persamaan hukum newton dan mekanika klasik. Besar gaya antara molekul dihitung secara eksplisit dan pergerakan molekul dikomputasi dengan metode integrasi. Dimana kondisi awal digambarkan dengan posisi dan kecepatan atom (Astuti, dkk., 2009).

Simulasi dinamika molekuler menghitung posisi massa dan kecepatan atom berdasarkan posisi dan kecepatan (Gunsteren dan Berendsen, 1990). Simulasi pertama menentukan gaya (F_i) pada setiap atom fungsi waktu sama dengan gradien negatif potensial:

$$F_i = - \frac{\delta V}{\delta r} \dots\dots\dots(2.2)$$

Dimana V adalah fungsi energi potensial dan r_i adalah posisi atom dari i . Sehingga dapat ditentukan penyelesaian a_i dari beberapa atom dengan membagi gaya yang bekerja dengan massa atom (Gunsteren dan Berendsen, 1990).

$$a_i = \frac{F}{m} \dots\dots\dots(2.3)$$

Perubahan kecepatan sama dengan integral percepatan yang berlebih. Perubahan posisi sama dengan integral kecepatan dari waktu ke waktu. Energi kinetik (K) didefinisikan dalam istilah kecepatan atom (Gunsteren dan Berendsen, 1990).

$$K = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m v^2 \dots\dots\dots(2.4)$$

Energi total sistem disebut Hamiltonian, yang merupakan jumlah dari energi kinetik dan energi potensial (Gunsteren dan Berendsen, 1990).

$$H_{(r,p)} = K_{(p)} + V_{(r)} \dots\dots\dots(2.5)$$

Dimana r adalah himpunan koordinat cartesian dan p adalah momentum atom

2.11.1 Konsep dan Algoritma Dinamika Molekuler (DM)

Pada bagian ini akan menguraikan konsep dan algoritma simulasi DM klasik. Simulasi ini atom-atom biopolimer bergerak menurut persamaan gerak Newton (Raabe, 2016):

$$m_a \ddot{\vec{r}} = - \frac{\delta}{\delta \vec{r}} U_{total}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N) \quad a = 1, 2 \dots N \dots\dots\dots(2.6)$$

dimana m_a adalah massa atom a , r adalah posisinya dan U_{total} adalah energi potensial total yang bergantung pada semua posisi atom dan pasangan gerakan atom. Energi potensial direpresentasikan oleh medan gaya merupakan bagian paling penting pada simulasi karena medan gaya harus benar-benar bisa mewakili interaksi antara atom dan dituliskan pada fungsi matematika sederhana yang dapat dihitung dengan cepat (Raabe, 2016).

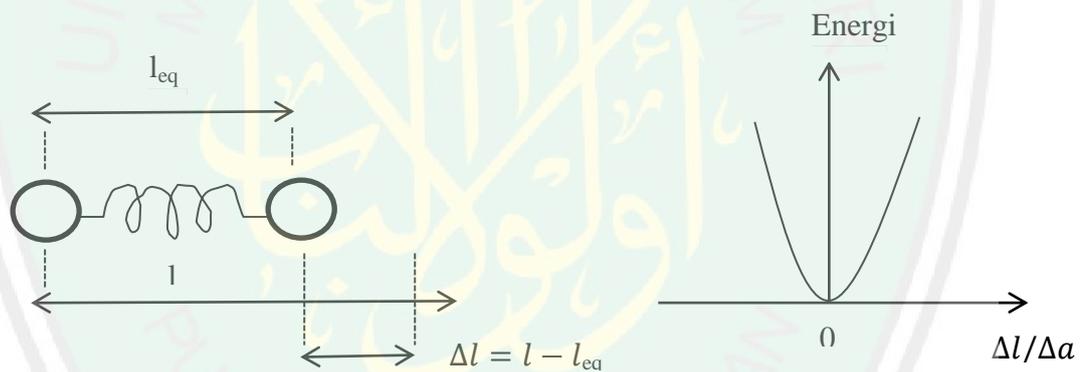
2.11.2 Fungsi Medan Gaya

Simulasi DM semua atom menganggap bahwa setiap atom mengalami gaya yang ditentukan oleh medan gaya model yang menghitung interaksi antara atom tersebut dengan seluruh atom sisa lain dalam sistem. Pada perkembangannya sampai saat ini, medan gaya dapat menyajikan sebuah kompromi yang baik antara akurasi dan efisiensi komputasi. Fungsi medan gaya menggunakan fungsi energi potensial umum yang memiliki kontribusi sebagai berikut (Lewars, 2016):

$$U_{total} = U_{bond} + U_{angle} + U_{dihedral} + U_{vdW} + U_{coloumb} \dots\dots\dots(2.7)$$

Tiga term pertama menggambarkan interaksi regangan, tekukan dan interaksi ikatan torsional. Dua term terakhir dalam persamaan 2.7 menggambarkan interaksi antara pasangan atom non ikatan. Term *bond* menjelaskan mengenai peningkatan energi pegas saat terjadi peregangan dan kira-kira sebanding dengan kuadrat perubahan jarak ikatan, seperti pada Gambar 2.8. Dimana terdapat parameter konstanta, panjang ikatan ketika terjadi regangan dan panjang ikatan aslinya. Adapun persamaan dari term bond sebagai berikut (Lewars, 2016):

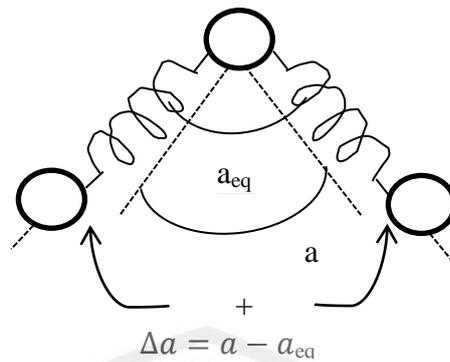
$$E_{stretch} = k_{stretch} (l - l_{eq})^2 \dots \dots \dots (2.8)$$



Gambar 2.8 Diagram panjang ikatan hasil perubahan energi dari molekul

Term sudut menunjukkan perubahan energi regangan tekukan yang kira-kira sebanding dengan kuadrat perubahan sudut seperti pada Gambar 2.8. Pada term ini terdapat parameter konstanta, ukuran sudut yang terdistorsi dan referensi ukuran sudut berdasarkan nilai aslinya yang ditunjukkan pada Gambar 2.9. Persamaan term sudut sebagaimana berikut (Lewars, 2016):

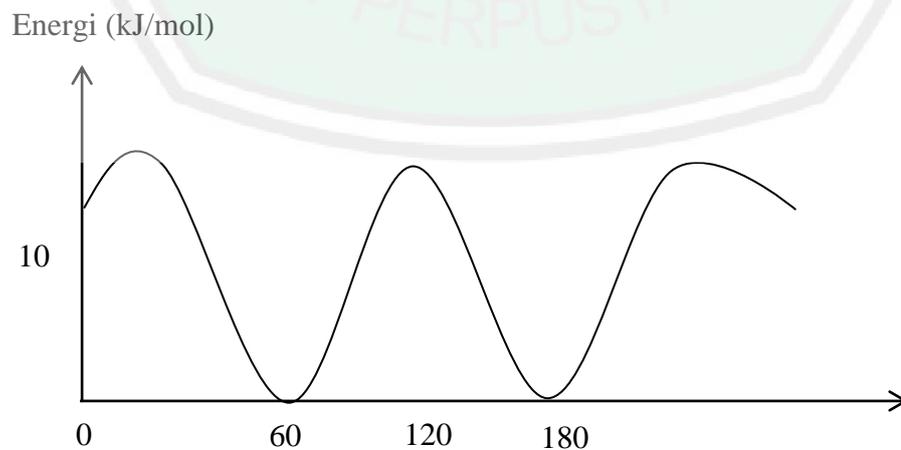
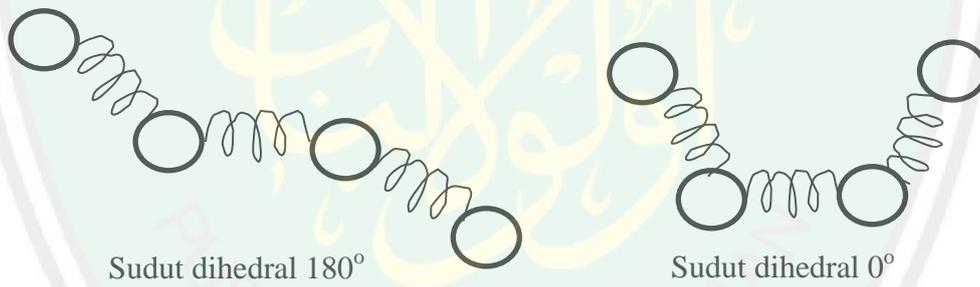
$$E_{bend} = k_{bend} (a - a_{eq})^2 \dots \dots \dots (2.9)$$



Gambar 2.9 Perubahan energi molekul yang disebabkan perubahan sudut

Term sudut dihedral atau sudut torsional sistem adalah perubahan energi regangan antara dua ikatan atom yang berbeda yang ditunjukkan pada Gambar 2.10. Energi potensial torsional sangat komplis, akan tetapi kombinasi dari fungsi sin dan cos akan mengubah kurva sudut torsional:

$$E_{torsion} = k_0 + \sum k_r [1 + \cos(r\theta)] \dots \dots \dots (2.10)$$

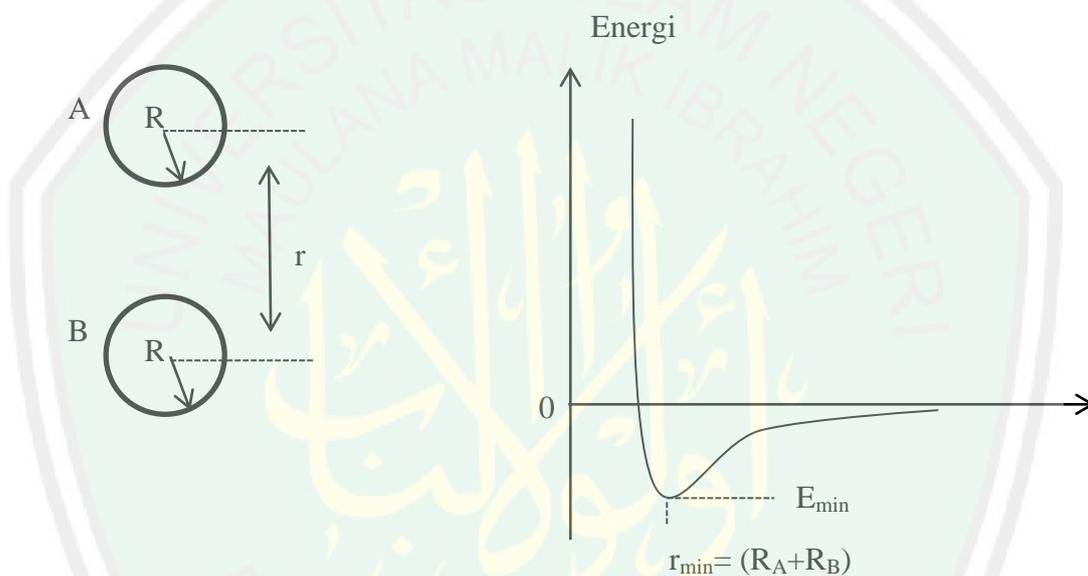


Gambar 2.10 Variasi energi dengan sudut dihedral

Term interaksi antara pasangan atom non ikatan dipengaruhi oleh gaya van der Waals yang mungkin bersifat antarmolekul. Persamaan sederhana dari term interaksi non ikatan disebut dengan potensial Lennard-Jones 12-6:

$$E_{nonbond} = k_{nonbond} \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \dots \dots \dots (2.11)$$

dimana energi minimum terjadi pada saat kontak van der Waals seperti pada Gambar 2.11.



Gambar 2.11 Variasi energi molekul dengan pemisahan dari non ikatan atom

Energi potensial akan bernilai negatif dikarenakan interaksi tarik menarik antarmolekul yang kuat. Pada setiap partikel dalam konteks ikatan tertentu, parameter k^{bond} , R_0 dan lain-lain untuk interaksi diberikan dalam persamaan yang dicantumkan pada file parameter medan gaya. Penentuan parameter tersebut diperoleh melalui kombinasi teknik empiris dan perhitungan mekanika kuantum. Kekonsistenan medan gaya diuji dalam memproduksi sifat struktural, dinamis dan

sifat termodinamika molekul kecil yang sudah dikarakterisasi dengan baik secara eksperimental serta dalam memproduksi sifat ruah (Lewars, 2016).

Kondisi batas periodik simulasi DM digunakan untuk menghindari efek permukaan pada batas sistem yang disimulasikan. Kondisi batas periodik merupakan metode yang meletakkan partikel yang diapit oleh sel yang direplikasi hingga tak terbatas melalui translasi periodik. Sebuah partikel yang meninggalkan sel disatu sisi akan digantikan dengan salinannya yang memasuki sel pada sisi yang berlawanan dan setiap partikel merupakan subjek terhadap potensial dari semua partikel lain di dalam sistem, termasuk *image* pada sel di sekitarnya. Sehingga menghilangkan efek permukaan akan tetapi hal tersebut tidak menghilangkan efek batas ukuran. Karena setiap sel merupakan salinan identik dari semua sel yang lain, semua partikel gambar bergerak secara bersama sehingga hanya perlu diwakili satu kali saja dalam kode dinamika molekul (Raabe, 2016).

Pemilihan kondisi batas periodik simulasi DM berdasarkan dua kali dimensi terpanjang dari zat yang terlarut. Pada Hyerchem untuk membuat periode box dengan ukuran yang ditentukan, secara otomatis periode box akan berisi air sejumlah *volume* yang ditentukan. Oleh karena itu untuk membuat periode box yang berisikan zat pelarut yang diinginkan harus menghitung terlebih dahulu jumlah zat pelarut yang harus ada pada *volume* yang diinginkan. Sehingga dapat menghapus jumlah molekul air secara keseluruhan dan menggantinya dengan jumlah molekul zat pelarut yang diinginkan (Allinger, 2002).

$$\text{Jumlah molekul} = \frac{\text{volume} \times \text{berat jenis} \times \text{bilangan Avogadro}}{\text{berat molekuler}} \dots\dots\dots(2.12)$$

Pada dasarnya proses simulasi DM memiliki tiga fase tahapan yaitu *heating*, *running* dan *cooling*. Pemilihan perhitungan dinamika molekul untuk menentukan sifat termodinamika suatu sistem, maka sistem tersebut harus mencapai keseimbangan dengan suhu yang stabil. Sehingga diperlukan memiliki periode simulasi panjang untuk mencapai keseimbangan dan memperoleh data. Simulasi ini bisa menggunakan suhu tinggi untuk membantu melintasi *barier* di permukaan potensial. Misalnya saja dengan memanaskan sistem kemudian mempertahankannya pada suhu tinggi lalu mendinginkannya (Allinger, 2002). Menurut Grant dan Richards (1995) tahap pertama simulasi dimulai dengan memanaskan sistem untuk mencapai suhu yang dibutuhkan. Suhu simulasi dihitung dari energi kinetik semua atom dalam sistem.

$$\frac{1}{2} \sum m v^2 = \frac{3}{2} N k_B T \dots \dots \dots (2.13)$$

Akan tetapi kecepatan atom-atom dalam sistem tidak diketahui pada saat $t = 0$. Sehingga sistem dipanaskan dengan cara memberikan gerak secara acak pada atom-atom dalam sistem sesuai dengan distribusi Maxwell pada temperatur yang diberikan. Sekali sistem tersebut mencapai kecepatan yang diinginkan, maka simulasi dapat dilanjutkan ke periode *equilibrasi* (keseimbangan). Periode ini mengizinkan redistribusi energi sistem untuk meyakinkan adanya stabilitas. Diperlukan juga suatu periode *rescaling* (penskalaan ulang) kecepatan atom-atom dalam sistem untuk membawa sistem kembali ke temperatur yang dibutuhkan. Panjang periode *equilibrasi* bergantung pada sifat-sifat yang ingin dipelajari, misalkan sifat energi kinetik yang membutuhkan periode relaksasi yang cukup pendek sekitar beberapa ps. Sementara sifat fasa ruah air misalkan membutuhkan sekitar 10-20 ps, dengan memonitor sifat-sifat sistem seperti temperatur dan

komponen-komponen energi yang berbeda. Maka akan menjadi jelas kapan sistem tersebut mencapai keseimbangan. Fase akhir akan memproduksi sifat-sifat dinamik. Sifat eksak dari fase ini ditentukan dengan ensemble yang digunakan dalam simulasi. Dalam ensemble mikrokanonikal (NVE) sistem akan mengalami dinamika gas dengan tidak ada proses rescaling kecepatan. Jika sistem cukup terstabilkan dengan fasa ekulibrasi, maka fasa produksi dinamik akan mudah diperoleh (Grant dan Richards, 1995).

AM1 (Austin Model 1) merupakan modifikasi dari metode MNDO dan dikembangkan oleh M.J.S Dewar dan rekan kerja di Universitas Texas Ausatin. Pada sebagian perhitungan MNDO gagal untuk mereproduksi ikatan hidrogen dengan benar, memberikan energi terlalu positif untuk molekul yang padat, energi terlalu negatif untuk molekul yang mengandung empat cincin dan memberikan energi aktivasi yang cenderung terlalu besar. Oleh karena itu mereka memodifikasi tolakan inti-inti untuk interaksi N-H dan O-H ke dalam persamaan sebagai berikut (Allinger, 2002):

$$E_N(A,H) = Z_A Z_H (S_A S_A | S_H S_H) \times \left(1 + \frac{\exp(-\alpha_A R_{AH})}{R_{AH}} + \exp(-\alpha_A R_{AH}) \right) + \left(\frac{Z_A Z_H}{R_{AH}} \right) \times \left(\sum_k a k_A \exp[-b_{kA} (R_{AH} - C_{kA})^2] + \sum_K a k_H \exp[-b_{kH} (R_{AH} - C_{kH})^2] \right) \dots \dots \dots (2.14)$$

Dan untuk semua interaksi lainnya sebagai berikut (Allinger, 2002):

$$E_N(A,B) = Z_A Z_B (S_A S_A | S_B S_B) \times \left(1 + \frac{\exp(-\alpha_A R_{AB})}{R_{AB}} + \exp(-\alpha_B R_{AB}) \right) + \left(\frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \right) \times \left(\sum_k a k_A \exp[-b_{kA} (R_{AB} - C_{kA})^2] + \sum_K a k_B \exp[-b_{kB} (R_{AB} - C_{kB})^2] \right) \dots \dots \dots (2.15)$$

Perbedaan dari dua persamaan di atas hanya berbeda pada term terakhir. Istilah tambahan pada tolakan inti-inti AM1 mendefinisikan fungsi Gaussian a, b dan c sebagai parameter yang dapat disesuaikan. AM1 memiliki antara dua hingga empat fungsi Gaussian per atom. Grup Dewar meregenerasi parameter AM1 untuk elemen H, B, C, N, O, F, Al, Si, P, S, Cl, Zn, Ge, Br dan Sn. AM1 memiliki kemampuan untuk mereproduksi ikatan hidrogen dan dapat mengaktivasi energi lebih baik untuk reaksi (Allinger, 2002).

