

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL  
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS FRAKSI n-HEKSANA *Hydrilla verticillata***

**SKRIPSI**

Oleh:  
**BAGAS PURWANTORO**  
NIM. 15630008



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

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL  
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS FRAKSI n-HEKSANA *Hydrilla verticillata***

**SKRIPSI**

Oleh:  
**BAGAS PURWANTORO**  
NIM. 15630008

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

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

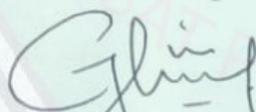
**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL  
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS FRAKSI n-HEKSANA *Hydrilla verticillata***

SKRIPSI

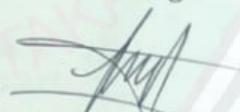
Oleh:  
**BAGAS PURWANTORO**  
NIM. 15630008

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji  
Tanggal: 29 Mei 2019

Pembimbing I

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

Pembimbing II

  
Mujahidin Ahmad, M.Sc  
NIDT. 19860512 20160801 1 060



Mengetahui,  
Ketua Jurusan

  
Etik Kamillah Hayati, M.Si  
NIP. 19790630 200604 2 002

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL  
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS FRAKSI n-HEKSANA *Hydrilla verticillata***

**SKRIPSI**

Oleh:  
**BAGAS PURWANTORO**  
NIM. 15630008

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 29 Mei 2019

Penguji Utama	: Eny Yulianti, M.Si NIP. 19760611 200501 2 006	(.....)
Ketua Penguji	: Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc NIDT. 19900906 20180201 2 239	(.....)
Sekretaris Penguji	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	(.....)
Anggota Penguji	: Mujahidin Ahmad, M.Sc NIDT. 19860512 20160801 1 060	(.....)

Mengesahkan,  
Ketua Jurusan



**Eluk Ismailah Hayati, M.Si**  
NIP. 19790620 200604 2 002

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Bagas Purwantoro

NIM : 15630008

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi

Lapis Tipis Fraksi n-Heksana *Hydrilla verticillata*

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

Malang, 21 Juni 2019

Yang membuat pernyataan



Bagas Purwantoro  
NIM. 15630008

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT, karena dengan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini, dengan judul “**Uji Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Fraksi n-Heksana *Hydrilla verticillata*** ”. Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini, khususnya kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat, hidayah serta karunia-Nya kepada penulis sehingga laporan ini dapat terselesaikan dengan baik.
2. Orang tua saya tercinta yang telah banyak memberikan perhatian, nasihat, doa, dan dukungan baik moril maupun materi, serta keluarga besar yang selalu memberi motivasi dan semangat.
3. Bapak Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag., selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
6. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si selaku pembimbing yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat dalam penyusunan skripsi ini.
7. Ibu Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc selaku konsultan yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat dalam penyusunan skripsi ini.
8. Bapak Mujahidin Ahmad, M.Sc selaku pembimbng agama yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat dalam penyusunan skripsi ini.

9. Teman-teman Jurusan Kimia UIN Malang angkatan 2015, khususnya kelompok riset *Hydrilla verticillata* 2018 dan kelompok riset bahan alam.
10. Semua pihak yang turut membantu dalam menyelesaikan penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu kritik dan saran yang bersifat konstruktif sangat penulis harapkan. Akhirnya dengan penuh rasa syukur kehadiran Allah SWT, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan pembaca pada umumnya.

Malang, 21 Mei 2019

Penulis



## HALAMAN PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada Engkau:

**Kepada Engkau Bapak dan Ibu tercinta dan terbaik di seluruh dunia**

*Bapak Sunhaji dan Ibu Sumarsih*

Mereka adalah orang tua hebat yang telah membesarkanku dengan penuh kasih sayang, terima kasih atas pengorbanan, nasehat dan do'a yang tiada hentinya kalian berikan kepadaku selama ini.

**Kepada Engkau mas, mbak dan adikku tersayang**

*Mas Fajar, Mbak Wulan dan Adikku Nosyta*

Terima Kasih atas dukungan serta do'a kalian. Penyemangat sampai kapanpun semoga Allah SWT membalas kebaikan kalian

**Kepada engkau sahabat squad Hydrilla verticillata dan sahabat ku kemana-mana**

*Mawaddah, Fiddin dan Irfan*

*serta teman-temanku Kimia A 2015 dan squad Organik*

yang mengajarkan bahwa tidak ada yang susah jika kita lalui itu bersama. Seorang sahabat yang terukir dalam hatiku sampai kapanpun sebagai penyemangat yang luar biasa.

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>LEMBAR ORISINALITAS .....</b>	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiv</b>
<b>المخلص .....</b>	<b>xv</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	5
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.4 Batasan Masalah .....	5
1.5 Manfaat Penelitian .....	6
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 <i>Hydrilla verticillata</i> .....	7
2.1.1 Deskripsi dan Klasifikasi <i>Hydrilla verticillata</i> .....	7
2.1.2 Kandungan <i>Hydrilla verticillata</i> .....	8
2.2 Steroid .....	9
2.3 Isolasi Senyawa Steroid .....	11
2.3.1 Ekstraksi Senyawa Steroid .....	11
2.3.2 Hidrolisis dan Partisi .....	13
2.3.3 Uji Fitokimia Senyawa Steroid .....	15
2.3.4 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) .....	16
2.4 Uji Antioksidan <i>Hydrilla verticillata</i> menggunakan DPPH .....	18
2.5 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis .....	22
2.6 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan FTIR .....	23
2.7 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan LC-MS/MS .....	26
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	30
3.2 Alat dan Bahan Penelitian .....	30
3.2.1 Alat .....	30
3.2.2 Bahan .....	30
3.3 Tahapan Penelitian .....	31
3.4 Pelaksanaan Penelitian .....	31

3.4.1 Preparasi Sampel.....	31
3.4.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri .....	32
3.4.3 Ekstraksi Sampel.....	33
3.4.4 Hidrolisis dan Partisi.....	33
3.4.5 Uji Fitokimia.....	34
3.4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	34
3.4.6.1 KLT Analitik.....	34
3.4.6.2 KLT Preparatif .....	35
3.4.7 Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH .....	36
3.4.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH.....	36
3.4.7.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel.....	36
3.4.8 Identifikasi Senyawa Steroid .....	37
3.4.8.1 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis .....	37
3.4.8.2 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan FTIR ...	37
3.4.8.3 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan LC-MS/MS.....	38
3.5 Analisis Data .....	38
 <b>BAB IV PEMBAHASAN</b>	
4.1 Preparasi Sampel.....	40
4.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri.....	40
4.3 Ekstraksi Sampel.....	41
4.4 Hidrolisis dan Partisi.....	42
4.5 Uji Fitokimia .....	44
4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....	46
4.6.1 KLT Analitik.....	46
4.6.2 KLT Preparatif .....	50
4.7 Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH .....	53
4.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH.....	53
4.7.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel.....	54
4.8 Identifikasi Senyawa Steroid .....	56
4.8.1 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis .....	56
4.8.2 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan FTIR.....	57
4.8.3 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan LC-MS/MS.....	60
 <b>BAB V PENUTUP</b>	
5.1 Kesimpulan .....	63
5.2 Saran.....	63
 <b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>73</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tumbuhan <i>Hydrilla Verticillata</i> .....	7
Gambar 2.2 Struktur senyawa steroid .....	9
Gambar 2.3 Dugaan reaksi hidrolisis ikatan O- <i>glikosida</i> dan penetralan dengan natrium bikarbonat .....	15
Gambar 2.4 Struktur (DPPH).....	19
Gambar 2.5 Reaksi radikal bebas DPPH dengan antioksidan.....	21
Gambar 2.6 Spektrum UV-Vis isolat steroid hasil KLTP.....	23
Gambar 2.7 Spektra Infra Merah isolat hasil pemisahan dengan KLT Preparatif mikroalga <i>Chlorella sp</i> .....	26
Gambar 2.7 Kromatogram LC-MS/MS steroid .....	29
Gambar 4.1 Dugaan reaksi <i>Liebermann-Burchard</i> .....	44
Gambar 4.2 Hasil uji fitokimia pada fraksi n-heksana .....	45
Gambar 4.3 Ilustrasi penampakan noda KLTA pada 366 nm .....	49
Gambar 4.4 Ilustrasi hasil pemisahan KLTP .....	52
Gambar 4.5 Hasil spektra UV-Vis larutan DPPH.....	54
Gambar 4.6 Hasil spektra UV-Vis isolat steroid.....	57
Gambar 4.7 Hasil identifikasi isolat steroid dengan FT-IR .....	57
Gambar 4.8 Spektra FTIR isolat 16 ekstrak n-heksana .....	59
Gambar 4.9 Kromatogram LC-MS/MS steroid <i>Hydrilla verticillata</i> .....	60
Gambar 4.10 Struktur ion prekursor dan ion produk.....	61

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan nutrisi pada <i>Hydrilla verticillata</i> .....	9
Tabel 2.2 Konstanta dielektrikum dan tingkat kelarutan beberapa pelarut....	12
Tabel 2.3 Tabel frekuensi inframerah .....	25
Tabel 2.4 Hasil identifikasi LC-MS/MS isolat steroid .....	29
Tabel 4.1 Jumlah noda yang terbentuk pada KLTA .....	47
Tabel 4.2 Hasil pemisahan senyawa steroid menggunakan KLT preparatif .	50
Tabel 4.3 Hasil pengukuran aktivitas antioksidan pada sampel .....	55
Tabel 4.4 Interpretasi spektra FT-IR isolat steroid hasil kromatografi lapis tipis .....	58
Tabel 4.4 Interpretasi spektra inframerah isolat 16 ekstrak n-heksana .....	59
Tabel 4.6 Hasil identifikasi LC-MS/MS isolat steroid <i>Hydrilla verticillata</i> .....	61

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian .....	73
Lampiran 2. Diagram Alir.....	74
Lampiran 3. Perhitungan, Pembuatan Reagen dan Larutan.....	80
Lampiran 4. Data Pengamatan dan Perhitungan .....	82



## ABSTRAK

Purwanto, B. 2019. **Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis Fraksi n-Heksana *Hydrilla verticillata***. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si. Pembimbing II : Mujahidin Ahmad, M.Sc. Konsultan : Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc.

---

**Kata Kunci:** *Hydrilla verticillata*, Steroid, Kromatografi Lapis Tipis, Uji antioksidan, UV-Vis, FTIR, LC-MS/MS

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan senyawa steroid yang dikhususkan pada tumbuhan *Hydrilla verticillata* beserta identifikasinya. Penelitian dilakukan dengan preparasi sampel *Hydrilla verticillata* yang dilanjutkan dengan ekstraksi menggunakan metanol. Ekstrak pekat metanol kemudian dihidrolisis menggunakan HCl dan dilanjutkan partisi menggunakan n-heksana. Hasil partisi yang diperoleh kemudian diuji fitokimia senyawa steroid dan dipisahkan senyawanya menggunakan KLT. Serta diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR, dan LC-MS/MS. Hasil penelitian menunjukkan ekstraksi maserasi menghasilkan rendemen 5,14%, dan rendemen dari partisi n-heksana sebesar 47,95%. Pemisahan steroid menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) menunjukkan bahwa variasi eluen terbaik adalah n-heksana: etil asetat (4:1) dengan 12 spot. Pemisahan Kromatografi Lapis Tipis Preapratif (KLTP) menghasilkan 19 spot. Isolat hasil KLTP diuji antioksidan menghasilkan  $EC_{50}$  5,109 ppm. Identifikasi senyawa steroid menggunakan UV-Vis menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum sebesar 203,9 nm dan 276 nm, sedangkan untuk identifikasi isolat steroid menggunakan spektrofotometer FTIR yang menunjukkan gugus fungsi O-H, geminal dimetil, C=O, C=C, C-OH sekunder dan =C-H (alkena) yang diduga merupakan senyawa steroid. Hasil pengujian LC-MS/MS menunjukkan adanya 1 senyawa jenis steroid yaitu  $\beta$ -sitosterol.

## ABSTRACT

Purwantoro, B. 2019. **Antioxidant Activity Assay of Steroid Derivative from n-Hexane Fraction of Thin Layer Chromatography *Hydrilla verticillata*.**  
Chemistry Department, Science and Technology Faculty, State Islamic University Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I : A. Ghanaim Fasya, M.Si.  
Supervisor II : Mujahidin Ahmad, M.Sc. Consultant: Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc.

---

**Keyword:** *Hydrilla verticillata*, Steroid, Thin Layer Chromatography, Antioxidant Assay, UV-Vis, FTIR, LC-MS/MS

The objectives of this study were to identify and determine the antioxidant activity of steroid derivative isolated from *Hydrilla verticillata*. The research was initiated with sample preparation of *Hydrilla verticillata* and followed by extraction using methanol. Hydrolyzation of concentrated methanol extract with HCl preceded compounds partition using n-hexane. The results of partition process were tested phytochemically for steroid compound which was separated through thin layer chromatography. The obtained steroid derivative was identified using UV-Vis spectrophotometer, FTIR and LC-MS/MS. The result of the study showed that extraction through maceration produced 5.14% yield, whereas product yield of partition using n-hexane was around 47.95%. Steroid separation through analytical thin layer chromatography (ATLC) revealed that the best eluant variation was n-hexane:acetyl acid (4:1) which resulted in 12 spots. Preparative thin layer chromatography (PTLC) yielded 19 spots. Isolate obtained from preparative TLC was assessed for its antioxidant activity and exhibited EC<sub>50</sub> of 5.109 ppm. Identification of steroid compound using UV-Vis spectrophotometer displayed maximum wavelength at 203.9 nm and 276 nm, while the identification of steroid compound with FTIR indicated the presence O-H functional group, geminal dimethyl, C=O, C=C, secondary C-OH and =C-H (alkene) which are presumably of a steroid compound. The result of LC-MS/MS showed the presence of 1 compound of steroid derivative,  $\beta$ -sitosterol.

## الملخص

بورواتورو، ب. 2019. اختبار فعالية مضادات الأكسدة لعزل المنشطات كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة فصل ن-الهكسين هيدريل الدوريات. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: أ. غانم فاشا، الماجستير، المشرف الثاني: مجاهد بن أحمد، الماجستير المستشارة: لؤلؤة الحميدة أوليا، الماجستير.

الكلمات المفتاحية: *Hydrilla verticillata* هيدريل الدوريات، المنشطات، كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة، اختبار مضاد للأكسدة، الأشعة فوق البنفسجية، FTIR، LC-MS / MS

يهدف هذا البحث إلى تحديد فعالية مضادات الأكسدة للمركبات الستيرويدية في النباتات هيدريل الدوريات وتحديد هويتها. وقد أجري البحث من خلال تحضير عينات من هيدريل الدوريات تليها استخراج باستخدام الميثانول. ثم تم تحليل المستخلص المركز للميثانول باستخدام حمض الهيدروكلوريك واستمر في استخدام القسم ن-الهكسين. ثم تم اختبار نتائج الأقسام التي تم الحصول عليها لمركبات الستيرويد الكيمياء النباتي وفصلها عن طريق المركبات باستخدام TLC. كما تم تحديدها باستخدام طيف UV-Vis و FTIR و LC-MS / MS. وأظهرت النتائج أن استخراج مسيراسي أسفر عن 5 راندمان بنسبة % 5.14، وبلغت نسبة نكسان الهكسان % 47.95. أظهر الفصل بين الستيرويدات باستخدام التحليل اللوني للطبقة الرقيقة التحليلية (KLTA) أن أفضل تباين في الشوائب هو ن-الهكسين: إيثيل أسيتات (4: 1) مع 12 نقطة. ويفرق كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة أنتجت اللوني (KLTP) تنتج 19 نقطة. أسفرت العزلة عن نتائج KLTP في اختبار مضادات الأكسدة عن EC50 5,109 جزء في المليون. أظهر تحديد مركبات الستيرويد التي تستخدم UV-Vis أن الطول الموجي الأقصى كان 203.9 نانومتر و 276 نانومتر ، في حين أن التعرف على عزلات الستيرويد باستخدام مقياس الطيف الضوئي FTIR الذي أظهر المجموعات الوظيفية OH ، ثنائي ميثيل الجيمين ، C = O ، C = C ، C-OH ، الثانوي و CH (الألكينات) التي يعتقد أنها مركبات ستيرويد. أظهرت نتائج اختبار LC-MS / MS وجود مركب نوع واحد من الستيرويد ،  $\beta$ -sitosterol .

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Radikal bebas merupakan salah satu penyebab timbulnya berbagai penyakit degeneratif, seperti kardiovaskuler, tekanan darah tinggi, stroke, sirosis hati, katarak, diabetes melitus dan kanker. Radikal bebas dapat dihasilkan dari dalam tubuh dan luar tubuh. Radikal bebas memiliki elektron yang tidak berpasangan pada orbit terluarnya, sehingga bersifat reaktif untuk bereaksi dengan molekul lain. Radikal bebas dapat merusak makromolekul seperti merusak lipid membran sel, DNA, dan protein yang menyebabkan stres oksidatif sel (Valko *et al.*, 2006). Oleh karena itu, diperlukan senyawa yang dapat meredam efek negatif dari radikal bebas, yaitu antioksidan. Jenis antioksidan terdiri dari dua, yaitu antioksidan alam dan antioksidan sintetik. Antioksidan alam telah lama diketahui menguntungkan untuk digunakan dalam bahan pangan karena umumnya derajat toksisitasnya rendah (Cahyadi, 2006). Selain itu adanya kekhawatiran akan kemungkinan efek samping yang belum diketahui dari antioksidan sintetik menyebabkan antioksidan alami menjadi alternatif yang sangat dibutuhkan (Sayuti dan Yenrina, 2015). Antioksidan alami banyak terdapat pada tumbuh-tumbuhan, sayur-sayuran dan buah-buahan (Winarsi, 2007).

Indonesia merupakan salah satu negara yang sangat kaya akan tumbuh-tumbuhan. Kekayaan alam ini diciptakan Allah SWT, semata-mata hanya untuk kepentingan kehidupan manusia. Allah SWT menciptakan segala sesuatu dengan manfaatnya tanpa ada yang sia-sia agar manusia selalu bersyukur dan mengingat

kekuasaannya, sebagaimana firman Allah SWT dalam surat asy-Syu'ara ayat 7 sebagai berikut :

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam **tumbuh-tumbuhan yang baik?**” (QS. asy-Syu'ara: 7).

Kata *kariim* antara lain digunakan untuk menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap obyek yang disifatinya. Tumbuhan yang baik adalah tumbuhan yang subur dan bermanfaat (Shihab, 2002). Berdasarkan ayat tersebut, Allah SWT telah menciptakan macam-macam tumbuhan yang baik untuk makhluknya. Salah satunya adalah *Hydrilla verticillata*. *H. verticillata* adalah tumbuhan air yang mengandung metabolit sekunder. Menurut Kensav dan Neelamegam (2015) menyebutkan hasil skrining *H. verticillata* mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid, alkaloid, dan steroid. Penelitian lain yang dilakukan Roma dkk. (2015) juga menyebutkan hasil skrining *H. verticillata* mengandung fenol, glikosida, alkaloid, dan steroid.

Kandungan senyawa aktif *H. verticillata* dapat diperoleh dengan cara ekstraksi maserasi. Metode maserasi sering dipilih karena aman digunakan dan dapat mengantisipasi senyawa yang tidak tahan panas. Proses ini sangat menguntungkan dalam proses isolasi bahan alam karena proses 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. Mardiyah (2012) menyatakan bahwa senyawa metabolit sekunder di alam berada dalam bentuk glikosida sehingga ekstraksi dilakukan menggunakan

pelarut yang bersifat polar. Menurut Lenny (2006) pelarut yang sering digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam adalah pelarut golongan alkohol, salah satunya metanol. Metanol dapat melarutkan senyawa metabolit sekunder dan memiliki titik didih yang rendah sehingga mudah diuapkan (Atun, 2014). Hafiz (2017) telah melakukan ekstraksi maserasi *H. verticillata* dengan menggunakan variasi pelarut antara lain metanol (polar), kloroform (semi polar), dan n-heksana (non polar). Hasil rendemen yang didapat pada pelarut metanol sebesar 12,72%, kloroform didapat rendemen yang lebih kecil yaitu sebesar 4,96%, pada pelarut n-heksana didapatkan rendemen paling kecil yaitu 3,8%. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan pelarut metanol untuk ekstraksi maserasi.

Pemisahan yang lebih spesifik dapat dilakukan dengan cara hidrolisis untuk memutuskan ikatan antara glikon dan steroid (Handoko, 2006). Sebagaimana penelitian Khalaf dkk. (2011) bahwa senyawa sterol yang merupakan salah satu jenis steroid ditemukan di tumbuhan dalam keadaan berikatan dengan glikosida. Pemutusan ikatan glikosida menjadi steroid dan glikon dapat dilakukan dengan hidrolisis menggunakan larutan HCl 2 N (sebagai katalis) dimana HCl merupakan asam kuat yang mudah melepas ion  $H^+$  secara sempurna dalam air (Handoko, 2006). Setelah ikatan glikosida terputus dilakukan partisi untuk memisahkan steroid dari glikon (gula). Partisi dapat dilakukan dengan menggunakan pelarut nonpolar, sehingga diharapkan senyawa steroid akan lebih terdistribusi pada fase nonpolar dan terpisah dengan senyawa polar (Handoko, 2006). Tonius dkk. (2016) menyatakan bahwa fraksi n-heksana daun buas-buas diduga mengandung *cholestane* yang termasuk dalam salah satu golongan steroid. Fraksi non-polar

yang diperoleh dari hasil partisi biasanya masih berupa senyawa campuran, sehingga perlu dilakukan isolasi lebih lanjut.

Isolasi senyawa steroid dapat dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) (Mohammad *et al.*, 2010). Mardaneni (2017) menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (17 : 3) pada fraksi etil asetat alga merah menghasilkan 6 noda. Baderos (2017) menyatakan bahwa identifikasi golongan steroid dari fraksi petroleum eter alga merah menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (17 : 3) menunjukkan 11 noda di bawah sinar UV 366 nm. Noda yang menunjukkan adanya steroid adalah noda ke- 5, 6, 7, 9, 10 dan 11. Penelitian Azah (2019) menyatakan bahwa identifikasi golongan steroid pada *Hydrilla verticillata* dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (3,75 : 1,25) diperoleh 13 noda dan 2 noda merupakan senyawa steroid.

Pengujian aktivitas antioksidan dari senyawa steroid *H. verticillata* dilakukan dengan metode *Di Phenyl Picryl Hydrazyl* (DPPH). Pengujian metode DPPH ini dilakukan untuk mengetahui nilai  $EC_{50}$  (*Effective concentration*), yang merupakan parameter yang menunjukkan konsentrasi ekstrak uji yang mampu menangkap radikal sebanyak 50%. Menurut hasil penelitian Ikfi (2017) uji antioksidan pada tumbuhan *H. verticillata* dengan menggunakan pelarut metanol, kloroform, dan n-heksana diperoleh nilai  $EC_{50}$  masing-masing 256,6 ppm; 457,6 ppm; dan 2763 ppm. Laili (2016) melakukan uji antioksidan terhadap fraksi petroleum alga merah menunjukkan bahwa nilai  $EC_{50}$  yaitu 248,1 ppm.

Pada penelitian ini akan dilakukan pengujian aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana dari *H. verticillata* dengan metode DPPH dan mengidentifikasi senyawa steroid dalam fraksi n-heksana dengan menggunakan instrumen UV-Vis,

FTIR dan LC-MS/MS. Hasil dari penelitian ini nantinya diaplikasikan sebagai sumber senyawa antioksidan alami.

