UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI KOLOM DENGAN VARIASI GRADIEN ELUEN FRAKSI ETIL ASETAT MAKROALGA *Eucheuma cottonii*

SKRIPSI

Oleh:
VIVIN ANGGRAINI
NIM. 14630041

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

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI KOLOM DENGAN VARIASI GRADIEN ELUEN FRAKSI ETIL ASETAT MAKROALGA *Eucheuma cottonii*

SKRIPSI

Oleh:
VIVIN ANGGRAINI
NIM. 14630041

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

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

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI KOLOM DENGAN VARIASI GRADIEN ELUEN FRAKSI ETIL ASETAT MAKROALGA *Eucheuma cottonii*

SKRIPSI

Oleh:
VIVIN ANGGRAINI
NIM. 14630041

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 23 November 2018

Pembimbing I	Pembimbing II
A.Ghanaim Fasya, M.Si	M. Imamudin, Lc, M.A
NIP. 19820616 200604 1 002	NIP. 197406022009011010

Mengetahui,
Ketua Jurusan

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

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI KOLOM DENGAN VARIASI GRADIEN ELUEN FRAKSI ETIL ASETAT MAKROALGA *Eucheuma cottonii*

SKRIPSI

Oleh:
VIVIN ANGGRAINI
NIM. 14630041

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 23 November 2018

Penguji Utama	**: Himmatul Barroroh, M.Si** **NIP. 19750730 200312 2 001**	(.....)
Ketua Penguji	**: Rachmawati Ningsih, M.Si** **NIP. 19810811 200801 2 010**	(.....)
Sekretaris Penguji	**: A. Ghanaim Fasya, M.Si** **NIP. 19820616 200604 1 002**	(.....)
Anggota Penguji	**: M. Imamudin, Lc, M.A.** **NIP. 197406022009011010**	(.....)

Mengetahui,
Ketua Jurusan

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

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Vivin Anggraini

NIM : 14630041

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom dengan Variasi Gradien Eluen Fraksi Etil Asetat Makroalga *Eucheuma cottonii*

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini adaah benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai 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 perbuatan tersebut.

Malang, 17 Desember 2018

Yang membuat pernyataan,

Vivin Anggraini

NIM. 14630041

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

PERSEMBAHAN

Saya persembahkan skripsi ini teruntuk:

1. **Alm. Bapak Nukhan**, kakek penulis yang saat ini ada di sisi Allah. Seseorang yang begitu menginspirasi penulis agar bisa mempunyai ketulusan hati seperti beliau. Semoga disana bapak dapat menyaksikan dan bangga kepada anaknya yang bisa mensekolahkan cucu-cucunya sampai perguruan tinggi. Seseorang yang saya tahu sangat mempriotaskan pendidikan terutama pendidikan agama. Meski saat itu saya masih kecil waktu kehilangan beliau, tapi saya percaya bahwa beliau punya cita-cita untuk bisa mensekolahkan anak-anaknya untuk sampai perguruan tinggi. Dan kini, cita-cita itu telah diwujudkan anak pertamamu pak, dengan kerja kerasnya Alhamdulillah cucu pertamamu bisa meraih gelar sarjana dan saya persembahkan ini semua untukmu.

2. **Orang tua tercinta, Bapak Misnan dan Ibu Musafa'ah.** Terima kasih atas kerja keras dan keringatnya hingga ananda bisa menuntut ilmu sampai jenjang perguruan tinggi. Meski Bapak yang hanya lulusan SD dan Ibu yang juga lulusan SMP tapi mereka ingin kedua anaknya bisa punya pendidikan yang lebih baik dari mereka. Perjuangan yang beliau lakukan dari nol hingga bisa seperti saat ini, tentu bukan hal yang mudah. Terima kasih telah mengajarkan bahwa untuk mempunyai kehidupan yang lebih baik harus punya kemampuan, kemauan dan kerja keras yang tinggi. Semua tidak akan datang dengan sendirinya. Mohon maaf jika selama ini belum bisa membuat bahagia dan bangga. Semoga suatu saat nanti ananda bisa membalas semua peluh keringat yang telah bapak dan ibu keluarkan.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis haturkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal penelitian. Shalawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW yang kita harapkan syafa'atnya di dunia dan akhirat. Selanjutnya penulis haturkan ucapan terima kasih seiring do'a dan harapan jazakumullah ahsanal jaza' kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya proposal penelitian ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Bapak Misnan dan Ibu Musafa'ah yang senantiasa memberikan Doa dan Restunya kepada penulis.
2. KH. Marzuqi Mustamar dan Nyai Hj. Saidah Mustaghfiroh selaku pengasuh Ponpes Sabilurrosyad Gasek. Terima kasih atas Doa dan Restunya kepada penulis.
3. Akhmad Dlulfikri Ramadhani selaku adik penulis dan Ibu Sulami selaku nenek penulis. Terima kasih atas dukungan kepada penulis.
4. Bapak Prof. Dr. Abdul haris, M.Ag, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Ibu Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
6. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
7. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si selaku dosen pembimbing penelitian dan dosen wali, Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si selaku dosen konsultan, Bapak M. Imamuddin, M.A selaku dosen pembimbing agama dan Ibu Himmatul Barroroh, M.Si selaku dosen penguji sripsi yang senantiasa memberikan arahan dan bimbingan dalam menyelesaikan skripsi.
8. Seluruh dosen, admin dan laboran jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

ilmu pengetahuan, wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.

9. Citra Eri Luki selaku teman sepenelitian makroalga dan teman-teman seperjuangan penelitian organik (Baits, Fitri, Una, Sofi, Paili).
10. Dzakyatur Rovidah, Faridah Nur Laili, Wenny Farida Ulfa, Siti Hartina Pratiwi dan Faiqotul Mufarrohah selaku sahabat penulis dari kecil. Terima kasih atas kebersamaanya sejak jaman TK, MI, MTs, SMA bahkan sampai saat ini. Semoga bisa terus saling support satu sama lain sampai kapanpun.
11. Teman-teman Kimia B 2014 terutama yang telah berjuang bersama, yang memberikan motivasi, informasi dan masukan terhadap penulis (Qory, Nana, Citra, Cicik, Dian, Qatrun, Widiya, Nelly, Roma, Risa, Diah, Rezha).
12. Teman-teman di kamar KB5 Ponpes Sabilurrosyad (Nabilla, Fajri, Zahroh, Lia, Kakak Yun, Devita, Siska, Dek Vicky) yang selalu memberikan semangatnya dan menemani hari-hari selama di Malang sebagai keluarga kedua.

Akhirnya dengan memohon ridho Allah SWT, semoga Allah SWT melimpahkan Rahmat dan balasan kepada semua pihak yang telah membantu hingga selesainya skripsi ini. penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, saran dan kritik dari berbagai pihak sangat diharapkan demi terwujudnya karya yang lebih baik untuk masa yang akan datang dan bisa memberikan manfaat bagi kita semua. *Aamiin ya Robbal 'aalamiin.*

Malang, Desember 2018

Penulis

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL i
HALAMAN PERSETUJUAN ii
HALAMAN PENGESAHAN iii
HALAMAN PERNYATAAN iv
HALAMAN PERSEMBAHAN v
KATA PENGANTAR vi
DAFTAR ISI viii
DAFTAR GAMBAR x
DAFTAR TABEL xi
DAFTAR LAMPIRAN xii
ABSTRAK xiii
BAB I PENDAHULUAN
1.1 Latar belakang masalah 1
1.2 Rumusan masalah 5
1.3 Tujuan penelitian 5
1.4 Batasan Masalah 5
1.5 Manfaat penelitian 6

BAB II TINJAUAN PUSTAKA
2.1 Kandungan Alga Merah *Euchema cottonii* 7
2.2 Senyawa Steroid dalam Alga Merah *Eucheuma cottonii* 8
2.3 Ekstraksi Maserasi pada Senyawa Steroid 9
2.4 Hidrolisis dan Ekstraksi Cair-Cair (Partisi) Ekstrak pekat Metanol 10
2.5 Uji Fitokimia Senyawa Steroid 12
2.6 Pemisahan Senyawa Steroid menggunakan Kromatografi Kolom 13
2.7 Uji Toksisitas Isolat Steroid dengan Metode BSLT 17
2.8 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis 20
2.9 Identifikasi Senyawa Steroid dengan FT-IR 23

BAB III METODE PENELITIAN
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian 26
3.2 Alat dan Bahan 26
3.2.1 Alat 26
3.2.2 Bahan 29
3.3 Rancangan Penelitian 27
3.4 Tahapan Penelitian 27
3.5 Pelaksanaan Penelitian 28
3.5.1 Ekstraksi Sampel dengan Pelarut Metanol 28
3.5.2 Hidrolisis dengan HCl dan Partisi dengan Etil Asetat 29
3.5.3 Uji Steroid dengan Reagen *Liberman-Burchard* 29
3.5.4 Isolasi Senyawa Steroid dengan Metoden Kromatografi Kolom 30
3.5.5 Monitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik 31

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

3.5.6 Uji Toksisitas Ekstrak Menggunakan Larva Udang *Artemia Salina* Leach 32
3.5.6.1 Penetasan Larva Udang 32
3.5.6.2 Uji Toksisitas 32
3.5.7 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan Spektrokopi UV-Vis 32
3.5.8 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan Spektrokopi FT-IR 33
3.6 Analisis Data 33

BAB IV PEMBAHASAN
4.1 Ekstraksi Sampel dengan Pelarut Metanol 34
4.2 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol dengan Etil Asetat 35
4.3 Uji Fitokimia Senyawa Steroid 36
4.4 Isolasi Steroid dengan Kromatografi Kolom dan Monitoring dengan KLTA 38
4.5 Uji Toksisitas Senyawa Steroid Menggunakan Metode BSLT 41
4.5.1 Penetasan Larva Udang 41
4.5.2 Uji Toksisitas 41
4.6 Identifikasi Steroid Menggunakan Spetroskopi UV-Vis 44
4.7 Identifikasi Steroid Menggunakan Spektroskopi FTIR 45
4.8 Pemanfaatan Alga Merah *Eucheuma cottonii* dalam Prespektif Islam 51

BAB IV PENUTUP
5.1 Kesimpulan 57
5.1 Saran 57

DAFTAR PUSTAKA 58
LAMPIRAN 64

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Alga Merah *Eucheuma cottonii*	7
Gambar 2.2	Struktur Dasar Steroid.....	8
Gambar 2.3	Struktur Senyawa Stigmasterol, β-Sitosterol, Kampesterol, Desmosterol.....	9
Gambar 2.4	Dugaan Reaksi Hidrolisis Glikosida	11
Gambar 2.5	Reaksi Antara HCl dan Natrium Bikarbonat.....	11
Gambar 2.6	Difusi Eddy	16
Gambar 2.7	Spektrum UV-Vis Isolat 1 Senyawa Steroid *E. cottonii*.....	21
Gambar 2.8	Spektrum UV-Vis Isolat 2 Senyawa Steroid *E. cottonii*.....	21
Gambar 2.9	Spektrum UV-Vis Isolat 3 Senyawa Steroid *E. cottonii*.....	21
Gambar 2.10	Spektrum UV-Vis Isolat Senyawa Steroid *E. cottonii*	22
Gambar 2.11	Spektra IR Senyawa Steroid *E. spinosum*.....	23
Gambar 2.12	Spektra IR Isolat Steroid Fraksi 1 *E. cottonii*	24
Gambar 2.13	Spektra IR Isolat Steroid Fraksi 2 *E. cottonii*	25
Gambar 4.1	Dugaan Reaksi Hidrolisis Glikosida	35
Gambar 4.2	Reaksi Antara Hcl Dan Natrium Bikarbonat.....	35
Gambar 4.3	Reaksi Antara Peraksi *Libermann Burchard* Dengan Senyawa Steroid.....	37
Gambar 4.4	Spektrum UV-Vis Isolat E	44
Gambar 4.5	Spektrum FT-IR Isolat B.....	45
Gambar 4.6	Spektrum FT-IR Isolat E.....	46
Gambar 4.7	Spektrum FT-IR Isolat F	46
Gambar 4.8	Pola Serapan O-H Stretching, Csp^3-H Stretching, Dan C=O	47
Gambar 4.9	Pola Serapan C=C Stretching, CH_2 Bending, Dan $C(CH_3)_2$ Bending.....	47
Gambar 4.10	Pola Serapan C-O-C Stretching, C-O Stretching Alkohol Sekunder Dan Primer	48
Gambar 4.11	Struktur Senyawa Steroid Hasil Isolasi Fraksi N-Butanol Menggunakan KLT Makroalga *Eucheuma Cottonii*	50

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Hasil Monitoring Kromatografi Kolom Dengan KLTA 39
Tabel 4.2 Hasil Pengamatan Mortalitas Larva Udang 42
Tabel 4.3 Nilai Toksisitas dari Larutan Uji (Modus) 43
Tabel 4.4 Perbedaan Hasil Serapan Senyawa dengan FTIR 50

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Rancangan Penelitian	64
Lampiran 2	Diagram Alir.....	65
Lampiran 3	Pembuatan Reagen dan Larutan	72
Lampiran 4	Perhitungan Rendemen.....	76
Lampiran 5	Perhitungan Rf Variasi Komposisi Eluen.....	77
Lampiran 6	Hasil Monitoring KLTA.....	79
Lampiran 7	Hasil Rendemen Kromatografi Kolom.....	80
Lampiran 8	Gambar Penelitian	82
Lampiran 9	Data Kematian Larva dan Perhitungan LC_{50} Uji Toksisitas Isolat B, Isolat E dan Isolat F	84

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

ABSTRAK

Anggraini, Vivin. 2018. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom dengan Variasi Gradien Eluen Fraksi Etil Asetat Makroalga *Eucheuma cottonii*. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: M. Imamudin, M.A; Konsultan: Rachmawati Ningsih, M.Si

Kata Kunci: Alga Merah (*Eucheuma cottonii*), Kromatografi kolom, Steroid, Uji Toksisitas

Telah dilakukan uji toksisitas terhadap senyawa steroid hasil isolasi kromatografi kolom dari Makroalga *Euchema cottoni* menggunakan metode BSLT. Isolasi dengan kromatografi kolom dilakukan dengan metode gradien eluen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil isolasi senyawa steroid menggunakan metode kromatograf kolom dengan variasi gradient euen serta tingkat toksisitas senyawa steroid yang terkandung dalam makroalga *Eucheuma cottonii*.

Isolasi senyawa steroid dari alga merah *Eucheuma cottonii* dilakukan dengan ekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak metanol dihidrolisis dengan katalis asam yaitu HCl dan dipartisi dengan pelarut etil asetat. Hasil fraksi etil asetat diuji fitokimia menggunakan reagen *Liberman Burchard*, kemudian diisolasi dengan kromatografi kolom dengan variasi gradient eluen n-heksana:etil asetat (95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30). Hasil pemisahan dimonitoring menggunakan KLTA. Senyawa steroid terbaik hasil pemisahan diuji toksisitas dengan menggunakan metode BSLT untuk mengetahui nilai LC_{50} pada konsentrasi 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm. Isolat hasil pemisahan yang diduga senyawa steroid diidentifikasi dengan menggunakan FTIR dan UV-Vis.

Hasil pemisahan dengan kromatografi kolom didapatkan 3 noda tunggal yang diduga merupakan senyawa steroid. Ketiga isolat tersebut toksik terhadap *Artemia salina* Leach dengan nilai LC_{50} masing–masing isolat B, E dan F sebesar 4,853; 5,294; dan 5,138 ppm. Identifikasi isolat menggunakan UV-Vis diperoleh panjang gelombang maksimum sebesar 202,9 nm pada isolat E. Hasil identifikasi isolat menggunakan FT-IR memberikan informasi gugus OH, Csp^3-H, C-O alkohol sekunder dan gugus gem dimetil yang menunjukkan gugus khas senyawa steroid.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

ABSTRACT

Anggraini, Vivin. 2018. Toxicity Test Isolate Steroid Results Of Chromatography Columns With Variation Of Gradient Eluent Fraction Ethyl Acetate Macroalgae *Eucheuma Cottonii.* Chemistry Department, Science and Technology Faculty, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Supervisor II: M. Imamudin, M.A; Adviser: Rachmawati Ningsih, M.Si

Keyword: Red Algae (*Eucheuma cottonii*), Colomn Chromatography, Steroid, Toxicity Test

Toxicity test was conducted on steroid compound result of isolation using column chromatography from macroalgae *Euchema cottonii* using BSLT method. Isolation by column chromatography was carried out using the eluent gradient method. This study aims to determine the results of isolation of steroid compounds using column chromatograph method with euen gradient variations and the level of toxicity of steroid compounds contained in macroalgae *Eucheuma cottonii*

Isolation of steroid compounds from macroalgae *Eucheuma cottonii* was carried out by maceration extraction using methanol solvent. Methanol extract was hydrolyzed with an acid catalyst namely HCl and partitioned with ethyl acetate solvent. Phytochemicals were tested using ethyl acetate fraction using *Libermann Burchard* reagent, then isolated by column chromatography with gradient eluent n-hexane: ethyl acetate (95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30) The results of the separation are monitored using KLTA. The best steroid compounds from the results of the separation were tested for toxicity using the BSLT method to determine the LC_{50} values at a concentration of 1, 2, 3, 4 and 5 ppm. Isolates resulting from the separation were thought to be steroid compounds identified using FTIR and UV-Vis.

The results of the separation by column chromatography obtained 3 single stains which are thought to be steroid compounds. The three isolates were toxic to *Artemia salin*a Leach with LC_{50} values of each isolate B, E and F of 4,853; 5,294; and 5.138 ppm. Identification of isolates using UV-Vis obtained a maximum wavelength of 202.9 nm in isolates E. The results of identification of isolates using FT-IR provided information on OH groups, Csp^3-H, C-O secondary alcohol and dimethyl gem groups shows a typical group of steroid compounds.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

الملخص

أنغرائيني، فيفين. ٢٠١٨. اختبار السمية لعزل الستيرويد من تحليل اللون عمود الرطب مع الاختلافات في التدرجات شاطف تجزئة أسيتات ماكروألجا الطحالب الحمراء . قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف ١: أحمد غنائم فشا، الماجستير. المشرف ٢: محمد إمام الدين، الماجستير. المستشارة: رحمواتي نينسية، الماجستير.

الكلمات الرئيسية: الطحالب الحمراء (*Eucheuma cottonii*)، تحليل اللون عمود الرطب ، الستيرويد، اختبار السمية

تم إجراء اختبار السمية على مركبات الستيرويد المعزولة من تحليل اللون عمود الرطب من ماكروألجا الطحالب الحمراء باستخدام طريقة BSLT. تم تنفيذ العزلة بواسطة عمود اللوني باستخدام طريقة التدرج الشفاف. يهدف هذا البحث إلى تحديد نتائج عزل مركبات الستيرويد باستخدام طريقة تحليل اللون عمو الرطب مع تغيرات متدرجة وشدة سمية مركبات الستيرويد الموجودة في ماكروألجا من نوع الطحالب الحمراء.

تم تنفيذ عزل مركبات الستيرويد من الطحالب الحمراء *Eucheuma cottonii* من قبل استخرا التعطين باستخدام المذيبات الميثانول. تم تحلل مستخلص الميثانول بحافز حامض وهو حمض الهيدروكلوريك وتقسيمه بمذيب أسيتات إيثيل. تم اختبار الكيميائي النباتي بواسطة جزء أسيتات إيثيل باستخدام كاشف *Liberman Burchard* ، ثم تم عزله بواسطة تحليل اللون عمود الرطب مع تداخل متدرج أسيتات إيثيل :n-hexane (٩٥: ٥، ٩٠: ١٠، ٨٥: ١٥، ٨٠: ٢٠، ٧٥: ٢٥، ٧٠: ٣٠). تتم مراقبة نتائج الفصل باستKLTA. تم اختبار أفضل مركبات الستيرويد من نتائج الفصل للسمية باستخدام طريقة BSLT لتحديد قيم LC_{50} بتركيز ١ جزء في المليون ، ٢ أجزاء في المليون ، ٣ أجزاء في المليون ، ٤ أجزاء في المليون و ٥ أجزاء في المليون. يعتقد أن العزلات الناتجة عن الفصل هي مركبات الستيرويد التي تم تحديدها باستخدام FTIR و UV-Vis.

حصلت نتائج الفصل بواسطة تحليل اللون عمود الرطب على ٣ بقع مفردة يعتقد أنها مركبات ستيرويد. كانت العزلات الثلاثة سامة لأرتيميا سالينا ليتش مع قيم LC_{50} لكل عزلة B، E و F من ٤،٨٥٣ جزء في المليون، ٥،٢٩٤ جزء في المليون، و ٥،١٣٨ جزء في المليون. التعرف على العزلات باستخدام الأشعة فالبنفسجية – Vis حصل على أقصى طول موجي ٢٠٢،٩ نانومتر في عزلات E. نتائج تحديد العزلات باستخدا FT-IR قدمت معلومات عن مجموعات– OH، Csp^3-H، C-O ومجموعات غام ديميتيل يظهر مجموعة نموذجية من مركبات الستيرويد.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Allah berfirman dalam surat an Nahl ayat 14:

وَهُوَ الَّذِي سَخَّرَ الْبَحْرَ لِتَأْكُلُوا مِنْهُ لَحْمًا طَرِيًّا وَتَسْتَخْرِجُوا مِنْهُ حِلْيَةً تَلْبَسُونَهَا وَتَرَى الْفُلْكَ مَوَاخِرَ فِيهِ وَلِتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ وَلَعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ (١٤)

" dan Dia-lah, Allah yang menundukkan lautan (untukmu), agar kamu dapat memakan daripadanya daging yang segar (ikan), dan kamu mengeluarkan dari lautan itu perhiasan yang kamu pakai; dan kamu melihat bahtera berlayar padanya, dan supaya kamu mencari (keuntungan) dari karunia-Nya, dan supaya kamu bersyukur"

Qs. An Nahl ayat 14 menjelaskan bahwa di dalam lautan terdapat karunia Allah yang berupa sumber daya alam hayati dan dengannya kita bisa mengambil manfaat dan mencari rezeki didalamnya. Alga merah atau rumput laut merupakan salah satu sumber daya alam hayati yang ada di laut yang dapat dimanfaatkan keberadannya. Salah satu jenis alga merah yaitu *Eucheuma cottonii*.

Makroalga *Eucheuma cottonii* diketahui mengandung senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif tersebut merupakan senyawa metabolit sekunder diantaranya flavonoid, saponin, steroid, triterpenoid (Lutfiyani, dkk., 2012) dan florotanin (Varier, dkk., 2013). Diantara senyawa bioaktif tersebut yaitu steroid, diketahui memiliki potensi toksisitas (Sapar, 2004). Dalam penelitiannya, Sapar (2004) melakukan uji bioaktivitas β-sitoserol yang diisolasi dari spons *Biemna triraphis* terhadap *Artemia salina* dengan nilai LC_{50} sebesar 76 ppm menunjukkan bahwa β-sitoserol mempunyai potensi toksisitas yang baik. Uji toksisitas dilakukan oleh

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Jannah, dkk. (2014) pada ekstrak kasar metanol, kloroform dan n-heksana alga coklat *Sargassum vulgare* dengan metode BSLT dihasilkan nilai LC_{50} berturut-turut adalah 139,098 ppm, 39,6343 ppm dan 39,8759 ppm. Uji fitokimia menunujukkan ketiga ekstrak tersebut mengandung senyawa steroid. Azizah (2016) melakukan uji toksisitas isolat steroid dari fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak kasar metanol alga merah *Eucheuma spinosum* dan dihasilkan nilai LC_{50} 31,589 ppm, 18,879 ppm, dan 25,978 ppm yang didapatkan dari isolat 5, 6, dan 7. Ketiga isolat tersebut merupakan isolat yang mengandung senyawa steroid setelah dilakukan pemisahan dengan metode KLTP. Berdasarkan penelitian tersebut, perlu dilakukan kajian lebih lanjut mengenai aktivitas toksisitas senyawa steroid yang terdapat pada *Eucheuma cottonii.*

Senyawa steroid dari *Eucheuma cottonii* bisa didapatkan dengan cara diisolasi. Isolasi senyawa steroid dapat dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom. Azizah (2016), melakukan isolasi senyawa steroid dengan menggunakan kromatografi kolom cara basah dan kering. Hasil pemisahan terbaik didapatkan dengan menggunakan cara basah yang menghasilkan 5 kelompok fraksi senyawa steroid dibandingkan dengan cara kering yang menghasilkan 2 kelompok steroid. Isolasi senyawa steroid yang dilakukan oleh Saputri, dkk. (2016) dengan menggunakan kromatografi kolom dengan eluen n-heksana : kloroform menghasilkan 8 fraksi senyawa. Etika (2014) mengisolasi senyawa steroid dengan kromatografi kolom dengan eluen n-heksana : etil asetat dihasilkan 5 kelompok senyawa steroid.

