

**UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI
KOLOM FRAKSI n-HEKSANA *Hydrilla verticillata***

SKRIPSI

Oleh:
MAWADDAH
NIM. 15630032



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

**UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI
KOLOM FRAKSI n-HEKSANA *Hydrilla verticillata***

SKRIPSI

Oleh:
MAWADDAH
NIM. 15630032

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 TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI
KOLOM FRAKSI n-HEKSANA *Hydrilla verticillata***

SKRIPSI

Oleh:
MAWADDAH
NIM. 15630032

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 17 Juni 2019

Pembimbing I

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

Pembimbing II

Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I
NIDT. 19890113 20180201 1 244

Mengetahui,
Ketua Jurusan



Elkhayati Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

**UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI
KOLOM FRAKSI n-HEKSANA *Hydrilla verticillata***

SKRIPSI

Oleh:
MAWADDAH
NIM. 15630032

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 17 Juni 2019

Penguji Utama : Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 2 010

Ketua Penguji : Dewi Yuliani, M.Si
NIDT. 19880711 20160801 2 067

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

Anggota Penguji : Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I
NIDT. 19890113 20180201 1 244

(.....)

(.....)

(.....)

(.....)

Mengesahkan,
Ketua Jurusan



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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Mawaddah

NIM : 15630032

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom
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 mencamtkumkan 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



Mawaddah
NIM. 15630032

MOTTO

*Bersabar dan nikmati semua prosesnya, karena semua akan indah ketika Allah
sudah berikan pada waktunya*

-mh-



PERSEMBAHAN

Alhamdulillah dengan mengucapkan rasa syukur yang tiada terhingga, skripsi ini saya persembahkan kepada:

“Orang terkasih yaitu bapak M.Imron, Ibu khoiriyah, mbak Sofiyah, mas Halim dan mas Ahmad Yani”.

Terimakasih yang tiada terhingga, karena tanpa dukungan kalian mungkin saya belum berada pada kondisi yang sekarang ini.



KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, segala puji selalu terpanjatkan kepada Allah SWT yang senantiasa melimpahkan rahmat dan kasih sayangNya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi ini dengan judul “**UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI n-HEKSANA *Hydrilla verticillata***”. Shalawat serta salam semoga tetap terlimpah kepada qudwah hasanah kita, Rasulullah SAW Sang Pembawa berita gembira dan pembawa kebenaran serta penyempurna akhlak. Seiring dengan terselesaikannya penyusunan laporan skripsi ini dengan penuh rasa hormat, kesungguhan, dan kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Orang tua saya tercinta yang selalu memberikan do'a, nasihat, dan semangat, serta kepada saudara-saudari saya yang selalu memberi dukungan moril maupun materi serta motivasi agar terus bisa mengukir prestasi.
2. Bapak Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si selaku pembimbing penelitian, terimakasih atas segala ilmu yang diberikan sampai terselesainya penulisan skripsi ini.
6. Ibu Dewi Yuliani, M.Si selaku konsultan penelitian, terimakasih atas segala ilmu yang diberikan sampai terselesainya penulisan skripsi ini.

7. Seluruh dosen dan laboran jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu pengetahuan dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal.
8. Teman-teman Kimia A 2015, khususnya tim *Hydrilla*, organik *squad*, teman-teman PPP. Al-Hikmah Al-Fathimiyyah serta semua pihak yang telah memberikan motivasi dan dukungan selama penelitian dan penyusunan laporan ini.

Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat kepada para pembaca. Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih banyak kekurangan, semoga Allah SWT selalu memberikan kita hidayah dan taufiqNya.

Aamiin.

Malang, 21 Juni 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
MOTTO	v
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
المخلص.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.5 Batasan Masalah.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Hydrilla verticillata</i>	7
2.2 Kandungan <i>Hydrilla verticillata</i>	8
2.3 Steroid	9
2.4 Ekstraksi Maserasi <i>H. verticillata</i>	10
2.5 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak pekat metanol	11
2.6 Isolasi Senyawa Steroid Menggunakan Kromatografi Kolom.....	12
2.7 Uji Toksisitas dengan <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT)	13
2.8 Identifikasi Senyawa Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.....	15
2.9 Identifikasi Senyawa Menggunakan Spektrofotometer FT-IR	16
2.10 Identifikasi Senyawa Menggunakan LC-MS/MS	17
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	18
3.2 Alat dan Bahan	18
3.2.1 Alat	18
3.2.2 Bahan	18
3.3 Tahapan Penelitian	19
3.4 Cara Kerja.....	19
3.4.1 Preparasi Sampel	19
3.4.2 Analisis Kadar Air Secara Thermogravimetri	19
3.4.3 Ekstraksi Maserasi <i>Hydrilla verticillata</i>	20

3.4.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol	20
3.4.5 Uji Steroid Ekstrak Metanol dan Fraksi n-heksana	21
3.4.6 Pemisahan senyawa steroid dengan Kromatografi Kolom	21
3.4.6.1 Pembuatan Bubur Silika	21
3.4.6.2 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom	22
3.4.7 Monitoring Hasil Isolat Steroid dengan KLTA	22
3.4.8 Uji Toksisitas Fraksi n-Heksana dan Isolat B	23
3.4.9 Identifikasi Senyawa Menggunakan UV-Vis	24
3.4.10 Identifikasi Senyawa Menggunakan FT-IR	25
3.4.11 Identifikasi Senyawa Menggunakan LC-MS/MS	25

BAB IV PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel	26
4.2 Analisis Kadar Air	26
4.3 Ekstraksi Maserasi	27
4.4 Hidrolisis dan Partisi	27
4.5 Uji Steroid Ekstrak Metanol dan Fraksi n-heksana	28
4.6 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom	30
4.7 Monitoring Hasil Kromatografi Kolom dengan KLTA	30
4.8 Uji Toksisitas Fraksi n-Heksana dan Isolat Hasil Kromatografi Kolom	33
4.9 Identifikasi Senyawa dengan UV-Vis	36
4.10 Identifikasi Senyawa dengan FT-IR	37
4.11 Identifikasi Senyawa dengan LC-MS/MS	38
4.12 Pemanfaatan <i>Hydrilla verticillata</i> dalam Prespektif Islam	42
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Hydrilla verticillata</i>	7
Gambar 2.2 Struktur Dasar Steroid	9
Gambar 2.3 Dugaan Reaksi Hidrolisis Ikatan <i>O</i> -glikosida	12
Gambar 2.4 Larva Udang <i>Artemia salina</i> L.	14
Gambar 4.1 Dugaan Reaksi Liebermann Burchard	29
Gambar 4.2 Model Regresi Linier Probit Uji Fraksi n-Heksana	34
Gambar 4.3 Model Regresi Linier Probit Uji Isolat B	35
Gambar 4.4 Hasil Spektra UV-Vis Fraksi n-Heksana dan Isolat B	36
Gambar 4.5 Hasil Spektra FTIR Fraksi n-Heksana dan Isolat B	37
Gambar 4.6 Hasil Identifikasi LC-MS/MS Fraksi n-Heksana	40
Gambar 4.7 Hasil Identifikasi LC-MS/MS Isolat B Hasil Kromatografi Kolom ..	41
Gambar 4.8 Dugaan Fragmentasi Senyawa Steroid	42



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan Nutrisi pada <i>H. verticillata</i>	8
Tabel 2.2 Nilai LC ₅₀ Ekstrak Berpotensi Sebagai Bioaktif	15
Tabel 2.3 Tabel frekuensi Inframerah Ekstrak Metanol <i>H. verticillata</i>	16
Tabel 2.4 Ion Steroid yang Terdeteksi Dengan LC-MS/MS	17
Tabel 3.1 Kondisi instrumentasi LC-MS/MS	25
Tabel 4.1 Hasil Monitoring Kromatografi Kolom dengan KLTA	32
Tabel 4.2 Mortalitas Larva Udang pada Fraksi n-Heksana	33
Tabel 4.3 Mortalitas Larva Udang pada Isolat B	35
Tabel 4.4 Interpretasi Spektra FTIR Fraksi n-Heksana dan Isolat B	38
Tabel 4.5 Ion Steroid Fraksi n-Heksana yang terdeteksi oleh LC-MS/MS	39
Tabel 4.6 Ion Steroid Isolat B yang terdeteksi oleh LC-MS/MS	40



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian	53
Lampiran 2. Diagram Alir	54
Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan	60
Lampiran 4. Data Pengamatan dan Perhitungan	63
Lampiran 5. Data Penggabungan Vial dan Hasil Monitoring KLTA	66
Lampiran 6. Data Hasil Uji Toksisitas	67
Lampiran 7. Data Instrumentasi Hasil Uji Isolat Steroid	72
Lampiran 8. Dokumentasi	77



ABSTRAK

Mawaddah. 2019. **Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi n-Heksana *Hydrilla verticillata*. Skripsi.** Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I; Konsultan : Dewi Yuliani, M.Si.

Kata kunci: Toksisitas, *Hydrilla verticillata*, Kromatografi Kolom, n-Heksana, *Artemia salina* Leach, Steroid.

Hydrilla verticillata merupakan tumbuhan air yang terdapat pada perairan tergenang seperti sungai, waduk, dan juga danau. *H. verticillata* yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari danau Ranu Grati Pasuruan. *H. verticillata* merupakan tumbuhan yang memiliki berbagai manfaat didalamnya yaitu berpotensi sebagai antimikroba, antimalaria dan sitotoksik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat toksisitas dari isolat steroid hasil kromatografi kolom *H. verticillata*. Isolasi senyawa steroid dilakukan dengan 3 tahapan yaitu diekstrak dengan metode maserasi tunggal menggunakan pelarut metanol, dipartisi dengan *n*-heksana dan pemisahan senyawa dilakukan dengan kromatografi kolom gradien eluen. Isolat steroid diuji toksisitasnya menggunakan metode *Brine Shrimp Lethal Test* dengan parameter nilai LC_{50} , hasil yang didapat yaitu 14,794 ppm. Hasil identifikasi senyawa pada isolat steroid menggunakan UV-Vis didapat panjang gelombang maksimum 206 nm yang menunjukkan adanya ikatan rangkap C=C tidak terkonjugasi. Identifikasi isolat dengan FTIR menunjukkan adanya gugus fungsi khas steroid -OH, C=C, dan $-CH(CH_3)_2$. Hasil tersebut diperkuat dengan adanya identifikasi menggunakan LC-MS/MS dan diperoleh hasil berupa 2 jenis senyawa steroid: β -sitosterol dan stigmasterol.

ABSTRACT

Mawaddah. 2019. **The Toxicity Test of Isolated Steroid Column Chromatography n-Hexane Fraction of *Hydrilla verticillata***. Thesis. Chemistry Department, Science and Technology Faculty State Islamic University Of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: A.Ghanaim Fasya, M.Si; Supervisor II: Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I; Consultant : Dewi Yuliani, M.Si.

Keyword: Toxicity, *Hydrilla verticillata*, column chromatography, n-Hexane, *Artemia salina* Leach, Steroid.

Hydrilla verticillata is a water plant it can found in rivers, reservoirs, and lakes. *H. verticillata* used in this research was obtained from Lake Ranu Grati Pasuruan. *H. verticillata* has some beneficial for antimicrobial, antimalarial and cytotoxic. This research aims to determine the level of toxicity of isolated steroid from column chromatography result of *H. verticillata*. The isolation of steroid compounds was carried out by various stages, namely extracted by a single maceration method using methanol solvent, partitioned with n-hexane and separation compounds with eluent gradient column chromatography. The toxicity of steroid isolate was tested using the Brine Shrimp Lethal Test method with LC_{50} value parameters, the results obtained were 14,794 ppm. The results of identification steroid compounds in isolate using UV-Vis obtained maximum wavelength 206 nm which showed the presence of a non-conjugated C = C double bond. Identification of isolate with FTIR showed the presence of a typical steroid -OH, C = C, and $-CH(CH_3)_2$. These results were continued identification using LC-MS/MS and the results show steroid compounds β -sitosterol and stigmasterol in isolate from column chromatography.

الملخص

موّدة . عام ٢٠١٩. اختبار سمية نتائج العمود اللوني للمنشطات المنعزلة - عمود كسور الهكسين *Hydrilla verticillata*. البحث الجامعي. قسم الكيمياء كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة الإسلاميّة الحكوميّة مولنا مالك إبراهيم مالانج.

المشرف الأوّل : أحمد غنائم فشا الماجستير; المشرف الثاني : أوكي باجاس فراستيو، الماجستير ;
مستشارة : دوي يولياني، الماجستير.

الكلمة الرئيسية : سمية، *Hydrilla verticillata*، العمود اللوني، الستيرويد، الهكسين،
Artemia salina Leach.

Hydrilla verticillata النباتات المائية الموجودة في المياه الراكدة مثل الأنهار والخزانات وكذلك البحيرات. أخذت *H. verticillata* في هذا البحث من بحيرة Ranu Grati فاسوروان. *H. verticillata* هي النبات التي منافعها منها يحتتمل أن تكون مضادات الميكروبات، مضادات الملاريا والسامة للخلايا. الهدف من هذا البحث هو يعرف طبق سمية الستيرويد المعزول من كروية التصوير العمودي *H. verticillata*. تم إجراء عزل للمركبات الستيرويدية في ثلاث مراحل، وهي المستخرجة بواسطة طريقة maserasi واحدة باستخدام مذيب الميثانول، مقسمًا بهكسين وفصل المركبات بواسطة العمود اللوني gradien eluen. تختبر سمية عزلات الستيرويد باستخدام طريقة *Brine Shrimp Lethal Test* بمحلول قيمة LC_{50} ، ونتاجها حصل إلى ١٤,٧٩٤ ppm. نتائج تحديد المركبات في عزلات الستيرويد باستخدام UV-Vis التي تم الحصول عليها ٢٠٦ بحد أقصى ٢٠٦ nm والتي تشير إلى وجود رابطة مزدوجة $C = C$ مترافق. أظهر تحديد العزلات مع FTIR وجود مجموعات الستيرويد النموذجية -OH، $C = C$ ، $-CH(CH_3)_2$. تم تعزيز هذا النتائج عن طريق تحديد استخدام LC-MS/MS و نتائجه حصل إلى نوعان وهما مركبات الستيرويد β -sitosterol و stigmasterol.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hydrilla verticillata adalah tumbuhan air yang banyak dijumpai di perairan Indonesia (Putri, 2014). Tumbuhan ini banyak ditemukan di sungai, waduk, dan danau (Das, dkk., 2015). Menurut Hasanah (2017), danau Ranu Grati Pasuruan merupakan danau yang didominasi oleh *H. verticillata*, namun belum ada pemanfaatan secara maksimal karena kurangnya eksplorasi dari masyarakat. Tumbuhan yang Allah SWT ciptakan memiliki manfaat yang beraneka ragam bentuk dan jenisnya, dalam Surat Thaha (20) :53 Allah SWT berfirman:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ
أَنْزَوْا جَا مِنْ نَبَاتٍ شَتَّىٰ

Artinya : “yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam” (Qs. Thaha (20):53).

Allah SWT menumbuhkan tumbuhan seperti *H. verticillata* sebagai petunjuk atas ketuhanan dan pemeliharaan Allah SWT terhadap ciptaanNya. Allah SWT menurunkan air hujan agar tumbuhan dapat tumbuh subur dan dapat diambil manfaatnya oleh manusia (Shihab, 2002).

Pemanfaatan *H. verticillata* di Negara Berkembang seperti India telah dimanfaatkan sebagai makanan ikan dan pupuk organik (Misra, dkk., 2012), sedangkan di Indonesia *H. verticillata* masih digunakan sebagai hiasan akuarium. *H. verticillata* mempunyai berbagai aktivitas sebagai antioksidan dan antimikroba

(Prabha dan Rajkumar, 2015), antitumor (Das, dkk., 2015), antimalaria (Annie, dkk., 2016), antipenuaan, agen detoksifikasi (Pal dan Nimse, 2006b), dan antiinflamasi (Byju, dkk., 2013). Aktivitas yang beragam tersebut disebabkan adanya kandungan metabolit sekunder dalam *H. verticillata*. Senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam *H. verticillata* meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, triterpenoid dan steroid (Praba dan Rajkumar, 2015; Hafiz, 2017).

Senyawa metabolit sekunder dikenal sebagai senyawa yang berpotensi sebagai obat. Steroid adalah senyawa metabolit sekunder yang mempunyai aktivitas tertentu, seperti pada ekstrak alga *Tydemnia exepditions* mengandung steroid yang dapat menghambat pertumbuhan kanker prostat (Zhang, dkk., 2012). Nurcahyanti, dkk., (2015) juga menyatakan bahwa steroid stigmast-5-en-3 β -ol dan stigmasterol dari kulit batang *Dysoxylum alliceum* yang dapat digunakan sebagai antikanker pada kanker payudara MCF-7. Potensi senyawa steroid sebagai obat dapat menjadi dasar pentingnya isolasi senyawa steroid dari *H. verticillata*.

Senyawa steroid diisolasi dengan tahap awal berupa proses ekstraksi menggunakan ekstraksi maserasi, ekstraksi ini aman digunakan untuk senyawa yang tidak tahan panas (Guenther, 1987). Maserasi dilakukan dengan merendam sampel menggunakan pelarut organik (polar). Metanol adalah pelarut yang digunakan karena mampu melarutkan semua senyawa metabolit sekunder pada suhu rendah (Atun, 2014). Kandukuri, dkk (2009), menyatakan bahwa ekstrak metanol dapat mengekstrak senyawa alkaloid, fenol, steroid, tanin dan saponin pada *waterhyacinth*. Penelitian Hafiz (2017) mendapatkan rendemen ekstrak kasar metanol lebih banyak daripada ekstrak kloroform dan n-heksana *H. verticillata* yaitu sebesar 12,72%.

Hasil dari ekstraksi maserasi masih terdapat senyawa yang terikat dengan ikatan glikosida, sehingga semua senyawa metabolit sekunder yang bersifat nonpolar pada *H. verticillata* dapat larut dalam metanol. Pemutusan ikatan glikosida dapat dilakukan dengan hidrolisis menggunakan HCl 2N (Kaur dan Murphy, 2012). Partisi dilakukan pada hasil hidrolisis untuk mengambil senyawa target yaitu steroid yang bersifat nonpolar sehingga digunakan pelarut n-heksana agar steroid larut ke fase nonpolar secara maksimal (Kristanti dkk., 2008). Kumala dan Sapitri (2011) menyatakan bahwa n-heksana memiliki kemampuan untuk mengekstrak steroid dari daun prasman dan memberikan positif uji steroid.

Hasil partisi berupa fraksi non-polar biasanya masih berupa senyawa campuran sehingga perlu dilakukan pemisahan lebih dengan kromatografi kolom (Kristanti, dkk., 2008). Metode kromatografi kolom dipilih pada penelitian ini karena memiliki kemampuan mengisolasi senyawa lebih banyak dibandingkan dengan pemisahan kromatografi lapis tipis. Pemisahan dengan kromatografi kolom dapat dilakukan dengan sistem elusi gradien untuk memaksimalkan senyawa target dan terpisahnya senyawa secara maksimal berdasarkan tingkat kepolaran. Etika dan Suryelita (2014) menggunakan n-heksana : etil asetat sistem elusi gradien berdasarkan tingkat kepolaran menggunakan perbandingan (10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:10) dan diperoleh hasil murni berupa steroid sebanyak 5 gram yang berbentuk jarum kristal.

Analisis senyawa hasil kromatografi kolom dapat dimonitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) untuk mengetahui tingkat kemurnian isolat yang didapat. Berdasarkan penelitian Mardaneni (2017) dan Luthfiyah (2017), elusi KLTA dengan eluen n-heksana dan etil asetat (17:3) dapat

menghasilkan 3 noda positif steroid dari 6 noda dan 4 noda positif steroid dari 7 noda yang terdeteksi.

Isolat steroid yang diperoleh dapat diuji toksisitasnya menggunakan metode *Brine Shrimp Lethal Test* (BSLT) dengan hewan uji berupa larva udang *Artemia salina* L. Sukadirman, dkk., (2004) menyatakan bahwa metode BSLT telah terbukti memberikan hasil toksisitas yang terpercaya, dan mempunyai korelasi positif dengan daya toksisitas senyawa antikanker. Penelitian Hafiz (2017) menyebutkan bahwa ekstrak metanol *H.verticillata* memberikan nilai LC_{50} sebesar 633,171 ppm yang berpotensi sebagai pestisida. Semakin kecil nilai LC_{50} atau nilai $LC_{50} < 1000$ maka ekstrak tersebut semakin toksik (Meyer, dkk., 1982).

H. verticillata pada penelitian ini diambil dari danau Ranu Grati Pasuruan. Keberadaan *H. verticillata* di danau tersebut sangat melimpah, akan tetapi pemanfaatannya masih belum maksimal. *H. verticillata* dalam penelitian ini akan diisolasi senyawa steroidnya menggunakan kromatografi kolom fraksi n-heksana yang selanjutnya diuji toksisitas terhadap larva udang *Artemia Salina* L. Hasil isolat steroid yang diperoleh dapat diidentifikasi dengan UV-Vis, FTIR dan LC-MS/MS.

Allah SWT menciptakan segala sesuatu di muka bumi ini dengan manfaat yang terkandung didalamnya. Tanda-tanda kebesaran Allah SWT hanya dapat disadari dan diketahui oleh orang-orang ulul albab, seperti dalam firman Allah SWT dalam surat Ar-Ra'd ayat 19.

أَفَمَنْ يَعْلَمُ أَنَّمَا أُنزِلَ إِلَيْكَ مِنْ رَبِّكَ الْحَقُّ كَمَنْ هُوَ أَعْمَىٰ ۚ إِنَّمَا يَتَذَكَّرُ أُولُو الْأَلْبَابِ

Artinya: "Adakah orang yang mengetahui bahwasanya apa yang diturunkan kepadamu dari Tuhanmu itu benar sama dengan orang yang buta? hanyalah

orang-orang yang berakal saja yang dapat mengambil pelajaran” (Ar-Ra’d (13):19).