### **1.2 Rumusan Masalah**

1. Eluen terbaik apa yang dapat memisahkan senyawa steroid yang terdapat dalam fraksi n-heksana dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Analitik?
2. Bagaimana hasil pemisahan senyawa steroid menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif?
3. Bagaimana aktivitas antioksidan isolat steroid hasil pemisahan dengan KLTP dari *H. verticillata*?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

1. Untuk mengetahui eluen terbaik yang dapat memisahkan senyawa steroid yang terdapat dalam ekstrak n-heksana dengan menggunakan KLTA.
2. Untuk mengetahui hasil pemisahan senyawa steroid menggunakan KLTP.
3. Untuk mengetahui aktivitas antioksidan isolat steroid hasil pemisahan dengan KLTP dari *H. verticillata*.

### **1.4 Batasan Masalah**

1. Sampel yang digunakan *H. verticillata* yang diperoleh dari danau ranu, Pasuruan, Jawa Timur.

2. Ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol.
3. Uji aktivitas antioksidan pada senyawa steroid dalam fraksi n-heksana menggunakan metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*).
4. Pemisahan senyawa steroid dalam fraksi n-heksana *H. verticillata* menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT).
5. Instrumentasi yang digunakan untuk identifikasi yaitu spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan LC-MS/MS.

### **1.5 Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat mengenai pemanfaatan *H. verticillata* yang dapat digunakan untuk alternatif tanaman obat dalam rangka pemberdayaan atau usaha dalam bidang farmakologi. Hal ini mempermudah pengkajian lebih lanjut tentang aktivitas dan pemanfaatan senyawa steroid terutama dalam bidang kesehatan.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Hydrilla verticillata*

##### 2.1.1 Deskripsi dan Klasifikasi *Hydrilla verticillata*

*Hydrilla verticillata* adalah tumbuhan air yang merupakan bagian dari ekosistem danau dan berperan sebagai sumber daya baik langsung maupun tidak langsung (Tanor, 2004). *H. verticillata* memiliki ciri-ciri yaitu, daun berukuran kecil berbentuk lanset yang tersusun mengelilingi batang. Batangnya bercabang dan tumbuh mendatar sebagai stolon yang pada tempat tertentu membentuk akar serabut (Silalahi, 2010). Tumbuhan *H. verticillata* memiliki sistematika sebagai berikut (Ramesh *et al.*, 2014):



**Gambar 2.1** Tumbuhan *Hydrilla verticillata*

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

*H. verticillata* dapat tumbuh di kedalaman 10-15 m di bawah permukaan air pada habitat air tawar seperti kolam, danau, sungai, dan parit (Marer dan Garvey, 2001). Tahap awal pertumbuhan *H. verticillata* adalah tumbuh satu inci per hari. Pertumbuhan ini berlanjut hingga *H. verticillata* mencapai permukaan air yang ditandai dengan terbentuknya cabang. Hal inilah yang membuat vegetasi *H. verticillata* menjadi besar di permukaan air yang dapat menyebabkan terhalangnya cahaya ke tumbuhan lain (Herrera Environmental Consultants, 2011). *H. verticillata* yang tumbuh di Indonesia termasuk dalam salah satu tipe utama produsen di danau tropika yaitu makrofita tenggelam di daerah dangkal danau (Goltenboth dkk., 2012).

### 2.1.2 Kandungan *Hydrilla verticillata*

*Hydrilla verticillata* mengandung 1,74% protein, 0,54% lemak, 1,82% serat kasar, 1,51% abu, 3,97% karbohidrat dan 90,42% air (Tanor, 2004). Menurut Kurniawan dkk. (2010) *Hydrilla verticillata* memiliki kandungan klorofil total sebesar 4,43 mL/g, karotenoid 0,92 mL/g dan vitamin C 4,70 mg/30 g. Klorofil dan beberapa senyawa turunannya sekarang telah diketahui dapat memberikan manfaat bagi manusia yaitu mempunyai potensi sebagai komponen anti-aterosklerosis pada hewan percobaan (Alsuhendra, 2004).

Adapun kandungan senyawa kimia yang lain dalam *Hydrilla verticillata* ditunjukkan pada Tabel 2.1 (Pal dan Nimse, 2006).

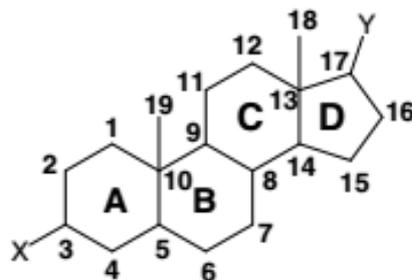
Tabel 2.1 Kandungan nutrisi pada *Hydrilla verticillata*

Nutrisi/ Mineral	Jumlah (mg/10,5 gr)	Nutrisi/ Mineral	Jumlah (mg/10,5 gr)
Vitamin B-1	26,2	Fosfor	29,7
Vitamin B-2	0,08	Besi	35,8
Vitamin B-3	5,2	Seng	6,3
Vitamin B-5	11,4	Mangan	24,5
Vitamin B-6	35,9	Tembaga	0,2
Vitamin B-12	1,1	Kobalt	0,4
Kalsium	1460	Molibdenum	15 µg/10,5 g
Magnesium	76,1	β-karoten	19600 IU/10,5 g*
Potassium	245		

\*IU = International unit

Beberapa penelitian tentang isolasi senyawa kimia dari *Hydrilla verticillata* juga dilakukan, di antaranya didapatkan senyawa kimia seperti *loliolide*, *thymidin*, asam oktadekanadioat (Xiao dkk. 2007). Byju dkk. (2013) juga mengemukakan adanya senyawa *phytol*, *3-octen-2-one*, *7-methyl*, *hexyl tetradecyl ester*, dan *2-hexadecen-1-ol,3,5,11,15-tetramethyl*. Selain itu, diperoleh juga senyawa asam linoleat, asam heksadekanadioat, dan asam oktadekatrienoat (Prabha dan Rajkumar, 2015). Das dkk. (2015) melarutkan *H. verticillata* dengan pelarut petroleum eter yang menunjukkan adanya senyawa flavonoid dan diterpenoid. Hasil penelitian dari Hafiz (2017) menggunakan pelarut n-heksana dengan hasil pengujian fitokimia pada *H. verticillata* menunjukkan adanya senyawa triterpenoid atau steroid.

## 2.2 Steroid



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

Steroid merupakan senyawa yang tergolong dalam senyawa lemak yang terdiri dari rantai karbon dengan 4 cincin, 3 cincin utama sikloheksana dan 1 cincin siklopentana. Pengelompokan senyawanya berdasarkan pada gugus yang terikat pada kerangka dasar rantai karbon (Kristanti, 2008). Turunan steroid yang banyak keberadaannya adalah sterol (Poedjiadi dan Supriyanti, 2012).

Senyawa steroid yang berada pada tumbuhan disebut dengan fitosterol, sementara yang terdapat pada hewan disebut zoolesterol, dan di fungi disebut mikosterol (Vembriarto, 2013). Fungsi dari senyawa steroid selain sebagai pelindung diri, juga berfungsi sebagai hormon dan kolesterol. Ergosterol, progesteron, dan estrogen merupakan senyawa turunan steroid (Poedjiadi dan Supriyanti, 2012). Senyawa steroid dapat digunakan sebagai senyawa antioksidan (Krisna dkk., 2014), antikanker (Diasuti dan Warsinah, 2010; Zhang dkk., 2012). Manfaat yang dimiliki oleh senyawa steroid ini menunjukkan bahwa Allah menciptakan segala sesuatunya sebagai ciptaan yang tidak sia-sia, sesuai yang tersirat dalam surat al-Imran ayat 191.

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ  
السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya: (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan 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.**

Tafsir al-Qurthubi menjelaskan makna kata *باطلًا* adalah yang akan hilang atau yang akan pergi. Kata tersebut *manshub* karena terdapat *mashdar* yang tidak disebutkan, yakni: *“Engkau tidak akan menciptakan semua ini sebagai ciptaan yang sia-sia”* (Qurthubi, 2009). Begitu pula dengan penciptaan

senyawa steroid, Allah SWT menciptakan senyawa steroid karena senyawa tersebut dapat bermanfaat bagi makhluk hidup.

### **2.3 Isolasi Senyawa Steroid**

Isolasi senyawa steroid dari *H. verticillata* dapat dilakukan dengan beberapa tahapan sebagai berikut:

#### **2.3.1 Ekstraksi Senyawa Steroid**

Metode ekstraksi bahan alam dikenal dengan metode maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut berdasarkan prinsip *like dissolve like* yaitu senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar sedangkan senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut non polar. Pada proses maserasi, perlu dilakukan pengadukan. Pengadukan untuk meratakan konsentrasi larutan di luar serbuk, sehingga dengan pengadukan tersebut tetap terjaga adanya derajat perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan di dalam sel dengan larutan di luar sel (Lenny, 2006).

Keuntungan dari metode ini adalah peralatannya mudah ditemukan dan pengerjaannya sederhana (Mustofa, 2008). Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut. Secara umum, pelarut golongan alkohol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam, karena dapat melarutkan seluruh senyawa metabolit sekunder (Lenny, 2006). Pelarut yang digunakan pada penelitian ini yaitu metanol yang didasarkan pada pemilihan variasi pelarut yang sesuai. Pelarut

tersebut digunakan karena memenuhi beberapa syarat-syarat pelarut. Suatu pelarut harus memiliki titik didih yang cukup rendah sehingga pelarut dapat mudah diuapkan tanpa menggunakan suhu yang tinggi, bersifat inert, dapat melarutkan senyawaan yang sesuai kepolarannya, serta memiliki harga yang terjangkau (Guenther, 1987). Kelarutan suatu komponen tergantung pada derajat polaritas pelarut yang ditentukan oleh konstanta dielektrikum yang ditampilkan pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Konstanta dielektrikum dan tingkat kelarutan beberapa pelarut.

Jenis Pelarut	Konstanta Dielektrum	Tingkat Kelarutan dalam Air	Titik Didih (C°)
Heksana	1,9	TL	68,7
Petroleum eter	2,28	TL	60
Benzena	2,38	TL	80,1
Toluena	4,81	TL	111
Kloroform	4,81	S	61,3
Etil asetat	6,02	S	77,1
Metil asetat	6,68	S	57
Metil klorida	9,08	S	39,75
Butanol	15,80	S	117,2
Propanol	20,1	L	97,22
Aseton	20,70	L	56,2
Etanol	24,30	L	78,5
Metanol	33,60	L	64
Air	78,4	L	100

\* Keterangan: TL = tidak larut; S = sedikit larut; L = larut dalam berbagai proporsi

Widya, dkk. (2014) melakukan metode ekstraksi maserasi terhadap tumbuhan air yaitu teratai (*Nymphaea pubescens* L.) menggunakan pelarut n-heksana didapatkan rendemen 0,93%. Ekstrak metanol tumbuhan teratai menunjukkan adanya senyawa alkaloid, fenolik, glikosida, saponin dan terpenoid/steroid sedangkan ekstrak n-heksana mengandung senyawa terpenoid/steroid. Penelitian Zahro (2011), melakukan ekstraksi maserasi

tanaman anting- anting (*Acalypha indica* Linn.) menggunakan pelarut n-heksana yang menghasilkan warna ekstrak kuning kecoklatan. Ekstrak pekat yang telah dipekatkan dengan *rotary evaporator* menghasilkan rendemen sebesar 2,51%. Hasil uji kandungan senyawa aktif menunjukkan positif adanya senyawa steroid.

### 2.3.2 Hidrolisis dan Partisi

Hidrolisis merupakan reaksi antara senyawa dan air dengan membentuk reaksi kesetimbangan. Selain bereaksi, peran air adalah sebagai medium reaksi sedangkan senyawanya dapat berupa senyawa anorganik maupun senyawa organik (Mulyono, 2006). Reaksi hidrolisis dilakukan untuk memutuskan ikatan glikosida pada senyawa organik yang berada pada bentuk glikosidanya. Glikosida merupakan senyawa yang terdiri dari gabungan gula (glikon) yang mempunyai sifat polar dan bagian bukan gula (aglikon) yang mempunyai sifat polar, semipolar dan nonpolar (Gunawan, 2008).

Hidrolisis merupakan proses dekomposisi kimia yang terjadi dengan adanya pemutusan ikatan glikosida yang menjadi penghubung antar monomer melalui reaksi menggunakan air ( $H_2O$ ) sehingga membentuk bagian-bagian yang lebih sederhana (Adhiatama dkk., 2012). Namun, reaksi hidrolisis memerlukan bantuan katalisator karena hidrolisis menggunakan air berlangsung sangat lambat (Nihlati dkk., 2008). Oleh karena itu, pada penelitian ini akan menggunakan HCl sebagai agen penghidrolisis. Pemilihan asam kuat seperti HCl sebagai katalis disebabkan karena asam kuat akan lebih mudah melepas proton ( $H^+$ ) secara sempurna di dalam air, sedangkan asam lemah relatif lebih sukar sehingga asam lemah memiliki kecenderungan terionisasi sebagian dalam pelepasan ion  $H^+$ .

Semakin banyak proton yang terionisasi dalam air, maka semakin kuat peranan proton dalam pemutusan ikatan glikosida (Handoko, 2006).

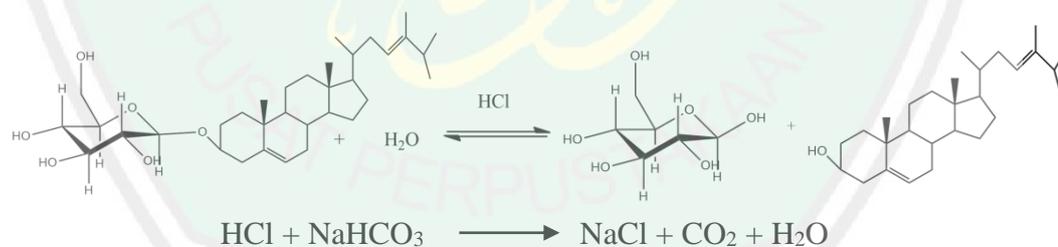
Penggunaan asam kuat seperti HCl pada proses hidrolisis menurut Wahyudi dkk., (2011) lebih baik dibanding menggunakan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> karena sifatnya yang lebih reaktif. Selain itu, katalisator asam klorida (HCl) akan membentuk garam yang tidak berbahaya yakni NaCl (Nihlati, dkk., 2008). Afif dkk. (2013) menggunakan metode hidrolisis dengan pelarut HCl 2 N sebagai katalis dan ekstraksi cair-cair untuk mengekstrak metabolit sekunder dari ekstrak metanol alga merah *E. contoni* dengan menggunakan variasi pelarut yaitu 1-butanol, etil asetat, kloroform, n-heksana dan petroleum eter. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak setelah dihidrolisis dan dipartisi memiliki nilai LC<sub>50</sub> lebih rendah (70,32 ppm) dibandingkan ekstrak sebelum dihidrolisis (194,40 ppm). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak hasil hidrolisis dan partisi lebih bersifat toksik.

Hasil hidrolisis akan dilakukan partisi menggunakan pelarut n-heksana. Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan Anggraeni dkk. (2014) nilai rendemen yang terbaik dari hasil partisi variasi pelarut etil asetat, kloroform, n-heksana dan petroleum eter menunjukkan nilai rendemen terbaik yaitu pada pelarut n-heksana sebesar 45,61 % (b/b) dan petroleum eter sebesar 8,1854 % (b/b), akan tetapi pada uji antioksidan aktivitas dan EC<sub>50</sub> tertinggi ditunjukkan pada ekstrak petroleum eter sebesar 64,8839 % pada 30 ppm. Menggunakan pelarut n-heksana untuk proses partisi yang diciptakan oleh Allah memiliki manfaat yang dapat digunakan oleh manusia. Hal ini sesuai dengan yang tersirat dalam al-Quran surat al-Baqarah ayat 29 :

هُوَ الَّذِي خَلَقَ لَكُمْ مَّا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا ثُمَّ اسْتَوَىٰ إِلَى السَّمَاءِ فَسَوَّاهُنَّ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ وَهُوَ بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ

Artinya: “Dialah Allah, yang menjadikan segala yang ada di bumi **untuk kamu** dan Dia berkehendak (menciptakan) langit, lalu dijadikan-Nya tujuh langit. Dan Dia Maha Mengetahui segala sesuatu.”

Menurut tafsir fi Zhilalil-Quran dari ayat tersebut kata “*untuk kamu*” memiliki makna yang dalam. Ini merupakan kata pasti yang menetapkan bahwa Allah menciptakan manusia dalam urusan yang besar, yaitu diciptakan sebagai makhluk tertinggi derajatnya di muka bumi yang dapat menguasainya dan mengelolanya, sehingga manusia memperoleh manfaat dan mengambil perbandingan darinya (Quthb, 2000). Berdasarkan tafsir tersebut Allah SWT menciptakan segala sesuatu di bumi, agar kalian dapat mengambil manfaat darinya, yaitu berupa hewan, tumbuhan, benda mati dan lain-lain dengan cara mengelolanya. Salah satunya dengan memanfaatkan pelarut n-heksana sebagai pelarut saat melakukan proses partisi.



**Gambar 2.3** Dugaan reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida dan penetralan dengan natrium bikarbonat (Mardiyah, 2012)

### 2.3.3 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Uji fitokimia merupakan pengujian kandungan senyawa-senyawa di dalam tumbuhan. Tumbuhan umumnya mengandung senyawa aktif dalam bentuk

metabolit sekunder yang salah satunya adalah steroid (Lenny, 2006). Identifikasi steroid dapat dilakukan dengan menggunakan pereaksi warna. Pereaksi yang dapat digunakan adalah reagen *Lieberman-Burchard* yang menghasilkan warna hijau biru.

#### **2.3.4 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP).**

Pemisahan senyawa dapat dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (Hayati dkk., 2012). Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan teknik pemisahan campuran senyawa berdasarkan fasa diam yang dilapiskan pada pelat kaca atau alumunium dengan suatu pelarut. Proses pengaliran pelarut yang naik sepanjang permukaan plat KLT oleh gaya kapiler disebut dengan elusi. Adanya proses elusi komponen-komponen yang terdapat dalam pelarut dapat bergerak sepanjang permukaan plat KLT dengan cara mengalirkan eluen (Atun, 2014). Sebelum digunakan pelarut yang digunakan sebagai fasa gerak dijenuhkan terlebih dahulu sampai berbentuk uap. Penjenuhan dilakukan dengan menutup rapat bejana yang telah terisi eluen dengan dilapisi kertas saring pada bagian atas. Jika uap telah mencapai kertas saring maka pelarut telah jenuh (Rohman, 2007).

Sampel yang dibutuhkan dalam KLT sedikit, hanya ditotolkan sedikit menggunakan pipa kapiler pada pelat. Pelarut yang digunakan pada kromatografi didasarkan pada hasil eksperimen sendiri dengan mempertimbangkan sifat-sifatnya. Karena kemampuan suatu pelarut pengembang untuk menggerakkan senyawa pada suatu adsorben berhubungan dengan polaritas pelarut. Kemampuan ini disebut kekuatan elusi, dan urutan kekuatan elusi beberapa pelarut yaitu air > metanol > etanol > aseton > etil asetat > kloroform > dietil eter > metilen

diklorida > benzena > toluena > karbon tetraklorida > heksan > petroleum eter (Atun, 2014). Fasa diam yang digunakan untuk kromatografi lapis tipis mengandung substansi yang dapat berpendar dalam sinar ultraviolet. Salah satu plat yang sering digunakan dan yang dapat berpendar warna adalah gel 60 GF254 (Kristanti, 2008).

Penotolan sampel pada KLT harus dilakukan dengan hati-hati, agar didapatkan pemisahan yang optimal. Cara yang dapat dilakukan adalah dengan membuat ukuran bercak sempit dan melebar, atau dengan sampel yang berukuran kurang lebih 2 – 10  $\mu$ L dengan pengeringan setiap totolan (Rohman, 2007). Identifikasi senyawa yang telah terpisah pada lapisan tipis dapat dilakukan dengan menggunakan reaksi penampak noda maupun dideteksi menggunakan lampu UV (254 atau 366 nm) untuk senyawa-senyawa yang dapat menyerap warna (Atun, 2014).

Masroh (2010) menyatakan bahwa hasil pemantauan dengan metode KLT pada isolat daun pecut kuda memperlihatkan pemisahan noda yang baik menggunakan fase gerak n-heksana : etil asetat (7 : 3) dengan lampu UV 366 menunjukkan  $R_f$  antara 0,27 - 0,82 dengan 6 noda. Isolat diduga termasuk golongan steroid karena hasil uji dengan pereaksi *Lieberman Burchard* berwarna hijau kebiruan.

Gunawan dkk. (2008) menyatakan bahwa identifikasi golongan steroid menggunakan campuran eluen kloroform : metanol (3 : 7) pada ekstrak herbal meniran dengan menghasilkan 1 noda berwarna ungu muda dengan nilai  $R_f$  0,58. (Halimah 2010) menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (7 : 3) pada ekstrak kloroform tanaman anting-anting menghasilkan 4 noda berwarna 2 hijau terang,

hijau kekuningan, dan hijau kecoklatan yang setelah disemprot reagen Liebermann-Burchard mendapatkan nilai Rf 0,57; 0,76; 0,94; dan 0,96.

Azah (2019) menyatakan bahwa hasil pemantauan dengan metode KLT pada isolat steroid *Hydrilla verticillata* memperlihatkan pemisahan noda yang baik menggunakan fase gerak n-heksana : etil asetat (3,75 : 1,25) dengan lampu UV 366 menunjukkan 13 noda. Penelitian Hayati, dkk. (2012) menyatakan bahwa identifikasi senyawa steroid pada tanaman anting-anting dapat menggunakan KLT dengan eluen heksana : etil asetat (7 : 3) dan disemprot dengan pereaksi *Lieberman-Burchard* menunjukkan terbentuknya noda berwarna hijau, biru ungu sampai coklat. Pada sinar UV 366 nm ekstrak etil asetat anting-anting terdapat 9 noda dengan nilai Rf berturut-turut adalah 0,66; 0,11; 0,38; 0,47; 0,56; 0,68; 0,77; 0,8; dan 0,83 dengan warna noda berturut-turut hijau kebiruan, hijau kebiruan, merah muda, hijau, merah muda, ungu tengah biru kehijauan, orange, hijau kebiruan, dan hijau kebiruan muda. Penelitian Restasari dkk. (2002) menunjukkan bahwa identifikasi senyawa steroid pada ekstrak kloroform daun ketapang dapat dilakukan dengan menggunakan KLT dengan campuran fasa gerak n-heksana : etil asetat : kloroform (5 : 3 : 1) memiliki daya pisah terbaik.

#### 2.4 Uji Antioksidan *Hydrilla verticillata* dengan Metode DPPH

DPPH pertama kali ditemukan pada tahun 1992 oleh Goldschmidt dan Renn. Senyawa ini sangat berguna dalam berbagai penyelidikan seperti pengujian aktivitas antioksidan senyawa fenol atau senyawa alami (vitamin, ekstrak tumbuhan, dan obat-obatan) serta untuk menghambat reaksi homolitik (Ionita, 2005). Pengujian aktivitas antioksidan untuk membaca atau mempelajari suatu hal

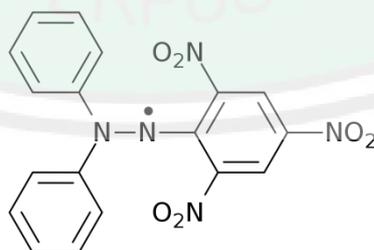
yang tidak bisa diketahui secara langsung. Hal ini sesuai dengan yang tersirat dalam al-Quran surat al-Alaq ayat 1.