AMBER (Assisted Model Building and Energy Refinement) didasarkan pada medan gaya yang dikembangkan untuk parameter sejumlah sistem organik dan telah banyak digunakan untuk protein dan asam nukleat. AMBER dapat digunakan untuk polimer dan molekul kecil dengan beberapa parameter tambahan. Pada umumnya, AMBER memberikan hasil yang sesuai untuk geometri model fase gas, energi bebas solvasi, frekuensi getaran dan energi konformasi. AMBER menggunakan representasi atom menyatu (united atom) yang berbeda dari semua representasi seluruh atom (all atom) dimana atom hidrogen non polar tidak direpresentasikan secara eksplisit, akan tetapi digabungkan ke dalam deskripsi yang lebih berat dimana atom H itu terikat. Hal tersebut menghasilkan kecepatan tambahan yang signifikan dalam perhitungan menggunakan AMBER dibandingkan menggunakan medan gaya lain (Ramachandran, 2008).

$$V = \sum_{bonds} \frac{k_l}{2} (l - l_0)^2 + \sum_{angles} \frac{k_\theta}{2} (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihedral} \sum_n \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\tau - \gamma)] + \sum_{i < j} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{1}{vdW_{scale}} \sum_{i < j}^{1,4 \text{ terms}} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{H \text{ bonds}} \left[\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right] + \sum_{i < j} \frac{q_j q_i}{\epsilon r_{ij}} + \frac{1}{EE_{scale}} \sum_{i < j}^{1,4 \text{ terms}} \frac{q_j q_i}{Dr_{ij}} \dots\dots\dots(2.16)$$

V merupakan energi potensial. Tiga term pertama menggambarkan interaksi regangan, tekukan dan interaksi ikatan torsional. Term berikutnya dalam persamaan 2.16 secara berturut-turut menggambarkan interaksi antara pasangan atom non ikatan yaitu potensial Lennard Jones 12-6, van der Waals, ikatan hidrogen dan interaksi elektrostatik.

Kondisi simulasi menggunakan metode AMBER adalah sebagai berikut (Allinger, 2002):

1. Konstan, akan membuat konstanta dielektrik menjadi konstan. Keadaan ini merupakan bentuk yang sesuai untuk sistem dalam fasa gas atau dalam pelarut eksplisit. Opsi ini digunakan untuk sistem yang berada dalam kotak periodik.
2. *Distance dependent*, akan membuat konstanta dielektrik sebanding dengan pemisahan interatomik. Hal tersebut mendekati efek pelarut dengan tidak adanya pelarut eksplisit dan memungkinkan untuk perhitungan lebih cepat. Gunakan *distance dependent* pada medan gaya OPLS. Karena opsi ini mensimulasikan keberadaan pelarut, maka biasanya memilih konstan saat ada pelarut.
3. Faktor skala 1-4, menunjukkan interaksi non-terikat (van der Waals dan elektrostatik) antara atom yang dipisahkan oleh tiga ikatan dikalikan dengan faktor ini. Elektrostatik memodifikasi besarnya muatan antara atom yang dipisahkan oleh tiga ikatan. Rentangannya adalah 0 hingga 1, untuk AMBER dan OPLS menggunakan 0,5. Untuk BIO+ menggunakan 1, 0; 0,5 atau 0,4 bergantung pada pengaturan parameter. van der Waals memodifikasi besarnya interaksi van der Waals antara atom yang dipisahkan oleh tiga

ikatan. Rentangannya adalah 0 hingga 1, untuk AMBER menggunakan 0,5; untuk OPLS 0,125; BIO+ nilainya ditetapkan pada rentang 1.

4. Cutoff, menentukan batas jarak untuk menghitung interaksi non ikatan. Memilih kotak periodik pada menu pengaturan secara otomatis mengatur Switched dengan nilai default. Cutoff diperlukan untuk mencegah perhitungan interaksi dengan gambar periodik yang berdekatan.
 - a. None, menghitung semua interaksi non ikatan. None adalah default untuk sistem dalam kondisi hampa. Jangan gunakan opsi ini untuk kondisi batas periodik karena mengakibatkan pemotongan implisit dan menyebabkan diskontinuitas dipermukaan potensial.
 - b. Switched, berfungsi sebagai smoothing, diterapkan dari jari-jari dalam ke jari-jari luar secara bertahap mengurangi interaksi non-ikatan ke nol. Jika sistem molekuler berada dalam kotak periodik, Hyperchem memilih Switched dan mengatur radius luar dan dalam.
 - c. Shifted, berfungsi sebagai smoothing, diterapkan diseluruh jarak non ikatan dari 0 hingga jarak terluar, secara bertahap mengurangi interaksi non ikatan ke nol.
 - d. Jari-jari luar, untuk switched dan shifted, ini merupakan jarak minimum dimana interaksi non ikatan diatur ke nol. Biasanya harus diatur setidaknya 4 \AA lebih besar dari jari-jari dalam.
 - e. Jari-jari dalam, hanya untuk switched, ini merupakan jarak interatomik maksimum untuk interaksi non ikatan penuh. Dengan kondisi batas periodik dengan nilai 4 \AA kurang dari setengah dimensi terkecil dari kotak periodik atau minimum nol.

Perhitungan energi solvasi diperoleh dari perubahan energi dalam suatu sistem yang berubah dari keadaan awal menjadi keadaan akhir. Hukum pertama termodinamika menunjukkan bahwa energi dalam suatu sistem besarnya tetap kecuali jika diubah dengan melakukan kerja atau dengan pemanasan. Jika kalor yang menyertai perubahan pada volume tetap adalah U . Maka pada tekanan tetap, kalor yang diberikan sama dengan perubahan dalam sifat termodinamika yang lain dari sistem yaitu entalpi H . Hal ini dinyatakan dengan (Atkins dan Paula, 2006):

$$H = U + pV \dots\dots\dots(2.17)$$

p merupakan tekanan sistem dan pV adalah sebagian dari definisi H untuk sembarang sistem dan tidak terbatas untuk gas sempurna. Seperti halnya energi dalam, entalpi bergantung pada keadaan sistem, sehingga entalpi merupakan fungsi keadaan (Atkins dan Paula, 2006). Energi solvasi dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Energi Solvasi} = \text{Energi Solut+Solven} - \text{Energi Solven} \dots\dots\dots(2.18)$$

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Februari – September 2018 di Laboratorium Komputasi, Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Kimia Instrumen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, neraca analitik, *magnetic stirrer*, inkubator, desikator, oven, *hotplate*, aluminium foil, kolom kromatografi, statif, bejana pengembang, pipa kapiler, lemari asap, spektrofotometer UV-Vis *Varian Carry*, *Hyperchem* dan LC-MS/MS merk ACELLA tipe 1250.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah fraksi etil asetat alga merah jenis *Eucheuma cottonii* dari penelitian sebelumnya (Isma Mardaneni, 2017). Adapun bahan-bahan kimia yang digunakan adalah, etil asetat *p.a.*, akuades, gas nitrogen, 99% n-heksana, 96% etanol, *glass wool*, silika Gel G-60 (0,063-0,200 mm), plat silika gel F₂₅₄ dan DPPH.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan melalui pengujian eksperimental di laboratorium dan secara *in silico*. Penelitian eksperimen, sampel yang berupa fraksi etil asetat *Eucheuma cottonii* dari penelitian sebelumnya diisolasi dengan kromatografi kolom basah menggunakan gradien eluen campuran n-heksana dan etil asetat 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25 dan 70:30 mL. Kemudian eluat yang didapatkan ditampung dalam botol vial. Fraksi yang didapatkan dimonitoring menggunakan KLT Analitik. Spot yang memberikan perubahan warna hijau menunjukkan aktif steroid. Fraksi yang menghasilkan spot warna sama digabung lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan dialiri gas N₂. Interaksi senyawa aktif steroid *E. cottonii* dengan eluen kromatografi disimulasikan menggunakan simulasi dinamika molekuler 5 molekul steroid yaitu β -sitosterol, stigmasterol, fukosterol, desmosterol dan kampesterol dalam variasi gradien eluen n-heksana : etil asetat yaitu 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25 dan 70:30.

Selanjutnya isolat steroid yang diperoleh dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan berbagai variasi konsentrasi untuk mengetahui tingkat potensi antioksidan melalui nilai EC₅₀ menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Penelitian ini bersifat statistik dimana rancangan percobaan dalam penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktor tunggal yaitu variasi konsentrasi isolat (C) yang terdiri dari 5 tingkat:

C1= 1 ppm

C2= 2 ppm

C3= 3 ppm

C4= 4 ppm

C5= 5 ppm

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Eksperimen :
 - a. Isolasi steroid dengan metode kromatografi kolom dengan variasi gradien eluen
 - b. Monitoring dengan KLTA
 - c. Uji aktivitas antioksidan hasil isolat steroid menggunakan metode DPPH
 - d. Identifikasi menggunakan LC-MS/MS
2. *In silico* : Simulasi dinamika molekuler
3. Analisa data

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Eksperimen

- a. **Isolasi Senyawa Steroid dengan Metode Kromatografi Kolom Basah (Kusmiyati, dkk., 2011)**

Fraksi etil asetat dari penelitian sebelumnya dikromatografi kolom menggunakan fase diam silika Gel 60 sebanyak 10 gram diaktivasi dengan pemanasan oven selama 2 jam pada suhu 110°C, kemudian didinginkan di dalam desikator selama 15 menit. Kolom mula-mula diisi *glasswool* pada bagian bawah. Kemudian pembuatan bubuk silika dibuat dengan ditambahkan sedikit demi sedikit dan diaduk menggunakan *magnetic stirer* di atas *hot plate* sampai terbentuk suspensi dan tidak ada gelembung udara. Suspensi tersebut kemudian

dimasukkan ke dalam kolom menggunakan corong. Dinding kolom diketuk-ketuk agar terbentuk adsorben yang benar-benar mampat. Adsorben dipastikan telah masuk semua ke dalam kolom dan didiamkan selama 24 jam. Setelah itu pelarut dikeluarkan dengan cara dibuka kran, sampai mendekati batas adsorben (1,5 cm diatas fase diam) lalu ditutup kembali kran pada kolomnya.

Sampel sebanyak 0,067 gram dilarutkan dalam 1 mL eluen dan dimasukkan ke dalam kromatografi kolom menggunakan pipet dan ditunggu hingga sampel turun. Selanjutnya ditambahkan eluen n-heksana : etil asetat dengan perbandingan gradien eluen dari perbandingan 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25 dan 70:30 mL. Kran dibuka dengan kecepatan alir diatur 2 mL/menit dan dilakukan elusi kemudian eluat ditampung setiap 2 mL dalam botol vial hingga didapatkan kurang lebih 300 vial. Proses elusi dilakukan dengan menjaga agar silika gel dalam kolom selalu terendam eluen.

b. Monitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) (Kristanti, dkk., 2008)

Setelah didapatkan beberapa fraksi dari kromatografi kolom pengisian cara basah dilakukan identifikasi atau monitoring I dengan cara diambil tiap 5 vial yaitu vial ke 5, 10, 15, 20, 25 sampai vial terakhir. Eluen yang digunakan sebagai fasa gerak adalah pelarut campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17 : 3 dan digunakan silika gel F₂₅₄ dengan ukuran 10x10 cm. Eluen disiapkan dengan dimasukkan campuran fasa gerak ke dalam bejana pengembang lalu dijenuhkan selama 1 jam. Plat silika gel ditandai 1 cm pada batas atas dan bawah, lalu diaktivasi dengan dioven pada suhu 110 °C selama 30 menit. Fraksi ditotolkan pada silika gel yang telah diaktivasi menggunakan pipa kapiler dengan

jarak 0,5 cm setiap vial. Setelah selesai penotolan, dimasukkan plat tersebut ke dalam eluen yang telah dijenuhkan dan dielusi sampai tanda batas atas. Kemudian diamati noda yang terbentuk menggunakan lampu UV 366 nm. Selanjutnya ditandai spot yang terlihat berwarna hijau dan dihitung nilai Rf-nya. Fraksi yang memiliki noda yang sama atau mirip dijadikan satu fraksi yang besar. Kelompok fraksi dari monitoring I dimonitoring kembali dengan cara diambil tiap 2 vial.

Spot yang dihasilkan dari KLTA yang berwarna hijau atau biru menunjukkan positif steroid. Fraksi yang menunjukkan hasil positif steroid dengan nilai Rf yang sama digabungkan menjadi fraksi besar. Kemudian, fraksi dipisahkan dengan *rotary evaporator vacum* lalu dialiri gas N₂.

c. Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan DPPH

1) Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 mL dimasukkan dalam tabung reaksi. Ditambahkan 3 mL etanol lalu didiamkan selama 10 menit. Kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan ditentukan panjang gelombang optimumnya larutan dan dicatat hasil pengukuran panjang gelombang maksimum untuk digunakan pada tahap selanjutnya.

2) Pengukuran Potensi Antioksidan Pada Sampel

a. Absorbansi kontrol: Larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 mL dimasukkan dalam tabung reaksi. Ditambahkan 3 mL pelarut yang digunakan pada ekstrak, tabung ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi pada suhu 37°C selama waktu kestabilan yaitu 30 menit. Setelah itu larutan dimasukkan ke dalam kuvet hingga penuh dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang yang telah diperoleh.

b. Sampel dilarutkan dalam etanol dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm. Masing-masing dimasukkan dalam tabung reaksi berbeda dan tiap tabung diisi 3 mL ekstrak serta ditambahkan DPPH sebanyak 1 mL (perbandingan larutan DPPH : ekstrak yang dilarutkan dengan konsentrasi tertentu 1:3). Perlakuan tersebut sebanyak 3 kali, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C pada waktu kestabilan 30 menit. Kemudian dimasukkan ke dalam kuvet sampai penuh untuk mengukur absorbansinya pada masing-masing konsentrasi dengan panjang gelombang yang telah diperoleh. Data adsorbansi pada tiap konsentrasi masing-masing ekstrak dihitung nilai % aktivitas antioksidannya. Nilai tersebut diperoleh dengan menggunakan rumus (2.1).

Setelah didapatkan % aktivitas antioksidan, selanjutnya masing-masing ekstrak dihitung nilai EC_{50} dengan memperoleh persamaan regresi non linier menggunakan program *GraphPad prism7 software, regression for analyzing dose-response data*.

c. Perbandingan asam askorbat (vitamin C) dan BHT: diperlakukan seperti sampel akan tetapi sampel diganti dengan larutan asam askorbat (vitamin C) dan BHT.

d. Identifikasi menggunakan LC-MS/MS

Isolat steroid dengan aktivitas antioksidan terbaik dianalisis menggunakan LC-MS/MS. Kolom yang digunakan dengan spesifikasi *Hypersil Gold* (50 mm x 2,1 mm x 1,9 μ m). HPLC merk *ACELLA type 1250* buatan *Thermo Scientific* yang terdiri dari degasser vakum, pompa quartener, autosampler termostatik dikendalikan oleh personal komputer melalui program *x-calibur 2.1*. Fase gerak yang digunakan adalah 0,1% asam format dalam air (fase A) dan 0,1% asam format dalam asetonitril (fase B). Pengaturan fase gerak secara gradien linier yaitu

pada menit 0,6 - 4 perbandingan 90% (B) : 10% (A), menit 4 - 4,5 perbandingan 90% (B) : 10% (A), dan menit 4,5 – 6 perbandingan 50% (B) : 50% (A). Volume injeksi pada LC adalah 2 μ l. Kolom dikontrol pada 30°C dan kompartemen autosampler ditetapkan untuk 10°C.

Analisis massa yang digunakan adalah MS/MS Triple Q (*Quadrupole*) spektrometer massa TSQ QUANTUM ACCESS MAX dari Thermo Finnigan dengan metode SRM (*Selected Reaction Monitoring*) dan sumber ionisasi APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) dikendalikan oleh software TSQ Tune yang dioperasikan dengan mode positif.

3.5.2 Simulasi Dinamika Molekuler (DM) 5 Molekul Steroid *E. cottonii* dalam Variasi Gradien Eluen

Meneliti perubahan-perubahan yang terkait dengan energi interaksi sepanjang simulasi dinamika molekul β -sitosterol, stigmasterol, fukosterol, desmosterol dan kampesterol dalam variasi gradien eluen n-heksana : etil asetat yaitu 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25 dan 70:30.

Simulasi dilakukan menggunakan modul simulasi dinamika molekuler yang tersedia pada program Hyperchem. Molekul dimasukkan dalam kotak molekul eluen ter-preequilibrasi kubik. Panjang sisi kotak dipilih sebesar 38 Å. Simulasi DM dilakukan menggunakan medan gaya Amber, model eluen menggunakan geometri n-heksana dan etil asetat teroptimasi semiempirik AM1, suhu konstan pada suhu ruang (298 K) dan tekanan konstan (1 atm) dengan langkah waktu (time step) 2 fs. Runding dihentikan setelah 20 ns atau sebelum

jarak antar molekul melebihi 30 Å. Koordinat Cartesian disimpan setiap 4 ps sepanjang trajektori.

3.6 Analisa Data

Penelitian aktivitas antioksidan dihitung menggunakan persen (%) aktivitas antioksidan yang diperoleh dari data absorbansi dari masing-masing konsentrasi. Setelah didapatkan data persen (%) aktivitas antioksidan pada masing-masing absorbansi sampel dan pembanding. Kemudian dilakukan perhitungan nilai EC_{50} dengan menggunakan persamaan regresi non linier yang menyatakan hubungan antara log konsentrasi dengan (%) aktivitas antioksidan. Kemudian dibandingkan nilai EC_{50} yang diperoleh, yang memiliki nilai EC_{50} paling rendah menunjukkan kemampuan aktivitas antioksidan paling rendah.

Pada simulasi dinamika molekuler energi sistem diambil dari rerata energi sistem disepanjang simulasi pada saat keadaan keseimbangan. Rerata energi dikarakterisasikan dengan nilai standar deviasi. Energi interaksi dalam hal ini adalah energi solvasi dihitung dengan menggunakan rumus (2.18). Energi solvasi dari masing-masing senyawa aktif steroid dalam setiap eluen dibandingkan untuk melihat preferensi solvasi solut dalam setiap solven. Pemisahan senyawa oleh solven tertentu akan menjadi baik jika energi solvasi dari masing-masing senyawa berjarak cukup jauh. Hasil simulasi dikonfirmasi dengan hasil kromatografi gradien eluen.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemisahan steroid menggunakan kromatografi kolom dengan variasi gradien eluen dilakukan secara eksperimen dan *in silico*. Pemisahan steroid secara eksperimen dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom dengan variasi gradien eluen yang berupa n-heksana dan etil asetat. Hasil pemisahan steroid secara eksperimen diuji bioaktivitasnya yaitu antioksidan dari isolat steroid fraksi etil asetat makroalga *Eucheuma cottonii*. Isolat steroid yang memiliki aktivitas antioksidan terbaik, diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS untuk mengetahui jenis steroid. Sedangkan penelitian secara *in silico* dilakukan dengan mensimulasikan kelima jenis steroid pada masing-masing variasi gradien eluen. Simulasi yang dilakukan secara *in silico* yaitu simulasi dinamika molekuler. Dimana hasil simulasi nantinya akan memvalidasi dan/atau memprediksi dari hasil pemisahan secara eksperimen.

4.1 Isolasi Senyawa Steroid dengan Metode Kromatografi Kolom Basah

Penelitian secara eksperimen yang dilakukan dengan isolasi untuk memperoleh senyawa steroid yang terdapat pada fraksi etil asetat makroalga *Eucheuma cottonii* menggunakan kromatografi kolom basah. Penelitian ini menggunakan variasi gradien eluen yang bertujuan untuk memperoleh senyawa yang terisolasi sesuai dengan kepolaran variasi gradien eluennya. Adapun variasi gradien eluen yang digunakan yaitu n-heksana : etil asetat 95:5; 90:10; 85:15; 80:20, 75:25; 70:30 mL. Isolasi dengan kromatografi kolom berdasarkan pada dua fase, yaitu fase diam berupa silika gel dan fase gerak berupa eluen n-heksana dan

etil asetat. Pemilihan fase diam silika gel dikarenakan ukurannya yang kecil sehingga mampu memberikan luas permukaan yang besar untuk bisa berinteraksi lebih kuat dengan senyawa polar. Ukuran silika gel yang digunakan adalah 60 mesh (0,063-0,200 mm) bertujuan untuk menyeragamkan ukuran partikel silika gel. Menurut Wonorahardjo (2013) ukuran partikel fase diam dapat mempengaruhi jarak elusi molekul sepanjang kolom. Apabila ukuran partikel dalam kolom tidak seragam, maka jarak yang ditempuh oleh molekul juga tidak seragam. Sehingga mengakibatkan waktu yang berbeda pada saat molekul sampai diujung kolom. Dikarenakan ada sebagian molekul yang masih tertinggal dan menghasilkan pemisahan yang kurang baik.