Ayat tersebut menunjukkan bahwa Allah SWT menyebutkan “ulul albab” yang berarti fungsi akal manusia agar mereka dapat berfikir dan menggunakan akal tersebut untuk merenungi kebesaran Allah SWT (Qurthubi, 2009). Seseorang yang dikatakan ulul albab seyogyanya dapat merenungi kebesaran Allah SWT dan juga dapat melakukan suatu kebaikan atau amal saleh yang dapat bermanfaat bagi manusia pada umumnya. Allah SWT menyebutkan dalam surat An-Nahl ayat 97.

مَنْ عَمِلَ صَالِحًا مِّنْ ذَكَرٍ أَوْ أُنْثَىٰ وَهُوَ مُؤْمِنٌ فَلَنُحْيِيَنَّهٗ حَيٰوةً طَيِّبَةً ۖ وَلَنَجْزِيَنَّهُمْ أَجْرَهُمْ بِأَحْسَنِ مَا كَانُوا يَعْمَلُونَ

Artinya: “Barangsiapa yang mengerjakan amal saleh, baik laki-laki maupun perempuan dalam Keadaan beriman, Maka Sesungguhnya akan Kami berikan kepadanya kehidupan yang baik” (An-Nahl (16):97).

Ayat diatas menjelaskan kepada kita bahwa Allah SWT akan memberikan kebaikan pada kehidupan manusia yang senantiasa beramal saleh baik laki-laki maupun perempuan. Beramal saleh menurut Qarni (2008) yaitu perbuatan baik yang dapat menghapus dosa lampau. Amal saleh dapat kita lakukan seperti halnya pada penelitian ini yaitu mengisolasi senyawa steroid yang berperan dalam bidang farmakologi (obat-obatan) yang nantinya dapat bermanfaat bagi manusia sekitar.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana tingkat toksisitas isolat steroid *H. verticillata* hasil kromatografi kolom fraksi n-heksana terhadap *Artemia salina* L.?

2. Bagaimana hasil identifikasi isolat steroid *H. verticillata* hasil kromatografi kolom fraksi n-heksana menggunakan UV-Vis, FTIR dan LC-MS/MS?

1.3 Tujuan

1. Untuk mengetahui tingkat toksisitas isolat steroid *H. verticillata* hasil kromatografi kolom fraksi n-heksana terhadap *Artemia salina* L.
2. Untuk mengetahui hasil identifikasi isolat *H. verticillata* hasil kromatografi kolom fraksi n-heksana menggunakan UV-Vis, FT-IR dan LC-MS/MS

1.4 Manfaat

Manfaat dalam penelitian ini adalah dapat diketahui tingkat toksisitas dan hasil identifikasi isolat steroid *H. verticillata* hasil kromatografi kolom fraksi n-heksana.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah yang diambil dalam penelitian ini adalah

1. Sampel *H. verticillata* berasal dari danau Ranu Grati, Pasuruan.
2. Ekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol.
3. Hidrolisis menggunakan HCl 2N dan partisi menggunakan n-heksana.
4. Pemisahan senyawa dengan metode kromatografi kolom *Step Gradient Polarity* (SGP).
5. Uji toksisitas terhadap *Artemia salina* L.
6. Identifikasi steroid menggunakan UV-Vis, FT-IR dan LC-MS/MS.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Hydrilla verticillata*

Hydrilla verticillata merupakan tumbuhan air keluarga *Hydrocharitaceae* yang dapat ditemukan di India, Sri Lanka, Malaysia, China dan Amerika (Pal dan Nimse, 2006). *H. verticillata* terdapat pada perairan tergenang seperti sungai, waduk, dan juga danau (Das, dkk., 2015). Tumbuhan ini merupakan tumbuhan yang seluruh bagian tubuhnya tenggelam di bawah permukaan air. Sebagian besar *H. verticillata* dapat ditemukan di kedalaman 6 m (Pal dan Nimse, 2006).

Marer dan Garvey (2001) mengemukakan bahwa *H. verticillata* memiliki daun berwarna hijau tipis, berduri halus dan bergerigi dengan panjang 6-20 mm dan lebar 2-4 mm. Batangnya bercabang berwarna hijau dan tumbuh mendatar sebagai stolon yang membentuk akar serabut (Langeland, 1996). Tahap awal pertumbuhan *H. verticillata* adalah satu inci per hari. Pertumbuhan yang sangat pesat inilah membuat *H. verticillata* terus menerus tumbuh hingga mencapai permukaan air dan dapat menyebabkan terhalangnya cahaya matahari ke tumbuhan disekitarnya (Departemen of Natural Resource, 2006). Gambar 2.1 merupakan *H. verticillata* segar setelah pengambilan sampel.



Gambar 2.1 *Hydrilla verticillata* (Hafiz, 2017)

Klasifikasi *H. verticillata* sebagai berikut (Ramesh, Rajan dan sathanam, 2014) :

Kingdom : Plantae
 Divisi : Magnoliophyta
 Kelas : Liliopsida
 Ordo : Hydrocharitales
 Famili : Hydrocharitaceae
 Genus : Hydrilla
 Spesies : *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle

2.2 Kandungan *Hydrilla verticillata*

Kandungan kimia dan nutrisi pada *H. verticillata* cukup beragam. Kurniawan, dkk., (2010) mengemukakan bahwa *H. verticillata* mengandung klorofil total sebesar 4,43 mg/g, karotenoid 0,92 mg/g dan vitamin C 4,70 mg/30g. *H. verticillata* juga mengandung beberapa kandungan kimia diantaranya saponin, polisakarida, dan juga beberapa kandungan nutrisi seperti pada Tabel 2.1. (Pal dan Nimse, 2006).

Tabel 2.1 Kandungan nutrisi pada *H. verticillata*

Nutrisi/mineral	Jumlah (mg/10,5 g)	Nutrisi/mineral	Jumlah (mg/10., g)
Vitamin B-1	26,2	Magnesium	76,1
Vitamin B-2	0,08	Potassium	245
Vitamin B-3	5,20	Fosfor	29,7
Vitamin B-5	11,4	Besi	35,8
Vitamin B-6	35,9	Zink	6,30
Vitamin B-12	1,10	Mangan	24,5
Kalsium	1460	Tembaga	0,20
Kobalt	0,40	Molibdenum	15 µg/10,50 g
β-karoten	19600 IU/10,50 g		

Beberapa penelitian terdahulu juga mengemukakan kandungan senyawa kimia pada *H. verticillata*. Byju, dkk., (2012) mengemukakan bahwa terdapat senyawa phytol dan 3,5,11,15-tetrametil 1- hexadecen-3-ol pada ekstrak lipofilik *H. verticillata*, yang keduanya merupakan isomer dari diterpenol. Hasil skrining

fitokimia *H. verticillata* pada ekstrak metanol menunjukkan adanya senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, saponin, steroid dan triterpenoid (Hafiz, 2017; Prabha dan Rajkumar, 2015).

2.3 Steroid

Steroid merupakan senyawa lemak turunan siklopentanoperhidrofenantrena. Struktur steroid terdiri dari 3 cincin utama sikloheksana dan 1 cincin siklopentana seperti pada Gambar 2.2. Pengelompokan senyawa steroid bergantung pada gugus fungsi yang terikat pada kerangka dasar rantai karbon (Kristanti, 2008).



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

Kanazawa (1972) menyebutkan bahwa jenis senyawa steroid yang terdapat pada alga merah *p. cruentum* terdiri dari 22-Dehydrocolesterol, kolesterol, desmosterol dan ergosterol. Menurut Sapar, dkk., (2004) dalam penelitiannya menyatakan bahwa steroid pada Spons *Biemna triraphis* terdiri dari β -sitosterol, klionasterol, kampesterol, 28-isofukosterol, fukosterol dan brassikasterol. Senyawa steroid pada alga merah *E. cottonii* juga ditemukan berupa demosterol, stigmasterol, kampesterol, fukosterol, dan β -sitosterol (Mardaneni, 2017).

Senyawa steroid memiliki beberapa aktivitas yaitu dapat menghambat pertumbuhan tumor pada hewan dan tumbuhan serta dapat menjadi racun bagi insekta, bakteri dan jamur (Vikrey dan Bickrey, 1981). Penelitian Nurcahyanti, dkk (2015) juga menyatakan bahwa terdapat senyawa steroid seperti stigmast-5-en-3 β -ol dan stigmasterol, yang keduanya aktif menghambat sel kanker payudara MCF-7. Ekstrak alga *Tydemnia exepditions* yang mengandung steroid dapat menghambat pertumbuhan kanker prostat (Zhang, dkk., 2012).

Senyawa steroid dapat diuji keberadaanya dalam ekstrak maupun fraksi menggunakan pereaksi *Liebermann Burchard* (LB). Menurut Kristanti, dkk., (2008) pereaksi LB adalah reagen spesifik yang digunakan untuk uji senyawa triterpenoid dan steroid. Hasil positif steroid akan dihasilkan warna hijau (Harbone, 1998).

2.4 Ekstraksi Maserasi *H. verticillata*

Ekstraksi maserasi dilakukan dengan metode perendaman sampel dengan pelarut organik pada suhu ruang. Proses ekstraksi ini mengutamakan waktu kontak yang cukup antara pelarut dan sel jaringan pada sampel yang diekstraksi (Guenther, 1987). Mekanisme ekstraksi maserasi yaitu pelarut akan terdistribusi terus menerus ke dalam sel tumbuhan, sehingga akan ada tekanan yang mampu memecah dinding sel dan membuat senyawa metabolit sekunder dapat terlarut dengan pelarut yang digunakan (Widodo, 2007).

Pemilihan pelarut pada proses maserasi yaitu dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut. Metanol merupakan pelarut yang sering dipakai dalam ekstraksi maserasi, karena memiliki konstanta dielektrikum yang tinggi yaitu 33,60 yang menandakan bersifat sangat polar.

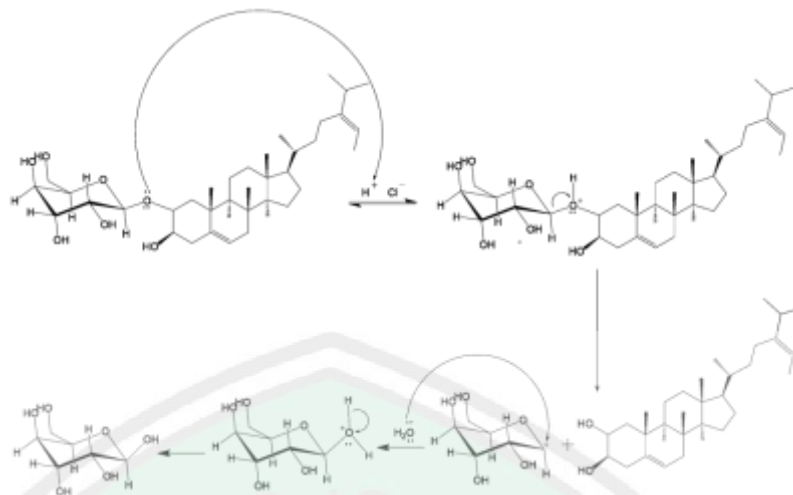
Kepolaran metanol mampu melarutkan senyawa metabolit sekunder yang polar dan juga non polar (masih berikatan dengan glukosa) dengan titik didih 64°C sehingga metanol mudah teruapkan pada suhu rendah (Atun, 2014).

Hasil rendemen yang diperoleh dari ekstraksi maserasi cukup banyak seperti pada penelitian Hafiz (2017) didapatkan rendemen sebesar 12,72% pada ekstrak metanol *H. verticillata*. Nazazilah (2015) dan Susetyo (2015) juga melaporkan bahwa ekstraksi maserasi *E. spinosum* menggunakan metanol menghasilkan rendemen 9,1% dan 9,4%. Lutfiyah (2017) dan Rahmawati (2017) mendapatkan rendemen ekstrak metanol *E. cottonii* berturut-turut sebesar 15,587 dan 11,866%.

2.5 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol

Hidrolisis merupakan proses pemutusan ikatan glikosida pada senyawa metabolit sekunder melalui reaksi menggunakan air dan dengan bantuan katalis asam berupa HCl 2 N (Kaur dan Murphy, 2012). Hidrolisis dilakukan pada ekstrak pekat hasil ekstraksi maserasi karena masih berupa campuran senyawa yang berikatan dengan gugus gula (Harbone, 1987). Reaksi hidrolisis bersifat *reversible* sehingga dapat dihentikan dengan penambahan natrium bikarbonat (NaHCO_3) yang dapat menetralkan kondisi asam pada larutan.

Gambar 2.3 merupakan dugaan mekanisme reaksi hidrolisis yaitu pemutusan ikatan glikosida antara gugus gula dan metabolit sekunder. Setelah hasil hidrolisis netral maka dilakukan partisi untuk mengambil senyawa target. Partisi dilakukan untuk mengambil senyawa target yang diinginkan dan memiliki kepolaran yang sama dengan pelarut yang digunakan. Senyawa steroid bersifat nonpolar sehingga akan lebih terdistribusi pada fase nonpolar seperti n-heksana dan dapat terpisah dengan senyawa polar yang lainnya (Kristanti dkk., 2008).



Gambar 2.3 Dugaan Reaksi Hidrolisis Ikatan *O*-glikosida

Pelarut n-heksana dapat digunakan dalam proses partisi untuk distribusi senyawa steroid karena memiliki kepolaran yang sama. Dwisari, dkk., (2016) menyebutkan bahwa hasil partisi menggunakan n-heksana pada akar pohon kayu buta-buta menghasilkan positif steroid. Ningsih (2015) melaporkan bahwa fraksi n-heksana pada *E. spinosum* menghasilkan rendemen 6,03%. Afif (2015) juga menyatakan bahwa fraksi n-heksana *E. cottoni* menghasilkan rendemen 5,14%.

2.6 Isolasi Senyawa Steroid menggunakan kromatografi kolom

Kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan suatu senyawa dalam jumlah besar sehingga didapatkan senyawa hasil isolasi yang lebih banyak (Lisiana, dkk.,2016). Prinsip kromatografi kolom adalah pemisahan berdasarkan proses adsorpsi antara fase diam dan fase gerak (Sastrohamidjojo, 2004). Faktor yang mempengaruhi pemisahan kolom adalah fase gerak dan fase diam, laju alir, dan panjang kolom.

Fase diam yang banyak digunakan pada kromatografi kolom adalah silika gel 60. Silika gel 60 yang digunakan adalah ukuran 0,063-0,200 mm (Sholikah,

2016). Laju alir pada metode kromatografi kolom juga mempengaruhi pemisahan senyawa steroid, sehingga digunakan laju alir 2 mL/menit (Fitri, 2017) dengan diameter kolom 1 cm (Mubarikah, 2017).

Komposisi eluen terbaik pada kromatografi kolom yaitu menggunakan n-heksana dan etil asetat dalam beberapa variasi. Rahmawati (2017) memisahkan steroid alga merah *E. cottoni* dengan gradien elusi 16:4, 17:3, 18:2. Perbandingan n-heksana dan etil asetat (18:2) pada penelitian tersebut menghasilkan pemisahan terbaik yaitu didapatkan 2 noda positif steroid dan 3 noda positif triterpenoid. Fitri (2017) juga memisahkan steroid alga merah *E. cottoni* menggunakan sistem elusi isokratik menggunakan n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan (4,25:0,75) dan hanya menghasilkan 1 steroid dan 2 terpenoid. Tonius, dkk., (2016) menyatakan bahwa metode elusi gradien dapat dilakukan untuk menghasilkan fraksi murni senyawa target dalam jumlah besar.

Analisis hasil pemisahan kromatografi kolom dapat dimonitoring menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA). Keberhasilan pemisahan steroid pada monitoring KLTA didasarkan pada pemilihan fase gerak. Luthfiyah (2017), menyatakan fase gerak yang digunakan pada KLTA *E. cottoni* adalah n-heksana : etil asetat (17:3) menghasilkan 4 noda positif steroid.

2.7 Uji Toksisitas dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Uji toksisitas bertujuan untuk memaparkan adanya efek toksik dengan menilai batas keamanan penggunaan suatu senyawa pada ekstrak (Vitalia, dkk., 2016). Zat kimia yang memiliki potensi sebagai racun dapat dinyatakan dengan LC_{50} (*Lethal Concentration-50*). Senyawa bioaktif hampir selalu toksik dalam

dosis tinggi. Salah satu organisme yang sesuai untuk uji toksisitas adalah larva udang (Lenny, 2006).

Brine Shrimp Lethal Test (BSLT) merupakan salah satu metode uji toksisitas yang penting digunakan untuk mengetahui senyawa bioaktif yang bersifat toksik pada bahan alam (Sarah, dkk., 2017). Bioaktivitas yang dapat dideteksi dari skrining awal dengan metode BSLT diantaranya adalah antikanker, antitumor, antimalaria, dan antimikroba (Colegate dan Molyneux, 2007). Hewan uji yang digunakan adalah jenis larva udang *Artemia salina*, adanya hewan uji pada uji toksisitas dimaksudkan untuk ekstrapolasi hasil dalam mencari dosis aman bagi manusia. Parameter yang ditunjukkan dari aktivitas biologi suatu senyawa pada *Artemia salina* adalah kematiannya (Meyer, dkk., 1982). Klasifikasi *A. salina* L. menurut Mudjiman (1989) sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Divisi	: Arthropoda
Subdivisi	: Crustacea
Kelas	: Branchiopoda
Ordo	: Anostraca
Famili	: Artemiidae
Genus	: Artemia L.
Spesies	: <i>Artemia salina</i> Leach



Gambar 2.4 Larva Udang *Artemia salina* L.

Larva udang *A. salina* L. termasuk *Crustacea* yang ukurannya mencapai 1-2 cm seperti pada Gambar 2.4. *A. salina* memiliki siklus hidup sekitar 25 hari

(Kristanti, dkk., 2008). Terdapat dua tahapan penetasan *A. salina* yaitu pemecahan cangkang dengan proses hidrasi, dan pemecahan payung sebelum larva keluar dari cangkang (Farihah, 2008).

Toksistas dari isolat dapat ditentukan dengan Nilai LC_{50} , suatu senyawa kimia dapat dikatakan toksik jika Nilai $LC_{50} < 1000$ ppm, namun jika harga $LC_{50} > 1000$ ppm maka dikatakan tidak toksik (Meyer, dkk., 1982). Hasil uji toksistas pada penelitian Hafiz (2017) pada ekstrak metanol *H. verticillata* yaitu menghasilkan nilai LC_{50} 633,171 (Toksik). Tingkat toksistas tersebut dapat dikategorikan, dan memberikan makna terhadap potensi aktivitasnya seperti pada Tabel 2.2 berikut.

Tabel 2.2 Nilai LC_{50} Ekstrak Berpotensi Sebagai Bioaktif

LC_{50} (ppm)	Potensi
<30	Antitumor dan Antikanker
30 – 200	Antimikroba
200 > x < 1000	Pestisida

Sumber : McLaughlin, 1991

2.8 Identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis merupakan salah satu jenis spektroskopi didasarkan pada interaksi materi dengan radiasi elektromagnetik. Seberkas radiasi (cahaya) yang dikenakan pada cuplikan (larutan sampel), maka sebagian dari cahaya tersebut akan diserap molekul pada sampel. 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).

2.9 Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer FT-IR

Spektrofotometer inframerah adalah alat untuk menganalisis senyawa kimia menggunakan sinar inframerah yang menjadi sumber radiasi. Spektrofotometer inframerah ini berfungsi untuk mendeteksi gugus fungsi, mengidentifikasi senyawa dan menganalisis campuran (Day dan Underwood, 1986). Inayah (2017) melaporkan hasil serapan steroid pada fraksi petroleum eter mikroalga *chorella* sp. menghasilkan bilangan gelombang seperti pada Tabel 2.3. Gugus-gugus fungsi yang khas pada senyawa steroid yaitu O-H, C=C, dan $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$. Identifikasi menggunakan FT-IR dapat memvalidasi gugus fungsi pada senyawa yang sudah terisolasi.

Tabel 2.3 Tabel Frekuensi Inframerah Fraksi Petroleum Eter *chorella* sp.

Gugus fungsi	Bilangan gelombang Inayah (2017) (cm^{-1})	Range pustaka Socrates (1994) (cm^{-1})
–OH, ulur	3467	3600-3450
–CH ₃ , asimetris	2955	2975-2950
–CH ₂ – asiklik, asimetris	2926	2940-2915
–CH ₂ – asiklik, simetri	2857	2870-2840
C=O, ester	1733	1750-1725
C=C terisolasi	1637	1680-1620
–CH(CH ₃) ₂ (geminal dimetil)	1465 dan 1384	1454 dan 1384*
C–O ester (ulur)	1287	1300-1100
–(CH ₂) ₂ , rocking	742	745-735

Keterangan: *Suryani (2011)

2.10 Identifikasi menggunakan LC-MS

Identifikasi senyawa dengan LC-MS/MS menggunakan prinsip pemisahan kromatografi cair (HPLC) yang dilengkapi dengan analisis spektrometer massa. Spektrometer massa (MS) bekerja dengan memilah dan mengidentifikasi ion menurut massa yang terdeteksi berdasarkan rasio fragmentasi (m/z).

Identifikasi senyawa steroid dengan LC-MS/MS menggunakan sumber ionisasi berupa *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI) mode positif. Menurut Diaz (2006) sumber ion APCI dapat menganalisis m/z kisaran 70-1000. Sistem LC dengan tipe Alliance 2695 yang dilengkapi *autosampler*, *degasser*, dan pemanas kolom. Sistem analisa massa menggunakan triple Q (*Quadrupole*) TSQ QUANTUM ACCESS MAX yang selanjutnya akan diperoleh data dengan menggunakan *software* MassLynx 4.0 (Agilent Technology, 2010).