Mardaneni (2017) melakukan pemisahan dan identifikasi senyawa steroid pada fraksi etil asetat alga merah *E. cottonii* dengan kromatografi kolom basah

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

menggunakan berbagai eluen dan menghasilkan pemisahan yang baik pada eluen n-heksana dan etil asetat (17:3). Sehingga, isolasi senyawa steroid dapat dilakukan dengan metode kromatografi kolom cara basah dengan menggunakan eluen n-heksana : etil asetat. Perbandingan rasio sampel dan silika gel adalah yang digunakan adalah 1:150 (Tyas, 2017) dan diameter kolom yang digunakan adalah 1 cm (Mubarokah, 2017) dengan laju alir kolom 2 mL/menit (Fitri, 2017).

Tahapan isolasi dapat diawali dengan proses ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol. Metanol dipilih karena dapat melarutkan senyawa metabolit sekunder dan memiliki titik didih yang paling rendah diantara senyawa alkohol lainnya sehingga mudah diuapkan (Atun, 2014). Andriani (2015) melakukan partisi dari ekstrak kasar metanol *Eucheuma spinosum* dengan variasi beberapa pelarut dan didapatkan rendemen yang terbesar dari pelarut etil asetat dengan kadar 7,17%. Mardaneni (2017) melakukan partisi menggunakan etil asetat pada ekstrak kasar *Eucheuma cottonii* didapatkan rendemen sebesar 21,12%. Selain itu, pelarut etil asetat bersifat non polar dan akan mengikat senyawa yang memiliki kepolaran sama (Kamboj dan Sulja, 2011). Proses hidrolisis dilakukan dengan bantuan katalis HCl 2N (Wahyudi, dkk., 2011).

Fraksi etil asetat yang didapat dipisahkan dengan kromatografi kolom dengan eluen campuran n-heksana dan etil asetat dengan variasi gradient eluen 95:5 ; 90:10 ; 85:15 ; 80:20 ; 75:25 ; 70:30. Variasi gradient eluen digunakan agar senyawa terpisahkan sesuai kepolaran eluennya dan menghasilkan pemisahan senyawa steroid yang lebih banyak. Etika (2014) mengisolasi steroid menggunakan kromatografi kolom dengan variasi eluen n-heksan : etil asetat (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10), menghasilkan noda tunggal

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

pada variasi eluen 9:1, 8:2, 7:3, dan 6:4. Rahmawati (2017) juga melakukan isolasi steroid menggunakan kromatografi kolom dengan variasi komposisi eluen n-heksan : etil asetat (16:4, 17:3, 18:2) yang dielusisecara isokratik, menghasilkan 2 noda tunggal steroid dan 3 noda tunggal triterpenoid sedangkan 3 fraksi lain senyawa campuran antara steroid dan triterpenoid.

Isolat hasil kromatografi kolom dimonitoring menggunakan KLTA. Hasil penelitian Rahmawati (2017), menunjukkan eluen terbaik menggunakan KLTA adalah n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 18:2. Isolat dinyatakan positif mengandung senyawa steroid jika dalam pengujian dengan pereaksi *Liberman-burchard* dihasilkan warna hijau (Aprelia dan Suyatno, 2013) saat dilakukan penyemprotan. Uji toksisitas menggunakan metode BSLT. Uji aktivitas toksik suatu senyawa dapat dilakukan dengan menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) yang menggunakan larva udang jenis *Artemia salina* Leach sebagai bioindikator. Metode ini sering digunakan dalam uji toksisitas karena menurut Sangi (2012), mudah dikerjakan, murah, waktu deteksi singkat dan dapat dipertanggungjawabkan. Isolat steroid *Eucheuma cottonii* kemudian diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR untuk mengetahui panjang gelombang maksimum dan gugus fungsi yang terdapat pada isolat yang mengandung steroid.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana hasil isolasi senyawa steroid fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak metanol *Euchema cottoni* menggunakan metode kromatografi kolom dengan variasi gradient eluen?
2. Bagaimana hasil dari uji toksisitas isolat steroid fraksi etil asetat makroalga *Euchema cottonii* dengan menggunakan metode BSLT?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui hasil isolasi senyawa steroid fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak metanol *Eucheuma cottonii* menggunakan metode kromatografi kolom dengan variasi gradient eluen.
2. Untuk mengetahui hasil dari uji toksisitas isolat steroid fraksi etil asetat makroalga *Eucheuma cottonii* dengan menggunakan metode BSLT.

1.4 Batasan masalah

Batasan-batasan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Sampel yang digunakan adalah alga merah *Eucheuma cottoniii* yang didapatkan dari pantai Wongsorejo Banyuwangi.
2. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut metanol.
3. Hidrolisis yang dilakukan menggunakan pelarut HCl 2N dan dipartisi dengan etil asetat.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4. Isolasi senyawa steroid dari *Eucheuma cottonii* menggunakan metode kromatografi kolom basah dengan menggunakan variasi gradient eluen n-heksana : etil asetat 95:5 ; 90:10 ; 85:15 ; 80:20 ; 75:25 ; 70:30.
5. Monitoring fraksi hasil kromatografi kolom dilakukan menggunakan KLTA.
6. Uji toksisitas isolat steroid dilakukan dengan menggunakan metode BSLT.
7. Identifikasi senyawa steroid dilakukan menggunakan FT-IR dan UV-Vis.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi ilmiah, bahwa terdapat kelimpahan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak metanol alga merah *Eucheuma cottonii* yang dipartisi dengan etil asetat khususnya senyawa steroid. Peneilitian ini juga diharapkan mampu memberikan informasi mengenai cara isolasi senyawa steroid dengan menggunakan kromatografi kolom. Selain itu juga memberikan informasi mengenai nilai toksisitas dari isolat steroid yang diujikan pada larva udang *Artemia salina* dengan meggunakan metode BSLT.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kandungan Alga Merah *Eucheuma cottonii*

Uji taksonomi alga merah *Eucheuma cottonii* telah dilakukan oleh Afif, dkk. (2015). Hasil uji taksonomi berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi, *Eucheuma cottonii* mempunyai taksonomi sebagai berikut.

Kingdom : Plantae
Divisi : Rhodophyta
Kelas : Rhodophyceae
Ordo : Gigartinales
Famili : Solieracea
Genus : Euchema
Spesies : *Eucheuma cottonii*

Gambar 2.1 Alga merah *Eucheuma cottonii* (Afif, dkk., 2015)

Alga merah sebagai sumber gizi memiliki kandungan karbohidrat (gula atau *vegetable gum*), protein, sedikit lemak dan abu yang sebagian besar merupakan senyawa garam natrium dan kalium. Selain senyawa metabolit primer, alga merah juga mengandung senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, triterpenoid, dan steroid (Andriani, 2015).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

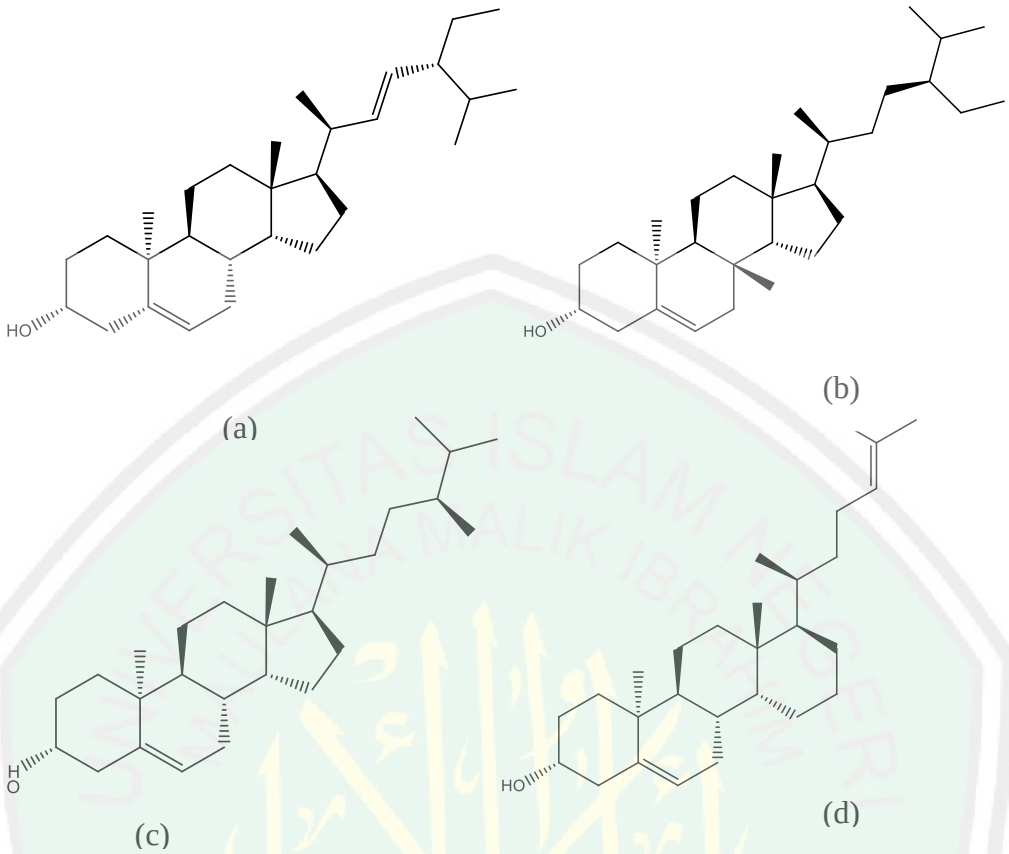
2.2 Senyawa Steroid dalam Alga Merah *Eucheuma cottonii*

Salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada alga merah *Eucheuma cottonii* adalah steroid (Andriani, 2015). Steroid adalah suatu golongan senyawa triterpenoid yang mengandung inti siklopentana perhidrofenantren yaitu dari tiga cincin sikloheksana dan sebuah cincin siklopentana. Tiga senyawa yang biasa disebut fitosterol terdapat pada hampir setiap tumbuhan tinggi yaitu: sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol (Harborne, 1987; Robinson, 1995).

Gambar 2.2 Struktur Dasar Steroid (Kristanti,dkk., 2008)

Mardaneni (2017) melakukan identifikasi senyawa steroid pada fraksi etil asetat alga merah *Eucheuma cottonii*. Identifikasi dilakukan menggunakan UV-Vis dan LC-MS/MS menunjukkan senyawa steroid yang berhasil diidentifikasi adalah β-sitosterol, stigmasterol, fukosterol, kampesterol, dan desmosterol. Sari (2017) melakukan isolasi steroid pada fraksi n-butanol dan diidentifikasi menggunakan UV-Vis dan LC-MS/MS. Senyawa steroid yang berhasil diidentifikasi adalah β-sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol. Strukturnya senyawa steroid tersebut dapat dilihat pada gambar 2.3.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



Gambar 2.3 (a) Struktur senyawa stigmasterol (b) Struktur senyawa β-sitosterol (c) struktur senyawa kampesterol (d) Struktur senyawa Desmosterol (Mardaneni, 2017)

2.3 Ekstraksi Maserasi pada Senyawa Steroid

Senyawa steroid yang terdapat dalam *Eucheuma cottonii* masih bercampur dengan senyawa lain, sehingga untuk mendapatkan senyawa steroid perlu dilakukan maserasi. Metode ini banyak digunakan karena aman digunakan dan dapat mengantisipasi senyawa steroid yang tidak tahan panas. Proses ini sangat menguntungkan dalam proses isolasi bahan alam karena perendaman mampu memecah dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel, sehingga senyawa metabolit sekunder akan larut dalam pelarut organik. (Kristanti, dkk., 2008).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

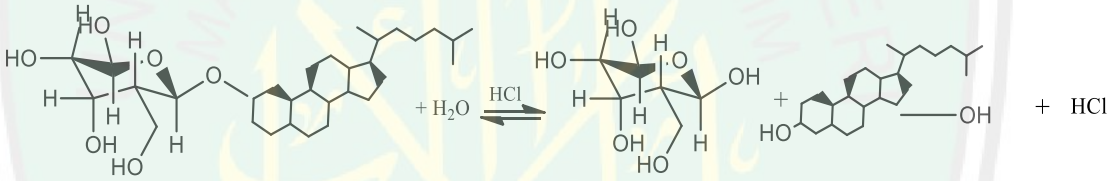
Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam tersebut (Indrayani, dkk., 2006). Steroid merupakan senyawa yang bersifat nonpolar. Namun, di alam steroid berada dalam bentuk glikosidanya (terikat dengan gugus gula), sehingga proses ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut yang bersifat semipolar atau polar (Kristanti, dkk., 2008). Ekstraksi maserasi biasanya dilakukan menggunakan pelarut organik seperti metanol atau etanol. Pada penelitian seringkali digunakan pelarut metanol untuk melakukan ekstraksi karena metanol memiliki titik didih yang lebih rendah dibandingkan etanol, sehingga pelarut metanol akan lebih mudah untuk diuapkan (Atun, 2014). Ekstraksi maserasi *Eucheuma cottonii* menggunakan metanol menghasilkan rendemen sebesar 15,5% (Fitri, 2017). Sedangkan pada penelitian yang dilakukan Sharo, dkk. (2013) yang menggunakan pelarut n-heksana diperoleh rendemen 0,78% dan pelarut etanol diperoleh rendemen 1,22%.

2.4 Hidrolisis dan Ekstraksi Cair-Cair (Partisi) Ekstrak Pekat Metanol

Hidrolisis dapat didefinisikan sebagai proses dekomposisi kimia yang terjadi dengan adanya pemutusan ikatan glikosida yang menjadi penghubung antar monomer melalui suatu reaksi menggunakan air sehingga terbentuk bagian-bagian yang lebih sederhana (Adhitama, dkk., 2012). Hidrolisis berfungsi 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).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Hidrolisis dilakukan dengan penambahan katalis asam untuk mempercepat reaksi pemutusan. Penelitian ini menggunakan HCl 2 N sebagai agen penghidrolisis. Pemilihan HCl yang tergolong sebagai asam kuat ini lebih mudah melepaskan proton H^+ secara sempurna dalam air. Semakin banyak proton H^+ yang dilepas, semakin mudah dalam memutus ikatan glikosida. Jika asam lemah yang digunakan sebagai agen penghidrolisis, maka lebih sukar untuk melepaskan ion H^+ (terionisasi sebagian) (Handoko, 2006). Dugaan reaksi yang terjadi pada saat proses hidrolisis sebagai berikut:



Gambar 2.4 Dugaan reaksi hidrolisis glikosida (Mardiyah, 2012)

Setelah proses pemecahan ikatan glikon dan aglikon perlu dilakukan penetralan dengan menggunakan adalah Natrium bikarbonat. Penetralan dilakukan karena glikosida bersifat stabil pada kondisi netral (Fessenden dan Fessenden, 1986). Berikut adalah reaksi penetralan antara asam klorida dan natrium bikarbonat:

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

Gambar 2.5 Reaksi antara HCl dan natrium bikarbonat (Mardiyah, 2012)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Setelah dilakukan hidrolisis, dilanjutkan proses partisi menggunakan etil asetat. Berdasarkan penelitian Mardaneni (2017), partisi yang dilakukan dengan pelarut etil asetat diperoleh rendemen sebesar 21,12% dan senyawa yang berhasil diidentifikasi dari fraksi etil asetat antara lain β-sitosterol, stigmasterol, fukosterol, desmosterol dan kampesterol. Sedangkan Mubarokah (2017), melakukan patisi dengan pelarut petroleum eter menghasilkan rendemen sebesar 9, 25%. Senyawa steroid yang berhasil diidentifikasi dari fraksi petroleum eter antara lain β-sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol (Baderos, 2017).

2.5 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa steroid terdapat pada alga merah *Eucheuma cottonii*. Metode yang digunakan adalah dengan pereaksi *Liberman Burchard* (kristanti, dkk., 2008). *Liberman 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 steroid mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat yang akan membentuk garam dan mengalami perpanjangan konjugasi dengan memberikan warna hijau kebiruam dan violet (Robinson, 1995). Dengan reagen yang ditambahkan, isolat yang mengandung senyawa steroid akan menunjukkan perubahan warna menjadi hijau sampai biru (Auterhoof dan Kovar, 1987).

Andriani (2015) dan Mardaneni (2017) menyebutkan bahwa hasil fraksi etil asetat *E. cottonii* yang ditambahkan dengan pereaksi *Liberman Burchard* menghasilkan warna biru-hijau yang menandakan fraksi etil asetat mengandung senyawa steroid.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

2.6 Pemisahan Senyawa Steroid menggunakan Kromatografi Kolom

Isolasi senyawa steroid dapat dilakukan menggunakan kromatografi kolom. Metode ini digunakan untuk memisahkan suatu sampel yang berupa campuran dengan berat beberapa gram. Prinsip dasar kromatografi kolom adalah suatu pemisahan yang didasarkan pada prinsip adsorpsi. Pemisahan dapat dilakukan dengan meletakkan sampel-sampel pada ujung atas kolom dan pelarut yang digunakan dialirkan secara terus menerus. Eluen/pelarut akan melewati kolom dengan adanya gravitasi bumi atau karena bantuan tekanan (Kristanti, dkk., 2008).

Pemilihan fasa gerak merupakan langkah penting untuk menentukan keberhasilan isolasi senyawa. Eluen yang digunakan dalam isolasi senyawa dalam kromatografi kolom bervariasi, sesuai dengan kebutuhan. Etika (2014) mengisolasi senyawa steroid dari daun mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) menggunakan kromatografi kolom. Isolasi dilakukan dengan melakukan ekstraksi menggunakan metanol dan difraksinasi dengan n-heksana. Eluen yang digunakan untuk isolasi adalah campuran eluen n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 dan 0:10). Hasil isolasi diperoleh 5 noda tunggal pada variasi eluen 9:1, 8:2, 7:3 dan 6:4. Rahmawati (2017) mengisolasi senyawa triterpenoid dan steroid fraksi petroleum eter ekstrak metanol dari alga merah *Eucheuma spinosum* dengan perbandingan eluen n-heksana dan etil asetat 18:2, 17:3, 16:4, Hasil isolasi dihasilkan eluen terbaik pada perbandingan eluen 18:2 dengan menghasilkan 5 noda tunggal yaitu 2 noda steroid dan 3 noda triterpenoid dan sisanya senyawa campuran keduanya.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Kedua penelitian tersebut dilakukan dengan metode elusi secara isokratik dimana selama proses elusi menggunakan fase gerak dengan polaritas tetap.

Penelitian ini menggunakan campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 95:5, 90:10. 85:15, 80:20. 75:25, dan 70:30 yang dilakukan dengan menggunakan metode elusi gradient, yaitu selama elusi menggunakan fasa gerak yang berubah-ubah polaritasnya. Pemisahan dimulai fase gerak yang non polar kemudian berubah ke pelarut yang polar. Variasi eluen yang cenderung bersifat non-polar dikarenakan senyawa steroid yang bersifat non polar. Senyawa yang bersifat non polar akan ikut bersama dengan laju eluen sedangkan senyawa yang bersifat polar akan tertahan dalam kolom, karena silika yang digunakan bersifat polar. Silika gel yang merupakan fase diam (adsorben) memiliki gugus silanol pada permukaannya. Gugus hidroksil pada silanol ini berpotensi kuat dalam membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa yang akan dipisahkan (Noviyanti, 2010). Semakin kuat ikatan hidrogen antara silika dan senyawa yang akan dipisahkan, maka semakin kuat akan tertahan pada fase diam/silika. Fase diam yang digunakan pada proses pemisahan kromatografi kolom adalah silika gel G-60 (0,063 – 0,200 mm).

Pemisahan yang baik dengan menggunakan kromatografi kolom didukung oleh efisiensi kolom yang tinggi. Menurut Rubiyanto (2013), terdapat dua teori yang menjelaskan efisiensi kinerja dari kromatografi yaitu teori piring dan teori laju. *Plate theory* atau teori piring mengasumsikan bahwa kolom kromatografi seperti sebuah kumpulan pelat teoritis, dimana terjadi kesetimbangan pemisahan antara fase diam dan fase gerak ketika solut bergerak melalui kolom sampai pada akhirnya didapatkan distribusi komponen-komponen campuran yang akan terelusi

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

sepanjang kolom. Teori plat dapat diartikan bahwa sepanjang kolom terjadi proses ekstraksi sebanyak N kali. Semakin besar harga N maka semakin efisien pula pemisahan. Dengan menggunakan variasi gradient eluen akan memungkinkan terjadinya proses ekstraksi yang lebih banyak karena terdapat beberapa komposisi pelarut dengan kepolaran yang berbeda. Efisiensi pemisahan dapat juga dinyatakan dalam bentuk parameter lain yaitu HETP (*Height Equivalent to a Theoritical Plate*) yang diformulasi sebagai berikut (Hendayana, 2010).

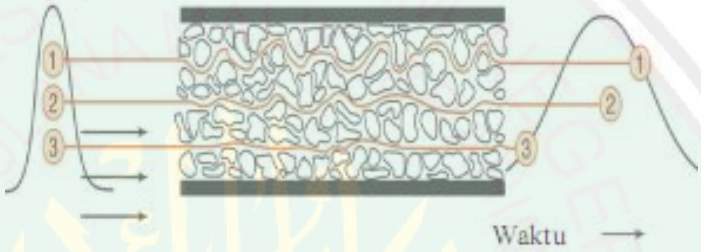
$$H = \frac{L}{N}$$

L menyatakan panjang kolom dalam sentimeter. Kebalikan dari harga N, semakin kecil harga HETP semakin efisien. Pada teori piring, harga N dan H konstan bila L konstan, sedangkan pada teori laju, H bergantung pada laju fase gerak. Faktor lain yang juga berpengaruh terhadap efisiensi kolom yaitu adanya difusi Eddy atau efek perbedaan jarak yang dilalui oleh molekul yang satu dengan yang lain disebabkan perbedaan bentuk, ukuran partikel-partikel pengisi kolom, cara pengisisan kolom, dan diameter dari kolom (Mabrouk, 2013).

Metode elusi gradient menggunakan komposisi fase gerak yang diubah-ubah secara terprogram saat pengisian kolom. Cara pengisian kolom seperti ini dapat menyebabkan perbedaan waktu keluar dalam proses pemisahan akibat adanya difusi Eddy. Solut dan fasa gerak dapat berinteraksi dengan sisi polar dari fasa diam. Pemisahan terjadi karena adanya perbedaan kekuatan adsorpsi solut terhadap fasa diam. Komposisi pelarut yang diubah-ubah memiliki tingkat kepolaran yang berbeda, sehingga solut yang memiliki adsorpsi rendah akan terbawa oleh eluen atau fase gerak yang memiliki kepolaran sama untuk melintasi fasa diam dan solut yang memiliki kepolaran tinggi akan tertahan dan membentuk

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

ikatan dengan fase diam (teradsorpsi di permukaan penyangga). Hal ini menyebabkan solut memiliki waktu yang berbeda-beda untuk melewati fasa diam tergantung tingkat kepolaran dari eluen atau fasa gerak yang membawanya, sehingga senyawa diharapkan dapat terpisah satu persatu sesuai dengan kepolarannya. Faktor difusi Eddy dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 2.6 Difusi Eddy (Mabrouk, 2013)

Selain fasa gerak, terdapat hal lain yang menjadi faktor untuk memaksimalkan proses pemisahan pada kromatografi kolom, seperti ukuran kolom, laju alir dan rasio sampel dengan silika gel. Mubarokah (2017) dalam penelitiannya mengisolasi senyawa steroid dan triterpenoid menggunakan variasi diameter kolom 2, 1.5 dan 1 cm. Resolusi terbaik didapatkan pada pemisahan dengan menggunakan diameter kolom 1 cm. Fitri (2017) melakukan isolasi steroid dan triterpenoid menggunakan kromatografi kolom variasi laju alir 1 mL/menit, 1,5 mL/menit dan 2 mL/menit. Laju alir terbaik untuk pemisahan didapatkan pada 2 mL/menit. Tyas (2017) melakukan isolasi steroid dan triterpenoid menggunakan kromatografi kolom dengan variasi rasio sampel dan silika gel (1:50, 1:100, 1:150). Hasilnya didapatkan pemisahan terbaik menggunakan rasio sampel dan siliki gel dengan perbandingan 1:150. Pada

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

penelitian ini akan digunakan diameter kolom 1 cm dan rasio sampel dengan silika gel perbandingan 1:150.

Monitoring hasil isolasi menggunanakan kromatografi kolom dapat dilakukan dengan menggunakan KLTA. Teknik pemisahan KLT menggunakan prinsip distribusi suatu senyawa pada fasa diam dan fasa gerak yang didasarkan pada perbedaan kepolaran dengan menggunakan plat KLT yang terdapat lapisan tipis di atasnya yaitu plat silika gel F_{254} ditambahkan indikator fluorosensi yang dapat membantu kenampakan bercak berwarna pada lapisan tersebut. Indikator fluorosensi merupakan senyawa yang dapat memancarkan sinar dengan lampu UV (Gritter, 1991).

Berdasarkan penelitian Rahmawati (2017) eluen terbaik pada proses pemisahan senyawa triterpenoid dan steroid dari alga merah *Eucheuma cottonii* adalah n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 18:2. Eluat semprot menggunakan pereaksi *Liberman-Burchard*, lalu dilihat dibawah lampu UV pada panjang gelombang 366 nm. Warna hijau menandakan isolat mengandung senyawa steroid (Aprelia dan Suyatno, 2013). Identifikasi dari senyawa yang telah terpisah menggunakan nilai Rf. Harga Rf dapat ditentukan berdasarkan perbandigan antara jarak senyawa yang terelusi dengan jarak pelarut yang mengelusi.