اقْرَأْ بِاسْمِ رَبِّكَ الَّذِي خَلَقَ

Artinya: “**Bacalah** dengan menyebut nama Allah yang menciptakan”(al-Alaq/30:1)

Menurut tafsir Al-Jaelani menjelaskan bahwa Allah mengajak atau menyuruh untuk membaca dan belajar dengan perenungan dan pendalaman bahwa Tuhan yang mampu menciptakan manusia dari asal yang lemah akan mampu pula untuk mengajarkannya menulis, yang merupakan saran penting untuk mengembangkan ilmu pengetahuan dan menjejarkan sesuatu yang belum diketahui (Jaelani, 2011).

DPPH bersifat tidak larut dalam air, berwarna ungu pekat seperti  $\text{KMnO}_4$  dan bentuk tereduksinya *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine* (DPPH-H) berwarna jingga kekuningan (Ionita, 2005). Struktur dari DPPH dapat dilihat pada Gambar 2.3:



**Gambar 2.4** Struktur (DPPH)

Metode DPPH adalah sebuah metode sederhana yang dapat digunakan untuk menguji kemampuan antioksidan yang terdapat pada makanan. Metode DPPH dapat digunakan untuk sampel yang padat dan juga dalam bentuk larutan. Panjang gelombang maksimum yang digunakan dalam pengukuran uji aktivitas antioksidan sangat bervariasi. Panjang gelombang maksimum yang digunakan yaitu 515 nm (Kuntorini, E. dan Astuti, 2010; Hanani, E., dkk., 2005), 516 nm (Julyasih, S., dkk., 2009), 517 nm (Yudiati, E., dkk., 2011), 518 nm (Bariyyah, S., dkk., 2013). Selain penentuan panjang gelombang maksimum, hal yang perlu diperhatikan dalam analisis aktivitas antioksidan adalah waktu kestabilan. Penentuan waktu kestabilan dilakukan untuk mengetahui waktu stabilnya reaksi antara sampel dengan DPPH yang ditunjukkan dengan tidak terjadinya penurunan absorbansi sampel. Waktu kestabilan reaksi antara DPPH dengan senyawa antioksidan yang direkomendasikan adalah 30 menit dan telah dilakukan dalam beberapa penelitian (Hanani dkk., 2005; Nihlati dkk., 2011; Yudiati dkk., 2011). Pada penelitian Barriyah (2013) menyatakan bahwa pengujian antioksidan ekstrak metanol *Chlorella sp.* dengan hasil sangat baik jika diinkubasi pada suhu 37 °C pada rentang waktu 30 – 55 menit.

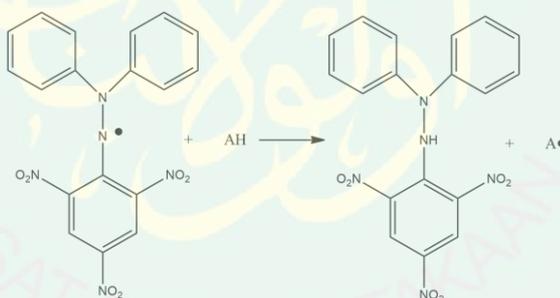
Prinsip metode DPPH adalah elektron ganjil pada molekul DPPH memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 517 nm yang berwarna ungu. Warna ini akan berubah dari ungu menjadi kuning lemah apabila elektron ganjil tersebut berpasangan dengan atom hidrogen yang disumbangkan senyawa antioksidan (Prakash, 2001). Segala sesuatunya pasti memiliki peran dan pasangan tersendiri, bekerja dengan ketentuan masing-masing. Hal ini sesuai dengan yang tersirat dalam al-Quran surat Yasin ayat 36.

سُبْحَانَ الَّذِي خَلَقَ الْأَزْوَاجَ كُلَّهَا مِمَّا تُنْبِتُ الْأَرْضُ وَمِنْ أَنْفُسِهِمْ وَمِمَّا لَا يَعْلَمُونَ

Artinya: “Maha Suci Tuhan yang telah **menciptakan pasangan-pasangan semuanya**, baik dari apa yang ditumbuhkan oleh bumi dan dari diri mereka maupun dari apa yang tidak mereka ketahui.”

Ayat tersebut menjelaskan sebagai pengagungan terhadap Allah yang sudah menciptakan semua secara berpasang-pasangan, baik tumbuh-tumbuhan, hewan, manusia serta segala hal yang tidak diketahui oleh makhluk (Al-Jazairi, 2009). Hal ini juga berlaku bagi suatu senyawa seperti radikal bebas yang mempunyai elektron ganjil kemudian berpasangan dengan atom hidrogen yang disumbangkan senyawa antioksidan.

Reaksi radikal bebas DPPH dengan atom H netral yang berasal dari senyawa-senyawa yang bersifat antioksidan dapat dilihat pada Gambar 2.5.



**Gambar 2.5** Reaksi radikal bebas DPPH dengan antioksidan

Parameter yang dipakai untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah harga konsentrasi efisien atau *efficient concentration* ( $EC_{50}$ ) atau *Inhibitory Concentration* ( $IC_{50}$ ) yang menunjukkan konsentrasi ekstrak uji yang mampu menangkap radikal bebas sebanyak 50% yang diperoleh melalui persamaan regresi. Semakin kecil nilai  $EC_{50}$  suatu senyawa uji maka senyawa tersebut

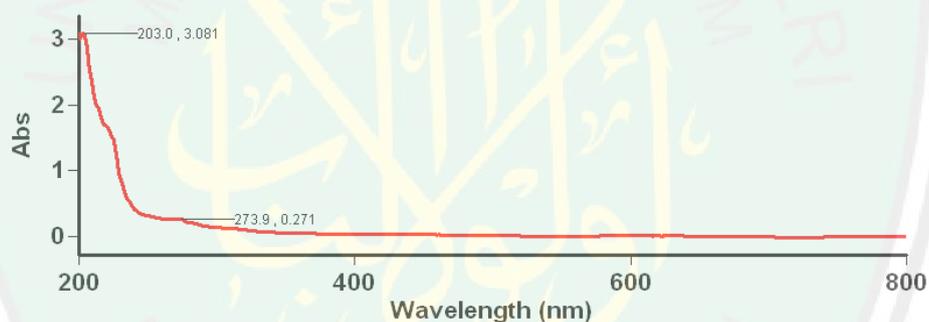
semakin efektif sebagai penangkal radikal bebas, dengan kata lain  $EC_{50}$  merupakan konsentrasi yang dibutuhkan untuk menurunkan sebesar 50% dari konsentrasi substrat (radikal DPPH) (Rohman dan Riyanto, 2005).

## 2.5 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis merupakan salah satu jenis spektroskopi yang sering digunakan dalam analisis kimia dan biologi. Spektrofotometer ini didasarkan pada interaksi antara materi dengan radiasi elektromagnetik. Apabila seberkas radiasi (cahaya) dikenakan pada cuplikan (larutan sampel), maka sebagian dari cahaya diserap molekul tersebut. Setiap senyawa dalam sampel memiliki tingkatan energi yang spesifik. Cahaya mempunyai perbedaan energi antara tingkatan dasar dan tingkatan tereksitasi dan sebagian energi cahaya yang sesuai diserap dengan panjang gelombang yang diperoleh. Elektron yang tereksitasikan melepaskan energi melalui proses radiasi panas dan akan kembali pada tingkatan dasar lagi. Perbedaan energi antara tingkat dasar dengan tingkat tereksitasi yang spesifik untuk tiap-tiap bahan atau senyawa menyebabkan frekuensi yang diserap juga berbeda-beda (Sastrohamidjojo, 2007). Sinar ultraviolet mempunyai panjang gelombang antara 200-400 nm, sementara sinar tampak mempunyai panjang gelombang 400-750 nm (Gandjar dan Rohman, 2007).

Steroid yang terdapat pada suatu sampel dapat dianalisis dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Azah (2019), steroid diisolasi dari ekstrak n-heksana *Hydrilla verticillata*

memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 203 nm dan 273,9 nm. Panjang gelombang 203 nm tersebut menunjukkan adanya senyawa steroid jenis  $\beta$ -sitosterol dan terdapat ikatan C=C tidak terkonjugasi dengan transisi  $\pi$ - $\pi^*$ . Hal ini sesuai dengan penelitian Aprelia dan Suyatno (2013) dengan melakukan identifikasi senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan paku *Critella arida* dan diperoleh serapan pada panjang gelombang 203 nm diduga merupakan steroid jenis  $\beta$ -sitosterol. Sedangkan pada panjang gelombang 273,9 nm diduga terjadi transisi elektronik dari  $n$ - $\pi^*$  (Murdianto dkk., 2010).



**Gambar 2.6** Spektrum UV-Vis isolat steroid hasil KLTP (Mardaneni, 2017)

## 2.6 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan FTIR

Spektroskopi inframerah adalah sebuah metode analisis instrumentasi pada senyawa kimia yang menggunakan radiasi sinar inframerah. Spektrofotometri inframerah digunakan untuk mendeteksi gugus fungsi, mengidentifikasi senyawa dan menganalisa campuran (Day dan Underwood, 1999). Penerapan spektrofotometer inframerah sangat luas, biasanya untuk analisis kualitatif. Sinar inframerah dilewatkan melalui suatu cuplikan senyawa organik, sehingga sejumlah frekuensi diserap sedang frekuensi yang lain diteruskan atau

ditransmisikan tanpa diserap. Kegunaan utama dari spektrofotometer IR yaitu untuk mengidentifikasi keberadaan suatu gugus fungsi dalam suatu senyawa organik berdasarkan spektrum yang khas pada daerah inframerah.

Radiasi inframerah menyebabkan terjadinya vibrasi dari gugus fungsi suatu molekul. Vibrasi terjadi pada panjang gelombang 2,5-15  $\mu\text{m}$  ( $4000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$ ) yang merupakan panjang gelombang umum dalam alat spektrofotometer inframerah. Ikatan-ikatan yang berbeda ( $\text{C-C}$ ,  $\text{C=C}$ ,  $\text{C}\equiv\text{C}$ ,  $\text{C-O}$ ,  $\text{C=O}$ ,  $\text{O-H}$ ,  $\text{N-H}$ , dan sebagainya) mempunyai frekuensi vibrasi yang berbeda dan kita dapat mendeteksi adanya ikatan-ikatan tersebut dalam molekul organik menyebabkan senyawa-senyawa organik dapat diidentifikasi melalui frekuensi yang karakteristik sebagai pita serapan dalam spektrum inframerah (Sastrohamidjojo, 2007).

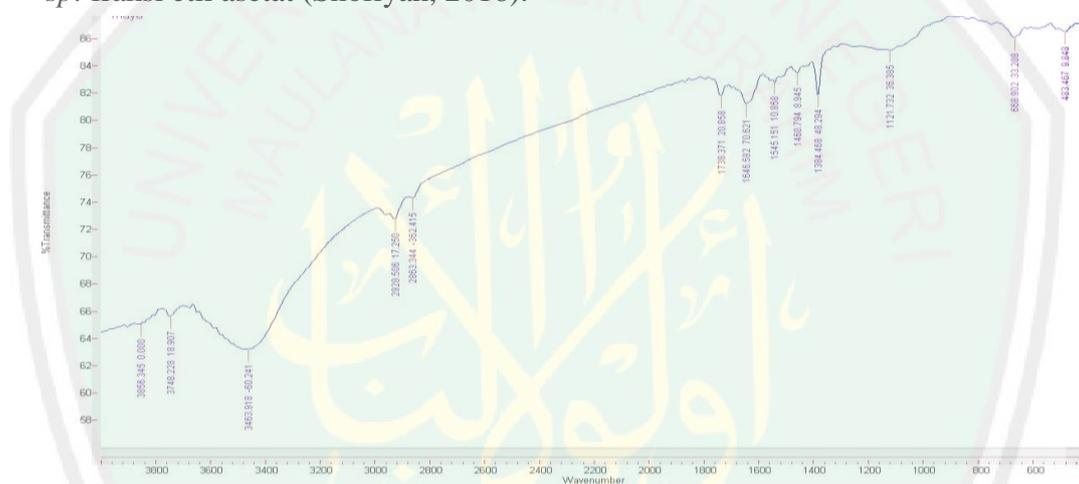
Identifikasi menggunakan FT-IR hanya akan memberikan informasi mengenai gugus fungsi yang terdapat pada struktur steroid. Steroid yang diidentifikasi dengan FT-IR akan memberikan serapan yang khas untuk gugus fungsi  $\text{OH}$ ,  $\text{C-O}$  alkohol dan  $\text{CH}_3$ . Hasil identifikasi steroid akan dinyatakan berhasil jika gugus fungsi yang telah disebutkan menimbulkan serapan pada daerahnya masing-masing (Mulyani dkk., 2013). Beberapa serapan dari berbagai gugus fungsi dapat dilihat pada Tabel 2.3 (Day dan Underwood, 1999).

Tabel 2.3 Tabel frekuensi inframerah

No	Gugus		Frekuensi (cm <sup>-1</sup> )	Panjang Gelombang (μm)
1	OH	Alkohol	3580 - 3650	2,74 – 2,79
		Berikatan H	3210 – 3550	2,82 – 3,12
		Asam	2500 – 2700	3,70 – 4,00
2	NH	Amina	3300 – 3700	2,70 – 3,03
3	CH	Alkana	2850 – 2960	3,37 – 3,50
		Alkena	3010 – 3095	3,23 – 3,32
		Aromatik	3300	3,03
4	C≡C	Alkuna	2140 – 2260	4,42 – 4,76
5	C=C	Alkena	1620 – 1680	5,95 – 5,81
		Aromatik	~1600	~6,25
6	C=O	Aldehida	1720 – 1740	5,75 – 5,81
		Keton	1675 – 1725	5,79 – 5,97
		Asam	1700 – 1725	5,79 – 87
7	C≡N	Nitril	2000 – 2300	4,35 – 5,00

Pada penelitian Shofiyah (2016) menyatakan bahwa identifikasi steroid pada mikroalga menggunakan FT-IR terdapat serapan pada bilangan gelombang 3463,91 cm<sup>-1</sup>, pada panjang gelombang tersebut terdapat serapan uluran simetri gugus O–H. Pita serapan 2928,50 cm<sup>-1</sup> dan 2863,34 cm<sup>-1</sup> diduga mengandung rentangan –CH alifatik. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan adanya gugus metil (CH<sub>3</sub>) dan metilen (CH<sub>2</sub>) (Socrates, 1994). Pada bilangan gelombang 1738,37 cm<sup>-1</sup> menunjukkan adanya ikatan rangkap C=O dan C=C dengan daerah serapan 1646,58 cm<sup>-1</sup>. Dugaan ini diperkuat dengan vibrasi C–H tekuk yang

mengindikasikan adanya gugus geminal dimetil yang umumnya ditemukan pada kerangka senyawa steroid (Aprelia dan Suyatno, 2013; Astuti dkk., 2004). Vibrasi C–H tekuk terdapat pada pita serapan  $1460,79\text{ cm}^{-1}$  dan  $1384,46\text{ cm}^{-1}$ . Bilangan gelombang  $1121,73\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya vibrasi C–OH sekunder. Serapan pada bilangan gelombang  $668,90\text{ cm}^{-1}$  merupakan serapan dari C–H gugus alkena dengan intensitas lemah (Skoog *et al.*, 1998). Data yang diperoleh dari spektrofotometer FTIR diduga terdapat senyawa steroid pada mikroalga *Chlorella sp.* fraksi etil asetat (Shofiyah, 2016).



**Gambar 2.7** Spektra Infra Merah isolat hasil pemisahan dengan KLT Preparatif mikroalga *Chlorella sp.* (Shofiyah, 2016).

## 2.7 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan LC-MS/MS

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

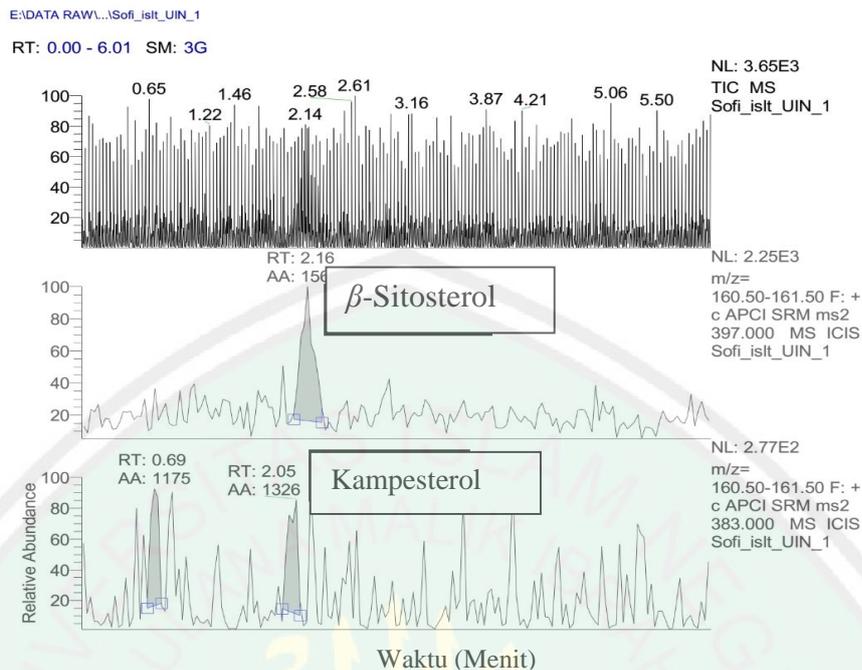
1. Alat dapat diaplikasikan secara luas tidak terbatas untuk molekul yang bersifat volatil, sangat polar dan persiapan sederhana tanpa derivatisasi.
2. Pengujian berbeda dapat dikembangkan dengan fleksibilitas yang tinggi dengan waktu analisa yang singkat.
3. Hasil analisa sangat khas dan spesifik dari adanya spektrometer massa yang tandem dengan alat.
4. Data kuantitatif maupun kualitatif dapat diperoleh karena seleksi ion yang cepat dengan banyak parameter.

MS (*mass spectrofotometer*) bekerja dengan mengionkan molekul dan memilih berdasarkan rasio fragmentasi ( $m/z$ ). Beberapa komponen yang harus terdapat dalam MS yaitu sumber ion dan analisis massa. Komponen tersebut memiliki berbagai jenis yang akan disesuaikan berdasarkan kepolaran senyawa serta kelebihan dan kekurangan masing-masing. Sumber ion yang digunakan pada penelitian yaitu sumber ion jenis Ionisasi Kimia Tekanan Atmosfer (*Athmospheric Pressure Chemical Ionization/APCI*), menurut pedoman Agilent Tech (2011) metode ini menggunakan eluen yang disemprotkan melalui pemanas bersuhu tinggi (200–400°C) pada tekanan atmosfer. Cairan akan menguap karena adanya uap panas yang timbul dari pemanas. Fase gas pelarut yang dihasilkan akan terionsasi dan ion-ionnya akan mentransfer muatan pada molekul analit. Ion dari analit akan melewati pipa kapiler menuju spektrometer massa. APCI biasanya digunakan pada kromatografi fase normal karena analit yang digunakan merupakan fasa normal.

Proses identifikasi steroid menggunakan LC-MS/MS dengan dilengkapi APCI mode positif sebagai sumber ionisasi. Menurut Diaz dkk., (2007) APCI

dapat menganalisa  $m/z$  dengan range 70 – 1000. Sistem LC menggunakan *alliance 2695* lengkap dengan *autosampler*, *degasser*, dan pemanas kolom. Sistem MS menggunakan *ZQ 2000 single quadrupole*. Sehingga diperoleh data dengan menggunakan *software* MassLynx 4.0. Kolom yang digunakan adalah C18 150 x 2,1 mm dengan fase gerak asetonitril/air (0,01% asam asetat) dengan laju alir 0,5 mL/menit.

Ion yang dihasilkan kemudian menuju pipa kapiler dan menuju penganalisa massa. LC-MS/MS digunakan untuk menganalisa senyawa yang sangat nonpolar dengan laju alir rendah. Penganalisa massa yang digunakan yaitu analisa *mass quadrupole*, metode ini terdiri atas empat batang paralel yang diatur dalam persegi yang di tengah persegi dialirkan ion analit. Bidang ini digunakan untuk menentukan rasio massa dari senyawa yang dianalisa dapat melewati bagian filter dengan waktu tertentu. Hasil identifikasi steroid yang telah dilakukan Pereira dkk., (2016) dengan alga coklat sebagai sampel menggunakan metode APCI menunjukkan 7 puncak senyawa dengan *retention time* yang berbeda. Puncak yang dihasilkan beberapa di antaranya merupakan senyawa kampestrol dengan  $m/z$  383,  $\beta$ -sitosterol  $m/z$  397, brassikasterol dengan  $m/z$  381, stigmasterol dengan  $m/z$  395, fukosterol dengan  $m/z$  369, kolesterol dengan  $m/z$  369, dan ergosterol dengan  $m/z$  379. Senyawa steroid saat diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS berada pada kondisi ionisasi, sehingga semua senyawa target akan melepaskan molekul air saat terprotonasi (Mo, *et al.*, 2013) sehingga ion yang terdeteksi berbentuk  $[M-H_2O+H]^+$  yang disebut sebagai ion prekursor, dan ion produk yang merupakan hasil fragmentasi dari ion prekursor dengan nilai  $m/z$  nya lebih kecil, dan hanya terdeteksi sebagian dari massa ion prekursornya (Khalaf, dkk., 2011).



**Gambar 2.8** Kromatogram LC-MS/MS steroid (Azah, 2018)

Hasil identifikasi steroid yang telah dilakukan Azah (2019) dengan *Hydrilla verticillata* menghasilkan 2 spektra senyawa. Puncak senyawa  $\beta$ -sitosterol menunjukkan bentuk puncak tunggal tinggi dengan ukuran yang lebih besar dari pada puncak yang lain. Puncak senyawa kampesterol menghasilkan puncak lebih kecil dari puncak senyawa  $\beta$ -sitosterol. Struktur ion prekursor dan ion produk dari  $\beta$ -sitosterol dan kampesterol tergambar pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4 Hasil identifikasi LC-MS/MS isolat steroid

Jenis Steroid	Waktu Retensi (Menit)	Massa ( $m/z$ )		Ion Prekursor	Ion Produk (daughter mass)	Kelimpahan
		Massa M-molekulH <sub>2</sub> O	Ion			
$\beta$ -Sitosterol	2, 16	414	396	397	160, 5 – 161, 5	15607
Kampesterol	0, 69 dan 2, 05	400	382	383	160, 5 – 161, 5	1175 & 1326

Sumber: Azah (2019)

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dengan judul “Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis Fraksi n-Heksana *H. verticillata*” dilaksanakan pada bulan Desember 2018 sampai bulan April 2019 dan bertempat di Laboratorium Bioteknologi, Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Kimia Analitik Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

##### 3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alat-alat gelas seperti *erlenmeyer* tutup 500 mL, batang pengaduk, gelas arloji, *erlenmeyer* vakum, corong *buchner*, timbangan analitik, spatula, gelas ukur 250 mL, kolom *silica gel*, corong gelas, *shaker*, *vacuum rotary evaporator*, desikator, gelas ukur 100 mL, pipet tetes, seperangkat KLTP, gunting, dan pipa kapiler. Instrumentasi yang digunakan yaitu Spektrofotometer UV-Vis, FTIR, dan LC-MS/MS.

##### 3.2.2 Bahan

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Hydrilla verticillata* yang berasal dari Danau Ranu Grati Pasuruan. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah metanol p.a, kloroform 96% p.a, n-heksana 96% p.a,

kertas saring, plat KLT GF<sub>254</sub>, dan aluminium foil, larutan DPPH 0,2 mM, etanol, HCl 37%, natrium bikarbonat, reagen *Lieberman-Burchard* (asam asetat anhidrat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, etanol absolut).

### 3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui tahapan berikut:

1. Preparasi sampel
2. Penentuan kadar air secara Termogravimetri
3. Ekstraksi sampel
4. Uji Fitokimia
5. Hidrolisis dan partisi
6. Pemisahan senyawa steroid dengan KLT analitik, KLT preparatif
7. Uji antioksidan senyawa steroid menggunakan metode DPPH
8. Identifikasi dengan instrumen Spektrofotometer UV-Vis
9. Identifikasi dengan instrumen FTIR
10. Identifikasi dengan instrumen LC-MS/MS
11. Analisa data

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.4.1 Preparasi Sampel

Pengambilan sampel di Danau Ranu dilakukan di permukaan air di mana jarak antara permukaan dengan dasar air  $\pm 2$  m. Sampel diambil sebanyak 10 Kg dan dicuci dengan air. Selanjutnya dikeringkan di bawah sinar matahari tidak langsung atau dengan naungan sampai kering. Setelah itu, sampel yang sudah

kering dihaluskan dengan ukuran 90 mesh dan dikeringkan pada suhu 38°C selama 24 jam di Materia Medika Kota Batu.

**3.4.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri**

Cawan porselen disiapkan terlebih dahulu, lalu dipanaskan dalam oven pada suhu 100-105°C sekitar 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya. Selanjutnya cawan disimpan dalam desikator sekitar 10 menit, lalu ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Setelah itu, sebanyak 5 g sampel dimasukkan dalam cawan porselen, kemudian dimasukkan dalam oven dan dikeringkan pada suhu 100-105°C sekitar ±15 menit, lalu sampel disimpan dalam desikator sekitar ± 10 menit dan ditimbang. Sampel tersebut dipanaskan kembali dalam oven ±15 menit, didinginkan dalam desikator sekitar ±10 menit dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi hingga tercapai berat konstan. Kadar air dalam *Hydrilla verticillata* dihitung menggunakan persamaan (3.1) dan (3.2).

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

- Dimana :
- a = bobot cawan kosong
  - b = bobot sampel + cawan sebelum dikeringkan
  - c = bobot cawan + sampel setelah dikeringkan

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}} \dots\dots\dots(3.2)$$

Setelah didapatkan nilai dari persamaan 3.1 dan 3.2 maka dihitung nilai kadar air terkoreksi. Kadar air terkoreksi dihitung dengan cara nilai kadar air dikurangi dengan faktor koreksi.

### 3.4.3 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi komponen aktif dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi. Sampel *Hydrilla verticillata* yang telah dihaluskan kemudian ditimbang sebanyak 50 g dan diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut methanol 96% dengan perbandingan 5:1 (b/v) sebanyak 3 kali dan dilakukan pengocokan menggunakan *shaker* selama 3 jam dengan kecepatan 120 rpm (*rotation per minutes*). Setelah itu, dilakukan penyaringan menggunakan corong *Buchner*. Ekstrak pekat ditimbang lalu dihitung rendemennya dengan persamaan 3.3.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \dots\dots\dots (3.3)$$

### 3.4.4 Hidrolisis dan Partisi

Hidrolisis ekstrak metanol *Hydrilla verticillata* dilakukan dengan cara penambahan HCl 2 N. Selanjutnya dinetralkan pH-nya dengan menambahkan natrium bikarbonat. Ekstrak pekat metanol 96% *Hydrilla verticillata* yang diperoleh dipartisi dengan pelarut n-heksana. Pelarut n-heksana masing-masing ditambahkan sebanyak 25 mL kemudian dikocok dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan organik dan lapisan air. Masing-masing lapisan yang terbentuk kemudian dipisahkan. Proses partisi dilakukan hingga diperoleh fasa air bening. Lapisan organik dimasukkan ke dalam *beaker glass* kemudian dipekatkan

dengan *rotary evaporator vacuum* lalu dialiri dengan gas N<sub>2</sub>. Ekstrak pekat yang diperoleh selanjutnya ditimbang dan dihitung rendemennya (Imamah, dkk., 2005).

### 3.4.5 Uji Fitokimia

Uji dilakukan dengan melarutkan fraksi n-heksana kedalam 0,5 mL kloroform, 0,5 mL asam asetat anhidrida dan 1 – 2 mL asam sulfat pekat (melalui dinding tabung), jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya golongan senyawa steroid.

### 3.4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

#### 3.4.6.1 KLT Analitik

Pemisahan senyawa steroid dengan KLT analitik menggunakan Metode modifikasi Sriwahyuni (2010). Identifikasi dengan KLT digunakan plat silika gel GF<sub>254</sub> yang diaktivasi terlebih dahulu di dalam oven pada suhu 100°C selama 30 menit untuk menghilangkan air yang terdapat pada plat. Selanjutnya masing-masing plat diberi ukuran 1 x 10 cm.

Ekstrak *H. verticillata* diperoleh dengan melarutkan ekstrak kasar akar sebanyak 10 mg *H. verticillata* dengan 1 mL pelarut n-heksana. *H. verticillata* ini kemudian ditotolkan pada jarak  $\pm 1$  cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler dan dalam 1 plat KLT diberi 1 totolan, dan dalam 1 tempat totolan diberikan 3 – 5 kali penotolan. Plat yang sudah berisi totolan tersebut, kemudian dikeringkan dan dielusi dengan masing-masing fase gerak (eluen). Eluen untuk pengembangan ini dilakukan penjenjuran terlebih dahulu dalam suatu bejana tertutup selama 20-30 menit. Penjenjuran ini dilakukan untuk menyamakan

tekanan uap pada seluruh bagian bejana. Setelah gerakan fase gerak sampai pada garis batas, elusi dihentikan. Noda-noda pada permukaan plat diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, kemudian diamati pada masing-masing hasil nodanya. , pada percobaan ini digunakan 5 macam variasi sebagai berikut,

$$V1 = 4,75 : 0,25 \quad (\text{n-heksana} : \text{etil asetat}) \quad (\text{Muharram}, 2010)$$

$$V2 = 4,5 : 0,5 \quad (\text{n-heksana} : \text{etil asetat}) \quad (\text{Zahra, dkk.}, 2013)$$

$$V3 = 4,25 : 0,75 \quad (\text{n-heksana} : \text{etil asetat}) \quad (\text{Azizah}, 2016)$$

$$V4 = 4 : 1 \quad (\text{n-heksana} : \text{etil asetat}) \quad (\text{Hayati dkk.}, 2012)$$

$$V5 = 3,75 : 1,25 \quad (\text{n-heksana} : \text{etil asetat}) \quad (\text{Dukomalamo dkk.}, 2016)$$

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

#### 3.4.6.2 KLT Preparatif

Pemisahan dengan KLT preparatif digunakan plat silika gel GF<sub>254</sub> dengan ukuran 10 x 20 cm. Ekstrak pekat hasil ekstraksi ditotolkan sepanjang plat pada jarak 1 cm dari garis bawah dan 1 cm dari garis tepi. Selanjutnya dielusi dengan menggunakan eluen yang memberikan pemisahan terbaik pada KLT analitik. Noda-noda pada permukaan plat diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm, kemudian diamati pada masing-masing hasil nodanya. Noda yang diduga merupakan senyawa steroid dikerok kemudian dilarutkan dalam pelarut n-heksana 5 mL, selanjutnya di*sentrifuge* untuk mengendapkan silikanya.

### 3.4.7 Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH

#### 3.4.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Etanol 95% dipipet sebanyak 4,5 mL kemudian ditambahkan larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1,5 mL, dimasukkan kedalam kuvet hingga penuh. Selanjutnya dicari  $\lambda_{\max}$  DPPH dan dicatat hasil pengukuran  $\lambda_{\max}$  untuk digunakan pada tahap selanjutnya (Hanani dkk., 2005).

#### 3.4.7.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel

Masing-masing isolat dilarutkan dalam pelaut etanol 95% dengan konsentrasi 50 ppm dan diuji aktivitas antioksidanya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda_{\max}$  yang telah didapatkan. Selanjutnya hasil uji aktivitas antioksidan yang terbaik divariasikan konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm. Ekstrak masing-masing konsentrasi dipipet 4,5 mL dan ditambahkan 1,5 mL DPPH 0,2 mM kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 90 menit, kemudian diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda_{\max}$  yang telah didapatkan. Data absorbansinya yang diperoleh dari tiap konsentrasi masing-masing ekstrak dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya (Arindah, 2010):

$$\text{Aktivitas antioksidan} = \left( \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \right) \times 100 \% \dots\dots (3.4)$$

Nilai  $EC_{50}$  diperoleh dari persamaan regresi menggunakan program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing doseresponse data*”. Nilai  $EC_{50}$  juga dihitung dalam persamaan  $y = ax + b$  yang diperoleh dari kurva regresi linier dari hubungan persen aktivitas antioksidan dan konsentrasi ekstrak antioksidan.  $EC_{50}$  dihitung dengan cara memasukkan nilai 50% ke dalam

persamaan kurva standar sebagai sumbu y kemudian dihitung nilai x sebagai konsentrasi  $EC_{50}$ . Kontrol yang digunakan yaitu larutan DPPH 0,2 mM dalam etanol 95%.

### **3.4.8 Identifikasi Senyawa Steroid**

#### **3.4.8.1 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan Spektrofotometer**

##### **UV-Vis**

Isolat yang diperoleh dari hasil KLT preparatif yang diduga senyawa steroid dianalisis dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Isolat dimasukkan dalam kuvet hingga sepertiganya. Kemudian dianalisis pada rentang panjang gelombang 200 – 800 nm. Pada blanko, pelarut n-heksana dimasukkan dalam kuvet setengahnya dan dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 200 – 800 nm, data disimpan. Spektra yang terbentuk diamati dan dicatat panjang gelombang serta absorbansi pada puncak yang terbentuk.

#### **3.4.8.2 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan FTIR**

Hasil isolate steroid n-heksana dan petroleum eter menunjukkan nilai aktivitas antioksidan terbaik diidentifikasi menggunakan FTIR. Ekstrak kasar tersebut dicampur dengan pelet KBr lalu digerus bersamaan dengan mortar agate. Campuran pelet KBr dan sampel yang telah halus ditekan dengan tekanan 80 torr (8 – 20 torr per satuan waktu) selama 10 menit. Selanjutnya pelet yang telah ditekan dianalisis menggunakan FTIR.

### 3.4.8.3 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan LC-MS/MS

Isolat senyawa steroid yang memiliki kemampuan antioksidan yang paling baik dianalisa menggunakan LC-MS/MS. Kolom yang digunakan dengan spesifikasi *hypersil gold* (50 mm x 2,1 mm x 1,9  $\mu\text{m}$ ). UHPLC merk ACCELLA type 1250 buatan *Thermo Scientific* yang terdiri dari *degasser* vakum, pompa *quartener*, *autosampler*. *Thermostatic* yang dikendalikan oleh komputer melalui program x-calibur 2.1. fasa gerak yang digunakan adalah 0,1% asam format dalam air (fasa A) dan 0,1% asam format dalam asetonitril (fase B). pengaturan eluen secara gradient linier 100% (A) : 0% (B) sampai 0% (A) : 100% (B) yang diatur selama 5 menit dengan laju alir 500  $\mu\text{L}/\text{menit}$ . Volume yang diinjeksikan 2  $\mu\text{L}$ . Kolom dikontrol pada suhu 30°C, dan kompartemen autosampler ditetapkan untuk 10°C. MS yang digunakan adalah MS/MS *triple Q* (*Quadrupole*) spektrometer masa TSQ QUANTUM ACCESS MAX dari Thermo Finnigan dengan sumber ionisasi APC1 (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) dikendalikan oleh *software* TSQ Tune yang dikendalikan dengan mode positif. Kondisi ion APCL 41 adalah sebagai berikut: arus yang digunakan 4  $\mu\text{A}$ , suhu penguapan 250°C, suhu kapiler 300°C, *sheat gas pressure* 45 arbitrary units, dan *aux gas pressure* 15 arbitrary units.

## 3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa grafik dan angka yang kemudian dideskripsikan hasilnya. Hasil aktivitas antioksidan berupa data angka yang dinyatakan dalam  $\text{EC}_{50}$ . Identifikasi senyawa steroid dapat diketahui dengan melakukan analisis hasil uji KLT menggunakan fase diam silika gel F<sub>254</sub>. Hasil

identifikasi juga diperoleh dari spektrofotometer UV-Vis, FT-IR dan LC-MS/MS berupa spektra yang kemudian dibandingkan menggunakan literatur.



## **BAB IV**

### **PEMBAHASAN**

#### **4.1 Preparasi Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Hydrilla verticillata* yang diperoleh dari danau Ranu Grati, Pasuruan. Preparasi sampel meliputi pencucian untuk menghilangkan pengotor yang terdapat pada sampel, selanjutnya dilakukan pengeringan yang bertujuan untuk mengurangi kandungan air. Proses pengeringan dilakukan dengan cara tanpa pemanasan sinar matahari langsung. Pengeringan tanpa menggunakan pemanasan matahari ini dilakukan agar senyawa aktif yang diinginkan tidak mengalami kerusakan akibat suhu yang tinggi. Setelah proses pengeringan dilakukan proses penghalusan dimaksudkan untuk memperluas permukaan dari sampel sehingga mempermudah pada tahap ekstraksi. Menurut Voight (1995) semakin kecil bentuk sampel maka luas permukaannya akan semakin besar sehingga kontak yang terjadi antara sampel dengan pelarut akan semakin besar, maka proses ekstraksi akan semakin cepat. Sampel dalam bentuk serbuk dengan tingkat penghalusan yang tinggi, kemungkinan terjadinya kerusakan sel-sel akan semakin besar sehingga memudahkan pelarut mengambil kandungan yang terdapat dalam sampel. Sampel yang telah dihaluskan dan diayak dengan ayakan berukuran  $\pm 90$  mesh, menghasilkan sebanyak 950 g serbuk kering dari 1,1 Kg sampel keringnya.

#### **4.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri**

Penentuan kadar air sampel kering *Hydrilla verticillata* bertujuan untuk mengetahui besarnya kandungan air di dalamnya. Kandungan air dalam sampel

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

Hasil penentuan kadar air pada sampel kering *Hydrilla verticillata* sebesar 6,5%. Nilai tersebut sesuai dengan Nurmillah (2009), bahwa kadar air maksimum yang diisyaratkan untuk berlangsungnya ekstraksi secara maksimal yaitu sebesar 11 %. Artinya kadar air sampel kering *Hydrilla verticillata* tidak melebihi ambang batas maksimum kadar air yang disyaratkan untuk proses ekstraksi. Hal ini bertujuan agar kandungan air dalam sampel yang telah berbentuk ekstrak tidak ditumbuhi jamur saat disimpan (Ratnani dkk., 2015).

#### 4.3 Ekstraksi Sampel

Senyawa metabolit sekunder yang berada di alam berikatan dengan glikosida sehingga bersifat polar. Oleh karena itu, pada penelitian ini proses ekstraksi maserasi dilakukan dengan pelarut metanol p.a yang bersifat polar. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk *Hydrilla verticillata* sebanyak 100 g ke dalam metanol dengan perbandingan 1:5. Pengadukan juga dilakukan untuk memaksimalkan kontak sampel dengan pelarut sehingga dapat mempercepat proses ekstraksi. Senyawa-senyawa non polar yang ada di dalam sitoplasma sel sampel akan larut dalam pelarut organik setelah mengalami

plasmolisis. Plasmolisis menyebabkan terjadinya pemecahan dinding sel akibat adanya perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel, sehingga senyawa di dalam sitoplasma akan larut pada pelarut organik selama proses ekstraksi (Ningsih dkk., 2016). Proses maserasi dihentikan ketika warna filtrat dari sampel sudah berubah dari hijau pekat menjadi hijau yang lebih bening yang dapat diasumsikan bahwa senyawa di dalam sampel telah terekstrak. Filtrat dari hasil proses maserasi menggunakan metanol yang telah diperoleh dijadikan satu dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* untuk memperoleh ekstrak pekat metanol. Hasil dari pemekatan ekstrak kasar metanol *H. verticillata* memiliki warna hijau kehitam-hitaman dan kental.

Hasil rendemen ekstrak pekat yang didapat dari dua erlenmeyer dengan masing-masing sampel awal 100 g pada penelitian ini yaitu 5,14%. Hasil rendemen sebesar 5,14% ini menghasilkan 5,14 g ekstrak pekat yang akan dilanjutkan pada proses hidrolisis dan partisi.

#### **4.4 Hidrolisis dan Partisi**

Senyawa organik yang terdapat pada tumbuhan dalam bentuk ikatan glikosida yaitu gabungan dua bagian senyawa antara gugus gula dan gugus bukan gula. Proses hidrolisis akan memutuskan ikatan glikosida menjadi glikon dan aglikon dengan bantuan katalis asam. Hidrolisis pada senyawa aktif ekstrak metanol dilakukan dengan menggunakan katalis asam HCl 2 N. Diasumsikan setelah penambahan katalis asam tersebut senyawa metabolit sekunder yang terikat pada aglikon akan terputus.

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

Penetralan dilakukan dengan larutan natrium bikarbonat bertujuan untuk menghentikan reaksi hidrolisis yang ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung gas  $CO_2$  yang mengidentifikasi bahwa HCl dan  $NaHCO_3$  sudah bereaksi. Reaksi hidrolisis merupakan reaksi yang bersifat *reversible* (bolak-balik), sehingga apabila tidak dilakukan penetralan maka reaksi pembentukan ikatan glikosida antara glikon dan aglikon akan terbentuk kembali. Adapun reaksi pemutusan ikatan glikosida ketika penambahan HCl dan penetralan dengan  $NaHCO_3$  ditunjukkan pada Gambar 2.3.

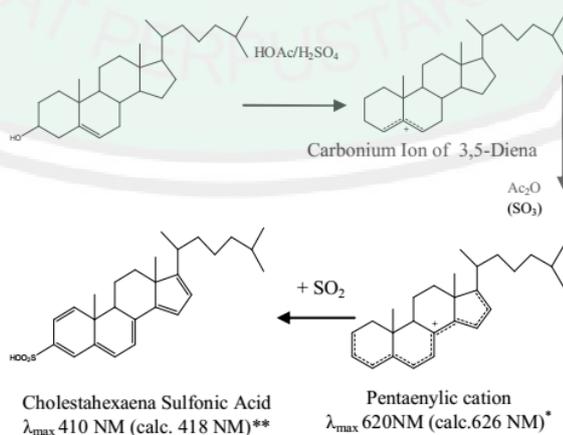
Hidrolisat yang diperoleh kemudian dipartisi (ekstraksi cair-cair) dengan menggunakan pelarut n-heksana. Pelarut ini bersifat nonpolar sehingga dapat melarutkan senyawa yang bersifat nonpolar seperti senyawa steroid. Proses partisi menghasilkan dua fasa cairan di mana fasa air dan fasa organik pada lapisan atas. Proses ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan untuk diambil fasa organik yang mengandung senyawa steroid hingga terjadi perubahan dari hijau kehitaman berubah warnanya menjadi bening. Dari 10 gram ekstrak kasar yang

dihidrolisis, didapatkan fraksi pekat n-heksana sebesar 4,7 gram dengan randemen 47,95% (perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 4).

#### 4.5 Uji Fitokimia

Uji fitokimia bertujuan untuk mengetahui senyawa steroid yang terdapat dalam sampel *Hydrilla verticillata*. Uji ini dilakukan dengan mereaksikan fraksi n-heksana dengan pereaksi *Liebermann Burchard* yang terdiri dari kloroform, asetat anhidrad, asam sulfat. Asam asetat anhidrad berfungsi dalam proses asetilasi gugus hidroksil yang memebentuk turunan asetil. Hal ini dikarenakan gugus asetil merupakan gugus pergi yang baik, sehingga terbentuk ikatan rangkap. Penggunaan kloroform untuk melarutkan senyawa steroid. Di dalam pelarut ini tidak terdapat molekul air, sehingga tidak akan merubah asam asetat anhidrat menjadi asam asetat sebelum reaksi berjalan dan turunan asetil tidak akan terbentuk. Hasil dari uji ini dihasilkan warna biru kehijauan yang menunjukkan fraksi n-heksana positif mengandung senyawa steroid. Reaksi yang terjadi antara pereaksi *Liebermann Burchard* dengan senyawa steroid ditunjukkan pada Gambar 4.1.

4.1.



Gambar 4.1 Dugaan reaksi *Liebermann-Burchard* (Nafisah dkk., 2014)

Perubahan yang terjadi dikarenakan adanya reaksi oksidasi golongan senyawa steroid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi (Robertino dkk., 2015). Adanya penambahan asam kuat dari reagen menyebabkan dehidrasi pada senyawa steroid, sehingga membentuk garam yang dapat memberikan warna (Masroh, 2010; Qalb, dkk., 2017). Hasil uji fitokimia pada *Hydrilla verticillata* fraksi n-heksana pada ekstrak kasar ditunjukkan pada Gambar 4.2



Gambar 4.2 Hasil uji fitokimia pada fraksi n-heksana

Berdasarkan Gambar 4.2 menunjukkan terdapat golongan senyawa aktif steroid yang ditandai dengan warna hijau. Astuti dkk., (2014) menyatakan bahwa uji kualitatif senyawa steroid menggunakan pereaksi *Liebermann Burchard* menghasilkan warna hijau. Hafiz (2017) dan Hasanah (2017), juga menyatakan bahwa ekstrak kasar n-heksana dan petroleum eter *Hydrilla verticillata* positif mengandung steroid.

## 4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

### 4.6.1 KLT Analitik

Pemisahan senyawa steroid dengan KLT bertujuan untuk mencari variasi eluen terbaik yang dapat memisahkan komponen senyawa dari fraksi n-heksana. Pemisahan senyawa steroid dengan KLT dilakukan untuk mencari variasi eluen terbaik yang dapat memisahkan komponen senyawa dari ekstrak *Hydrilla verticillata*. Eluen terbaik merupakan eluen yang dapat memisahkan senyawa dengan baik dan dalam jumlah banyak, ditandai dengan munculnya banyak noda dengan pemisahan noda yang baik (Ramadhani, dkk., 2013). Noda yang terbentuk tidak berekor dan adanya jarak yang jelas antar noda (Zirconia, dkk., 2015). Penggunaan beberapa variasi eluen dilakukan untuk mengatur kepolaran, yang dianggap sudah mewakili kepolaran dari setiap senyawa yang akan dipisahkan. Lima macam perbandingan eluen antara n-heksana dengan etil asetat yang semakin meningkat kepolarannya (4,75:0,25, 4,5:0,5, 4,25:0,75, 4:1, 3,75:1,25).