Pereira, dkk. (2016) melaporkan hasil identifikasi steroid alga coklat menggunakan metode APCI dihasilkan 7 puncak senyawa dengan *retention time* yang berbeda. Puncak yang dihasilkan dari fragmentasi $M-H_2O+H^+$ terdeteksi senyawa steroid jenis kampestrol, β -sitosterol, brassikasterol, stigmasterol, fukosterol, kolesterol, dan ergosterol. Mardaneni (2017) juga melaporkan bahwa hasil LC-MS/MS *Euchema cottoni* seperti pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4 Ion steroid yang terdeteksi dengan LC-MS/MS

Steroid	Waktu retensi (menit)	Massa (m/z)			
		M	M-H ₂ O	M-H ₂ O+H ⁺	Daughter mass
β -Sitosterol	1,54	414	396	397	160,5-161,5
Stigmasterol	1,43	412	394	395	254-255
Fukosterol	1,35	386	368	369	80,5-81,5
Kampestrol	1,24	400	382	383	146,5-147,5
Desmosterol	0,85	384	366	367	160,5-161,5

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2019 sampai April 2019 di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terbagi menjadi dua yaitu alat-alat yang digunakan pada tahap isolasi dan alat-alat yang digunakan untuk tahap uji toksisitas dan identifikasi. Alat-alat yang digunakan pada tahap isolasi antara lain seperangkat alat gelas, corong buchner, kolom kromatografi, *rotary evaporator vacuum*, *incubator shaker*, dan statif. Alat-alat yang digunakan pada tahap uji toksisitas dan identifikasi antara lain botol vial, lampu penerang, wadah penetasan larva udang, aerator, bejana pengembang, lampu UV, oven, FT-IR dan LC-MS/MS.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *H. verticillata* dari Danau Ranu Pasuruan. Bahan-bahan kimia yang diperlukan meliputi metanol 99,9%, n-heksana 96%, asam sulfat 98%, kloroform 96%, HCl 2 N, Na-bikarbonat jenuh, etil asetat *p.a.*, anhidrida asetat *p.a.*, etanol *p.a.* dan aquades. Bahan-bahan uji toksisitas meliputi dimetil sulfoksida, ragi roti, air laut, plat silika gel F₂₅₄, silika gel 60 (0,063–0,200 mm) dan telur *Artemia salina* L.

3.3 Tahapan penelitian

Tahapan-tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu :

1. Preparasi sampel
2. Analisis kadar air
3. Ekstraksi maserasi
4. Hidrolisis dengan HCl dan partisi dengan n-heksana
5. Uji fitokimia ekstrak metanol dan fraksi n-heksana *H. verticillata*
6. Isolasi dengan metode Kromatografi Kolom *Step Gradient Polarity* (SGP)
7. Monitoring dengan KLTA
8. Uji toksisitas isolat steroid terhadap larva udang *Artemia salina* L.
9. Identifikasi dengan FTIR dan LC-MS/MS
10. Analisis Data

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Preparasi Sampel

H. verticillata diambil dari permukaan air Danau Ranu Grati. Sampel diambil sebanyak 10 Kg, kemudian dikering-anginkan selama 7 hari. Selanjutnya, sampel kering dihaluskan di Materia Medica Batu dan diayak dengan ukuran ± 90 mesh.

3.4.2 Analisis Kadar Air Secara Thermogravimetri (AOAC, 1984)

Cawan porselen dipanaskan dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya. Cawan disimpan dalam desikator selama 10 menit, selanjutnya cawan ditimbang dan perlakuan yang sama diulang sampai mencapai berat konstan. Serbuk *H. verticillata* sebanyak 5 g dimasukkan ke dalam cawan dan dipanaskan pada suhu 100 – 105°C ± 15 menit. Cawan

dimasukkan dalam desikator selama 10 menit lalu ditimbang dan perlakuan yang sama diulang sampai mencapai berat konstan. Kadar air dalam *H. verticillata* dapat dihitung menggunakan Persamaan 3.1.

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

Keterangan : (a) berat cawan kosong, (b) berat cawan+sampel sebelum dikeringkan, (c) berat cawan + sampel setelah dikeringkan

3.4.3 Ekstraksi Maserasi *Hydrilla verticillata* (Hafiz, 2017)

Ekstraksi komponen aktif pada sampel dilakukan dengan ekstraksi maserasi atau perendaman sampel dengan pelarut metanol. Sebanyak 100 g serbuk *H. verticillata* halus ditambahkan dengan metanol 500 mL kemudian dilakukan pengocokan menggunakan *shaker* selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm dan direndam 24 jam. Ekstrak hasil perendaman disaring dengan corong *buchner* menghasilkan filtrat dan residu. Filtrat ditampung pada erlenmeyer dan residu diekstraksi kembali dengan pelarut dan perlakuan yang sama sebanyak 5 kali pengulangan. Kelima filtrat hasil ekstraksi digabung menjadi satu, kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vacuum*. Ekstrak pekat metanol yang diperoleh kemudian ditimbang dan dihitung rendemennya menggunakan Persamaan 3.2.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Sampel}} \times 100\% \dots\dots\dots (3.2)$$

3.4.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol (Imamah, dkk., 2015)

Ekstrak pekat metanol *H. verticillata* diambil sebanyak 10 g dan diletakkan ke dalam gelas kimia, kemudian ditambahkan 10 mL HCl untuk proses

hidrolisis. Proses hidrolisis dilakukan selama 1 jam dan dihomogenkan dengan magnetik stirrer pada suhu ruang, kemudian ditambah natrium bikarbonat jenuh sampai pH netral. Hasil hidrolisis kemudian dipartisi dengan n-heksana sebanyak 50 mL di dalam corong pisah dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan organik dan lapisan air. Masing-masing lapisan yang terbentuk kemudian dipisahkan. Lapisan organik diambil kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum*. Hasil fraksi n-heksana yang diperoleh dapat ditimbang dan dihitung rendemennya menggunakan Persamaan 3.2.

3.4.5 Uji Steroid Ekstrak Metanol dan Fraksi n-heksana (Kristanti, dkk., 2008)

Uji fitokimia steroid dilakukan pada hasil ekstraksi dan hasil hidrolisis-partisi. Hasil ekstrak metanol dan fraksi n-heksana *H. verticillata* diuji fitokimia dengan menggunakan pereaksi *Liebermann Burchard* yaitu masing-masing sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform dan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Campuran tersebut kemudian ditambah dengan 1–2 mL asam sulfat pada dinding tabung, apabila terbentuk warna hijau kebiruan maka menunjukkan adanya senyawa steroid pada hasil ekstraksi dan hidrolisis-partisi.

3.4.6 Pemisahan Metode Kromatografi Kolom

3.4.6.1 Pembuatan Bubur Silika (Fasa Diam pada Kromatografi Kolom)

Bubur silika dibuat dengan bahan silika gel 60 sebanyak 10 g yang sudah diaktivasi dalam oven selama 2 jam pada suhu 110°C. Selanjutnya silika gel didinginkan dan dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit. Pembuatan

bubur silika dilakukan dengan cara silika gel dicampur dalam 20 mL pelarut n-heksana : etil asetat (95:5) dan dihomogenkan selama \pm 1 jam. Tahap persiapan kolom mula-mula diisi *glasswool* pada bagian bawah kolom, kemudian bubuk silika dimasukkan ke dalam kolom secara perlahan dan tanpa jeda. Bubur silika dalam kolom dipastikan mampat dengan didiamkan selama \pm 24 jam.

3.4.6.2 Pemisahan Fraksi n-heksana *H. verticillata* dengan Kromatografi

Kolom *Step Gradient Polarity* (SGP)

Fraksi n-heksana *H. verticillata* sebanyak 0,067 g mula-mula dilarutkan dalam 1 mL pelarut n-heksana : etil asetat (95:5). Sejumlah cuplikan fraksi n-heksana yang telah larut, kemudian dimasukkan ke dalam kolom. Pemisahan senyawa fraksi n-heksana menggunakan kromatografi kolom dengan fasa diam berupa silika gel 60, diameter kolom 1 cm, dan panjang kolom 50 cm. Proses elusi dilakukan secara gradien dengan perbandingan fase gerak n-heksana : etil asetat (95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, dan 70:30) dengan volume masing-masing 100 mL. Hasil berupa eluat dari kromatografi kolom akan ditampung ke dalam vial setiap 2 mL (Fitri, 2017).

3.4.7 Monitoring Hasil Isolat Steroid dengan KLTA

Vial-vial bernomor genap pada hasil pemisahan kromatografi kolom akan dikelompokkan berdasarkan perbandingan fase geraknya dan dimonitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA). Proses monitoring menggunakan plat silika gel F₂₅₄ ukuran 10x10 cm yang sudah diaktivasi pada suhu 110°C selama 30 menit. Isolat dari masing-masing vial kemudian ditotolkan pada plat silika yang sudah ditandai jarak \pm 1 cm dari tepi bawah dan tepi atas. Penotolan isolat

dilakukan dengan pipa kapiler sebanyak 10 kali totalan secara berkala dengan pengeringan, kemudian dielusi dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (17 :3) (Mardaneni, 2017; Luthfiyah, 2017).

Proses elusi dihentikan apabila fase gerak sudah mencapai garis batas atas, dan noda-noda pada plat hasil pemisahan dideteksi dengan menyemprotkan reagent LB dan diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Desianti, dkk., 2014). Proses selanjutnya yaitu menganalisis hasil spot pada plat, apabila terbentuk warna hijau kebiruan maka menunjukkan adanya steroid (Indrayani, dkk., 2006). Noda pada plat yang mempunyai nilai Rf sama dan bercak yang sama, maka digabung menjadi satu sebagai fraksi yang sama, kemudian hasil isolat tersebut dapat diuji toksisitasnya terhadap *Artemia salina* L.

3.4.8 Uji Toksisitas Fraksi n-Heksana dan Isolat B

Uji toksisitas pada fraksi n-heksana dan isolate B hasil kromatografi kolom diawali dengan penetasan telur *Artemia salina* L. Telur *A. salina* ditetaskan dalam wadah penetasan yang berisi air laut yang diaerasi dan disinari dengan lampu pijar/neon. Telur *Artemia salina* L. sebanyak 2,5 mg dimasukkan ke dalam wadah yang berisi 250 mL air laut, kemudian diaerasi selama \pm 48 jam dengan suhu penetasan 25–30°C. Larva udang yang sudah menetas maka siap untuk digunakan sebagai hewan uji.

Uji toksisitas isolat steroid terhadap larva udang *Artemia salina* L. dilakukan sebanyak 5 kali ulangan. Hasil isolat steroid pada masing-masing vial dengan berat 1 mg dilarutkan dengan n-heksana sebanyak 10 mL untuk membuat larutan stok 100 ppm. Larutan stok yang diperoleh kemudian dipipet masing-masing 100, 200, 300, 400 dan 500 μ L yang masing-masing dimasukkan ke dalam

5 botol vial dan diuapkan pelarutnya. Setelah pelarut pada masing-masing vial menguap maka ditambahkan 100 μL dimetil sulfoksida (DMSO), satu tetes larutan ragi roti 60%, 2 mL air laut, dikocok hingga tercampur. Larutan yang telah tercampur dimasukkan dalam labu ukur 10 mL kemudian ditandabatkan dengan air laut dan dihomogenkan. Setelah masing-masing larutan ditandabatkan maka konsentrasi larutan menjadi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm, kemudian masing-masing konsentrasi larutan tersebut dipindahkan ke dalam botol vial dan ditambah 10 ekor larva udang *Artemia salina* untuk dilakukan pengamatan.

Kematian larva udang diamati selama 24 jam, dengan dibandingkan terhadap beberapa kontrol yaitu kontrol pelarut, kontrol DMSO, dan kontrol air laut. Kontrol pelarut dibuat tanpa penambahan isolat steroid dan DMSO yaitu diambil 100 μL n-heksana. Kontrol DMSO dibuat tanpa penambahan isolat steroid dan pelarut (n-heksana), yaitu diambil 100 μL DMSO. Selanjutnya kontrol air laut dilakukan dengan penambahan air laut tanpa penambahan lainnya seperti pelarut (n-heksana) dan DMSO. Ketiga kontrol tersebut masing-masing ditambahkan satu tetes ragi roti dan 10 ekor larva udang, perhitungan mortalitas atau tingkat kematian larva dapat dihitung menggunakan Persamaan 3.4.

$$\% \text{Mortalitas} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva (10)}} \times 100\% \dots\dots\dots (3.4)$$

$$\text{Mortalitas} = \% \text{Mortalitas} \times \text{jumlah keseluruhan larva (50)} \dots\dots\dots (3.5)$$

3.4.9 Identifikasi Senyawa Menggunakan UV-Vis

Hasil isolat steroid hasil kromatografi kolom diidentifikasi dengan UV-Vis pada panjang gelombang 200-800 nm. Isolat steroid dilarutkan dalam pelarutnya

(n-heksana) sebanyak 3-5 mL. Kemudian diamati panjang gelombang maksimal dari isolat yang akan muncul.

3.4.10 Identifikasi Senyawa Menggunakan FT-IR

Hasil isolasi senyawa steroid dengan kromatografi kolom diidentifikasi menggunakan FT-IR. Preparasi sampel mula-mula dilakukan dengan mencampur hasil isolat steroid yang telah diuapkan dengan 0,2 g pelet KBr diaduk merata menggunakan mortal agate. Campuran KBr dan sampel akan ditekan menggunakan tekanan 80 Torr selama 10 menit hingga terbentuk sebuah pelet, selanjutnya diidentifikasi dengan alat FTIR dengan bilangan gelombang 4000 – 400 cm^{-1} .

3.4.11 Identifikasi Senyawa Menggunakan LC-MS/MS

Isolat senyawa steroid yang memiliki sifat paling toksik dengan nilai LC_{50} paling rendah, selanjutnya diambil sedikit cuplikan hasil isolat steroid untuk dianalisa menggunakan LC-MS/MS dengan kondisi seperti pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Kondisi Instrumentasi LC-MS/MS

Nama	Kondisi
Kolom UHPLC	<i>Hypersil gold</i> (50 mm x 2.1 mm x 1,9 μm) Accela
Fasa gerak	0,1% asam format dalam air (fasa A) 0,1% asam format dalam asetonitril (fase B)
Laju alir	500 $\mu\text{L}/\text{menit}$
Volume Injeksi	2 μL
MS type	MS/MS triple Q (<i>Quadrupole</i>) TSQ QUANTUM ACCESS MAX
Sumber ionisasi	APCI (<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>) 41
Software	X- Calibur 2.1
Kontrol suhu kolom	30°C

BAB IV

PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Hydrilla verticillata pada penelitian ini diperoleh dari Danau Ranu Grati Pasuruan. *H. verticillata* dikeringkan untuk mengurangi kandungan air yang terdapat di dalamnya sehingga tidak mengganggu proses ekstraksi. *H. verticillata* kering diperoleh sebanyak 1,1 Kg kemudian dihaluskan di Materia Medika Batu dengan ukuran 90 mesh. Penghalusan sampel dimaksudkan untuk memperbesar luas permukaan partikel sehingga mempermudah kontak pelarut pada saat ekstraksi (Deskawi, dkk., 2015). Sampel kering *H. verticillata* diperoleh dalam bentuk serbuk sebanyak 950 g.

4.2 Analisis Kadar Air

Analisis kadar air perlu dilakukan untuk mengetahui kandungan air yang terdapat dalam sampel serbuk kering *H. verticillata*. Hasil pengukuran kadar air *H. verticillata* pada penelitian ini yaitu sebesar 6,5% (Lampiran 4.1). Hasil tersebut menunjukkan bahwa kadar air pada *H. verticillata* memenuhi standar Depkes RI (1994) dengan batas maksimum yang disyaratkan sebesar 10%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kadar air pada penelitian ini tidak mengganggu proses ekstraksi karena hasil yang diperoleh tidak melebihi batas maksimum yang ditentukan. Kadar air pada sampel memiliki pengaruh besar terhadap proses ekstraksi, apabila kadar air semakin besar maka senyawa pada sampel akan sulit terekstrak.

4.3 Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi maserasi pada *H. verticillata* dilakukan dengan perendaman sampel selama 24 jam disertai pengocokan menggunakan shaker untuk memaksimalkan kontak antara sampel dan pelarut. Pelarut yang digunakan adalah metanol yang bersifat polar dan mampu mengekstrak senyawa metabolit sekunder pada bahan alam yang masih terikat dengan gugus glikosida. Perendaman sampel membuat senyawa organik yang terkandung dalam *H. verticillata* akan berdifusi melewati dinding sel dan larut dalam metanol.

Proses ekstraksi pada penelitian ini dilakukan sebanyak 4 kali ulangan menghasilkan endapan dan filtrat. Pengulangan dihentikan saat filtrat hasil maserasi berwarna hijau bening yang menandakan senyawa sudah banyak terekstrak. Filtrat hasil maserasi dari beberapa kali ulangan dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* sehingga didapat ekstrak pekat metanol sebesar 3,62% (Lampiran 4.2.1).

4.4 Hidrolisis dan Partisi

Ekstrak pekat metanol selanjutnya dihidrolisis untuk memutus ikatan glikon dan aglikon pada senyawa metabolit sekunder yang masih dalam bentuk glikosidanya. Hidrolisis dilakukan dengan penambahan HCl 2 N sebagai katalis, adapun dugaan reaksi pemutusan glikosida ditunjukkan pada Gambar 2.3. Sifat reaksi hidrolisis adalah *reversible* atau bolak-balik sehingga dilakukan penetralan menggunakan natrium bikarbonat (NaHCO_3) untuk menghentikan reaksi hidrolisis. Proses penambahan ini akan menghasilkan busa yang menunjukkan gas

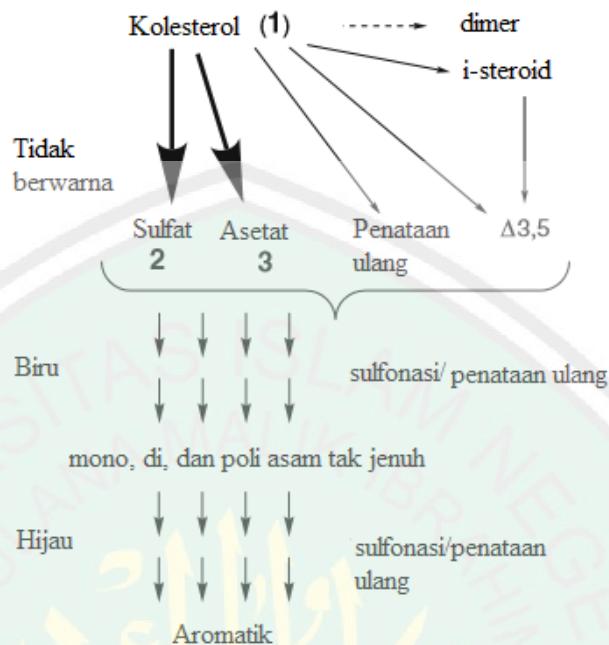
CO₂ sudah terbentuk dan terjadi reaksi HCl dengan NaHCO₃, selanjutnya proses ini dihentikan sampai pH netral.

Hidrolisat yang didapat selanjutnya dipartisi (ekstraksi cair-cair) menggunakan pelarut n-heksana yang bersifat nonpolar untuk mengambil senyawa steroid yang juga bersifat nonpolar. Proses partisi menghasilkan dua fasa cairan yaitu fasa organik yang mengandung senyawa steroid dan fasa air yang berisi garam hasil reaksi hidrolisis. Fasa organik diambil pada setiap hasil partisi yang dilakukan sebanyak 3 kali ulangan dan didapat fraksi n-heksana pekat sebesar 47,95% (Lampiran 4.2.2). Penelitian Khasanah (2019) juga melaporkan bahwa hasil partisi *H. verticillata* dengan n-heksana menghasilkan rendemen sebesar 90,66% hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa metabolit sekunder pada *H. verticillata* cenderung bersifat nonpolar karena lebih banyak terdistribusi pada pelarut nonpolar.

4.5 Uji Steroid Ekstrak Metanol dan Fraksi n-Heksana

Identifikasi senyawa steroid pada ekstrak metanol dan fraksi n-heksana *H. verticillata* positif mengandung steroid. Penelitian Hafiz (2017) juga melaporkan bahwa ekstrak metanol *H. verticillata* positif mengandung steroid dan pada penelitian Khasanah (2019) juga melaporkan bahwa fraksi n-heksana *H. verticillata* positif mengandung steroid. Reagen *Liebermann Burchard* (LB) berupa kloroform, asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat ditambahkan pada sampel sehingga menghasilkan warna hijau untuk senyawa steroid (Anggraini dan Nabillah, 2018). Reaksi yang terjadi antara steroid dengan asam asetat anhidrat

disebut reaksi asetilasi gugus $-OH$ yang akan menghasilkan kompleks asetil steroid (Ilyas, dkk., 2015).



Gambar 4.1 Jalur Reaksi Perubahan Warna pada Reaksi LB (Xiong, dkk., (2007)

Jalur reaksi LB pada Gambar 4.1 merupakan jalur reaksi pada kolesterol yang diteliti oleh Xiong, dkk., (2007), dan dikarakterisasi dengan C-NMR. Penelitian tersebut dilakukan untuk membuktikan perubahan warna yang terjadi pada reaksi LB. Senyawa kolesterol akan mengalami beberapa tahapan saat penambahan asam sulfat, dan asetat anhidrat dalam kloroform yaitu asetilasi, pembentukan i-steroid, penataan ulang, dimerisasi, sulfonasi, oksidasi/desaturasi, dan aromatisasi. Jalur reaksi tersebut menghasilkan i-steroid, kolesta-3,5-diena, dan spesies tak jenuh lainnya. Kinetika yang berbeda di antara jalur ini dapat menghasilkan respons warna bahwa pada steroid reaksi LB akan menghasilkan warna biru atau hijau (Xiong, dkk., 2007).