Aktivasi silika gel bertujuan untuk mengaktifkan gugus hidroksil (-OH) dan menguapkan air yang terdapat pada silika gel. Sehingga gugus hidroksil pada silika gel menjadi aktif dan dapat membentuk ikatan hidrogen yang kuat dengan senyawa yang akan dipisahkan (Noviyanti, 2010). Proses pembuburan pada metode kromatografi kolom basah bertujuan untuk menghomogenkan silika gel dengan eluen n-heksana : etil asetat dan dihomogenkan menggunakan stirer magnetik. Bubur silika dimasukkan ke dalam kolom dan dimampatkan dengan dikocok perlahan. Pengocokan di dalam kolom bertujuan untuk menghindari terbentuknya gelembung udara atau rongga-rongga pada kolom. Perlakuan pendiaman bubur silika dalam kolom selama 24 jam digunakan untuk menghasilkan kerapatan fase diam yang lebih baik. Dikarenakan semakin rapat fase diam maka semakin kuat daya serap suatu komponen.

Proses isolasi menggunakan sistem gradien eluen yaitu dengan memakai variasi eluen yang berbeda dari awal sampai akhir. Penampungan eluat dilakukan

setiap 2 mL/menit agar meminimalkan bercampurnya kembali senyawa yang telah terpisah dari kolom. Proses isolasi senyawa steroid menggunakan variasi gradien eluen disajikan pada Lampiran 8.

Proses isolasi dimulai dari eluen pertama n-heksana : etil asetat 95:5 mL, ketika eluen pertama akan habis ditambahkan eluen kedua 90:10 mL dan begitu selanjutnya sampai eluen terakhir 70:30 mL. Jumlah eluat tertampung diperoleh dari enam variasi gradien eluen sebanyak 295 vial.

4.1.1 Monitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik

Eluat yang diperoleh dari kromatografi kolom basah dimonitoring dengan KLT Analitik. Monitoring bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengelompokkan senyawa yang telah terpisah dari isolasi menggunakan kromatografi kolom. Pengelompokkan senyawa dilakukan dengan melihat warna noda yang terbentuk antar vial dan melihat nilai R_f. Apabila warna noda yang terbentuk antar vial sama dengan nilai R_f, maka dapat dikelompokkan menjadi satu kelompok menjadi gabungan fraksi yang lebih besar. Sebagian eluat dimonitoring pada *range* per 5 vial yaitu 1, 5, 10, 15, 20, 25 sampai 295 dengan cara menotolkan eluat ke plat KLT dan dielusi dengan eluen (17:3). Pengamatan noda dilakukan di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm dikarenakan steroid dapat berfluoresensi pada panjang gelombang tersebut sehingga mampu menghasilkan warna seperti pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil KLTA isolat kromatografi kolom

Spot-spot yang terlihat, selanjutnya dikelompokkan berdasarkan warna dan Rf-nya. Spot yang menunjukkan warna hijau atau biru dikelompokkan sebagai senyawa steroid. Dan spot yang menunjukkan warna merah atau ungu dikelompokkan sebagai senyawa triterpenoid (Ismarti, 2011). Hasil monitoring fraksi kromatografi kolom variasi gradien eluen ditunjukkan pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Pengelompokkan fraksi hasil isolasi kromatografi kolom basah

Isolat	Fraksi	Warna (UV)	Senyawa	Rf	Rendemen (%)
1	1-14	-	-	-	8,06
2	15-41	Biru	Steroid	0,8125	4,63
3	42-53	Biru	Steroid	0,7875	0,89
4	54-64	Hijau	Steroid	0,4625	0,45
5	65-86	Hijau	Steroid	0,325	6,27
6	87-100	Merah	Tritepenoid	0,2625	1,79
7	101-165	Merah	Tritepenoid	0,2625	4,63
		Merah	Tritepenoid	0,175	4,63
8	166-195	Merah	Tritepenoid	0,175	3,13
9	196-295	Merah	Tritepenoid	0,025	6,27

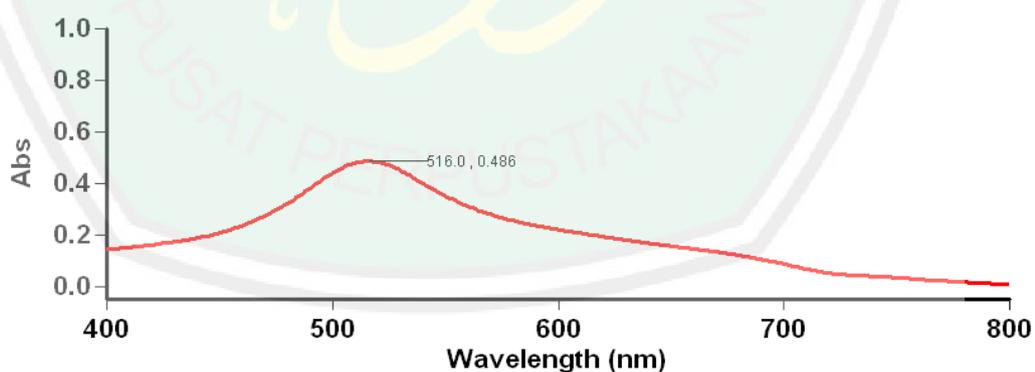
Berdasarkan hasil monitoring fraksi hasil kromatografi kolom menggunakan KLT Analitik pada Tabel 4.1 dapat diketahui bahwa terdapat spot berwarna hijau yang menunjukkan senyawa tersebut adalah steroid. Senyawa steroid tunggal terdapat pada empat fraksi yang berbeda yaitu pada fraksi 15-41, 42-53, 54-64 dan 65-86. Perbedaan nilai Rf dari masing-masing fraksi dikarenakan terdapat perbedaan struktur dan kepolaran senyawa terhadap fase gerak dan fase diam. Senyawa yang mempunyai nilai kepolaran yang kecil akan kurang bertahan dalam fase diam sehingga nilai Rf dari senyawa tersebut besar. Sedangkan senyawa yang memiliki nilai kepolaran yang besar akan lebih tertahan dalam fase diam sehingga mempunyai nilai Rf yang kecil. Isolat hasil pemisahan menggunakan kromatografi kolom yang menunjukkan senyawa steroid, selanjutnya diuji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.

4.1.2 Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Pengujian antioksidan dengan metode DPPH diawali melalui penentuan panjang gelombang maksimum. Penentuan panjang gelombang maksimum bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang yang mempunyai serapan tertinggi. Pengukuran sampel dilakukan pada panjang gelombang maksimum untuk memaksimalkan kepekaan DPPH dan meminimalkan kesalahan (Rohman dan Gandjar, 2007).

Kuntorini dan Astuti (2010), Wulansari dan Chairul (2011) telah melaporkan bahwa larutan DPPH memiliki panjang gelombang maksimum sebesar 515 nm, 516 nm dan 519 nm. Hasil penentuan panjang gelombang maksimum DPPH 0,2 mM diperoleh sebesar 516,0 nm. Hasil spektra UV-Vis larutan DPPH ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Hasil spektra UV-Vis larutan DPPH

Pengukuran panjang gelombang maksimum bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang yang memiliki serapan tertinggi pada 516,0 nm dengan absorbansi 0,486. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh, selanjutnya

digunakan untuk uji aktivitas antioksidan pada isolat senyawa steroid hasil kromatografi kolom fraksi etil asetat makroalga *Eucheuma cottoni*.

b. Pengukuran Potensi Antioksidan pada Sampel

Pengujian aktivitas antioksidan pada isolat senyawa steroid hasil kromatografi kolom dengan variasi konsentrasi 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm dan diukur serapannya pada panjang gelombang 516 nm. Pembuatan larutan DPPH dibuat dalam keadaan baru dengan konsentrasi 0,2 Mm.

Absorbansi kontrol dan absorbansi isolat yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menentukan persen aktivitas antioksidan. Larutan kontrol berfungsi untuk menentukan absorbansi radikal DPPH sebelum direduksi oleh sampel. Selisih absorbansi kontrol dengan absorbansi sampel yang telah direduksi DPPH merupakan sisa radikal DPPH yang terbaca pada spektrofotometer UV-Vis (Arindah, 2010). Persen aktivitas antioksidan menunjukkan kemampuan antioksidan untuk menghambat radikal bebas dalam bentuk persen. Persen aktivitas antioksidan menunjukkan banyaknya atom Hidrogen dari senyawa antioksidan yang menangkap radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine*) (Rahayu, 2010). Pengukuran aktivitas antioksidan yang dilakukan menghasilkan gradasi warna menjadi ungu muda dan ada beberapa yang memberikan perubahan warna kuning. Hasil data EC₅₀ aktivitas antioksidan isolat steroid ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Nilai EC₅₀ aktivitas antioksidan isolat steroid

Sampel	EC₅₀ (ppm)
Isolat 2	20,92
Isolat 3	-
Isolat 4	-
Isolat 5	5,146

Berdasarkan Tabel 4.2 menunjukkan bahwa isolat steroid fraksi etil asetat makroalga *Eucheuma cottonii* pada isolat 2 dan 5 memiliki kemampuan aktivitas antioksidan untuk menghambat radikal bebas. Sedangkan pada isolat 3 dan 4 tidak memiliki kemampuan aktivitas antioksidan. Hal tersebut dikarenakan isolat 3 dan 4 pada larutan DPPH secara visual terlihat berwarna ungu seperti warna larutan kontrolnya dan terkonfirmasi tidak terdeteksi nilai EC_{50} . Selain itu, diduga pada isolat 3 dan 4 senyawa steroid belum terambil semua oleh gradien eluen. Isolat steroid kelima memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik daripada isolat steroid kedua ditunjukkan dengan nilai EC_{50} yang lebih tinggi yaitu 5,146 ppm. Semakin kecil nilai EC_{50} maka aktivitas antioksidan pada suatu sampel semakin kuat. Hasil isolasi steroid fraksi etil asetat makroalga *Eucheuma cottonii* menggunakan kromatografi kolom pada masing-masing gradien eluen ditunjukkan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil isolasi steroid pada masing-masing gradien eluen

Eluen	Isolat	Senyawa	EC_{50}
95: 5	1	-	NA
95:5	2	Steroid	20,92
95:5	3	Steroid	-
95:5; 90:10	4	Steroid	-
90:10	5	Steroid	5,146
90:10	6	Tritenoid	NA
85:15; 80:20	7	Tritenoid	NA
		Tritenoid	NA
80:20; 75:25	8	Tritenoid	NA
75:25; 70:30	9	Tritenoid	NA

NA : *Not Available*

Pengujian antioksidan pada sampel dibandingkan dengan aktivitas antioksidan asam askorbat dan BHT. Penelitian Rahmawati (2016) pada pembandingan asam askorbat dan BHT menghasilkan EC_{50} secara berturut-turut sebesar 3,87 ppm dan 4,207 ppm. Perbandingan ini dilakukan guna untuk mengetahui seberapa kuat potensi antioksidan pada sampel jika dibandingkan dengan antioksidan sintetik yang sering digunakan. Pembandingan asam askorbat dan BHT mempunyai potensi antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan isolat steroid dari nilai EC_{50} aktivitas antioksidan yang sudah dihitung. Penelitian Yanuarti (2017) tentang antioksidan fenolik pada rumput laut *Eucehuma cottonii* yang diekstrak dengan etil asetat memiliki aktivitas antioksidan yang lemah dengan nilai IC_{50} 594,68 ppm dibandingkan dengan ekstrak metanol sebesar 23,15 ppm. Penelitian Mardiyah (2014) bahwasannya aktivitas antioksidan tertinggi hasil partisi *Eucheuma spinosum* pada fraksi petroleum eter 12,65 ppm diikuti oleh fraksi kloroform 19,23 ppm, metanol 22,13 ppm, etil asetat 41,94 ppm, 1-butanol 73,02 ppm dan n-heksana 80,32 ppm. Hasil penelitian Lailah (2014) mengenai aktivitas antioksidan fraksi etil asetat *Sargassum cristaefolium* diperoleh nilai EC_{50} sebesar 53,08 ppm. Sedangkan Dinasti (2016) meneliti aktivitas antioksidan hasil isolasi KLTP senyawa steroid fraksi etil asetat *Chlorella sp* diperoleh nilai EC_{50} sebesar 77,78 ppm. Setelah mengetahui nilai EC_{50} aktivitas antioksidan pada isolat senyawa steroid hasil kromatografi kolom fraksi etil asetat makroalga *Eucheuma cottoni*. Isolat yang memiliki nilai EC_{50} terbaik dalam menangkal radikal bebas selanjutnya diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS yaitu isolat 5 sebesar 5,146 ppm.

4.1.3 Identifikasi Senyawa Steroid dengan LC-MS/MS

Identifikasi menggunakan LC-MS/MS bertujuan untuk mengetahui jenis senyawa steroid pada hasil isolat kromatografi kolom fraksi etil asetat makroalga *Eucheuma cottoni*. Hasil kromatogram isolat steroid 5 ditunjukkan pada Gambar 4.3. Jenis senyawa steroid yang ditargetkan berjumlah 9 yaitu β -sitosterol, kampesterol, desmosterol, fukosterol stigmasterol, eritrodiol, ergosterol, brassicasterol dan lupeol. Akan tetapi hasil identifikasi dari kesembilan senyawa yang ditargetkan hanya muncul lima jenis senyawa steroid antara lain β -sitosterol, kampesterol, desmosterol, fukosterol dan stigmasterol. Hasil identifikasi LC-MS/MS isolat steroid fraksi etil asetat makroalga *Eucheuma cottonii* pada Tabel 4.4.

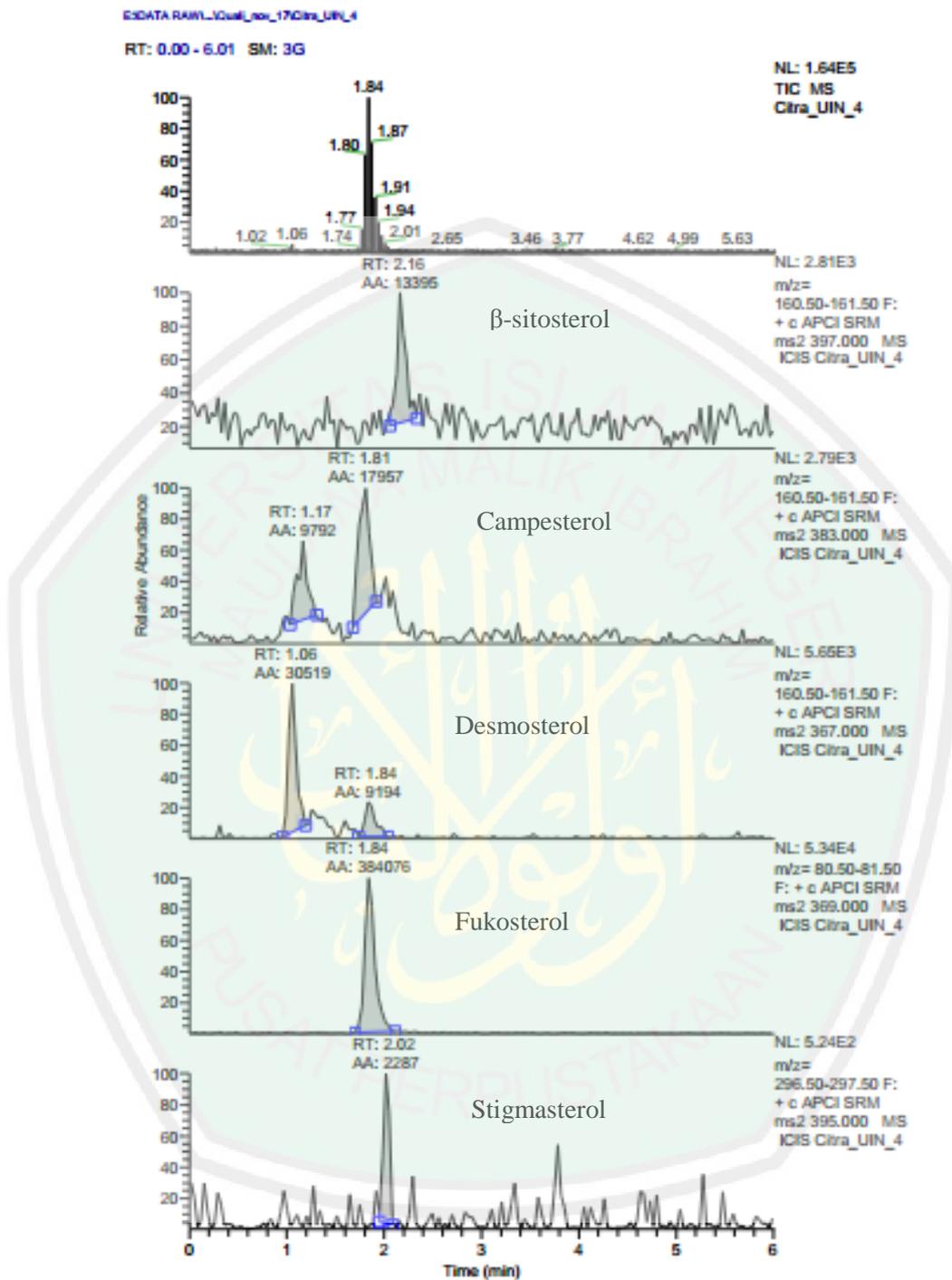
Tabel 4.4 Hasil identifikasi LC-MS/MS isolat steroid kelima

Jenis steroid	<i>Time retention</i> (min)	<i>Automatic Area</i>	M (g/mol)	<i>Parent mass</i> (m/z)	<i>Daughter mass</i> (m/z)
<i>Fukosterol</i>	1,84	384.076	386	369	80,5-81,5
Desmosterol	1,06	30.519	384	367	160,5-161,5
Kampesterol	1,81	17.957	400	383	160,5-161,5
β -sitosterol	2,16	13.395	414	397	160,5-161,5
Stigmasterol	2,02	2.287	412	395	296,5-297,5
Eritrodiol	-	-	442	425,4*	217,3*
Ergosterol (24- methylene- ergosta-5-en- 3 β -ol)	-	-	398	379*	145*
Brassicasterol	-	-	-	381**	297**
Lupeol	-	-	426	409***	109,1***

*Pereira, 2016

**Mo, 2013

***Gobo, 2016



Gambar 4.3 Kromatogram LC-MS/MS isolat 5 hasil kromatografi kolom

Berdasarkan Tabel 4.4 dapat diketahui kepolaran jenis senyawa steroid ditinjau dari waktu retensi yang diperoleh. Semakin tinggi waktu retensi yang dihasilkan maka semakin non polar senyawa tersebut, begitu juga sebaliknya. Sehingga senyawa steroid yang bersifat non polar menuju polar yaitu β -sitosterol, diikuti dengan stigmasterol, fukosterol, kampesterol dan desmosterol. Selain kepolaran dapat juga diketahui kelimpahan relatif dari jenis senyawa steroid berdasarkan *automatic area* yang diperoleh. Sehingga kelimpahan relatif dari yang terbesar secara berurutan yaitu fukosterol, desmosterol, kampesterol, β -sitosterol dan stigmasterol. Sampel dianalisis menggunakan metode MS/MS yang hanya mendeteksi senyawa yang ditargetkan. Pada proses ionisasi, ion yang terdeteksi pada MS mode positif dalam bentuk ion prekursor atau yang disebut *parent mass* dan pada MS kedua akan menghasilkan bentuk ion produk sebagai *daughter mass*.