2.7 Uji Toksisitas Isolat Steroid dengan Metode *Brine Shir*mp Lethality Test (BSLT)

Uji toksisitas dengan menggunakan larva *Artemia Salina* L. atau uji BSLT merupakan suatu metode skrining awal untuk menentukan sifat sitotoksik suatu

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

ekstrak ataupun senyawa. Prinsip uji toksisitas adalah bahwa komponen bioaktif selalu bersifat toksik jika diberikan dengan dosis tinggi dan menjadi obat pada dosis rendah. Penggunaan larva *Artemia Salina* L. sebagai bioindikator pertama kali dilakukan pada tahun 1956, kemudian penggunaannya meluas untuk toksin-toksin alami dan sebagai skrining umum untuk substansi bioaktif yang terdapat pada ekstrak tanaman (Meyer dkk., 1982).

Metode pengujian dengan larva *Artemia Salina* L. merupakan cara yang paling efektif dan sederhana karena ketersediaan telur-telur udang yang mudah menetas, pertumbuhannya cepat dan relatif mudah pengaturan populasinya pada kondisi laboratorium. Pengembangan metode ini didasarkan pada sifat khas larva udang yang dapat menerima segala jenis zat dan bahan tanpa seleksi terlebih dahulu, pengerjaannya mudah, cepat serta menggunakan sampel yang relatif sedikit. Selain digunakan sebagai pendeteksi komponen yang dapat membunuh kanker maupun hama, metode ini dapat juga digunakan sebagai metode penapisan awal untuk menemukan komponen antikanker pada tumbuhan tingkat tinggi (Mclaughlin, 1991 dan Meyer, 1982).

Senyawa metabolit sekunder akan bekerja secara toksik terhadap tubuh larva udang *Artemia salina.* Menurut Manahan (2003), toksik atau racun merupakan suatu zat yang berbahaya bagi kehidupan organisme karena efeknya dapat merusak jaringan, organ atau proses biologis di dalam tubuh. Suatu senyawa dapat dikatakan toksik atau beracun bergantung organisme yang terpapar, jalur paparan dan dosis atau efeknya terhadap tubuh organisme. Jalur paparan racun dapat melalui kulit, pernapasan dan pencernaan. Beberapa senyawa membutuhkan dosis tinggi namun ada pula senyawa dengan dosis yang rendah sudah bisa

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

menjadi racun bagi organisme. Dosis atau tingkat toksisitas dari senyawa steroid dapat diketahui dengan menentukan nilai LC_{50} (konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% larva). Apabila harga LC_{50} lebih kecil dari 1000 ppm dikatakan toksik, sebaliknya apabila harga LC_{50} lebih besar dari 1000 ppm dikatakan tidak toksik. Semakin kecil harga LC_{50} maka semakin toksik suatu senyawa (Meyer, dkk., 1982).

Analisis data uji toksisitas dengan metode BSLT biasanya dilakukan dengan analisis probit untuk menghitung nilai LC_{50}. Analisis dengan model probit merupakan kependekan dari *Probability Unit*. Penggunaan analisis regresi probit ini sering digunakan untuk menguji daya racun suatu jenis pestisida terhadap lhama atau penyakit, sehingga bermanfaat untuk menentukan tingkat dosis terhadap persentase kematian hama yang diinginkan (Lenny, 2006). Analisis probit dalam pengujian biologis digunakan untuk mengetahui respon obyek yang diteliti oleh adanya stimuli (hewan uji) dengan mengetahui respon berupa mortalitas. Pendugaan nilai toksisitas insektisida terhadap serangga hama diukur dengan nilai LC_{50}, yaitu suatu konsentrasi atau dosis yang tepat yang dapat menyebabkan kematian 50% hewan yang diuji (Moekasan, 1993).

Senyawa metabolit sekunder di dalam tubuh larva udang *Artemia salina* akan bersifat toksik dengan cara menghambat kinerja enzim seperti RNA *polymerase* dan Na^+/K^+ *ATPase* sehingga merusak proses biologis di dalam tubuh larva udang. RNA *polymerase* merupakan enzim yang berguna dalam pemisahan untai DNA dan menggabungkan nukleotida-nukleotida RNA. Apabila enzim RNA *polymerase* dihambat, maka RNA *polymerase* tidak dapat memperpanjang nukleotida-nukleotida RNA dan sintesis protein di DNA tidak dapat terbentuk.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Sedangkan Na^+/K^+ *ATPase* berperan transport ion. Apabila enzim tersebut dihambat, maka ion Na^+ tidak dapat keluar dari sel sehingga akan menyebabkan protein membran integral menggembung dan pecah. Hal inilah yang dapat menyebabkan larva udang akan mati (Budaraga, 2016).

Afif (2015) melakukan uji toksisitas pada ekstrak kasar makroalga *E. cottonii* yang dipartisi menggunakan etil asetat didapatkan nilai LC_{50} sebesar 143,4 ppm. Jannah (2014) melakukan uji toksisitas pada ekstrak n-heksan yang mengandung senyawa steroid menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 39,8759 ppm. Penelitian Azizah (2016) melakukan uji toksisitas pada senyawa steroid fraksi petroleum eter makroalga *E. spinosum* dengan menggunakan metode BSLT menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 31, 589 ppm, 18,8 ppm, dan 25,978 ppm pada masing-masing isolat 1, 2 dan 3.

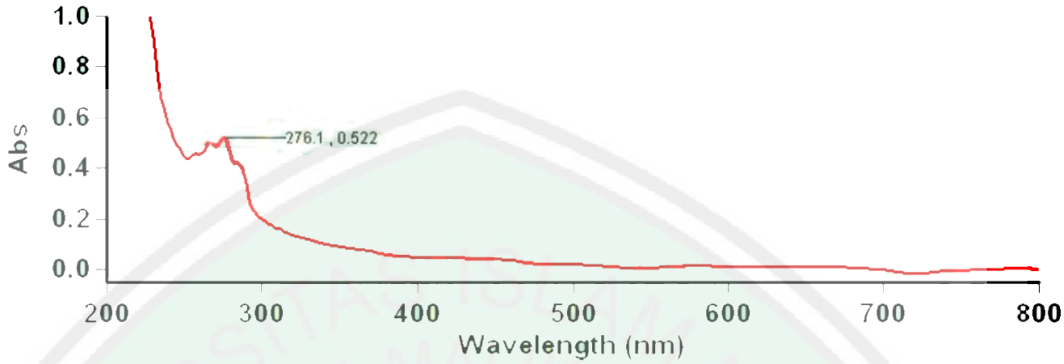
2.8 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis.

Prinsip dari spektrofotometer UV-Vis adalah adanya transisi elektronik suatu molekul yang disebabkan oleh peristiwa absorbsi energi berupa radiasi elektromagnetik pada frekuensi yang sesuai oleh molekul tersebut (Gandjar dan Rohman, 2007). Absorbsi radiasi oleh sampel diukur oleh detektor pada berbagai panjang gelombang dan diinformasikan ke perekam untuk menghasilkan spektrum. Spektrum ini akan memberikan informasi penting untuk identifikasi adanya gugus kromofor (Hendayana, 2006).

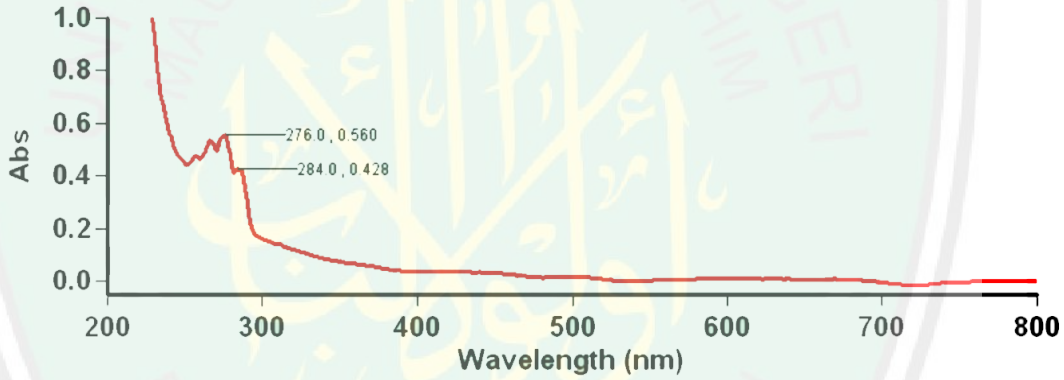
Laili (2016) melakukan isolasi senyawa steroid dari *E.spinosum* dengan menggunakan KLTP dan didapatkan 3 isolat senyawa steroid. Ketiga senyawa yang diidentifikasi menggunakan UV-Vis memiliki serapan maksimum pada

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

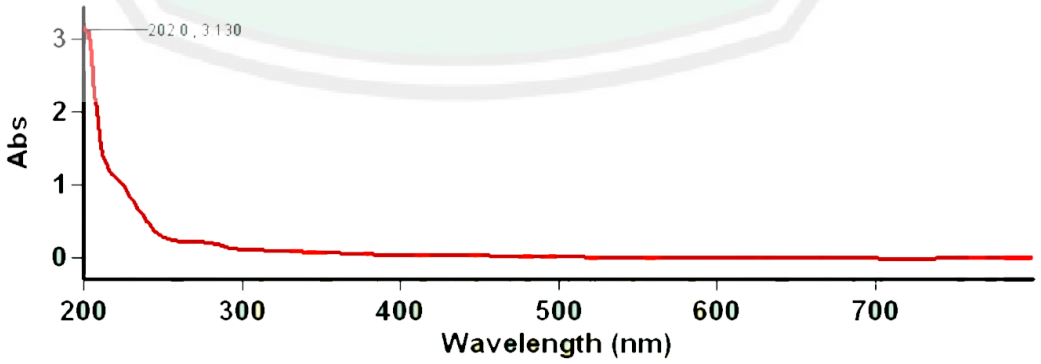
panjang gelombang 276,1 nm pada isolat 1, 276,0 nm dan 284,0 nm pada isolat 2 dan 202,0 nm pada isolat 3. Spektra ditunjukkan pada gambar berikut.



Gambar 2.7 Spektrum UV-Vis isolat 1 senyawa steroid *E.spinosum* (Laili, 2016)



Gambar 2.8 Spektrum UV-Vis isolat 2 senyawa steroid *E. spinosum* (Laili, 2016)

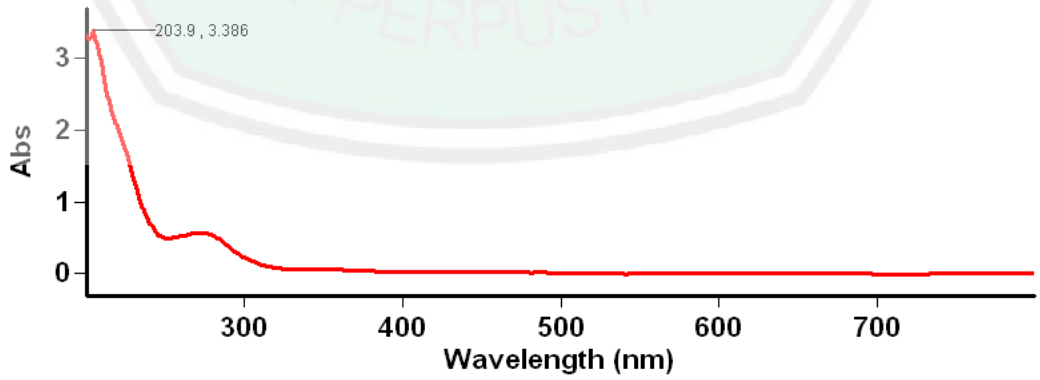


Gambar 2.9 Spektrum UV-Vis isolat 3 senyawa steroid *E. spinosum* (Laili, 2016)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Spektrum isolat 1 menunjukkan adanya serapan maksimum pada panjang gelombang 276,1 nm diduga akibat adanya transisi elektron dari π-π^*, yang disebabkan adanya golongan senyawa yang memiliki cincin aromatis seperti ikatan C≡C terkonjugasi. Spektrum isolate 2 menunjukkan adanya dua puncak serapan yaitu pada panjang gelombang 276,0 nm dan 284,0 nm yang menunjukkan adanya senyawa steroid hasil isolasi ini memiliki ikatan rangkap terkonjugasi. Spketrum isolat 3 menunjukkan adanya serapan maksimum pada panjang gelombang 202,0 nm yang menandakan adanya ikatan C≡C tidak terkonjugasi.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Sari (2017) yang melakukan isolasi senyawa steroid menggunakan kromatografi lapis tipis 2 dimensi pada alga merah *E. cottonii*, menghasilkan serapan maksmimum pada panjang gelombang 203,9 nm dan 273 nm pada isolat yang diidentifikasi menggunakan UV-Vis. Senyawa steroid juga diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS dan menunjukkan adanya senyawa β-sitosterol. Spektrum UV-Vis ditunjukkan pada gambar berikut.



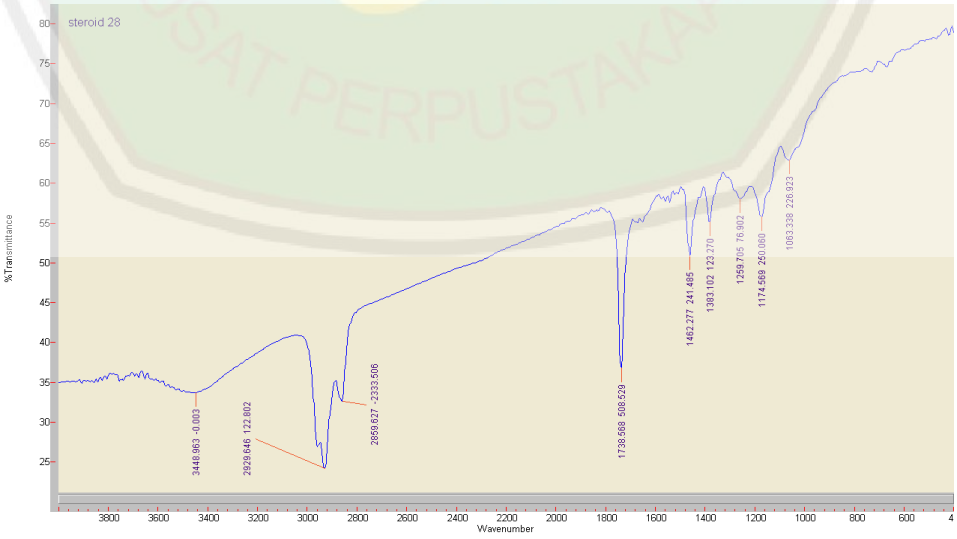
Gambar 2.10 Spektrum UV-Vis senyawa steroid *E. cottonii* (Sari, 2017)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

2.9 Identifikasi Senyawa Steroid dengan FT-IR

Spektroskopi Infra Merah (IR) merupakan instrument yang digunakan untuk identifikasi suatu senyawa berdasarkan serapan yang ditimbulkan oleh vibrasi molekul (Panji, 2012). Identifikasi menggunakan FT-IR hanya akan memberikan informasi mengenai gugus fungsi berdasarkan panjang gelombang. Bentuk pita dan intensitas. Steroid yang diidentifikasi dengan FT-IR akan memberikan serapan yang khas untuk gugus fungsi OH, C-O alcohol, C=C, dan CH_3. Hasil identifikasi steroid akan dinyatakan berhasil jika gugus fungsi yang telah disebutkan menimbulkan serapan pada daerahnya masing-masing (Mulyani, dkk., 2013).

Solikah (2016) melakukan isolasi senyawa steroid pada alga merah *Eucheuma spinosum* dengan metode kromatografi kolom. Hasil isolasi diidentifikasi menggunakan IR. Berikut spektra dari senyawa steroid.

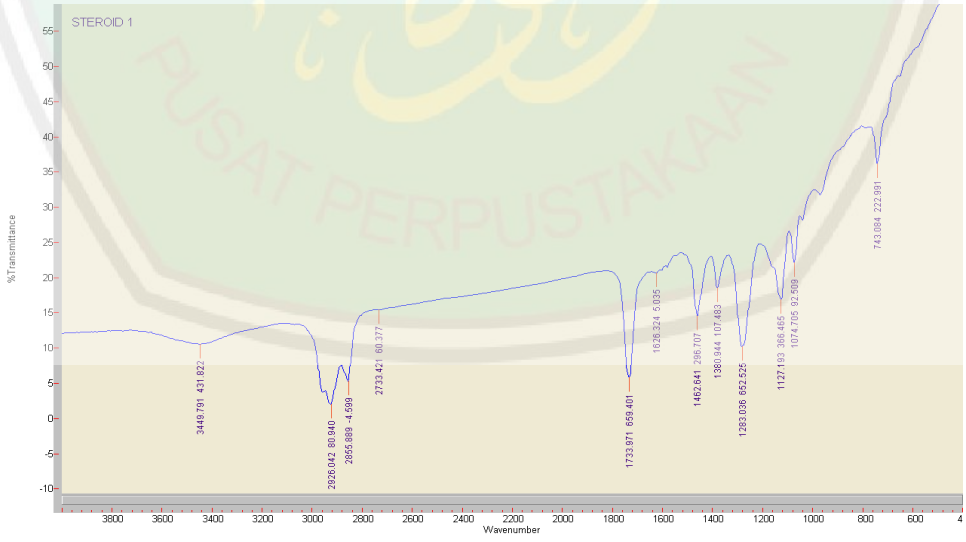


Gambar 2.11 Spektra IR senyawa steroid dari alga merah (*Eucheuma spinosum*) (Solikah, 2016)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

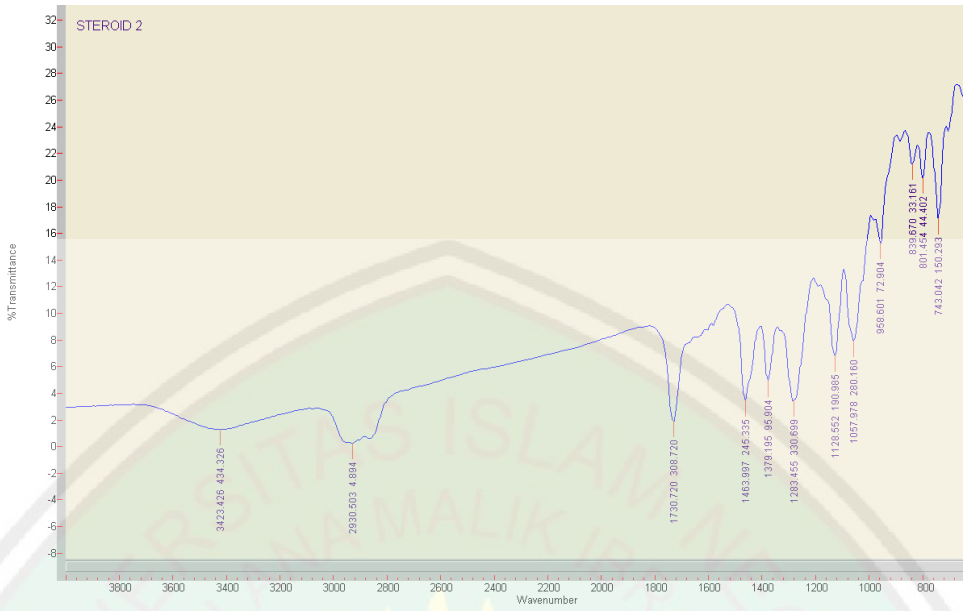
Berdasarkan hasil spektra dapat diinterpretasikan bahwa isolat tersebut memiliki gugus OH pada bilangan 4338,963 cm^{-1}, terdapat gugus C-H pada bilangan 2929,645 cm^{-1} dan pada bilanga 2859,627 cm^{-1} menunjukkan $–CH_2$-. Pada bilangan 1738,568 cm^{-1} menunjukkan serapan C=O, pada bilangan 1462,227 cm^{-1} menunjukkan serapan C-C serta pada bilangan 1383,102 menunjukkan serapan $–C(CH_3)_2$. Serapan gugus alkohol sekunder ditunjukkan pada bilangan 1259,569 cm^{-1}, pada bilangan 1174,569 menunjukkan serapan C-O-C dan pada bilangan 1063,338 cm^{-1} menunjukkan adanya C-O alkohol sekunder.

Rahmawati (2017) melakukan isolasi senyawa steroid makroalga *E. cottonii* menggunakan kromatografi kolom. Hasil pemisahan didapatkan 2 fraksi isolat steroid. Kedua isolate diidentifikasi dengan menggunakan FT-IR. Hasil spektra ditunjukkan pada Gambar 2.12 dan 2.13.



Gambar 2.12. Spektra IR isolat steroid fraksi 1 *E. cottonii* (Rahmawati, 2017)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



Gambar 2.13 Spektra IR isolat steroid fraksi 2 *E. cottonii* (Rahmawati, 2017)

Hasil spektrum inframerah menunjukkan senyawa steroid fraksi 1 memiliki serapan yang mirip dengan serapan OH (strech) pada 3446,79 cm^{-1}, C – H ulur pada 2937,59 cm^{-1} dan 2868,22 cm^{-1}, C=O pada 1670,35 cm^{-1} dikuatkan dengan adanya C=C pada 1614,42 cm^{-1}, C–H tekuk pada 1460,11 cm^{-1} dan – $C(CH_3)_2$ pada 1379,10 cm^{-1} yang merupakan steroid dengan gugus C=C, C=O, O – H, dan –$C(CH_3)_2$ (Astuti, 2014). Fraksi kedua memiliki spektrum yang berbeda dengan fraksi pertama. Berdasarkan hasil identifikasi dengan FTIR steroid fraksi 2 serapan gugus yang dihasilkan memiliki kemiripan dengan serapan gugus O – H pada 3421,8 cm^{-1}, vibrasi ulur –CH_3 pada 2926,4 cm^{-1}, C=C pada 1625,8 cm^{-1}, C–H pada 1460,9 cm^{-1}, -$C(CH_3)_2$ pada 1382,2 cm^{-1}, C–O pada 1097,3 cm^{-1} yang merupakan steroid dengan gugus hidroksil (Aprelia, 2013). Sehingga dari kedua fraksi tersebut diduga merupakan jenis senyawa steroid yang berbeda.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret 2018 – Juli 2018 di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Kimia Instrumen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, neraca analitik, mortar, pisau, kertas saring, corong buchner *vacuum*, *rotary evaporator vacuum*, shaker, corong pisah, desikator, oven, *hotplate*, kolom kromatografi, statif, bejana pengembang, pipa kapiler, lemari asap, spektrofotometer UV-Vis dan spektrofotometer FTIR.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Alga merah *Euchema cottonii* yang berasal dari pantai Wonosorejo Banyuwangi. Bagian yang digunakan adalah seluruh bagian Alga merah *Euchema cottonii*. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva udang *Artemia salina*.

Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah metanol 99,9%, etil asetat p.a , KBr, HCl 2 N, aquades, n-heksana 99%, $NaHCO_3$ jenuh, asam asetat anhidrat, kloroform p.a, H_2SO_4 98%, DMSO, ragi roti, air laut, silika Gel G-60 (0,063-0,200 mm), glass wool dan plat silika gel F_{254}.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian eksperimental di laboratorium. Sampel yang diambil adalah rumput laut jenis Alga Merah *Eucheuma cottonii.* Alga merah *Eucheuma cottoniii* yang telah berbentuk serbuk kering, diekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut metanol 99,9% lalu disaring dengan *rotary evaporator vacum*. Ekstrak metanol dihidrolisis dengan menggunakan HCl 2N dan dinetralkan dengan $NaHCO_3$ jenuh. Kemudian dipartisi dengan pelarut etil asetat p.a dan dipekatkan dengan *rotary evaporator vacum.* Selanjutnya ekstrak hasil partisi diisolasi dengan kromatografi kolom menggunakan gradien eluen campuran n-heksana dan etil asetat (95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30). Eluat yang didapatkan ditampung dalam botol vial lalu fraksi dimonitoring menggunakan KLT Analitik dengan eluen n-heksana dan etil asetat (17:3), spot dengan nilai Rf yang sama disemprot dengan pereaksi *Liberman-Burchard* (LB). Spot yang menghasilkan warna hijau menunjukkan adanya senyawa steroid. Fraksi yang menghasilkan spot warna sama digabung lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Selanjutnya isolat steroid yang didapat dilakukan uji toksisitas untuk mengetahui tingkat toksisitas isolat terhadap larva udang melalui nilai LC_{50}. Isolat steroid kemudian diidentifikasi dengan Spektroskopi FT-IR dan Spektroskopi UV-Vis.