4.6 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom

Tahap pemisahan dilakukan pada fraksi n-heksana sebanyak 0,0667 g dengan perbandingan 1:150 antara sampel dan fase diam berupa silika gel. Penelitian Tyas (2017) melaporkan bahwa dengan perbandingan 1:150 menghasilkan pemisahan senyawa yang terbaik pada isolasi steroid *E. cottonii*. Sistem elusi yang digunakan adalah gradien eluen dengan pemilihan fase gerak berupa n-heksana dan etil asetat yang cenderung bersifat nonpolar untuk memaksimalkan pemisahan senyawa steroid yang juga bersifat nonpolar.

Pemisahan senyawa dengan kromatografi kolom proses elusinya dimulai dengan variasi eluen yang bersifat nonpolar lebih besar yaitu n-heksana : etil asetat 95:5. Hal ini diasumsikan bahwa senyawa steroid yang bersifat nonpolar akan terelusi dan terpisah terlebih dahulu. Sampel yang bersifat nonpolar akan melewati fase diam sedangkan yang bersifat polar akan tertahan pada fase diam. Gugus hidroksil silanol yang terdapat pada silika akan membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa polar pada sampel. Eluat hasil pemisahan ditampung setiap 2 mL/menit ke dalam vial dengan jumlah eluat yang tertampung pada penelitian ini sebanyak 276 vial.

4.7 Monitoring Hasil Kromatografi Kolom dengan KLTA

Eluat hasil pemisahan kromatografi kolom yang terdapat dalam vial-vial kemudian dimonitoring dengan KLT Analitik untuk pengelompokan lebih lanjut. Pengelompokan vial didasarkan pada kesamaan profil kandungan kimia dari noda yang terbentuk pada KLT dan nilai R_f yang sama. Senyawa yang terdapat dalam sampel mempunyai kecepatan yang berbeda saat melewati kolom sehingga

senyawa yang bermigrasi terlebih dahulu ditunjukkan dengan nilai Rf yang tinggi. Hasil pengelompokan isolat pada penelitian ini didapat 11 isolat gabungan seperti pada Tabel 4.1 yang terdiri dari noda tunggal dan campuran.

Hasil monitoring menunjukkan adanya senyawa hasil isolasi dengan noda tunggal dan campuran, noda tunggal yang terbentuk pada KLT menunjukkan tingkat pemisahan yang baik dari suatu senyawa. Enam isolat tunggal yang didapat pada penelitian ini yaitu ditunjukkan pada Tabel 4.1 diduga merupakan 1 isolat steroid dan 5 isolat triterpenoid. Penelitian Iyani (2017) melaporkan hasil pemisahan *Chorella* sp. dengan kromatografi kolom sistem elusi isokratik hanya menghasilkan 1 fraksi steroid dan 2 fraksi triterpenoid. Hal ini menunjukkan bahwa dengan sistem elusi gradien senyawa pada sampel akan lebih banyak terisolasi dari pada sistem elusi isokratik.

Efisiensi kolom dapat dipengaruhi oleh difusi Eddy yang disebabkan adanya perbedaan bentuk, ukuran partikel pengisi kolom, cara pengisian kolom, dan diameter kolom (Mabrouk, 2013). Difusi eddy pada sistem elusi gradien memungkinkan terjadinya proses pemisahan senyawa yang lebih banyak karena senyawa akan terdistribusi sepanjang kolom dengan berbagai komposisi eluen. Komposisi eluen yang berbeda akan memberikan interaksi senyawa dengan fasa diam maupun fase gerak secara maksimal berdasarkan tingkat kepolaran senyawa. Sistem elusi isokratik memungkinkan interaksi senyawa dengan fasa diam dan fase gerak sangat terbatas yaitu dengan satu variasi eluen, sehingga senyawa pada sampel tidak banyak terpisah .

Hasil pada Tabel 4.1 menunjukkan bahwa isolat A merupakan gabungan vial 1-11 yang tidak terdeteksi noda dan warnanya saat disinari UV 254 dan 366

nm. Hal ini dapat dinyatakan bahwa hasil monitoring pada isolat A tidak dapat diduga jenis senyawa yang terpisah karena tidak memberikan noda saat pemisahan dengan n-heksana : etil asetat (17:3). Hasil tersebut juga sama pada penelitian Utama (2018) yang melaporkan bahwa hasil monitoring dalam isolasi alga merah pada vial awal yaitu pada kisaran vial 1-34 juga tidak terdeteksi noda dan warnanya saat disinari UV 254 dan 366 nm.

Tabel 4.1 Hasil Monitoring Kromatografi Kolom dengan KLTA

Isolat	Vial	Warna UV _{254/366}	Jarak Senyawa (cm)	Jarak Elusi (cm)	R _f	Dugaan Senyawa
A	1-11	-	-	-	-	-
B	12-20	Hitam	6,4	8	0,800	Steroid*
C	44-52	Merah	4,2	8	0,525	Triterpenoid**
D	53-67	Merah	4,2	8	0,525	Triterpenoid**
E	68-77	Merah	3,5	8	0,437	Triterpenoid
		Merah	3,5	8	0,437	
F	96-112	Merah	1,6	8	0,200	Triterpenoid**
G	113-137	Merah	1,6	8	0,200	Triterpenoid
		Merah	1,0	8	0,125	
H	138-158	Merah	1,0	8	0,125	Triterpenoid
I	159-193	Merah	1,0	8	0,125	Triterpenoid**
		Merah	0,6	8	0,075	
J	194-214	Merah	1,0	8	0,125	Triterpenoid**
		Merah	0,6	8	0,075	
		Merah	0,3	8	0,037	
K	215-2 33	Merah	1,0	8	0,125	Triterpenoid
		Merah	0,3	8	0,037	
L	234-276	Merah	0,3	8	0,037	Triterpenoid**

Sumber: *Risnafiani, dkk., (2015), **Etika dan Suryelita, (2014)

Isolat B yang merupakan gabungan vial 12-20 diduga sebagai senyawa steroid dengan noda hitam pada UV 254 nm. Nilai R_f yang dihasilkan pada vial 12-20 merupakan nilai tertinggi yaitu 0,800 yang menunjukkan bahwa senyawa

yang terpisah lebih terdistribusi ke dalam fase gerak yang bersifat nonpolar. Risnafiani, dkk., (2015) menyatakan bahwa terdapat senyawa steroid dari fraksi n-heksana daun buncis dengan noda hitam pada UV 254 nm dan memiliki nilai Rf 0,662. Dugaan senyawa steroid pada isolat B pada penelitian ini dilanjutkan uji toksisitasnya terhadap *Artemia salina*.

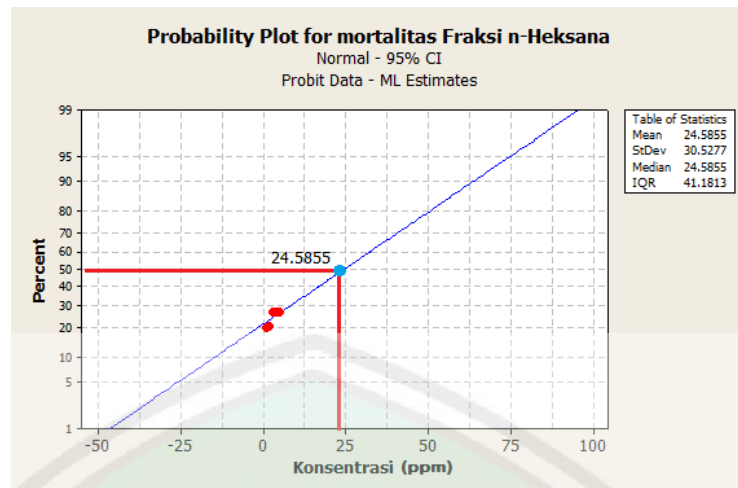
4.8 Uji Toksisitas Fraksi n-Heksana dan Isolat Hasil Kromatografi Kolom

Uji toksisitas dalam penelitian ini dilakukan pada fraksi n-heksana dan isolat B yang diduga sebagai senyawa steroid hasil kromatografi kolom. Hasil mortalitas larva udang pada fraksi n-heksana seperti Tabel 4.2 menunjukkan bahwa rata-rata kematian larva dalam konsentrasi 1-5 ppm menghasilkan angka yang fluktuatif.

Tabel 4.2. Mortalitas Larva Udang Fraksi n-heksana

Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva yang Mati (Ekor)						% Mortalitas	Mortalitas
	I	II	III	IV	V	Modus		
0 ₁	0	0	0	0	0	0	0	0
0 ₂	0	0	0	0	0	0	0	0
0 ₃	0	0	3	0	0	0	0	0
1	2	3	1	2	2	2	20	10
2	4	2	1	2	2	2	20	10
3	3	3	2	2	2	3	30	15
4	1	0	3	3	1	3	30	15
5	2	0	1	2	2	2	20	10

Keterangan kontrol: 0₁ = 0 ppm, 0₂ = Pelarut, 0₃ = DMSO



Gambar 4.2 Model Regresi Linier Probit Uji Fraksi n-Heksana pada MINITAB

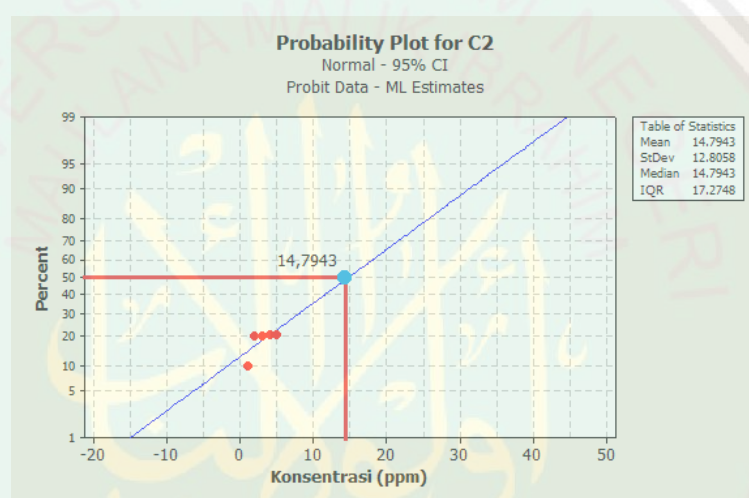
Berdasarkan Gambar 4.2 dapat diketahui bahwa nilai 50% mortalitas (LC_{50}) pada fraksi n-heksana menunjukkan adanya hubungan linearitas antara konsentrasi dan nilai mortalitas. Semakin fluktuatif suatu data mortalitas yang didapat maka akan menghasilkan titik pertemuan garis linear pada konsentrasi yang tinggi atau nilai LC_{50} yang semakin besar. Hasil mortalitas larva udang dalam isolat B seperti pada Tabel 4.3 menunjukkan bahwa rata-rata kematian larva stabil seiring tingginya konsentrasi 1-5 ppm.

Nilai 50% mortalitas pada isolat B didapat titik pertemuan garis linier terhadap konsentrasi seperti pada Gambar 4.3. Gambar tersebut menunjukkan bahwa nilai LC_{50} pada isolat B didapat sebesar 14,794 ppm. Penelitian Hafiz (2017) melaporkan bahwa hasil LC_{50} ekstrak metanol *H. verticillata* didapat sebesar 633,171 ppm, sedangkan pada penelitian ini didapat hasil LC_{50} fraksi n-heksana 24,585 ppm dan isolat B 14,794 ppm. Berdasarkan kedua data tersebut menjelaskan bahwa fraksi n-heksana dan isolat B hasil kromatografi kolom yang diduga terdapat senyawa steroid memiliki daya toksik tinggi terhadap hewan uji.

Tabel 4.3. Mortalitas Larva Udang Isolat B

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

Keterangan kontrol: 0₁ = 0 ppm, 0₂ = Pelarut, 0₃ = DMSO



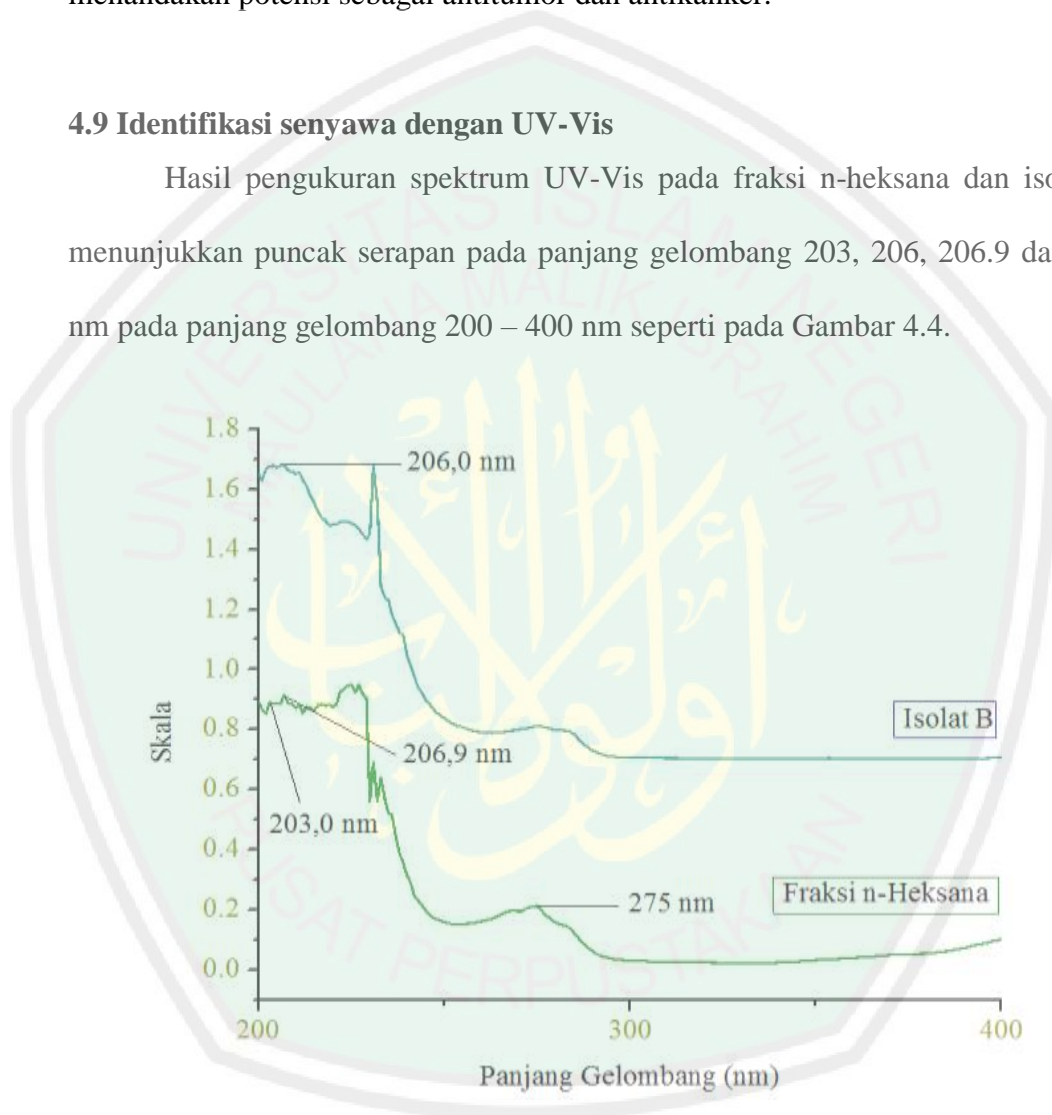
Gambar 4.3 Model Regresi Linier Probit Uji Isolat B pada MINITAB

Aktivitas toksik dari masing-masing sampel pada penelitian ini disebabkan adanya senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada fraksi n-heksana dan isolat B. Senyawa metabolit sekunder seperti steroid yang memiliki gugus -OH dapat mengikat integral protein pada membran sel. Menurut Budaraga, dkk., (2016) dalam penelitiannya pada *Cinnamomum burmanni* menyatakan bahwa gugus -OH pada senyawa flavonoid dapat mengikat integral protein pada membran sel larva. Hal tersebut dapat menghambat transpor aktif ion Na⁺/K⁺

sehingga akan menyebabkan integral protein pada membran sel mengembang karena ion Na^+/K^+ terakumulasi dalam sel dan pecah. Hal inilah yang dapat menyebabkan larva udang mati. Nilai LC_{50} dari kedua sampel uji pada penelitian ini masing-masing <30 ppm, menurut McLaughlin (1991) hasil tersebut menandakan potensi sebagai antitumor dan antikanker.

4.9 Identifikasi senyawa dengan UV-Vis

Hasil pengukuran spektrum UV-Vis pada fraksi n-heksana dan isolat B menunjukkan puncak serapan pada panjang gelombang 203, 206, 206.9 dan 275 nm pada panjang gelombang 200 – 400 nm seperti pada Gambar 4.4.



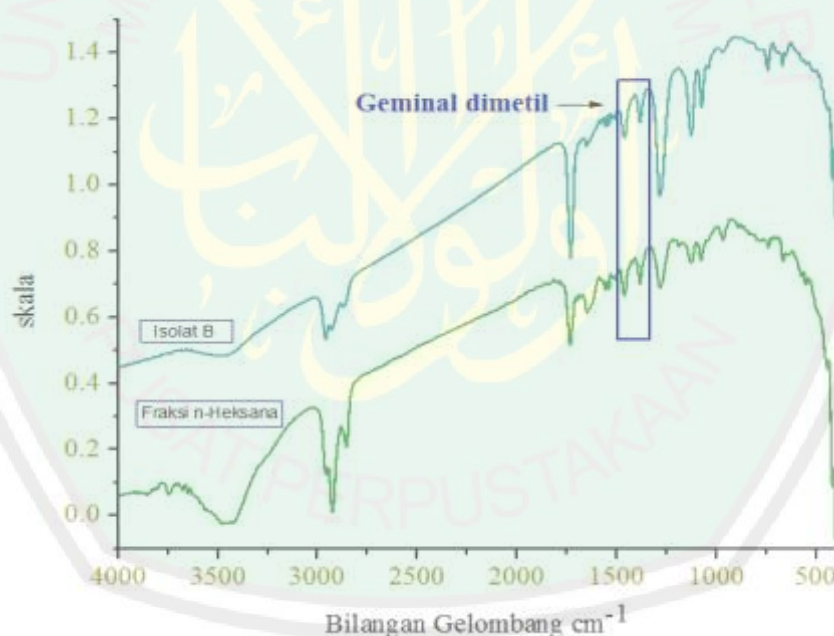
Gambar 4.4 Hasil Spektra UV-Vis Fraksi n-Heksana dan Isolat B

Hasil identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis tersebut menunjukkan bahwa terdapat transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ pada fraksi n-heksana dan isolat B yaitu ditandai dengan adanya panjang gelombang di 203, 206, dan 206,9 nm . Hal ini

disebabkan karena adanya ikatan rangkap C=C yang tidak terkonjugasi pada panjang gelombang < 215 nm (Hartini dan Suyatno, 2016). Hasil spektra pada fraksi n-heksana juga menunjukkan adanya panjang gelombang 275 nm yang merupakan transisi elektron $n \rightarrow \pi^*$ (Murdianto, dkk., 2010).

4.10 Identifikasi senyawa dengan FT-IR

Hasil identifikasi fraksi n-heksana dan isolat B menggunakan spektroskopi FTIR seperti pada Gambar 4.5. Serapan gugus khas senyawa steroid yang terdeteksi yaitu adanya serapan gugus C=C, OH sekunder, dan $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$. Serapan geminal dimetil ($-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) adalah serapan khas dari senyawa steroid dan triterpenoid (Astuti, dkk., 2014).



Gambar 4.5 Hasil Spektra FTIR Fraksi n-Heksana dan Isolat B

Berdasarkan Gambar 4.5 dapat diketahui bahwa gugus khas senyawa steroid muncul pada spektra fraksi n-heksana dan isolat B yaitu adanya serapan geminal dimetil yang mempunyai perbedaan intensitas. Gugus geminal dimetil

pada fraksi n-heksana muncul pada serapan $1450,972\text{ cm}^{-1}$ dan $1383,523\text{ cm}^{-1}$., sedangkan pada isolat B muncul pada serapan $1461,072\text{ cm}^{-1}$ dan $1383,282\text{ cm}^{-1}$. Interpretasi hasil spektra FTIR dari fraksi n-heksana dan isolat B dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Interpretasi Spektra FTIR Fraksi n-Heksana dan Isolat B

No	Bilangan Gelombang (cm^{-1}) Fraksi n-Heksana	Bilangan Gelombang (cm^{-1}) Isolat B	Range Pustaka (cm^{-1}) (Socrates, 1994)	Jenis Vibrasi
1.	3463,734	3480,167	3550 – 3250	OH (<i>stretch</i>)
2.	2926,224	2958,892	3000 – 2800	C sp_3 -H (<i>stretch</i>)
3.	1733,408	1730,714	1780 – 1730	C=O
4.	1649,504	1652,073	1690 – 1620	C=C (<i>stretch</i>)
5.	1450,972	1461,072	1600 – 1450	C–C (<i>stretch</i>)
6.	1383,523	1383,282	1395 – 1365	-C(CH ₃) ₂ (<i>stretch</i>)
7.	1283,816	1284,500	1300 – 1200	Alkohol sekunder
8.	1126,776	1126,065	1110 – 1300	C–O–C
9.	1077,258	1074,102	1125 – 1000	C–O alkohol Sekunder
10.	779,391	743,460	995 – 650	=C–H (<i>rocking</i>)
11.	-	668,961	995 – 650	=C–H siklik (<i>broad</i>)

4.11 Identifikasi Senyawa dengan LC-MS/MS

Hasil identifikasi menggunakan UV-Vis dan FTIR menunjukkan adanya dugaan senyawa steroid pada fraksi n-heksana dan isolat B hasil kromatografi kolom. Data identifikasi dapat didukung dengan hasil identifikasi LC-MS/MS untuk mengetahui jenis senyawa steroid yang terdapat pada kedua sampel. Hal ini

dilakukan untuk membandingkan hasil sebelum dan sesudah pemisahan dengan kromatografi kolom.