Allah SWT telah menciptakan beraneka macam tumbuh-tumbuhan yang baik di bumi, yang menunjukkan keagungan Allah dan segala kekuasaan-Nya (Ash-Shiddieqy, 2000). Segala sesuatu yang telah diciptakan-Nya tidak ada yang sia-sia. Allah SWT menciptakan sesuatu akan ada manfaatnya termasuk makroalga *Eucheuma cottonii* yang merupakan salah satu tumbuhan baik yang bisa digunakan. Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan *Eucheuma cottonii* berpotensi sebagai antioksidan, antikanker dan antibakteri. Sebagaimana firman Allah SWT dalam surat ad Dukhaan (44): 38:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا لَاعِبِينَ ۝

“Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya dengan bermain-main”

Berdasarkan tafsir al Muyassar surat ad Dukhaan (44): 38 ini menjelaskan bahwa Allah SWT tidak menciptakan langit dan bumi kecuali dengan kebenarannya dari segi penciptaan maupun pengaturannya. Sehingga bagi para orang mukmin segala apa yang telah diciptakan Allah SWT merupakan lahan perenungan dan pemikiran untuk menggali lebih dalam tentang kekuasaannya. Terlebih bagi manusia yang berakal agar dapat menggali berbagai potensi dari ciptaan Allah untuk dibuktikan kebenarannya melalui ilmu pengetahuan atau penelitian, baik yang ada di langit, bumi dan diantara keduanya. Salah satu diantaranya adalah yang berada di bumi yaitu penciptaan tumbuhan air seperti makroalga (al Qarni, 2007).

Allah SWT menciptakan segala sesuatu yang berada di bumi tidak ada yang main-main. Akan tetapi, semua yang telah diciptakan terdapat hikmah yang agung dan tujuan yang mulia (al Qarni, 2008). Allah SWT menciptakan makroalga *Eucheuma cottonii* mempunyai berbagai manfaat salah satunya dalam bidang kesehatan yaitu sebagai obat. Obat merupakan salah satu alternatif untuk menyembuhkan penyakit, Allah SWT maha adil dikarenakan memberikan suatu penyakit beserta obatnya. Suatu penyakit akan sembuh sesuai dengan kehendak Allah SWT (Fattah, 2010). Manusia diperuntukkan untuk mempelajari banyak ilmu pengetahuan yang akan menuntunnya mendapatkan obat-obat yang diperlukan baik alami ataupun sintetik. Manusia akan memperoleh pemanfaatan tumbuhan sebagai obat dengan usaha mengembangkan ilmu pengetahuan.

Penelitian untuk memperoleh manfaat dari makroalga *Eucheuma cottonii* merupakan salah satu bentuk dari usaha untuk mendapatkan bukti atas apa yang telah diberikan oleh Allah SWT. Pada makroalga *Eucheuma cottonii* mengandung

senyawa steroid. Senyawa steroid dipisahkan menggunakan kromatografi kolom dengan variasi gradien eluen. Isolat steroid hasil kromatografi kolom diuji bioaktivitasnya sebagai antioksidan terhadap DPPH dan mempunyai nilai aktivitas antioksidan yang cukup baik dengan nilai EC_{50} 5,146 ppm dan 20,92 ppm. Sehingga potensi makroalga *Eucheuma cottonii* sebagai bahan obat alami membuktikan bahwa makroalga yang tumbuh di perairan juga memiliki manfaat bagi manusia.

4.2 Simulasi Dinamika Molekuler 5 Molekul Steroid *Eucheuma cottonii* dalam Variasi Gradien Eluen

Penelitian secara *in silico* yang dilakukan pada 5 molekul steroid *Eucheuma cottonii* dalam variasi gradien eluen bertujuan untuk mengetahui profil energi potensial interaksi molekuler antara senyawa steroid dengan eluen dalam metode variasi gradien eluen. Metode yang digunakan pada tahapan *in silico* merupakan simulasi dinamika molekuler (DM). Metode simulasi DM merupakan salah satu metode komputasi fisika yang populer untuk mensimulasikan gerak atom, molekul dan obyek berukuran besar (Widiasih, 2013). Energi potensial interaksi molekuler dapat menghasilkan energi bernilai positif atau negatif. Apabila energi potensial interaksi molekuler bernilai positif menandakan sifat interaksi tolak menolak antara steroid dengan eluen. Sedangkan energi potensial bernilai negatif menandakan terjadinya interaksi tarik menarik antara solven dan solut. Suatu sistem akan selalu cenderung menuju keadaan yang paling stabil, yaitu keadaan dengan energi minimum. Simulasi DM dilakukan untuk

memperoleh sifat-sifat sistem dalam keadaan stabilnya (keadaan keseimbangan) dengan menggunakan program Hyperchem.

Tahapan simulasi DM diawali dengan membangun model molekul eluen yaitu n-heksana dan etil asetat. Kemudian membangun lima model molekul jenis steroid yaitu β -sitosterol, kampesterol, desmosterol, fukosterol dan stigmasterol. Pembangunan model eluen, dilakukan dengan menggambarkan struktur 3D masing-masing kedua eluen tersebut. Model molekul kedua eluen dan kelima jenis steroid masing-masing strukturnya dioptimasi menggunakan metode AM1 dan disimpan dengan file HIN. Syarat batas konvergensi yaitu *convergence limit* 0,01, *iteration limit* 50, *total charge* 0, *spin multiplicity* 1, *spin pairing* RHF dan *state lowest*. Model molekul 3D lima jenis steroid di ambil dari file SDF yang terdapat di *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/222284#section=3D-Conformer>. Selanjutnya mengonversi file SDF ke file PDB dengan bantuan *software Open Bable GUI* di *download* pada <https://sourceforge.net/projects/openbabel/>, hasil konversi file PDB dibuka pada Hyperchem.

Tahapan kedua yaitu membuat periode *box* untuk menghindari efek permukaan pada batas sistem yang disimulasikan. Panjang sisi kotak simulasi dipilih sebesar 38 Å. Hal tersebut dikarenakan Hyperchem merekomendasikan dimensi besarnya kotak minimal dua kali dari dimensi terpanjang molekul solut (Allinger, 2002). Pengecekan dimensi terpanjang pada molekul solut dengan cara memilih (*select*) dua atom terujung yang memiliki jarak terjauh dan kemudian akan muncul jarak antara kedua atom tersebut pada status bar. Hasil dimensi terpanjang dari molekul solut terdapat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Panjang dimensi terpanjang molekul jenis steroid

Jenis Steroid	Panjang dimensi
β -sitosterol	17,8628Å
Desmosterol	17,0823Å
Fukosterol	16,6379Å
Kampesterol	17,8226Å
Stigmasterol	17,0808Å

Berdasarkan hasil panjang dimensi terpanjang, dapat disimpulkan bahwa panjang dimensi terpanjang terdapat pada β -sitosterol. Sehingga hasil panjang dimensi terpanjang dibulatkan menjadi 19 Å dan dibuat besarnya kotak dua kali panjang dimensi terpanjang tersebut menjadi 38 Å. Kotak simulasi dalam Hyperchem dengan panjang sisi kotak 38 Å secara *default* akan berisikan 1.813 molekul H₂O. Seluruh molekul H₂O tersebut dihapus dan digantikan oleh molekul eluen yaitu n-heksana dan etil asetat sesuai model masing-masing variasi gradien eluen. Geometri n-heksana dan etil asetat yang digunakan adalah geometri yang sudah teroptimasi semi empirik AM1.

Metode semi empiris merupakan jenis perhitungan kimia mekanika kuantum yang menggunakan parameter yang berasal dari eksperimen untuk menyederhanakan dalam proses perhitungan. Metode AM1 pada umumnya memiliki keakuratan paling tinggi dalam Hyperchem dibandingkan dengan metode semi empiris lainnya. Metode ini berguna untuk molekul organik yang mengandung unsur-unsur dari baris 1 dan 2 pada tabel periodik akan tetapi bukan logam transisi. Selain itu AM1 mampu menghitung sifat elektronik, mengoptimalkan geometri, energi total dan panas pembentukan (Allinger, 2002).

Penentuan jumlah molekul n-heksana dan etil asetat pada variasi gradien eluen diperoleh dari perhitungan *volume* periode *box* yang dibutuhkan, berat jenis

masing-masing eluen dan berat molekuler kedua eluen, seperti pada persamaan 2.12. Jumlah masing-masing molekul eluen dalam setiap kotak simulasi pada variasi gradien eluen ditunjukkan pada Tabel 4.6. Langkah optimasi kotak simulasi dimulai dari pemasukan jumlah masing-masing eluen. Pemasukan molekul eluen dalam kotak simulasi dilakukan secara bertahap. Hal tersebut dikarenakan untuk mempermudah tercapainya konfigurasi teroptimasi partikel-partikel dalam kotak simulasi. Artinya tidak ada molekul yang saling tumpang tindih yang mengakibatkan konfigurasi energi tinggi. Mula-mula jumlah molekul n-heksana dalam periode *box* dimasukkan hingga 30 molekul. Kemudian dilakukan geometri optimasi menggunakan metode Amber. Metode Amber baik digunakan untuk interaksi molekuler dengan parameter yang tidak terkait dengan partikel elektronik. Kondisi simulasi adalah sebagai berikut, dielektrik dibuat konstan, faktor skala interaksi 1-4 dibuat menjadi 0,05 dan limit konvergensi 0,01. Konfigurasi partikel dalam kotak simulasi teroptimasi ini diperbanyak lagi menjadi dua kalinya (30 molekul n-heksana dikali dua) dan dilakukan kembali geometri optimasi sampai diperoleh energi minimum. Setiap penambahan molekul disimpan dengan nama jumlah molekul yang ditambahkan. Prosedur memperbanyak molekul dan optimasi geometri diatas, dilakukan sampai sejumlah molekul yang diinginkan. Prosedur pemasukan jumlah molekul n-heksana berlaku juga pada pemasukan jumlah molekul etil asetat.

Tabel 4.6 Jumlah molekul eluen pada variasi gradien eluen

Variasi gradien eluen (n-heksana:etil asetat)	Jumlah molekul n-heksana	Jumlah molekul etil asetat	Total molekul eluen
95 : 5	237	22	259
90 : 10	221	44	265
85 : 15	205	64	269
80 : 20	191	84	275
75 : 25	175	104	279
70 : 30	161	123	284

Setelah tersimpan masing-masing jumlah molekul n-heksana dan etil asetat sebagaimana pada Tabel 4.6. Selanjutnya penggabungan jumlah molekul n-heksana dan etil asetat sesuai variasi gradien eluen. Pembuatan kotak simulasi dari variasi gradien 95:5, dilakukan dengan menggabungkan jumlah molekul n-heksana 237 molekul dan etil asetat 22 molekul. Prosedur penggabungan dilakukan dengan membuka *workspace* molekul 237 n-heksana dan 22 molekul etil asetat yang sudah teroptimasi. 22 molekul etil asetat di *copy* ke *workspace* molekul n-heksana. Kemudian dilakukan optimasi menggunakan metode Amber dengan kondisi sebagaimana sebelumnya dan disimpan dengan nama variasi eluen. Langkah tersebut dilakukan pada seluruh variasi gradien eluen.

Pemodelan pemisahan steroid dalam variasi gradien eluen secara *in silico* berbeda tahapannya dengan eksperimen. Pada *in silico* energi interaksi masing-masing steroid disimulasikan pada setiap variasi gradien eluen. Energi interaksi diperoleh dari selisih energi potensial steroid dalam eluen, energi potensial eluen murni dan energi potensial 1 buah steroid, seperti pada persamaan 2.18. Semua sistem tersebut dioptimasi menggunakan metode Amber dengan kondisi sebagaimana sebelumnya.

Sistem eluen murni dimodelkan dengan jumlah molekul eluen sesuai berat jenis sebagaimana pada Tabel 4.6. Sistem steroid dalam eluen dimodelkan dengan

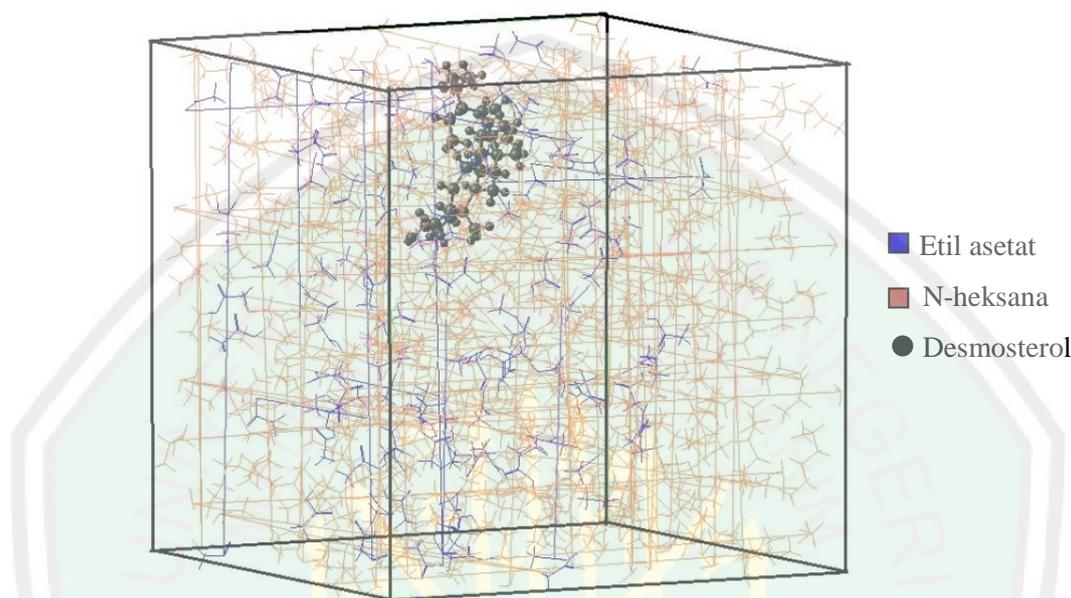
kotak simulasi sistem eluen murni dengan jumlah molekul eluen murni dikurangi beberapa molekul eluen yang bervolume sebesar ruang yang akan ditempati oleh molekul steroid. *Volume* molekul steroid diperoleh dari metode perhitungan Grid, menggunakan parameter jari-jari atom dengan menghitung jarak Van der Waals. Jarak tersebut disimpan dalam *file* parameter VDWGRID.TXT dalam direktori *library*. Pengecekan *volume* molekul dalam Hyperchem dilakukan dengan cara *men-select* molekul, menuju ke menu *compute*, pilih *QSAR properties* dan klik *volume*. Setelah itu tunggu beberapa detik *volume* molekul steroid akan muncul secara otomatis yang ditunjukkan pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 *Volume* molekuler steroid dan eluen

Jenis steroid dan eluen	<i>Volume</i>
β -sitosterol	1285,26 Å ³
Desmosterol	1191,83 Å ³
Fukosterol	1281,19 Å ³
Kampesterol	1247,61 Å ³
Stigmasterol	1281,69 Å ³
N-heksana	433,25 Å ³
Etil asetat	361,53 Å ³

Berdasarkan *volume* jenis steroid yang dimodelkan dalam simulasi, *volume* tengah steroid berkisar 1281,19 Å³. Volume tengah molekul steroid mendekati setara dengan dua molekul n-heksana dan satu molekul etil asetat yaitu 1228,03 Å³. Setiap variasi gradien eluen dikurangi tiga molekul eluen terdiri dari dua molekul n-heksana dan satu molekul etil asetat untuk nantinya digantikan oleh 1 molekul steroid. Kotak simulasi eluen murni berkurang tiga molekul ini dioptimasi kembali dan disimpan dengan nama yang berbeda. Selanjutnya memasukkan masing-masing jenis steroid ke dalam enam variasi eluen. Masing-masing kotak simulasi tersebut dioptimasi kembali dan disimpan dengan nama

sesuai variasi eluen-solut. Gambaran salah satu kotak simulasi steroid dalam eluen teroptimasi pada satu variasi eluen ditampilkan pada Gambar 4.4.

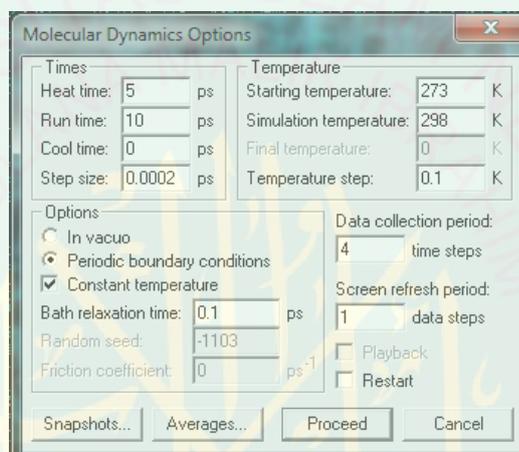


Gambar 4.4 Optimasi jenis steroid desmosterol pada eluen 75:25

Model molekul jenis steroid dioptimasi menggunakan metode AM1 dengan syarat batas konvergensi sebagaimana sebelumnya. Kemudian steroid yang sudah teroptimasi disimulasi DM. Masing-masing jenis steroid disimulasi pada keadaan hampa dalam kotak simulasi. Simulasi steroid dilakukan pada keadaan hampa untuk mengoptimalkan geometri strukturnya.

Semua sistem yang telah dioptimasi, selanjutnya dilakukan simulasi DM, yaitu pada sistem eluen murni, steroid dan steroid dalam eluen. Pada keadaan awal sebelum simulasi DM dan setelah simulasi DM, file disimpan dengan nama yang berbeda. Proses simulasi memerlukan beberapa tahap simulasi yaitu *heating/initial*, pemanasan dan simulasi keadaan keseimbangan. Tujuan simulasi untuk memperoleh keadaan keseimbangan sistem dengan sebaik-baiknya. Pada

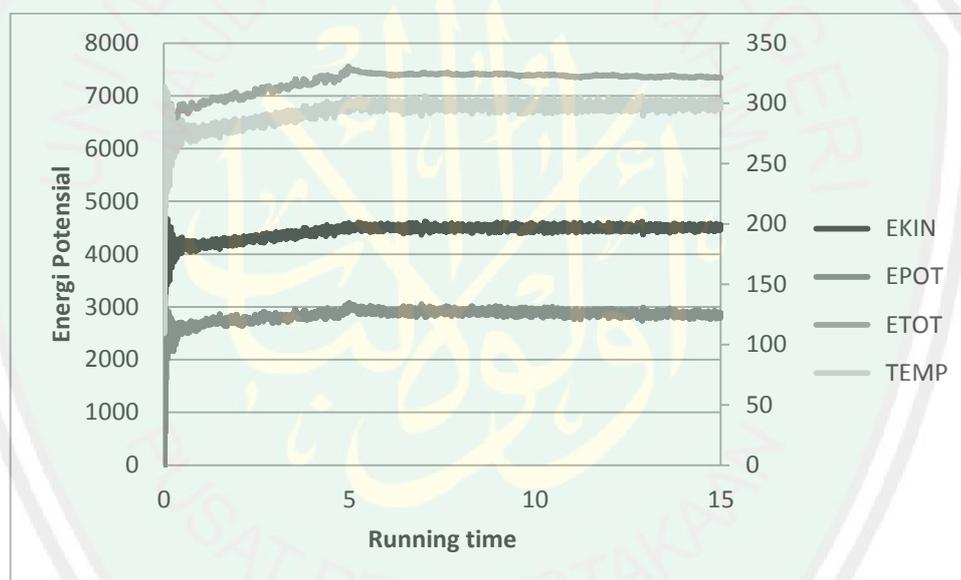
keadaan keseimbangan tersebut akan diambil data energi potensial sistem yang akan digunakan untuk menghitung energi potensial interaksi antara steroid dan eluen. Sistem berada dalam keseimbangan ditandai dengan energi dari sistem yang sudah cenderung konstan disepanjang waktu simulasi yang cukup. Metode yang digunakan adalah *molecular dynamic*.