3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan-tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu:

1. Ekstraksi sampel dengan pelarut metanol
2. Hidrolisis dengan HCl 2N dan partisi dengan etil asetat

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

3. Uji steroid dengan reagen *Liberman-Burchard*
4. Isolasi senyawa steroid dengan metode kromatografi kolom
5. Monitoring dengan kromatografi lapis tipis analitik
6. Uji toksisitas hasil isolate steroid dengan metode BSLT
7. Identifikasi senyawa steroid dengan Spektroskopi Uv-Vis
8. Identifikasi senyawa steroid dengan Spektroskopi FT-IR

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Ekstraksi Sampel dengan Pelarut Metanol (Anam, 2015)

Ekstraksi komponen aktif pada sampel dilakukan dengan ekstraksi maserasi atau perendaman dengan pelarut metanol 99,9%. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan karena dimungkinkan bahwa kandungan senyawa pada tanaman sudah cukup banyak yang terekstrak pada masing-masing tahapnya. Serbuk tanaman alga merah *Eucheuma Cottonii* ditimbang sebanyak 100 gam dan diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut metanol 99,9% 500 mL di dalam erlenmeyer dan diaduk dengan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm (*rotation per minutes*) selama selama 24 jam. Kemudian disaring dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut dan perlakuan yang sama sampai 3 kali pengulangan hingga diperoleh filtrat yang telah pudar warnanya. Selanjutnya filtrat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Kemudian dihitung nilai randemen ekstrak yang dahasilkan.

$$\text{Randemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kasar yang diperoleh}}{\text{berat sampel yang diekstrak}} x\ 100\ \% \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (3.2)$$

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

3.5.2 Hidrolisis dengan HCl dan Partisi dengan Etil Asetat (Setiyawan dkk., 2015)

Ekstrak pekat metanol 99,9% sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam beaker glass, kemudian dihidrolisis dengan menambahkan 10 mL asam klorida (HCl) 2N ke dalam ekstrak pekat. Hidrolisis dilakukan selama 1 jam menggunakan *magnetic stirrer hot plate* pada suhu ruang. Hidrolisat yang diperoleh ditambahkan dengan natrium bikarbonat ($NaHCO_3$) jenuh sampai pH-nya netral, lalu hidrolisat dipartisi dengan menambahkan 50 mL pelarut etil asetat. Proses partisi dilakukan tiga kali pengulangan. Ekstrak hasil partisi dipekatkan dengan *rotary evaporator*, ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemennya dengan rumus.

$$\text{Randemen} = \frac{\text{Fraksi yang diperoleh}}{\text{berat sampel yang dihidrolisis}} x\ 100\ \% \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ (3.3)$$

3.5.3 Uji steroid dengan Reagen *Libermann-Burchard* (Mardiyah dkk., 2014)

1 mg ekstrak etil asetat dari *Eucheuma cottonii* dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya, campuran tersebut ditambah dengan 1-2 mL H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung. Terbentuknya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya senyawa steroid pada ekstrak tersebut.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

3.5.4 Isolasi Senyawa Steroid dengan Metode Kromatografi Kolom (Septiandari, 2016)

Ekstrak alga merah *Eucheuma cottonii* menunjukkan positif steroid, kemudian dilanjutkan terhadap fraksi etil asetat. Fraksi dikromatografi kolom menggunakan fase diam silika Gel 60 sebanyak 10 gram diaktifasi dengan pemanasan oven selama 2 jam pada suhu 110^{o}C, kemudian didinginkan di dalam desikator selama 15 menit. Kolom mula-mula diisi *glasswool* pada bagian bawah. Kemudian pembuatan bubur 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. 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 250 vial. Proses elusi dilakukan dengan menjaga agar silika gel dalam kolom selalu terendam eluen.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

3.5.5 Monitoring dengan Kromatogafi Lapis Tipis Analitik (KLTA) (Septiandari, 2016)

Setelah didapatkan beberapa fraksi dari kromatogafi kolom pengisian cara basah dilakukan identifikasiatau 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 F_{254} dengan ukuran 10x10 cm. Eluen disiapkan dengan masukkan 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 ^{o}C selama 30 menit. Fraksi ditotolkan pada silika gel yang telah diaktivasi menggunkan 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 pada lampu UV 366 nm. Selanjutnya ditandai spot yang terlihat berwarnan 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.

3.5.6 Uji Toksisitas Ekstrak Menggunakan Larva Udang *Artemia salina* Leach (Swantara,2010)

3.5.6.1 Penetasan Larva Udang

250 mL air laut dimasukkan dalam botol penetasan, dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina* Leach. Selanjutnya diaerasi dan telur menetas dalam waktu ± 48 jam dan siap digunakan sebagai target uji toksisitas.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

3.5.6.2 Uji Toksisitas

Perlakuan uji toksisitas dilakukan sebanyak 5 kali ulangan pada masing-masing hasil isolat steroid sampel. Botol disiapkan untuk pengujian, masing-masing isolat steroid sampel membutuhkan 5 botol dan 1 botol sebagai kontrol. Konsentrasi dibuat 5 ppm, 4 ppm, 3 ppm, 2 ppm, 1 ppm, dan 0 ppm sebagai kontrol. Larutan uji tersebut kemudian dimasukkan dalam vial dan diuapkan pelarutnya. Setelah pelarutnya menguap, ditambahkan dengan 100 µL dimetil sulfoksida (DMSO), setetes larutan ragi roti dan air laut sampai volumenya 10 mL. larutan uji ditambahkan dengan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L.

Kontrol dibuat dengan menambahkan 100 mL dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut kedalam gelas beaker, kemudian dikocok sampai ekstrak dapat larut dalam air laut. Larutan dipindahkan dalam labu ukur 10 mL, kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL. Pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap kematian larva udang. Analisis data dilakukan untuk mencari nilai LC_{50} dengan analisis probit untuk menunjukkan nilai LC_{50} dengan menghitung nilai %mortilitas larva udang.

$$\% \text{ mortilitas} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva yang diuji}} \text{ x } 100\% \quad \text{..... (3.4)}$$

3.5.7 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan Spektroskopi UV-Vis (Laili, 2016)

Hasil isolasi senyawa steroid dengan menggunakan kromatografi kolom diidentifikasi menggunakan Spektroskopi UV-Vis. Analisa dilakukan pada

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

panjang gelombang 200-800 nm, dan akan didapatkan spectrum dan panjang gelombang maksimum.

3.5.8 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan Spektroskopi FT-IR (Sukandana,2011)

Hasil isolasi senyawa steroid dengan kromatografi kolom diidentifikasi menggunakan FTIR. Ekstrak pekat dicampur dengan pellet KBr lalu digerus bersamaan dengan mortat agate. Campuran pellet KBr dan sampel yang telah halus dipres dengan tekanan 80 Torr (8-20 tor per satuan waktu) selama 10 menit. Selanjutnya pellet yang telah dipress dianalisis menggunakan FT-IR.

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa isolat steroid yang telah dipisahkan menggunakan kromatografi kolom selanjutnya digunakan untuk uji toksisitas dengan hewan uji berupa larva udang *Artemia Salina* dan menghasilkan data berupa angka kematian dari larva udang. Data yang didapat kemudian diolah untuk mendapatkan nilai angka probit menggunakan program MINITAB16 dengan tingkat kepercayaan 95% dan error 5%. Hasil pengolahan berupa nilai LC_{50} yang menunjukkan nilai konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian. Isolat steroid diidentifikasi dengan Spektroskopi FT-IR dan UV-Vis untuk memperkuat dugaan senyawa steroid yang telah dipisahkan dengan dihasilkan data spektrum berupa gugus fungsi pada spektroskopi FT-IR dan spektrum panjang gelombang maksimum pada spektroskopi UV-Vis.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

BAB IV

PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi Sampel dengan Pelarut Metanol

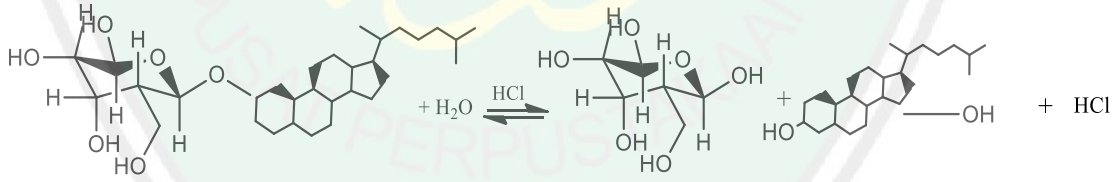
Ekstraksi padat cair merupakan langkah awal untuk mengisolasi senyawa steroid dari sampel makroalga *Eucheuma cottonii*. Metode yang digunakan adalah maserasi atau perendaman menggunakan pelarut organik metanol. Pelarut metanol digunakan karena sifatnya yang polar, hal ini membantu senyawa steroid dapat terekstrak dengan baik karena ketika berada pada bahan alam, senyawa steroid masih berikatan glikosida dengan gula, sehingga senyawa bersifat polar (Atun, 2014).

Saat proses perendaman, terjadi kontak antara sampel dengan pelarut. Metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam metanol dan senyawa akan terekstrak sempurna karena selama proses perendaman terjadi proses pemecahan dinding dan membran sel akibat adanya perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar selnya (Lenny, 2006). Maserasi dilakukan pengulangan sampai 3 kali atau sampai warna filtrat berubah menjadi lebih bening dan warna sampel sudah berubah pucat sehingga dapat diasumsikan bahwa senyawa aktif telah terekstrak dari sampel *Eucheuma cottonii*. Filtrat yang diperoleh digabungkan dan diuapkan pelarutnya sehingga diperoleh ekstrak pekat metanol sebesar 6,316 gram dan rendemennya sebesar 6,316% (perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 4).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4.2 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol dengan Etil Asetat

Senyawa metabokit sekunder atau senyawa steroid yang terdapat dalam ekstrak metanol masih berikatan dengan gula melalui ikatan glikosida sehingga dilakukan proses hidrolisis secara asam untuk memutus ikatan glikosida antara glikon (gula) dan aglikon (bukan gula). Asam yang digunakan adalah HCl, Pemilihan HCl yang tergolong asam kuat ini lebih mudah melepaskan proton H^+ secara sempurna dalam air (Handoko, 2006). Reaksi hidrolisis bersifat bolak balik atau reversible, sehingga perlu dilakukan penetralan untuk menghentikannya dengan menggunakan natrium bikarbonat. Penambahan ini dilakukan sampai pH menjadi netral. Saat penambahan ini, nampak terbentuk busa pada ekstrak kasar. Penetralan dilakukan karena glikosida bersifat stabil pada kondisi netral (Fessenden dan Fessenden, 1986). Reaksi yang terjadi pada proses hidrolisis dan penetralan dapat dilihat pada Gambar 4.1 dan 4.2.



Gambar 4.1 Dugaan reaksi hidrolisis glikosida (Mardiyah, 2012)

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

Gambar 4.2 Reaksi antara HCl dan natrium bikarbonat (Mardiyah, 2012)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

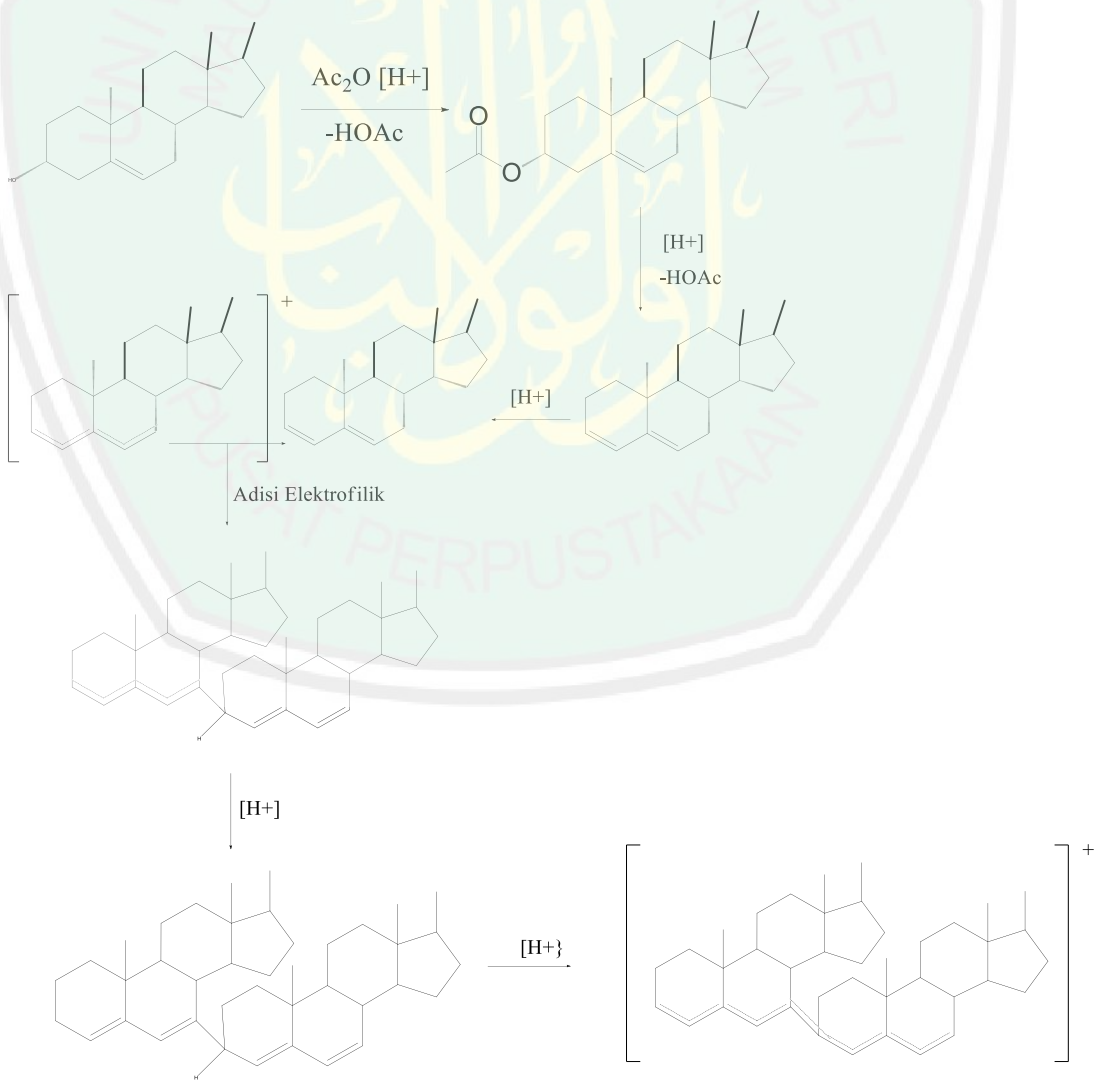
Hidrolisat yang diperoleh kemudian dipartisi (ekstraksi cair-cair) dengan menggunakan pelarut etil asetat. Pelarut ini bersifat semi polar sehingga dapat melarutkan senyawa yang bersifat semi polar hingga non polar seperti senyawa steroid. Senyawa steroid memiliki struktur dasar yang terdiri dari tiga cincin sikloheksna dan sebuah cincin siklopentana, namun pada turunan senyawanya terdapat gugus OH bebas (Gambar 2.3) yang menyebabkan senyawa ini bersifat semi polar hingga non polar. dengan Proses partisi menghasilkan dua fasa cairan dimana terdapat fasa air (senyawa polar) yang terdapat di lapisan bawah dan fase organik (senyawa nonpolar) pada lapisan atas. Proses ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan untuk diambil fase organik yang mengandung senyawa steroid sampai terjadi perubahan warna hijau kehitaman berubah warnanya menjadi bening untuk ekstraksi yang lebih maksimal. Dari 5,06 gram ekstrak kasar yang dihidrolisis, menghasilkan ekstrak pekat etil asetat sebesar 0,87 gram dengan rendemen sebesar 17,19% (perhitungan dapat dilihat pada lampiran 4).

4.3 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Uji fitokimia bertujuan untuk mengetahui senyawa steroid yang terdapat dalam sampel makroalga *E. Cottonii*. Uji ini dilakukan dengan meraksikan ekstrak etil asetat dengan pereaksi Liberman Burchard yang terdiri dari kloroform, asetan anhidrat dan asam sulfat pekat. Asam asetat anhidrat berfungsi dalam proses asetilasi gugus hidroksil yang membentuk turunan asetil. Hal ini dikarenakan gugus asetil yang merupakan gugus pergi yang baik akan lepas, sehingga terbentuk ikatan rangkap. Penggunaan kloroform karena senyawa steroid larut

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

baik di dalam pelarut ini dan yang paling prinsipil adalah tidak mengandung molekul air, sehingga tidak akan merubah asam asetat anhidrat menjadi asam asetat sebelum reaksi berjalan dan turunan asetil tidak akan terbentuk. Penambahan asam kuat atau asam sulfat mengdehidrasi senyawa steroid dan akan membentuk garam cholestadiene dan mengalami perpanjangan konjugasi dengan memberikan warna hijau kebiruan dan violet (Robinson, 1995). Hasil dari uji ini dihasilkan warna biru kehijauan yang menunjukkan ekstrak etil asetat positif mengandung senyawa steroid. Reaksi yang terjadi antara peraksi *Libermann Burchard* dengan senyawa steroid dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Reaksi antara peraksi *Libermann Burchard* dengan senyawa steroid

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4.4 Isolasi Steroid dengan Kromatografi Kolom dan Monitoring dengan KLTA

Kromatografi kolom digunakan untuk mengisolasi senyawa steroid berdasarkan prinsip adsorbsi senyawa pada dua fase yang berbeda yaitu fasa diam yang berupa silika gel dan fase geraknya adalah campuran dari n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, dan 70:30 yang dilakukan dengan menggunakan metode elusi gradient, yaitu selama elusi menggunakan fase gerak yang berubah-ubah polaritasnya. Sebelum digunakan, silika gel lebih dahulu diaktivasi untuk menghilangkan kandungan air pada silika. Silika gel yang telah teraktivasi kemudian dijadikan slurry atau dibuburkan terlebih dahulu dengan eluen yang akan digunakan sebagai fase gerak untuk mempercepat proses homogenisasi dan membuat fase diam di dalam kolom menjadi rapat. Sehingga tidak terdapat celah atau udara yang dapat menghambat proses pemisahan.

Perbandingan antara sampel dan fase diam yang digunakan adalah 1:150 (Tyas, 2017). Pada saat proses elusi, eluen dimasukkan ke dalam kolom secara perlahan mulai dari perbandingan eluen 95:5, 9:10, 85:15, 80:20, 75:25, dan 70:30 secara berurutan dan terus menerus tanpa jeda. Variasi eluen yang cenderung bersifat non polar dikarenakan senyawa steroid yang bersifat non polar. Senyawa yang bersifat non polar akan ikut bersama dengan laju eluen sedangkan senyawa yang bersifat lebih polar cenderung tertahan ke dalam fase diamnya. Fraksi hasil isolasi kemudian ditampung setiap 2 mL per menit dalam botol kecil yag disebut vial. Pemisahan senyawa dengan kromatografi kolom ini dihasilkan 279 vial.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Selanjutnya dilakukan KLT fraksi-fraksi hasil kolom untuk mengelompokkan pola noda yang sama.

Monitoring hasil isolasi kromatografi kolom menggunakan KLTA. Teknik pemisahannya hampir sama dengan kromatografi kolom yaitu berdasarkan distribusi suatu senyawa pada fase diam yang berupa lapisan tipis silika gel F_{254} yang terdapat plat KLT dan fase gerak yang berupa campuran dari pelarut n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17:3 (Mardaneni, 2017). Vial yang dimonitoring diambil dari vial dengan kelipatan 5, yang diharapkan setiap satu vial dapat mewakili dari 5 vial. Kemudian dilanjutkan monitoring kedua dengan jarak satu vial. Hasil monitoring dari kromatografi kolom dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil monitoring kromatografi kolom dengan KLTA

No.	Fraksi	Vial	Warna (UV)	Jarak Senyawa	Jarak Elusi	Rf	Senyawa
1.	A	1-8	-	-	-	-	-
2.	**B**	**9-11**	**Biru**	**6,6**	**8**	**0,825**	**Steroid**
3.	C	12-15	Biru	6,5	8	0,8125	Steroid
			Hijau	6,4		0,8	
4.	D	16-24	Biru	4,2	8	0,525	Steroid
			Hijau	4,2		0,5125	
5.	**E**	**25-48**	**Hijau**	**4,1**	**8**	**0,5125**	**Steroid**
6.	**F**	**49-74**	**Hijau**	**3**	**8**	**0,375**	**Steroid**
7.	G	75-87	Hijau	3,1	8	0,3875	Campuran
			Merah	2,8		0,35	
8.	H	88-98	Merah	1,6	8	0,2	Triterpenoid
9.	I	99-155	Merah	1,7	8	0,2125	Triterpenoid
10.	J	156-210	Merah	0,1	8	0,0125	Triterpenoid
11.	K	211-279	Merah	0,2	8	0,025	Triterpenoid

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Hasil monitoring dari tiap-tiap vial yang dihasilkan dari kromatografi kolom, didapatkan 11 kelompok fraksi besar (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K) dengan satu noda tunggal berwarna biru pada fraksi B dengan nilai Rf 0,825 dan dua noda tunggal berwarna hijau pada fraksi E dan F dengan nilai Rf masing-masing 0,5125 dan 0,375 yang mengandung senyawa steroid. Pemisahan senyawa steroid dengan kromatografi kolom menggunakan variasi gradien eluen menghasilkan noda tunggal yang mengandung senyawa steroid sedikit lebih banyak dibandingkan dengan menggunakan metode elusi isoratik yang digunakan oleh Rahmawati (2017), dimana dari hasil pemisahan terbaiknya menggunakan variasi pelarut n-heksan dan etil asetat 18:2 terbentuk 2 noda tunggal yang mengandung senyawa steroid.

Cara pengisian kolom dengan sistem gradien eluen dapat mempengaruhi proses difusi Eddy. Karena komposisi pelarut atau eluen yang diubah-ubah, sehingga steroid dengan kepolaran rendah dapat terbawa eluen lebih dulu dan yang memiliki kepolaran tinggi akan tertahan dan terbawa oleh eluen dengan kepolaran yang sama, sehingga menyebabkan adanya perbedaan waktu keluar senyawa steroidnya. Hal ini dapat dilihat dari jarak senyawa pada masing-masing fraksi dengan perbedaan yang kecil seperti pada fraksi B dan C yang hanya memiliki perbedaan jarak 0,1 cm dengan noda berwarna biru. Isolat terpisah pada fraksi-fraksi awal, yang artinya tingkat kepolaran dari eluennya masih rendah karena perbandingan dari pelarut n-heksana cenderung lebih besar dibandingkan dengan pelarut etil asetat. Pada vial-vial terakhir lebih banyak isolat triterpenoid yang mucul, sehingga dapat disimpulkan senyawa steroid cenderung bersifat lebih non polar.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4.5 Uji Toksisitas Senyawa Steroid Menggunakan Metode BSLT

4.5.1 Penetasan Larva Udang

Uji toksisitas dengan metode BSLT merupakan metode skrining awal untuk menentukan sifat sitotoksik suatu senyawa dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* sebagai bioindikatornya. *Artemia salina* yang digunakan tersedia dalam bentuk telur, sehingga perlu dilakukan penetasan sebelum dilakukan pengujian. Penetasan telur *Artemia salina* dibantu dengan media air laut dimana media tersebut merupakan tempat pertumbuhan dari larva udang, serta dibantu dengan pencahayaan untuk memberikan rangsangan terhadap *Artemia salina* untuk menetas karena termasuk dalam organisme fototropik (Amaliyah, dkk., 2013) dan aerasi membantu memberikan oksigen yang cukup.

Penetasan larva udang *Artemia salina* dilakukan selama 48 jam, karena pada dalam waktu tersebut larva berada dalam keadaan paling peka. Organ-organ yang terbentuk sudah lengkap, salah satunya adalah mulut. Karena melalui mulut dan kulitnya, zat atau senyawa steroid yang toksik akan terserap ke dalam tubuhnya.