Plat yang digunakan berukuran  $1 \times 10$  cm, menggunakan variasi eluen yang telah ditentukan. Pengamatan pola pemisahan noda dilakukan di bawah lampu UV pada panjang gelombang 366 nm. Pemisahan senyawa akan menghasilkan berkas noda dengan warna tertentu yang menunjukkan golongan senyawanya. Senyawa steroid akan menghasilkan warna biru dan hijau saat diamati di bawah lampu UV 366 nm (Pratiwi, 2014). Jumlah noda yang terbentuk dari penggunaan beberapa variasi eluen terangkum pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Jumlah noda yang terbentuk pada KLTA

No	Perbandingan Eluen	Jumlah spot	Rf	Resolusi	Warna	Dugaan senyawa
1	4,75: 0,25	4	0,0375	0,5	Merah	Triterpenoid
			0,1	0,5	Merah	Triterpenoid
			0,1625	0,2	Hijau	Steroid
			0,1875	0,2	Merah	Triterpenoid
			0,05	0,3	Merah	Triterpenoid
2	4,5: 0,5	4	0,0875	1	Merah	Triterpenoid
			0,2125	0,3	Hijau	Steroid
			0,25	0,3	Merah	Triterpenoid
			0,075	0,6	Merah	Triterpenoid
			0,15	0,4	Merah	Triterpenoid
3	4,25: 0,75	9	0,2	0,4	Merah	Triterpenoid
			0,25	0,4	Merah	Triterpenoid
			0,2875	0,3	Merah	Triterpenoid
			0,35	0,5	Merah	Triterpenoid
			0,425	0,6	Merah	Triterpenoid
			0,6	1,4	Hijau	Steroid
			0,7625	1,3	Merah	Triterpenoid
			0,1125	0,7	Merah	Triterpenoid
			0,2	0,4	Merah	Triterpenoid
4	4:1	12	0,25	0,9	Merah	Triterpenoid

No	Perbandingan Eluen	Jumlah spot	Rf	Resolusi	Warna	Dugaan senyawa
5	3,75: 0,25	12	0,3625	0,3	Merah	Triterpenoid
			0,4	0,6	Merah	Triterpenoid
			0,475	0,7	Merah	Triterpenoid
			0,5625	0,5	Merah	Triterpenoid
			0,625	0,4	Merah	Triterpenoid
			0,675	0,4	Merah	Triterpenoid
			0,725	0,5	Hijau	Steroid
			0,7875	0,6	Merah	Triterpenoid
			0,8625	0,6	Merah	Triterpenoid
			0,1625	0,7	Merah	Triterpenoid
			0,25	0,6	Merah	Triterpenoid
			0,325	1,3	Merah	Triterpenoid
			0,4875	0,55	Merah	Triterpenoid
			0,55625	0,25	Merah	Triterpenoid
			0,5875	0,4	Merah	Triterpenoid
			0,6375	0,5	Merah	Triterpenoid
			0,7	0,3	Merah	Triterpenoid
			0,7375	0,3	Merah	Triterpenoid
			0,775	0,3	Hijau	Steroid
			0,8125	0,4	Merah	Triterpenoid
			0,8625	0,4	Merah	Triterpenoid

Berdasarkan Tabel 4.1, dari kelima variasi eluen yang digunakan, pada variasi eluen 4 : 1 dan 3,75 : 1,25 menghasilkan jumlah noda terbanyak dan sama yaitu 12. Sedangkan untuk variasi eluen 4,25 : 0,5 menghasilkan 9 noda. Untuk variasi eluen 4,5 : 0,5 dan 4,75 : 0,25 menghasilkan jumlah noda yang sama yaitu 4. Hasil ilustrasi pola pemisahan variasi eluen pada KLTA saat diamati di bawah lampu UV 366 nm tergambar pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Ilustrasi penampakan noda KLTA pada 366 nm

Gambar 4.3 menunjukkan bahwa terdapat beberapa noda terduga steroid dengan pola pemisahan yang berbeda-beda pada masing-masing plat variasi eluen. Perbedaan jumlah noda dan pola pemisahan ini dikarenakan adanya perbedaan tingkat kepolaran dari setiap variasi eluen. Noda yang cenderung memiliki sifat kepolaran yang tinggi akan menghasilkan nilai Rf lebih rendah, karena senyawa lebih terdistribusi ke fase diam (silika) yang bersifat polar, sedangkan yang bersifat kepolaran rendah akan menghasilkan nilai Rf lebih besar karena lebih terdistribusi ke fase geraknya. Pola pemisahan 3,75:1,25 dan 4:1 menghasilkan

jumlah noda yang sama dan terbanyak dari pada variasi eluen lainnya, tetapi pada variasi eluen 4:1 pola pemisahan terduga steroid lebih bagus dibandingkan dengan variasi eluen 3,75:1,25, karena adanya jarak yang jelas pada senyawa terduga steroid dengan senyawa terduga triterpenoid. Perbandingan 4,75:0,25 dan 4,5:0,5 menghasilkan jumlah noda yang sedikit. Untuk variasi eluen 4,25:0,75 memiliki jumlah noda sebanyak 9, namun noda terduga steroid mengalami *overlap* dengan noda yang diduga senyawa triterpenoid. Berdasarkan hasil tersebut, maka eluen 4:1 digunakan untuk analisa lebih lanjut menggunakan KLTP.

#### 4.6.2 KLT Preparatif

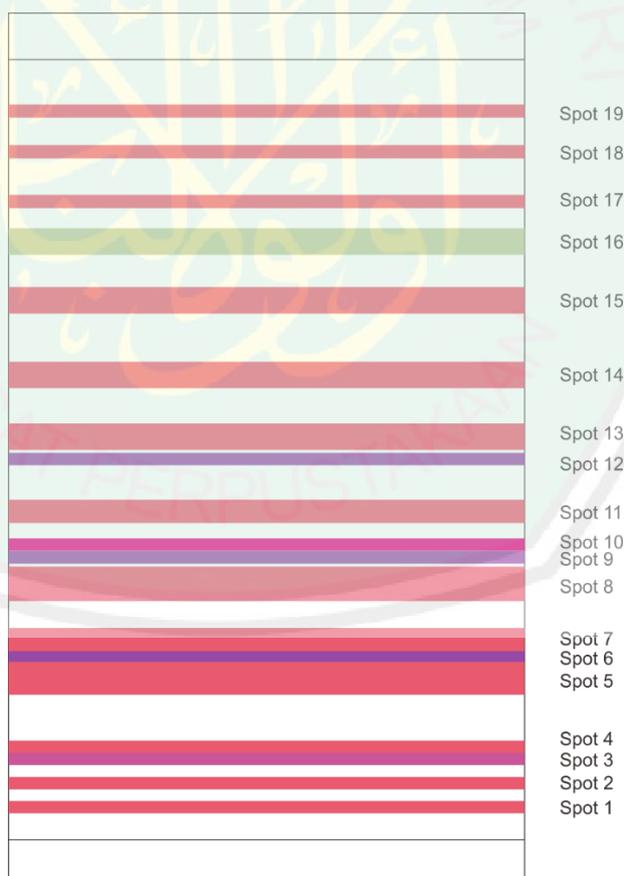
Pemisahan senyawa steroid dengan KLTP dilakukan bertujuan untuk mendapatkan isolat steroid yang lebih banyak dengan menggunakan plat berukuran 10 × 20 cm. Variasi eluen yang digunakan pada KLT preparatif menggunakan variasi eluen terbaik yang dihasilkan pada KLT analitik yaitu 4:1. Noda yang terbentuk diamati dan diidentifikasi di bawah lampu UV. Hasil Pemisahan menggunakan KLT preparatif terbentuk 19 spot yang ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil pemisahan senyawa steroid menggunakan KLT preparatif

No	Nilai Rf	Resolusi	Warna	Dugaan Senyawa
1	0,067	0,5	Merah	Triterpenoid
2	0,094	0,5	Merah	Triterpenoid
3	0,12	1,1	Merah	Triterpenoid

No	Nilai Rf	Resolusi	Warna	Dugaan Senyawa
4	0,183	0,5	Merah	Triterpenoid
5	0,21	0,5	Merah	Triterpenoid
6	0,239	0,8	Merah	Triterpenoid
7	0,283	0,5	Merah	Triterpenoid
8	0,31	0,9	Merah	Triterpenoid
9	0,36	0,4	Merah	Triterpenoid
10	0,383	0,4	Merah	Triterpenoid
11	0,4	1	Merah	Triterpenoid
12	0,461	0,9	Merah	Triterpenoid
13	0,51	0,8	Merah	Triterpenoid
14	0,55	1,9	Merah	Triterpenoid
15	0,66	1,7	Merah	Triterpenoid
16	0,75	0,8	Hijau	Steroid
17	0,8	1	Merah	Triterpenoid
18	0,856	1,1	Merah	Triterpenoid
19	0,917		Merah	Triterpenoid

Berdasarkan Tabel 4.2 dapat diketahui terdapat 1 steroid dan 18 triterpenoid. Jumlah spot yang dihasilkan pada KLT preparatif tidak sama dengan KLTA. Hal ini dikarenakan jarak elusi yang berbeda, sehingga pada KLTP senyawa yang awalnya masih berhimpit akhirnya terpisah. Untuk memperjelas hasil yang didapat saat diamati dibawah lampu UV dilakukan uji fitokimia menggunakan reagen *Liebermann-Burchard*, dengan cara menyemprotkannya ke potongan plat hasil KLTP ukuran  $1 \times 20$  cm. Hasil uji positif ditandai dengan terbentuknya warna hijau pada noda terduga steroid saat diamati secara langsung (Suhaenah dan Nuryanti, 2017). Berikut ilustrasi hasil pemisahan KLTP pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Ilustrasi hasil pemisahan KLTP

Berdasarkan Gambar 4.4 menghasilkan 1 noda positif steroid pada spot 16. Hasil spot noda pada pemisahan senyawa aktif steroid dengan KLTP menunjukkan bahwa segala ciptaan Allah baik dari hal yang besar maupun hal sekecil pun itu beragam sesuai dengan ukurannya dengan serapi-rapinya. Hal ini merupakan suatu pertanda bahwasanya setiap dari ciptaan Allah SWT itu memiliki kadar nya tertentu. Sebagaimana dalam surah al-Furqan ayat 2 :

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُنْ لَهُ  
شَرِيكٌ فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا

Artinya: “Yang kepunyaan-Nya-lah kerajaan langit dan bumi, dan Dia tidak mempunyai anak, dan tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan(Nya), dan dia telah menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya”.

Dari sisi kejadiannya, sudah jelas bahwa semua makhluk tidak terlepas dari perbedaan jenis dan, bentuknya, yang mana terdiri atas unsur-unsur yang sangat terbatas jumlahnya (Shihab, 2002). Berdasarkan tafsir tersebut dapat diketahui bahwa segala sesuatu yang diciptakan Allah SWT termasuk senyawa aktif yang terkandung dalam *Hydrilla verticillata* yang dapat dilihat pada hasil pemisahan KLTP berupa spot nodanya, bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatunya dengan ukuran-ukuran yang serapi-rapinya.

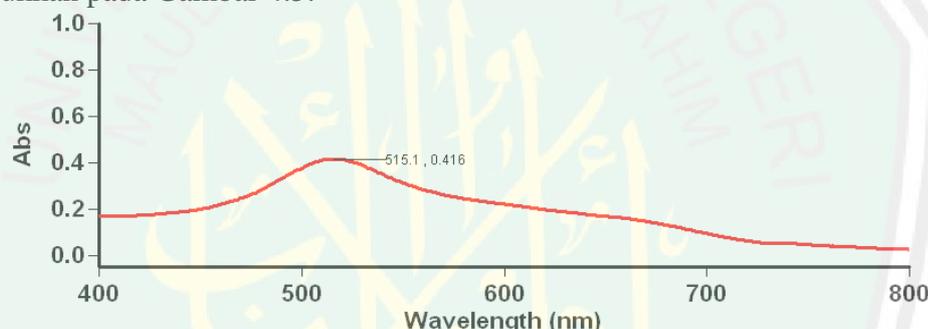
#### 4.7 Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH

##### 4.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan terhadap DPPH diawali dengan penentuan panjang gelombang maksimum dari DPPH. Penentuan dari panjang gelombang maksimum ini bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang yang mempunyai serapan tertinggi. Pengukuran sampel dilakukan panjang gelombang maksimum

untuk mengoptimalkan kepekaan DPPH dan meminimalkan kesalahan (Rohman dan Gandjar, 2007).

Panjang gelombang maksimum yang digunakan dalam pengukuran uji aktivitas antioksidan sangat bervariasi. Panjang gelombang maksimum yang digunakan yaitu 515 nm (Kuntorini, E. dan Astuti, 2010; Hanani, E., dkk., 2005), 516 nm (Julyasih, S., dkk., 2009), 517 nm (Yudiati, E., dkk., 2011), 518 nm (Bariyyah, S., dkk., 2013). Hasil penentuan panjang gelombang maksimum DPPH 0,2 mM diperoleh sebesar 515 nm. Hasil spektra UV-Vis larutan DPPH ditunjukkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Hasil spektra UV-Vis larutan DPPH

Penentuan panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh, selanjutnya digunakan untuk uji aktivitas antioksidan pada isolat senyawa steroid hasil Kromatografi Lapis Tipis fraksi n-heksan *Hydrilla verticillata*.

#### 4.7.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel

Pengujian aktivitas antioksidan pada isolat senyawa steroid hasil KLTP dengan variasi konsentrasi 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 515 nm. Pembuatan larutan DPPH dibuat dengan keadaan baru untuk menghindari terjadinya perubahan nilai yang signifikan.

Absorbansi kontrol dan absorbansi isolat yang diperoleh digunakan untuk menentukan persen (%) aktivitas antioksidan. Persen aktivitas antioksidan ini

menunjukkan kemampuan suatu antioksidan dalam menghambat radikal bebas dengan atom hidrogen yang terdapat pada senyawa antioksidan yang menangkap radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyn*) (Rahayu et al., 2010). Hasil pengukuran dari aktivitas antioksidan yang dilakukan memberikan gradasi warna menjadi ungu muda (memudar).

Parameter yang digunakan dalam penentuan aktivitas antioksidan adalah persen aktivitas antioksidan dan nilai  $EC_{50}$ . Persen (%) aktivitas dari antioksidan yang telah diperoleh dianalisis menggunakan persamaan regresi non linier dengan *GraphPad prism software, Regression for analyzing doseresponse data*, sehingga didapatkan nilai  $EC_{50}$  dari masing-masing isolat.  $EC_{50}$  merupakan konsentrasi dari larutan substrat atau sampel yang mampu mereduksi aktivitas DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai  $EC_{50}$  berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan (Molyneux, 2004).

Tabel 4.3 Hasil pengukuran aktivitas antioksidan pada sampel

Konsentrasi	Absorbansi kontrol	Absorbansi sampel	% Aktivitas antioksidan
<b>1 ppm</b>	0,1167	0,1125	3,59
<b>2 ppm</b>	0,4052	0,3849	5,009
<b>3 ppm</b>	0,1173	0,0973	17,05
<b>4 ppm</b>	0,7741	0,5601	27,6
<b>5 ppm</b>	0,7774	0,3875	50,154
	<b><math>EC_{50}</math></b>	<b>5,109 ppm</b>	

Berdasarkan Tabel 4.3 dapat diketahui bahwa nilai  $EC_{50}$  sebesar 5,109 ppm. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai  $EC_{50}$  bernilai kurang dari 50 ppm, kuat jika bernilai 50 – 100 ppm, sedang jika bernilai 100 – 150 ppm dan lemah jika bernilai 150 – 200 ppm (Hidajat, 2005). Hal ini menunjukkan bahwa setiap dari ciptaan Allah SWT itu memiliki ukuran yang

benar-benar telah ditentukan oleh Allah. Seperti yang dijelaskan pada surat al-Qomar ayat 49.

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

Artinya : “*Sesungguhnya kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran.*”  
(al-Qomar/27: 49)

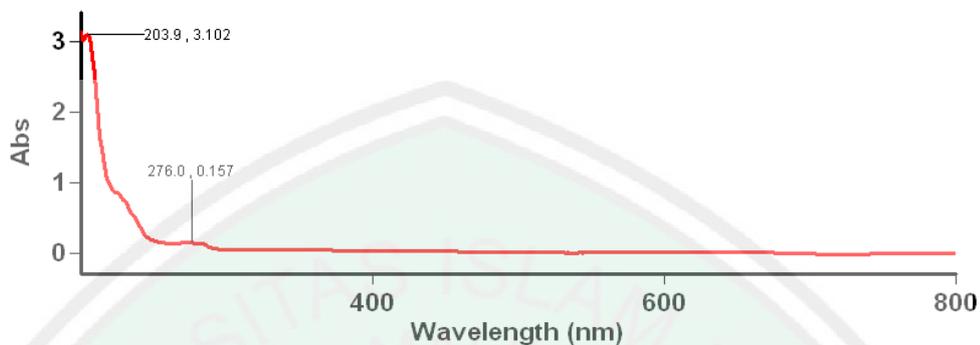
Shihab (2002) menyatakan bahwa yang dimaksud dengan kata *biqadar* adalah bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu dengan ukuran masing-masing tidak kurang dan tidak lebih. Berdasarkan tafsir tersebut dapat diketahui bahwa segala sesuatu yang diciptakan Allah SWT memiliki ukuran atau kadar masing-masing begitu pula dengan aktivitas antioksidan yang dihasilkan dari isolat steroid *Hydrila verticillata*. Hasil penelitian ini menunjukkan isolat senyawa steroid termasuk dalam antioksidan sangat kuat dengan penambahan antioksidan yang terdapat dari isolat sebanyak 5,109 ppm larutan uji akan menangkap radikal bebas sebanyak 50% dari total radikal bebas.

#### 4.8 Identifikasi Senyawa Steroid

##### 4.8.1 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Berdasarkan Gambar 4.6 isolat steroid menghasilkan serapan maksimum pada panjang gelombang 203,9 dan 276 nm. Panjang gelombang 203 nm tersebut menunjukkan adanya senyawa steroid jenis  $\beta$ -sitosterol dan terdapat ikatan C=C tidak terkonjugasi dengan transisi  $\pi$ - $\pi^*$ . Hal ini sesuai dengan penelitian Aprelia dan Suyatno (2013) dengan melakukan identifikasi senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan paku terdapat adanya serapan maksimum pada 203 nm yang

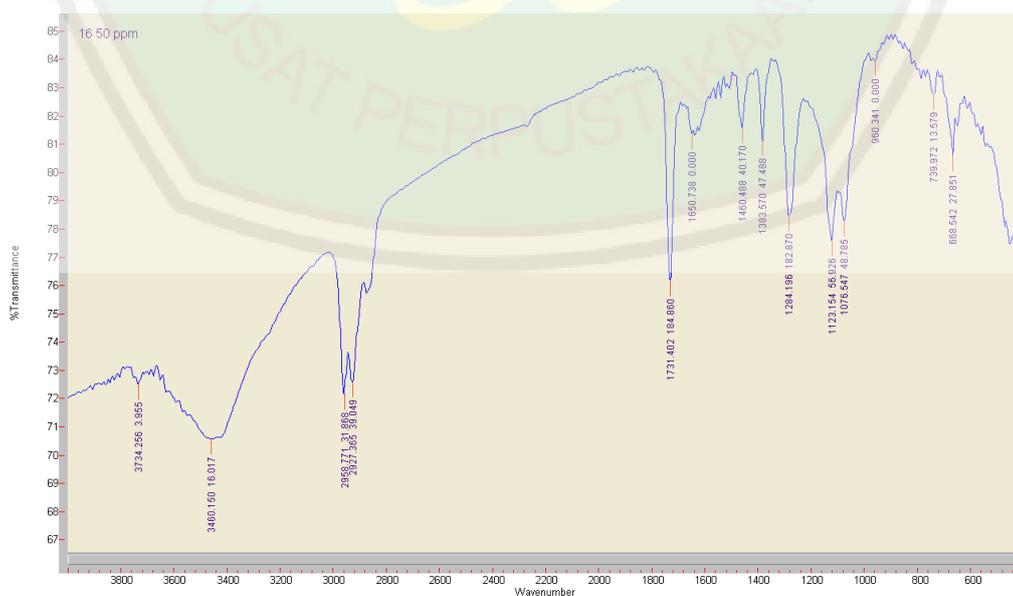
menunjukkan adanya senyawa  $\beta$ -sitosterol. Sedangkan panjang gelombang 276 nm menunjukkan bahwa hasil isolasi ini memiliki ikatan rangkap terkonjugasi.



Gambar 4.6 Hasil spektra UV-Vis isolat steroid

#### 4.8.2 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan FTIR

FTIR merupakan suatu metode yang digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi suatu senyawa. Dalam FTIR terjadi interaksi antara energi dengan molekul yang menyebabkan terjadinya transisi akibat adanya vibrasi molekul, sehingga setiap gugus fungsi mempunyai tipe ikatan yang berbeda sehingga tiap gugus fungsi mempunyai serapan IR yang khas. Spektra FTIR dari hasil isolat *Hydrilla verticillata* dapat dilihat pada Gambar 4.7



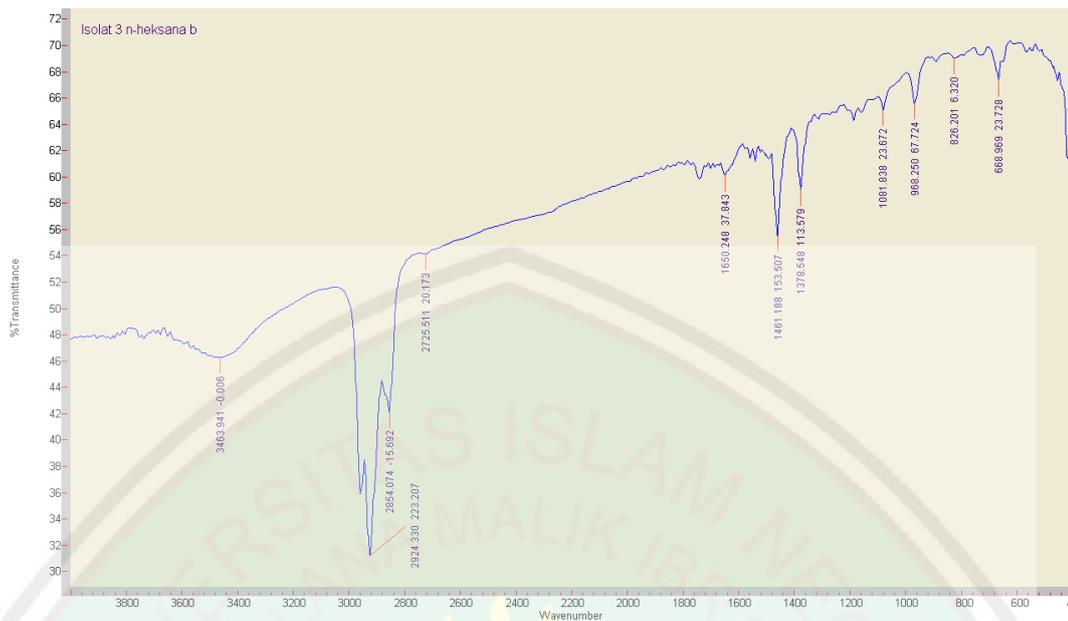
Gambar 4.7 Hasil identifikasi isolat steroid dengan FT-IR

Tabel 4.4 Interpretasi spektra FT-IR isolat steroid hasil kromatografi lapis tipis

No	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Range Pustaka (cm <sup>-1</sup> ) (Socrates, 1994)	Jenis Vibrasi	Intensitas (Socrates, 1994)
1.	3460,150	3550 – 3250	OH (stretch)	m – s
2.	2958,771	3000 – 2800	C sp <sub>3</sub> -H (stretch)	m – s
3.	2927,365	2940 – 2915	-CH <sub>2</sub> - (Asy)	M
4.	2840,1	2870 – 2840	-CH <sub>2</sub> - (sym)	M
5.	1731,402	1780 – 1730	C=O ester	M
6.	1650,738	1690 – 1620	C=C	M
7.	1460,488	1600 – 1450	C–C stretch	W
8.	1383,570	1395 – 1365	-C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (stretch)	M
9.	1284,196	1300 – 1200	Secondary Alcohol	W
10.	1123,154	110 – 1300	C–O–C ester	S
11.	1076,547	1125 – 1000	C–O alcohol Sekunder	s – w
12.	960,341	995 – 650	=C–H siklik (broad)	
13.	739,972	995 – 650	=C–H siklik	W
14.	668,542	995 – 650	=C–H siklik (broad)	W

Keterangan : s = *strong*, m = *medium*, w=*weak*

Hasil analisis pola serapan FTIR yang dihasilkan dari isolat steroid *Hydrilla verticillata* berdasarkan Gambar 4.7 dan Tabel 4.4 menunjukkan adanya pita serapan pada daerah 3460,150 cm<sup>-1</sup> yang melebar menunjukkan adanya gugus O–H pada isolat. Pita serapan 2958,771 cm<sup>-1</sup> menunjukkan CH<sub>3</sub> *stretching*, –CH<sub>2</sub>– asiklik (2927 dan 2840 cm<sup>-1</sup>) dan ikatan C=C (1650 cm<sup>-1</sup>). Gugus fungsi penting lainnya yaitu gugus karbonil C=O untuk ester (1731 cm<sup>-1</sup>) yang didukung dengan serapan C–O ester (1286 cm<sup>-1</sup>) dan serapan C–O–C (1076 cm<sup>-1</sup>). Serapan C–O untuk alkohol sekunder muncul 1123,154 cm<sup>-1</sup>. Gugus geminal dimetil pada bilangan gelombang 1460 cm<sup>-1</sup> dan 1383,5 cm<sup>-1</sup>. Serapan geminal dimetil ini adalah serapan khas dari senyawa steroid dan triterpenoid (Astuti dkk., 2014).