Gambar 4.5 *Input* simulasi DM tahap *initial*

Berdasarkan Gambar 4.5 *input* simulasi tahap *initial* pertama dengan memberikan *heat time* sebesar 5 ps. Hal tersebut dikarenakan sistem memerlukan energi awal agar molekul bergerak menuju temperatur yang diberikan, keadaan energi awal sistem adalah setara 0 K. *Run time* merupakan waktu yang diberikan kepada sistem untuk mensimulasikan keadaan molekul pada temperatur yang dituju, sebesar 10 ps, sehingga data energi sistem mencapai kestabilan, yaitu tidak ada kecenderungan fluktuasi energi, baik kecenderungan naik maupun turun. *Constant temperatur* dipilih supaya sistem tetap berada pada temperatur konstan. Sementara temperatur pada keadaan konstan, energi dapat berubah-ubah untuk menjaga temperatur tersebut. Pada tahap simulasi, grafik energi yang dihasilkan

perlu diawasi agar nilai energi sistem konstan pada waktu simulasi yang diberikan. Data hasil simulasi berupa file csv yang berisi data energi potensial, energi kinetik, energi total dan temperatur pada satu file. Hasil dari tahap *initial* simulasi DM ini menunjukkan bahwa energi potensial, energi kinetik, energi total dan temperatur dalam rentangan waktu *running* sudah tidak ada kecenderungan fluktuasi energi. Sehingga keadaan tersebut sudah dapat dikatakan berada pada keadaan keseimbangan Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Hasil simulasi DM 298 K β -sitosterol pada eluen 90:10

Berdasarkan hasil simulasi DM tahap *initial* menunjukkan bahwa sistem sudah berada pada keadaan keseimbangan. Perlu dilakukan uji simulasi kembali untuk meyakinkan kestabilan keadaan keseimbangan tersebut. Pengujian kestabilan sistem dilakukan dengan cara keadaan keseimbangan dirusak dengan menaikkan temperatur dan mengembalikannya ke keadaan keseimbangan sistem pada suhu 298 K. Simulasi DM tahap kedua ini dengan menaikkan temperatur

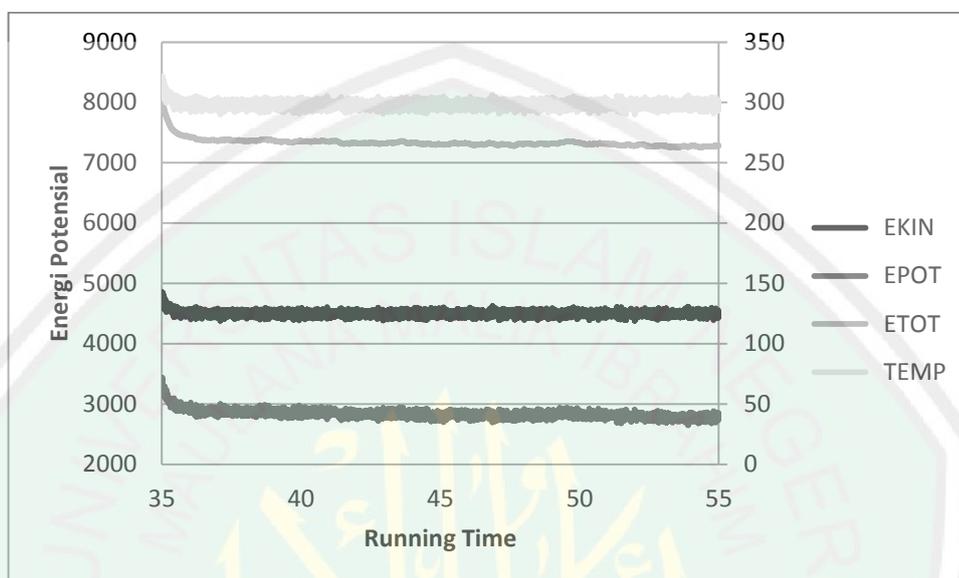
sistem menjadi 700 K guna merusak keseimbangan sistem awal, dengan *heat time* 5 ps, *run time* 10 ps, *cool time* 5 ps, *starting temperatur* 300 K dan *final temperatur* 298 K. Hasil simulasi DM tahap *initial* digunakan untuk simulasi DM tahap kedua ini. Hasil setelah simulasi DM tahap kedua disimpan dengan nama yang berbeda dari tahap awal dan digunakan untuk simulasi DM tahap selanjutnya.



Gambar 4.7 Hasil simulasi DM 700 K β -sitosterol pada eluen 90:10

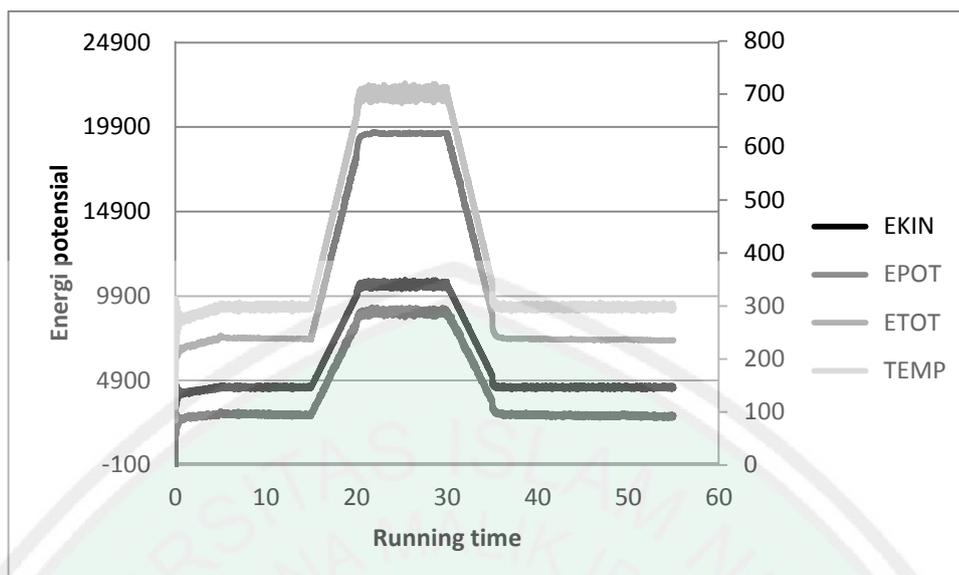
Berdasarkan hasil simulasi DM tahap kedua Gambar 4.7 menunjukkan bahwa sistem pada suhu tinggi ini sudah mencapai keadaan keseimbangan dengan tidak ada kecenderungan fluktuasi pada nilai energi potensial, kinetik, total maupun temperatur. Kemudian keadaan sistem pada suhu tinggi dikembalikan pada keadaan sistem dengan temperatur 298 K. Simulasi DM tahap ketiga ini bertujuan untuk memperoleh tahap pencapaian keseimbangan dari simulasi. Kondisi simulasi tahap ini diatur dengan kondisi *heat time* 0 ps, *run time* 20 ps,

cool time 0 ps, starting temperatur 0 K, simulation temperature 298 K dan final temperatur 0 K.



Gambar 4.8 Hasil simulasi DM 298 K β -sitosterol pada eluen 90:10

Hasil simulasi DM tahap ketiga ditunjukkan pada Gambar 4.8. Berdasarkan grafik tersebut dapat diamati tidak adanya kecenderungan fluktuasi dari ketiga energi dan dan temperatur dalam rentang waktu *running*. Sehingga sistem tersebut sudah mencapai keadaan keseimbangan. Simulasi DM dilakukan pada semua sistem eluen murni, steroid dan steroid dalam eluen. Hasil data ketiga simulasi DM dari keadaan temperatur 298 K, 700 K dan 298 K dapat digabungkan menjadi satu grafik pada Gambar 4.9. Grafik tersebut menunjukkan hasil ketiga simulasi DM tidak mengalami perubahan kecenderungan fluktuasi. Hasil simulasi DM keseluruhan sistem berupa grafik, dengan keseluruhan data berada dalam satu file csv. Data tersebut, antara lain nilai energi potensial, energi kinetik, energi total dan temperatur selama proses satu simulasi.



Gambar 4.9 Hasil simulasi DM β -sitosterol pada eluen 90:10 dalam keadaan tiga temperatur terhadap *run time*.

Pengolahan data hasil simulasi DM diawali dengan menggabungkan hasil file csv pada berbagai keadaan sesuai variasi eluen-solut. Penggabungan data dari hasil simulasi DM tahap *initial*, pemanasan sampai dengan tahap pencapaian keseimbangan kembali. Hasil penggabungan simulasi tersebut dijadikan satu file yang disimpan sebagai file xlsx. Sehingga data file xlsx dapat diolah menggunakan microsoft excel. Penggabungan keseluruhan data hasil simulasi DM berdasarkan *running time* sebesar 54,996 ps, setara dengan 15 ps simulasi tahap awal, 20 ps simulasi tahap kedua dan 20 ps tahap ketiga.

Berdasarkan Grafik 4.9 dapat diketahui bahwa tahap pencapaian keseimbangan simulasi DM mulai mengalami keseimbangan pada waktu 40 ps. Pada waktu 40 ps mulai mengalami keseimbangan, maka data hasil simulasi 40 ps sampai dengan 54,996 ps digunakan untuk pengolahan data. Pada pengolahan data, data hasil simulasi yang digunakan yaitu energi potensial. Pengolahan data

tersebut digunakan untuk mengetahui energi interaksi antara eluen (campuran n-heksana dan etil asetat) dan solut (steroid) melalui persamaan 2.18.

Pengolahan data dilakukan dengan mencari rata-rata energi potensial dari eluen murni sesuai variasi gradien eluen dan kelima jenis steroid. Energi interaksi diperoleh dari selisih energi potensial steroid dalam eluen, dengan rata-rata energi potensial eluen murni dan rata-rata energi potensial steroid. Sehingga satu variasi eluen menghasilkan lima macam data energi potensial interaksi solut-solven sesuai lima jenis steroid. Energi potensial interaksi masing-masing jenis steroid berjumlah 4687 data. Perhitungan rata-rata energi potensial interaksi steroid dalam eluen dengan standar deviasinya menunjukkan nilai yang tidak tampak berbeda jauh. Oleh sebab itu, untuk meyakinkan bahwa nilai rata-rata energi potensial interaksi masing-masing steroid dengan eluennya benar-nemar berbeda satu sama lain, maka dilakukan uji ANOVA (*Analysis of Variance*). Kelima data energi potensial interaksi pada satu eluen diuji ANOVA. Dimana H_0 menyatakan tidak terdapat perbedaan yang signifikan hasil perhitungan rata-rata energi potensial interaksi antara jenis-jenis steroid pada satu variasi eluen. Dan H_1 menyatakan terdapat perbedaan yang signifikan hasil perhitungan rata-rata energi potensial interaksi antara jenis-jenis steroid pada satu variasi eluen.

Tabel 4.8 Hasil Uji ANOVA

Eluen	F hitung	F tabel
95 : 5	4417448,07	2,3723113
90 : 10	255,903813	2,3723113
85 : 15	86836866,3	2,3723113
80 : 20	2341592,49	2,3723113
75 : 25	1601150,63	2,3723113
70 : 30	6158,14463	2,3723113

Berdasarkan Tabel 4.8 diketahui bahwa F hitung lebih besar daripada F tabel, maka uji ANOVA menunjukkan penolakan terhadap H_0 . Jadi dari uji ANOVA tersebut, dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan hasil perhitungan rata-rata energi potensial interaksi antara jenis-jenis steroid pada satu variasi eluen. Data rata-rata energi potensial interaksi hasil simulasi pada masing-masing variasi eluen ditunjukkan pada Tabel 4.9.

Tabel 4.9 Data rata-rata energi potensial interaksi steroid-eluen pada masing-masing variasi eluen (kkal/mol)

Steroid	n-heksana:etil asetat					
	95:5	90:10	85:15	80:20	75:25	70:30
Fukosterol	-89,702	-74,310	-87,064	-89,379	-111,086	-72,480
Desmosterol	-67,288	-79,321	-91,073	-83,702	-53,743	-70,530
Kampesterol	-84,745	-81,405	-94,479	-71,187	-67,303	-95,650
β -sitosterol	1596,820	-81,297	-85,080	1152,384	-113,980	-141,960
Stigmasterol	-70,737	-100,069	-103,409	-92,270	950,642	-74,674

Energi potensial interaksi bertanda positif menunjukkan bahwa interaksi antara molekul steroid dan eluen tolak menolak. Sedangkan data energi potensial interaksi bertanda negatif menunjukkan bahwa terjadi interaksi tarik menarik antara molekul steroid dan eluen. Semakin besar negatif nilai energi potensial interaksinya, maka semakin kuat interaksi tarik menarik antara molekul steroid dan eluen. Berdasarkan Tabel 4.9 profil energi potensial interaksi molekuler antara senyawa steroid dan kombinasi eluen secara *in silico* tampak bahwa, ada steroid yang larut dalam seluruh variasi eluen dari 95:5 sampai dengan 70:30 dan ada beberapa steroid yang tidak dapat larut pada variasi konsentrasi tertentu yaitu β -sitosterol pada eluen 95:5; 80:20 dan stigmasterol pada eluen 75:25. Data energi

interaksi steroid dengan eluen tidak menunjukkan adanya kecenderungan yang seiring dengan sifat kepolaran eluen. Variasi konsentrasi eluen non polar dan semi polar terhadap energi interaksi solut-solven masing-masing steroid tidak memiliki hubungan yang linier. Hal tersebut menunjukkan bahwa tampaknya terdapat faktor lain, selain polaritas yang menentukan kekuatan energi interaksi steroid dengan eluennya. Interaksi intermolekuler yang terjadi antara steroid dan eluen menunjukkan interaksi tarik menarik yang kuat antara keduanya. Hal tersebut dikarenakan nilai energi potensial interaksi antara keduanya lebih besar dibandingkan dengan energi ikatan kimia. Energi ikatan kimia menurut Voet, dkk (2016) antara lain energi ikatan kovalen untuk O-H bernilai 109,8692 kkal/mol, energi ikatan C-H sebesar 98,8811 kkal/mol dan energi ikatan untuk C-C sebesar 83,1184 kkal/mol. Energi ikatan non kovalen antara lain energi ikatan interaksi ionik bernilai 20,5408 kkal/mol, energi ikatan gaya van der Waals sebesar 4,7769 kkal/mol, energi ikatan interaksi dipol-dipol sebesar 2,2213 kkal/mol, energi ikatan hidrogen 5,0158 kkal/mol dan energi interaksi hidrofobik 2,38846 kkal/mol.

Hasil eksperimen ini menunjukkan bahwa senyawa steroid dalam isolat steroid fraksi etil asetat *Eucheuma cottonii* dapat terbawa pada kromatografi kolom oleh eluen campuran n-heksana etil asetat yaitu pada perbandingan n-heksana etil asetat 95:5 dan 90:10 mL. Hasil data yang diperoleh pada kromatografi kolom dapat dikonfirmasi dari hasil data energi potensial interaksi molekuler secara *in silico*. Konfirmasi elusi steroid dalam eluen pada kromatografi kolom oleh hasil data energi potensial interaksi solut-solven secara *in silico* serta aktivitas antioksidannya dijelaskan sebagai berikut:

Tabel 4.10 Steroid, energi potensial interaksi steroid-eluen, dan EC₅₀ pada gradien eluen n-heksana etil asetat 95:5 dan 90:10

Data kromatografi kolom		EC ₅₀	Energi interaksi perhitungan komputasi				
Isolat	Eluen		Fukosterol	Desmosterol	Kampesterol	β-sitosterol	Stigmasterol
2	95:5	20,92	-89,702	-67,288	-84,745	1596,820	-70,737
3	95:5	-	-89,702	-67,288	-84,745	1596,820	-70,737
4	95:5 ; 90:10	-	-89,702 ; -74,310	-67,288 ; -79,321	-84,745 ; -81,405	1596,820 ; -81,297	-70,737 ; -100,069
5	90:10	5,146	-74,310	-79,321	-81,405	-81,297	-100,069

Berdasarkan Tabel 4.10 isolat 2 memiliki aktivitas antioksidan yang cukup baik dengan nilai EC₅₀ 20,92 ppm. Isolat 2 tersebut dalam kromatografi kolom, dibawa oleh eluen pada gradien eluen n-heksana etil asetat 95:5 dalam rentangan fraksi awal. Secara *in silico* diketahui bahwa isolat 2 tersebut setidaknya membawa 4 jenis steroid yaitu fukosterol, desmosterol, kampesterol dan stigmasterol. β-sitosterol tidak terdapat dalam isolat 2 karena memiliki energi interaksi positif besar sehingga tidak memiliki preverensi untuk larut dalam eluen n-heksana etil asetat 95:5. Jadi β-sitosterol masih tertahan pada fase diam. Sedangkan isolat 3 yang diperoleh dari rentangan fraksi tengah eluen n-heksana etil asetat 95:5, tidak memiliki aktivitas antioksidan. Sebagaimana isolat 2, isolat 3 dalam kromatografi kolom juga dibawa oleh eluen n-heksana etil asetat 95:5, sehingga akan mengandung molekul steroid yang sama. Tapi ternyata uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa isolat 3 tidak memiliki aktivitas antioksidan. Tampaknya hal ini dikarenakan jumlah steroid dalam isolat 3 yang terlalu sedikit untuk dapat terdeteksi aktivitas antioksidannya.

Isolat 4 yang merupakan hasil elusi campuran fraksi akhir dari eluen n-heksana etil asetat 95:5 dan fraksi awal eluen n-heksana etil asetat 90:10 tidak memiliki aktivitas antioksidan. Hal tersebut menunjukkan bahwa steroid isolat 4 dalam kromatografi kolom yang dibawa oleh 2 variasi eluen n-heksana etil asetat 95:5 dan 90:10 memiliki jenis steroid dan jumlah yang hampir sama dengan isolat 3. Secara *in silico* pada eluen n-heksana etil asetat 90:10 energi potensial interaksi β -sitosterol terhadap eluen bernilai negatif sebesar -81,297 kkal/mol. Artinya β -sitosterol mulai terbawa oleh fase gerak karena adanya interaksi tarik menarik yang kuat dengan eluen. Secara *in silico* eluen n-heksana etil asetat 90:10 berinteraksi kuat dengan β -sitosterol, tapi ternyata tidak tampak aktivitas antioksidan isolat 4. Kemungkinan hal ini mengindikasikan bahwa β -sitosterol belum turun dari kolom dalam jumlah yang cukup. Sehingga isolat 4 tidak dapat terdeteksi aktivitas antioksidannya.

Isolat 5 yang telah diuji aktivitas antioksidannya memiliki EC_{50} sebesar 5,146 ppm. Nilai EC_{50} yang kurang dari 50 ppm menunjukkan bahwa isolat 5 memiliki kekuatan sebagai antioksidan yang sangat kuat. Pemisahan isolat 5 dengan kromatografi kolom dibawa oleh eluen n-heksana etil asetat 90:10. Secara *in silico* eluen n-heksana etil asetat berinteraksi kuat dengan fukosterol, desmosterol, β -sitosterol, kampesterol dan stigmasterol. Kelima jenis steroid tersebut dibuktikan dengan hasil identifikasi LC-MS/MS pada isolat 5. Dari hasil data tersebut, penelitian secara *in silico* dapat memvalidasi dari data hasil eksperimen.

Tabel 4.11 Perbandingan energi potensial interaksi steroid-eluen pada eluen n-heksana etil asetat 90:10 dengan data hasil LC-MS/MS isolat 5

Jenis steroid	Data LC-MS/MS		Energi interaksi
	Rt (min)	Automatic Area	90 dan 10
<i>Fukosterol</i>	1,84	384.076	-74,310
Desmosterol	1,06	30.519	-79,321
Kampesterol	1,81	17.957	-81,405
β -sitosterol	2,16	13.395	-81,297
Stigmasterol	2,02	2.287	-100,069

Perbandingan energi potensial interaksi steroid eluen dengan data hasil LC-MS/MS berdasarkan pada isolat 5 yang diidentifikasi LC-MS/MS ditunjukkan pada Tabel 4.11. Isolat 5 dalam kromatografi kolom berada pada rentangan fraksi eluen n-heksana etil asetat 90:10. Secara *in silico* data energi interaksi yang dibandingkan dengan data kromatografi kolom yaitu pada eluen n-heksana etil asetat 90:10. Berdasarkan Tabel 4.11 dapat diketahui bahwa kelima jenis steroid ada dan kelimpahan relatif dari masing-masing steroid diketahui dari *automatic area* hasil LC-MS/MS. Kelimpahan relatif jenis-jenis steroid secara berurutan dari yang terbesar adalah fukosterol, desmosterol, kampesterol, β -sitosterol dan stigmasterol. Fukosterol merupakan jenis steroid yang paling banyak daripada steroid lain, karena memiliki kelimpahan relatif yang sangat besar.

Isolat 5 berisi fukosterol, desmosterol, kampesterol, β -sitosterol dan stigmasterol. Sementara isolat 4 yang dibawa eluen n-heksana etil asetat 95:5 dan 90:10 secara *in silico* diprediksi mengandung jenis steroid yang sama dengan isolat 5 dan kemungkinan sedikit β -sitosterol yang terbawa oleh eluen n-heksana etil asetat 90:10. Karena masih dalam awal elusi, ternyata tampak isolat 4 tidak menunjukkan aktivitas antioksidan. Sedangkan pada isolat 5 yang terbawa juga oleh eluen n-heksana etil asetat 90:10 memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Isolat 5 diprediksi akan membawa β -sitosterol secara lebih sempurna

daripada eluen dalam isolat 4, dengan jumlah yang lebih banyak. Karena sudah secara penuh berinteraksi sempurna dengan eluen n-heksana etil asetat 90:10. Data LC-MS/MS menunjukkan bahwa kelimpahan relatif β -sitosterol termasuk yang cukup kecil dibanding kelimpahan relatif steroid yang lain. Akan tetapi kelimpahan relatif yang cukup sedikit tersebut ternyata mampu menaikkan aktivitas antioksidan pada isolat 5. Hal ini menunjukkan bahwa β -sitosterol menunjukkan sifat aktivitas antioksidan yang lebih dominan daripada jenis steroid lainnya.

Tabel 4.12 Steroid dan energi potensial interaksi steroid-eluen pada perbandingan eluen n-heksana etil asetat 85:15 dan 80:20

Eluen	Golongan senyawa terdeteksi lampu UV		Energi interaksi perhitungan komputasi				
	KK Gradien *	KK Isokratik **	Fuko-sterol	Desmo-sterol	Kampe-sterol	β -sito-sterol	Stigma-sterol
85:15	Tritepenoid (Tidak ada steroid)	Steroid	-87,064	-91,073	-94,479	-85,080	-103,409
80:20	Tritepenoid (Tidak ada steroid)	Steroid	-89,379	-83,702	-71,187	1152,384	-92,270

KK: Kromatografi Kolom

*Penelitian ini

**Penelitian Rahmawati 2017

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa eluen n-heksana etil asetat 85:15 dan 80:20 tidak berhasil meluluskan steroid. Sementara secara *in silico*, seharusnya steroid dapat terlarut dalam eluen n-heksana etil asetat 85:15 dan 80:20. Tetapi yang terdeteksi adalah tritepenoid. Tampaknya hal ini dikarenakan kandungan steroid dalam sampel sudah habis terbawa oleh gradien eluen sebelumnya. Hasil

data energi potensial interaksi steroid dan eluen pada Tabel 4.12 tervalidasi dari data penelitian Rahmawati (2017) mengenai variasi komposisi eluen pada isolasi steroid dan triterpenoid makrolaga (*Eucheuma cottonii*) dengan kromatografi kolom basah. Pada penelitian tersebut, menggunakan variasi isokaratik eluen n-heksana etil asetat 85:15 dan 80:20 untuk dapat memisahkan steroid dari fraksi petroleum eter makrolaga. Hasil deteksi lampu UV menunjukkan bahwa steroid yang diperoleh pada masing-masing eluen adalah satu noda tunggal hijau yang mengindikasikan senyawa tersebut adalah steroid. Hasil data energi potensial interaksi steroid eluen 85:15 dan 80:20 dapat memvalidasi hasil penelitian tersebut. Dikarenakan data energi potensial interaksi steroid dan eluen pada eluen 85:15 dan 80:20 bernilai negatif dan ada satu steroid yang bernilai positif yaitu β -sitosterol. Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa steroid dapat terikat bersama eluen dan steroid dapat terpisah.

Tabel 4.13 Data energi potensial interaksi steroid-eluen dalam eluen n-heksana etil asetat 75:25 dan 70:30

Steroid	n-heksana:etil asetat	
	75:25	70:30
Fukosterol	-111,086	-72,480
Desmosterol	-53,743	-70,530
Kampesterol	-67,303	-95,650
β -sitosterol	-113,980	-141,960
Stigmasterol	950,642	-74,674

Data energi potensial interaksi steroid-eluen secara *in silico* sudah dapat saling memvalidasi data eksperimen. Penelitian secara eksperimen untuk memisahkan steroid pada masing-masing variasi 75:25 dan 70:30 belum ada yang melakukan penelitian. Data energi potensial interaksi steroid eluen n-heksana etil

asetat 75:25 dan 70:30 secara *in silico* ditunjukkan pada Tabel 4.13. Berdasarkan data tersebut, diketahui dengan menggunakan komposisi eluen 75:25 dan 70:30, steroid-steroid tersebut memiliki energi interaksi negatif. Artinya steroid-steroid tersebut memiliki preverensi untuk terikat pada campuran eluen 75:25 dan 70:30 kecuali stigmasterol pada 75:25. Data energi interaksi secara *in silico* dapat memprediksi untuk penelitian secara eksperimen kromatografi kolom dengan eluen n-heksana etil asetat 75:25 dan 70:30. Jadi dapat diprediksi bahwa eluen 75:25 dan 70:30 dapat memisahkan beberapa steroid dari senyawa campurannya.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Profil fraksi golongan senyawa hasil kromatografi kolom dari fraksi etil asetat makroalga *Eucheuma cottonii* dengan variasi gradien eluen menunjukkan bahwa eluen 95:5 sampai dengan 90:10 berhasil memisahkan 4 isolat senyawa golongan steroid. Sedangkan eluen 85:15 sampai dengan 70:30 berhasil memisahkan 3 isolat senyawa golongan triterpenoid.
2. Aktivitas antioksidan keempat isolat steroid menghasilkan EC_{50} 20,92 ppm pada isolat 2 dan 5,146 ppm pada isolat 5. Sedangkan pada kedua isolat steroid lainnya 3 dan 4 tidak memiliki aktivitas antioksidan.
3. Senyawa steroid yang berada dalam isolat steroid hasil kromatografi kolom dengan aktivitas antioksidan terbaik terdapat 5 jenis steroid yaitu fukosterol, desmosterol, kampesterol, β -sitosterol dan stigmasterol.
4. Profil energi potensial interaksi molekuler antara senyawa steroid dengan eluen kombinasi variasi konsentrasi n-heksana etil asetat secara *in silico* tampak bahwa, kelima steroid larut dalam seluruh variasi eluen dari 95:5 sampai dengan 70:30 kecuali ada beberapa steroid yang tidak dapat larut pada variasi konsentrasi tertentu yaitu β -sitosterol pada eluen 95:5; 80:20 dan stigmasterol pada eluen 75:25.

5.2 Saran

Secara eksperimen perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dalam pemisahan senyawa steroid pada *Eucheuma cottonii* agar menghasilkan isolat yang lebih murni, pemilihan metode lain untuk uji aktivitas antioksidan dan penggunaan instrumen lain untuk identifikasi jenis steroid. Secara *in silico* perlu dilakukan pemilihan metode lain dalam simulasi dinamika molekuler.



DAFTAR PUSTAKA

- Afif, S., Fasya, A.G., Barizi, A., dan Rachmawati, A., 2013. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp lethality Test*) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Alga Merah *Eucheuma cottonii* dari Perairan Sumenep Madura. *Skripsi* tidak diterbitkan. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Aliyatul M.A. 2013. Aktifitas Antibakteri Ekstrak Metanol Dan N-Heksan Rumput Laut Merah (*Eucheuma Cottonii*)Pesisir Pantai Lobuk Madura Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Mulana Malik Ibrahim Malang.
- Allinger, N.L. 2002. HyperChem Release 7 for Windows. Hypercube. Inc. Publication HC70-00-01-00.
- Al Qarni, 'A. 2007. *Tafsir Muyassar Jilid 4 Juz 24-30*. Jakarta: Qisthi Press.
- Al Qarni, 'A. 2008. *Tafsir Muyassar Jilid 4 Juz 24-30*. Jakarta: Qisthi Press.
- Anam, K. 2015. Isolasi Senyawa Triterpenoid dari Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Analisisnya Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. *Skripsi*, Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Andriani Z., Fasya, A.G., Syarifah, U., dan Hanapi, A. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Alga Merah *Eucheuma cottonii* dari Pantai Tanjung Sumenep Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escheria coli*. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Mulana Malik Ibrahim Malang.
- Anggadiredja, J., Irawati, S., dan Kusmiyati. 2006. *Rumput Laut : Pembudidayaan, Pengelolaan dan Pemasaran Komoditas Perikanan Potensial*. Jakarta: Penerbit Swadaya.
- AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis The Association of Official Analytical Chemist, Inc*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemist.
- Aprelia, F dan Suyatno. 2013. Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etil Asetat Tumbuhan Paku *Christella arida* dan Uji Pendahuluan sebagai Antikanker. *UNESA Journal of Chemistry* 2(3) 94-99.
- Ardiansyah. 2007. Antioksidan dan Peranannya Bagi Kesehatan. Artikel IPTEK.

- Arindah, D. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Golongan Senyawa Antioksidan pada Daging Buah Pepino (*Solonum Muricatum aiton*) yang Berpotensi sebagai Antioksidan. *Skripsi*, Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Asih, I.A.R.A. 2009. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Isoflavon dari Kacang Kedelai (*Glycine max*). *Jurnal Kimia*, 3(1), 33–40.
- Ash Shiddieqy, T.M.H. 2000. Tafsir Al-Qur'anul Majid An-Nuur. Semarang: Pustaka Rizki Putra.
- Aslan, L.M. 2005. *Budidaya Rumput Laut*. Yogyakarta: Kanisius.
- Astuti D.M., Maulana A., dan Kuntowati E.M. 2014. Isolasi Steroid dari Fraksi N-heksana Batang Bajakah Tampala (*Spatholobus littoralis Hassk*). Prosiding seminar nasional kimia. ISBN : 978-602-0951-00-3. Jurusan kimia FMIPA UNESA.
- Atkins, P. dan Paula J.D. 2006. *Physical Chemistry*, Eighth Edition. New York: W.H Freeman and Company.
- Atmadja. 1996. *Rumput Laut Sebenarnya?* Semarang: Divisi Penelelitian dan Pengembangan Rumput Laut UNDIP.
- Atun, S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Konversi Cagar Budaya Borobudur*. 8 (2)
- Byju, K., Anuradha V., Vasundhara G., Nair S.M., dan Kumar N.C. 2014. *In Vitro and in Silico Studies on the Anticancer and Apoptosis-Inducing Activities of the Sterols Identified from the Soft Coral, Subergorgia reticulata*. *Pharmacognosy magazine*. Vol 10. Chocin University India.
- Cannell, R.J.P. 1998. *Natural Products Isolation Methodes in biotechnology 4*. Totowa : Humana Press.
- Deeb, O., Hernandez M.C.R., Castro C.G., Juarez R.G., dan Basurto J.C. 2009. Exploration of Human Serum Albumin Binding Sites by Docking and Molecular Dynamics Flexible Ligand-Protein Interactions. *Biopolymers*. Vol 3 No 2. Al-Quds University Jerusalem Palestine.
- Diastuti, H., dan Warsinah. 2010. Identifikasi Senyawa Antikanker dari Ekstrak Kloroform Kulit Batang *Rhizopora mucronata*. *Majalah Farmasi Indonesia*, 21(4), 266–271.
- Dinasti, A. R. 2017. Isolasi dengan KLTP dan Uji Antioksidan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikrolaga *Chlorella sp*. *Skripsi*, Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Departemen Kesehatan RI. 2013. *Gambaran Kesehatan Lanjut Usia di Indonesia*. Jakarta: Depkes.
- Doty M.S. 1985. *Eucheuma alvarezii* sp.nov (Gigartinales, Rhodophyta) from Malaysia. Di dalam: Abbot IA, Norris JN (editors). *Taxonomy of Economic Seaweeds*. California Sea Grant College Program. p 37 – 45.
- Fattah, A.B.A.B.A. 2010. *Shahih Thibbun Nabawi Panduan dan Metode Pengobatan Nabi SAW. Buku*. Jakarta: Pustaka Imam Ahmad.
- Fitri, K. N. 2017. Variasi Laju Alir pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* Metode Kromatografi Kolom. *Skripsi*, Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Gobo, L. A, Viana C, dan Lameira, A. 2016. A Liquid Chromatography Atmospheric Pressure Photoionization Tandem Mass Spectrometric (LC APPI-MS/MS) Method for The Determination of Triterpenoids in Medicinal Plant Extracts. *Journal of Mass Spectrometry*. (51) 558-565. <https://doi.org/10.1002/jms.3783>.
- Guenther, E. 2006. *Minyak Atsiri*. Jakarta: UI Press.
- Gunawan, I.W.G dan Sutrisnayati. 2008. Isolasi dan identifikasi senyawa terpenoid yang aktif antibakteril pada herba meniran. *Jurnal kimia*: 31-39 ISSN 1907-9850.
- Gunsteren, S. V dan Berendsen H.J.C. 1990. Computer simulation of molecular dynamics methodology, applications and perspectives in chemistry *Angewandte Chemie, International Edition in English*. 29: 992-1023 and Karplus, M, Petsko G.A. Molecular dynamic simulations in biology *nature* 347;631 639.
- Grant, G.H dan Richards W.G. 1995. *Computational Chemistry*. Oxford New York Toronto: Oxford University Press.
- Hafid, A.F. 2003. Aktivitas Antiradikal Bebas DPPH Fraksi Metanol *Fagraea auricula* dan *Gagraea ceilanica*, *Majalah Farmasi Airlangga*, III (1);34-39.
- Hanapi, A., Fasya, A. G., Mardiyah, U., dan Miftahurrahmah. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *Alchemy*, 2(2), 126–137.
- Handoko, S. 2016. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter (PE) Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Metode Kromatografi Kolom Pembuatan Fasa Diam Cara Basah Dan Kering. *Skripsi*, Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Hernani dan Nurdjanah R. 2005. Aspek Pengeringan dalam Mempertahankan Kandungan Metabolit Sekunder Pada Tanaman Obat. *Perkembangan teknologi TRO*. 21 (2) : 33-39.
- Hidajat, B. 2005. Penggunaan Antioksidan Pada Anak. Artikel Kimia. Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Hutomo, M dan Moosa M.K. 2005. Indonesian Coastal and Marine Biodiversity: *Present Journal of Marine Sciences* 14(1): 88-97.
- Ismarti. 2011. Isolasi Triterpenoid dan Uji Antioksidan Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Meranti Merah (*Shorea singkawang* (Miq).Miq). Artikel. Pascasarjana Universitas Andalas.
- Khopkar, S.M. 2008. *Konsep-Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Kristanti, A. N., Nanik, S. A., Mulyadi, T., dan Bambang, K. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Kondeti, R.R., Mulpuri K.S., dan Meruga B. 2014. Advancements in column chromatography: A review. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- Kuntorini, E.M dan Astuti, M.D. 2010. Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bulbus Bawang Dayak (*Eleutherine americana Merr*). *Sains dan Terapan Kimia*. Vol. 4. No 1: 15-22.
- Kusmiyati, Nurfina, A., dan Sri, H. 2011. Isolasi dan Identifikasi Zat Aktif Ekstrak Metanol Rimpang Kunyit Putih Fraksi Etil Asetat. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian* 1 (2).
- Kutsiyah. 2012. Penentuan Kandungan Senyawa Fenolik Total dan Kapasitas Antioksidan Alga Merah *Euclima spinosum* dari Pantai Lobuk Madura. *Skripsi*, Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Lewars, E.G. 2016. *Computational Chemistry Third Edition*. Peterborough: Canada.
- Lailiyah, A., Tri K.A., Abdul H., dan Eriyanto Y. 2014. Kapasitas Antioksidan dan Kandungan Total Senyawa Fenolik Ekstrak Kasar Alga Coklat *Sargassum Cristaeifolium* dari Pantai Sumenep Madura. *Alchemy*. Vol 3, no 1, hal 18-30.
- Mardaneni, I. 2017. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Alga Merah *Euclima cottonii* Perairan Wongsorejo Banyuwangi Menggunakan Metode KLT dan LC-MS. *Skripsi*, Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Mardiyah dan Kholidiyah. 2013. Metanol Daun Surian Yang Berpotensi Sebagai Antioksidan. *Makara* Yogyakarta: UGM Press.
- Mardiyah, U., Fasya, A. G., Fauziyah, B., dan Amalia, S. 2014. Ekstraksi, Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Alchemy*, 3(1), 39–46.
- Miftahurrahmah. 2012. Ekstraksi, Uji aktivitas Antibakteri dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Pesisir Laut Banyuwangi. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Mo, S., Dong, L., Hurst, W. J., dan Breemen, R. B. van. 2013. Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Lipids*, (48), 949–956.
- Molyneux, P. 2004. The Use Of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Jurnal Science*.
- Mubarokah, F. A. 2017. Variasi Diameter Kolom pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* Metode Kromatografi Kolom. *Skripsi*, Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Muhibbah, S. R. N. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri terhadap Bakteri *Escheria coli* dan *Staphylococcus aureus* dan Uji Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) dari Pantai Lobuk Madura. *Skripsi* tidak diterbitkan.
- Mulyono. 2006. *Kamus Kimia*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Ningsih, E. M. 2015. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid pada Fraksi n-heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma spinosum*. *Skripsi*, Malang: Universitas Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Noviyanti, L. 2010. Modifikasi Teknik Kromatografi Kolom untuk Pemisahan Trigliserida dari Ekstrak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.). *Skripsi*, Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Pereira, C. M. P., Nunes, C. F. P., Villela, L. Z., Streit, N. M., Dias, D., Pinto, E., dan Colepicolo, P. 2016. Extraction of Sterols in Brown Macroalgae from Antarctica and Their Identification by Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Applied Phycology*, 1–7.
- Raabe, G. 2016. *Molecular Simulation Studies on Thermophysical Properties with Application to Working Fluids*. Ltd: Singapore.