Hasil identifikasi pada fraksi n-heksana positif mengandung senyawa steroid jenis β -sitosterol, stigmasterol, fukosterol dan kampesterol. Waktu retensi pada hasil spektra massa menunjukkan kepolaran suatu senyawa, fasa diam pada kolom LC bersifat nonpolar sedangkan fasa geraknya bersifat polar. Semakin besar ukuran molekul suatu senyawa dan merupakan rantai panjang maka memiliki sifat lebih nonpolar. Berdasarkan hasil LC-MS/MS pada Tabel 4.5 urutan kepolaran dari jenis senyawa steroid pada fraksi n-heksana (polar-nonpolar) yaitu fukosterol > stigmasterol > kampesterol > β -sitosterol.

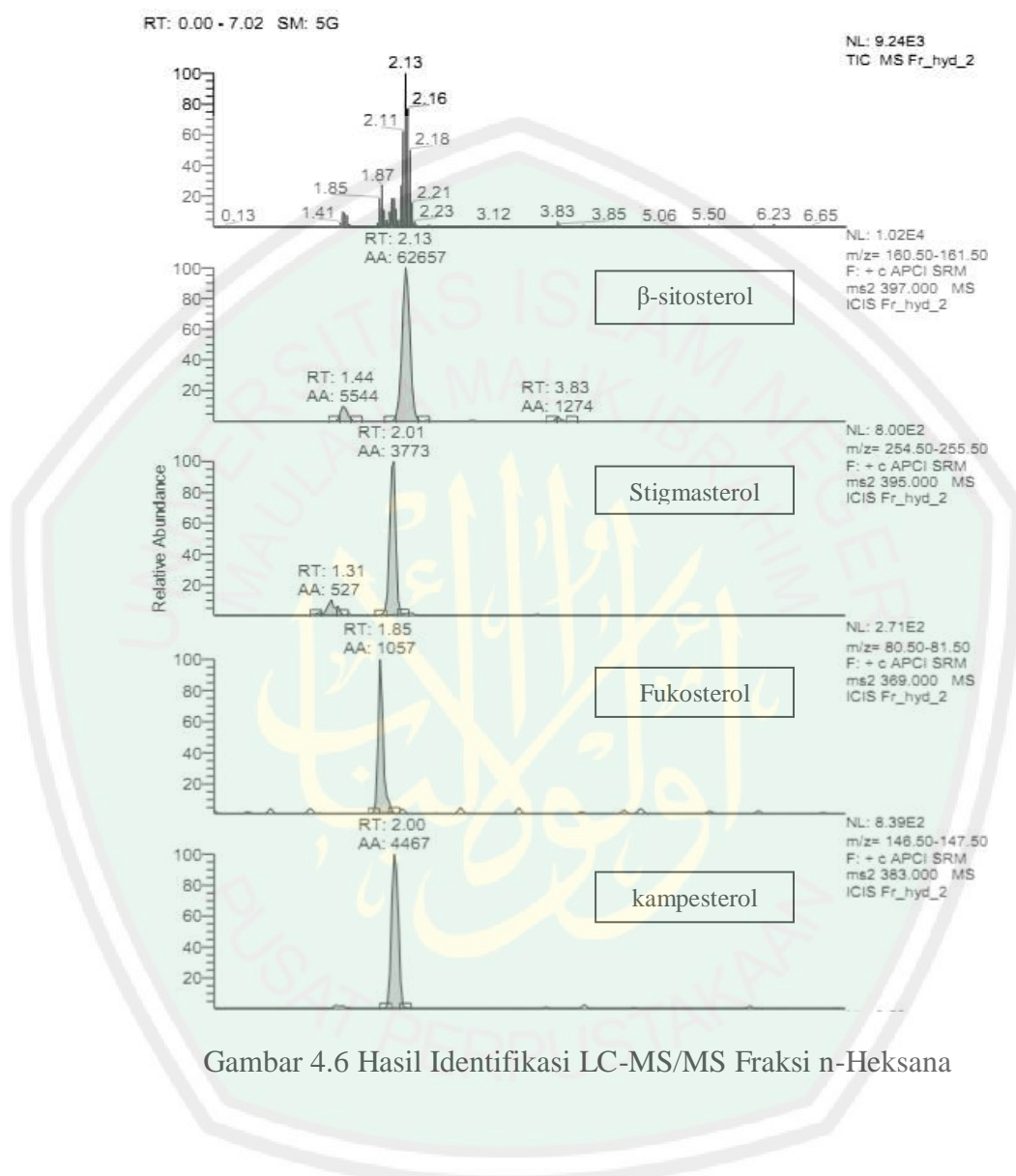
Tabel 4.5 Ion Steroid Fraksi n-Heksana yang terdeteksi oleh LC-MS/MS

Steroid	Waktu retensi (menit)	Massa (m/z)			
		M	M- H_2O+H^+	Daughter mass	AA (Luas Area)
β -Sitosterol	2,13	414	397*	160,5-161,5	62.657
Kampestrol	2,00	400	383**	146,5-147,5	4.467
Stigmasterol	2,01	412	395**	254,5-255,5	3.773
Fukosterol	1,85	386	369*	80,5-81,5	1.057

Keterangan: * Pereira, dkk., (2016), ** Mo, dkk., (2013)

Berdasarkan Tabel 4.5 dapat diketahui bahwa terdapat luas area yang digambarkan sebagai puncak dari masing-masing jenis senyawa steroid seperti pada Gambar 4.6. β -sitosterol memiliki luas area 62.657 yang menunjukkan kelimpahan senyawa terbesar pada sampel dibandingkan dengan jenis senyawa yang lainnya. Kelimpahan senyawa steroid pada fraksi n-heksana *H. verticillata* dari tertinggi hingga terendah yaitu β -sitosterol > kampesterol > stigmasterol >

fukosterol. Adapun pola fragmentasi yang terdeteksi pada LC-MS/MS seperti pada Gambar 4.8.



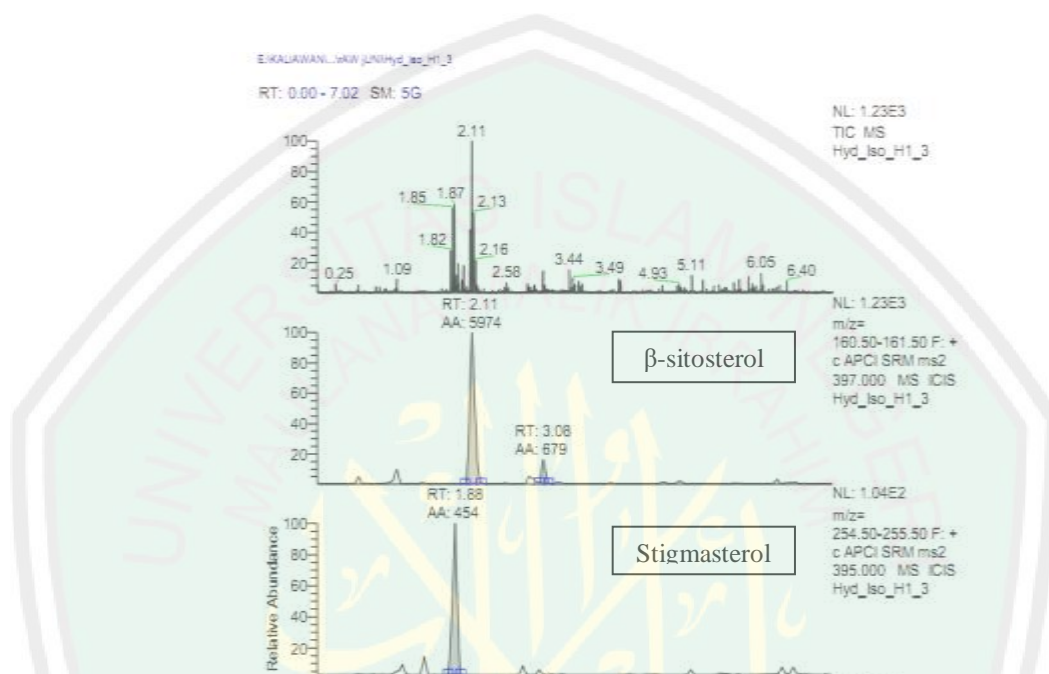
Gambar 4.6 Hasil Identifikasi LC-MS/MS Fraksi n-Heksana

Identifikasi selanjutnya dilakukan pada isolat B hasil kromatografi kolom dengan LC-MS/MS. Hasil LC-MS/MS menunjukkan adanya jenis senyawa steroid β -sitosterol dan stigmasterol dengan waktu retensi yang berbeda sesuai kepolarannya. Berdasarkan Tabel 4.6 dapat diketahui bahwa stigmasterol lebih polar dari pada β -Sitosterol.

Tabel 4.6 Ion Steroid Isolat B yang terdeteksi oleh LC-MS/MS

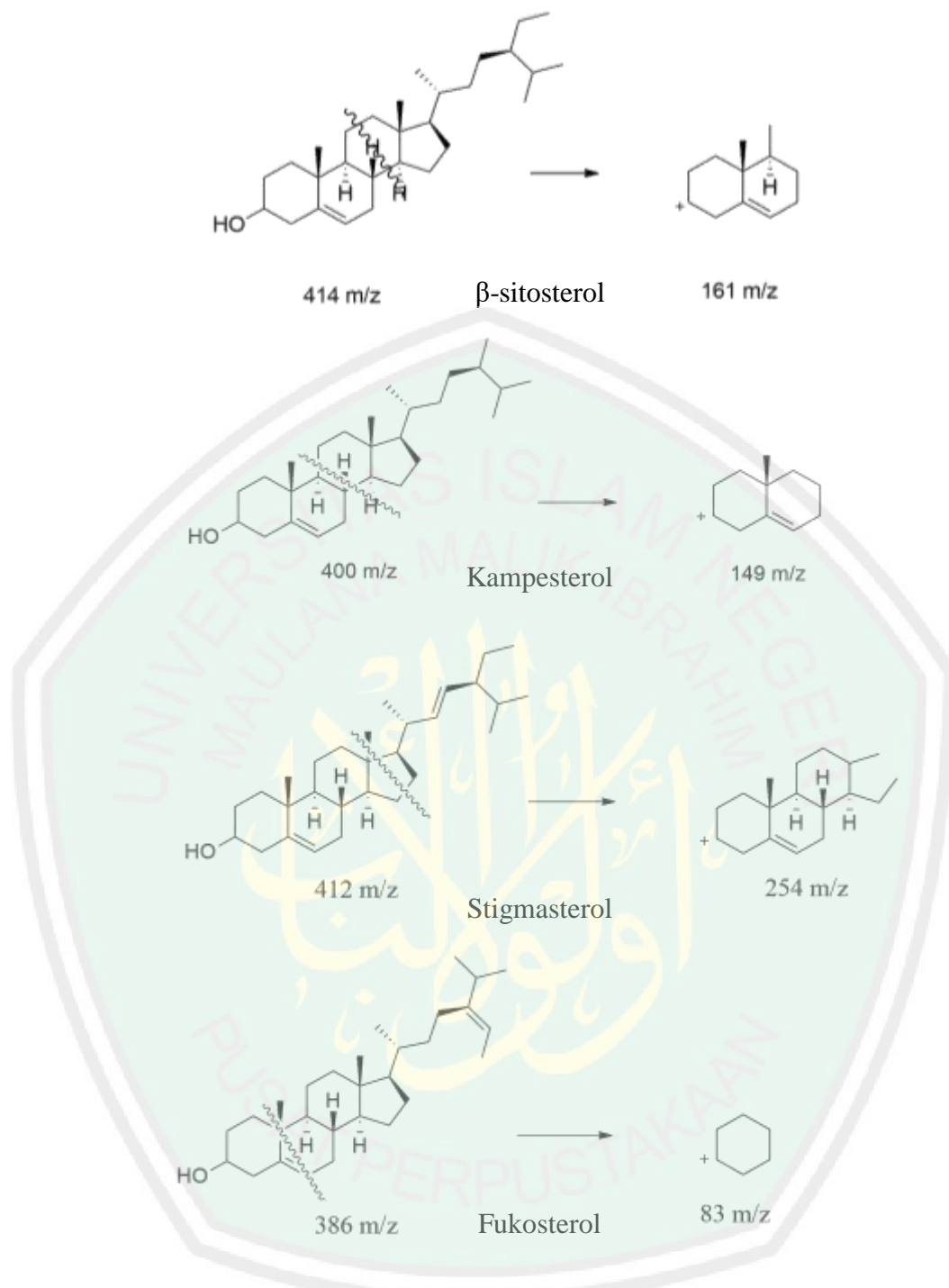
Steroid	Waktu retensi (menit)	Massa (m/z)			
		M	M-H ₂ O+H ⁺	Daughter mass	AA (Luas Area)
β -Sitosterol	2,13	414	397*	160,5-161,5	5.974
Stigmasterol	2,01	412	395**	254,5-255,5	454

Keterangan: * Pereira, dkk., (2016), ** Mo, dkk., (2013)



Gambar 4.7 Hasil Identifikasi LC-MS/MS Isolat B Hasil Kromatografi Kolom

Berdasarkan Gambar 4.7 dapat dinyatakan bahwa kelimpahan β -sitosterol yang terdeteksi pada fraksi n-heksana juga terdeteksi pada isolat B hasil kromatografi kolom. Hal ini menunjukkan bahwa isolasi senyawa pada sampel *H. verticillata* menggunakan kromatografi kolom mampu menghasilkan senyawa target berupa steroid jenis β -sitosterol yang merupakan senyawa dengan kelimpahan yang tinggi dengan luas area 5.974. Adapun pola fragmentasi senyawa yang terdeteksi pada LC-MS/MS seperti pada Gambar 4.8.



Gambar 4.8 Dugaan Fragmentasi Senyawa Steroid Hasil Identifikasi LC-MS/MS

4.12 Pemanfaatan *Hydrilla verticillata* dalam Prespektif Islam

Hydrilla verticillata merupakan tumbuhan air yang mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder. Penelitian ini mengkaji senyawa steroid dalam *H.*

verticillata untuk diisolasi menggunakan kromatografi kolom. Senyawa steroid dari *H. verticillata* menurut Nurcahyanti, dkk., (2015) dapat digunakan sebagai antikanker terhadap sel kanker payudara MCF-7.

Proses memanfaatkan tumbuhan sebagai obat merupakan salah satu sarana untuk mengambil pelajaran dan memikirkan tentang kekuasaan dan bentuk kasih sayangNya. Allah SWT menyembuhkan penyakit dengan berbagai macam sarana pengobatan yang menjadi penyebab kesembuhan. Hal ini menunjukkan bahwa semua penyakit memiliki obat penyembuhnya dan hanya Allah SWT yang dapat menyembuhkan. Sebagaimana dalam surat asy-Syu'araa' (26) : 80.

وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ

“Dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan aku” (QS asy Syu’ara’: 80).

Tanda-tanda kebesaran Allah SWT hanya dapat disadari dan diketahui oleh orang-orang ulul albab. Pengertian khusus ulul albab menurut Wassil (2009) adalah hamba-hamba Allah SWT yang memperhatikan gejala-gejala alam dan banyak menggunakan pikirannya untuk berfikir, seperti dalam firman Allah SWT dalam surat Ar-Ra'd ayat 19.

أَفَمَنْ يَعْلَمُ أَنَّمَا أُنزِلَ إِلَيْكَ مِنْ رَبِّكَ الْحَقُّ كَمَنْ هُوَ أَعْمَىٰ إِنَّمَا يَتَذَكَّرُ أُولُو الْأَلْبَابِ

“Artinya: Adakah orang yang mengetahui bahwasanya apa yang diturunkan kepadamu dari Tuhanmu itu benar sama dengan orang yang buta? hanyalah orang-orang yang berakal saja yang dapat mengambil pelajaran” (Ar-Ra'd (13):19).

Pada Ayat tersebut diatas Allah SWT menyebutkan *أُولُو الْأَلْبَابِ* yang berarti fungsi akal yang diberikan kepada manusia agar mereka dapat berfikir dan menggunakan akal tersebut untuk merenungi kebesaran Allah SWT (Qurthubi, 2009). Senyawa steroid hasil isolasi kromatografi kolom pada penelitian ini diuji toksisitasnya terhadap larva udang *Artemia salina*. Hasil uji toksisitas didapat nilai LC_{50} isolat B sebesar 14,794 ppm yang menandakan isolat bersifat toksik dan berpotensi sebagai antitumor dan antikanker. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu dimuka bumi ini dengan ukuran yang tepat dan memiliki manfaat didalamnya sebagaimana firman Allah SWT dalam surat al-Qomar ayat 49:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

“*Sesungguhnya kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*” (*al-Qomar* (54):49).

Berdasarkan tafsir Ibnu Katsir ayat tersebut diatas menjelaskan bahwa Allah SWT telah menciptakan dan menentukan ukuran masing-masing makhlukNya dan memberi petunjuk dibalik itu semua. Allah SWT telah menentukan ukuran yang sesuai tidak lebih maupun kurang. Hal tersebut menunjukkan bahwa Allah SWT sangat berlaku adil pada semua makhluk ciptaanNya, dan apapun yang terjadi sudah ditetapkan oleh Allah SWT dengan kadar dan penanganan yang sesuai.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Tingkat toksisitas isolat B hasil kromatografi kolom terhadap *Artemia salina* menunjukkan hasil LC_{50} sebesar 14,794 ppm yang berpotensi sebagai antitumor dan antikanker .
2. Hasil identifikasi isolat B pada UV-Vis didapat panjang gelombang maksimum 206 nm yang menunjukkan adanya transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ dari ikatan rangkap C=C tidak terkonjugasi. Hasil identifikasi dengan FTIR menunjukkan adanya gugus fungsi khas steroid O-H, C=C, dan $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (geminal dimetil). Hasil tersebut diperkuat dengan adanya identifikasi menggunakan LC-MS/MS dan diperoleh hasil berupa senyawa steroid β -sitosterol dan stigmasterol pada isolat B hasil kromatografi kolom.

5.2 Saran

Hasil isolasi senyawa steroid dari *Hydrilla verticillata* perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut dengan instrumentasi $^1\text{H-NMR}$ atau $^{13}\text{C-NMR}$ untuk mengetahui elucidasi struktur dari senyawa yang diisolasi. Hasil isolasi senyawa steroid juga dapat diidentifikasi pada bidang bioinformatika untuk mengetahui potensi dan pemanfaatan dari senyawa yang diisolasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Afif, S., Fasya, A. G., dan Ningsih, R. 2015. Extraction, Toxicity Assay and Identification of Active Compounds of Red Algae (*Euclima cottonii*) from Sumenep Madura. *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, 4(2): 101-106.
- Agilent Technologies. 2010. Basic of LC-MS. USA.
- Annie, S. W., Raveen, R., Paulraj, M. G., Samuel, T., dan Arivoli, S. 2016. Screening of *Hydrilla verticillata* (L. F.) Royle (*Hydrocharitaceae*) Crude Leaf Extracts for Larvicidal Efficacy Against The Filarial Vector *Culex Quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *International Journal of Entomology Research*, 1(3): 43-48.
- Anggraini, I. D., dan Nabillah. 2018. Activity Test of Suji Leaf Extract on In Vitro Cholesterol Lowering. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. 21(2): 54-58.
- AOAC, 1984. *Official methods of analysis. 11th edition*. Association of Official Analytical Chemists Inc., Washington, D.C.
- Astuti, M. D., Maulana, A., dan Kuntowati, E. M. 2014. Isolasi Steroid dari Fraksi n-Heksana Batang Bajakah Tampala (*Spatholobus littoralis Hassk*). *Prosiding Seminar Nasional Kimia*. Surabaya: Jurusan Kimia Universitas Negeri Surabaya. ISBN : 978-602-0951-00-3.
- Atun, S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Konversi Cagar Budaya Borobudur*, 8(2).
- Budaraga, I. K., Arnim, Marlida, Y., dan Bulanin, Usman. 2016. Toxicity of Liquid Smoke Cinnamon (*Cinnamomum Burmanni*) Production of Ways for Purification and Different Concentration. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 6(7): 13-21.
- Byju, K., Anuradha, V., Rosmine, E., Kumar, N. C., dan 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.
- Colegate, S. M., dan Molyneux, R. J. 2007. *Bioactive Natural Products Determination, Isolation and Structural Determination Second Edition*. Prancis: CRC Press.
- Das, B., Pal, D., dan Haldar, A. 2015. Pharmacognostical and Physiochemical Study of the Aquatic Weed *Hydrilla verticillata* (L.F) Royle Known as Nutrient Power House. *International Journal of Research in Pharmacy and Science*, 5(1): 1-5.
- Day, R. A. dan Underwood, A. L. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Jakarta : Erlangga.