Gambar 4.8 Spektra FTIR isolat 16 ekstrak n-heksana (Sulistiyani, 2019)

Tabel 4.5 Interpretasi spektrum inframerah isolat 16 ekstrak n-heksana

Bilangan gelombang (v, $\text{cm}^{-1}$ )	Range Pustaka (Socrates, 1994)	Intensitas Refrensi	Penempatan gugus terkait
<b>3463,94</b>	3600-3450	Lebar	O-H <i>stretch</i>
<b>2924,33</b>	2940-2914	Tajam	-CH <sub>2</sub> - <i>stretch asy</i>
<b>2854,07</b>	2870-2840	Sedang	-CH <sub>2</sub> - <i>stretch sym</i>
<b>1650,24</b>	1680-1620	Sedang	C=C <i>stretch</i>
<b>1461,18</b>	1480-1440	Tajam	-CH <sub>2</sub> <i>bend (scissoring)</i>
<b>1378,54</b>	1395-1365	Tajam	-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <i>stretch</i>
<b>1081,83</b>	1100-1050	Sedang	C-O alkohol sekunder
<b>968,25</b>			
<b>826,20</b>	995-650	Sedang	=C-H siklik <i>bend</i>
<b>668,96</b>			

Sumber : Sulistiyani (2019)

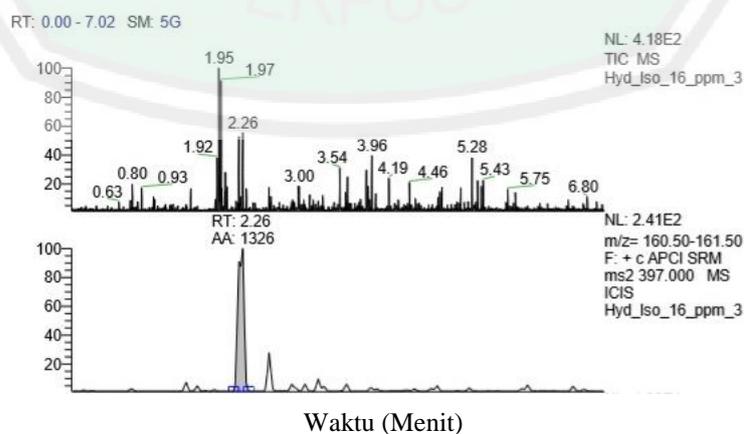
Hasil identifikasi steroid yang telah dilakukan Sulistiyani (2019) menunjukkan bahwa isolat 16 ekstrak n-heksana memiliki serapan melebar pada  $3463,94 \text{ cm}^{-1}$  yang diduga adalah serapan ulur (*stretching*) dari gugus hidroksil H. Serapan pada  $2924,33 \text{ cm}^{-1}$  merupakan serapan ulur (*stretching*) -CH<sub>2</sub>- asimetri, serta terdapat serapan ulur (*stretching*) -CH<sub>2</sub>- simetri pada panjang gelombang  $2854,07 \text{ cm}^{-1}$ . Serapan pada  $1650,24 \text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya uluran (*stretching*)

C=C alkena tidak konjugasi ( $1680-1620\text{ cm}^{-1}$ ), dugaan ini diperkuat dengan adanya serapan pada bilangan gelombang  $968,25$ ,  $826,20$ ,  $668,96\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya =C-H siklik *bend*. Serapan pada  $1461,18\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan serapan tekuk  $-\text{CH}_2$  (*scissoring*), dan pada  $1378,54\text{ cm}^{-1}$  adalah serapan ulur  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ . Serapan panjang gelombang  $1081,83\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan C-O alkohol sekunder.

Hasil spektrum inframerah dari Gambar 4.7 dan Gambar 4.8 menunjukkan bahwa memiliki serapan gugus fungsi yang hampir sama. Adapun gugus fungsinya yaitu O-H, C=C, dan  $-\text{CH}_2$ , sedangkan gugus fungsi yang menjadi ciri khas dari isolat steroid pada penelitian ini terdapat pada serapan  $2958,771\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan  $\text{CH}_3$  *stretching* gugus karbonil C=O untuk ester ( $1731\text{ cm}^{-1}$ ).

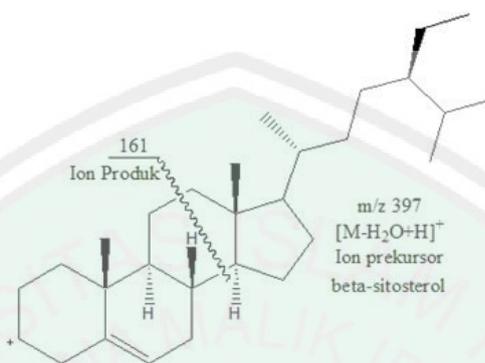
#### 4.8.3 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan LC-MS/MS

Identifikasi dilakukan pada isolat steroid yang didapat dari pemisahan menggunakan kromatografi lapis tipis. LC-MS/MS merupakan salah satu alat yang dapat memisahkan senyawa berdasarkan berat dan struktur molekul, serta distribusi kepolarannya terhadap fasa diam dan fasa gerak yang digunakan. Hasil identifikasi isolat steroid berupa kromatogram disajikan pada Gambar 4.9.



Gambar 4.9 Kromatogram LC-MS/MS isolat steroid *Hydrilla verticillata*

Berdasarkan Gambar 4.9 dalam isolat steroid *Hydrilla verticillata* hanya menghasilkan satu spektra senyawa yaitu senyawa  $\beta$ -sitosterol. Sedangkan, puncak-puncak yang terdapat di sebelah puncak senyawa target adalah *noise*.



Gambar 4.10 Struktur ion prekursor dan ion produk (Khalaf dkk., 2011)

Senyawa steroid saat diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS berada pada kondisi ionisasi, sehingga senyawa target akan melepaskan molekul air pada saat terprotonasi (Mo *et al.*, 2013) sehingga yang terdeteksi berbentuk  $[M-H_2O+H]^+$  atau ion prekursor, dan hasil fragmentasi dari ion prekursor adalah ion produk dengan nilai  $m/z$  yang lebih kecil (Khalaf dkk., 2011). Dugaan jenis steroid hasil identifikasi LC-MS/MS berdasarkan waktu retensi dan nilai  $m/z$  yang terdapat pada Tabel 4.6

Tabel 4.6 Hasil identifikasi LC-MS/MS isolat steroid *Hydrilla verticillata*

Jenis Steroid	Waktu Retensi (Menit)	Massa ( $m/z$ )				Kelimpahan
		M	M-H <sub>2</sub> O	Ion Prekursor	Ion Produk	
$\beta$ -sitosterol	2, 26	414	396	397	160, 5 – 161, 5	1326

Tabel 4.6 menunjukkan kelimpahan, kepolaran dan berat molekul senyawa pada isolat steroid *Hydrilla verticillata*. Senyawa  $\beta$ -sitosterol memiliki kelimpahan sebesar 1326. Nilai kelimpahan diperoleh dari nilai luas area atau *Automatic Area*

(AA). Berat molekul senyawa  $\beta$ -sitosterol sebesar 397 m/z. Hasil tersebut juga memiliki kemiripan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Azah (2019), yang berhasil mengidentifikasi dua senyawa golongan steroid yang diantaranya adalah  $\beta$ -sitosterol dari isolat steroid ekstrak *Hydrilla verticillata* dengan nilai m/z sebesar 397.

Berdasarkan hasil identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR yang didukung dengan LC-MS/MS, isolat steroid mengandung satu jenis steroid yaitu  $\beta$ -sitosterol. Hasil identifikasi menggunakan FTIR terdapat serapan gugus geminal dimetil pada bilangan gelombang  $1460\text{ cm}^{-1}$  dan  $1383,5\text{ cm}^{-1}$ , gugus geminal dimetil ini merupakan serapan khas dari senyawa steroid dan triterpenoid. Hasil identifikasi menggunakan FTIR ini didukung dengan identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang menunjukkan pada panjang gelombang 203 nm merupakan serapan dari steroid  $\beta$ -sitosterol. Untuk memperkuat dugaan jenis senyawa steroid yang terdapat dalam isolat steroid *Hydrilla verticillata* dilakukan identifikasi dengan menggunakan LC-MS/MS. Hasil dari identifikasi menggunakan LC-MS/MS menunjukkan bahwa terdapat satu jenis steroid yaitu  $\beta$ -sitosterol dengan kelimpahan 1326.



## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa,

1. Pemisahan steroid fraksi n-heksana pada *Hydrilla verticillata* menggunakan kromatografi lapis tipis dengan variasi eluen n-heksana dan etil asetat. Pemisahan yang terbaik untuk memisahkan steroid menggunakan KLT analitik adalah perbandingan eluen 4:1 dengan 12 spot.
2. Pemisahan steroid menggunakan KLT preparatif menghasilkan 19 spot dengan 1 spot steroid.
3. Aktivitas antioksidan isolat steroid hasil pemisahan dengan KLT preparatif dari *Hydrilla verticillata* menghasilkan  $EC_{50}$  5,109 ppm yang menunjukkan aktivitas antioksidannya sangat kuat.

#### **5.2 Saran**

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai metode pemisahan senyawa steroid pada *Hydrilla verticillata* agar dihasilkan isolat yang lebih maksimal seperti menggunakan kromatografi kolom.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adhiatama, I., Zainudin, M., Rokhati, N. 2012. Hidrolisis Kitosan Menggunakan Katalis Asam Klorida (HCl). *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. 1(1): 245-251.
- Afif, S., Fasya, A. G., Barizi, A., Rachmawati, A., 2013. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Alga Merah *Eucheuma cottoni* dari Perairan Sumenep Madura. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Agilent Technologies. 2011. Agilent LC-MS Primer. U.S.A 5988-2045EN.
- Al-Jazairi, S. A. 2009. *Tafsir Al-Aitsar Jilid 7*. Jakarta: Darus Sunah.
- Alsuhendra. 2004. Daya Anti-Aterosklerosis Zn-Klorofil Turunan Klorofil dari Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) pada Kelinci Percobaan. *Disertasi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Anggraeni, O.N., A. Ghanaim F., Munirul., A. Hanapi. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* *ALCHEMY*. Vol. 3, No.2: 173-188
- Aprelia, F., dan Suyatno. 2013. Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etil Asetat Tumbuhan Paku *Christella arida* dan Uji Pendahuluan Sebagai Antikanker. *UNESA Journal of Chemistry*, 2(3): 93-99.
- Arindah, D. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Golongan Senyawa Antioksidan pada Daging Buah Pepino (*Solonum muricatum* Aiton) yang Berpotensi sebagai Antioksidan. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Astuti, M.D., Abdi, M., dan Evi, M.K. 2004. Isolasi Steroid dari Fraksi n-Heksana Batang Bajakah Tampala (*Spatholobus littoralis* Hassk.). 2014. *Prosiding Seminar Nasional Kimia*. Surabaya: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya. ISBN : 978-602-0951-00-3.
- Atun, S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Konservasi Cagar Budaya Borobudur*. Volume 8, Nomor 2. 53 – 61.
- Azah, S. N. 2019. Uji Toksisitas dan Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLTP Ekstrak n-Heksana dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata* Menggunakan UV-Vis dan LC-MS/MS. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana

Malik Ibrahim Malang.

- Azizah, L. N. 2016. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Baderos, A. 2017. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan Identifikasi Menggunakan LC-MS. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Bariyyah, S.K., A. Ghanaim F., Munirul A., dan A. Hanapi. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Byju, K., Anuradha, V., Rosmine, E., Kumar, N. C., & Nair, S. M. 2013. Chemical Characterization of The Lipophilic Extract of *Hydrilla verticillata*: A Widely Spread Aquatic Weed. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22(3), 304–311.
- Cahyadi, W. 2006. *Kedelai Khasiat dan Teknologi*. Bumi Aksara. Bandung
- Das, B., Pal, D., & Haldar, A. 2015. Pharmacognostical and Physiochemical Study of the Aquatic Weed *Hydrilla verticillata* (L.F) Royale Known as Nutrient Power House. *International Journal of Research in Pharmacy and Science*. 5 (1): 1-5.
- Day, Jr., R.A. dan Underwood, A.L. 1999. *Analisis Kimia Kuantitatif (terjemahan Pudjaatmaka, A.H.)*. Jakarta: Penerbit Airlangga.
- Diastuti, H. dan Warsinah. 2010. Identifikasi Senyawa Antikanker dari Ekstrak Kloroform Kulit Batang *Rhizopora mucronata*. *Majalah Farmasi Indonesia*, 21(4), 266 -271.
- Diaz, B C, A. Segura Carretero, A. Fernandez-Gutierrez, A. Belmonte Vega, A. Garrido Frenich, J.L. Martinez Vidal, J. Duran Martos. 2007. Separation and Determination of Sterol in Olive Oil by HPLC-MS. *Food Chemistry*. 593 – 598.
- Dukomalamo, I., Sangi, M. S. dan Rorong, J. A. 2016. Analisis Senyawa Toksik Tepung Pelepah Batang Aren (*Arenga Pinnata*) dengan Spektroskopi UV-Vis dan Inframerah. *Jurnal MIPA online*. 5 (1). Hal. 54-59.
- Gandjar, I. G dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

- Goltenboth, F., Timotius, K.H., Milan, P.P., & Margraf, J. 2012. *Ekologi Asia Tenggara*. Jakarta: Salemba Teknika
- Guenther, E. 1987. *Minyak Atsiri Jilid I (Terjemahan)*. Jakarta : UI Press. Hal. 44-484.
- Guenther, E. 2006. *Minyak Atsiri*. Jakarta: Universitas Jakarta.
- Gunawan, I. W. G. 2008. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpenoid yang Aktif Antibakteri pada Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn). *Jurnal Kimia*. Vol. 2 No. 1, hal: 31 – 39.
- Hafiz, M. N. 2017. Uji Toksisitas Ekstrak Metanol, Kloroform dan n-Heksana *Hydrilla verticillata* (L.f) Royle Dari Danau Ranu Kab. Pasuruan Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Halimah, N. 2010. Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn.) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi* Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hanani, E., M. Abdul dan Ryany, S. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia* sp. Dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. II (3): 127-133.
- Handoko, D. S. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis. *SIGMA: Jurnal Sains dan Teknologi*, 9(1).
- Hasanah, F. 2017. Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Etanol, Etil Asetat dan Petroleum Eter *Hydrilla Verticillata* (L.F) Royle Dari Danau Ranu Kab. Pasuruan Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hayati, E. K., Jannah, A., dan Ningsih, R. 2012. Identifikasi Senyawa dan Aktivitas Antimalaria In Vivo Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting-Anting (*Acalypha Indica* Linn.). *Molekul*, Vol. 7. No. 1. Hal: 20-32.
- Herrera Environmental Consultants. 2011. *Pipe and Lucerne Lakes – Hydrilla verticillata and Aquatic Vegetation Surveys 2010: Final Report*. King Country Department of Natural Resources and Parks, Olympia, WA.
- Hidajat, B. 2005. Penggunaan Antioksidan pada Anak. *Artikel Kimia*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Ikfi, S. 2017. Uji Antioksidan Ekstrak Metanol, Kloroform dan n-Heksana *Hyrilla verticillata* (L.f) Royle dari Danau Ranu Kab. Pasuruan Menggunakan Metode DPPH (1,1 –diphenyl-2-picrylhydrazyl). *Skripsi*. Malang:

Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Imamah, N., Fasya, A. G., Nasichuddin, A., & Adi, K.A. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasinya Menggunakan Spektrofotometer FTIR. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ionita P. 2005. Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen active species. *Chem. Pap*, 59: 11-16.
- Jaelani, S.A.Q. 2011. *Tafsir Al-Jaelani*. Terjemahan oleh Abdul, H. Bekasih: PT. Sahara Intisains.
- Julyasih, S.M, I.G.P Wirawan, W.S. Harijani, W. Widajati. 2009. Aktivitas Antioksidan Beberapa Jenis Rumput Laut (*seaweeds*) Komersial di Bali. *Seminar Nasional*. Fakultas Pertanian dan LPPM UPN "Veteran" Jawa Timur.
- Kensav, M., dan Neelamegam, R. 2015. Preliminary Phytochemical Analysis of *Hydrilla verticillata (L.F) Royle*. Collected from Polluted and Inpolluted Water Sources. *International Journal of informative & futuristic research*. Vol.3, no.3.
- Khalaf, I., Corciovia, A., Vlase, L., Ivanescu, B., Lazar, D. 2011. LC/MS Analysis of Sterolic Compound from *Glycyrrhiza glabra*. *Journal STUDIA UBB CHEMIA*, 3(1): 97-102.
- Khoiriyah, S. Hanapi, A., dan Fasya, A. G. 2014. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat, Kloroform dan Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga Coklat *Sargassum vulgare* dari Pantai Kapong Pamekasan Madura. *ALCHEMY*. Vol. 3 No. 2. Hal 133-144.
- Krisna, I. G. A. P. S. A., Santi, S. R., dan Rustini, N. L. 2014. Senyawa Steroid Pada Daun Gayam (*Inocarpus fagiferus Fobs*) dan Aktvitasnya sebagai Antioksidan Terhadap Difenilpikril Hidrazil (DPPH). *Jurnal Kimia*, 8(2): 251-256.
- Kristanti, A. N. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Kuntorini, E.M. dan M.D. Astuti. 2010. Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bulbus Bawang Dayak (*Eleutherine americana Merr*). *Sains dan Terapan Kimia*, Vol. 4., No. 1: 15-22.
- Kurniawan, M., Izzati, M., & Nurchayati, Y. 2010. Kandungan Klorofil, Karotenoid, dan Vitamin C pada Beberapa Spesies Tumbuhan Akuatik. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*. 18(1): 32.
- Laili, R. 2016. Uji Aktioksidan dan Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak

- Metanol Alga Merah. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida dan Alkaloida. *Karya Ilmiah* Tidak Diterbitkan. Medan: MIPA Universitas Sumatera Utara.
- Mardaneni, I. 2017. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Alga Merah *Eucheuma cottonii* Perairan Wongsorejo Banyuwangi Menggunakan Metode KLT dan LC-MS. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Mardiyah, U. 2012. Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheumaspinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Marer, P.J., dan Garvey, K.K. 2001. *Aquatic Pest Control*. USA: University of California.
- Masroh, L. F. 2010. Isolasi Senyawa Aktif Dan Uji Toksisitas Ekstrak Heksana Daun Pecut Kuda (*Stachytharpheta jamaicensis L Vahl*). *skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Michael, V. and Christoph, S. 2008. A Decade of HPLC-MS/MS In The Routine Clinical Laboratory-Goals for Further Development. *Clinical Biochemistry*. Rev, 41; 649-662.
- Mo, S., Dong, L., Hurst, W. J. dan Breemen, R. B. v. 2013. Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Springers*. Hal 949-956.
- Mohammad, A., Bhawani, S. A., dan Sharma, S. 2010. Analysis of Herbal Product by Thin-layer Chromatography. India: Aligarh Muslim University. *International Journal of Pharma and Bio Science*, 2(1): 1-50.
- Molyneux, P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarinn J. Science Technology*, 26 (2) : 211-219.
- Muharram. 2010. Isolasi dan Uji Bioaktivitas Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak N-Heksana Daun Pare (*Momordica charantia L*). *Bionature*. Vol. 11 (2). ISSN: 1411-4720. Hal 70-78.
- Mulyani M., Arifin B., dan Nurdin H., 2013. Uji Antioksidan dan Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Daun Srikaya. *Jurnal Kimia*. Universitas Andalas. Vol.2 No. 1.
- Mulyono. 2006. Membuat Reagen Kimia di Laboratorium. Jakarta: Bumi Aksara.