4.5.2 Uji Toksisitas

Pengujian dilakukan pada tiga isolat steroid hasil isolasi menggunakan kromatografi kolom yaitu pada fraksi B, E dan F masing-masing pada konsentrasi 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm dengan 5 kali pengulangan dengan kontrol DMSO. Prosedurnya dengan menentukan nilai LC_{50} dari aktivitas senyawa steroid terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Suatu senyawa dapat dikatakan toksik apabila nilai LC_{50} kurang dari 1000 ppm (Meyer, 1982).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Pelarut harus diuapkan sebelum pengujian agar kematian larva udang tidak dipengaruhi oleh pelarutnya. DMSO digunakan sebagai surfaktan karena senyawa steroid mempunyai perbedaan kepolaran dengan air laut, DMSO memiliki gugus hidrofilik yang bersifat polar dan gugus hidrofobik yang bersifat non polar sehingga surfaktan dapat melarutkan senyawa nonpolar dan polar. Hasil pengamatan kematian larva udang dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Tabel hasil pengamatan mortalitas larva udang

Isolat B		**Isolat E**		**Isolat F**	
Konsentrasi (ppm)	**Modus (larva yang mati)**	**Konsentrasi (ppm)**	**Modus (larva yang mati)**	**Konsentrasi (ppm)**	**Modus (larva yang mati)**
Kontrol DMSO	0	Kontrol DMSO	0	Kontrol DMSO	0
1	4	1	3	1	3
2	4	2	6	2	3
3	5	3	2	3	4
4	4	4	3	4	4
5	4	5	5	5	4

Senyawa metabolit sekunder bersifat toksik atau racun bagi tubuh *Artemia salina.* Menurut Budaraga (2016), senyawa metabolit sekunder tersebut akan bersifat toksik dengan cara menghambat enzim RNA *polymerase* dan Na^+/K^+ ATP*ase* yang terdapat dalam tubuh *Artemia salina*. Akibatnya, enzim RNA *polymerase* tidak dapat bekerja dalam pemisahan untai DNA sehingga sintesis protein tidak dapat terbentuk dan Na^+/K^+ ATP*ase* tidak dapat bekerja mentransport ion sehingga menyebabkan protein membran integral menggembung dan pecah. Akibat proses penghambatan tersebut, dapat menyebabkan kerusakan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

pada tubuh *Artemia salina* sehingga menyebabkan *Artemia salina* akan mati dengan dosis tertentu yang dapat diketahui dari nilai LC_{50} nya. Dalam penelitiannya, Budaraga (2016) menguji senyawa metabolit sekunder jenis flavonoid sedangkan dalam penelitian ini menggunakan senyawa metabolit sekunder golongan steroid. Senyawa flavonoid dan steroid merupakan golongan dari senyawa metabolit sekunder yang diketahui memiliki aktivitas toksik (Afif, 2015). Analisa data dari uji toksisitas dilakukan dengan analisis probit menggunakan minitab untuk memperoleh nilai LC_{50}. Nilai LC_{50} dari larutan uji dapat dilihat dalam Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Tabel nilai toksisitas dari larutan uji (modus)

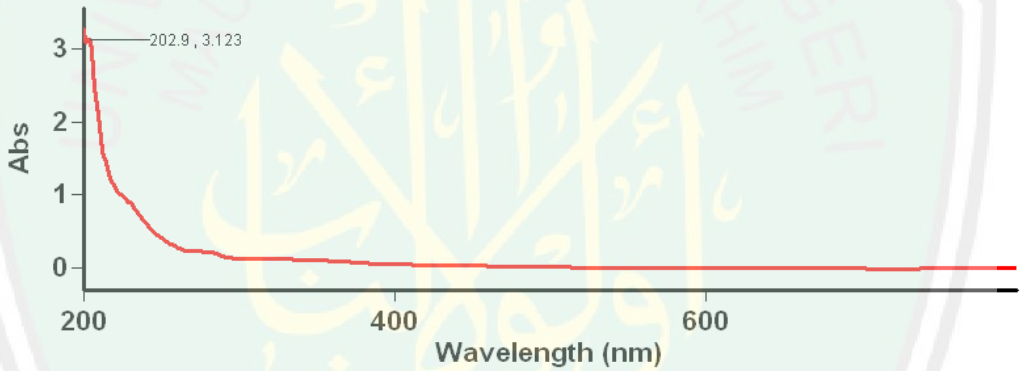
Larutan uji	**Nilai LC_{50} (ppm)**
Isolat B	4,853
Isolat E	5,294
Isolat F	5,138

Berdasarkan nilai toksisitas larva udang *Artemia salina* Leach dari hasil pengujian, masing-masing isolat memiliki sifat sangat toksik karena nilai LC_{50} nya kurang dari 30 ppm. Menurut Meyer (1982), suatu senyawa dikatakan sangat toksik jika nilai LC_{50}< 30 ppm. Tingkat ketoksikan dari isolat hasil kromatografi kolom ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan penelitian Afif (2015), yang melakukan uji toksisitas pada ekstrak kasar dan hasil partisi dengan etil asetat makroalga *E.cottonii* dengan nilai LC_{50} masing-masing sebesar 194,4 ppm dan 143,4 ppm. Jadi, karena memiliki tingkat toksisitas yang tinggi, maka isolat hasil kromatografi kolom ini berpotensi untuk dikembangkan di bidang farmakologi sebagai obat antikanker maupun antitumor (Carballo, *et al.*, 2002).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4.6 Identifikasi Steroid Menggunakan Spektroskopi UV-Vis

Isolat steroid hasil pemisahan dengan kromatografi kolom selanjutnya dilakukan identifikasi dengan spektroskopi UV-Vis pada panjang gelombang antara 200-400 nm. Pada ketiga isolat dari fraksi B, E dan F yang diidentifikasi, isolat B dan F tidak dapat terelusidasi dengan baik sehingga tidak dapat digunakan untuk mengkarakterisasi jenis strukturnya. Hasil identifikasi isolat E menggunakan spektroskopi UV-Vis disajikan Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Spektrum UV-Vis isolat E

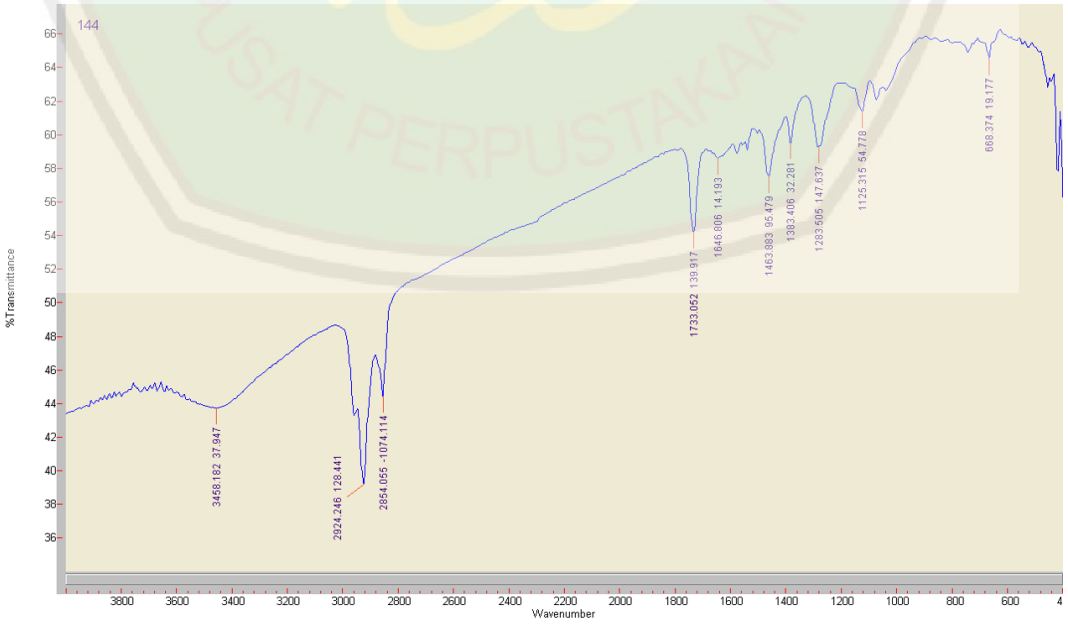
Berdasarkan Gambar 4.4 isolat E memiliki serapan pada panjang gelombang maksimum 202,9 nm menunjukkan adanya transisi π-π^* yang mengindikasikan adanya ikatan rangkap C=C tidak terkonjugasi. Pola spektra yang dihasilkan mirip dengan penelitian Etika dan Suryelita (2014), yang melakukan identifikasi senyawa steroid dengan UV-Vis hasil isolasi dari daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dan diperoleh serapan pada panjang gelombang 203 nm dan diduga merupakan stigmasterol diperkuat dengan identifikasi

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

menggunakan FTIR, ^{13}C-NMR dan ^{1}H-NMR. Selain itu, Sari (2017) juga telah mengisolasi senyawa steroid dari alga merah *Eucheuma cottonii* dan menghasilkan panjang gelombang 203,9 nm dari hasil identifikasi menggunakan UV-Vis dan diperkuat dengan LC-MS/MS menghasilkan jenis steroid paling dominan adalah senyawa β-sitosterol juga muncul senyawa lain seperti kampesterol, stigmasterol, dan kolesterol.

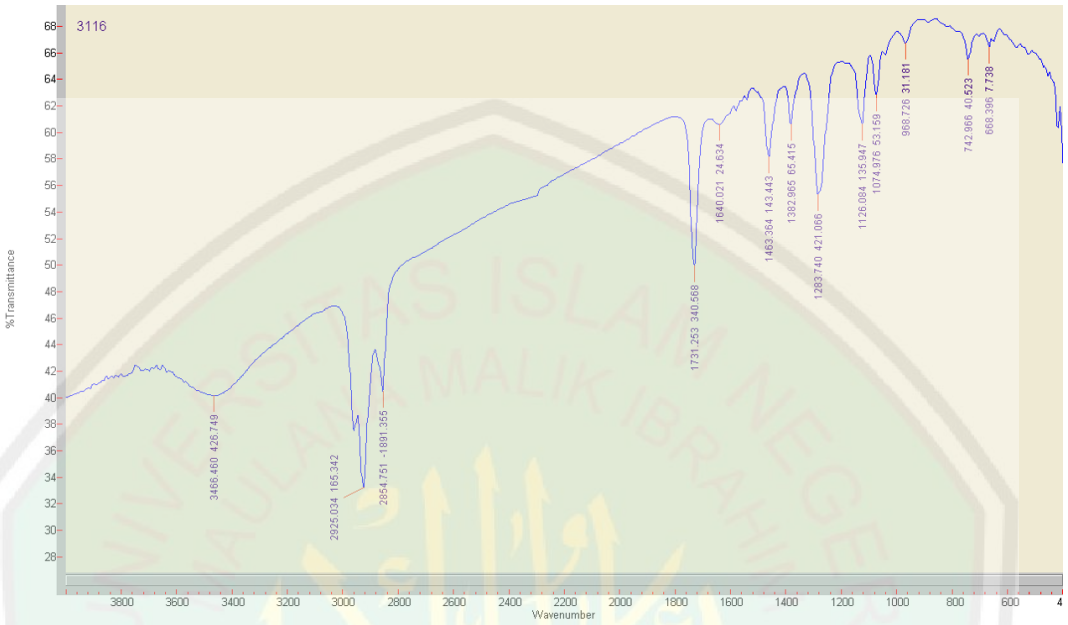
4.7 Identifikasi Steroid Menggunakan Spektroskopi FT-IR

Hasil isolasi dengan kromatografi kolom yang menunjukkan adanya senyawa steroid tunggal yang ditandai dengan warna hijau/biru saat dilakukan monitoring dengan KLTA selanjutnya dilakukan identifikasi menggunakan spektroskopi FT-IR. Hasil spektra IR isolat fraksi B, E, dan F masing-masing dapat dilihat pada Gambar 4.5; 4.6; dan 4.7

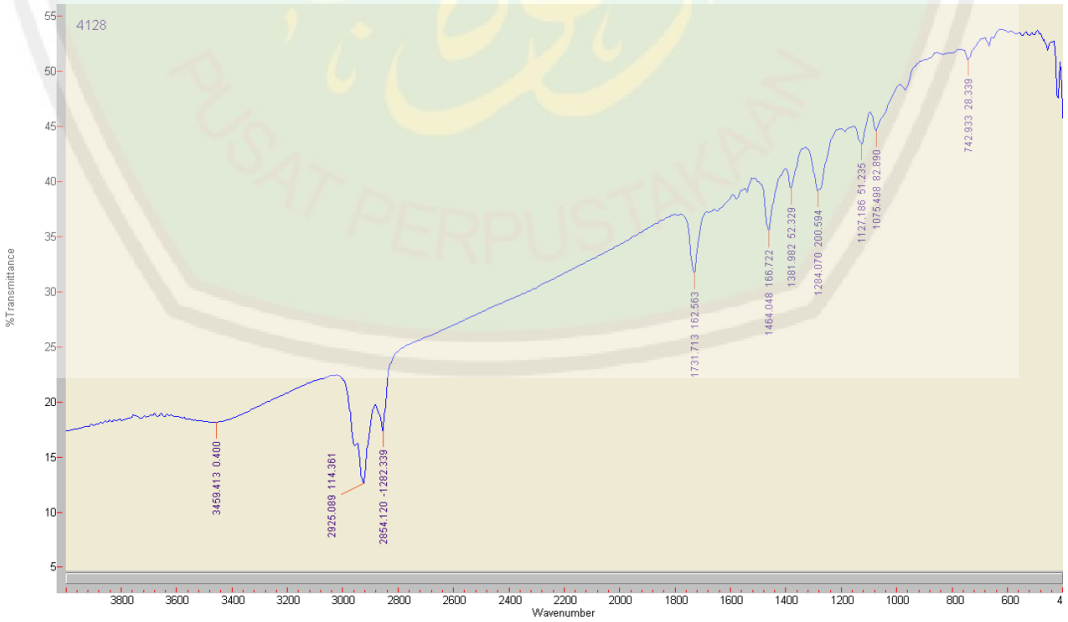


Gambar 4.5 Spektrum FT-IR isolat B

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

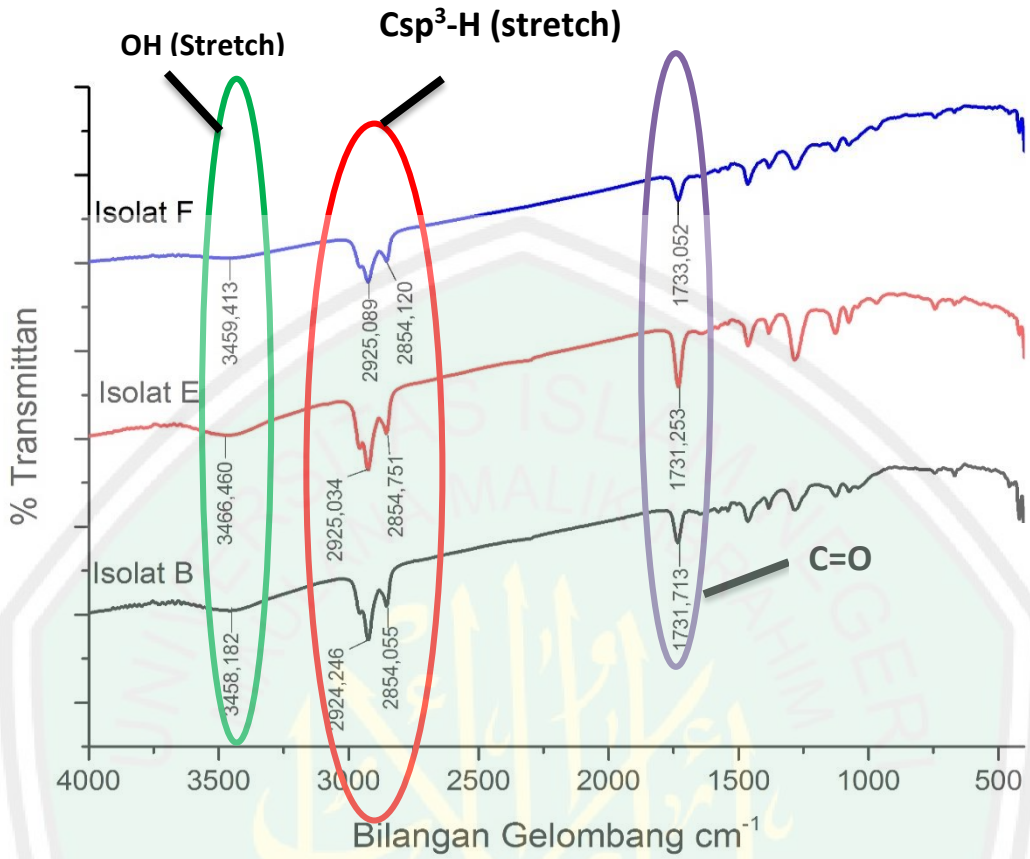


Gambar 4.6 Spektrum FTIR isolat E

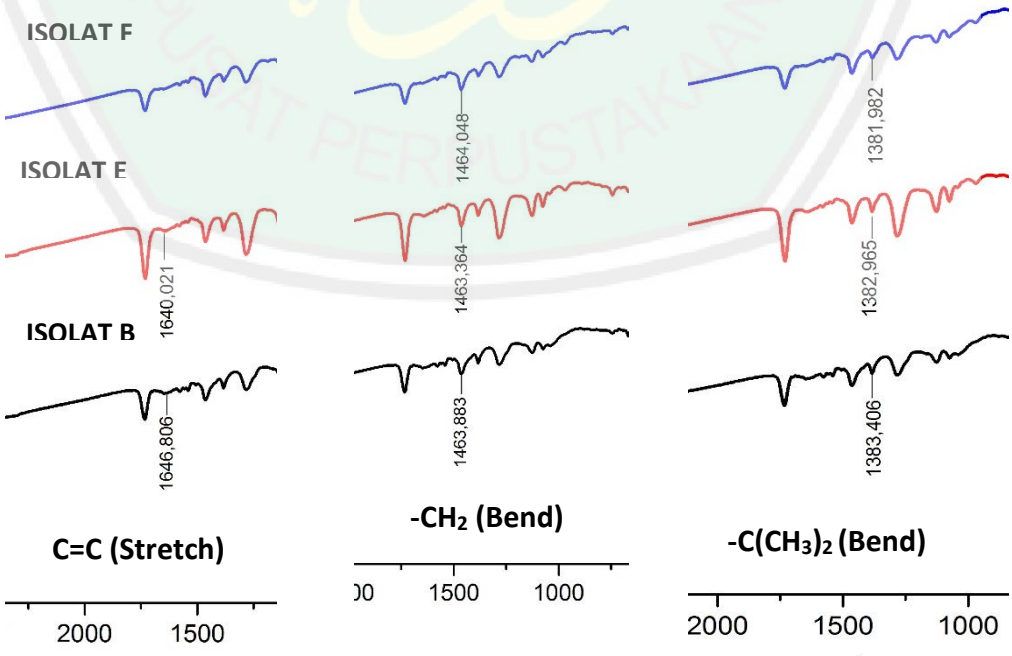


Gambar 4.7 Spektrum FT-IR isolat F

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

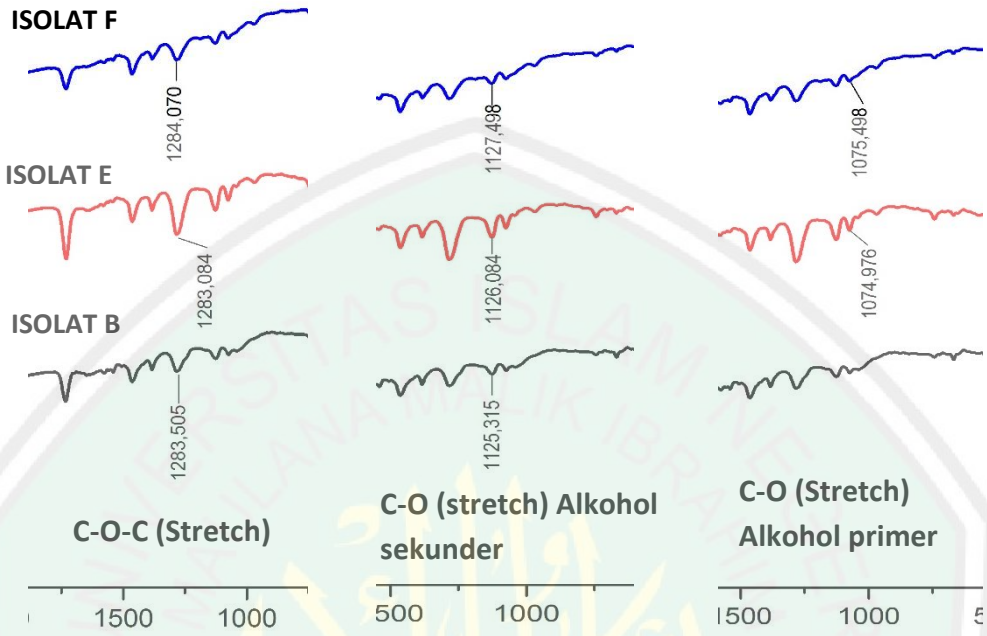


Gambar 4.8 Pola serapan O-H stretching, Csp^3-H stretching, dan C=O



Gambar 4.9 Pola serapan C=C stretching, CH_2 bending, dan $C(CH_3)_2$ bending

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



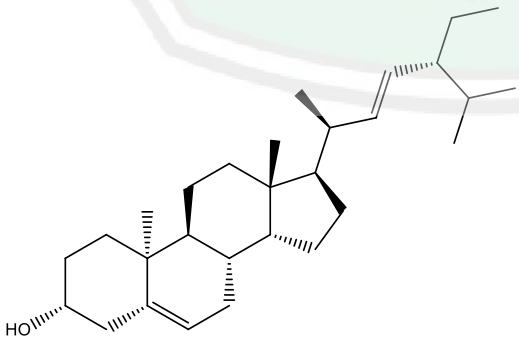
Gambar 4.10 Pola serapan C-O-C stretching, C-O stretching alkohol sekunder dan primer

Berdasarkan Gambar 4.9; 4.10; 4.11, ketiga isolat tersebut menunjukkan adanya serapan yang sama yaitu adanya gugus fungsi alkohol (OH) pada bilangan gelombang antara 3600-3450 cm^{-1}. Terdapat juga serapan pada bilangan gelombang antara 2970-2850 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus Csp^3-H. Selain itu pada ketiga isolat muncul serapan pada bilangan gelombang 1732-1728 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus C=O. Terdapat juga vibrasi C-H tekuk yang mengindikasikan adanya gugus geminal dimetil. Vibrasi C-H tekuk terdapat pada pita serapan 1460-1380 cm^{-1} yang merupakan serapan khas senyawa steroid serta adanya serapan pada bilangan gelombang 1160-1100 cm^{-1} yang merupakan serapan dari gugus fungsi C-O alkohol sekunder. Bilangan gelombang 1645-1635 cm^{-1} muncul pada isolat B dan E yang merupakan serapan dari gugus C=C non

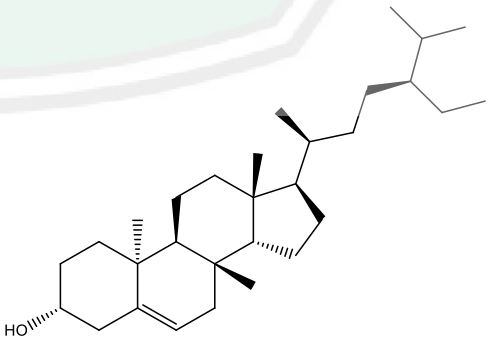
CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

kunjugasi serta bilangan gelombang 1080-1020 cm^{-1} muncul pada isolat E dan F yang merupakan gugus fungsi C-O alkohol primer.

Serapan ini didukung dengan hasil penelitian Mamahit (2009) yang telah mengisolasi senyawa steroid dari daun gedi dan hasil identifikasi menggunakan FTIR menunjukkan adanya gugus Csp^3-H 2920 dan 2850 cm^{-1}, C-H bending (metilen) 1462 cm^{-1} dan C-H bending (metil) 1375 cm^{-1} yang merupakan gugus gem dimetil dan didukung identifikasi dengan ^{13}C-NMR dan ^{1}H-NMR menyebutkan bahwa senyawa steroid yang berhasil diisolasi adalah senyawa β-sitosterol. Gambar 4.10 menunjukkan senyawa steroid yang diidentifikasi dengan LC-MS/MS dan UV-Vis hasil isolasi steroid dari makroalga *Eucheuma cottonii* fraksi n-butanol menggunakan KLT (Sari, 2017) yang dimungkinkan juga terdapat dalam isolat hasil penelitian ini berdasarkan hasil identifikasi dengan UV-Vis menunjukkan adanya serapan panjang gelombang maksimum yang mirip dan adanya beberapa gugus fungsi yang terdapat pada senyawa tersebut berdasarkan identifikasi dengan FT-IR. Perbedaan hasil serapan FT-IR dari ketiga isolat dapat dilihat pada Tabel 4.4.