- Departemen Kesehatan RI. 1994. Persyaratan Obat Tradisional. Keputusan Menteri Kesehatan RI No. 661/MENKES/SK/VII/1994.
- Department of Natural Resources. 2016. *Aquatic invasive spesies: Hydrilla*. Indianapolis. Diakses pada tanggal 8 Oktober 2018. www.in.gov/dnr/files/hydrilla.pdf.
- Desianti, N., Fasya, A. G., dan Adi, T. K.. 2014. Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*. *Skripsi*. Malang: Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Deskawi, O., Ningsih, R., Avisena, N. Dan Hastitu, E. 2015. Potensi Ekstrak Kasar The Hitam (*Camella sinesis O.K. var. Assamica*) sebagai Pewarna (Dye) pada Pembuatan Sel Surya Tersensitisasi (SSPT). *ALCHEMY*. Vol. 4 No.1. Hal: 50-59
- Diaz, B. C. A., Carretero, A. S., Gutierrez, A. F., Vega, A. B., Frenich, A. G., Vidal, J. L. M., dan Martoz, J. D. 2007. Separation and Determination of Sterol in Olive Oil by HPLC-MS. *Food Chemistry*, 7: 593-598.
- Etika, S. B., dan Suryelita. 2014. Isolasi Steroid dari Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *EKSAKTA*, 1: 60-65.
- Fariyah. 2008. Uji Toksisitas Ekstrak Daun *Ficus Benjamina* l. terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Skripsi*. Surakarta: Jurusan Kimia Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Fitri, K. N. 2017. Variasi Laju Alir pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* Metode Kromatografi Kolom. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Gandjar, I. G. dan Rohman, A. 2007. Kimia Farmasi Analisis. Yogyakarta: Pustaka belajar.
- Guenther, E. 1987. *Minyak Atsiri. Jilid I*. Terjemahan Ketaren S. Jakarta: Universitas Jakarta Press.
- Hasanah, F. 2017. Uji Toksisitas Ekstrak Etanol, Etil Asetat, dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata* (L. F) Royle dari Danau Ranu Grati Pasuruan terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Hafiz, N. M. 2017. Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Metanol, Kloroform Dan N-Heksana *Hydrilla verticillata* (L.F) Royle dari Danau Ranu Kab.Pasuruan terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Harborne. J. B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan Kosasih Padmawinta dan Iwang Soediro. Bandung: ITB.

- Hartini, R. S., dan Suyatno. 2016. Identifikasi dan Uji Pendahuluan Aktivitas Antikanker Senyawa Non Fenolik dari Ekstrak Diklorometana Batang Tumbuhan Ashitaba (*Angelica Keiskei*). *Prosiding Seminar Nasional Kimia dan Pembelajarannya*. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya. ISBN : 978-602-0951-12-6.
- Ilyas, A., Novianty, I., dan Irmayanti. 2015. Senyawa Golongan Steroid dari Ekstrak n-Heksana Kulit Batang Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) dan Uji Toksisitas Terhadap *Artemia salina* Leach. *Chimica et Natura Acta*, 3(3): 119-123.
- Imamah, N. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chorella* sp. menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasinya menggunakan Spektrofotometer FTIR. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Indrayani, L. (2014). Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) Terhadap Larva Ugang *Artemia salina* Leach. *jurnal Fakultas Sains dan Matematika*, Universitas Kristen Satya Wacana Salatiga.
- Iyani, R. 2017. Variasi Rasio Sampel terhadap Silika Gel pada Pemisahan Steroid dan Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chorella* sp. dengan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Kaur, N. and Murphy, J. B. 2012. Enhanced Isoflavone Biosynthesis In Transgenic Cowpea (*Vigna unguiculata* L) callus. Urbana Campaign, USA: University of Illinois Departement of crop science. *Academy journal-plant Mol Biol Biotechnol*, 3(1):1-8.
- Kandukuri, V., Vina, Y. J. G., Suryam, A., dan Charya, M. A. S. 2009. Phytochemicals Test of Waterhyacinth. *African Journal Microbiology Research*, 3(8): 418-421.
- Khasanah, N. F. 2018. Uji Toksisitas Senyawa Aktif Fraksi n-Heksana, Kloroform dan n-Butanol *Hydrilla verticillata* Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol dari Perairan Danau Ranu Pasuruan. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Kurniawan, M., Izzati, M., dan Nurcahyati, Y. 2010. Kandungan Klorofil, Karotenoid, dan Vitamin C pada Beberapa Spesies Tumbuhan Akuatik. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, 18(1): 32-36.
- Kumala, S., dan Sapitri, D. W. 2011. Phytochemical Screening and Toxicological Evaluation Using Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) Of Some Fraction of Prasman Leaves (*Eupatorium triolinerve* v.) extract. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 2(1): 193-197.

- Kristanti, A. N., Aminah, N. S., Tanjung, M., dan Kurniadi, B. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Langeland, A., Hesthagen, T., dan Berger, H. M. 1996. Effects of acidification due to emissions from the Kola Peninsula on fish populations in lakes near the Russian border in northern Norway. *Water, Air and Soil Pollution*, 102:17-36.
- Lenny, S. 2006. *Senyawa Terpenoida dan Steroid*. Karya Ilmiah. Medan: Jurusan Kimia Universitas Sumatera Utara.
- Lisiana, N., Hayati, E.K., Dewi, D.C. 2016. Isolasi Senyawa Alkaloid Pada Tanaman Anting-Anting (*Acalypha Indica* L) Dengan Variasi Kecepatan Laju Alir Menggunakan Kromatografi Kolom. *Alchemy Journal Of chemistry*. Malang: Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Luthfiyah, E. N. 2017. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol *Eucheuma cottonii* Perairan Wongsorejo Banyuwangi dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan LC-MS/MS. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Mardaneni, I. 2017. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Fraksi Etil Asetat Perairan Wongsorejo Banyuwangi dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis Dan LC-MS/MS. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Marer, P. J., dan Garvey, K. K. 2001. *Aquatic Pest Control*. USA: University of California.
- McLaughlin, J. L. 1991. Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality Two Simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractionation Methods in Plants. *Biochemistry journal*, 6(1): 1-30.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. dan Mc Laughlin, J. L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*. 45: 31-34.
- Misra, M. K., Panda, A., dan Sahu, D. 2012. Survey of Useful Wetland Plants of South Odisha, India. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 11(4): 658–666.
- 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.

- Mubarikah, F. A. 2017. Variasi Diameter Kolom pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* Metode Kromatografi Kolom. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Mudjiman, A. 1989. *Udang Renik Air Asin Artemia salina*. Jakarta: Penerbit Bhatara.
- Murdianto, A. R., Fachriyah, E. dan Kusriani, D. 2013. Isolasi, Identifikasi Serta Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Golongan Triterpenoid Dari Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steen) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *UNDIP Chem Inf* 1(1).
- Nazazilah, F. 2015. Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Flavonoid Alga Merah *E. spinosum* dan Identifikasi dengan Spektrofotometer FTIR. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Ningsih, E. M., Fasya, A. G., Adi, T. K. dan Hanapi, A., 2015. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid pada Fraksi n-heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma spinosum*. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Nurchayanti, O., Julaeha, E., dan Mayanti, T. 2015. Senyawa Steroid dari Kulit Batang *Dysoxylum alliceum* dan Aktivitasnya Terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7. *Chimica Et Natura Acta*, 3(2): 62-65.
- Pal, D. K., dan Nimse, S. B. 2006. Little Known Uses of Common Aquatic Plant, *Hydrilla verticillata* (Linn. f.) Royle. *Artikel: Natural Product Radiance*, 5(2): 108-111.
- Prabha, P., dan Rajkumar, J. 2015. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 7(3): 1809-1815 *Research Article Phytochemical screening and bioactive potential of Hydrilla verticillata*, 7(3): 1809-1815.
- Pereira, C. M. P., Nunes, C. F. P., Villeila, L. Z., Streit, N. M., Dias, D., Gomes, C. B., dan Colepicolo, P. 2016. Extraction of Sterols Brown Macroalga from Antarctica and Their Identification by Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry. *Artikel: Journal Applied Phycology*, <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0905-5>.
- Putri, M. E. 2014. Analisis Parameter Optimum Penyerapan Kation Zn(II) Oleh Biomassa *Hydrilla verticillata*. *Widyariset*, 17(3): 373-380.
- Qarni, A. 2008. Tafsir Muyassar Jilid 1. Jakarta: Qisthi Press.
- Qurthubi, S. I. 2009. *Tafsir Al-Qurthubi (1)*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Rahmawati, D. A. 2017. Variasi Komposisi Eluen pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Makroalga (*Eucheuma cottonii*) dengan Kromatografi Kolom

Basah. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.

Ramesh, S., Rajan, R., dan Santhanam, R. 2014. *Freshwater phytopharmaceutical compounds*. US: CRC Press.

Risnafiani, A. R., Rismawati, E., dan Aprilia, H. 2015. Karakteristik Daun Buncis (*Phaseolus vulgaris L.*) dan Identifikasi Kandungan Senyawa Steroid dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Prosiding Penelitian SPeSIA*. Bandung: Prodi Farmasi UNISBA. ISSN: 2460-6472.

Sapar, A., Kumanireng, A.S., de Voogd, N., dan Alfian, N. 2004. Isolasi dan Penentuan Struktur Metabolit Sekunder Aktif Spons *Biemna triraphis* Asal Pulau Kapodasang (Kepulauan Spermonde). *Marina Chimica Acta*, 5(1): 2-5.

Sastrohamidjojo, H. 2007. *Kromatografi*. Yogyakarta: UGM Press.

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

Sholikah, A. N. L. 2016. Isolasi Senyawa Steroid dari Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) Menggunakan Metode Kromatografi Kolom. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.

Socrates. 1994. *Infrared Characteristic Group Frequencies Tables and Charts* (Second edition). New York: John Willey and Sons Inc.

Sukadirman, Rahman, A., & Pratiwi, F.N. (2004). Uji praskrining aktivitas antikanker ekstrak eter dan ekstrak metanol *Marchantia cf. Planiloba Steph.* dengan metode uji kematian larva udang dan profil densitometri ekstrak aktif. *Skripsi*. Surabaya: Universitas Airlangga.

Suryani, E. 2011. Isolasi Dan Elusidasi Struktur Senyawa Triterpenoid dari Ekstrak Etil Asetat Kulit Batang Tumbuhan Kecapi (*Sandroricum koetjape Merr.*). *Skripsi*. Padang: Universitas Andalas.

Susetyo, E. 2015. Isolasi Golongan Senyawa Triterpenoid Fraksi Etil Asetat Alga Merah (*E. spinosum*) Hasil Ekstrak Metanol dan Identifikasi Menggunakan FTIR. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.

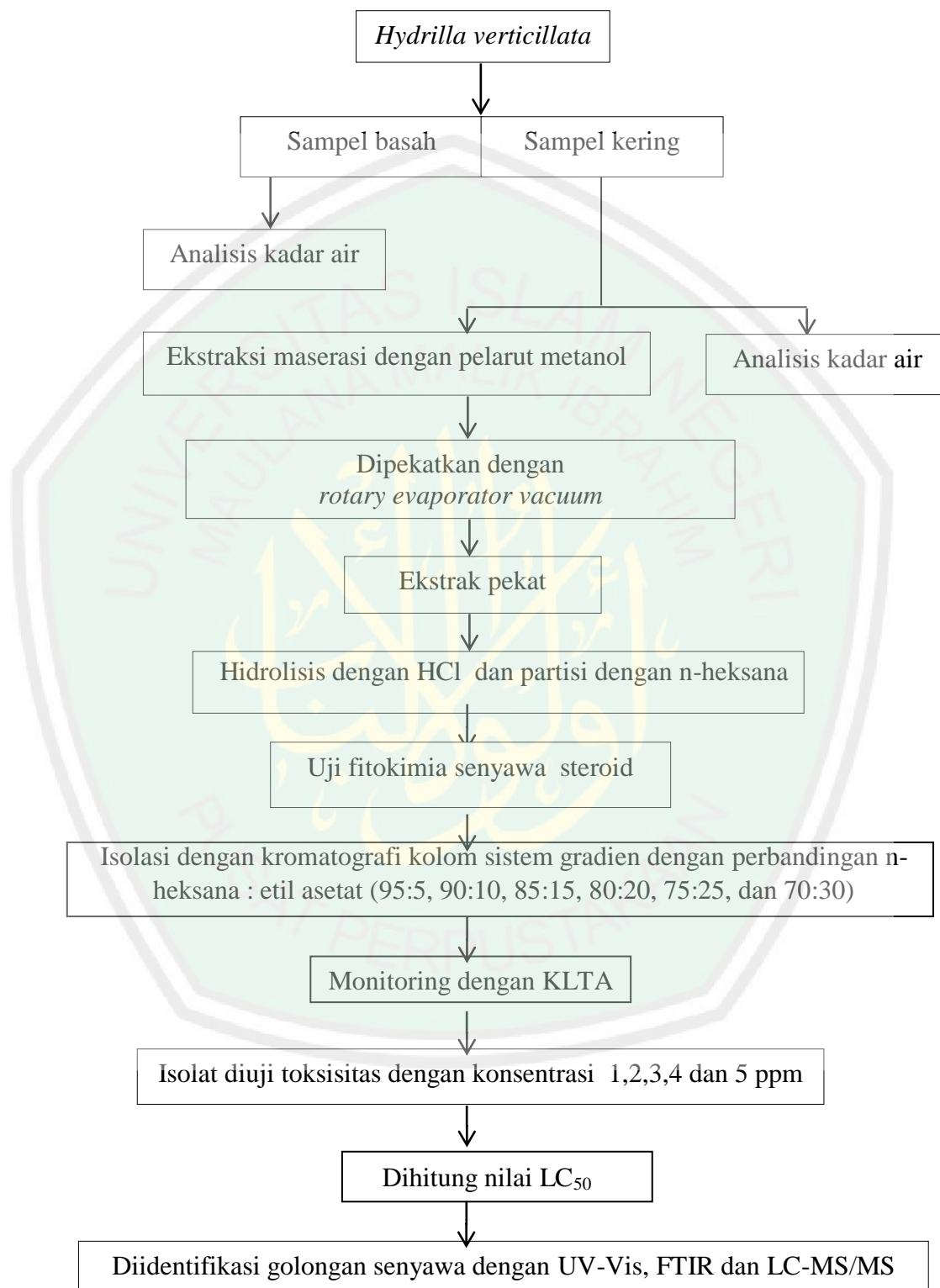
Tonius, J., Wibowo, M.A., dan Idiawati, N. 2016. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Steroid Fraksi n-Heksana Daun Buas-Buas (*Premna serratifolia L.*). *JKK*, 5(1);1-7.

Tyas, A. P. 2017. Variasi Rasio Sampel dan Silika Gel pada Isolasi Steroid dan Terpenoid Makroalga *Euchema cottonii* dengan Kromatografi Kolom

- Basah. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Utama, P. 2018. Variasi Rasio Sampel dan Silika Gel dalam Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Euchema spinosum* dengan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Vickery M. L., dan Vickery B. 1981. *Secondary Plant Metabolism*. London: The McMillan Pr Ltd.
- Vitalia, N., Najib, A. dan Ahmad, A. R. 2013. Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pletekan dengan Menggunakan etode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. Vol. 3, No. 1. Hal 124-129.
- Wassil, J. A. 2009. *Tafsir Quran Ulul Albab*. Bandung: Madania Prima.
- Xiao, Y., Wang, Y.-L., Gao, S.-X., Sun, C., dan Zhou, Z.-Y. 2007. Chemical Composition of *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle in Taihu Lake. *Chinese Journal of Chemistry*, 25(5): 661–665.
- Zhang, J. L., Liang, Y., Wang, K.L., Liao, X.J., Dheng, Z., dan Xu, S.H. 2012. Steroids with Inhibitory Activity Diversity of Marine Alga *Tydemania expeditions*. *Fitoterapia*, 83: 973 – 978.

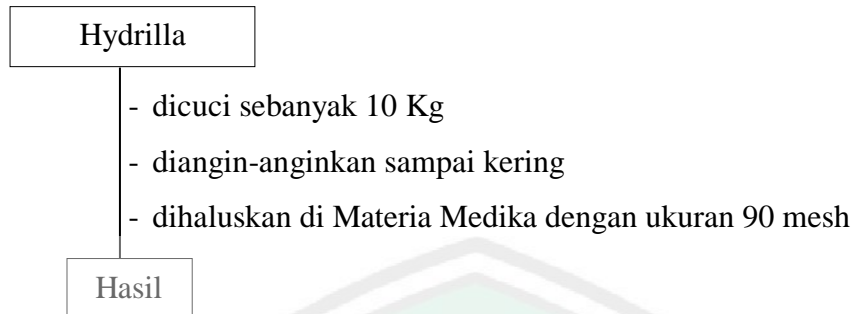
LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian

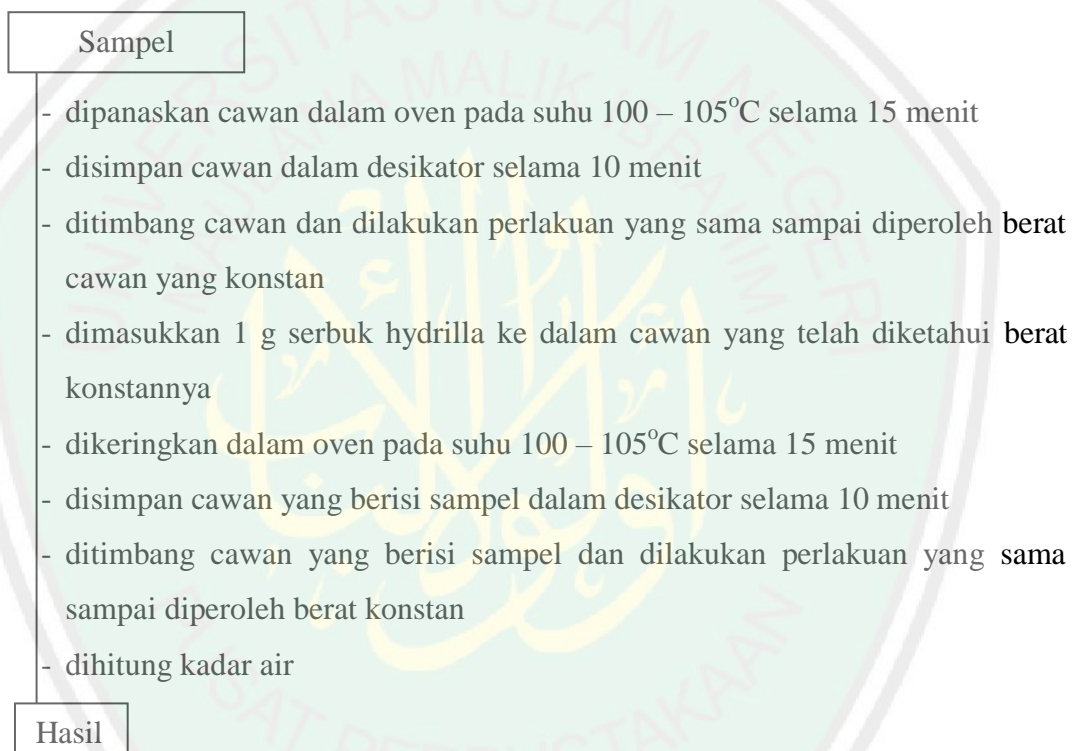


2. Diagram Alir

2.1 Preparasi Sampel



2.2 Analisis Kadar Air



2.3 Ekstraksi Sampel

Hydrilla

- ditimbang sebanyak 100 g
- diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut metanol 500 mL dalam erlenmeyer
- diaduk dan direndam menggunakan shaker dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam
- disaring dengan corong Buchner
- dimaserasi kembali dengan pelarut dan perlakuan yang sama sampai 4 kali pengulangan
- digabung filtrat yang diperoleh
- dipekatkan menggunakan rotary evaporator
- dialiri gas N₂
- ditimbang dan dihitung rendemen

Hasil

2.4 Hidrolisis dan partisi ekstrak pekat metanol

Ekstrak pekat metanol

- ditimbang sebanyak 10 g dan dimasukkan ke gelas kimia
- ditambahkan 50 mL asam klorida (HCl) 2 N
- dihidrolisis selama 1 jam menggunakan magnetik stirer hot plate pada suhu ruang
- ditambahkan natrium bikarbonat jenuh sampai pHnya netral

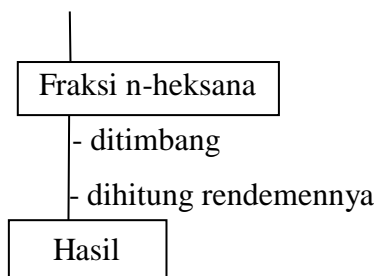
Hidrolisat

- dipartisi menggunakan 50 mL n-heksana didalam corong pisah (3x)
- dikocok dan didiamkan sampai terbentuk dua lapisan

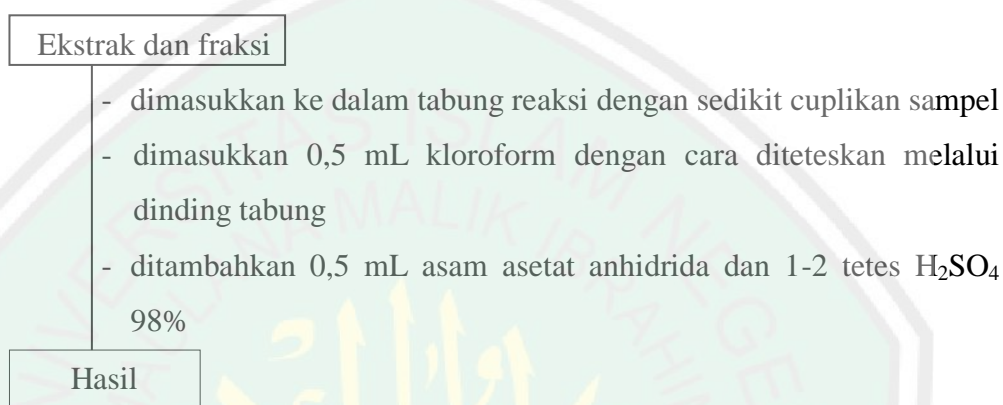
Lapisan Organik

- dimasukkan dalam gelas kimia
- dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vacum*
- dialiri gas N₂

Lapisan Air



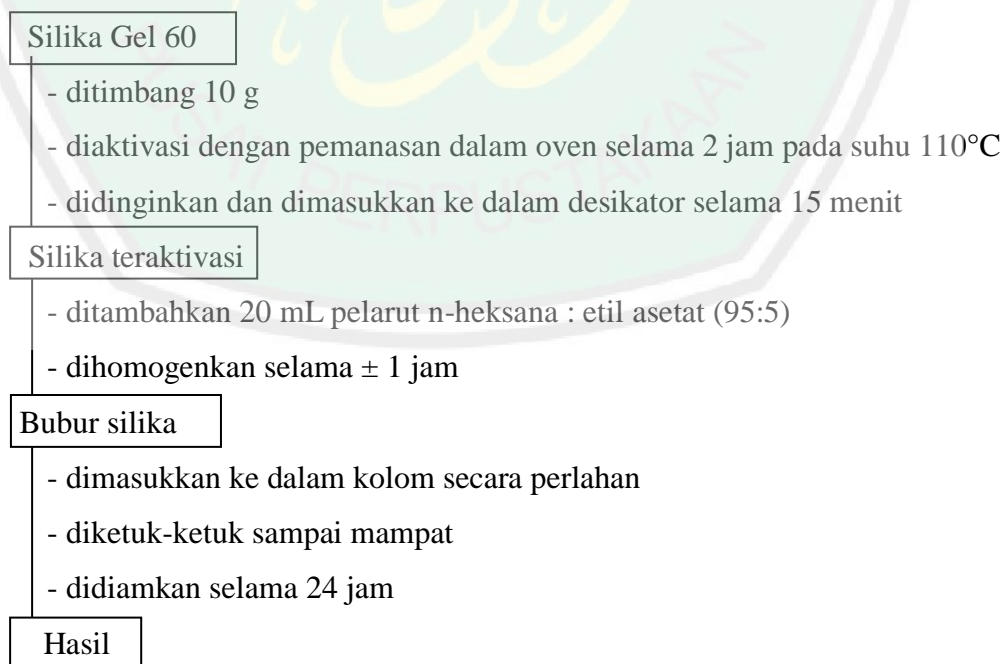
2.5 Uji fitokimia Steroid Ekstrak Metanol dan Fraksi n-heksana



Keterangan : Jika terbentuk cincin hijau / kebiruan pada hasil maka menunjukkan adanya senyawa steroid

2.6 Pemisahan senyawa steroid dengan metode Kromatografi Kolom

2.6.1 Pembuatan bubuk silika dan persiapan kolom



2.6.1 Pemisahan fraksi n-heksana dengan kromatografi kolom

Ekstrak pekat Fraksi n-heksana

- diambil 0,0667 g (yang sudah dilarutkan ke dalam 1 ml n-heksana ; etil asetat (95 : 5))
- dimasukkan kedalam kolom dan di atasnya ditambahkan sedikit silika yang teraktivasi
- dialirkan fasa gerak secara gradien n-heksana : etil asetat (95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, dan 70:30)
- ditampung eluat setiap 2 mL pada botol vial dan dilakukan pengelompokan setiap 2 fraksi
- dihentikan proses elusi setelah semua senyawa steroid diperkirakan telah keluar dari kolom

Hasil

2.7 Monitoring dengan KLTA

Fraksi hasil isolasi

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

Hasil

2.8 Penggabungan vial

Spot hasil monitoring

- ditimbang vial kosong untuk menggabungkan isolat
- digabungkan vial-vial yang mempunyai Rf dan warna noda yang sama
- ditandai isolat yang telah digabungkan dan siap dibuat larutan stok

Hasil

2.9 Uji toksisitas dengan Larva Udang *Artemia salina*

2.9.1 Penetasan Telur

Air laut 250 mL

- ditempatkan dalam wadah penetasan
- dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina*
- diaerasi selama \pm 48 jam

Hasil

2.9.2 Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia salina* l.

Isolat Steroid

- dilarutkan dengan menggunakan pelarut n-heksana 10 mL (menjadi larutan stok 50 ppm)
- larutan stok 50 ppm dipipet beberapa mL untuk membuat 1,2,3,4,5 ppm
- dimasukkan ke dalam masing-masing botol vial dengan pengulangan 5x
- diuapkan pelarutnya sampai kering
- dimasukkan 100 μ L dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti dan 2 mL air laut
- dikocok hingga ekstraknya larut
- ditandabatkan hingga 10 mL dengan air laut
- dimasukkan 10 ekor larva udang
- diamati kematian larva udang setelah 24 jam
- dianalisis datanya untuk mencari nilai LC₅₀

Hasil

2.10 Identifikasi Golongan Senyawa Steroid

2.10.1 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan UV-Vis

Fraksi n-Heksana dan Isolat Hasil Kromatografi Kolom

- dilarutkan dalam 9 mL pelarutnya
- dianalisis pada panjang gelombang 200-800 nm

Hasil

2.10.2 Identifikasi senyawa steroid menggunakan FTIR

Fraksi n-Heksana dan Isolat Hasil Kromatografi Kolom

- diuapkan dengan pelarutnya
- dicampur dengan serbuk KBr
- digerus dengan mortar agate
- dibuat pellet
- diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR

Spektra IR

2.10.3 Identifikasi jenis steroid dengan LC-MS/MS

Fraksi n-Heksana dan Isolat hasil kromatografi kolom

- diambil beberapa cuplikan
- dilarutkan dalam pelarutnya (0,1% asam format dalam air (fase A) dan 0,1% asam format dalam asetonitril (fase B) (70% fase A : 30% fase B)
- diinjekkan ke dalam tempat sampel
- dijalankan Intrumen LC-MS/MS

Hasil

Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan

3.1 Pembuatan larutan HCl 2 N

$$\begin{aligned} \text{BJ HCl pekat} &= 1,267 \text{ g/mL} \\ \text{Konsentrasi} &= 37 \% = \frac{37 \text{ g HCl}}{100 \text{ g larutan}} \\ \text{BM HCl} &= 36,5 \text{ g/mol} \\ n &= 1 \text{ (jumlah mol ion H}^+) \\ \text{mol} &= \frac{g \text{ HCl}}{Mr \text{ HCl}} = \frac{37 \text{ g}}{36,5 \text{ g/mol}} = 1,014 \text{ mol} \\ 100 \text{ gram larutan} &= \frac{100 \text{ g}}{1,267 \text{ g/mL}} = 78,9 \text{ mL} = 0,0789 \text{ L} \\ \text{Molaritas} &= \frac{\text{mol}}{L} = \frac{1,014 \text{ mol}}{0,0789 \text{ L}} = 12,85 \text{ M} \\ \text{Normalitas} &= n \times \text{Molaritas} \\ &= 1 \times 12,85 \text{ M} = 12,85 \text{ N} \\ N_1 \cdot V_1 &= N_2 \cdot V_2 \\ 12,85 \text{ N} \cdot V_1 &= 2 \text{ N} \cdot 100 \text{ mL} \\ V_1 &= 15,6 \text{ mL} \end{aligned}$$

Adapun prosedur pembuatannya adalah diambil larutan HCl pekat 37% sebanyak 15,6 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL yang berisi 15 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

3.2 Pembuatan larutan NaHCO₃ jenuh

Kelarutan NaHCO₃ sebesar 9,99 gr dalam 100 mL aquades. Sehingga untuk membuat larutan NaHCO₃ jenuh ditimbang NaHCO₃ dengan berat > 9,99 gr (sampai terdapat endapan padatan yang tidak larut). Lalu disaring larutan tersebut untuk memisahkan residu dan filtrat sehingga didapatkan larutan NaHCO₃ jenuh.

3.3 Pembuatan Reagen Liebermann-Burchard

Reagen Liebermann Burchard digunakan untuk uji warna steroid, bahan yang dibutuhkan yaitu kloroform 96% (0,5 mL), anhidrida asetat (0,5 mL), asam Sulfat 98% (1,2 mL). Masing-masing bahan tersebut dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi sampel, lalu diamati perubahan warnanya.

3.4 Pembuatan Eluen n-heksana : etil asetat

Eluen yang digunakan untuk elusi pada pemisahan dengan kromatografi kolom dan untuk monitoring dengan KLTA yaitu menggunakan perbandingan n-heksana : etil asetat.

3.4.1 Eluen Kromatografi kolom

Tabel 1. perbandingan volume n-heksana dan etil asetat

Perbandingan	Volume n-heksana (mL)	Volume Etil asetat (mL)
95 : 5	95	5
90 : 10	90	10
85 : 15	85	15
80 : 20	80	20
75 : 25	75	25
70 : 30	70	30

Keterangan : Setiap perbandingan sudah tertera mengenai volume yang harus dipipet pada masing-masing pelarut hingga total volume pada setiap perbandingan adalah 100 mL.

3.4.2 Eluen monitoring KLTA

Eluen yang digunakan untuk monitoring KLTA hasil kromatografi kolom adalah n-heksana : etil asetat perbandingan 17:3 dalam 20 mL.

- Volume n-heksana (17 dalam 20 mL)

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

- Volume etil asetat (3 dalam 20 mL)

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

Jadi untuk membuat eluen n-heksana : etil asetat 17:3 dalam 20 mL diperlukan 17 mL n-heksana dan 3 mL etil asetat.

3.5 Pembuatan Konsentrasi Larutan Isolat untuk Uji Toksisitas

3.5.1 Pembuatan Larutan stok Isolat B

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

Larutan stok (ppm) = 20,4 mg dalam 10 mL pelarutnya

$$\text{ppm} = \frac{20,4 \text{ mg}}{0,01 \text{ L}}$$

$$= 2040 \text{ ppm}$$

Jadi, Fraksi B yang diduga sebagai senyawa target didapat 20,4 mg dan dilarutkan dalam 10 mL n-heksana sehingga menjadi larutan stok 2040 ppm. Untuk membuat konsentrasi larutan 1,2,3,4 dan 5 ppm dari larutan stok 2040 ppm maka dibuat larutan stok 500 ppm terlebih dahulu.

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

$$V_1 \times 2040 \text{ ppm} = 0,01 \text{ L} \times 500 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{0,01 \text{ L} \times 500 \text{ ppm}}{2040 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 0,0024 \text{ L}$$

Pembuatan konsentrasi larutan 1,2,3,4 dan 5 ppm yang diambil dari 10 mL larutan stok 500 ppm sebagai berikut.

Larutan Stok	Volume yang diambil (mL)	Konsentrasi Larutan (ppm)
500 ppm	0,02	1
	0,04	2
	0,06	3
	0,08	4
	0,1	5

3.5.2 Pembuatan Larutan Uji Isolat C, E, F, dan H

Contoh pembuatan larutan uji isolat C

- ppm = mg/L
- Larutan stok (ppm) = 0,6 mg dalam 10 mL pelarutnya
- $\text{ppm} = \frac{0,6 \text{ mg}}{0,01 \text{ L}}$
= 60 ppm

Jadi, Isolat C didapat 0,6 mg dan dilarutkan dalam 10 mL n-heksana untuk dijadikan larutan stok 60 ppm. Untuk membuat konsentrasi larutan 5 ppm dari larutan stok 60 ppm maka diambil 0,83 mL.

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

$$V_1 \times 60 \text{ ppm} = 0,01 \text{ L} \times 5 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{0,01 \text{ L} \times 5 \text{ ppm}}{60 \text{ ppm}} = 0.83 \text{ mL}$$

Jadi untuk membuat Larutan uji isolat E,F dan H sebagai berikut.

Isolat	Berat Isolat (mg)	Larutan Stok (ppm) dalam 10 mL	Volume yang diambil (mL)	Konsentrasi larutan (ppm)
C	0,6	60	0,83	5
E	1,0	100	0,50	5
F	2,2	220	0,22	5
H	2,0	200	0,25	5

Keterangan: Masing-masing Larutan uji isolat C, E, F, dan H dibuat dalam konsentrasi 5 ppm yang selanjutnya di uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina*.

Lampiran 4. Data Pengamatan dan Perhitungan

4.1 Data Pengukuran Kadar Air Sampel Kering *Hydrilla verticillata*

4.1.1 Data Berat Cawan Kosong

Ulangan Cawan	Berat Cawan Kosong (g)				Berat Konstan (g)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
A1	44,0870	44,0833	44,0824	44,0826	44,0826
A2	41,3260	41,3219	41,3226	41,3224	41,3224
A3	54,2508	54,2487	54,2480	54,2481	54,2481

Keterangan: A = Cawan, P = ulangan

Berat cawan kosong yang sudah konstan kemudian ditambah 1 g serbuk *Hydrilla verticillata* dan ditimbang kembali sampai berat konstan pada data berat cawan + sampel

4.1.2 Data Berat Cawan+sampel

Ulangan Sampel	Berat Cawan + Sampel (g)				Berat Konstan (g)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
A1	45,0809	45,0130	45,0126	45,0128	45,0128
A2	42,3212	42,2598	42,2597	42,2598	42,2598
A3	55,2416	55,1750	55,1755	55,1748	55,1748

Keterangan: A = Cawan, P = ulangan

Data Berat konstan yang diperoleh adalah data berat cawan+sampel konstan yang akan dihitung kadar airnya

1. Kadar Air Sampel pada Cawan A1

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\ &= \frac{(45,0809 - 45,0128) \text{ g}}{(45,0809 - 44,0826) \text{ g}} \times 100\% \\ &= 6,8\% \end{aligned}$$

2. Kadar Air Sampel pada Cawan A2

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan dioven})} \times 100\% \\ &= \frac{(42,3212 - 42,2598) \text{ g}}{(42,3212 - 41,3224) \text{ g}} \times 100\% \\ &= 6,1\% \end{aligned}$$

3. Kadar Air Sampel pada Cawan A3

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\ &= \frac{(55,2416 - 55,1748) \text{ g}}{(55,2416 - 54,2481) \text{ g}} \times 100\% \\ &= 6,7\% \end{aligned}$$

Kadar air rata-rata yang terkandung pada sampel kering *Hydrilla verticillata* adalah **6,5%**.

4.2 Perhitungan Rendemen

4.2.1 Ekstrak Metanol

$$\text{Berat gelas kosong} = 176,0684 \text{ g}$$

$$\text{Berat gelas kosong + ekstrak pekat} = 179,6951 \text{ g}$$

$$\text{Berat ekstrak pekat} = 3,6267 \text{ g}$$

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat Sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{3,6267 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 3,62\% \end{aligned}$$

4.2.2 Fraksi n-Heksana

Berat gelas kosong = 181,110 g

Berat gelas kosong + fraksi pekat = 185,905 g

Berat ekstrak pekat = 4,795 g

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat Sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{4,795 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 47,95$$

Keterangan : Berat sampel yang dihidrolisis dan partisi adalah sampel gabungan dari tim *Hydrilla verticillata* yaitu sebanyak 10 g, hal ini dikarenakan rendemen yang didapat pada penelitian ini sangat sedikit yaitu ± 3 g.



Lampiran 5. Penggabungan Vial dan Hasil Monitoring Menggunakan KLTA

5.1 Hasil Monitoring Kromatografi Kolom Menggunakan KLTA

Isolat	Vial	Warna UV _{254/366}	Jarak Senyawa (cm)	Jarak Elusi (cm)	R _f	Dugaan Senyawa
A	1-11	-	-	-	-	-
B	12-20	Hitam	6,4	8	0,800	Steroid*
C	44-52	Merah	4,2	8	0,525	Triterpenoid**
D	53-67	Merah	4,2	8	0,525	Triterpenoid**
E	68-77	Merah	3,5	8	0,437	Triterpenoid
F	96-112	Merah	1,6	8	0,200	Triterpenoid**
G	113-137	Merah	1,6	8	0,200	Triterpenoid**
H	138-158	Merah	1,0	8	0,125	Triterpenoid
I	159-193	Merah	1,0	8	0,125	Triterpenoid**
J	194-214	Merah	0,6	8	0,075	Triterpenoid**
K	215-2 33	Merah	1,0	8	0,125	Triterpenoid
L	234-276	Merah	0,3	8	0,037	Triterpenoid**

Sumber: *Risnafiani, dkk., (2015), **Etika dan Suryelita, (2014)

Lampiran 6. Data Hasil Uji Toksisitas

6.1 Data Hasil Uji Toksisitas Fraksi n-Heksana

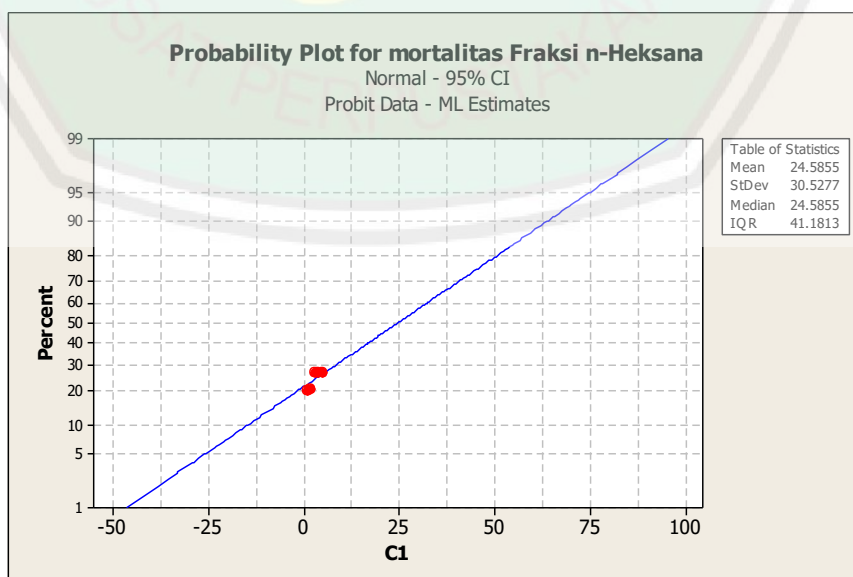
Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva yang Mati (Ekor)					Modus	% Mortalitas
	I	II	III	IV	V		
0 ₁	0	0	0	0	0	0	0
0 ₂	0	0	0	0	0	0	0
0 ₃	0	0	3	0	0	0	0
1	2	3	1	2	2	2	20
2	4	2	1	2	2	2	20
3	3	3	2	2	2	3	30
4	1	0	3	3	1	3	30
5	2	0	1	2	2	2	20

Keterangan Kontrol : 0₁ = 0 ppm, 0₂ = Pelarut, 0₃ = DMSO

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

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

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



Probit Analysis: Mortalitas Fraksi n-Heksana versus Konsentrasi

Distribution: Normal
Response Information

Variable	Value	Count
C2	Event	60
	Non-event	190
C3	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood
Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-0.805351	0.207397	-3.88	0.000
C1	0.0327571	0.0620245	0.53	0.597

Natural Response 0

Log-Likelihood = -137.630

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	2.97740	3	0.395
Deviance	2.96729	3	0.397

Tolerance Distribution

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	24.5855	40.8898	-55.5569	104.728
StDev	30.5277	57.8033	0.746400	1248.58

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-46.4326	93.7045	*	*
2	-38.1107	77.9550	*	*
3	-32.8308	67.9643	*	*
4	-28.8589	60.4501	*	*
5	-25.6281	54.3392	*	*
6	-22.8782	49.1391	*	*
7	-20.4670	44.5810	*	*
8	-18.3081	40.5012	*	*
9	-16.3447	36.7923	*	*
10	-14.5373	33.3800	*	*
20	-1.10724	8.28159	*	*
30	8.57679	10.8219	*	*
40	16.8514	26.2935	*	*
50	24.5855	40.8898	*	*
60	32.3197	55.5113	*	*
70	40.5943	71.1651	*	*
80	50.2783	89.4914	*	*
90	63.7084	114.912	*	*
91	65.5157	118.333	*	*
92	67.4792	122.050	*	*
93	69.6381	126.137	*	*
94	72.0492	130.701	*	*
95	74.7992	135.907	*	*
96	78.0300	142.024	*	*
97	82.0019	149.543	*	*
98	87.2818	159.539	*	*
99	95.6037	175.294	*	*

6.2 Data Hail Uji Toksisitas Isolat B

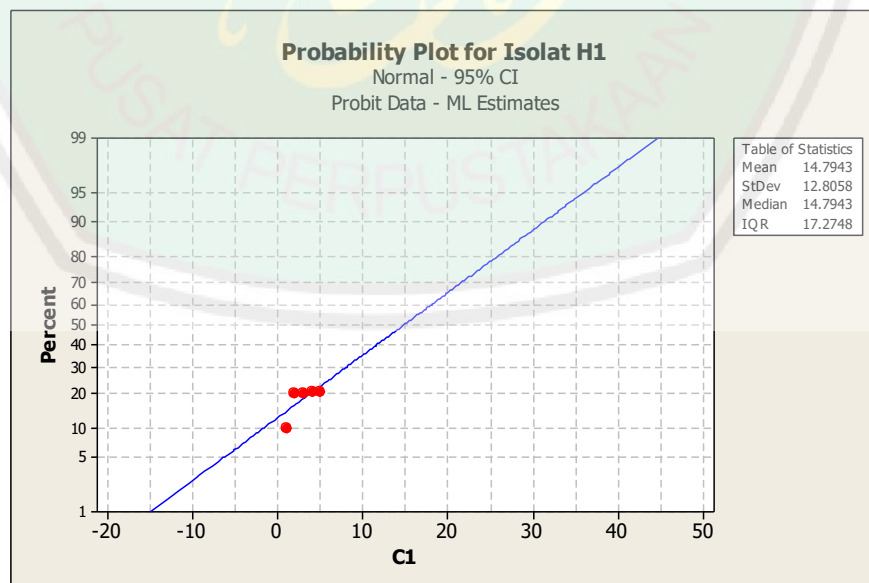
Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva yang Mati (Ekor)					Modus	% Mortalitas
	I	II	III	IV	V		
0 ₁	0	0	0	0	0	0	0
0 ₂	0	0	0	0	0	0	0
0 ₃	0	0	3	0	0	0	0
1	0	2	1	1	1	1	10
2	1	2	2	2	2	2	20
3	2	1	3	2	2	2	20
4	1	1	2	2	2	2	20
5	1	2	2	3	2	2	20

Keterangan : 0₁ = 0 ppm, 0₂ = Pelarut, 0₃ = DMSO

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

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

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



Probit Analysis: Mortalitas versus Konsentrasi

Distribution: Normal
Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas isolat	Event	45
	Non-event	205
N	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood
Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1.15528	0.226907	-5.09	0.000
konsentrasi	0.0780894	0.0665522	1.17	0.241
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -117.156

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	1.61757	3	0.655
Deviance	1.64266	3	0.650

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	14.7943	10.0281	-4.86041	34.4490
StDev	12.8058	10.9138	2.40972	68.0533

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-14.9965	15.4778	*	*
2	-11.5056	12.5136	*	*
3	-9.29081	10.6361	*	*
4	-7.62468	9.22636	*	*
5	-6.26941	8.08232	*	*
6	-5.11586	7.11138	*	*
7	-4.10442	6.26317	*	*
8	-3.19880	5.50735	*	*
9	-2.37517	4.82435	*	*
10	-1.61702	4.20117	*	*
20	4.01665	1.41788	*	*
30	8.07892	4.39796	*	*
40	11.5500	7.29000	*	*
50	14.7943	10.0281	*	*
60	18.0386	12.7778	*	*
70	21.5097	15.7256	*	*
80	25.5720	19.1796	*	*
90	31.2056	23.9735	*	*
91	31.9638	24.6189	*	*
92	32.7874	25.3200	*	*
93	33.6930	26.0910	*	*
94	34.7045	26.9521	*	*
95	35.8580	27.9343	*	*
96	37.2133	29.0884	*	*
97	38.8794	30.5072	*	*
98	41.0943	32.3935	*	*
99	44.5851	35.3667	*	*

6.3 Data Mortalitas Uji Toksisitas pada Isolat C, E, F dan H

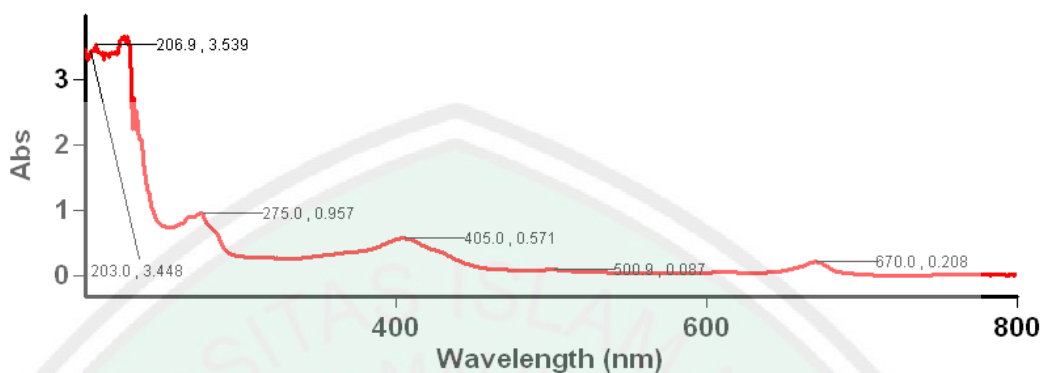
Isolat	U1	U2	U3	U4	U5	Modus
C	0	2	3	2	2	3
E	1	1	3	3	3	3
F	2	2	2	1	1	2
H	1	0	1	2	3	1

Keterangan : Isolat C, E, F dan H merupakan gabungan dari vial-vial yang memiliki noda tunggal saat dimonitoring. Isolat-isolat ini diuji toksisitasnya terhadap larva udang *Artemia salina* pada konsentrasi 5 ppm, untuk mengetahui potensi senyawa pada setiap fraksi tersebut, yang diduga sebagai senyawa triterpenoid. Isolat-isolat tersebut tidak diuji lanjut pada konsentrasi 1-5 ppm karena potensinya sangat kecil.

Lampiran 7. Data Instrumentasi Hasil Fraksi n-Heksana dan Isolat B

7.1 Data Hasil Spektrofotometer Uv-Vis Fraksi n-Heksana

Lamdha Maks Fraksi n-Heksana



Scan Analysis Report

Report Time : Fri 17 May 02:39:57 PM 2019
 Method:
 Batch: D:\Mawaddah\Lamdha Maks Fraksi n-Heksana (17-05-2019).DSW
 Software version: 3.00(339)
 Operator: Rika

Sample Name: Fraksi n-heksana

Collection Time 5/17/2019 2:40:54 PM

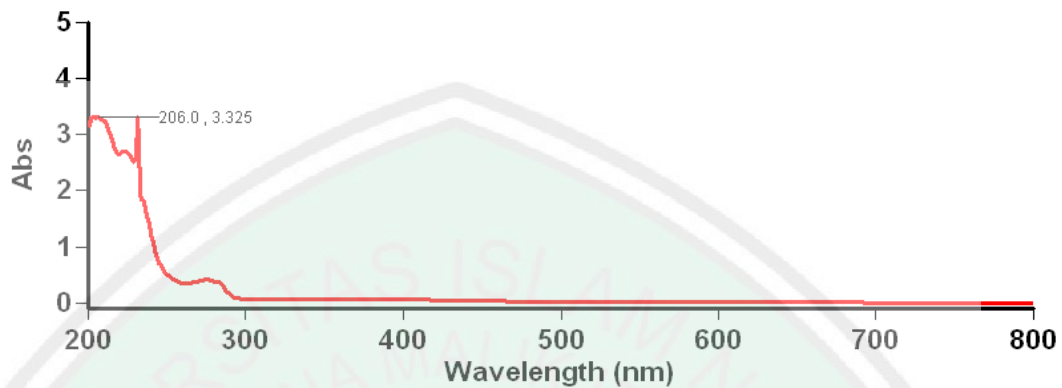
Peak Table
 Peak Style Peaks
 Peak Threshold 0.0100
 Range 800.1nm to 200.0nm

Wavelength (nm)	Abs
670.0	0.208
500.9	0.087
405.0	0.571
275.0	0.957
233.0	2.526
230.9	2.717
227.0	3.663
225.0	3.666
219.0	3.423
217.0	3.427
213.1	3.396
211.0	3.423
206.9	3.539
203.0	3.448

7.2 Data Hasil Spektrofotometer Uv-Vis Isolat B

Lamdha Maks Isolat B

Tanggal Analisa : 15 Maret 2019



Scan Analysis Report

Report Time : Wed 20 Feb 06:04:37 AM 2008

Method:

Batch: D:\Fiddieni\Lamdha Maks Steroid (27-03-2019).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: isnaeni

Sample Name: steroid

Collection Time 2/20/2008 6:04:47 AM

Peak Table

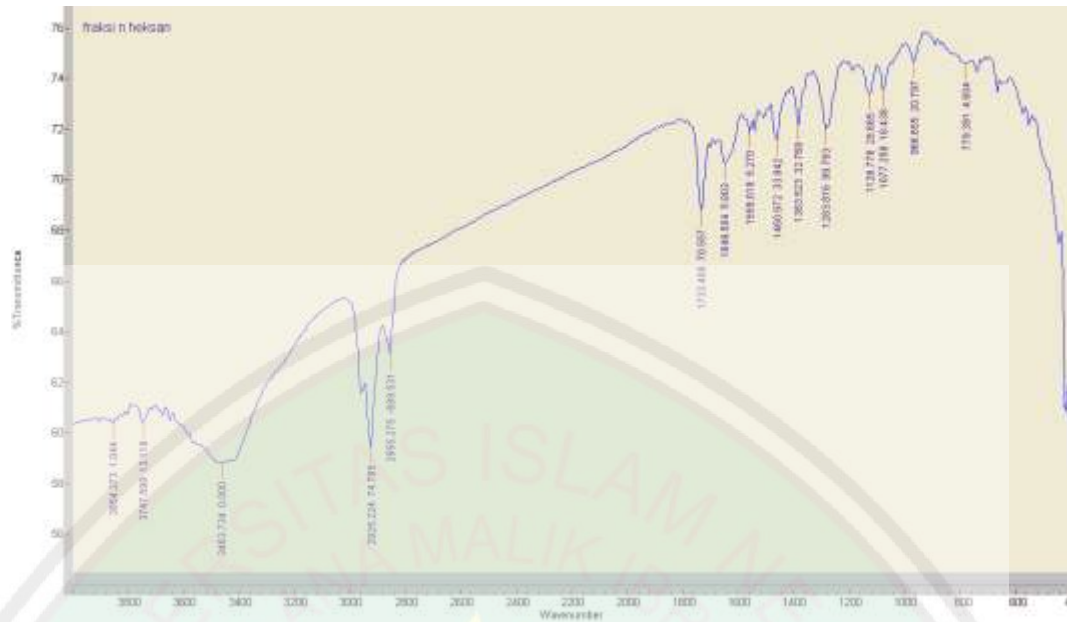
Peak Style Maximum Peak

Peak Threshold 0.0100

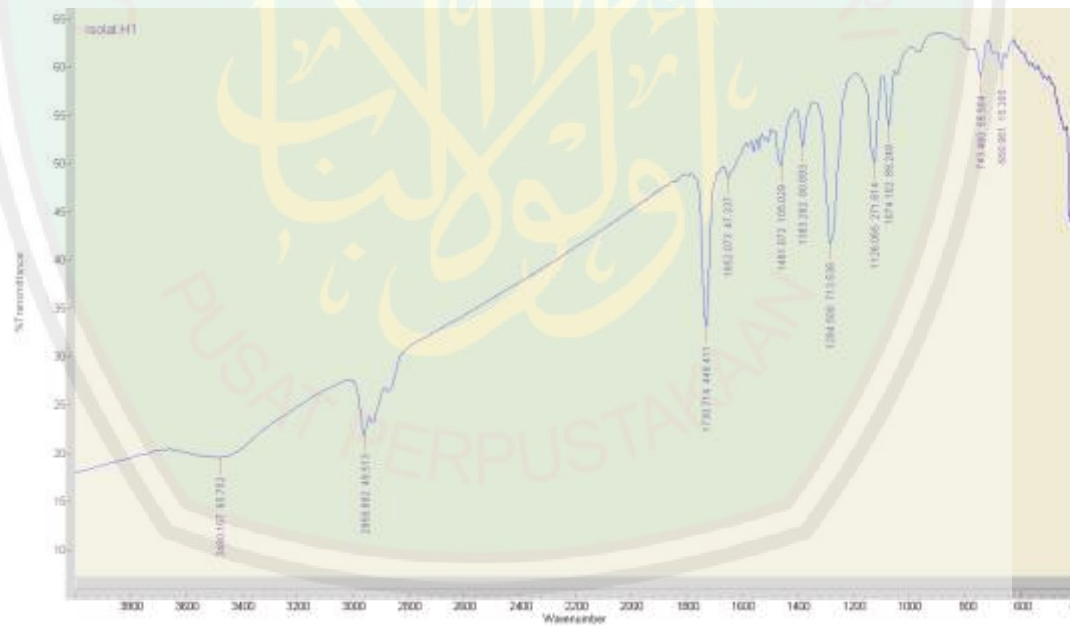
Range 799.9nm to 200.0nm

Wavelength (nm)	Abs
206.0	3.325

7.3 Data Hasil FT-IR Fraksi n-Heksana



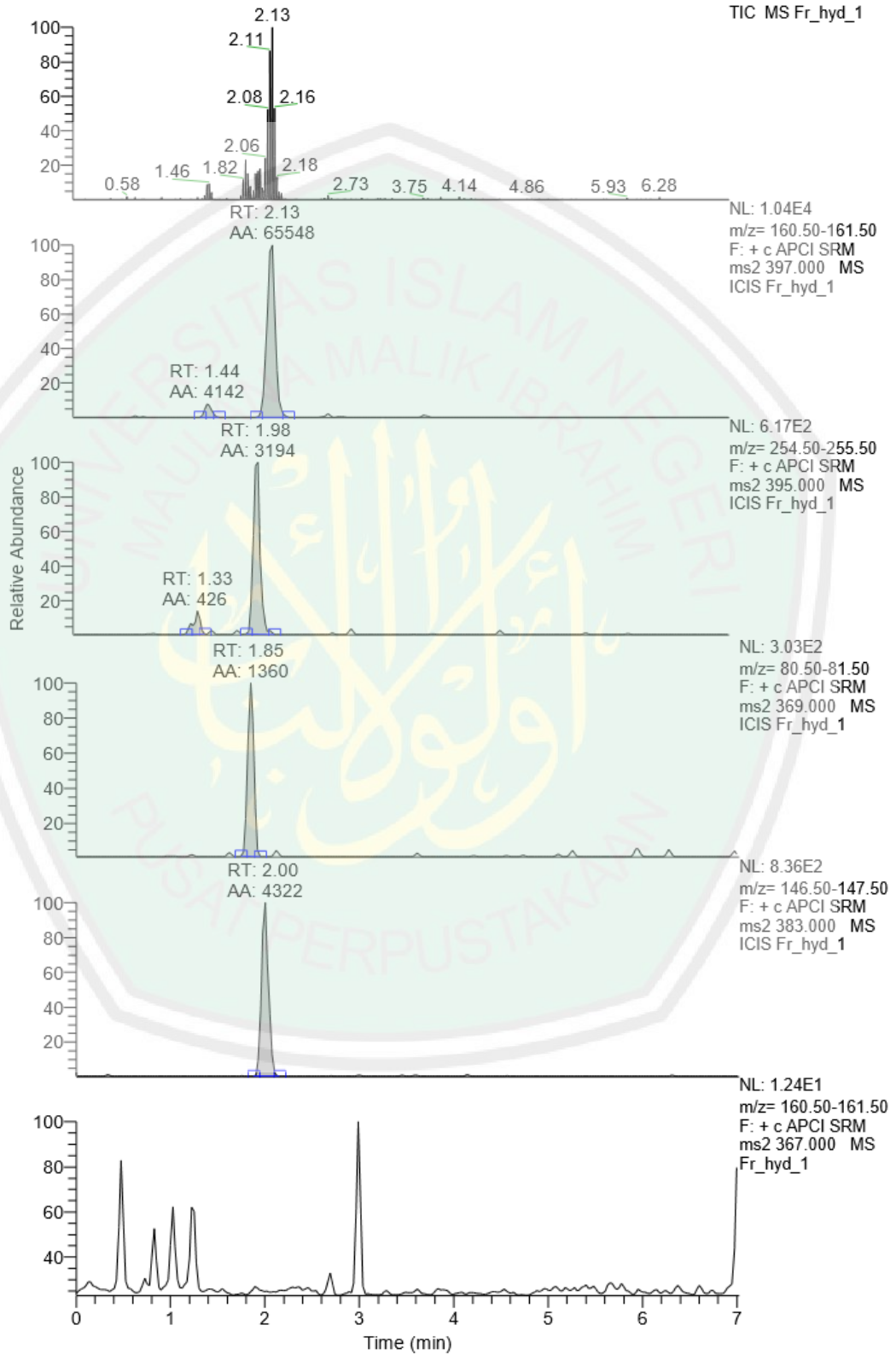
7.4 Data Hasil FT-IR Isolat B



7.5 Data Hasil LC-MS/MS Fraksi n-Heksana

E:\KALIAWAN\...2015\RAW JUNIFr_hyd_1

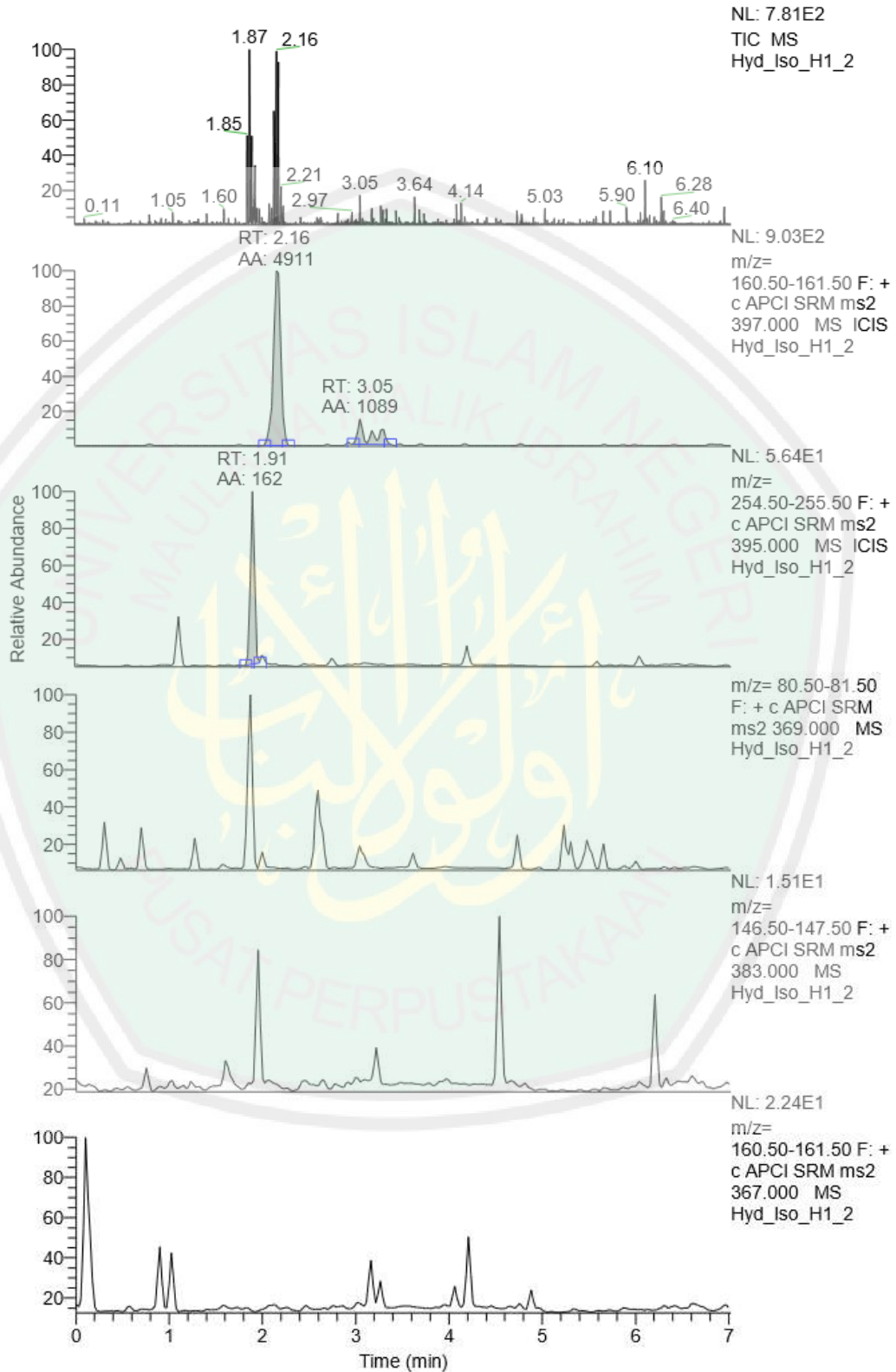
RT: 0.00 - 7.02 SM: 5G

NL: 9.53E3
TIC MS Fr_hyd_1

7.6 Data Hasil LC-MS/MS Isolat B

E:\KALIAWANI...vaw\juni\Hyd_Iso_H1_2

RT: 0.00 - 7.02 SM: 5G



Lampiran 8. Dokumentasi



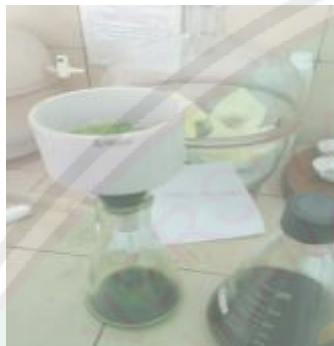
Hydrilla verticillata Basah



H. verticillata Kering



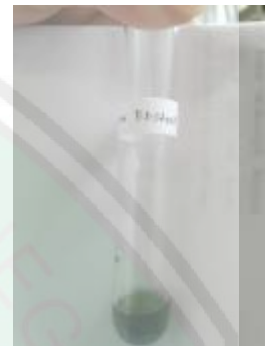
Serbuk halus *H. verticillata*



penyaringan hasil shaker



Ekstrak pekat metanol



uji fitokimia ekstrak (+)



Hidrolisis dengan HCl 2 N



Partisi dengan n-heksana



Fraksi n-heksana pekat



Uji fitokimia fraksi (+)



0,0667g fraksi untuk
Pemisahan kromatografi
kolom



Proses elusi pada kolom



eluat ditampung 2mL /menit



Hasil pengelompokan fraksi



Fraksi yang diuji Toksisitas



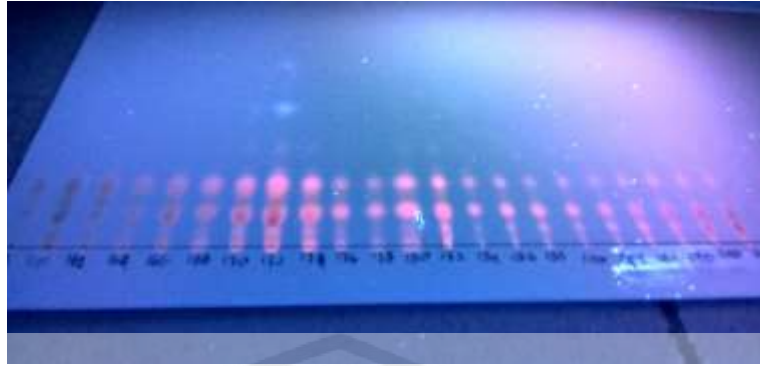
Perhitungan mortalitas udang uji



Hasil Monitoring vial 2 – 78



Hasil Monitoring vial 80 - 156



Hasil Monitoring Vial 158 – 234



Hasil Monitoring Vial 236 - 276