- Murdianto, A. R., Fachriyah, E. dan Kusriani, D. 2010. Isolasi, Identifikasi Serta Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Golongan Triterpenoid dari Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *UNDIP Chem Info*. Vol 1, No 1
- Mustofa. 2008. *Fitofarmaka*. <http://fkuii.org>. Diakses pada tanggal 8 November 2016
- Nafisah, M., Tukiran., Suyatno dan Nurul, H. 2014. Uji Skrining Fitokimia pada Ekstrak Heksana, Kloroform dan Metanol dari Tanaman Patikan Kebo. *Prosiding seminar Nasional Kimia*. ISBN: 978-602-0951-00-3
- Nihlati, I., Abdul, R., Triana, H. 2008. Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Temu Kunci [*Boesenbergia pandurata* (roxb.) Schlecht] dengan Metode Penangkapan Radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). *Skripsi* diterbitkan. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Ningsih, D. R., Zufahair. Dan Kartika, D. 2016. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder serta Uji Aktivitas Ekstrak Daun Sirsak sebagai Antibakteri. *Molekul*. Vol. 11. No. 1. Hal: 101-111.
- Nurmillah, O. Y. 2009. Kajian Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Ekstrak Biji, Kulit buah, Batang dan Daun Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.). *Skripsi* diterbitkan. Bogor : Fakultas Teknologi Pertanian IPB.
- Pal, D.K., & Nimse, S.B. 2006. Screening of The Antioxidant Activity of *Hydrilla verticillata* Plant. *Asian Journal of Chemistry*. 18(4): 3004, 3006
- Pereira, C. M. P., Nunes, C. F. P., Villeila, L. Z., Streit, N. M., Dias, D., Gomes,. 2016. Extraction of Sterols In Brown Macroalga from Antarctica and Their Identification by Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry. *Journal Appl Phycol*.
- Poedjiadi, Anna dan Supriyanti, F. M. T. 2012. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI-Press.
- Pozo, O.J., Eenoo, P.V., Deventer, K. dan Delbeke, F.T. 2008. Detection and Characterization of Anabolic Steroids in Doping Aanalysis by LC-MS. *Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 27, No. 8.
- Prabha, P., & Rajmukar, J. 2015. Research Article Phytochemical Screening and Bioactive Potential of *Hydrilla verticillata*. *Journal of chemical and Pharmaceutical Reseach*, 7(3): 1809-1815.
- Prakash, A., 2001. Antioxidant Activity. *Medallion Laboratories Analytical Progress*, 19 (2).
- Pratiwi, D. A. N. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pacar Kuku

- (*Lawsonia Inermis L* ) dan Bioautografi terhadap *Bacillus Subtilis* dan *shigella Sonnei*. *Skripsi Thesis*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Qalbi BM, A.N., Djangi, J. dan Muhaedah. 2017. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Kloroform Daun Tumbuhan Iler (*Coleus scutellarioides*, Linn, Benth). *Journal Chemica*. Vol 18. Hal: 48-55.
- Qurthubi, S. I. 2009. *Tafsir al-Qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Quthb, S. 2000. *Tafsir fi Zhilalil-Qur'an Jilid I*. Jakarta: Gema Insani Press.
- Rahayu.,dkk. 2010. Penentuan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun Ketapang (*Terminalia catappa L*) dengan Metode DPPH. *Skripsi Diterbitkan*. Semarang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro.
- Ramadhani, R. A., Kusriani, D. dan Fachriyah, E. 2013. Identifikasi dan Uji Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Etil Asetat Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis L*). *Chem Info*. Vol 1, No 1. Hal 247-255.
- Ramesh, A., Rajan, R., Sathanam, R. 2014. *Freshwater Phytopharmaceutical Compounds*: India. CRC Press Inc.
- Ratnani, R. D., Hartati, I., Anas, Y., P, D. E. dan Khilyati, D. D. D. 2015. Standarisasi Spesifik dan Non Spesifik Ekstraksi Hidrotropi Andrographolid dari Sambiloto. *Prosiding Seminar Nasional Peluang Herbal sebagai Alternatif Medicine*. ISBN: 978-602-19556-2-8. Hal: 147-155.
- Restasari, A., Kusriani, K., dan Fachriyah, E. 2002. Isolasi dan Identifikasi Fraksi Teraktif dari Ekstrak Kloroform Daun Ketapang (*Terminalia Catappa* Linn). *Skripsi Diterbitkan*. Jurusan Kimia FMIPA UNDIP Semarang.
- Robertino, I., Widyastuti, S. K. dan Setiasih, N. L. K. 2015. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor (*Moringga Oleifera*). *Indonesia Medicus Veterinus*. ISSN: 2301-7848. Hal: 71-79.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata, Bandung: ITB.
- Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis* . Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Rohman, A. dan Riyanto. 2005. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Mengkudu. *Agritech*. Vol.25. No. 3: 131-136.
- Roma, K., Kiran, S., dan Sahoo, D. 2017. Extraction and Screening of Bioactive Compounds of Some Common Hydrophyticand Wetland Plantsfrom East Singbhum. *IOSR Journal of pharmacy*. Vol. 7 no. 11.
- Sastrohamidjojo, H. 2007. *Kromatografi*. Yogyakarta: UGM Press.
- Sayuti, K., dan Yenrina, R. 2015. *Antioksidan Alami dan Sintetik. I*. Padang: Andalas University Press.

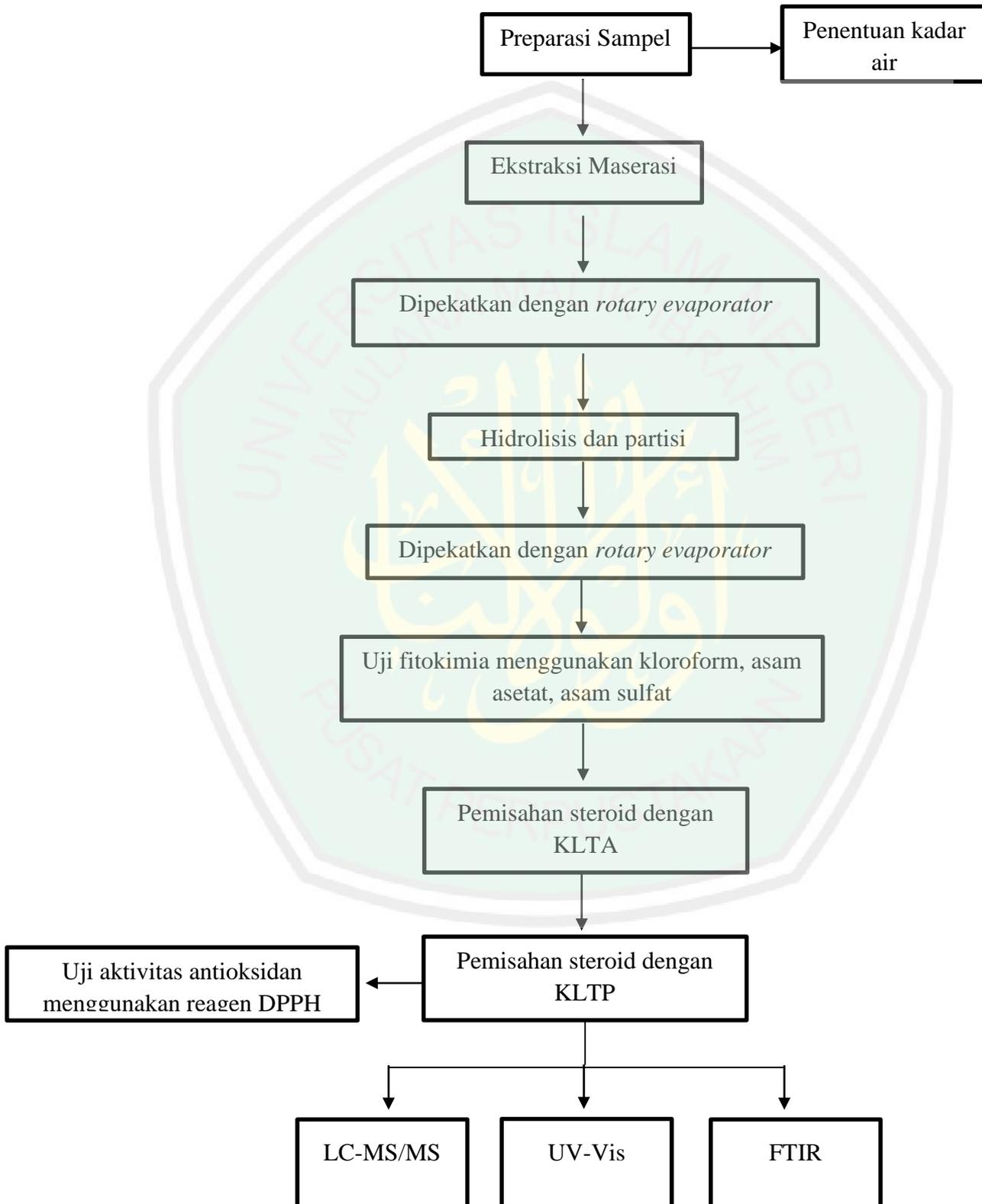
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir al-Misbah; Pesan, Kesan, dan Keserasian Alquran Vol.5*. Jakarta: Lentera Hati.
- Shofawie, A. T. 1990. Studi tentang Kemampuan Konsumsi Harian Ikan Koan (*Ctenopharyngodon idella*) terhadap Ganggang (*Hydrilla verticillata*). *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Shofiyah. 2016. Uji Toksisitas Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.* Dengan Metode BSLT dan Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer FTIR. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Silalahi, J. 2010. Analisis Kualitas Air dan Hubungannya dengan Keanekaragaman Vegetasi Akuatik di Perairan Balige Danau Toba. *Tesis*. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Skoog, DA., Holler, FJ., Nieman, TA., dan Crouch, SR. 1998. *Principles of Instrumental Analysis*. Ed ke-5. Orlando: Hourcourt Brace.
- Socrates. 1994. *Infrared Characteristic Group Frequencies -2<sup>nd</sup> Edition*. England: John Wiley and Sons Ltd.
- Sriwahyuni, I. 2010. Uji Fitokimia Ektrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha Indica* Linn) dengan Variasi Pelarut dan Uji Toksisitas Menggunakan Brine Shrimp (*Artemia salina* Leach). *Skripsi* Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Tanor, M. N. 2004. *Hydrilla verticillata* sebagai Sumber Hara pada Sistem Budidaya Kacang Tanah. *Eugenia* 10 (1) : 92-101.
- Tonius, J., Wibowo, M. A., Idiawati, N. 2016. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Steroid Fraksi n-Heksana Daun Buas-buas (*Premna s erratifolia* Linn.). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, Volume 5(1), halaman 1-7.
- Valko, M., Rhodes C. J., Moncol. J., Izakovic. M., Mazur. M. 2006. Free Radical, Metal and Antioxidant in Oxidative Stress Induced Cancer. *J Chem. Biol.* Rusia edisi 160. p.1-40.
- Vembriarto, J. 2013. *Kimia Steroid*. Malang : Universitas Negeri Malang.
- Voigt, R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi Edisi 5*, Yogyakarta: Gadjah Mada. University Press.
- Wagner. 2001. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas, Second Edition*, 359, 362, 364. New York: Springer.
- Wahyudi, J., Wibowo, W. A., Rais, Y. A., Kusumawardani, A. 2011. Pengaruh Suhu Terhadap Kadar Glukosa Terbentuk dan Konstanta Kecepatan Reaksi pada Hidrolisis Kulit Pisang. *Jurnal Pengembangan Teknologi*

*Kimia Untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia*. ISSN 1693 – 4393.

- Widya, D. W., Suryanto, D., & Desrita. 2014. Aktivitas Antimikroba Biji Teratai (*Nymphaea pubescens* L.) terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* dan Jamur *Saprolegnia sp.* *Skripsi*. Fakultas Pertanian. Universitas Sumatera Utara, Meda.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius, Yogyakarta.
- Wulandari, M. 2013. Aktivitas Antioksidan Ekstrak N-Heksana, Etil Asetat Dan Metanol Kulit Buah Jeruk Sambal (*Citrus Microcarpa Bunge*). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, Tahun 2013, Volume 2 (2), Halaman 90-94. Pontianak: Program Studi Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura.
- Xiao, Y., Wang, Y.-L., Gao, S.-X., Sun, C., & Zhou, Z.-Y. 2007. Chemical Composition of *Hydrilla Verticillata* (L. f.) Royle in Taihu Lake. *Chinese Journal of Chemistry*, 25(5), 661–665.
- Yudiati, E., Sri S., Sunarsih dan Rani A.. 2011. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Metanol dan Pigmen Kasar *Spirulina sp.* *Ilmu Kelautan*, Vol.16 o. 4: 187-192.
- Zahra, U. Muharram, dan Ilyas, A. 2013. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak n-Heksana dari Umbi Lobak. *Al-Kimia*.
- Zahro, I. M. 2011. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Triterpenoid Ekstrak n-Heksana Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn) Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Zhang, J., Tian, H. Y., Li, J., Luo, C., Ye, W. C., Jiang, W. R. 2012. Steroids with Inhibitory Activity Against the Prostate Cancer Cells and Chemical Diversity of Marine Alga *Tydemania expeditions*. *Fitoterapia*. 973-978.
- Zirconia, A., Kurniasih, N. dan Amalia, V. 2015. Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Daun Kembang Bulan (*Tithonia Diversifolia*) dengan Metode Pereaksi Geser. *Al Kimiya*. Vol 2, no 1. Hal 9-17.

## LAMPIRAN

## Lampiran 1. Rancangan penelitian



## Lampiran 2. Diagram Alir

### 1. Preparasi *Hydrilla verticillata*

*Hydrilla Verticillata*

- dicuci dengan air sampai bersih
- diiris kecil-kecil
- dikeringkan tanpa menggunakan sinar matahari
- dihaluskan sampai menjadi serbuk dengan ukuran 90 mesh

Hasil

### 2. Penentuan Kadar Air

Serbuk *Hydrilla verticillata*

- ditimbang sebanyak 2,5 gram
- dimasukkan kedalam cawan porselen yang sudah dioven
- dioven dan dikeringkan pada suhu 100-105°C selama ± 15 menit - didinginkan dalam desikator
- ditimbang kembali - diulangi sampai diperoleh berat yang konstan - dihitung dengan persamaan: Kadar air =  $\frac{b-c}{b-a} \times 100\%$

Hasil

### 3. Ekstraksi *H. verticillata*

Serbuk *H. verticillata*

- ditimbang sebanyak 50 gram
- dimasukkan ke dalam erlenmeyer
- direndam dalam 300 mL pelarut metanol selama 24 jam
- dishaker selama 3 jam dengan kecepatan 120 rpm
- disaring menggunakan corong Buchner
- diambil filtratnya
- dimaserasi kembali ampas yang diperoleh sampai diperoleh filtrat yang agak bening
- digabung ketiga filtrat

Filtrat seluruhnya

Ampas

- dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vacuum*

Ekstrak metanol

- ditimbang ekstrak pekat
- dihitung rendemen ekstrak

Hasil

#### 4. Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Ekstrak sampel

- dimasukkan kedalam tabung reaksi
- dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform
- ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat
- ditambahkan 1-2 mL asam sulfat pekat pada dinding tabung
- diamati warna yang terbentuk

Hasil

#### 5. Hidrolisis dan partisi

Ekstrak pekat metanol

- ditimbang sebanyak 2,5 gram dan dimasukkan ke beaker glass
- ditambahkan 5 mL asam klorida (HCl) 2 N
- dihidrolisis selama 1 jam menggunakan magnetik stirer hot plate pada suhu ruang

Hidrolisat

- ditambahkan natrium bikarbonat sampai pH netral
- dipartisi menggunakan 25 mL n-heksana dengan dua kali pengulangan

Ekstrak

- dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vakum*
- dialiri gas N<sub>2</sub>

Ekstrak pekat

- ditimbang
- dihitung rendemennya

Hasil

## 6. Pemisahan Senyawa menggunakan KLT analitik

Ekstrak pekat fraksi n-heksana

- ditotolkan pada jarak 1 cm pada pelat yang telah diaktifasi
- dielusi dengan menggunakan n-heksanan:etil asetat (perbandingan sampel : eluen adalah 4:1) yang telah dijenuhkan sampai tanda batas
- dihitung nilai Rfnya
- disemprot dengan reagen *Liebermann-Buchard*
- diperiksa noda menggunakan lampu uv pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm

Hasil

## 7. Pemisahan Senyawa menggunakan KLTP

Ekstrak pekat fraksi n-heksana

- digunakan plat silika gel GF<sub>254</sub> dengan ukuran 10 x 20
- ditotolkan ekstrak pekat sepanjang plat pada jarak 1 cm dari garis bawah dan 1 cm dari garis tepi
- dielusi dengan menggunakan eluen yang memberikan pemisahan terbaik
- dihentikan setelah gerakan fasa gerak sampai pada garis tepi
- diperiksa di bawah lampu UV pada panjang gelombang 366 nm
- diamati noda yang terbentuk
- disemprot dengan menggunakan reagen *libermann-buchard*

Hasil noda

- dikerok noda yang merupakan senyawa steroid
- dilarutkan dengan n-heksana
- *disentrifuge* untuk mengendapkan silika

Hasil

## 8. Uji aktivitas antioksidan terhadap DPPH

### 8.1 Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Etanol 95%

- dipipet sebanyak 4,5 mL
- ditambah larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1,5 mL
- dimasukkan ke dalam kuvet hingga penuh
- dihitung  $\lambda_{\max}$

Hasil

### 8.2 Uji antioksidan

Isolat steroid

- ditimbang 2,2 mg
- dilarutkan dengan eluen sampai 10 mL
- dipipet larutan stok 220 ppm 0,2 mL, 0,4 mL, 0,6 mL, 0,8 mL, 1 mL
- dimasukkan kedalam botol vial
- ditanda bataskan 5 mL
- diambil 3 mL dan dimasukkan ke dalam tabung vial
- ditambahkan 3 mL etanol dan 2 mL DPPH, 4 mL etanol sebagai blanko
- dihitung  $\lambda_{\max}$

Hasil

## 10. Identifikasi Golongan Senyawa Steroid dengan FTIR

Isolat

- dimasukkan 0,2 gram pellet KBr kedalam vial yang berisi isolat
- dibuat pelet
- diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR

Hasil

### 11. Identifikasi Golongan Senyawa Steroid dengan UV-Vis

Isolat

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

Hasil

### 12. Identifikasi Golongan Senyawa Steroid dengan LC-MS/MS

Isolat

- diambil beberapa cuplikan
- dilarutkan dalam pelarutnya
- diinjekkan dalam instrumen LC-MS/MS
- dijalankan instrumentasi

Hasil

### Lampiran 3. Perhitungan, Pembuatan Reagen dan Larutan

#### 3.1 Pembuatan Larutan DPPH 0,2 mM

DPPH 0,2 mM dalam 50 mL etanol Mr DPPH = 394,33 g/mol

$$\begin{aligned} \text{Mol DPPH} &= 50 \text{ mL} \times 0,2 \text{ mM} \\ &= 50 \text{ mL} \times \frac{0,2 \text{ M}}{1000} \\ &= 0,01 \text{ mmol Mg DPPH} = 0,01 \text{ mmol} \times \text{Mr DPPH} \\ &= 0,01 \text{ mmol} \times 394,33 \text{ g/mol} = 3,9433 \text{ mg} \end{aligned}$$

#### 3.2 Pembuatan Larutan Stok Isolat 16

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

Larutan stok (ppm) = 2,2 mg/L dalam 10 mL pelarutnya

$$\text{ppm} = \frac{2,2}{0,01 \text{ L}}$$

$$\text{ppm} = 220 \text{ ppm}$$

Jadi, larutan stok 220 ppm pada masing-masing ekstrak dan isolat dibuat dengan dilarutkan 2,2 mg isolat kedalam 10 mL pelarutnya.

Pembuatan Larutan 1 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 50 \text{ ppm} &= 0,01 \text{ L} \times 1 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0,01 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{50 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0,0002 \text{ L} \\ &= 0,2 \text{ mL} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan 3 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 50 \text{ ppm} &= 0,01 \text{ L} \times 3 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0,03 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{50 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0,0006 \text{ L} \\ &= 0,6 \text{ mL} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan 5 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 50 \text{ ppm} &= 0,01 \text{ L} \times 5 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0,05 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{50 \text{ ppm}} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan 2 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 50 \text{ ppm} &= 0,01 \text{ L} \times 2 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0,02 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{50 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0,0004 \text{ L} \\ &= 0,4 \text{ mL} \end{aligned}$$

Pembuatan larutan ekstrak 4 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times M_1 &= V_2 \times M_2 \\ V_1 \times 50 \text{ ppm} &= 0,01 \text{ L} \times 4 \text{ ppm} \\ V_1 &= \frac{0,04 \text{ L} \cdot \text{ppm}}{50 \text{ ppm}} \\ V_1 &= 0,0008 \text{ L} \\ &= 0,8 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}V_1 &= 0,001 L \\ &= 1 \text{ mL}\end{aligned}$$

### 3.3 Pembuatan Reagen *Lieberman-Burchard*

Kloroform = 0,5 mL

Asam asetat anhidrida = 0,5 mL

Asam sulfat pekat = 1 mL

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



## Lampiran 4. Data Pengamatan dan Perhitungan

### 4.1 Data Pengukuran Kadar Air

Berat Cawan Kosong	Ulangan Cawan				Berat Konstan (g)
	Sebelum	U1	U2	U3	
<b>Dioven</b>					
C1	44,0870	44,0833	44,0824	44,0826	44,0843
C2	41,3260	41,3219	41,3226	41,3224	41,3223
C3	54,2508	54,2487	54,2480	54,2481	54,2480

Berat Cawan + Sampel	Ulangan Cawan				Berat Konstan (g)
	Sebelum	U1	U2	U3	
<b>Dioven</b>					
C1	45,0809	45,0130	45,0126	45,0128	45,0128
C2	42,3212	42,2598	42,2597	42,2598	42,2598
C3	55,2416	55,1750	55,1755	55,1748	55,1751

#### 1. Kadar air cawan ke-1

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum di oven})-(\text{berat cawan+sampel setelah di oven})}{\text{berat sampel}} \times 100 \% \\
 &= \frac{(45,0809-45,0128) \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,0681 \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 100 \% \\
 &= 6,81 \%
 \end{aligned}$$

#### 2. Kadar air cawan ke-2

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum di oven})-(\text{berat cawan+sampel setelah di oven})}{\text{berat sampel}} \times 100 \% \\
 &= \frac{(42,3212-42,2598) \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,0614 \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 100 \% \\
 &= 6,14 \%
 \end{aligned}$$

#### 3. Kadar air cawan ke-3

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

$$= \frac{(55,2416 - 55,1751) \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,0665 \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 100 \%$$

$$= 6,65 \%$$

Kadar air kering rata-rata pada sampel *Hydrilla verticillata* adalah 6,53 %

## 4.2 Perhitungan Rendemen dan Data

### 4.2.1 Ekstrak Metanol

Berat sampel (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + ekstrak pekat (g)	Berat ekstrak pekat (g)	Rendemen (%)
100	176,06	181,20	5,14	5,14

#### ➤ Rendemen

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{5,14 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100 \% = 5,14 \% \end{aligned}$$

### 4.2.2 Hasil Partisi

Berat sampel (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + ekstrak pekat (g)	Berat ekstrak pekat (g)	Rendemen (%)
10	181,110	185,907	4,795	47,95 %

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{4,795 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times 100 \% = 47,95 \% \end{aligned}$$

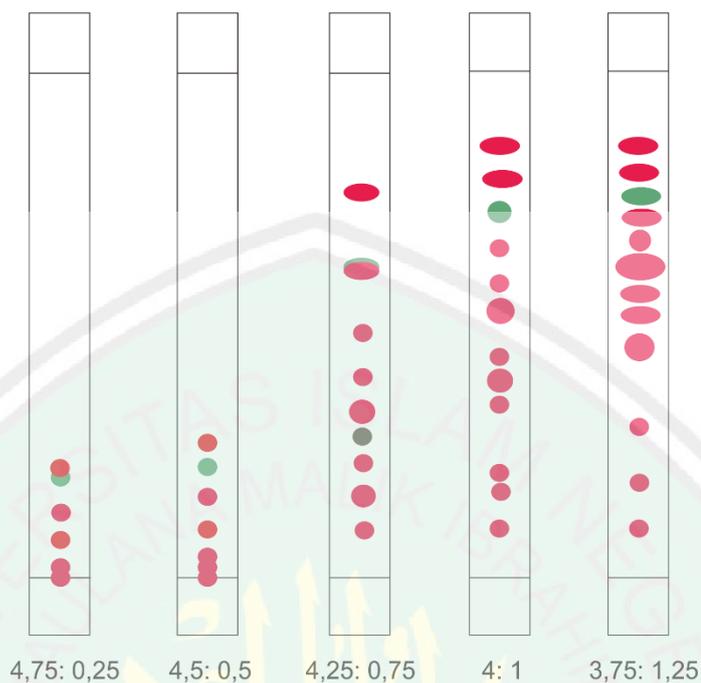
### 4.3 Hasil KLTA, KLTP dan Perhitungan Rf

#### 4.3.1 Hasil KLTA

No	Perbandingan Eluen	Jumlah spot	Rf	Resolusi	Warna	Dugaan senyawa
1	4,75: 0,25	4	0,0375	0,5	Merah	Triterpenoid
			0,1		Merah	Triterpenoid
			0,1625	0,2	Hijau	Steroid
			0,1875		Merah	Triterpenoid
2	4,5: 0,5	4	0,05	0,3	Merah	Triterpenoid
			0,0875		Merah	Triterpenoid
			0,2125	0,3	Hijau	Steroid
			0,25		Merah	Triterpenoid
3	4,25: 0,75	9	0,075	0,6	Merah	Triterpenoid
			0,15		Merah	Triterpenoid
			0,2	0,4	Merah	Triterpenoid
			0,25		Merah	Triterpenoid
			0,2875	0,3	Merah	Triterpenoid
			0,35		Merah	Triterpenoid
			0,425	0,6	Merah	Triterpenoid
			0,6		Merah	Triterpenoid
			0,7625	1,4	Hijau	Steroid
			0,7625	1,3	Merah	Triterpenoid
4	4:1	12	0,1125	0,7	Merah	Triterpenoid
			0,2		Merah	Triterpenoid
			0,25	0,4	Merah	Triterpenoid
				0,9		

			0,3625	0,3	Merah	Triterpenoid
			0,4	0,6	Merah	Triterpenoid
			0,475	0,7	Merah	Triterpenoid
			0,5625	0,5	Merah	Triterpenoid
			0,625	0,4	Merah	Triterpenoid
			0,675	0,4	Merah	Triterpenoid
			0,725	0,5	Hijau	Steroid
			0,7875	0,6	Merah	Triterpenoid
			0,8625		Merah	Triterpenoid
			0,1625	0,7	Merah	Triterpenoid
			0,25	0,6	Merah	Triterpenoid
			0,325	1,3	Merah	Triterpenoid
			0,4875	0,55	Merah	Triterpenoid
			0,55625	0,25	Merah	Triterpenoid
5	3,75: 0,25	12	0,5875	0,4	Merah	Triterpenoid
			0,6375	0,5	Merah	Triterpenoid
			0,7	0,3	Merah	Triterpenoid
			0,7375	0,3	Merah	Triterpenoid
			0,775	0,3	Hijau	Steroid
			0,8125	0,4	Merah	Triterpenoid
			0,8625		Merah	Triterpenoid

Menggunakan lampu UV 366 nm

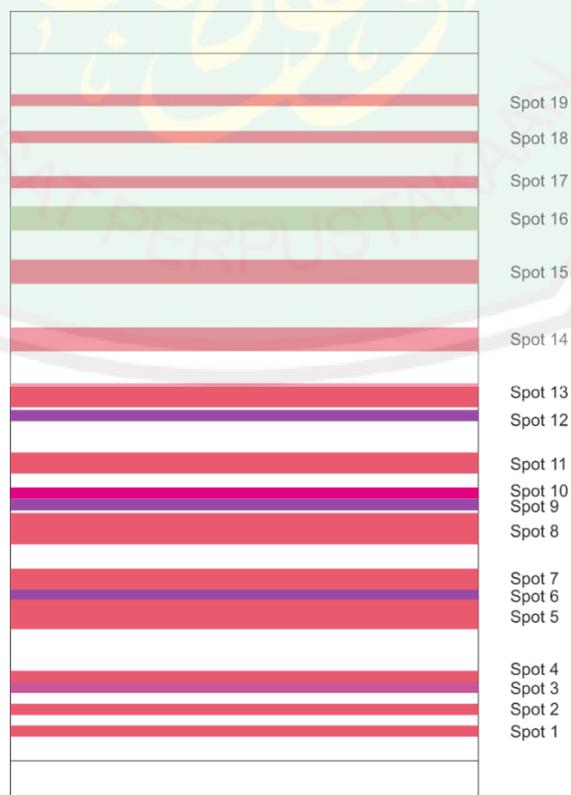


## 4.3.2 Hasil KLTP

No	Nilai Rf	Resolusi	Warna	Dugaan Senyawa
1	0,067	0,5	Merah	Triterpenoid
2	0,094	0,5	Merah	Triterpenoid
3	0,12	1,1	Merah	Triterpenoid
4	0,183	0,5	Merah	Triterpenoid
5	0,21	0,5	Merah	Triterpenoid
6	0,239	0,8	Merah	Triterpenoid
7	0,283	0,5	Merah	Triterpenoid
8	0,31	0,9	Merah	Triterpenoid
9	0,36	0,4	Merah	Triterpenoid

10	0,383	0,4	Merah	Triterpenoid
11	0,4	1	Merah	Triterpenoid
12	0,461	0,9	Merah	Triterpenoid
13	0,51	0,8	Merah	Triterpenoid
14	0,55	1,9	Merah	Triterpenoid
15	0,66	1,7	Merah	Triterpenoid
16	0,75	0,8	Hijau	Steroid
17	0,8	1	Merah	Triterpenoid
18	0,856	1,1	Merah	Triterpenoid
19	0,917		Merah	Triterpenoid

Menggunakan lampu UV 366 nm



#### 4.4 Pengujian Aktivitas Antioksidan

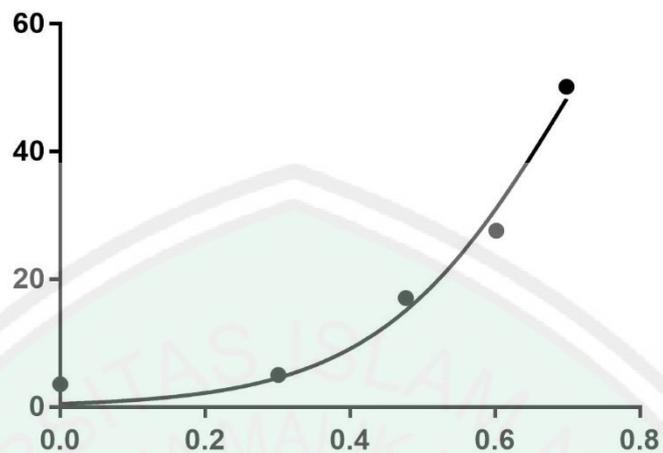
Konsentrasi	Absorbansi kontrol	Absorbansi sampel	Mean	% Aktivitas Antioksidan
1 ppm	0,1167	0,1124	0,1125	3,59 %
		0,1127		
		0,1125		
2 ppm	0,4052	0,3847	0,3849	5,009 %
		0,3847		
		0,3855		
3ppm	0,1173	0,0974	0,0973	17,05 %
		0,0974		
		0,0973		
4 ppm	0,7741	0,5598	0,5601	27,6 %
		0,5598		
		0,5607		
5 ppm	0,7774	0,3871	0,3875	50,154 %
		0,3875		
		0,3878		

#### Nonlin fit of Transform of Exponential decay: Table of results

	Data Set-A	Global (shared)
Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		Different curve for each data set
Alternative hypothesis		set
P value		One curve for all data sets
Conclusion (alpha = 0.05)		
Preferred model		Models have the same DF
F (DFn, DFd)		Different curve for each data set
Different curve for each data set		set
Best-fit values		
Bottom	= 0	
Top	= 100	
LogEC50	0.7084	
HillSlope	3.241	
<b>EC50</b>	<b>5.109</b>	

Span	= 100	
Std. Error		
LogEC50	0.01614	
HillSlope	0.4473	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	0.6674 to 0.7856	
HillSlope	1.978 to 5.162	
EC50	4.649 to 6.104	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	
R square	0.9798	
Absolute Sum of Squares	29.68	
Sy.x	3.145	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
One curve for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0	
Top	= 100	
LogEC50	0.7084	0.7084
HillSlope	3.241	3.241
EC50	5.109	5.109
Span	= 100	
Std. Error		
LogEC50	0.01614	0.01614
HillSlope	0.4473	0.4473
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	0.6674 to 0.7856	0.6674 to 0.7856
HillSlope	1.978 to 5.162	1.978 to 5.162
EC50	4.649 to 6.104	4.649 to 6.104
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R square	0.9798	0.9798
Absolute Sum of Squares	29.68	29.68
Sy.x		3.145
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
# of X values	15	
# Y values analyzed	5	

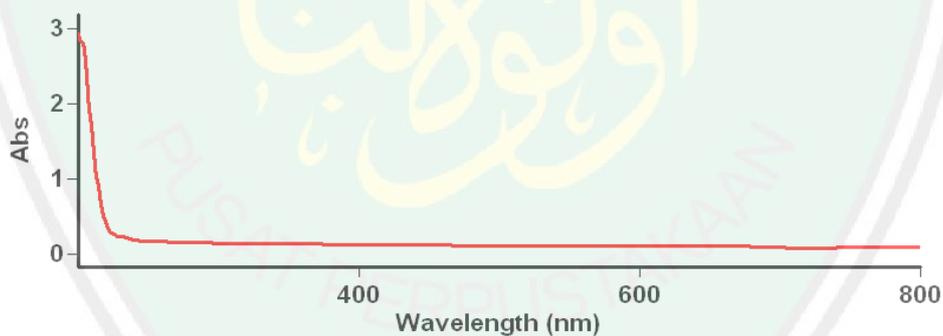
### Transform of Exponential decay



Hasil Identifikasi Menggunakan UV-Vis Isolat n-Heksana

## Lamdha Maks n-Heksana

Tanggal Analisa : 18 Maret 2019



## Scan Analysis Report

Report Time : Mon 18 Mar 02:32:29 PM 2019

Method:

Batch: D:\Bagas\Lamdha Maks n-Heksana (18-03-2019).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: n-Heksana

Collection Time

3/18/2019 2:32:33 PM

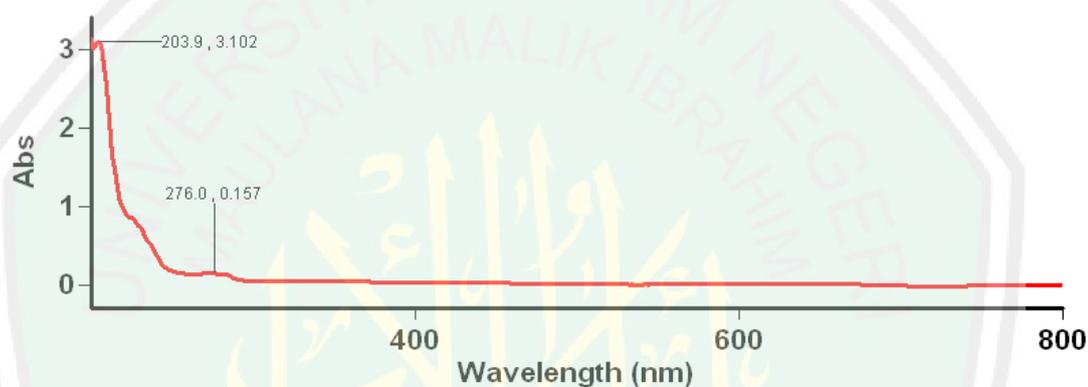
## Peak Table

Peak Style            Peaks  
Peak Threshold        0.0100  
Range                  800.1nm to 200.0nm

No peak found above threshold

## Lamdha Maks Steroid

Tanggal Analisa : 18 Maret 2019



## Scan Analysis Report

Report Time : Mon 18 Mar 02:34:44 PM 2019

Method:

Batch: D:\Bagas\Lamdha Maks Steroid (18-03-2019).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

### Sample Name: Steroid

Collection Time        3/18/2019 2:35:07 PM

## Peak Table

Peak Style            Peaks  
Peak Threshold        0.0100

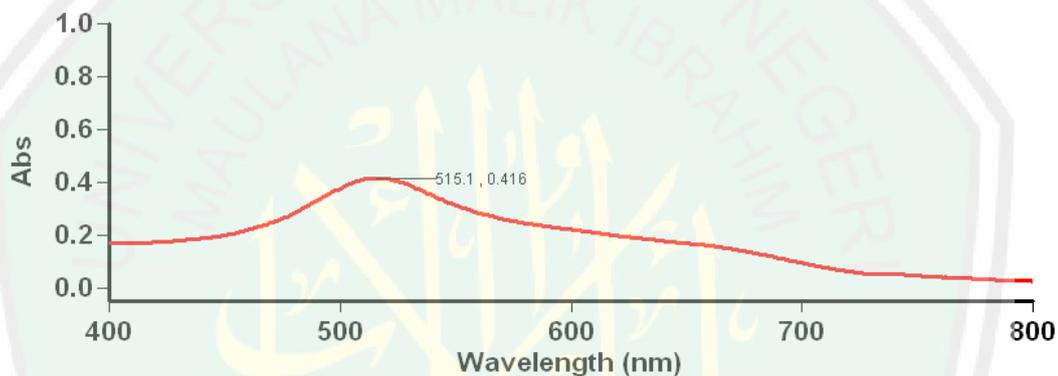
Range 800.1nm to 200.0nm

Wavelength (nm) Abs

276.0	0.157
203.9	3.102

## Lamdha Maks DPPH

Tanggal Analisa : 21 Maret 2019



## Scan Analysis Report

Report Time : Thu 21 Mar 02:52:29 PM 2019

Method:

Batch: D:\Bagas\Lamdha Maks DPPH (21-03-2019).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

### Sample Name: DPPH

Collection Time 3/21/2019 2:52:59 PM

Peak Table

Peak Style Peaks

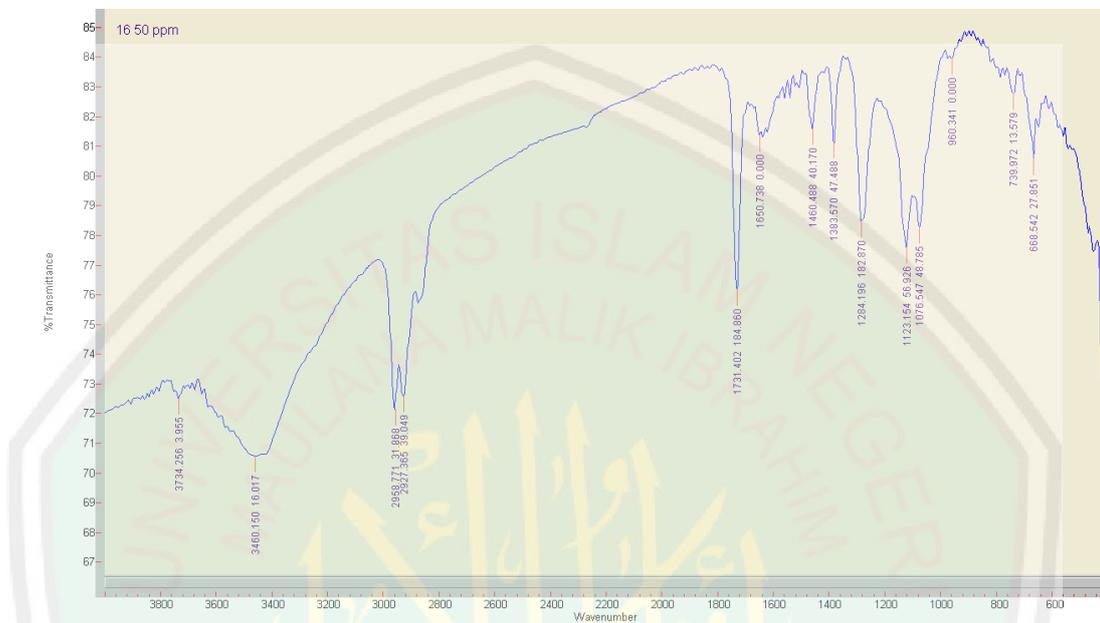
Peak Threshold 0.0100

Range 800.0nm to 400.0nm

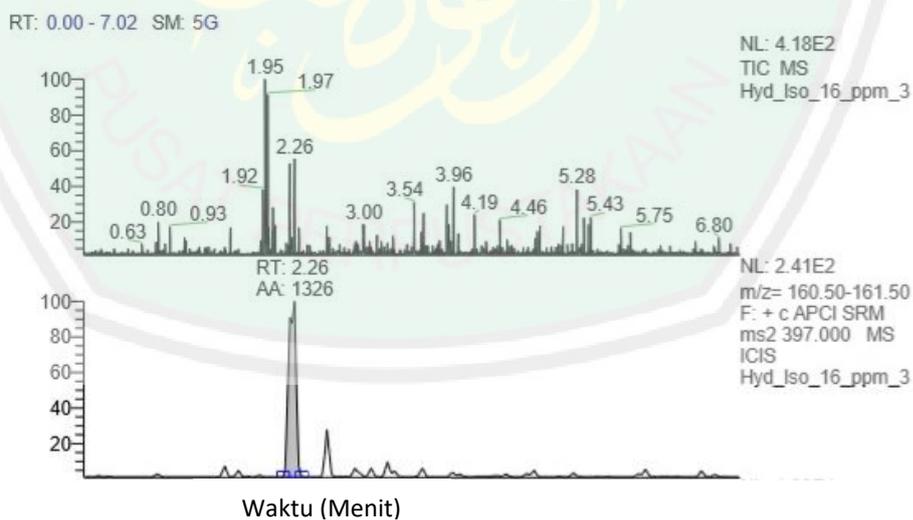
Wavelength (nm) Abs

515.1 0.416

**4.6 Hasil Identifikasi Menggunakan FTIR Isolat n-Heksana**



**4.7 Hasil Identifikasi Menggunakan LC-MS/MS Isolat n-Heksana**



4.8 Dokumentasi Penelitian



*H. verticillata* Basah



*H. verticillata* Kering



Serbuk *H. verticillata*



Penimbangan cawan kosong



Penimbangan 1 g sampel



Berat konstan kadar air



Penambahan metanol saat Ekstraksi



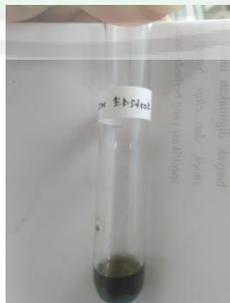
sampel+metanol dishaker selama 24 jam per 1x ekstraksi



penyaringan hasil shaker



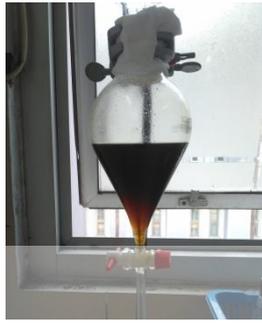
Ekstrak pekat metanol



uji fitokimia steroid (+)



Hidrolisis dengan HCl 2 N



Partisi dengan n-heksana



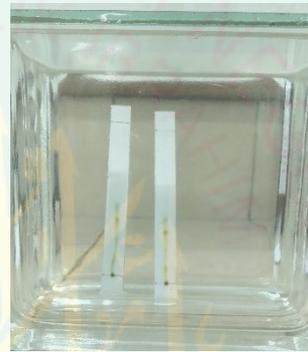
Fraksi n-heksana pekat



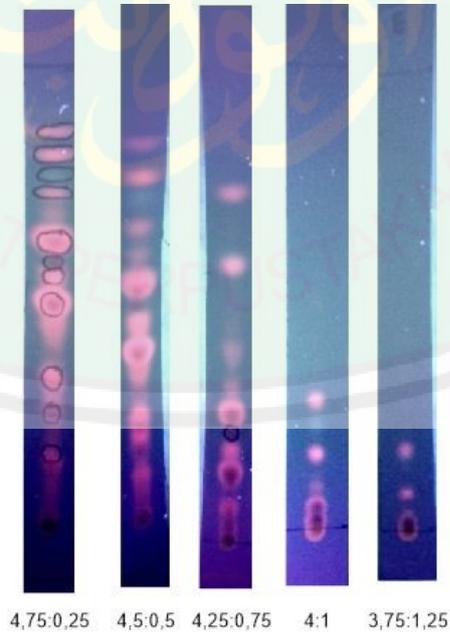
Uji fitokimia steroid (+)



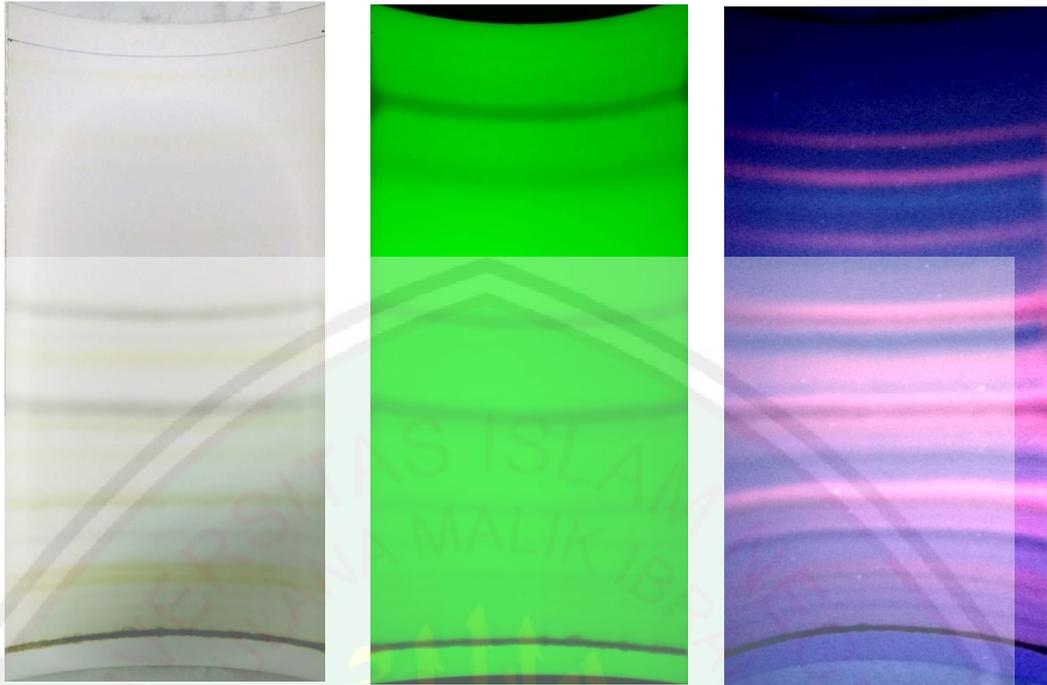
Sampel 4000 ppm



Proses elusi KLTA



KLTA setelah elusi

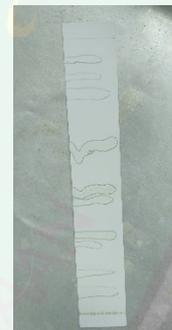


Hasil dari KLTP



sebelum disemprot

*Liebermann-Burchard*



setelah disemprot

*Liebermann-Burchard*



spot KLTP setelah dikerok



Proses vortex



setelah di vortex dan di sentrifuge



Isolat hasil KLTP



preparasi uji antioksidan



Sebelum ditambahkan DPPH



Setelah ditambahkan DPPH