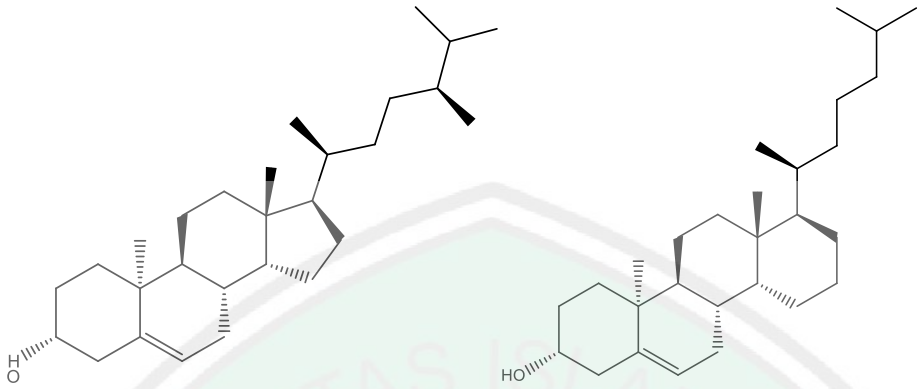


Stigmasterol



β-sitosterol

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



Kampesterol Kolesterol

Gambar 4.11 Struktur senyawa steroid hasil isolasi fraksi n-butanol menggunakan KLT makroalga *Eucheuma cottonii* (Sari, 2017)

Tabel 4.4 Perbedaan hasil serapan senyawa dengan FTIR

No.	Serapan isolat B	Serapan isolat E	Serapan isolat F	Jenis vibrasi
1	3458,182	3466,460	3459,413	OH (stretch)
2	2924,246; 2854,055	2925,034; 2854,751	2925,089; 2854,120	C sp_3-H (stretch)
3	1733,052	1731,253	1731,713	C=O (stretch)
4	1646,806	1640,021	-	C=C (stretch)
5	1463,883	1463,364	1464,048	-CH_2 (bend)
6	1383,406	1382,965	1381,982	-$C(CH_3)_2$ (bend)
7	1283,505	1283,084	1284,070	C-O-C (stretch)
8	1125,315	1126,084	1127,498	C-O (stretch) alkohol sekunder
9	-	1074,976	1075,498	C-O (stretch) alkohol primer
10	668,374	968,726; 742,966; dan 668,396	742,933	=C-H siklik

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Hasil isolasi senyawa steroid dengan kromatografi kolom memberikan hasil berupa 3 noda tunggal isolat yang diduga merupakan senyawa steroid dengan 1 noda tunggal berwarna biru dan 2 noda tunggal berwarna hijau. Ketiga isolat tersebut bersifat sangat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan nilai LC_{50} dari isolat B, E dan F masing-masing sebesar 4,853 ppm, 5,294 ppm dan 5,138 ppm. Identifikasi isolat dilakukan menggunakan UV-Vis dengan nilai panjang gelombang maksimum isolat E sebesar 202,9 nm yang menunjukkan adanya ikatan rangkap C=C non konjugasi. Berdasarkan hasil identifikasi dengan FTIR, ketiga isolat memiliki persamaan dalam memberikan informasi adanya gugus OH bebas, C-O alkohol sekunder serta gugus gem dimetil. Sedangkan perbedaannya, isolat B tidak menampakkan serapan pada gugus C-O alkohol primer sedangkan pada isolat F tidak menampakkan serapan pada gugus C=C non konjugasi.

4.8 Pemanfaatan Alga Merah *Eucheuma cottonii* dalam Prespektif Islam

أَوَ لَمۡ يَرَوۡاْ إِلَى ٱلۡأَرۡضِ كَمۡ أَنۢبَتۡنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوۡجٖ كَرِيمٍ (٧)

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

Bumi merupakan planet dalam tata surya yang terdiri atas daratan dan lautan sebagai tempat tinggal makhluk hidup baik manusia, hewan maupun tumbuhan. Dalam penelitian ini akan dikaji mengenai manfaat dari salah satu tumbuhan yang hidup di perairan yaitu alga merah. Berdasarkan tafsir Al-Mishbah lafadz زَوۡجٖ menjelaskan bahwa Allah SWT menciptakan bumi yang didalamnya terdapat beraneka macam jenis tumbuhan baik yang hidup di daratan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

maupun di lautan. Atas kehendak Allah SWT telah menjadikan bumi yang awalnya tandus menjadi subur dan menumbuhkan berbagai macam tumbuhan tersebut sehingga dapat dimanfaatkan bagi makhluk hidup lainnya, salah satunya sebagai obat dari berbagai penyakit (Shihab, 2002). Kita sebagai manusia hendaknya dapat merenungkan dan mengambil manfaat dari beraneka macam tumbuhan tersebut. Oleh karena itu dalam penelitian ini akan dikaji tentang pemanfaatan salah satu tumbuhan yang dapat digunakan sebagai obat. Dalam penelitian ini telah dilakukan uji toksisitas dari senyawa steroid yang terkandung dalam alga merah *Eucheuma cottonii*. Alga merah *Eucheuma cottonii* merupakan salah satu jenis tumbuhan yang hidup di daerah perairan yang memiliki manfaat yang cukup baik. Alga merah ini selain dapat digunakan sebagai bahan makanan juga dapat digunakan sebagi sumber obat-obatan karena mengandung senyawa aktif yang dikenal sebagai senyawa steroid. Steroid merupakan suatu senyawa yang memiliki aktivitas toksik yang baik. Uji toksisitas ini merupakan uji skrining awal yang dilakukan untuk mengetahui pemanfaatan senyawa sebagai antikanker.

Kandungan dalam makroalga *Eucheuma cottonii* dapat dibuktikan dalam penelitian ini yang berhasil mengisolasi senyawa steroid di dalamnya dengan metode kromatografi kolom. Proses isolasi makroalga diawali dengan proses ekstraksi untuk mengambil ekstrak kasarnya dan dipisahkan lagi dengan metode partisi menggunakan etil asetat untuk memisahkan senyawa yang lebih spesifik. Isolasi steroid kemudian dilakukan dengan kromatografi kolom. Senyawa steroid yang berhasil diisolasi diuji toksisitasnya terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dan didapatkan nilai 4-5 ppm. Nilai LC_{50} yang lebih kecil dari 30 ppm menandakan senyawa tersebut sangat toksik sehingga dapat digunakan sebagai

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

obat. Hal ini merupakan salah satu bentuk usaha yang dilakukan untuk mendapat kesembuhan dari Allah SWT melalui penggunaan tumbuhan alga merah sebagai obat. Seperti hadis yang diriwayatkan oleh Imam Bukhari di dalam shahihnya, dari sahabat Abu Hurairah bahwasanya Nabi bersabda:

عَنْ أَبِي هُرَيْرَةُ رَضِيَ اللهُ عَنْهُ عَنْ النَّبِيِّ صَلَى اللهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ قَالَ : مَا انزَلَ اللهُ دَاءً اِلَّا اَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً.

(رَوَاهُ بُخارِي)

Diriwayatkan dari Abu Hurairah r.a bahwa Nabi SAW. pernah bersabda "Tidaklah Allah menurunkan suatu penyakit melainkan Allah turunkan pula obatnya" (HR. Al-Bukhari).

Imam Muslim meriwayatkan dari Jabir yang dinisbatkan kepada Nabi SAW,

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءً فَإِذَا أَصَيْبَ دَوَاءَ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللهِ عَزَّ وَجَلَّ (اخرجه مسلم)

"*Setiap penyakit ada obatnya, bila sebuah obat sesuai dengan penyakitnya maka dia akan sembuh dengan seizin Allah SWT". (HR. Muslim).*

Kata 'diturunkan' disini merupakan ungkapan tentang penetapan. Dalam hadis Jabir terdapat isyarat bahwa kesembuhan tergantung kepada ketetapan obat dengan izin Allah, sebab obat yang melebihi batas tidak akan ada manfaatnya bahkan dapat menimbulkan penyakit lain. Dalam hadits Jabir RA, "*Dengan izin Allah*" mengandung makna bahwa sumber segala sesuatu adalah takdir Allah dan kehendak-Nya, sehingga pengobatan tidak menafikan tawakkal bagi siapa saja yang berkeyakinan bahwa kesembuhan itu hanya dengan izin Allah dan takdir-Nya (Al Asqalani, 2008).

Dijelaskan juga bahwa pengobatan dikaitkan dengan yang halal, sehingga selama masih dapat ditemukan dan dicari obat yang halal, maka tetap diusahakan untuk tidak sampai menggunakan obat yang haram. Sebagaimana firman Allah dalam surah Al-Maidah ayat 88 yang berbunyi:

وَكُلُواْ مِمَّا رَزَقَكُمُ ٱللَّهُ حَلَٰلًا طَيِّبٗاۖ وَٱتَّقُواْ ٱللَّهَ ٱلَّذِيٓ أَنتُم بِهِۦ مُؤۡمِنُونَ (٨٨)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

"*Dan makanlah makanan yang halal lagi baik dari apa yang Allah telah rezekikan kepadamu, dan bertakwalah kepada Allah yang kamu beriman kepada-Nya*".

Bahwa maksudnya adalah apa yang telah Allah halalkan kepada mereka dari makanan. Bahwasanya makanan adalah apa yang berasal dari hewan atau tumbuhan yang dimakan dan masuk ke dalam tubuh oleh makhluk hidup. Dalam hal ini, obat juga bisa masuk dalam kategori makanan karena dapat masuk masuk ke dalam tubuh makhluk hidup. Oleh karena itu, sebagai manusia jangan sampai melampaui batas yang telah Allah tetapkan, sehingga menghalalkan apa yang diharamkan dan mengharamkan atas apa yang dihalalkan. Karena Allah akan menurunkan kemarahannya apabila perintah tersebut dilanggar (Ath-Thabari, 2007).

Pencarian obat dari bermacam-macam penyakit bentuk usaha yang dilakukan manusia untuk memperoleh kesembuhan. Dan dengan ilmu pengetahuan yang dimilikinya, melalui tumbuh-tumbuhan yang telah diciptakan Allah, manusia berusaha untuk mengambil manfaat di dalamnya. Namun, obat hanyalah salah satu bentuk usaha manusia untuk mendapatkan kesembuhan dari Allah SWT. karena semua penyakit itu datangnya dari Allah, maka Allah-lah yang berhak untuk menyembuhkannya. Sebagai manusia kita juga senantiasa menjaga kesehatan tubuh sebelum rasa sakit menghampiri kita, karena itu merupakan salah satu bentuk rasa syukur kita atas nikmat yang telah Allah berikan. Dalam Kitab Tibb al-Nawawi karya Ibn Qayyim al-Jauziyyah yang berisi himpunan cara Nabi SAW dalam pengobatan dan terapi penyakit baik fisik maupun hati. Dikatakan dalam kitab itu:

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

الوِقَايَةُ خَيْرٌ مِنَ العِيلَاجِ

diungkapkan bahwa menurut Rasulullah SAW, perlindungan itu lebih baik daripada mengobati. Menjaga kesehatan merupakan obat yang paling besar untuk menghadapi penyakit.

Apa yang telah diciptakan Allah SWT di bumi tidaklah dengan tidak sia-sia. Semua yang diciptakan dapat diambil manfaatnya bagi orang yang beriman dan berilmu. Sebagaimana yang telah dilakukan dalam peelitian ini yaitu mengambil manfaat dari tumbuhan makroalga *Euvheuma cottonii* sebagai obat antkanker. Oleh karena itu sebagai manusia yang diciptakan dengan akal dan pikiran untuk mengetahui segala sesuatu secara langsung dan jelas untuk merenung tanda-tanda kekuasaan Allah SWT agar senantiasa menjadi hamba yang besyukur. Sebagaimana Firman Allah SWT dalam Qs. Ali Imran ayat 190-191 yang berbunyi:

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

"Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal. (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): 'Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia. Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka." (Qs. Ali Imran: 190-191).

Allah SWT memerintahkan kita untuk melihat, merenung, dan mengambil kesimpulan pada tanda-tanda ke-Tuhanan. Pada ayat ini Allah SWT menyebutkan: لَأٓيَٰتٍ لِّأُو۟لِى ٱلْأَلْبَٰبِ "*Terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal."* Inilah salah satu fungsi akal yang diberikan kepada seluruh manusia,

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

agar dapat merenungkan tanda-tanda yang telah diberikan oleh Allah SWT (Al-Qurthubi, 2008). Maka perenungan tersebut mendorong manusia untuk berkata "*Tidaklah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia".* Maksudnya, sia-sia adalah tanpa adanya hikmah yang bisa dijadikan pelajaran. Seluruh yang ada di bumi bukanlah perbuatan Allah yang main-main dan tidak berguna. Semua diciptakan dengan tujuan yang luhur dan mulia, sehingga manusia senantiasa pandai bersyukur dan mengingat keagungan-Nya (Al-Jazairi, 2007).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Hasil pemisahan senyawa steroid fraksi etil asetat menggunakan kromatografi kolom variasi gradien eluen menghasilkan 3 noda tunggal yang diduga merupakan senyawa steroid dengan bentuk kristal jarum berwarna putih kehijauan dan mempunyai nilai Rf untuk masing-masing isolat B, E dan F adalah 0,825; 0,5125; dan 0,375 cm.
2. Isolat hasil pemisahan dengan kromatografi kolom fraksi etil asetat makroalga *Eucheuma cottonii* toksis terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan nilai LC_{50} untuk isolat B, E dan F masing-masing adalah 4,853; 5,294; dan 5,138 ppm.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan pemisahan senyawa steroid dengan metode lain seperti kromatografi vacum cair (KVC) dan pemurnian senyawa menggunakan teknik kromatografi kolom tekan (KKT) untuk mendapatkan senyawa steroid yang lebih murni lagi.
2. Diperlukan adanya identifikasi isolat steroid dengan instrumen lain seperti ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, GC-MS atau LC/MS untuk dapat mengetahui senyawa steroid secara lebih spesifik.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR PUSTAKA

Adhiatama, I., Zainuddin, M., dan Rokhati, N. 2012. Hidrolisis Kitosan menggunakan Katalis Asam Klorida. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industi*, 1(1): 245-251.

Afif, S. 2013. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test)* dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Alga Merah *Euchema cottonii* dari Perairan Sumenep Madura. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Amaliyah, S., A. Ghanaim F. Dan A. Hanaoi. 2013. Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *Skripsi*. Jurusan Kimia Malang.

Anam, K. 2015. Isolasi Senyawa Triterpena dari Alga Merah (*Euchema cottoni*) menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Analisisnya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Andriani, Zulli, Fasya, A.G., dan Hanapi, A. 2015. Antibacterial Activity of the Red Algae *Eucheuma cottonii* Extract from Tanjung Coast, Sumenep Madura. *Alchemy*, 4(3): 93-100.

Aprelia, F. dan Suyatno. 2013. Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etil Asetat Tumbuhan Paku *Christella arida* dan Uji Pendahuluan Sebagai Antikanker. *Journal of Chemistry*, 2(3): 94-99.

Astuti, M.D., Maulana, A., dan Kuntowati, E.M. 2014. Isolasi Steroid dari fraksi N-Heksana Batang Bajakah Tampala (*Spatholobus littoralis* Hassk.). *Prosiding Seminar Nasioanl Kimia.* Surabaya: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya. ISBN : 978-602-0951-00-3.

Asqalani, I. H. I. H.. 2008. *Fathul Baari*. Jakarta: Pustaka Azzam.

Auterhoof, H. dan Kovar, K. A. 1987. *Identifikasi Obat.* Bandung: ITB.

Atun, S. 2014. Metode isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Konversi Cagar Budaya Borobudur*, 8(2): 53-61.

Azizah, L. N. 2016. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum). Skripsi* diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Budaraga, I. K., Arnim, Marlida, Y., dan Bulanim, Usman. 2016. Toxicity of Liquid Smoke Cinnamon (*Cinnamomum Burmanni*) Production of Ways for Purification and Different Concentration. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 6(7): 13-21.

Carballo, J., Hernandez-Inda, Z.L., Perez, P., dan Garcia-Gravalos, M.D. 2002. A Comparison Between Two Brine Shrimp Assays to Detect In Vitro Cytotoxicity In Marine Natural Product. *BMC Biotechnol*, 2(1):17.

Etika, S.B. dan Suryelita. 2014. Isolasi Steroid dari Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia L.*). *Jurnal Eksakta*, 1: 60-65.

Fessenden dan Fessenden. 1986. *Kimia Organik*. Jakarta: Erlangga

Fitri, Khumairo Nur. 2017. Variasi Laju Alir pada Isolasi Steroid dan Tritepenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* Metode Kromatografi Kolom. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Gandjar, I.G. dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka belajar.

Gritter, R.J. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Terjemahan Kosasih Padmawinata (2008). Bandung: ITB.

Gunawan, I. W. G., IG. A. Gede Bawa dan N. L. Sutrisnayanti. 2008. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Triterpenoid yang Aktif Antibakteri pada Herba Meniran (Phyllanthus niruri Linn). *Jurnal Kimia*, 2(1): 31-39.

Hanapi, A. Fasya, A.G., Mardiyah, U., dan Miftahurrahmah. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Antibakteri Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheum spinosum* dari perairan Wongsorejo Banyuwangi. *Jurnal Alchemy*. 2 (2): 126-137.

Handoko, D. S. P. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis. *Jurnal*. 9(1).

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* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim

Harborne, J.B. 1987. *Metode fitokimia Penuntun cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Terjemahan Kosasih Padmawinata (2001). Bandung: ITB.

Hasib, Kholili. 2011. *Sehat Alami: Pilih yang Halal Sekaligus Thayyib.* (Online), (http://m.hidayatullah.com/read/2011/01/31/3488/sehat-islami-pilih-yang-halal-sekaligus-thayyib.html), diakses 25 September 2018.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Hendayana, S. 2006. K*imia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elketroforesis Modern*. Bandung : PT Remaja Rosdakarya.

Indrayani, L., Hartati, S. dan Lydia, S. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Berk Penel Hayati*, 12: 57-61.

Jannah, M., Hanapi, A., dan Fasya, A.G. 2014. Uji Toksisitas dan Fitokimia Ekstrak Kasar Metanol, Kloroform, dan n-Heksana Alga Coklat *Sargassum vulgare* dari Pantai Kapong Pamekasan Madura. *Alchemy*, 3 (2): 194-203.

Jazairi, S. A. B. J.. 2007. *Tafsir al-Qur'an Al-Aisar*. Jakarta: Daruss Sunnah

Kapur, Shitij dan Seeman, P. 2000. Antipsychotic Agents Differ In How Fast They Come Off The Dopamine D_2 Receptors. Implications For Atypical Antipsychotic Action. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 25(2): 161-166.

Kamboj, A., dan Saluja A.K. 2011. Isolation of Srigmasterol and B-Sitosterol from Petroleum Ether Extract of Aerial Parts of *Ageratum Conyzoides* (Asteraceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(1): 20.

Kasal, A. Budesinsky, M. Dan Grifftihs, W.J. 2010. Spectrocopic Methods of Steroid Analysis. *Steroid Analysis*. Business Media.

Kristanti, A. N., Nanik, S. A., Mulyadi, T., Bambang, K.. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Universitas Airlangga.

Laili, R. 2016. Uji Aktifitas Antioksidan dan Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis Senyawa Steroid Fraksi PE Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*). *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.

Lutfiyani, R., Ma'ruf, W.F., dan Dewi, E.N. 2012. Aktivitas Antijamur Senyawa Bioaktif Ekstrak *Gelidium latifolium* terhadap *Candida albicans*. *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*, 1(1): 26-33.

Mabrouk, P.A. 2013. An Introduction to Chromatography. (Online), (http://www.pg.gda.pl/chem/Dydaktyka/Analityczna/LC/Chromatografia_A_Przyjazny/AP-Part3.pdf), diakses pada 11 Januari 2018.

Mamahit, Lexy. 2009. Satu Senyawa Steroid dari Daun Gedi. *Chem Prog*, 2(1): 33-38.

Manahan, S. E. 2003. *Toxicological Chemistry and Biochemistry*. Washington D.C: Lewis Publishers.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Mardaneni, Isma. 2017. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Alga Merah *Eucheuma cottonii* Perairan Wongsorejo Banyuwangi Menggunakan Metode KLT dan LC-MS. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Mardiyah, U. 2012. Ekstraksi Uji Aktivitas Antioksidan terhadap *1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil* (DPPH) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Euchema spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.

Mc Laughlin, J. I,. 1991. *Crown Gall tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality : Two Simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractination.* Methods in Plants Biochemistry. Academic Pree

Meyer, B. N, Ferrigni, N. R, Putnam, J. E, Jacobsen, L. B, Nichols, D. E, McLaughlin, J. L. 1982. Brine Shrimp: A Convanient general Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*. 45: 31-34

Mubarokah, Fitroh Annisaul. 2017. Variasi Diameter Kolom pada Isolasi Steroid dan Tritepenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* Metode Kromatografi Kolom. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Mulyani M., Arifin B., dan Nurdin H. 2013. Uji Antioksidan dan Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Daun Srikaya (*Annona squamosa* L.). *Jurnal Kimia*, 2(1): 6-12.

Noviyanti, L., 2010. Modifikasi Teknik Kromatografi Kolom Untuk Pemisahan Trigliserida dari Ekstrak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk). *Skripsi*. Medan: USU.

Panji, Tri. 2012. *Teknik Spektroskopi untuk Elusidasi Struktur Molekul.* Yogyakarta: Graha Ilmu

Qurthubi, S. I. 2008. *Tafsir al-Qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azzam.

Rahmawati, Dwi Anik. 2017. Variasi Komposisi Eluen pada Isolasi Steroid dan Tritepenoid Makroalga (*Eucheuma cottonii)* dengan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi.* Diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata (2003). Bandung: ITB.

Sangi,Jessy J., Liberty, P., Malangi, Meiske S., E. Paendong. 2012. Penentuan Kandungan Tanin dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Buah Alpukat (*Persea americana* Mill). *Jurnal MIPA UNSRAT Online*, 1(1): 5–10.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Sapar, A., kumanireng, A., Voogd, N.de., Noor, A.. 2004. Isolasi dan Penentuan Struktur Metabolit Sekunder Aktif dari Spons *Biemna triraphis* Asal Pulau Kapodasang (Kepulauan Spermonde). *Marina Chimica Acta*, 5(1).

Saputri, Revita, Astuti, M. D., Evi M. K. 2016. Isolasi dan Identifikasi Steroid dari Fraksi Etil Asetat Herba Lampasau (*Diplazium esculentum* Swartz). *Jurnal Pharmascience*, 3(2): 107-111.

Sari, Ira Ratna. 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* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Setiyawan, M. I. 2015. Isolasi Senyawa Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Euchema spinosum*) Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol dan Identifikasi menggunakan FT-IR. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Sharo, N.M., Ningsih, R., Nasichudin, A., dan Hanapi, A. 2013. Uji Toksisitas dan Identifikasi Senyawa Ekstrak Alga Merah (*Eucheuma Cottonii*) Terhadap Larva Udang Artemia Salina Leach. *Alchemy*, 2 (3).

Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al Mishbab Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an* Vol. 7,8-10. Jakarta: Penerbit Lentera Hati.

Sholikah, A. N. L. 2015. Isolasi Senyawa Steroid dari Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Euchema spinosum)* Menggunakan Metode Kromatografi Kolom. *Skripisi* diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Sukandana, I. M. 2011. Kandungan Senyawa Steroid-Alkaloid pada Ekstrak n-Heksana Daun Beringin (*Ficus benjamina* L.). *Jurnal Kimia*, 5(2): 169-174.

Swantara, I. M. D., dan Parwata I. M.O A. 2011. Kajian Senyawa Antioksidan pada Rumput Laut dari Pantai Sekitar Bali. *Jurnal Kimia*.

Thabari, Abu Ja'far. 2007. *Tafsir Ath-Thabari (9).* Jakarta: Pustaka Azzam.

Tyas, Ariska Purwaning. 2017. Variasi Rasio Sampel dan Silika Gel pada Isolasi Steroid dan Tritepenoid Makroalga *Eucheuma cottonii* dengan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Varier, K.M., Milton, M.C., Arulvasu, C., dan Gajendran, B. 2013. Evaluation of Antibacterial Properties of Selected Red Seaweeds from Rameshwaram Tamil Nadu India. *Journal of Academia and Industrial Research*, 1(11): 667-670.