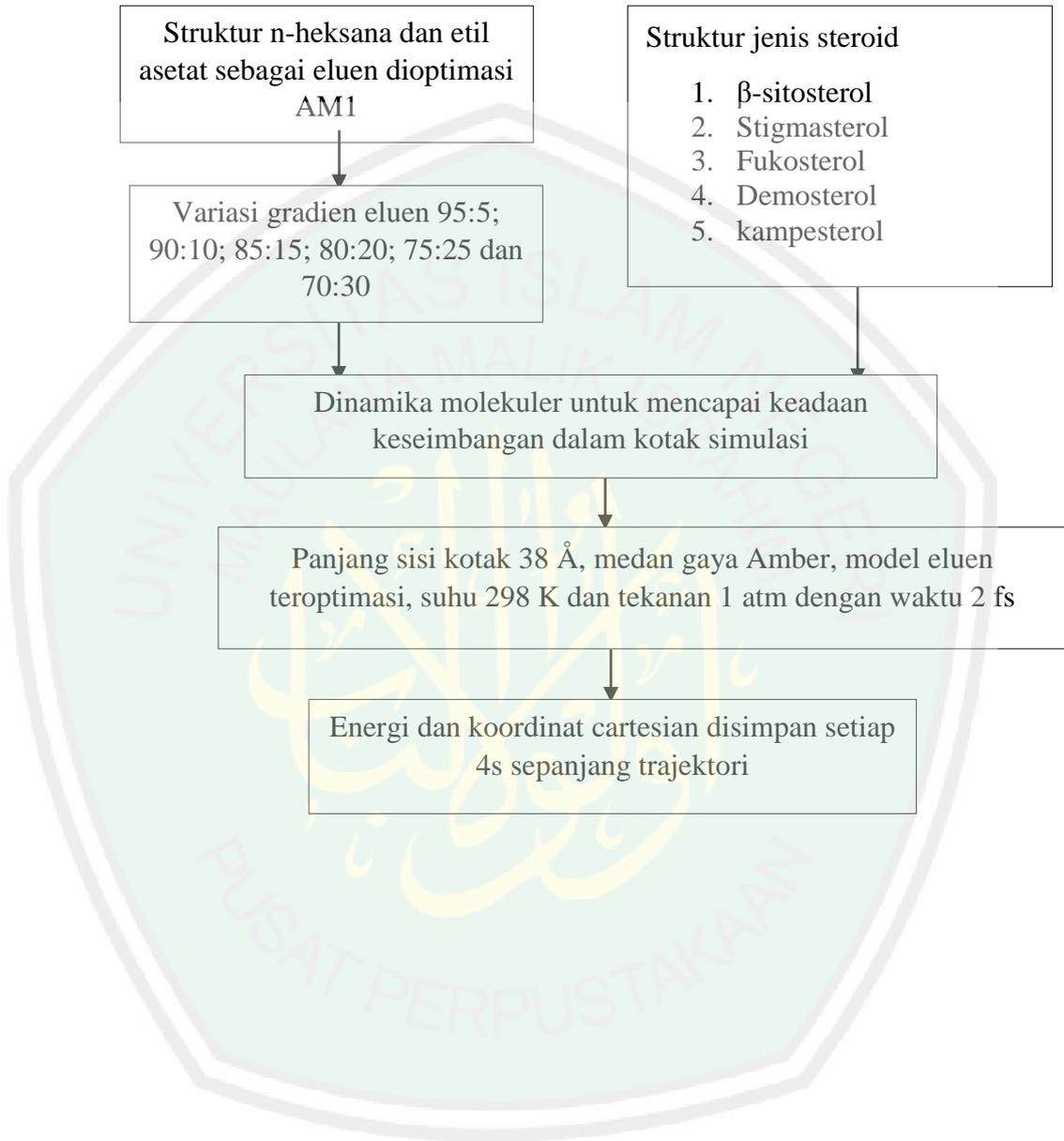
- Qurthubi, I. 2009. *Tafsir al-Qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azam.
- Rahayu, D.S., Dewi, K., dan Enny, F. 2010. Penentuan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun Ketapang (*Terminalia catappa L*) dengan Metode DPPH. *Skripsi*, Semarang: Universitas Diponegoro.
- Rahmawati, D. A. 2017. Variasi Komposisi Eluen pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Makroalga (*Eucheuma cottonii*) dengan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*, Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Rahmawati, L. M. 2016. Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Senyawa Steroid Isolat Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan UV-Vis. *Skripsi*, Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ramachandran, K.I., Deepa, G., dan Namboori, K. 2008. *Computational Chemistry and Molecular Modeling*. Verlag Berlin Heidelberg.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Rohman, A dan Gandjar, I. G. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Rudiyanto. 2013. Kajian Kapasitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Kandungan Fenolik Total Ekstrak Alga Merah Jenis *Eucheuma cottonii* dari Perairan Sumenep. *Skripsi* tidak diterbitkan. UIN Maliki Malang.
- Sapar, A., Kumanireng, A. S., Voogd, N. D., dan Noor, A. 2004. Isolasi dan Penentuan Struktur Metabolit Sekunder Aktif dari Spons *Biemna triraphis* Asal Pulau Kapodasang (Kepulauan Spermonde). *Marina Chimica Acta*, 5(1), 2–5.
- Sari, I. R. 2017. Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis dan Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan LC-MS pada Fraksi N-Butanol Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *Skripsi*, Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Sakdiyah, H. 2017. Pemisahan Senyawa Triterpenoid dan Steroid Fraksi Etil Asetat Alga Merah *Eucheuma spinosum* Menggunakan Kromatografi Kolom Basah dengan Variasi Ukuran Kolom. *Skripsi*, Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Sastrohamidjojo. 2005. *Kromatografi*. Yogyakarta: UGM Press.

- Septiandari, N. 2016. Isolasi Senyawa Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) Menggunakan Kromatografi Kolom Cara Kering dan Basah. *Skripsi*, Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Setiyawan, M. I., Ningsih R., Syarifah, U., dan Adi T.K . 2015. Isolasi Senyawa Triperpenoid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol dan Identifikasi Menggunakan FT-IR. *Skripsi* tidak diterbitkan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Sharo N.M. 2013. Uji Toksisitas dan Identifikasi Senyawa Ekstrak Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) terhadap larva udang *Artemia Salina* Leach. *Skripsi* tidak diterbitkan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Quran Vol. 10*. Jakarta: Penerbit Lentera Hati.
- Sholikah, A.N.L. 2016. Isolasi Senyawa Steroid dari Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) Menggunakan Metode Kromatografi Kolom. *Skripsi*, Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Soenardjo, N. 2011. Aplikasi Budidaya Rumput Laut *Eucheuma cottonii* (Weber van Bosse) Dengan Metode Jaring Lepas Dasar (Net Bag) Model Cidaun. *Buletin Oseanografi Marina*. Vol.1 hal. 36-44. Semarang.
- Songklanakar, J.S.T. 2004. The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. 26(2): 211-219. United Kingdom.
- Srijianto. 2004. Pengaruh Waktu, Suhu dan Perbandingan Bahan Baku *Technology*.26 (2): 212-218.
- Stahl, E. 1985. *Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Edisi terjemahan (diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Iwang Soediro). Bandung : ITB press.
- Tasic, M. B., Konstantinovic, B. V., Lazic, M. L., dan Veljkovic, V. B. 2009. The Acid Hydrolysis of Potato Tuber Mash in Bioethanol Production. *Biochemical Engineering Journal*, 43, 208–211.
- Tyas, A. P. 2017. Variasi Rasio Sampel dan Silika Gel pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Makroalga *Eucheuma cottonii* dengan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*, Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Voet, D., Voet J.G., dan Pratt C.W. 2016. *Principles of Biochemistry, Life at the Molecular Level 5th Edition*. Singapore : Markono Print Media.

- Vogel. 1978. *Text Book Of Practical Organic Chemistry*. 4th Edition. London: Longman Group Limited.
- Voight, R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Terjemahan Soedani NoeronoSoewandi. Yogyakarta: UGM Press.
- Wahdaningsih, S., Erna P. S., dan Subagus W. 2011. Aktivitas Penangkap Radikal Bebas Dari Batang Pakis (*Alsophila glauca J. Sm*). *Majalah Obat Tradisional*. 16(3): 156-160. Jogjakarta.
- Widiasih., Herawati., Safitri H., dan Arkundato A. 2013. Penerapan Metode Dinamika Molekul untuk Pembelajaran: Konsep Titik Leleh dan Perubahan Wujud. *Jurnal Teori dan Aplikasi Fisika*. Vol 01 No 2. Jember.
- Wonorahardjo, S. (2013). *Metode-Metode Pemisahan Kimia Sebuah Pengantar*. Jakarta: Akademia Permata.
- Wulansari, D., dan Chairul. 2011. Penapisan Aktivitas Antioksidan dan Beberapa Tumbuhan Obat Indonesia Menggunakan Radikal 2,2-Diphenyl-1-Pcrylhydrazyl (DPPH). *Majalah Obat Tradisional*. Bogor: Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi-LIPI.
- Yuhernita, J. 2014. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Metanol Daun Surian Yang Berpotensi Sebagai Antioksidan. *Makara Sains*. 15 (1):1.
- Yanuarti, R., Nurjanah., Effionora A., dan Taufik H. 2017. Profil Fenolik dan Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Rumput Laut *Turbinaria conoides* dan *Eucheuma cottonii*. *JPHPI*. Volume 20 Nomor 2. Banten.
- Yunizal. 2004. *Teknologi Pengolahan Alginat*. BRKP. Jakarta.
- Zuhra, F. C., Juliati B. T., dan Herlince S. 2008. Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid Dari Daun Katuk (*Sauropus androgunus (L) Merr.*). *Jurnal Biologi Sumatera*. Vol 3 No 1 hal 7-10. Medan.

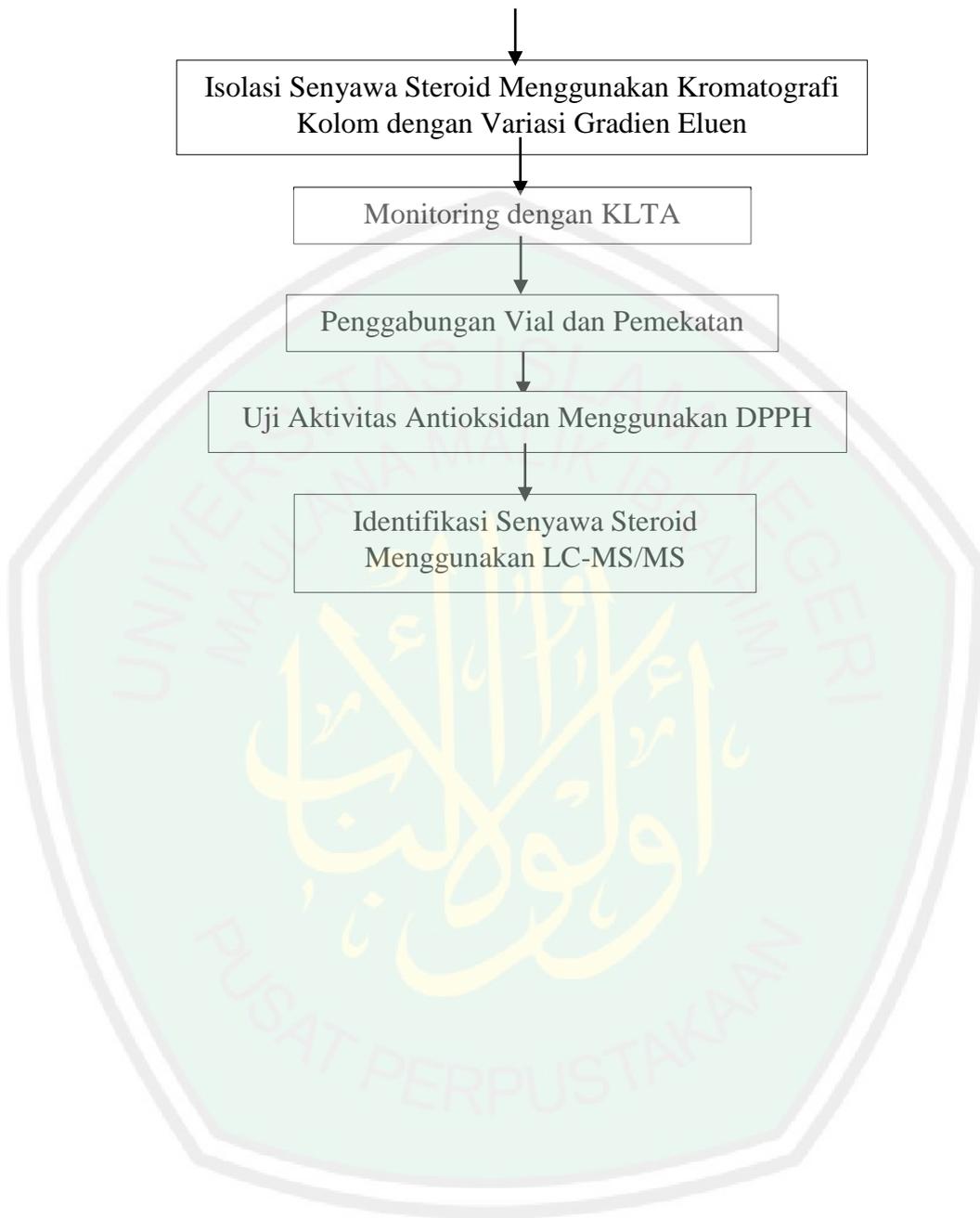
Lampiran 1 Rancangan Penelitian

1. *In silico* : Simulasi Dinamika Molekuler



2. Eksperimen

Fraksi Etil Asetat Alga Merah *Euchema cottonii*



Lampiran 2 Diagram Alir

1. Pemisahan dengan Kromatografi Kolom Basah Variasi Gradien Eluen

Ekstrak Pekat Fraksi Etil Aseat

- disiapkan fasa diam kolom silika gel G-60 (0,063-0,200 mm) metode basah
- dimasukkan silika gel dalam kolom diameter 1 cm dan sampel dengan perbandingan 1:150
- dimasukkan eluen campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 95:5; 90:10; 85:15; 80:20, 75:25 dan 70:30 mL
- ditampung eluat setiap 2 mL pada botol vial dan dilakukan pengelompokan setiap 5 vial
- dihentikan proses elusi setelah semua senyawa steroid diperkirakan telah keluar dari kolom
- diulangi langkah diatas dengan variasi gradien eluen

Hasil

1.1 Pembuatan Kolom Metode Basah

Silika Gel G-60 (0,063-0,200 mm)

- diaktivasi 10 gram silika gel selama 2 jam pada suhu 110°C dan didinginkan dalam desikator selama 15 menit
- disiapkan campuran homogen antara pelarut n-heksana:etil asetat (95:5) dan silika gel menggunakan *magnetic stirer* di atas *hot plate* sampai terbentuk suspense
- dimasukkan suspense ke dalam kolom menggunakan corong
- diketuk-ketuk dinding kolom
- dibuka kran bagian bawah kolom setelah terbentuk lapisan setebal 2 cm
- dibiarkan kolom beberapa saat agar cairan yang berada di atas adsorben menjadi jernih (setelah adsorben masuk semua dalam kolom)

Hasil

2. Monitoring dengan KLTA

Fraksi hasil Kromatografi Kolom

- disiapkan eluen campuran n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 17:3 dalam bejana pengembang
- dijenuhkan selama 1 jam
- dioven plat KLT pada suhu 110°C selama 30 menit
- ditotolkan masing-masing kelompok fraksi
- dimasukkan dalam bejana pengembang berisi eluen yang telah dijenuhkan
- diamati noda yang terbentuk

Hasil

2.1 Penggabungan Vial, Pemekatan dan Identifikasi Steroid

Spot hasil monitoring

- ditandai fraksi yang mempunyai warna hijau (steroid)
- digabungkan fraksi dan dipekatkan dengan suhu ruang
- dialiri gas N₂

Hasil

3. Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH

3.1 Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan DPPH 0,2 mM

- diambil sebanyak 1 mL
- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan 3 etanol
- didiamkan selama 10 menit
- dimasukkan ke dalam kuvet
- dicari panjang gelombang maksimum

Hasil

3.2 Pengukuran potensi antioksidan pada sampel

a. Absorbansi kontrol

Larutan DPPH 0,2 mM

- diambil sebanyak 1 mL
- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan pelarut yang digunakan pada ekstrak sebanyak 3 mL
- ditutup tabung reaksi dengan aluminium foil
- diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit
- dimasukkan larutan ke dalam kuvet
- diukur absorbansinya dengan panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan

Hasil

b. Pengukuran sampel

Sampel dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm

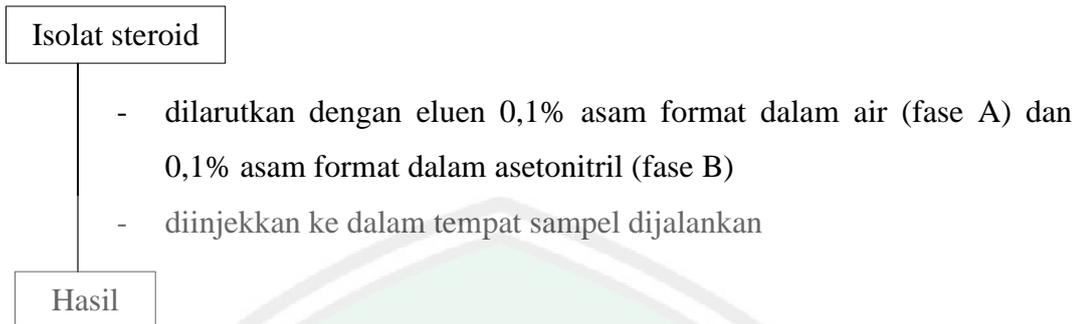
- disiapkan tabung reaksi untuk masing-masing konsentrasi
- diisi masing-masing tabung reaksi dengan 3 mL ekstrak
- ditambahkan DPPH sebanyak 1 mL
- diulang sebanyak 3 kali
- diinkubasi pada suhu 37° C selama 30 menit
- dimasukkan ke dalam kuvet
- diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan

Nilai absorbansi

- dihitung nilai % aktivitas antioksidan
- dihitung nilai EC₅₀

Hasil

4. Identifikasi Menggunakan LC-MS/MS



Lampiran 3 Pembuatan Eluen dan Larutan Stok

1. Pembuatan Eluen n-heksana : etil asetat

Dibuat eluen untuk elusi pada pemisahan dengan kromatografi kolom dan untuk monitoring dengan KLTA dengan perbandingan n-heksana:etil asetat dengan volume total 100 mL.

1.1 Eluen Kromatografi kolom

- 95:5

$$\text{N-heksana} = \frac{95}{100} \times 100 = 95 \text{ mL}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{5}{100} \times 100 = 5 \text{ mL}$$

- 90:10

$$\text{N-heksana} = \frac{90}{100} \times 100 = 90 \text{ mL}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{10}{100} \times 100 = 10 \text{ mL}$$

- 85:15

$$\text{N-heksana} = \frac{85}{100} \times 100 = 85 \text{ mL}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{15}{100} \times 100 = 15 \text{ mL}$$

- 80:20

$$\text{N-heksana} = \frac{80}{100} \times 100 = 80 \text{ mL}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{20}{100} \times 100 = 20 \text{ mL}$$

- 75:25

$$\text{N-heksana} = \frac{75}{100} \times 100 = 75 \text{ mL}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{25}{100} \times 100 = 25 \text{ mL}$$

- 70:30

$$\text{N-heksana} = \frac{70}{100} \times 100 = 70 \text{ mL}$$

$$\text{Etil asetat} = \frac{30}{100} \times 100 = 30 \text{ mL}$$

1.2 Eluen monitoring KLTA

- Volume n-heksana (17 dalam 100 mL)

$$\text{n-heksana} = \frac{17}{20} \times 100 = 85 \text{ mL}$$

- Volume etil asetat (3 dalam 100 mL)

$$\text{Etil asetat} = \frac{3}{20} \times 100 = 15 \text{ mL}$$

2. Pembuatan larutan DPPH 0,2 mM

DPPH 0,2 mM dalam etanol p.a (96%)

Mr DPPH ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$) = 394,32 gr/mol = 394,32 mg/mmol

$$\text{Molaritas} = \frac{\text{mol}}{\text{L}}$$

$$\text{Mol DPPH} = 10 \text{ mL} \times 0,2 \text{ Mm}$$

$$= 10 \text{ mL} \times \frac{0,2 \text{ M}}{1000}$$

$$= 0,002 \text{ mmol}$$

$$\text{mg DPPH} = 0,002 \text{ mmol} \times \text{Mr DPPH}$$

$$= 0,002 \text{ mmol} \times 394,32 \text{ mg/mmol}$$

$$= 0,78864 \text{ mg}$$

$$= 0,00078864 \text{ g}$$

3. Pembuatan larutan stok 840 ppm dalam 5 ml pelarut

$$\text{ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$840 \text{ ppm} = \frac{\text{mg}}{0,005 \text{ L}}$$

$$= 4,2 \text{ mg}$$

Jadi, untuk membuat 5 ml larutan sampel 840 ppm diperlukan bahan sebanyak

4,2 mg

4. Pembuatan larutan sampel 1 ppm

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$5 \text{ mL} \cdot 1 \text{ ppm} = V2 \cdot 840 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} V_2 &= \frac{5 \text{ mL} \times 1 \text{ ppm}}{840 \text{ ppm}} \\ &= 0,0059 \text{ mL} \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat 5 mL larutan sampel 1 ppm diperlukan larutan stok 840 ppm sebanyak 0,0059 mL

5. Pembuatan larutan sampel 2 ppm

$$\begin{aligned} V_1.M_1 &= V_2.M_2 \\ 5 \text{ mL} \cdot 2 \text{ ppm} &= V_2 \cdot 840 \text{ ppm} \\ V_2 &= \frac{5 \text{ mL} \times 2 \text{ ppm}}{840 \text{ ppm}} \\ &= 0,0119 \text{ mL} \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat 5 mL larutan sampel 2 ppm diperlukan larutan stok 840 ppm sebanyak 0,0119 mL

6. Pembuatan larutan sampel 3 ppm

$$\begin{aligned} V_1.M_1 &= V_2.M_2 \\ 5 \text{ mL} \cdot 3 \text{ ppm} &= V_2 \cdot 840 \text{ ppm} \\ V_2 &= \frac{5 \text{ mL} \times 3 \text{ ppm}}{840 \text{ ppm}} \\ &= 0,0179 \text{ mL} \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat 5 mL larutan sampel 3 ppm diperlukan larutan stok 840 ppm sebanyak 0,0179 mL

7. Pembuatan larutan sampel 4 ppm

$$\begin{aligned} V_1.M_1 &= V_2.M_2 \\ 5 \text{ mL} \cdot 4 \text{ ppm} &= V_2 \cdot 840 \text{ ppm} \\ V_2 &= \frac{5 \text{ mL} \times 4 \text{ ppm}}{840 \text{ ppm}} \\ &= 0,0238 \text{ mL} \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat 5 mL larutan sampel 4 ppm diperlukan larutan stok 840 ppm sebanyak 0,0238 mL

8. Pembuatan larutan sampel 5 ppm

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$5 \text{ mL} \cdot 5 \text{ ppm} = V2 \cdot 840 \text{ ppm}$$

$$V2 = \frac{5 \text{ mL} \times 5 \text{ ppm}}{840 \text{ ppm}}$$
$$= 0,0298 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 5 mL larutan sampel 5 ppm diperlukan larutan stok 840 ppm sebanyak 0,0298 mL



Lampiran 4 Pengelompokan Hasil Monitoring Menggunakan KLTA

Hasil monitoring fraksi etil asetat makroalga *Eucheuma cottonii*

No	Fraksi	Warna UV	Jarak senyawa (cm)	Jarak elusi (cm)	Rf	Senyawa	Berat isolat (mg)
1	1-14	-	-	-	-	-	5,4 mg
2	15-41	Biru	6,5	8	0,8125	Steroid	3,1 mg
3	42-53	Biru	6,3	8	0,7875	Steroid	0,6 mg
4	54-64	Hijau	3,7	8	0,4625	Steroid	0,3 mg
5	65-86	Hijau	2,6	8	0,325	Steroid	4,2 mg
6	87-100	Merah	2,1	8	0,2625	Tritepenoid	1,2 mg
7	101-165	Merah	1,4	8	0,2625	Tritepenoid	3,1 mg
		Merah			0,175	Tritepenoid	
8	166-195	Merah	1,4	8	0,175	Tritepenoid	2,1 mg
9	196-295	Merah	0,2	8	0,025	Tritepenoid	4,2 mg

Lampiran 5 Perhitungan Nilai Rf Hasil Monitoring dan Rendemen Isolat Tunggal dan Campuran

5.1 Contoh Perhitungan Nilai Rf Hasil Monitoring

Nilai Rf isolat steroid kedua dapat dihitung menggunakan rumus dibawah ini:

$$Rf = \frac{\text{Jarak senyawa yang terelusi}}{\text{Jarak pelarut yang mengelusi}}$$

$$Rf \text{ isolat steroid kedua} = \frac{6,5 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,8125$$

Nilai Rf isolat steroid dan triterpenoid untuk isolat yang lain Tabel 4.1 dihitung dengan cara yang sama seperti perhitungan tersebut.

5.2 Contoh Perhitungan Rendemen Isolat Tunggal dan Campuran

Rendemen isolat steroid kedua dapat dihitung menggunakan rumus dibawah ini:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat isolat hasil kromatografi kolom (g)}}{\text{Berat fraksi etil asetat dari partisi } E. \textit{cottonii} \text{ yang digunakan (g)}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen isolat steroid kedua} &= \frac{0,0031 \text{ g}}{0,067 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 4,63 \% \end{aligned}$$

Rendemen isolat steroid dan triterpenoid untuk fraksi yang lain Tabel 4.1 dihitung dengan cara yang sama seperti perhitungan tersebut.

Lampiran 6 Pengujian Aktivitas Antioksidan

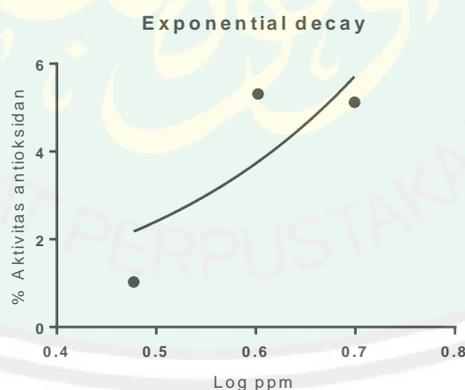
Konsentrasi	Persen aktivitas antioksidan (%)			
	Isolat 2	Isolat 3	Isolat 4	Isolat 5
1 ppm	1,7703	-9,6954	8,9398	5,073
2 ppm	5,7745	-10,3649	19,2557	2,375
3 ppm	1,0278	-10,1534	-3,1602	1,073
4 ppm	5,3129	-9,0909	-17,9147	3,792
5 ppm	5,1245	-10,5096	0,4822	40,911

6.1 Isolat 2 (Fraksi 15-41)

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	% Aktivitas Antioksidan
3	0,4767	0,4718	1,0278
4	0,4762	0,4509	5,3129
5	0,4781	0,4536	5,1245

Comparison of Fits Can't calculate
Null hypothesis Different curve for each data set
Alternative hypothesis One curve for all data sets
P value
Conclusion (alpha = 0.05) Models have the same DF
Preferred model Different curve for each data set
F (DFn, DFd)
Different curve for each data set
set
Best-fit values
Bottom = 0
Top = 100
LogIC50 1,321
HillSlope 1,959
IC50 20,92
Span = 100
Std. Error
LogIC50 0,6209
HillSlope 1,805
95% CI (profile likelihood)
LogIC50 -infinity to +infinity
HillSlope ??? to +infinity
IC50
Goodness of Fit
Degrees of Freedom 1
R square 0,6534
Absolute Sum of Squares 4,064
Sy.x 2,016
Constraints
Bottom Bottom = 0
Top Top = 100
One curve for all data sets

Best-fit values		
Bottom	= 0	
Top	= 100	
LogIC50	1,321	1,321
HillSlope	1,959	1,959
IC50	20,92	20,92
Span	= 100	
Std. Error		
LogIC50	0,6209	0,6209
HillSlope	1,805	1,805
95% CI (profile likelihood)		
LogIC50	-infinity to +infinity	-infinity to +infinity
HillSlope	??? to +infinity	??? to +infinity
IC50		
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		1
R square	0,6534	0,6534
Absolute Sum of Squares	4,064	4,064
Sy.x		2,016
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
LogIC50	LogIC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
# of X values	9	
# Y values analyzed	3	



6.2 Isolat 3 (Fraksi 42-53)

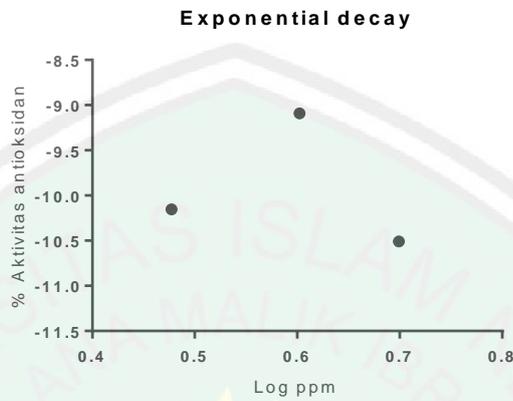
Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	% Aktivitas Antioksidan
3	0,3782	0,4166	-10,1534
4	0,3784	0,4128	9,0909
5	0,3787	0,4185	-10,5096

Comparison of Fits
Null hypothesis

Can't calculate
Different curve for each data set

Alternative hypothesis	One curve for all data sets
P value	
Conclusion (alpha = 0.05)	Neither fit completed
Preferred model	
F (DFn, DFd)	
Different curve for each data set	Not converged
Best-fit values	
Bottom	
Top	
LogIC50	
HillSlope	
IC50	
Span	
Std. Error	
LogIC50	
HillSlope	
95% CI (profile likelihood)	
LogIC50	
HillSlope	
IC50	
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	
R square	
Absolute Sum of Squares	
Sy.x	
Constraints	
Bottom	Bottom = 0
Top	Top = 100
One curve for all data sets	Not converged
Best-fit values	
Bottom	
Top	
LogIC50	
HillSlope	
IC50	
Span	
Std. Error	
LogIC50	
HillSlope	
95% CI (profile likelihood)	
LogIC50	
HillSlope	
IC50	
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	
R square	
Absolute Sum of Squares	
Sy.x	
Constraints	
Bottom	Bottom = 0
Top	Top = 100
LogIC50	LogIC50 is shared

HillSlope HillSlope is shared
 Number of points
 # of X values 9
 # Y values analyzed 3

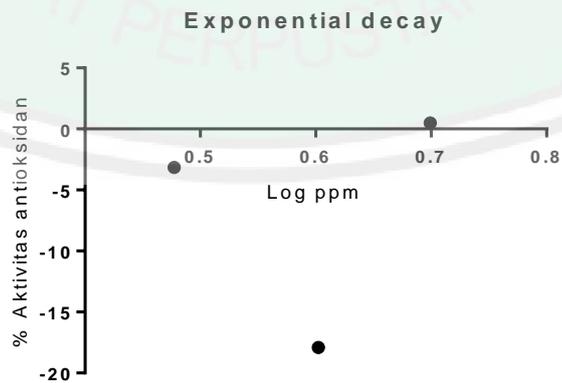


6.3 Isolat 4 (Fraksi 54-64)

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	% Aktivitas Antioksidan
3	0,4968	0,5125	-3,1602
4	0,4968	0,5057	-17,9147
5	0,4953	0,4977	0,4822

Comparison of Fits Can't calculate
 Null hypothesis Different curve for each data set
 Alternative hypothesis One curve for all data sets
 P value
 Conclusion (alpha = 0.05) Neither fit completed
 Preferred model
 F (DFn, DFd)
 Different curve for each data set Not converged
 Best-fit values
 Bottom
 Top
 LogIC50
 HillSlope
 IC50
 Span
 Std. Error
 LogIC50
 HillSlope
 95% CI (profile likelihood)
 LogIC50
 HillSlope
 IC50
 Goodness of Fit
 Degrees of Freedom
 R square

Absolute Sum of Squares
 Sy.x
 Constraints
 Bottom Bottom = 0
 Top Top = 100
 One curve for all data sets Not converged
 Best-fit values
 Bottom
 Top
 LogIC50
 HillSlope
 IC50
 Span
 Std. Error
 LogIC50
 HillSlope
 95% CI (profile likelihood)
 LogIC50
 HillSlope
 IC50
 Goodness of Fit
 Degrees of Freedom
 R square
 Absolute Sum of Squares
 Sy.x
 Constraints
 Bottom Bottom = 0
 Top Top = 100
 LogIC50 LogIC50 is shared
 HillSlope HillSlope is shared
 Number of points
 # of X values 9
 # Y values analyzed 3

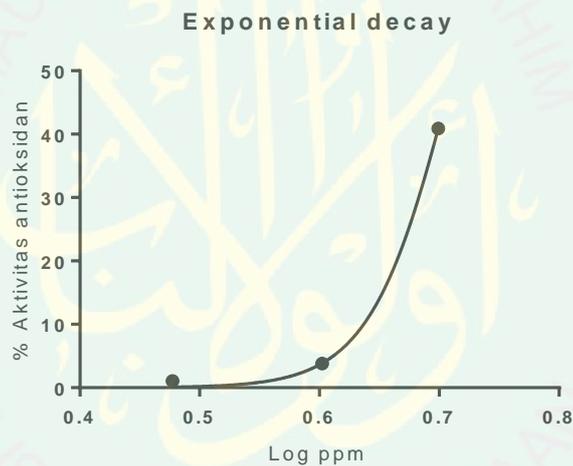


6.4 Isolat 5 (Fraksi 65-86)

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	% Aktivitas Antioksidan
3	0,5776	0,5714	1,073
4	0,5776	0,5557	3,792
5	0,5776	0,3413	40,911

Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		2 parameters different for each data set
Alternative hypothesis		2 parameters same for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		2 parameters different for each data set
F (DFn, DFd)		
Best-fit values		
Bottom	= 0	
Top	= 100	
LogIC50	0,7115	
HillSlope	12,77	
IC50	5,146	
Span	= 100	
Std. Error		
LogIC50	0,001928	
HillSlope	1,189	
95% CI (profile likelihood)		
LogIC50	0,6948 to 0,7597	
HillSlope	5,214 to ???	
IC50	4,952 to 5,751	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	1	
R square	0,999	
Absolute Sum of Squares	0,9472	
Sy.x	0,9733	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
Best-fit values		
Bottom	= 0	
Top	= 100	
LogIC50	0,7115	0,7115
HillSlope	12,77	12,77
IC50	5,146	5,146
Span	= 100	
Std. Error		
LogIC50	0,001928	0,001928
HillSlope	1,189	1,189
95% CI (profile likelihood)		
LogIC50	0,6948 to 0,7597	0,6948 to 0,7597

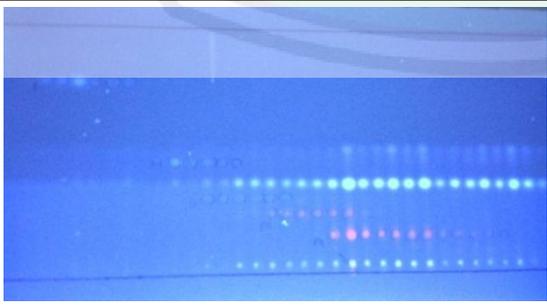
HillSlope	5,214 to ???	5,214 to ???
IC50	4,952 to 5,751	4,952 to 5,751
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		1
R square	0,999	0,999
Absolute Sum of Squares	0,9472	0,9472
Sy.x		0,9733
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
LogIC50	LogIC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
# of X values	9	
# Y values analyzed	3	

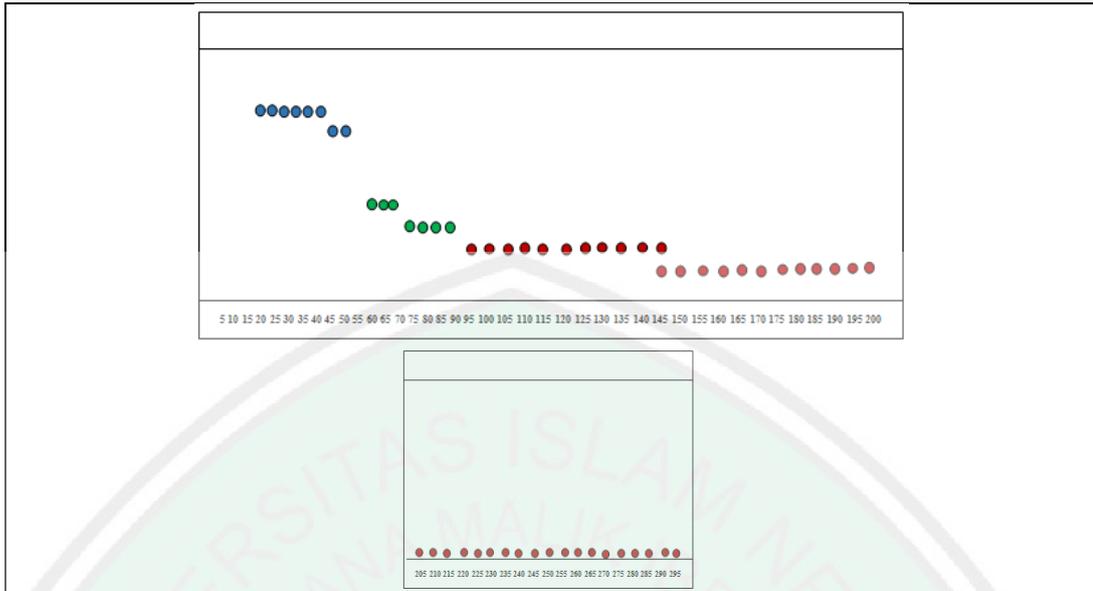


Lampiran 7 Jenis senyawa steroid yang ditargetkan

No	Jenis steroid	M (g/mol)	[M+H-H ₂ O] ⁺	Parent mass (m/z)	Daughter mass (m/z)	Sumber Referensi
1	β-sitosterol	414	397	397	160,5-161,5	Mo, 2013
2	Kampesterol	400	383	383	161,5	Fu, 2012
3	Desmosterol	384	367	367	160,5-161,5	Mardaneni, 2017
					161	Machado, 2004
4	Fukosterol	386	369	369	80,5-81,5	Mardaneni, 2017
			395	-	-	Diaz, 2007
5	Stigmasterol	412	395	395	254-255	Mardaneni, 2017
				395,4	83,1	Fu, 2012
				395	297	Mo, 2013
6	Eritrodiol	442	425	425	177	Iyani, 2017
				425,4	217,3	Pereira, 2016
7	Ergosterol (24-methylene-ergosta-5-en-3β-ol)	398	-	379	145	Pereira, 2016
8	Brassicasterol	-	-	381	255	Pereira, 2016
				381	297	Mo, 2013
9	Lupeol	426	-	409	109,1	Gobo, 2016
				409,1	137	Mo, 2013

Lampiran 8 Dokumentasi

	
<p>Gambar 1. Menimbang silika gel 10 gr</p>	<p>Gambar 2. Silika gel setelah diaktivasi</p>
	
<p>Gambar 3. Proses pembuatan bubuk silika gel</p>	<p>Gambar 4. Proses isolasi senyawa steroid menggunakan kromatografi kolom</p>
	
<p>Gambar 5. Persiapan eluen selanjutnya untuk proses isolasi</p>	<p>Gambar 6. Tiap vial ke 5 sampai 295 dimonitoring</p>
	
<p>Gambar 7. Hasil monitoring senyawa di bawah lampu UV 366 nm</p>	



Gambar 8. Ilustrasi hasil monitoring senyawa di bawah lampu UV 366 nm



Gambar 9. Hasil uji aktivitas antioksidan isolat 3



Gambar 10. Hasil uji aktivitas antioksidan isolat 2



Gambar 11. Hasil uji aktivitas antioksidan isolat 4



Gambar 12. Hasil uji aktivitas antioksidan isolat 5