Wahyudi, J., Wibowo, W. A., Rais, Y. A., dan Kusumawardani, A. 2011. Pengaruh Suhu terhadap Kadar Glukosa Terbentuk dan Konstanta Kecepatan Reaksi pada Hidrolisis Kulit Pisang. Di dalam: Seminar Nasional Teknik Kimia Kejuangan. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia Kejuangan 2011;* Yogyakarta, 22 Februari 2011. Yogyakarta: Panitia Kejuangan Yogyakarta. Halaman 1-5.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian

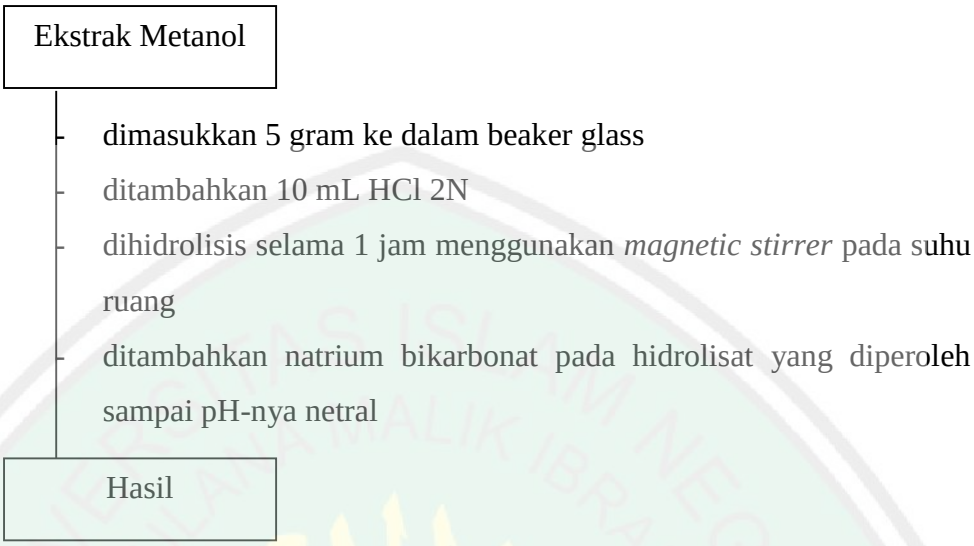
CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Lampiran 2. Diagram Alir

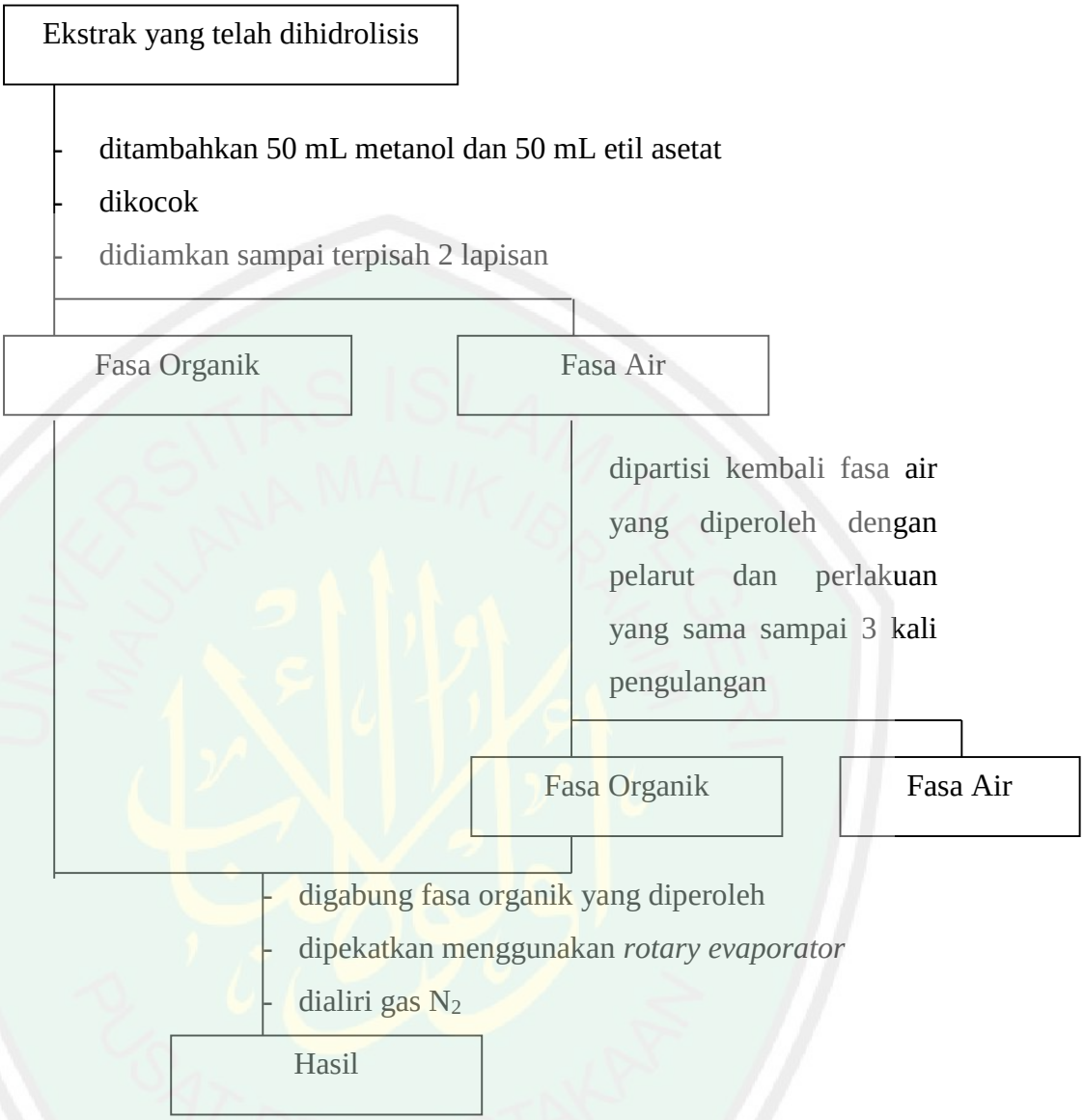
1. Ekstraksi Sampel

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

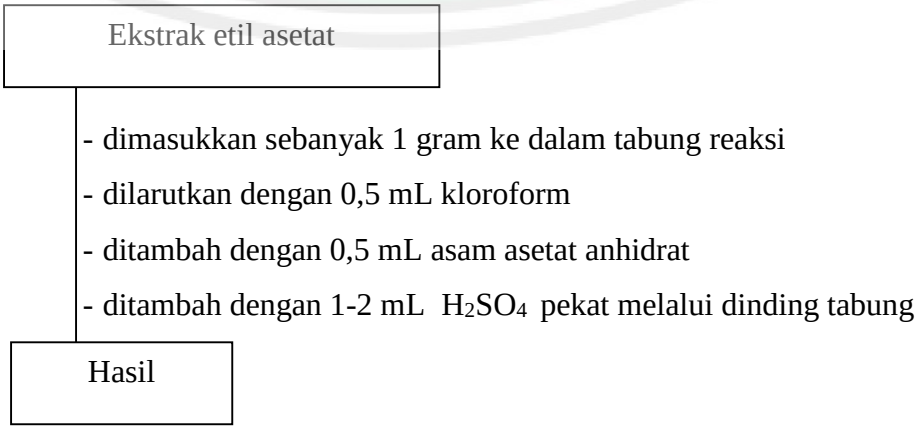
2. Hidrolisis dan Ekstraksi cair-cair (Partisi) Ekstrak pekat metanol pada fraksi etil asetat



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



3. Uji Fitokimia Steroid



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4. Isolasi Senyawa Steroid Menggunakan Kromatografi Kolom dengan Variasi Gradien Eluen

4.1 Kolom Pengisian Cara Basah

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

- diaktivasi 10 gram silika gel selama 2 jam pada suhu 110^{o}C dan didinginkan dalam desikator selama 15 menit
- disiapkan campuran homogen antara pelarut n-heksana:etil asetat (955:)
- 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

Hasil

4.2 Isolsi Senyawa Steroid Variasi Gradien Eluen

Ekstrak pekat fraksi etil asetat

- disiapkan fasa diam kolom silika gel G-60 (0,063-0,200 mm)
- dimasukkan silika gel dalam kolom diameter 1 cm dan sampel dengan perbandingan 1:100
- dimasukkan eluen campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan (95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30)
- ditampung eluat setiap 2 mL pada botol vial dan dilakukan pengelompokan setiap 10 vial
- dihentikan proses elusi setelah semua senyawa steroid diperkirakan telah keluar dari kolom

Hasil

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

5. Monitoring dengan KLTA

Fraksi hasil isolasi

- disiapkan eluen campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan (17:3)
- dijenuhkan selama 1 jam
- dioven plat KLT pada suhu 100°C selama 30 menit
- ditotolkan masing-masing kelompok fraksi
- dimasukkan dalam bejan pengembang berisi eluen yang telah dijenuhkan
- diamati noda yang terbentuk

Hasil

5.1 Penggabungan Vial, Pemekatan dan Identifikasi Steroid dengan Reagen LB

Fraksi hasil isolasi

- digunting spot Rf yang sama
- disemprotkan pereaksi *Libermann Burchard*
- diamati dibawah lampu UV panjang gelombang 254 nm dan 366 nm
- ditandai fraksi yang mempunyai warna hijau (steroid)
- digabungkan fraksi dan dipekatkan dengan *rotary evaporator*
- dialiri gas N_2

Hasil

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

6. Uji Toksisitas Senyawa Steroid Menggunakan metode BSLT

6.1 Penetasan larva udang

250 mL air laut

- dimasukkan dalam botol penetasan
- dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina* Leach
- diaerasi

Hasil

6.2 Uji toksisitas

Isolat steroid sampel

- ditimbang sebanyak 10 mL
- dipipet masing-masing sebanyak 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL dan 2,5 mL
- dimasukkan ke dalam botol vial dan pelarutnya diuapkan hingga kering
- dimasukkan 100 mL dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut
- dikocok sampai ekstrak dapat larut dalam air laut
- dipindahkan dalam labu ukur 10 mL
- dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina*
- ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL sampai konsentrasi masing-masing larutan menjadi 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm

Hasil

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

7. Identifikasi menggunakan UV-Vis

Isolat steroid

- diambil sebanyak 2 mL
- dimasukkan kedalam kuvet hingga sepertiganya
- dianalisis pada panjang gelombang 200-800 nm

Hasil

8. Identifikasi Menggunakan FTIR

Isolat steroid

- digerus dengan KBr menggunakan mortar agate
- dipres selama 10 menit dengan tekanan 10 Torr
- diletakkan dalam instrumentasi FTIR
- diidentifikasi

Hasil

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Lampiran 3. Pembuatan Reagen dan Larutan

3.1.Pembuatan larutan HCl 2 N

Berat jenis (BJ) HCl pekat = 1,267 g/mL

Konsentrasi (C) = 37% = $\frac{37}{100}$

Berat molekul (BM) HCl = 36,5 g/mol

n = 1 (jumlah mol ion H^-)

Normalitas HCl = n x Molaritas HCl

$$= 1 \text{ x } \frac{C \; x \; BJ \; HCl}{BM \; HCl \; pekat}$$

$$= \frac{\frac{37}{100} \; x \; 12{,}67 \frac{g}{mL} \; x \; 1000}{36{,}5 \; g/mol}$$

$$= \frac{37 \; x \; 12{,}67 \; L^{-1} \; x \; 10}{36{,}5 \; g/mol}$$

$$= 12{,}84 \text{ mol/L}$$

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

$12,84 \text{ N} \; . \; V_1 = 2\text{N} \; . \; 100 \text{ mL}$

$V_1 = 15{,}6 \text{ mL}$

Adapun prosedur pembuatannya adalah diambil aquades dan dimasukkan dalam labu takar kemudian ditambahkan larutan HCl pekat 37% sebanyak 16,5 mL. selanjutnya ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

3.2.Pembuatan larutan $NaHCO_3$ jenuh

Kelarutan $NaHCO_3$ sebesar 9,99 g dalam 100 mL aquades. Sehingga untuk membuat larutan $NaHCO_3$ jenuh ditimbang $NaHCO_3$ dengan berat > 9,99 g (sampai terdapat endapan padatan yang tidak larut). Lalu disaring larutan tersebut untuk memisahkan residu dan filtrat sehingga didapatkan larutan $NaHCO_3$ jenuh.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

3.3.Pembuatan reagen Liberman-Burchard

- Kloroform p.a : 0,5 mL
- Anhidrida asetat : 0,5 mL
- Asam Sulfat pekat p.a : 1,2 mL

Dimasukkan ekstrak sampel ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL. kloroform lalu ditambah dengan 0,5 mL anhidrida asetat. Campuran ini selanjutnya ditambah dengan 1-2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung reaksi. Cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan keberhasilan terbentuknya reagen Liberman-Burchard.

3.4.Pembuatan Eluen n-heksana : etil asetat

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

3.4.1. Eluen Kromatografi Kolom

- 95:5

  N-heksana = $\frac{95}{100}$ x 100 = 95 ml

  Etil asetat = $\frac{5}{100}$ x 100 = 5 ml

- 90:10

  N-heksana = $\frac{90}{100}$ x 100 = 90 ml

  Etil asetat = $\frac{10}{100}$ x 100 = 10 ml

- 85:15

  N-heksana = $\frac{85}{100}$ x 100 = 85 ml

  Etil asetat = $\frac{15}{100}$ x 100 = 5 ml

- 80:20

  N-heksana = $\frac{80}{100}$ x 100 = 80 ml

  Etil asetat = $\frac{20}{100}$ x 100 = 20 ml

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

- 75:25

  N-heksana = $\frac{75}{100}$ x 100 = 75 ml

  Etil asetat = $\frac{25}{100}$ x 100 = 25 ml

- 70:30

  N-heksana = $\frac{70}{100}$ x 100 = 70 ml

  Etil asetat = $\frac{30}{100}$ x 100 = 30 ml

3.4.2. Eluen monitoring KLTA

- Volume n-heksana (17 dalam 100 mL)

  N-heksana = $\frac{17}{20}$ x 100 = 85 ml

- Volume etil asetat (3 dalam 100 mL)

  Etil asetat = $\frac{3}{20}$ x 100 = 15 ml

3.5.Pembuatan larutan stok 50 ppm dalam 20 ml pelarut

Ppm = $\frac{mg}{L}$

50 ppm = $\frac{mg}{0{,}02\ L}$

= 1 mg

Jadi, untuk membuat 20 mL larutan sampel 50 ppm diperlukan bahan sebanyak 1 mg

3.5.1. Pembuatan larutan sampel 5 ppm

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$5\ mL.\ 5\ ppm = V2.\ 50\ ppm$$

$$V2 = \frac{5\ mL\ X\ 5\ ppm}{50\ ppm}$$

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

Jadi, untuk membuat 5 mL larutan sampel 5 ppm diperlukan larutan stok 50 ppm sebanyak 0,5 mL

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

3.5.2. Pembuatan larutan sampel 4 ppm

V1.M1 = V2.M2

5 mL. 4 ppm = V2. 50 ppm

$$V2 = \frac{5\ mL\ X\ 4\ ppm}{50\ ppm}$$

= 0,4 mL

Jadi, untuk membuat 5 mL larutan sampel 4 ppm diperlukan larutan stok 50 ppm sebanyak 0,4 mL

3.5.3. Pembuatan larutan sampel 3 ppm

V1.M1 = V2.M2

5 mL. 3 ppm = V2. 50 ppm

$$V2 = \frac{5\ mL\ X\ 3\ ppm}{50\ ppm}$$

= 0,3 mL

Jadi, untuk membuat 5 mL larutan sampel 3 ppm diperlukan larutan stok 50 ppm sebanyak 0,3 mL

3.5.4. Pembuatan larutan sampel 2 ppm

V1.M1 = V2.M2

5 mL. 2 ppm = V2. 50 ppm

$$V2 = \frac{5\ mL\ X\ 2\ ppm}{50\ ppm}$$

= 0,2 mL

Jadi, untuk membuat 5 mL larutan sampel 2 ppm diperlukan larutan stok 50 ppm sebanyak 0,2 mL

3.5.5. Pembuatan larutan sampel 1 ppm

V1.M1 = V2.M2

5 mL. 1 ppm = V2. 50 ppm

$$V2 = \frac{5\ mL\ X\ 1\ ppm}{50\ ppm}$$

= 0,1 mL

Jadi, untuk membuat 5 mL larutan sampel 1 ppm diperlukan larutan stok 50 ppm sebanyak 0,1 mL

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Lampiran 4. Perhitungan Rendemen

4.1.Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma cottonii*

Berat sampel = 100 gram

Berat ekstrak pekat metanol = 6,3163 gram

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

$$= \frac{6{,}3163\ gram}{100\ gram} \text{ x } 100\%$$

$$= 6{,}3163\ \%$$

4.2.Ekstrak dari fraksi Etil Asetat

Berat ekstrak metanol = 5,06 gram

Berat fraksi yang diperoleh = 0,87 gram

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{berat\ ekstrak\ fraksi\ EA}{berat\ ekstrak\ metanol} \text{ x } 100\%$$

$$= \frac{0{,}87\ gram}{5{,}06\ gram} \text{ x } 100\%$$

$$= 17{,}1936\ \%$$

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Lampiran 5. Perhitungan Rf Variasi Komposisi Eluen

a. Fraksi 9-11

Rf noda 1 = $\frac{6{,}6\ cm}{8\ cm}$ = 0,825 cm

b. Fraksi 12-15

Rf noda 1 = $\frac{6{,}5\ cm}{8\ cm}$ = 0,8125 cm

Rf noda 2 = $\frac{6{,}4\ cm}{8\ cm}$ = 0,8 cm

c. Fraksi 16-24

Rf noda 1 = $\frac{4{,}2\ cm}{8\ cm}$ = 0,525 cm

Rf noda 2 = $\frac{4{,}1\ cm}{8\ cm}$ = 0,5125 cm

d. Fraksi 25-48

Rf noda 1 = $\frac{4{,}1\ cm}{8\ cm}$ = 0,5125 cm

e. Fraksi 49-74

Rf noda 1 = $\frac{3\ cm}{8\ cm}$ = 0,375 cm

f. Fraksi 75-87

Rf noda 1 = $\frac{3{,}1\ cm}{8\ cm}$ = 0,3875 cm

Rf noda 1 = $\frac{2{,}8\ cm}{8\ cm}$ = 0,35 cm

g. Fraksi 88-98

Rf noda 1 = $\frac{1{,}6\ cm}{8\ cm}$ = 0,2 cm

h. Fraksi 99-155

Rf noda 1 = $\frac{1{,}7\ cm}{8\ cm}$ = 0,2125 cm

i. Fraksi 156-210

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Rf noda 1 = $\frac{0{,}1\ cm}{8\ cm}$ = 0,0125 cm

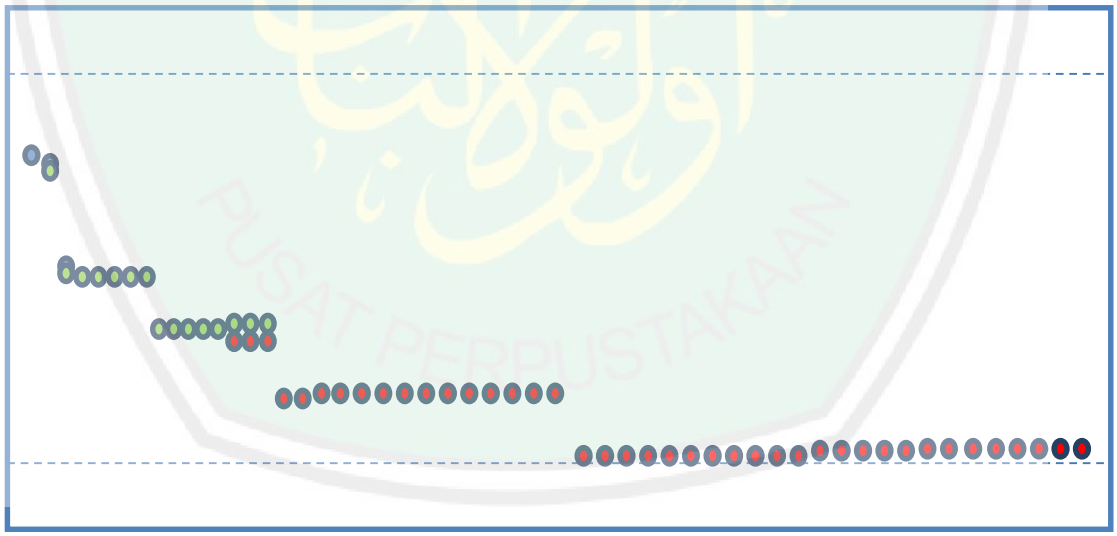
j. Fraksi 211-279

Rf noda 1 = $\frac{0{,}2\ cm}{8\ cm}$ = 0,025 cm

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Lampiran 6. Hasil Monitoring KLTA

No.	Fraksi	Vial	Warna (UV)	Jarak Senyawa	Jarak Elusi	Rf	Senyawa
1.	A	1-8	-	-	-	-	-
2.	**B**	**9-11**	**Biru**	**6,6**	**8**	**0,825**	**steroid**
3.	C	12-15	Biru	6,5	8	0,8125	Steroid
			Hijau	6,4		0,8	
4.	D	16-24	Biru	4,2	8	0,525	Steroid
			Hijau	4,2		0,5125	
5.	**E**	**25-48**	**Hijau**	**4,1**	**8**	**0,5125**	**Steroid**
6.	**F**	**49-74**	**Hijau**	**3**	**8**	**0,375**	**Steroid**
7.	G	75-87	Hijau	3,1	8	0,3875	Campuran
			Merah	2,8		0,35	
8.	H	88-98	Merah	1,6	8	0,2	Triterpenoid
9.	I	99-155	Merah	1,7	8	0,2125	Triterpenoid
10.	J	156-210	Merah	0,1	8	0,0125	Triterpenoid
11.	K	211-279	Merah	0,2	8	0,025	Triterpenoid



Gambar Ilustrasi Hasil Monitoring dengan KLT Analitik mulai vial 5-275 (kelipatan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Lampiran 7. Hasil Rendemen Kromatografi Kolom

Fraksi	Senyawa	Berat (gram)	Rendemen (%)
(9-11)	Steroid	0,0011	1,6
(25-48)	Steroid	0,0029	4,3
(49-74)	Steroid	0,0032	4,7
(88-98)	Triterpenoid	0,0004	0,6
(99-155)	Triterpenoid	0,0025	3,7
(156-210)	Triterpenoid	0,0002	0,3
(211-279)	Triterpenoid	0,0078	11,6

a. Fraksi 9-11

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{berat\ isolat}{berat\ sampel} \text{ x } 100\%$$

$$= \frac{0{,}0011\ g}{0{,}067\ g} \text{ x } 100\%$$

$$= 1{,}6\%$$

b. Fraksi 25-48

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{berat\ isolat}{berat\ sampel} \text{ x } 100\%$$

$$= \frac{0{,}0029\ g}{0{,}067\ g} \text{ x } 100\%$$

$$= 4{,}3\%$$

c. Fraksi 49-74

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{berat\ isolat}{berat\ sampel} \text{ x } 100\%$$

$$= \frac{0{,}0032\ g}{0{,}067\ g} \text{ x } 100\%$$

$$= 4{,}7\%$$

d. Fraksi 88-98

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{berat\ isolat}{berat\ sampel} \text{ x } 100\%$$

$$= \frac{0{,}0004\ g}{0{,}067\ g} \text{ x } 100\%$$

$$= 0{,}6\%$$

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

e. Fraksi 99-155

% Rendemen $= \frac{berat\ isolat}{berat\ sampel}$ x 100%

$= \frac{0{,}0025\ g}{0{,}067\ g}$ x 100%

= 3,7%

f. Fraksi 156-210

% Rendemen $= \frac{berat\ isolat}{berat\ sampel}$ x 100%

$= \frac{0{,}0002\ g}{0{,}067\ g}$ x 100%

= 0,3%

g. Fraksi 211-279

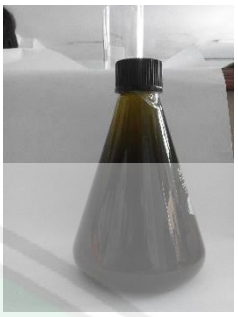
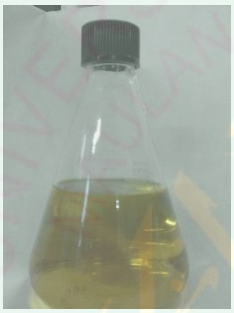
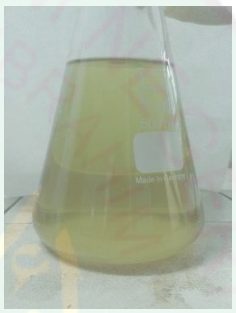
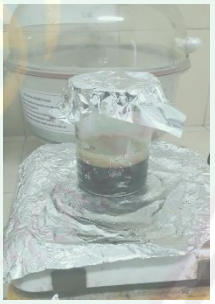
% Rendemen $= \frac{berat\ isolat}{berat\ sampel}$ x 100%

$= \frac{0{,}0078\ g}{0{,}067\ g}$ x 100%

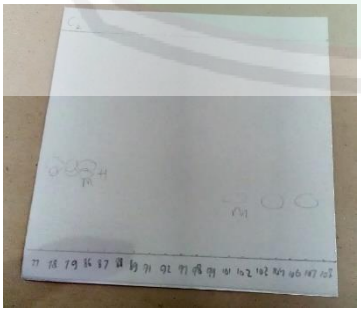
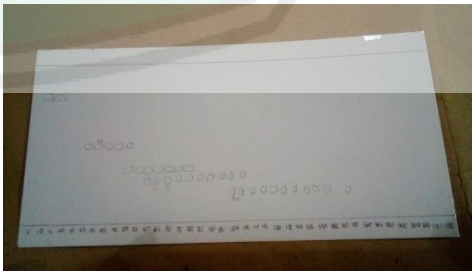
= 11,6%

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Lampiran 8. Gambar Penelitian

 Proses Ekstraksi Maserasi	 Filtrat 1
 Filtrat 2	 Filtrat 3
 Hasil Uji Fotokimia Setroid	 Hidrolisis dengan HCl
 Penetralan dengan $NaHCO_3$	 Proses Partisi Ulangan 1

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

 Proses Partisi Ulangan 2	 Proses Partisi Ulangan 3
 Proses Dekantasi Kolom Kromatografi	 Proses Elusi Kromatografi Kolom
 Hasil Monitoring KLTA dengan lampu UV	 Hasil Monitoring KLTA dengan lampu UV
 Hasil Monitoring KLTA	 Hasil Monitoring KLTA

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Lampiran 9. Data Kematian larva dan perhitungan LC_{50} uji toksisitas isolat B, isolat E dan isolat F

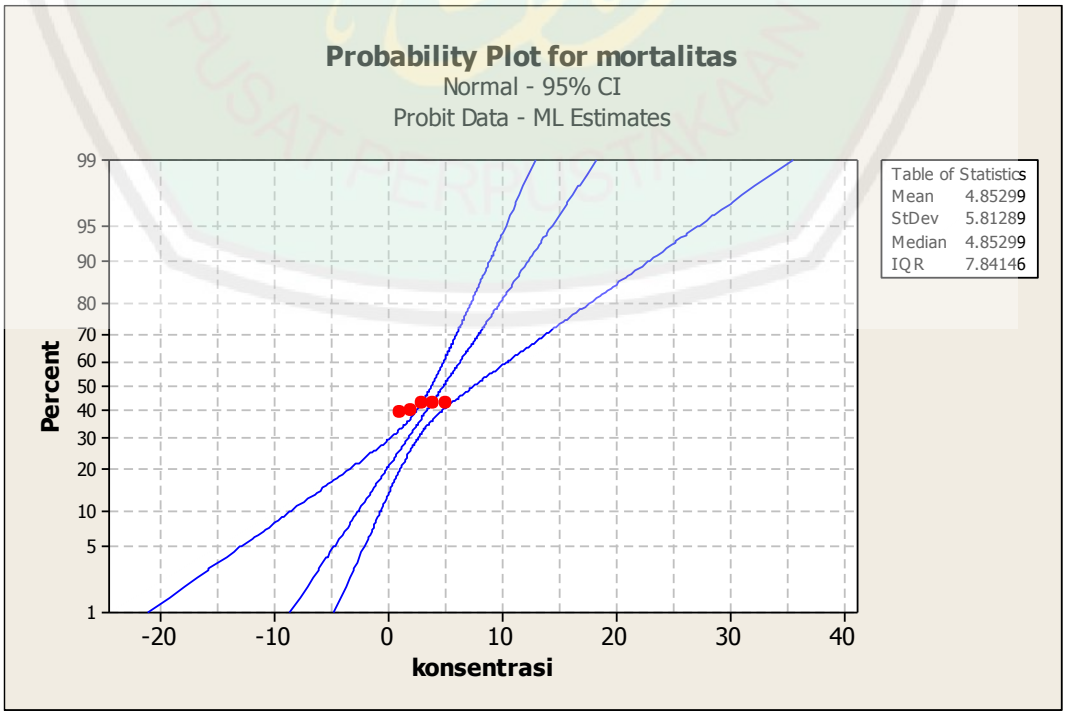
1. Isolat B

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati (ekor)						% Mortalitas
	I	II	III	IV	V	Modus	
0	0	0	0	0	0	0	0
1	3	4	2	6	4	4	40
2	4	3	4	5	3	4	40
3	5	4	5	5	5	5	50
4	6	4	3	5	4	4	40
5	4	6	4	2	4	4	40

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

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

Mortalitas = %Mortalitas x jumlah hewan uji



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Probit Analysis: mortalitas, n versus konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	21
	Non-event	279
n	Total	300

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1.73426	0.220837	-7.85	0.000
konsentrasi	0.0955717	0.0675120	1.42	0.157
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -75.066

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	4.21909	4	0.377
Deviance	6.11681	4	0.191

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI Lower	Upper
Mean	18.1462	10.8802	-3.17865	39.4711
StDev	10.4634	7.39133	2.62048	41.7793

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI Lower	Upper
1	-6.19518	6.48046	*	*
2	-3.34288	4.51235	*	*
3	-1.53319	3.29310	*	*
4	-0.171828	2.41652	*	*
5	0.935534	1.76992	*	*
6	1.87807	1.33892	*	*
7	2.70450	1.16075	*	*
8	3.44446	1.23570	*	*
9	4.11742	1.47132	*	*
10	4.73689	1.77523	*	*
20	9.34004	4.74122	*	*
30	12.6592	7.03829	*	*
40	15.4954	9.02048	*	*
50	18.1462	10.8802	*	*
60	20.7971	12.7437	*	*

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

70	23.6332	14.7400	*	*
80	26.9524	17.0785	*	*
90	31.5555	20.3238	*	*
91	32.1750	20.7607	*	*
92	32.8480	21.2354	*	*
93	33.5879	21.7574	*	*
94	34.4144	22.3403	*	*
95	35.3569	23.0053	*	*
96	36.4643	23.7866	*	*
97	37.8256	24.7471	*	*
98	39.6353	26.0242	*	*
99	42.4876	28.0372	*	*

Probability Plot for mortalitas

Probit Analysis: mortalitas, n versus konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	105
	Non-event	195
n	Total	300

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-0.834868	0.144162	-5.79	0.000
konsentrasi	0.172032	0.0458154	3.75	0.000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -186.974

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	26.2257	4	0.000
Deviance	35.4286	4	0.000

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI Lower	Upper
Mean	4.85299	0.726629	3.42883	6.27716
StDev	5.81289	1.54808	3.44906	9.79678

Table of Percentiles

		Standard	95.0% Fiducial CI

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Percent	Percentile	Error	Lower	Upper
1	-8.66980	3.05433	-21.1251	-4.71508
2	-7.08521	2.63741	-17.8202	-3.66393
3	-6.07984	2.37381	-15.7253	-2.99516
4	-5.32354	2.17619	-14.1506	-2.49073
5	-4.70835	2.01600	-12.8709	-2.07932
6	-4.18473	1.88015	-11.7826	-1.72816
7	-3.72561	1.76149	-10.8293	-1.41932
8	-3.31453	1.65569	-9.97669	-1.14191
9	-2.94066	1.55992	-9.20213	-0.888713
10	-2.59652	1.47220	-8.49005	-0.654747
20	-0.0392538	0.846918	-3.25381	1.13890
30	1.80471	0.497250	0.288419	2.66572
40	3.38032	0.477273	2.51507	4.77038
50	4.85299	0.726629	3.80942	7.52440
60	6.32567	1.06576	4.88723	10.4950
70	7.90128	1.45836	5.97686	13.7367
80	9.74524	1.93231	7.22250	17.5601
90	12.3025	2.60014	8.92885	22.8836
91	12.6467	2.69052	9.15747	23.6010
92	13.0205	2.78880	9.40565	24.3806
93	13.4316	2.89696	9.67834	25.2380
94	13.8907	3.01788	9.98267	26.1957
95	14.4143	3.15591	10.3295	27.2883
96	15.0295	3.31823	10.7367	28.5723
97	15.7858	3.51797	11.2369	30.1512
98	16.7912	3.78378	11.9013	32.2505
99	18.3758	4.20321	12.9475	35.5603

2. Isolat E

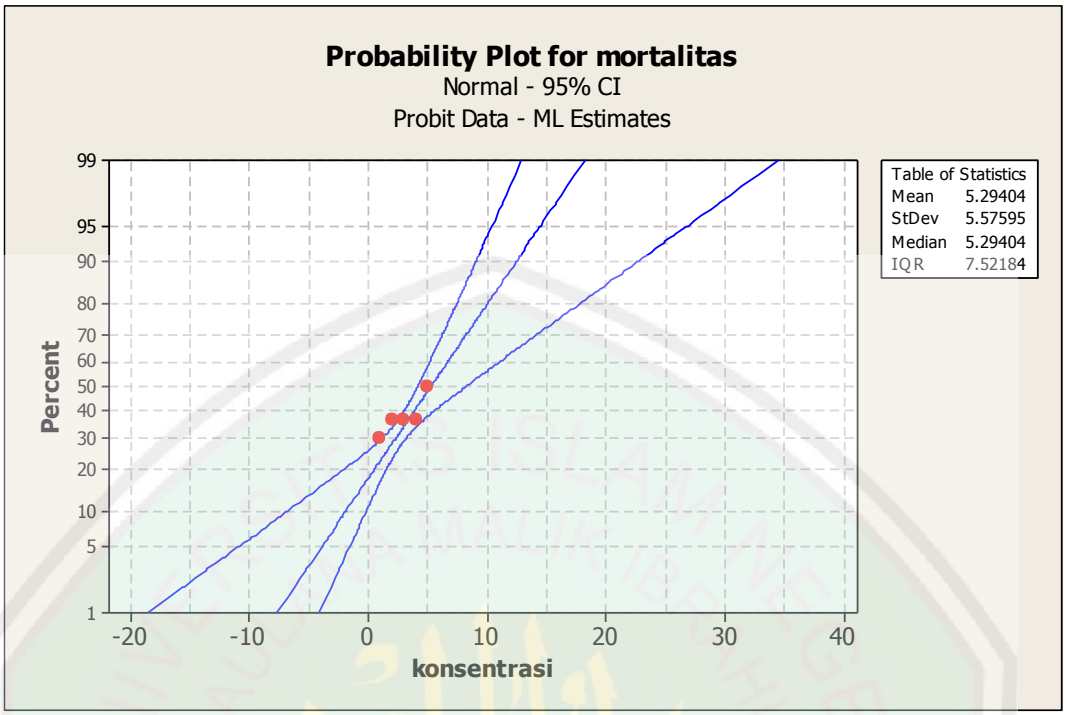
Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati (ekor)						% Mortalitas
	I	II	III	IV	V	Modus	
0	0	0	0	0	0	0	0
1	6	3	4	3	6	3	30
2	6	6	1	5	6	6	60
3	2	4	2	5	3	2	20
4	2	6	6	3	3	3	30
5	10	6	3	0	5	5	50

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

Mortalitas	Jumlah hewan uji (ekor)	Konsentrasi (ppm)
0	50	0
15	50	1
30	50	2
10	50	3
15	50	4
25	50	5

Mortalitas = %Mortalitas x jumlah hewan uji

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



Probit Analysis: mortalitas, n versus konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	21
	Non-event	279
n	Total	300

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1.73426	0.220837	-7.85	0.000
konsentrasi	0.0955717	0.0675120	1.42	0.157
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -75.066

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	4.21909	4	0.377
Deviance	6.11681	4	0.191

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI Lower	Upper
Mean	18.1462	10.8802	-3.17865	39.4711
StDev	10.4634	7.39133	2.62048	41.7793

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI Lower	Upper
1	-6.19518	6.48046	*	*
2	-3.34288	4.51235	*	*
3	-1.53319	3.29310	*	*
4	-0.171828	2.41652	*	*
5	0.935534	1.76992	*	*
6	1.87807	1.33892	*	*
7	2.70450	1.16075	*	*
8	3.44446	1.23570	*	*
9	4.11742	1.47132	*	*
10	4.73689	1.77523	*	*
20	9.34004	4.74122	*	*
30	12.6592	7.03829	*	*
40	15.4954	9.02048	*	*
50	18.1462	10.8802	*	*
60	20.7971	12.7437	*	*
70	23.6332	14.7400	*	*
80	26.9524	17.0785	*	*
90	31.5555	20.3238	*	*
91	32.1750	20.7607	*	*
92	32.8480	21.2354	*	*
93	33.5879	21.7574	*	*
94	34.4144	22.3403	*	*
95	35.3569	23.0053	*	*
96	36.4643	23.7866	*	*
97	37.8256	24.7471	*	*
98	39.6353	26.0242	*	*
99	42.4876	28.0372	*	*

Probability Plot for mortalitas

Probit Analysis: mortalitas, n versus konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	105
	Non-event	195
n	Total	300

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-0.834868	0.144162	-5.79	0.000

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

konsentrasi 0.172032 0.0458154 3.75 0.000
Natural
Response 0

Log-Likelihood = -186.974

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	26.2257	4	0.000
Deviance	35.4286	4	0.000

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI Lower	Upper
Mean	4.85299	0.726629	3.42883	6.27716
StDev	5.81289	1.54808	3.44906	9.79678

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI Lower	Upper
1	-8.66980	3.05433	-21.1251	-4.71508
2	-7.08521	2.63741	-17.8202	-3.66393
3	-6.07984	2.37381	-15.7253	-2.99516
4	-5.32354	2.17619	-14.1506	-2.49073
5	-4.70835	2.01600	-12.8709	-2.07932
6	-4.18473	1.88015	-11.7826	-1.72816
7	-3.72561	1.76149	-10.8293	-1.41932
8	-3.31453	1.65569	-9.97669	-1.14191
9	-2.94066	1.55992	-9.20213	-0.888713
10	-2.59652	1.47220	-8.49005	-0.654747
20	-0.0392538	0.846918	-3.25381	1.13890
30	1.80471	0.497250	0.288419	2.66572
40	3.38032	0.477273	2.51507	4.77038
50	4.85299	0.726629	3.80942	7.52440
60	6.32567	1.06576	4.88723	10.4950
70	7.90128	1.45836	5.97686	13.7367
80	9.74524	1.93231	7.22250	17.5601
90	12.3025	2.60014	8.92885	22.8836
91	12.6467	2.69052	9.15747	23.6010
92	13.0205	2.78880	9.40565	24.3806
93	13.4316	2.89696	9.67834	25.2380
94	13.8907	3.01788	9.98267	26.1957
95	14.4143	3.15591	10.3295	27.2883
96	15.0295	3.31823	10.7367	28.5723
97	15.7858	3.51797	11.2369	30.1512
98	16.7912	3.78378	11.9013	32.2505
99	18.3758	4.20321	12.9475	35.5603

Probability Plot for mortalitas

Probit Analysis: mortalitas, n versus konsentrasi

Distribution: Normal

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	95
	Non-event	205
n	Total	300

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-0.949442	0.148198	-6.41	0.000
konsentrasi	0.179342	0.0467952	3.83	0.000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -179.678

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	45.0348	4	0.000
Deviance	50.5263	4	0.000

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI Lower	Upper
Mean	5.29404	0.799163	3.72771	6.86037
StDev	5.57595	1.45492	3.34362	9.29866

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI Lower	Upper
1	-7.67756	2.74360	-18.6145	-4.09730
2	-6.15756	2.35267	-15.5147	-3.08043
3	-5.19317	2.10573	-13.5502	-2.43307
4	-4.46770	1.92078	-12.0739	-1.94448
5	-3.87758	1.77101	-10.8745	-1.54570
6	-3.37530	1.64415	-9.85478	-1.20504
7	-2.93490	1.53350	-8.96188	-0.905184
8	-2.54057	1.43499	-8.16355	-0.635548
9	-2.18194	1.34597	-7.43865	-0.389169
10	-1.85183	1.26461	-6.77256	-0.161190
20	0.601200	0.696951	-1.90112	1.61099
30	2.37001	0.437322	1.24559	3.25480
40	3.88139	0.526449	3.02629	5.56742
50	5.29404	0.799163	4.16997	8.24966
60	6.70669	1.12779	5.18650	11.0591
70	8.21807	1.50010	6.23068	14.1082
80	9.98687	1.94688	7.43026	17.6991
90	12.4399	2.57511	9.07663	22.6964
91	12.7700	2.66009	9.29733	23.3697
92	13.1286	2.75248	9.53694	24.1014
93	13.5230	2.85416	9.80022	24.9061

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

94	13.9634	2.96783	10.0941	25.8050
95	14.4657	3.09757	10.4290	26.8305
96	15.0558	3.25014	10.8222	28.0355
97	15.7812	3.43787	11.3053	29.5172
98	16.7456	3.68768	11.9469	31.4875
99	18.2656	4.08187	12.9574	34.5937

3. Isolat F

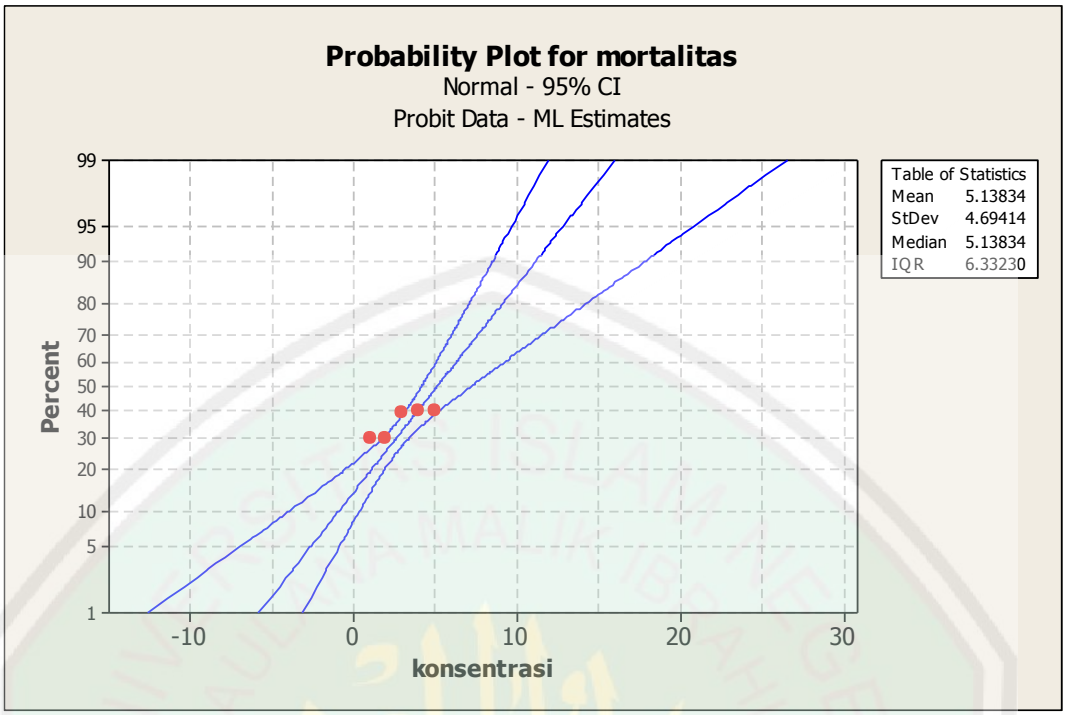
Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati (ekor)						% Mortalitas
	I	II	III	IV	V	Modus	
0	0	0	0	0	0	0	0
1	4	3	2	3	3	3	30
2	3	4	5	4	3	3	30
3	5	6	4	6	4	4	40
4	4	4	6	5	3	4	40
5	3	4	4	5	6	4	40

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

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

Mortalitas = %Mortalitas x jumlah hewan uji

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



Probit Analysis: mortalitas, n versus konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	21
	Non-event	279
n	Total	300

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1.73426	0.220837	-7.85	0.000
konsentrasi	0.0955717	0.0675120	1.42	0.157

Natural Response 0

Log-Likelihood = -75.066

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	4.21909	4	0.377
Deviance	6.11681	4	0.191

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI Lower	Upper
Mean	18.1462	10.8802	-3.17865	39.4711
StDev	10.4634	7.39133	2.62048	41.7793

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI Lower	Upper
1	-6.19518	6.48046	*	*
2	-3.34288	4.51235	*	*
3	-1.53319	3.29310	*	*
4	-0.171828	2.41652	*	*
5	0.935534	1.76992	*	*
6	1.87807	1.33892	*	*
7	2.70450	1.16075	*	*
8	3.44446	1.23570	*	*
9	4.11742	1.47132	*	*
10	4.73689	1.77523	*	*
20	9.34004	4.74122	*	*
30	12.6592	7.03829	*	*
40	15.4954	9.02048	*	*
50	18.1462	10.8802	*	*
60	20.7971	12.7437	*	*
70	23.6332	14.7400	*	*
80	26.9524	17.0785	*	*
90	31.5555	20.3238	*	*
91	32.1750	20.7607	*	*
92	32.8480	21.2354	*	*
93	33.5879	21.7574	*	*
94	34.4144	22.3403	*	*
95	35.3569	23.0053	*	*
96	36.4643	23.7866	*	*
97	37.8256	24.7471	*	*
98	39.6353	26.0242	*	*
99	42.4876	28.0372	*	*

Probability Plot for mortalitas

Probit Analysis: mortalitas, n versus konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	105
	Non-event	195
n	Total	300

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-0.834868	0.144162	-5.79	0.000

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

konsentrasi 0.172032 0.0458154 3.75 0.000
Natural
Response 0

Log-Likelihood = -186.974

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	26.2257	4	0.000
Deviance	35.4286	4	0.000

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI Lower	Upper
Mean	4.85299	0.726629	3.42883	6.27716
StDev	5.81289	1.54808	3.44906	9.79678

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI Lower	Upper
1	-8.66980	3.05433	-21.1251	-4.71508
2	-7.08521	2.63741	-17.8202	-3.66393
3	-6.07984	2.37381	-15.7253	-2.99516
4	-5.32354	2.17619	-14.1506	-2.49073
5	-4.70835	2.01600	-12.8709	-2.07932
6	-4.18473	1.88015	-11.7826	-1.72816
7	-3.72561	1.76149	-10.8293	-1.41932
8	-3.31453	1.65569	-9.97669	-1.14191
9	-2.94066	1.55992	-9.20213	-0.888713
10	-2.59652	1.47220	-8.49005	-0.654747
20	-0.0392538	0.846918	-3.25381	1.13890
30	1.80471	0.497250	0.288419	2.66572
40	3.38032	0.477273	2.51507	4.77038
50	4.85299	0.726629	3.80942	7.52440
60	6.32567	1.06576	4.88723	10.4950
70	7.90128	1.45836	5.97686	13.7367
80	9.74524	1.93231	7.22250	17.5601
90	12.3025	2.60014	8.92885	22.8836
91	12.6467	2.69052	9.15747	23.6010
92	13.0205	2.78880	9.40565	24.3806
93	13.4316	2.89696	9.67834	25.2380
94	13.8907	3.01788	9.98267	26.1957
95	14.4143	3.15591	10.3295	27.2883
96	15.0295	3.31823	10.7367	28.5723
97	15.7858	3.51797	11.2369	30.1512
98	16.7912	3.78378	11.9013	32.2505
99	18.3758	4.20321	12.9475	35.5603

Probability Plot for mortalitas

Probit Analysis: mortalitas, n versus konsentrasi

Distribution: Normal

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	95
	Non-event	205
n	Total	300

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-0.949442	0.148198	-6.41	0.000
konsentrasi	0.179342	0.0467952	3.83	0.000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -179.678

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	45.0348	4	0.000
Deviance	50.5263	4	0.000

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI Lower	Upper
Mean	5.29404	0.799163	3.72771	6.86037
StDev	5.57595	1.45492	3.34362	9.29866

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI Lower	Upper
1	-7.67756	2.74360	-18.6145	-4.09730
2	-6.15756	2.35267	-15.5147	-3.08043
3	-5.19317	2.10573	-13.5502	-2.43307
4	-4.46770	1.92078	-12.0739	-1.94448
5	-3.87758	1.77101	-10.8745	-1.54570
6	-3.37530	1.64415	-9.85478	-1.20504
7	-2.93490	1.53350	-8.96188	-0.905184
8	-2.54057	1.43499	-8.16355	-0.635548
9	-2.18194	1.34597	-7.43865	-0.389169
10	-1.85183	1.26461	-6.77256	-0.161190
20	0.601200	0.696951	-1.90112	1.61099
30	2.37001	0.437322	1.24559	3.25480
40	3.88139	0.526449	3.02629	5.56742
50	5.29404	0.799163	4.16997	8.24966
60	6.70669	1.12779	5.18650	11.0591
70	8.21807	1.50010	6.23068	14.1082
80	9.98687	1.94688	7.43026	17.6991
90	12.4399	2.57511	9.07663	22.6964
91	12.7700	2.66009	9.29733	23.3697
92	13.1286	2.75248	9.53694	24.1014
93	13.5230	2.85416	9.80022	24.9061

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

94	13.9634	2.96783	10.0941	25.8050
95	14.4657	3.09757	10.4290	26.8305
96	15.0558	3.25014	10.8222	28.0355
97	15.7812	3.43787	11.3053	29.5172
98	16.7456	3.68768	11.9469	31.4875
99	18.2656	4.08187	12.9574	34.5937

Probability Plot for mortalitas

Probit Analysis: mortalitas, n versus konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	90
	Non-event	210
n	Total	300

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1.09463	0.154303	-7.09	0.000
konsentrasi	0.213031	0.0479010	4.45	0.000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -172.888

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	15.4275	4	0.004
Deviance	21.6996	4	0.000

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI Lower	Upper
Mean	5.13834	0.644989	3.87419	6.40250
StDev	4.69414	1.05550	3.02106	7.29377

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI Lower	Upper
1	-5.78186	1.95937	-12.5949	-3.09543
2	-4.50224	1.67759	-10.3187	-2.19552
3	-3.69037	1.49998	-8.87684	-1.62223
4	-3.07963	1.36723	-7.79391	-1.18926
5	-2.58283	1.25997	-6.91447	-0.835614

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

6	-2.15998	1.16933	-6.16726	-0.533291
7	-1.78923	1.09048	-5.51335	-0.266957
8	-1.45726	1.02049	-4.92909	-0.0272522
9	-1.15535	0.957445	-4.39897	0.191993
10	-0.877441	0.900036	-3.91227	0.395084
20	1.18765	0.512155	-0.377887	1.98642
30	2.67673	0.367302	1.84991	3.45462
40	3.94910	0.451334	3.20624	5.25639
50	5.13834	0.644989	4.18837	7.22606
60	6.32759	0.878255	5.08331	9.28291
70	7.59995	1.14448	6.00621	11.5181
80	9.08903	1.46560	7.06699	14.1533
90	11.1541	1.91870	8.52258	17.8235
91	11.4320	1.98007	8.71767	18.3182
92	11.7339	2.04682	8.92946	18.8557
93	12.0659	2.12030	9.16218	19.4470
94	12.4367	2.20246	9.42190	20.1075
95	12.8595	2.29627	9.71790	20.8610
96	13.3563	2.40661	10.0654	21.7466
97	13.9671	2.54242	10.4923	22.8356
98	14.7789	2.72319	11.0593	24.2837
99	16.0585	3.00855	11.9522	26.567

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG