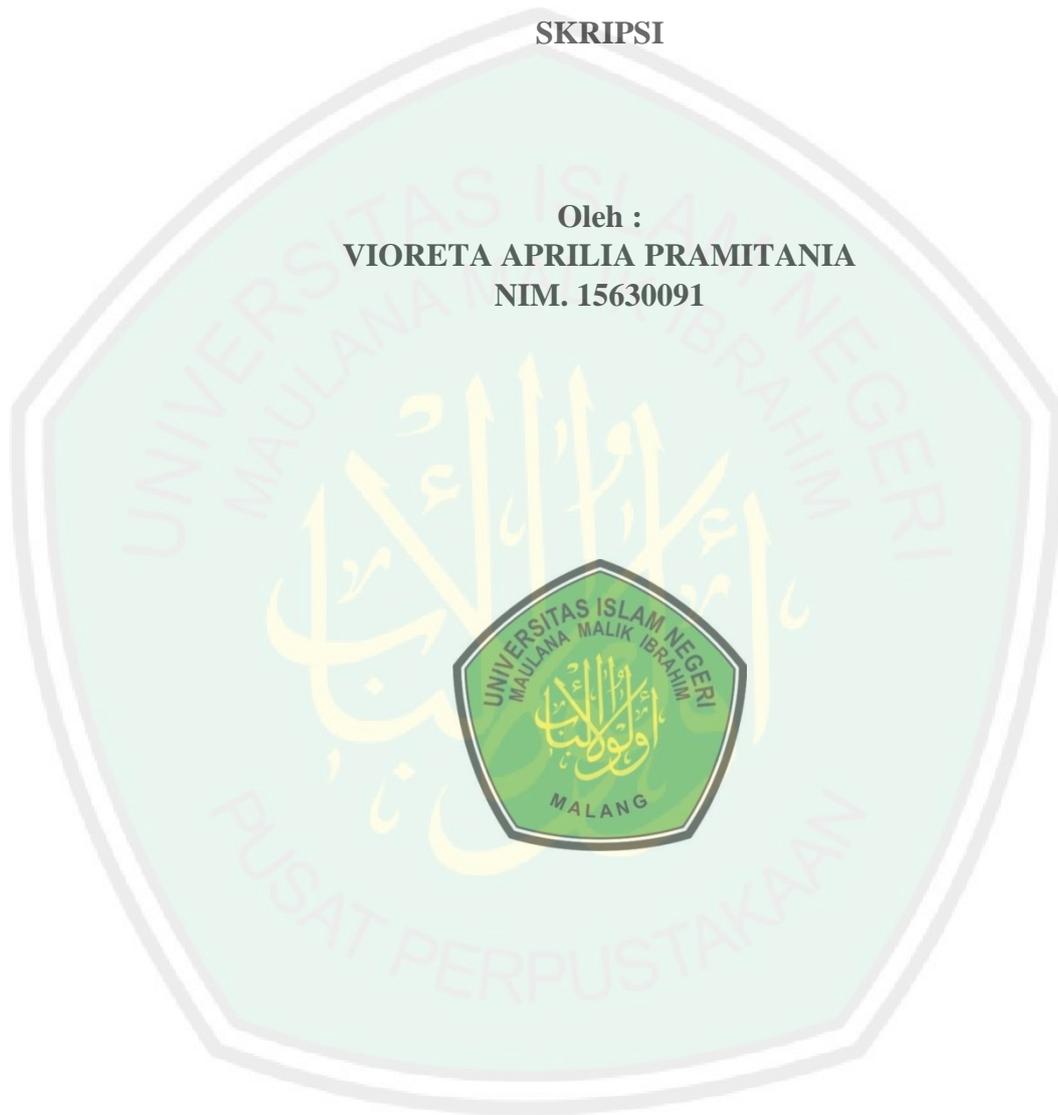


**UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI
KOLOM FRAKSI n-HEKSANA ALGA MERAH (*Eucheuma cottonii*) DARI
PERAIRAN WONGSOREJO BANYUWANGI**

SKRIPSI

Oleh :
VIORETA APRILIA PRAMITANIA
NIM. 15630091



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

**UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI
KOLOM FRAKSI n-HEKSANA ALGA MERAH (*Eucheuma cottonii*) DARI
PERAIRAN WONGSOREJO BANYUWANGI**

SKRIPSI

Oleh:

**VIORETA APRILIA PRAMITANIA
NIM. 15630091**

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 ALGA MERAH (*Eucheuma cottonii*) DARI
PERAIRAN WONGSOREJO BANYUWANGI**

SKRIPSI

Oleh:
VIORETA APRILIA PRAMITANIA
NIM. 15630091

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 29 Mei 2019

Pembimbing I



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

Pembimbing II



Mochamad Imamudin, Lc, M.A.
NIP. 19740602 200901 1 010

Mengetahui,
Ketua Jurusan



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

**UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI
KOLOM FRAKSI n-HEKSANA ALGA MERAH (*Eucheuma cottonii*) DARI
PERAIRAN WONGSOREJO BANYUWANGI**

SKRIPSI

Oleh:
VIORETA APRILIA PRAMITANIA
NIM. 15630091

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

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



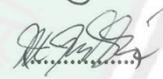
Ketua Penguji : Ahmad Hanapi, M.Sc
NIDT. 19851225 20160801 1 069



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



Anggota Penguji : Mochamad Imamudin, Lc, M.A.
NIP. 19740602 200901 1 010



Mengesahkan,
Ketua Jurusan



Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790629 200604 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Vioreta Aprilia Pramitania

NIM : 15630091

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul penelitian : Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom
Fraksi n-Heksana Alga Merah (*Eucheuma Cottonii*) Dari
Perairan Wongsorejo Banyuwangi

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

Malang, 19 Juni 2019
Yang membuat pernyataan,



Vioreta Aprilia Pramitania
NIM. 15630091

MOTTO

Life is about interpreting every thing to be better.
When we interpret it, there is nothing to regret and no one needs to fall.



PERSEMBAHAN

Skripsi ini ku persembahkan teruntuk:

Ibuku tersayang yang selalu mendoakan apapun hal baik untuk putrinya, meskipun telah dipatahkan hatinya. Segala ridlo dan nasihatnya yang selalu mengajarku tentang kesabaran dan kehidupan.

Almarhum bapak yang selalu ku rindukan disetiap saat, yang selalu menyayangiku tanpa sekalipun memarahiku. Yang selalu membawaku kemana pun beliau pergi dan selalu menuruti kemauan putrinya.

Mas Nico dan Mbak Niken yang selalu mendukung apapun yang dilakukan adiknya. Terimakasih atas kepercayaan, kasih sayang yang selalu diberikan kepadaku, dan senantiasa memberikan motivasi yang luar biasa sehingga mampu memberikan pencerahan yang sangat berarti.

KATA PENGANTAR

Dengan menyebut nama Allah SWT yang maha pengasih lagi maha penyayang, penulis panjatkan puji syukur atas rahmat, hidayah, dan inayah-Nya yang selalu terlimpahkan sehingga terselesaikannya penulisan skripsi penelitian yang berjudul '**Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi n-Heksana Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi**'. Oleh karena itu, penulis menghaturkan terimakasih kepada:

1. Ibu yang selalu mendoakanku dan yang selalu mengutamakan pendidikan untuk anak-anaknya. Almarhum Ayah yang selalu menyayangiku.
2. Kakak tercinta yaitu Mas Nico dan Mbak Niken yang selalu memberiku semangat.
3. Bapak Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag. selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si. selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si. selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
6. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si. selaku pembimbing dan Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc. selaku konsultan, serta Bapak Mochamad Imamudin, Lc, M.A. selaku pembimbing agama. Terimakasih atas seagala ilmu yang diberikan sampai terselesainya skripsi penelitian ini. Serta seluruh dosen jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu pengetahuan, wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal.

7. Teman-teman seperjuangan penelitian organik bahan alam, khususnya untuk Irfan dan Ajeng yang selalu saling membantu dalam proses penelitian.
8. Rekan-rekan Jurusan Kimia angkatan 2015 dan juga kelas kimia C, khususnya untuk Nende yang selalu saling berbagi cerita dan membantu selagi bisa.
9. Teman-teman SMA yang selalu ada untuk bercanda tanpa henti dan selalu membantu yaitu zum dan nourma.
10. Rekan-rekan yang membantu dalam proses penulisan skripsi, yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Semoga amal perbuatan Bapak/Ibu serta semua pihak yang membantu dalam proses penyelesaian skripsi penelitian ini diridloi Allah SWT.

Malang, 19 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
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan.....	5
1.4 Batasan Masalah.....	6
1.5 manfaat	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Alga Merah (<i>Eucheuma cottonii</i>).....	8
2.2 Senyawa Steroid	10
2.3 Analisa Kadar Air.....	11
2.4 Ekstraksi Alga Merah (<i>Eucheuma cottonii</i>)	11
2.5 Hidrolisi Glikosida	12
2.6 Partisi Menggunakan n-Heksana.....	13
2.7 Uji Fitokimia Senyawa Steroid	14
2.8 Kromatografi Kolom Basah	15
2.9 Monitoring dengan KLT	16
2.10 Uji Toksisitas Metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test).....	18
2.10.1 Klasifikasi <i>Artemia salina</i> L.....	18
2.10.2 Analisa Probit.	19
2.11 Identifikasi Steroid menggunakan UV-Vis	20
2.12 Identifikasi Steroid menggunakan FTIR	21
2.13 Identifikasi Steroid menggunakan LCMS/MS	22
BAB III METODOLOGI	
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian.....	25
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	25
3.2.1 Alat	25
3.2.2 Bahan	25
3.3 Rancangan Penelitian	26
3.4 Tahapan Penelitian	26
3.5 Cara Kerja.....	27
3.5.1 Preparasi Sampel	27
3.5.2 Analisis Kadar Air	27

3.5.3 Analisa Kadar Garam	28
3.5.4 Ekstraksi Sampel	28
3.5.5 Hidrolisis dengan HCl dan Partisi dengan n-Heksana.....	29
3.5.6 Uji Fitokimia Senyawa Steroid.....	29
3.5.7 Pemisahan Steroid Metode Kromatografi Kolom Basah.....	29
3.5.8 Monitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLTA)	30
3.5.9 Uji Toksisitas Larva Udang <i>Artemia salina</i>	31
3.5.9.1 Penetasan Larva Udang.....	31
3.5.9.2 Uji Toksisitas	31
3.5.10 Identifikasi Steroid menggunakan UV-Vis	31
3.5.11 Identifikasi Steroid menggunakan FTIR	32
3.5.12 Identifikasi Steroid menggunakan LCMS/MS	32
3.6 Analisis Data	33
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Preparasi Sampel	34
4.2 Analisa Kadar Air.....	34
4.3 Analisa Kadar Garam	35
4.4 Ekstraksi Sampel	36
4.5 Hidrolisis Ekstrak Metanol.....	37
4.6 Partisi dengan n-Heksana	38
4.7 Uji Fitokimia Senyawa Steroid	39
4.8 Isolasi Steroid dengan Kromatografi Kolom dan Monitoring dengan KLTA.....	40
4.9 Uji Toksisitas Senyawa Steroid Metode BSLT.....	43
4.9.1 Penetasan Larva Udang	43
4.9.2 Uji Toksisitas	43
4.10 Identifikasi Steroid menggunakan UV-Vis	46
4.11 Identifikasi Steroid menggunakan FTIR	48
4.12 Identifikasi Steroid menggunakan LCMS/MS	50
4.13 Pemanfaatan rumput laut <i>Eucheuma cottonii</i> dalam Prespektif.....	54
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan.....	60
5.2 Saran	60
DAFTAR PUSTAKA	61
LAMPIRAN.....	69

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Alga merah <i>Eucheuma cottonii</i>	8
Gambar 2.2 Struktur dasar steroid	10
Gambar 2.3 Dugaan reaksi hidrolisis	13
Gambar 2.4 Struktur silika gel	16
Gambar 2.5 <i>Artemia salina</i>	18
Gambar 2.6 Spektrum UV-Vis steroid.....	21
Gambar 2.7 Spektrum UV-Vis steroid.....	21
Gambar 2.8 Spektrum FTIR steroid.....	22
Gambar 2.9 Kromatogram LCMS/MS senyawa steroid <i>Eucheuma cottonii</i>	24
Gambar 4.1 Reaksi HCl dan natrium bikarbonat	38
Gambar 4.2 Hasil uji fitokimia steroid.....	40
Gambar 4.3 Spektra UV-Vis fraksi <i>Eucheuma cottonii</i>	46
Gambar 4.4 Spektra UV-Vis isolat steroid A2.....	46
Gambar 4.5 Spektra FTIR fraksi n-heksana dan isolat steroid A2	48
Gambar 4.6 Kromatogram isolat steroid A2.....	52
Gambar 4.7 Fragmentasi β -sitosterol	53

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Tabel Kandungan <i>Eucheuma cottonii</i>	9
Tabel 2.2 Hasil LCMS/MS Steroid <i>Eucheuma cottonii</i>	23
Tabel 4.1 Kadar Air <i>Eucheuma cottonii</i>	35
Tabel 4.2 Kadar Garam <i>Eucheuma cottonii</i>	36
Tabel 4.3 Hasil Monitoring dengan KLTA.....	42
Tabel 4.4 Hasil Pengamatan Kematian Larva Udang	44
Tabel 4.5 Nilai Toksisitas <i>Eucheuma cottonii</i>	45
Tabel 4.6 Interpretasi Spektra FTIR Fraksi n-Heksana	48
Tabel 4.7 Interpretasi Spektra FTIR Isolat Steroid A2	49
Tabel 4.8 Interpretasi Kromatogram LCMS/MS Isolat A2	51
Tabel 4.9 Hasil Identifikasi LCMS/MS Referensi	51



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian	69
Lampiran 2 Diagram Alir.....	70
Lampiran 3 Perhitungan Pembuatan Reagen	76
Lampiran 4 Perhitungan Kadar Air.....	80
Lampiran 5 Perhitungan Kadar Garam	83
Lampiran 6 Perhitungan rendemen	85
Lampiran 7 Perhitungan Rf Hasil Monitoring KLTA.....	86
Lampiran 8 Hasil monitoring KLTA	88
Lampiran 9 Perhitungan Rendemen Kromatografi Kolom.....	91
Lampiran 10 Data Kematian Larva Udang dan Perhitungan LC ₅₀ Uji Toksisitas Isolat Steroid	94
Lampiran 11 Spektrum UV-Vis	98
Lampiran 12 Spektra FTIR	100
Lampiran 13 Senyawa Steroid Target Identifikasi LCMS/MS.....	101
Lampiran 14 Dokumentasi Penelitian.....	102

ABSTRAK

Pramitania, V. A. 2019. **Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi n-Heksana Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi**. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I : A. Ghanaim Fasya, M.Si ; Pembimbing II : Mochamad Imamudin, Lc, M.A ; Konsultan : Ahmad Hanapi, M.Sc.

Kata kunci: *Eucheuma cottonii*, Kromatografi Kolom, Steroid, Uji Toksisitas.

Alga merah *Eucheuma cottonii* memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder dengan manfaat yang beragam. Senyawa steroid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder dengan tingkat toksisitas yang tinggi. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui tingkat toksisitas isolat steroid fraksi n-heksana dan mengetahui jenis steroid pada alga merah *Eucheuma cottonii*.

Isolasi *Eucheuma cottonii* dilakukan dengan ekstraksi maserasi pelarut metanol. Ekstrak kasar yang didapat dihidrolisis dengan HCl 2 N dan dipartisi dengan pelarut n-heksana. Fraksi n-heksana diuji fitokimia dengan reagen *Liebermann-Burchard*. Kemudian diisolasi menggunakan kromatografi kolom dengan gradien eluen n-heksana:etil asetat (95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30). Senyawa steroid yang terpisahkan dengan baik dilakukan uji toksisitas metode BSLT pada konsentrasi 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, dan 5 ppm. Isolat dengan nilai toksik tertinggi diidentifikasi menggunakan UV-Vis, FTIR dan LCMS/MS.

Fraksi n-heksana yang diuji fitokimia dengan reagen *Liebermann-Burchard* menghasilkan cincin hijau yang menandakan positif mengandung steroid. Hasil pemisahan kromatografi kolom senyawa steroid memberi nilai LC₅₀ sebesar 11,0746 ppm pada uji toksisitas BSLT. Identifikasi menggunakan UV-Vis memberi serapan 203 nm dan 276 nm. Hasil identifikasi FTIR menunjukkan serapan khas steroid OH dan C-O alkohol sekunder. Hasil LCMS/MS isolat menunjukkan adanya steroid jenis sitosterol, fukosterol, kolesterol dan demosterol.

ABSTRACT

Pramitania, V. A. 2019. **Toxicity Test of Steroid Isolate Result of Chromatography Column of n-Hexane Fraction of Red Algae (*Eucheuma cottonii*) from Wongsorejo Aquatic Area of Banyuwangi.** *Thesis.* Chemistry Department, Science and Technology Faculty, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I : A. Ghanaim Fasya, M.Si. Supervisor II : Mochamad Imamudin, Lc, M.A : Advisor : Ahmad Hanapi, M.Sc.

Keywords: *Eucheuma cottonii*, Column Chromatography, Steroid, Toxicity Test.

Red algae *Eucheuma cottonii* contains secondary metabolites with various benefits. Steroid compounds are one of the active secondary metabolites with high toxicity. This study was conducted with the aim to determine the toxicity level of n-hexane fraction steroid isolates and determine the type of steroids in red algae *Eucheuma cottonii*.

Macroalgae *Eucheuma cottonii* has steroid content with a good level of toxicity. Isolation of *Eucheuma cottonii* was carried out with methanol solvent maceration extraction. The crude extract obtained was hydrolyzed with HCl 2 N and partitioned with n-hexane. Furthermore, it was isolated using column chromatography with n-hexane: ethyl acetate eluent gradient (95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30). The results monitored by ATLC. The best result of separation by ATLC was tested for toxicity with the BSLT method at a concentration of 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, and 5 ppm. Isolates with the highest toxic levels were identified by UV-Vis and FTIR

The n-hexane fraction tested by phytochemical with the *Liebermann-Burchard* reagent, and produced a green ring which indicated positive steroid content. The results of column chromatography separation in steroid compounds which gave LC₅₀ values of 11.0746 ppm in the BSLT toxicity test. Identification using UV-Vis gives absorption of 203 nm and 276 nm. The results of FTIR identification showed a typical absorption of steroid OH, and secondary alcohols in C-O. Isolate LCMS/MS results showed the presence of sitosterol steroids, fukosterol, cholesterol and demosterol.

ملخص البحث

فرايميتيا، ف. أ. ٢٠١٩. اختبار السمية لعزل اللوني المنشطات نتائج الفصل من الطحالب الحمراء ن الهكسان (*Eucheuma cottonii*) من المياه **Wongsorejo Banyuwangi**. بحث جامعي. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الحكومية الإسلامية مالانج. المشرف الأول: غنائم فاشا الماجستير المشرف الثاني: محمد إمام الدين، الماجستير. المستشار: أحمد حنافي الماجستير

الكلمة الرئيسية: *Eucheuma cottonii*، العمود اللوني، المنشطات، اختبار السمية.

يحتوي الطحلب الأحمر *Eucheuma cottonii* على مركبات الستيرويد الثانوية مع فوائد مختلفة. مركبات الستيرويد هي واحدة من مركبات الستيرويد الثانوية ذات محتوى السمية العالية. أجريت هذه البحث بهدف لمعرفة محتوى السمية عزلات المنشطات الستيرويد isolate steroid n-hexane fraction ومعرفة نوع المنشطات في الطحالب الحمراء *Eucheuma cottonii*.

تم تنفيذ عزل *Eucheuma cottonii* من خلال استخراج maceration لمذيب الميثانول. ومستخرج الكاشط الذي ينال بتحليل الماء باستخدام HCl ٢ N تقسيمه بمذيب n-hexane. ويختبر تجزئة n-hexane بواسطة كيميائي نباتي باستخدام كاشف Liebermann-Burchard. ثم تم عزله باستخدام تحليل كروماتوجرافي للعمود مع تدرج هكسين نقي: إيثيل أسيتات (٩٥:٥، ١٠:٩٠، ١٥:٨٥، ٢٠:٨٠، ٢٥:٧٥، ٣٠:٧٠). يتم تنفيذ مركبات الستيرويد التي يتم فصلها بشكل جيد عن طريق اختبار السمية لطريقة BSLT بتركيزات من ١ ppm، ٢ ppm، ٣ ppm، ٤ ppm و ٥ ppm. تم تحديد العزلات ذات أعلى القيم السمية باستخدام UV-Vis و FTIR و LCMS/MS.

جزء n-hexane الذي تم اختياره بواسطة كيمياء نباتية باستخدام كاشف Liebermann-Burchard يحصل حلقة خضراء تشير إيجابيا محتوى الستيرويد. أعطت نتائج الفصل الكروماتوجرافي العمود لمركبات الستيرويد قيم LC₅₀ من ١١,٠٧٤٦ جزء في المليون في اختبار سمية BSLT. تحديد الهوية باستخدام الأشعة فوق البنفسجية فيس يعطي امتصاص ٢٠٣ نانومتر و ٢٧٦ نانومتر. وأظهرت نتائج تحديد FTIR امتصاص نموذجي من الستيرويد OH، C-O الكحول الثانوية. وأظهرت النتائج LCMS/MS وجود المنشطات سيتوستيرول، فوكوستيرول، والكوليسترول والدموستيرول.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 latar belakang

Alga merupakan tumbuhan thallus karena bagian-bagian tubuhnya tidak dapat dibedakan. Alga merupakan salah satu tumbuhan yang bermanfaat dalam keseharian. Beberapa kegunaan alga yaitu untuk bahan makanan, pembentukan pil, kosmetik, pembersih gigi dan yang lainnya. Seperti yang disebutkan dalam al Qur'an dalam surat as Syu'ara' ayat 7, Allah SWT telah menciptakan berbagai macam tumbuhan yang bermanfaat bagi manusia.

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ;

Artinya: *"Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?"*
(Qs. as-Syu'ara' (26): 7)

Ayat di atas memberikan makna bahwa Allah SWT telah menumbuhkan jenis-jenis tumbuhan yang baik. Tumbuhan yang baik dapat diartikan sebagai tumbuhan yang memiliki manfaat. Atas kekuasaan dan kemurahan-Nya, Allah menciptakan dan menumbuhkan berbagai tumbuhan yang sangat berguna untuk setiap makhluknya. Alga merah merupakan salah satu tumbuhan baik golongan makroalga yang mengandung metabolit sekunder.

Makroalga memiliki kandungan bermanfaat seperti mineral, elemen makro dan elemen mikro lainnya (Yunus, 2009). Salah satu jenis rumput laut yang mudah dibudidayakan dan memiliki berbagai potensi yaitu alga merah (*Rhodophyceae*). Potensi yang dimilikinya sebagai salah satu biota laut yang dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder diantaranya alkaloid, steroid, triterpenoid, polifenol, dan sebagainya (Mardaneni, 2017).

Eucheuma cottonii merupakan salah satu jenis alga merah yang menghasilkan senyawa steroid. Penelitian yang telah dilakukan oleh Lopez, dkk. (2011) pada 18 makrolaga di semenanjung Portugis termasuk alga merah jenis *Rhodophyta* menyatakan bahwa alga merah jenis tersebut mengandung beberapa jenis steroid diantaranya yaitu β -sitosterol, stigmasterol, fukosterol, dan kampesterol. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Mardaneni (2017) bahwa *Eucheuma cottonii* mengandung senyawa steroid jenis β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol, desmosterol dan fukosterol. Becerra, dkk. (2015) melakukan penelitian rumput laut jenis *Lessonia vadosa* yang memiliki kandungan fukosterol sebagai antileismanial yang dapat digunakan untuk perlindungan dari sinar UV dan pertahanan terhadap penyakit metabolik sindrom seperti tekanan darah tinggi, kadar gula tinggi, kolesterol tinggi serta permasalahan obesitas.

Estraksi alga merah *Eucheuma cottonii* dapat dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol (Andriani, dkk., 2015). Penelitian yang telah dilakukan oleh Afif, dkk. (2015) menyatakan bahwa mengekstraksi *Eucheuma cottonii* dapat dilakukan dengan metode maserasi menggunakan metanol, dan dari penelitian tersebut diperoleh randemen ekstrak kasar metanol sebesar 16,97 %. Titik didih rendah yang dimiliki metanol akan mempermudah proses penguapan pelarut, meskipun bersifat toksik (Atun, 2014). Ekstrak kasar selanjutnya dihidrolisis dengan HCl 2 N. Hidrolisis bertujuan untuk memisahkan antara senyawa glikon dan aglikon (steroid) pada senyawa glikosida (Andriani, dkk., 2015). Proses partisi dilakukan dengan menggunakan ekstraksi cair-cair, n-heksana dipilih sebagai pelarut non polar yang diharapkan senyawa steroid akan

lebih terdistribusi pada fase non-polar dan terpisah dengan senyawa polar (Pramana dan Saleh, 2013). Setelah diperoleh fraksi dilanjutkan dengan uji fitokimia menggunakan reagen *Liebermann-Burchard* (Kristanti, dkk., 2008). Hasil Penelitian yang dilakukan oleh Sari, dkk. (2015) pada fraksi n-heksana dari daun mara menghasilkan positif mengandung steroid.

Fraksi non-polar yang diperoleh dari hasil partisi biasanya masih berupa senyawa campuran, sehingga perlu dilakukan isolasi lebih lanjut (Setiyawan dkk., 2015). Salah satu cara melakukan proses pemisahan dalam senyawa campuran yaitu menggunakan kromatografi kolom teknik basah dan kemudian di monitoring menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Penelitian Handoko (2016) isolasi senyawa steroid menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) didapatkan 0,001 mg, sedangkan isolasi senyawa steroid menggunakan kromatografi kolom kering menghasilkan 7 mg dan cara basah yaitu 7,7 mg. Sholikah (2016) melakukan isolasi dengan menggunakan kromatografi kolom basah dan didapatkan 5 kelompok senyawa steroid dan 4 kelompok Senyawa triterpenoid.

Faktor-faktor yang berperan pada keberhasilan pemisahan dengan kromatografi kolom adalah pemilihan adsorben, pemilihan pelarut, dan pengemasan kolom (Kristanti, dkk., 008). Pemilihan variasi gradien eluen yang sesuai untuk isolasi senyawa steroid merupakan faktor yang penting, karena setiap steroid pada suatu bahan memiliki kepolaran yang berbeda-beda. Oleh karena itu pemakaian gradien eluen dalam proses pemisahan suatu senyawa menjadi hal yang utama. Penelitian tentang *Eucheuma cottonii* yang telah dilakukan (Rahmawati, 2017) pemisahan steroid dari fraksi n-heksana *Eucheuma cottonii*

dengan kromatografi kolom menggunakan variasi eluen n-heksana dan etil asetat 16:4, 17:3, dan 18:2 memberikan hasil pemisahan yang berbeda. Variasi eluen 16:4 menghasilkan 1 noda tunggal steroid dengan rendemen 4,6%. Variasi eluen 17:3 menghasilkan 3 noda tunggal dengan rendemen 3,3%, sedangkan pada variasi eluen 18:2 memberikan 1 noda tunggal dengan rendemen 4,4% dan menghasilkan noda tunggal dengan rendemen 5,8%. Monitoring dengan kromatografi lapis tipis menunjukkan variasi eluen terbaik yaitu 18:2 karena menghasilkan lebih banyak pemisahan senyawa steroid yang ditandai dengan semakin banyaknya noda tunggal yang dihasilkan.

Uji toksisitas adalah pengujian tingkatan racun yang dapat menyebabkan gangguan fungsi tubuh pada suatu organisme, sehingga dapat ditentukan dosis pemakaiannya untuk suatu proses pengobatan. Uji toksisitas dengan menggunakan metode BSLT dilakukan dengan dua tahapan, yaitu: penetasan telur dan uji toksisitas senyawa steroid. *Artemia salina* dapat digunakan sebagai hewan uji pada umur 48 jam (Azizah, 2016). Hasil uji toksisitas senyawa steroid dari kulit batang kayu biti yang telah dilakukan oleh Ilyas, dkk. (2015) dengan memakai konsentrasi 1000 ppm menunjukkan bahwa nilai LC_{50} pada ekstrak n-heksana sebesar 74,079 $\mu\text{g/mL}$, fraksi sebesar 118,850 $\mu\text{g/mL}$, dan untuk Kristal murni sebesar 88,201 $\mu\text{g/mL}$.

Setelah didapat angka kematian tertinggi pada larva udang, maka perlu dilakukannya proses identifikasi hasil isolasi senyawa steroid dari alga merah *Eucheuma cottonii* dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui panjang gelombang maksimum, FTIR untuk mengetahui gugus fungsi senyawa steroid dan menggunakan LC-MS/MS untuk mengetahui jenis steroid

yang terkandung pada isolat. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Mardaneni (2017) menyebutkan bahwa pengujian isolat steroid *Eucheuma cottonii* fraksi etil asetat dengan LC-MS/MS memunculkan beberapa m/z diantaranya yaitu 397, 395, 369, 383, dan 367 m/z yang menunjukkan adanya senyawa steroid jenis fukosterol, β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol dan desmosterol.

Beberapa penelitian sebelumnya telah melakukan proses pemisahan senyawa steroid dari makroalga merah *Eucheuma cottonii* untuk hasil pemisahan terbaik tanpa adanya penelitian tentang uji toksisitasnya. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan pengujian toksisitas isolat steroid dari fraksi n-heksana yang dihasilkan dari pemisahan menggunakan kromatografi kolom basah serta dimonitoring menggunakan kromatografi lapis tipis untuk mengetahui isolat steroid yang terkandung pada botol vial. Hasil dari uji toksisitas terbaik dengan ditunjukkan dari nilai LC_{50} terendah akan dilakukan proses identifikasi untuk mengetahui jenis steroidnya.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana tingkat toksisitas isolat steroid fraksi n-heksana *Eucheuma cottonii*?
2. Bagaimana hasil identifikasi isolat steroid fraksi n-heksana *Eucheuma cottonii* menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan LCMS/MS?

1.3 Tujuan

1. Untuk mengetahui tingkat toksisitas isolat steroid fraksi n-heksana *Eucheuma cottonii*.

2. Untuk menduga jenis steroid dengan mengetahui panjang gelombang maksimal, gugus fungsi dan pola fragmentasi senyawa steroid dari hasil spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan LCMS/MS.

1.4 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan yaitu alga merah jenis *Eucheuma cottonii* dari perairan Wongsorejo Banyuwangi.
2. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi dengan pelarut metanol dan dilakukan hidrolisis menggunakan HCl 2N dan partisi menggunakan n-heksana.
3. Pemisahan isolat steroid fraksi n-heksana *Eucheuma cottonii* dengan kromatografi kolom basah ukuran panjang 50 cm dengan diameter 1 cm, gradien eluen n-heksana dan etil asetat 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; dan 70:30 dengan laju alir 2 mL/menit.
4. Monitoring isolat steroid fraksi n-heksana *Eucheuma cottonii* dengan KLTA.
5. Uji toksisitas menggunakan metode BSLT.
6. Instrumen yang digunakan untuk identifikasi steroid yaitu spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan LCMS/MS.

1.5 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi ilmiah, bahwa terdapat kelimpahan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak metanol alga merah (*Eucheuma cottonii*) yang dipartisi dengan n-heksana khususnya

senyawa steroid. Penelitian ini juga diharapkan mampu memberikan informasi mengenai cara isolasi senyawa steroid menggunakan kromatografi kolom basah serta tentang tingkat toksisitas steroid. Pemisahan ini diharapkan dapat mempermudah pengkajian lebih lanjut dugaan senyawa steroid alga merah *Eucheuma. cottonii* dengan spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan LCMS/MS yang dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan.

kesehatan.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga Merah (*Euचेuma cottonii*)

Salah satu biota laut yang bermanfaat bagi kehidupan yaitu makroalga atau yang biasanya disebut sebagai rumput laut. Masyarakat hanya memkonsumsinya tanpa pengetahuan bahwa didalam rumput laut terkandung berbagai macam zat yang bermanfaat bagi pengonsumsinya. Menurut Parenrengi dan Sulaeman (2017) mengenai pengenalan rumput laut *Kappaphycus alvarezii*, penyebutan *cottonii* digunakan dalam dunia perdagangan nasional maupun internasional. *Euचेuma cottonii* termasuk dalam salah satu jenis alga merah (*Rhodophyceae*) yang berubah sebutan menjadi *Kappaphycus alvarezii* karena menghasilkan karaginan, sehingga jenis ini secara taksonomi disebut *Kappaphycus alvarezii*. Rumput laut ini berbentuk thallus silindris sederhana hingga kompleks dengan permukaan yang licin. Terdapat duri pada thallus yang memiliki cabang yang tumbuh rimbun pada bagian yang terkena sinar matahari. Alga merah jenis *Euचेuma cottonii* memiliki beberapa warna yang berbeda-beda antara lain warna hijau, hijau kekuningan, abu-abu, coklat, atau merah. Bentuk rumput laut jenis *Euचेuma cottonii* dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Alga merah *Euचेuma cottonii*

Amora dan Sukesu (2013) telah melakukan uji taksonomi pada *Eucheuma cottonii* dengan hasil klasifikasi sebagai berikut :

Divisi : Rhodophyta
 Kelas : Rhodophyceae
 Ordo : Gigartinales
 Famili : Solariaceae
 Genus : *Eucheuma*
 Spesies : *Eucheuma cottonii*

Eucheuma cottonii termasuk dalam kategori alga yang memiliki senyawa bioaktif yang sangat berguna untuk dikonsumsi (Sharo, dkk., 2013). Alga mengandung protein, lipid, vitamin, dan mineral yang dapat digunakan sebagai sumber makanan serta obat-obatan (Rahmawati, 2017). Selain itu juga dapat digunakan sebagai antibakteri (Izzati, 2007), antioksidan (Lestario, dkk., 2008), antivirus (Manilal, dkk., 2009), antileismanial (Becerra, dkk., 2015), antijamur (Khazanda, dkk., 2007), dan antitumor (Zandi, dkk., 2010).

Matanjun, dkk. (2009) melakukan penelitian tentang kandungan nutrisi pada rumput laut yang tumbuh di daerah tropis jenis *Eucheuma cottonii* yang dapat dikonsumsi dan bermanfaat untuk kesehatan ditunjukkan pada Tabel 2.1 sebagai berikut :

Tabel 2.1 Kandungan *Eucheuma cottonii*

Kandungan	Jumlah
Kadar air	10,55 %
Protein	9,76 %
Lipid	1,10 %
Karbohidrat	26,49 %
Serat kasar	5,91 %
Abu	46,19 %

Sharo, dkk. (2013) telah mengidentifikasi golongan senyawa aktif dalam ekstrak *Eucheuma cottonii* bahwa senyawa metabolit sekunder golongan senyawa triterpenoid pada ekstrak etanol dan steroid pada ekstrak *n*-heksana. Hasil

penelitian Afif, dkk. (2015) menunjukkan bahwa ekstrak *Eucheuma cottonii* mengandung metabolit sekunder antara lain flavonoid, steroid dan alkaloid sedangkan untuk ekstrak etil asetat *Eucheuma cottonii* senyawa yang dihasilkan adalah golongan alkaloid, triterpenoid dan steroid, dan untuk ekstrak kloroform adalah flavonoid, triterpenoid dan alkaloid.

2.2 Senyawa Steroid

Steroid merupakan golongan senyawa lipid turunan dari perhidrosiklopentanofenantrena yang terdiri dari 3 cincin sikloheksana dan 1 cincin siklopentana di ujung cincin sikloheksana (Sharo, dkk., 2013). Steroid bersifat non polar karena tersusun dari isoprene, namun steroid yang memiliki gugus $-OH$ lebih bersifat polar yang disebut sebagai sterol (Kristanti, dkk., 2008).



Gambar 2.2 Struktur dasar steroid

Jenis steroid terbagi menjadi beberapa senyawa seperti β -sitosterol, clionasterol, fukosterol, campesterol, 28- isofukosterol dan brassikasterol (Sapar, dkk., 2004). Hasil identifikasi menggunakan LC-MS didapatkan senyawa steroid pada *Eucheuma cottonii* dengan urutan kepolaran dimulai dari demosterol, fukosterol, dan β -sitosterol (Luthfiah, 2017). Hasil penelitian Mardaneni (2017) kandungan steroid pada *Eucheuma cottoni* yaitu demosterol, stigmasteol, kampesterol, fukosterol, dan β -sitosterol.

2.3 Analisa kadar air

Kandungan air memiliki peranan penting dalam proses penyimpanan. Rumput laut memiliki sifat menyerap air atau yang disebut dengan higroskopis maka dari itu perlu diketahui kandungan air pada penyimpanan rumput laut, sebelum digunakan (Diharmi, dkk., 2011). Uji kadar air *Eucheuma cottonii* pada penelitian yang dilakukan oleh Afif (2017) menghasilkan kadar air basah sebesar 79,6 % sedangkan kadar air keringnya 4,74 %. Andriani, dkk. (2015) yang melakukan uji kadar air pada *Eucheuma cottonii* dan diperoleh kadar air basah sebesar 88,1 % dan kadar air kering sebesar 5,76 %. Kadar air *Eucheuma cottonii* pada penelitian Rahmawati (2017) diperoleh kadar air sampel rumput laut *Eucheuma cottonii* kering sebesar 4,56 %.

2.4 Ekstraksi Alga Merah *Eucheuma cottonii*

Ekstraksi maserasi memiliki prinsip pengambilan senyawa aktif dari suatu bahan dengan cara melarutkannya pada pelarut yang telah disesuaikan (Muhimmah, 2011). Pemilihan metode ekstraksi maserasi karena untuk menghindari kerusakan senyawa aktif yang tidak stabil pada suhu tinggi (Ilyas, dkk., 2015). Maserasi dengan pemakaian pelarut dapat membuat terjadinya difusi. Proses difusi ini terjadi karena pelarut yang memiliki konsentrasi tinggi akan menembus dinding sel sehingga memasuki sel, akibatnya isi didalam sel akan keluar dan bercampur dengan pelarut (Rahmawati, 2017). Proses ini berjalan terus menerus hingga keseimbangan konsentrasi tercapai dibagian dalam dan luar sel (Pramana dan Saleh, 2013).

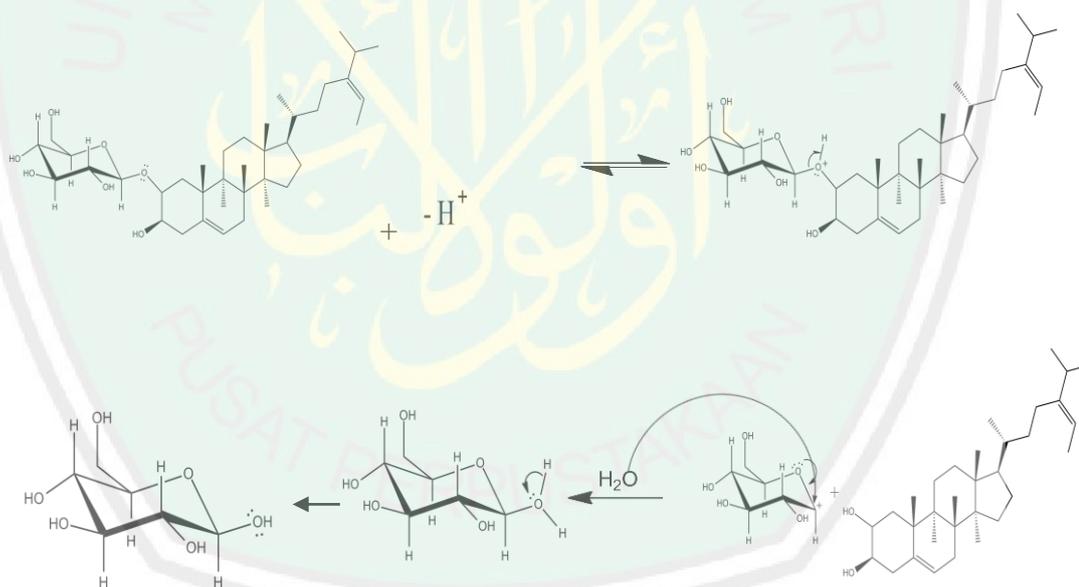
Senyawa steroid dari tanaman biasanya terikat dengan gugus gula yang berakibat bersifat polar. Jika akan melakukan isolasi senyawa steroid dari tanaman

maka dapat menggunakan pelarut polar yaitu metanol (Kristanti, dkk., 2008). Membran sel dapat dilisiskan oleh metanol karena mampu menembus semua jaringan tumbuhan (Pramana dan Saleh, 2013). Hasil penelitian Luthfiah (2017) didapatkan ekstrak kasar *Eucheuma cottonii* yaitu sebesar 15,587 % dari 100 gram sampel menggunakan 500 mL metanol. Rahmawati (2017) memperoleh hasil rendemen ekstraksi sebesar 11,866 % dari 100 gram serbuk kering *Eucheuma cottonii* dengan pelarut 1,5 L. Penelitian dari Fitri (2017) menghasilkan randemen ekstrak metanol *Eucheuma cottonii* 100 gram menggunakan 500 mL metanol yaitu sebesar 15,587 %.

2.5 Hidrolisis Glikosida

Steroid yang ditemui pada tanaman pada umumnya tidaklah dalam keadaan bebas saja. Behmer, dkk (2013) melakukan penelitian kandungan steroid pada *Phaseolus vulgaris* dan *Nicotiana tabacum* yang menghasilkan 3 jenis steroid pada tanaman, diantaranya steroid bebas, steroid terasilasi, dan steroid glikosida yang paling banyak dari 2 steroid lainnya. Apabila ikatan glikosida berada pada suatu senyawa maka senyawa tersebut akan memiliki sifat lebih polar (Saifudin, dkk., 2006). Proses hidrolisis dilakukan dengan beberapa pilihan katalis, salah satunya menggunakan asam berupa HCl. Penggunaan HCl lebih baik dibanding H₂SO₄ karena sifat HCl yang lebih reaktif, mudah dipisahkan dari produknya karena sifatnya yang mudah menguap. HCl memiliki efektifitas mempercepat reaksi berlangsung dan mudah diperoleh dengan harga murah (Wahyudi, dkk., 2011). Penelitian ini menggunakan HCl 2N karena menurut Tasic, dkk. (2009) hidrolisis asam menggunakan HCl 2 N menghasilkan laju konsentrasi yang lebih baik dari penggunaan HCl 1 M. Luthfiah (2017)

melakukan proses pemisahan senyawa steroid pada *Eucheuma cottonii* dengan membandingkan antara hasil ekstraksi metanol tanpa hidrolisis dan hasil ekstraksi metanol yang dilakukan hidrolisis menggunakan HCl 2 N memberikan hasil bahwa, jumlah steroid terbanyak dihasilkan oleh ekstrak kasar metanol yang dilakukan penghidrolisisan ikatan glikosida. Reaksi hidrolisis berlangsung secara *reversibel*, maka perlu untuk dihentikan dengan penambahan natrium bikarbonat (NaHCO_3). Natrium bikarbonat bersifat basa, sehingga larutan yang awalnya bersifat asam setelah penambahan basa akan menjadi netral. Reaksi dapat dihentikan sehingga tidak terbentuk kembali ikatan antara glikon dan aglikonnya (Handoko, 2016). Dugaan reaksi hidrolisis dapat dilihat pada gambar 2.3 (Lawoko, dkk., 2009), (Lopez, 2011) :



Gambar 2.3 Dugaan reaksi hidrolisis

2.6 Partisi Menggunakan n-Heksana

Partisi atau ekstraksi cair-cair termasuk dalam salah satu jenis ekstraksi dengan prinsip kelarutan suatu zat diantara dua pelarut yang tidak bercampur. Syarat pelarut yang dapat digunakan adalah yang memiliki kepolaran sesuai dengan bahan

yang diekstraksi dan harus terpisah ketika dikocok. Ketika dua zat memiliki konstanta distribusi yang berbeda maka kedua zat tersebut akan menjadi dua fase yang tidak saling bercampur (Wonorahardjo, 2013).

Proses partisi perlu dilakukan sehingga senyawa glikon yang berupa gula bersifat polar dan aglikon yaitu yang mengandung steroid dapat terpisah (Handoko, 2016). Senyawa glikon akan terekstrak pada fase air, sedangkan senyawa aglikon akan terekstrak ke fase organik. Senyawa steroid tergolong dalam senyawa bersifat non polar, biasanya dipakai n-heksana untuk proses ekstraksi (Kristanti, dkk., 2008). Pemakaian n-heksana sebagai pelarut non polar akan dengan mudah mengekstraksi steroid sehingga akan lebih mudah untuk melanjutkan ke tahap isolasi (Pramana dan Saleh, 2013). Uji antibakteri pada ekstrak alga merah *Eucheuma cottonii* yang dilakukan Andriani, dkk. (2015) menghasilkan rendemen partisi steroid menggunakan n-heksana sebesar 2,50 %.

2.7 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Uji fitokimia menjadi salah satu jenis uji kualitatif untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang dapat diperoleh dari tumbuhan maupun hewan. Prinsip dari pengujian fitokimia yaitu terjadinya reaksi yang menghasilkan warna ketika diberikan suatu reagen. Steroid dapat diuji fitokimia menggunakan reagen *Liebermann-Burchard*. Fraksi yang terkandung steroid akan ditandai dengan terbentuknya warna biru (Kristanti, dkk., 2008). Menurut Sharo, dkk., (2013) yang telah menguji fitokimia ekstrak n-heksana dari *Eucheuma cottonii* dengan reagen *Liebermann-Burchard* menunjukkan hasil positif terkandung steroid yang ditandai dengan warna hijau kebiruan.

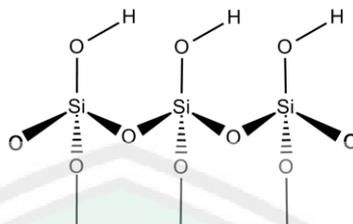
2.8 Kromatografi Kolom Basah

Kromatografi kolom merupakan teknik pemisahan yang mengandalkan pada distribusi analit diantara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Pemakaian fase gerak dapat berupa cair ataupun gas yang akan melewati fase diam berupa zat padat yang ada pada kolom harus lah memiliki ukuran yang sama agar senyawa-senyawa yang diinginkan dapat terpisah dengan baik (Wonorahardjo, 2013). Kromatografi kolom dapat dikategorikan sebagai kromatografi serapan karena memakai zat padat sebagai fase diamnya (Sastrohamidjojo, 2007).

Pemakaian kolom konvensional perlu diperhatikan sesuai dengan teori pelat dan teori laju. Efisiensi kolom pada teori pelat berhubungan pada nilai *HETP* (*height equivalent to a theoretical plate*) yang dinyatakan sebagai harga *H*. Untuk memperoleh harga *H* yang kecil maka harus meningkatkan jumlah piring teoritis disetiap bertambah panjangnya suatu kolom sehingga akan mengoptimalkan efisiensi suatu kolom. Teori kelajuan menjelaskan tentang tiga faktor yang mempengaruhi efisiensi kolom yang berhubungan pada harga *H*. Faktor A yaitu difusi eddy yang menyatakan ukuran dan keseragaman butiran fase diam. Faktor B yaitu difusi longitudinal yang berhubungan pada sepanjang kolom. Dan faktor C berupa ketidak seimbangan transfer masa (Wonorahardjo, 2013).

Fase diam didalam kolom akan berperan sebagai adsorben. Fase diam yang dipilih yaitu silika gel G-60. Pemilihan silika gel disebabkan karena adanya gugus hidroksi pada silanol yang akan membuat ikatan hidrogen dengan senyawa polar yang akan dipisahkan, semakin kuat berikatan hidrogen maka semakin tertahan pada silika gel, sehingga senyawa non polar berupa steroid dapat terpisah

dengan bergerak bersama fase geraknya (Rahmawati, 2017). Struktur silika gel pada gambar 2.3 (Noviyanti, 2010) :



Gambar 2.4 Struktur Silika Gel

Pemakaian fase gerak yang sesuai menjadi salah satu faktor keberhasilan proses pemisahan suatu senyawa. Sifat pelarut menentukan kekuatan elusi untuk menggerakkan senyawa agar dapat terpisah. Menurut Atun (2014) urutan pelarut dengan kekuatan elusinya yaitu air > methanol > etanol > aseton > etil asetat > kloroform > dietil eter > metilen diklorida > benzene > toluene > karbon tetraklorida > heksana > petroleum eter. Rahmawati (2017) melakukan penelitian tentang variasi eluen pada kromatografi kolom memberikan hasil perbandingan n-heksana : etil asetat = 18 : 2 menghasilkan pemisahan terbaik dengan ditandai terbentuknya noda tunggal (Rahmawati, 2017). Pemakaian eluen kali ini digunakan komposisi gradien eluen.

2.9 Monitoring dengan KLT

Kromatografi lapis tipis termasuk dalam kategori kromatografi bidang yang sedikit berbeda dan lebih unggul dari kromatografi kertas yang sederhana. Pemakaian penyerap biasa digantikan oleh serbuk selulosa, alumina, gel silika atau material lainnya. Namun sering kali dipakai yaitu gel silika karena mempunyai kapasitas yang besar dalam proses adsorpsi. Pemisahan yang terjadi

pada kromatografi lapis tipis ini didasarkan pada distribusi senyawa yang dipisahkan diantara dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Senyawa yang telah terpisah akan menghasilkan noda pada pelat klt yang dapat dijadikan sebagai proses identifikasi suatu senyawa. Noda tersebut dapat dihitung nilai faktor retardasinya (R_f) dengan persamaan berikut (Wonorahardjo, 2013) :

$$R_f = \frac{\text{jarak tempuh senyawa}}{\text{jarak tempuh pelarut}} \dots\dots\dots (2.1)$$

Pemisahan yang baik dipengaruhi oleh pemakaian fase gerak yang baik. Kekuatan elusi menjadi hal penting dalam pemilihan fase gerak yang dapat dengan baik mengelusi senyawa analit yang hendak dipisahkan. Hal ini berkaitan erat dengan tingkat kepolaran suatu pelarut (Wonorahardjo, 2013). Pada penelitian ini digunakan fase gerak n-heksana dan etil asetat untuk mengidentifikasi senyawa steroid yang bersifat non polar sehingga lebih terdistribusi pada fase gerak. Pemilihan fase gerak ini didasarkan dari hasil penelitian Baderos (2017) yang melakukan pemisahan steroid fraksi petroleum eter *Eucheuma cottonii* menggunakan variasi eluen n-heksana dan etil asetat menghasilkan pemisahan terbaik pada perbandingan 17:3 yang ditandai terbentuknya noda tunggal lebih banyak dengan nilai R_f yang berjauhan. Menurut Luthfiyah (2017) yang melakukan pemisahan dengan KLT menunjukkan pemisahan steroid terbaik dengan perbandingan eluen 17:3 yang ditandai dengan terbentuknya noda tunggal steroid lebih banyak. Proses kromatografi lapis tipis dilakukan untuk memonitoring hasil pemisahan kromatografi kolom di kelipatan 2 botol vial.

2.10 Uji Toksisitas Metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test)

Uji toksisitas merupakan tahap awal dari suatu rangkaian uji bioaktivitas. Beberapa penelitian yang telah dilakukan hanya terfokus untuk bagaimana cara memperoleh suatu senyawa murni tanpa adanya pengujian lanjut (Kristanti, 2008). Pengujian toksisitas berguna untuk mengetahui seberapa beracun dosis yang diperlukan untuk suatu takaran dalam pengobatan (Azizah, 2016). Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) sering dipilih untuk uji toksisitas karena larva udang sangat rentang oleh beberapa senyawa toksik. Larva udang mudah untuk dikembangbiakan dengan mudah tanpa penanganan khusus, cepat, dan hanya perlu sedikit sampel (Kristanti, 2008).

2.10.1 Klasifikasi Larva Udang *Artemia salina* Leach

Artemia salina merupakan salah satu jenis larva udang yang hanya dapat hidup pada air dengan tingkat salinitas tinggi yaitu berkisar antara 60-300 ppt. Ukuran tubuhnya hanya mencapai 1 – 2 cm dengan daur hidup 25 hari yang ditentukan pada keadaan lingkungannya, diantaranya keadaan pH, suhu dan tingkat salinitas. *Artemia salina* hanya dapat bertahan dibawah suhu 35 °C. *Artemia salina* ditampilkan pada Gambar 2.5 (Dumitrascu, 2011).



Gambar 2.5 *Artemia salina*

Klasifikasi larva udang yang digunakan dalam uji toksisitas metode BSLT adalah sebagai berikut (Dumitrascu, 2011) :

Kingdom: Animalia
 Phylum: Arthropoda
 Subphylum: Crustacea
 Class: Branchiopoda
 Order: Anostraca
 Family: Artemiidae
 Genus: Artemia
 Species: *Artemia salina*

Artemia salina memiliki fase pertumbuhan yang terbagi menjadi beberapa tahap sebagai berikut (Kristanti, 2008) :

- Kista : setelah 24 - 48 jam akan pecah cangkangnya, muncul embrio berselaput. Dalam keadaan kering berbentuk bulat melengkuk, sedangkan saat basah berbentuk bulat penuh.
- Nauplius : terbentuk ketika embrio berselaput telah pecah dengan warna kuning kecoklatan dan dapat berenang
- Dewasa : berumur antara 7 – 15 hari tumbuh mata majemuk bertangkai serta telah memiliki alat cerna.

2.10.2 Analisa Probit

Analisa hasil dari uji toksisitas diperoleh angka kematian larva udang yang dinyatakan sebagai nilai LC₅₀. Arti dari LC₅₀ adalah menyatakan konsentrasi suatu senyawa yang diperlukan agar dapat membunuh sebanyak 50 % hewan uji (Azizah, 2016). Sebelum mendapatkan nilai LC₅₀ maka perlu menghitung persen kematian dari hasil uji toksisitas dengan persamaan berikut (Nurhayati, dkk., 2006) :

$$\% \text{ larva} = \frac{\text{jumlah larva mati}}{\text{jumlah total larva}} \times 100\% \dots \dots \dots (2.2)$$

Setelah mengetahui hasil persentase larva udang yang mati maka dilakukan analisa probit dengan tabel dan membuat persamaan garis $Y = Bx + A$, yang mana $Y = \log$ konsentrasi, dan X adalah angka probit, sehingga didapat nilai LC_{50} .

Apabila pada kontrol terjadi kematian larva udang lebih dari 5 %, maka dilakukan koreksi Abbott Formula dengan persamaan yakni (Kristanti, 2008) :

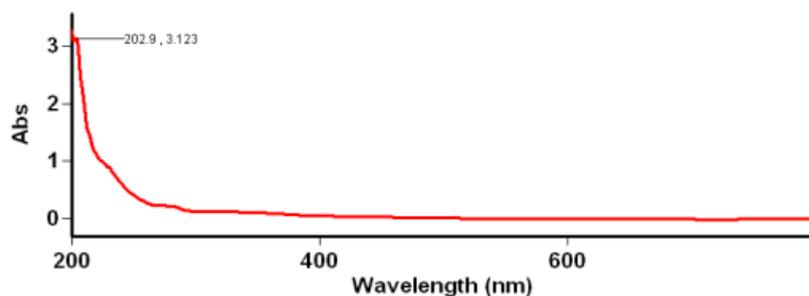
$$\text{Angka kematian} = \frac{\% \text{ kematian hewan uji} - \% \text{ kematian hewan kontrol}}{100 - \% \text{ kematian hewan uji}} \dots\dots (2.3)$$

Namun jika terjadi kematian lebih dai 10 % maka pengujian harus diulang kembali. Pengujian toksisitas yang dilakukan oleh Sari, dkk (2015) pada senyawa steroid fraksi n-heksana menghasilkan nilai LC_{50} terbaik sebesar 13,93 ppm jika dibandingkan dengan fraksi etil asetat sebesar 468,25 ppm dan pada ekstrak total sebesar 23,99 ppm.

2.11 Identifikasi Steroid dengan UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis atau yang disebut dengan spektrofotometer elektronik memiliki prinsip kerja berdasarkan pada trasisi tingkat energi akibat dari penyerapan sinar UV-Vis oleh molekul. Ada 2 transisi tingkat energi yang terjadi yaitu transisi antar orbital ikatan (*bonding*) dan anti ikatan (*anti bonding*). Selisih perbedaan energi antar orbital sebanding dengan panjang gelombang yang diserap oleh detektor (Panji, 2012). Hasil penyerapan detektor akan menghasilkan spektrum yang memberi informasi mengenai kehadiran gugus kromofor pada suatu sampel (Hendayana, 2006).

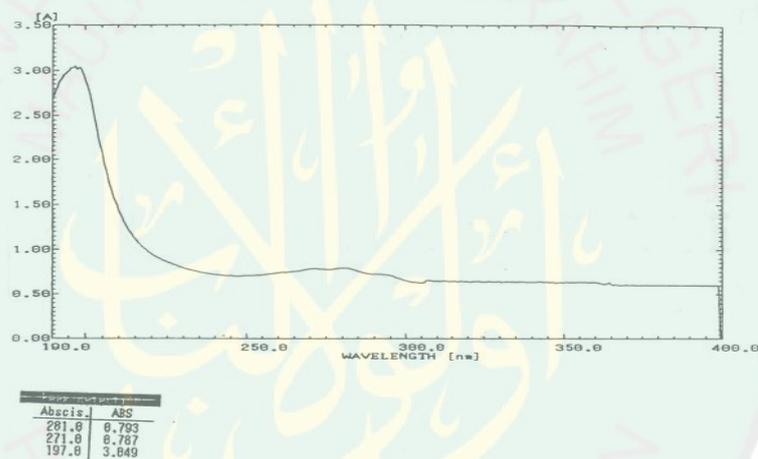
Anggraini (2019) melakukan identifikasi pada isolat steroid fraksi etil asetat pada *Eucheuma cottonii* memberikan serapan pada panjang gelombang maksimum 202,9 nm. Hasil spektrum UV-Vis dapat dilihat pada gambar 2.6.



Gambar 2.6 Spektrum UV-Vis steroid (Anggraini, 2019)

Penelitian yang dilakukan Susilawati, dkk (2010) mengidentifikasi steroid daun Rimbang menghasilkan serapan pada panjang gelombang 271 dan 281 nm. Hasil spektrum UV-Vis dapat dilihat pada gambar 2.7.

Lampiran 5. Spektrum UV Senyawa Hasil Isolasi Steroid dari Daun Rimbang



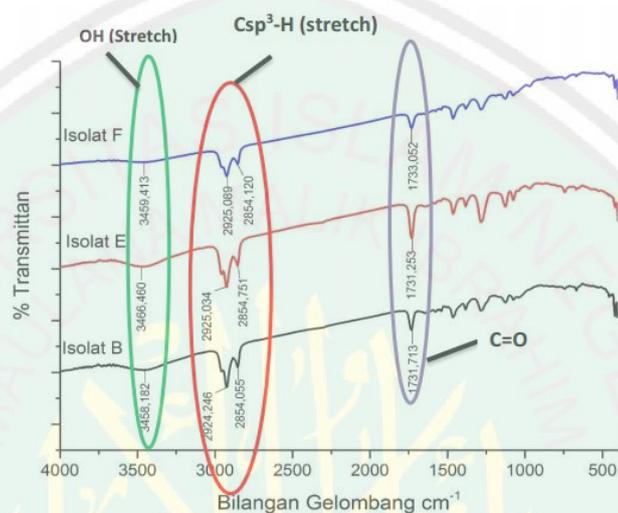
Gambar 2.7 Spektrum UV-Vis steroid (Susilawati, dkk., 2010)

2.12 Identifikasi menggunakan FTIR

Spektrofotometer infra merah didasarkan pada prinsip serapan yang diakibatkan adanya vibrasi suatu molekul. Vibrasi molekul akan memberikan *peak* pada bilangan gelombang dan intensitas tertentu pada setiap gugus molekulnya. Besarnya bilangan yang dihasilkan bernilai sama dengan frekuensi yang dihasilkan (Panji, 2012). Metode pada FTIR memiliki keunggulan diantaranya

memiliki kepekaan tinggi sehingga resolusi yang akan dihasilkan tinggi dengan waktu yang cepat (Williams dan Fleming, 2008).

Anggraini (2018) telah melakukan identifikasi steroid pada *Eucheuma cottonii* memberikan spektrum pada gambar 2.8. Hasil spektrum memberikan serapan khas gugus O-H stretching, Csp³-H stretching, dan C=O.



Gambar 2.8 Spektrum FTIR steroid (Anggraini, 2018).

2.13 Identifikasi menggunakan LC-MS/MS

Liquid chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) adalah salah satu jenis instrumentasi untuk melakukan suatu proses pemisahan. LC-MS termasuk dalam salah satu jenis kromatografi cair yang dapat digunakan untuk mengukur massa suatu senyawa yang dipisahkan (Baderos, 2017). Penggunaan LC-MS saat ini sangatlah beragam, mulai dari untuk analisa lingkungan, analisa hasil sintesis baik dalam bidang farmasi untuk obat-obatan, analisa dari zat alam seperti hormon dan zat beracun. Keunggulan LC-MS dibandingkan GC-MS diantaranya memiliki kutub untuk banyak kontaminan, tahap derivatisasi untuk senyawa yang

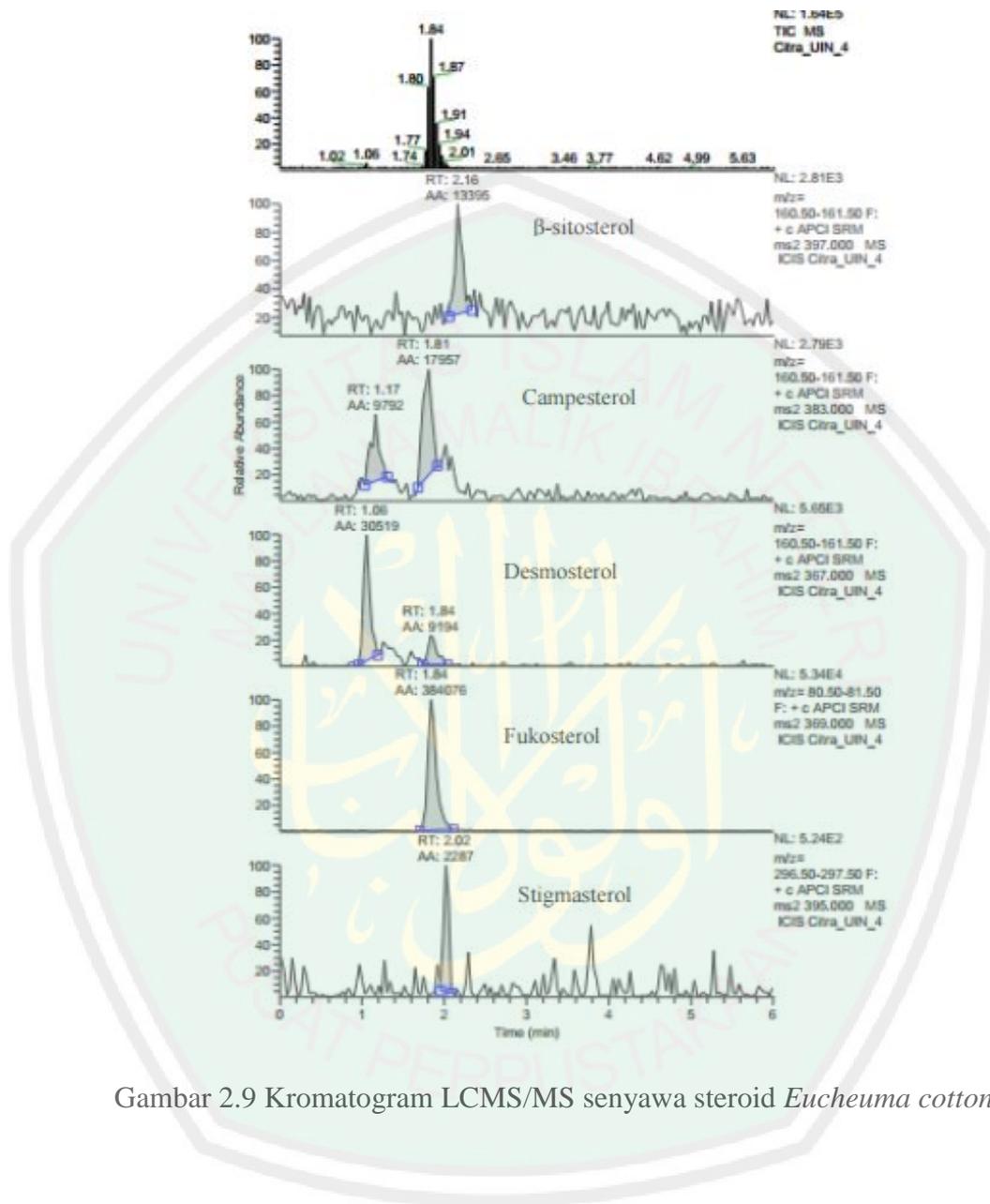
tahan panas, peningkatan jumlah bahan yang dapat dianalisis, serta memiliki waktu analisis total yang tidak lama (Fernandez, dkk., 2017).

Tabel 2.2 Hasil LCMS/MS steroid *Eucheuma cottonii*

No	Ekstrak / Fraksi	Jenis Steroid	Waktu retensi (min)	Massa ion perkusor [M-H ₂ O+H ⁺] (m/z)	Massa ion produk (m/z)
1	(Luthfiyah, 2017) Ekstrak Metanol	Desmosterol	0,85	367	160,5-161,5
		Fukosterol	1,35	369	80,5-81,5
		β-Sitosterol	1,54	397	160,5-161,5
2	(Mardaneni, 2017) Fraksi etil asetat	Fukosterol	1,35	369	80,5-81,5
		β-Sitosterol	1,54	397	160,5-161,5
		Stigmasterol	1,43	395	146,5-147,5
		Kampesterol	1,24	383	160,5-161,5
		Desmosterol	0,85	367	160,5-161,5
3	(Sari, 2017) Fraksi n-Butanol	Kolesterol	1,17	369	94,5-95,5
		Stigmasterol β-	0,86	395	80,5-81,5
		Sitosterol	1,30	397	160,5-161,5
		Kampesterol	0,71	383	160,5-161,5
4	(Baderos, 2017) Fraksi Petroleum eter	Kolesterol	1,57	369	94,5-95,5
		Stigmasterol	0,55	395	80,5-81,5
		β-Sitosterol	1,33	397	160,5-161,5
		Kampesterol	1,27	383	160,5-161,5
5	(Luki, 2018) Isolat kolom fraksi etil asetat	β-Sitosterol,	2,16	397	160,5-161,5
		Kampesterol,	1,81	383	160,5-161,5
		Desmosterol,	1,06	367	160,5-161,5
		Fukosterol	1,84	369	80,5-81,5
		Stigmasterol	2,02	395	296,5-297,5

Identifikasi senyawa steroid pada alga coklat yang dilakukan oleh Pereira, dkk (2016) menggunakan metode sumber ionisasi tekanan udara atmosfer (APCI) diperoleh 7 jenis senyawa golongan steroid dengan puncak dan waktu retensi yang berbeda-beda yaitu fukosterol, brassikasterol, kampesterol, β-sitosterol, kholesterol, ergosterol, dan stigmasterol. Beberapa penelitian pemisahan senyawa steroid pada *Eucheuma cottonii* dengan fraksi berbeda-beda menggunakan LC-MS dari Wongsorejo Banyuwangi menghasilkan senyawa yang sama yaitu β-sitosterol. Hasil kromatogram LC-MS/MS yang dilakukan Luki (2018) dapat

dilihat pada Tabel 2.2 dan Gambar 2.9 menunjukkan hasil steroid yang telah diidentifikasi LCMS/MS.



Gambar 2.9 Kromatogram LCMS/MS senyawa steroid *Eucheuma cottonii*

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2018 – Maret 2019 di Laboratorium Organik, Laboratorium Layanan dan Instrumen Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah oven, rotary evaporator vacuum, ayakan 90 mesh, hotplate, aluminium foil, inkubator shaker, kolom kromatografi panjang 50 cm diameter 1 cm, statif, seperangkat alat gelas laboratorium, lampu UV, neraca analitik, lemari asap, dan penyaring vakum, Salinometer, UV-Vis Varian Carry Hyperchem, FTIR merk Varian tipe FT-100, dan LC merk ACCELLA type 1250 dan MS/MS triple Q (*Quadrupole*) spektrometer massa TSQ QUANTUM ACCESS MAX.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alga merah (*Eucheuma cottonii*) yang berasal dari pantai Wongsorejo Banyuwangi, Etanol 96 %, metanol 99,9%, aquades, HCl 2 N, n-heksana 99 %, etil asetat p. a, pereaksi *Liberman-Burchard* (LB), Natrium bikarbonat (NaHCO₃) jenuh, kertas indikator pH, aseton, plat KLT GF 254, silika Gel G-60 (0,063 – 0,200 mm), KBr dan 0,1% asam format dalam air (fasa A) dan 0,1% asam format dalam asetonitril (fase B).

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat deskriptif kualitatif dengan memyajikan data sesuai dengan kejadian, menggunakan variasi metode pengisian kolom. Proses penelitian dilakukan sebagai berikut: alga merah *Eucheuma cottonii* dikeringkan dan diayak dengan ayakan 90 mesh. Lalu dianalisa kadar air dan kadar garam selanjutnya dimaserasi dengan pelarut metanol 99,9% lalu disaring dan dipekatkan dengan rotary evaporator vacum. Ekstrak metanol dilakukan hidrolisis menggunakan HCl 2 N dan dinetralkan dengan NaHCO₃ jenuh. Kemudian dipartisi menggunakan pelarut n-heksana dan dipekatkan dengan *rotary evaporator vacum*. Selanjutnya, hasil partisi. Proses isolasi menggunakan kromatografi kolom dengan fasa diam pengisian adsorben cara basah menggunakan gradien eluen campuran n-heksana dan etil asetat yaitu 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; dan 70:30. Eluat yang didapatkan ditampung dalam botol vial lalu fraksi dimonitoring kelipatan 2 botol vial menggunakan KLT Analitik dengan eluen n-heksana dan etil asetat (18:2). Isolat yang mengandung steroid diuji toksisitasnya dengan melakukan variasi konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm pada larva udang *Artemia salina* Leach. Dilakukan pengulangan 3 kali dan dihitung nilai LC₅₀ menggunakan aplikasi SPSS. Hasil isolat yang didapat dari kromatografi kolom diidentifikasi dengan UV-Vis, FTIR dan LCMS/MS untuk mengetahui jenis steroid yang terkandung.

3.4 Tahapan penelitian

Tahapan-tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu:

1. Preparasi sampel,
2. Analisa kadar air

3. Analisa kadar garam
4. Ekstraksi sampel,
5. Hidrolisis dengan HCl dan Partisi dengan n-Heksana
6. Uji fitokimia senyawa steroid
7. Isolasi menggunakan metode Kromatografi Kolom Basah
8. Monitoring dengan KLTA
9. Uji Toksisitas Makroalga *Euचेuma cottonii* terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach
10. Identifikasi senyawa steroid dengan UV-Vis, FTIR, dan LCMS/MS
11. Analisis data.

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Preparasi Sampel (Anam, 2015).

Sampel *Euचेuma cottonii* reparasi sampel tanaman alga merah *Euचेuma cottonii* dengan cara dikeringanginkan kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 38° C selama 24 jam. *Euचेuma cottonii* yang telah kering lalu dihaluskan menggunakan mesin penggilingan dengan ukuran 90 mesh.

3.5.2 Analisis Kadar Air (Anam, 2015).

Semua bagian alga merah dilakukan analisa kadar air. Sebelum pemakaian cawan harus dihilangkan kadar airnya dengan pemanasan oven pada suhu 100 °C sampai 105 °C selama 15 menit, lalu cawan dimasukkan dalam desikator sekitar 10 menit dan ditimbang. Perlakuan yang sama dilakukan sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Setelah konstan maka serbuk alga merah dimasukkan ke dalam cawan sebanyak 1 gram dan dikeringkan dalam oven pada suhu 100 °C

sampai 105 °C selama 15 menit, kemudian sampel disimpan dalam desikator selama 10 menit dan ditimbang. Perlakuan ini diulangi sampai didapat berat konstan. Kadar air dalam alga merah *Eucheuma cottonii* dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut (AOAC, 1984):

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

Keterangan : a = berat konstan cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

3.3.3 Analisa Kadar Garam

Analisa kadar garam atau yang disebut analisa salinitas alga merah *Eucheuma cottonii* dilakukan di laboratorium Eksplorasi Sumberdaya Perikanan dan Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

3.3.4 Ekstraksi Sampel (Anam, 2015)

Ekstraksi komponen aktif dengan perendaman memakai pelarut metanol. Sebanyak 100 gram serbuk alga merah diberi 500 mL metanol yang dibagi menjadi 2 erlenmeyer, kemudian diaduk selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm (*rotation per minutes*). Proses ekstraksi maserasi dilakukan penggantian pelarut setiap 24 jam sekali, pengulangan pelarut sebanyak 3 kali. Pengambilan filtrat dilakukan penyaringan. Total filtrat yang diperoleh digabung menjadi satu. Filtrat yang didapat dipekatkan dengan rotary evaporator dengan suhu 50 °C. Rendemen dapat dihitung dengan persamaan berikut (Luthfiyah, 2017) :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \dots \dots \dots (3.2)$$

3.5.5 Hidrolisis dengan HCl dan Partisi dengan n-Heksana (Andriani, 2015)

Ekstrak pekat metanol alga merah *Eucheuma cottonii* sebanyak 10 gram ditempatkan dalam beaker glass dan ditambahkan 20 mL HCl 2 N perbandingan (1:2). Proses hidrolisis dilakukan selama 1 jam menggunakan magnetik stirrer hot plate pada suhu ruang. Hasil hidrolisis ditambah dengan natrium bikarbonat (NaHCO_3) sampai pH-nya netral, selanjutnya dipartisi dengan 25 mL pelarut n-heksana menggunakan corong pisah. Dilakukan partisi kembali sampai 3 kali pengulangan dengan pelarut n-heksana.

3.5.6 Uji Fitokimia Senyawa Steroid (Sharo, 2013)

Hasil partisi n-heksana dilanjutkan uji fitokimia dengan mengambil sebanyak 1 mg ke dalam tabung reaksi, ditambah dengan 0,5 mL kloroform, 0,5 mL asa asetat anhidrida, dan 1-2 mL H_2SO_4 melalui dinding tabung.

3.5.7 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Metode Kromatografi Kolom Basah (Kusmiyati, dkk., 2011)

Fraksi n-heksana yang didapat dilakukan pemisahan senyawa steroid dengan kromatografi kolom. Penggunaan silika gel G-60 sebanyak 10 gram yang diaktifasi dalam oven selama 2 jam pada suhu 110 °C, lalu didinginkan dalam desikator selama 15 menit. Pada bagian bawah kolom diisi *glass woll*. Pembuatan bubuk silika dalam *beaker glass* ditambah eluen heksana : etil asetat (95:5) sedikit demi sedikit dengan diaduk memakai *magnetic stirrer* diatas *hot plate* tanpa pemanasan hingga terbentuk suspensi tanpa gelembung. Kemudian dimasukkan dalam kolom memakai corong gelas, setelah terisi maka kolom diketuk-ketuk

pelan agar terisi mampat lalu dibiarkan selama 24 jam. Pelarut dikeluarkan hingga mencapai batas absorben sekitar 1,5 cm di atas fase diam.

Sebanyak 0,0667 gram fraksi n-heksana dilarutkan dengan 1 mL eluen eluen heksana : etil asetat (95:5) dan dipipet ke dalam kolom. Setelah sampel turun ditambah gradien eluen n-heksana : etil asetat secara berurutan dari 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; dan 70:30. Diatur kran dengan kecepatan alir diatur 2 mL/menit. Eluat yang keluar ditampung pada botol vial sebanyak 2 mL hingga diperoleh kurang lebih 270 botol vial. Selama proses elusi dijaga silika gel selalu terendam eluen.

3.5.8 Monitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) (Rahmawati, 2017)

Isolat hasil kromatografi kolom dilakukan monitoring dengan KLTA. Plat silika gel F254 digunakan ukuran 10x10 cm, dan eluen campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17:3. Eluen dimasukkan ke dalam bejana pengembang lalu dijenuhkan selama 1 jam. Plat silika gel ditandai 1 cm dari bagian batas atas dan bawah, dan diaktivasi pada suhu 110 °C selama 30 menit dalam oven. Isolat ditotolkan sebanyak 10 kali pada plat silika gel menggunakan pipa kapiler dengan jarak ± 1 cm dari bagian bawah plat. Setelah proses penotolan selesai dimasukkan ke dalam bejana pengembang dan dielusi sampai tanda batas atas. Noda/bercak hasil pemisahan kemudian diamati di bawah sinar UV dan dihitung R_f -nya.

3.5.9 Uji Toksisitas terhadap Larva *Udang Artemia salina Leach*

3.5.9.1 Penetasan Larva Udang (Sharo, 2013).

Penetasan larva udang *Artemia salina Leach*, dimasukkan 250 mL air laut dalam wadah penetasan, lalu dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina Leach*. Diaerasi dan diberi lampu. Telur akan menetas dalam waktu \pm 24 jam dan siap untuk digunakan sebagai target uji toksisitas pada umur 48 jam.

3.5.9.2 Uji Toksisitas (Azizah, 2016)

Uji toksisitas dilakukan pada isolat senyawa steroid hasil kromatografi kolom dengan variasi konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm. Masing-masing konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali. Larutan uji di masukkan dalam vial lalu pelarutnya diuapkan. Kemudian, ditambahkan dengan 100 μ L dimetil sulfoksida (DMSO), setetes larutan ragi roti dan diberi air laut hingga volumenya 10 mL. Larutan uji ditambahkan dengan 10 ekor larva udang. Kontrol negatif dibuat dengan hanya menambahkan DMSO dan pelarut. Larutan kontrol ditambah dengan air laut hingga volumenya 10 mL dan ditambah larva udang *Artemia salina L.* sebanyak 10 ekor. Proses pengujian dilakukan pengamatan selama 24 jam.

3.5.10 Identifikasi Steroid menggunakan UV-Vis

Isolat steroid hasil pemisahan kromatografi kolom yang telah kering dari pelarut n-heksana, ditambah dengan 5 mL etanol. Kemudian di vortex hingga metanol dapat melarutkan isolat steroid. Selanjutnya dimasukkan dalam kuvet dan dianalisa pada panjang gelombang 200-800 nm.

3.5.11 Identifikasi Steroid menggunakan FTIR (Rahmawati, 2017)

Isolat yang diperoleh digrus dengan KBr menggunakan *mortar agate* kemudian dipress dengan tekanan 80 torr selama 10 menit sehingga menjadi pelet. Selanjutnya pelet dimasukkan ke dalam spektrofotometer FTIR untuk dianalisis gugus fungsinya.

3.5.12 Identifikasi Steroid menggunakan LCMS/MS

Isolat steroid hasil kromatografi kolom dilakukan analisa menggunakan LC-MS/MS. Spesifikasi LC yang digunakan adalah UHPLC merk ACCELLA *type 1250* rancangan *Thermo Scientific* yang tersusun atas *degasser* vakum, pompa *quartener*, *autosampler* thermostatic dioperasikan komputer melalui program *x-calibur 2.1*. Kolom yang dipakai memiliki spesifikasi *hypersil gold* (50 mm x 2,1 mm x 1,9 μm). Fasa gerak yang dipakai adalah 0,1% asam format dalam air (fasa A) dan 0,1% asam format dalam asetonitril (fase B). Pengaturan eluen secara gradien linier 100% (A) : 0% (B) sampai 0% (A) : 100% (B) yang diatur selama 5 menit dengan laju alir 500 $\mu\text{L}/\text{menit}$. Volume isolat yang diinjeksikan sebanyak 2 μL . Kolom dikontrol pada suhu 30 °C, dan kompartemen autosampler ditetapkan untuk 10 °C. MS yang dipakai dengan tipe MS/MS tripe Q (*Quadrupole*) spektrometer massa TSQ QUANTUM ACCESS MAX dari Thermo Finnigan dengan SRM (*Selective reaction monitoring*) dan sumber ionisasi APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) dikendalikan oleh software TSQ Tune dalam mode positif. Kondisi ion APCI sebagai berikut: Arus yang digunakan 4 μA , suhu penguapan 250 °C, suhu kapiler 300 °C, sheat gas pressure 45 arbitrary units, dan Aux gas pressure 15 arbitrary units.

3.6 Analisis Data

Isolasi senyawa steroid dengan kromatografi kolom dianalisa secara kualitatif menggunakan KLTA. Isolat yang teridentifikasi steroid dilakukan uji toksisitas untuk didapat data kematian dari larva udang yang kemudian dianalisa angka probit menggunakan program SPSS. Hasil pengolahan data berupa nilai LC_{50} yang menunjukkan nilai konsentrasi yang menyebabkan 50 % kematian. Data yang diperoleh dari hasil identifikasi senyawa steroid dilakukan dengan menginterpretasikan hasil spektra UV-Vis, FTIR dan kromatogram LCMS/MS sehingga dapat ditentukan jenis senyawa steroid yang terdapat dalam Alga merah (*Eucheuma cottonii*).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Pada penelitian ini digunakan sampel *Eucheuma cottonii* yang merupakan rumput laut dari perairan Wongsorejo Kabupaten Banyuwangi Provinsi Jawa Timur. Sampel basah yang diperoleh sebanyak 10 Kg dicuci dan dipotong kecil-kecil untuk memperluas permukaan. Ukuran sampel yang kecil akan mempercepat proses pengeringan yang dilakukan. Pengeringan dilakukan dengan cara dikeringanginkan tanpa terkena sinar matahari untuk menghindari terjadinya kerusakan senyawa.

Sampel *Eucheuma cottonii* yang telah kering selanjutnya dihaluskan dan diayak dengan ayakan 90 mesh untuk menyeragamkan ukuran. Ukuran sampel yang lebih kecil akan memperluas kontak dengan pelarut, sehingga pelarut dapat lebih maksimal mengekstraksi senyawa metabolit sekunder. Luas permukaan sampel yang semakin meningkat akan mempercepat kelarutan suatu zat (Tambun, dkk., 2016). Serbuk *Eucheuma cottonii* yang didapat seberat 0,48 Kg dari total berat awal 10 Kg, sehingga diperoleh rendemen sebesar 4,8 %.

4.2 Analisa Kadar Air

Alga merah *Eucheuma cottonii* dalam keadaan basah memiliki kadar air tinggi sehingga sangat rentan terjadi proses pembusukan, sedangkan setelah dikeringkan didapat kadar air yang sangat rendah. Kadar air yang rendah ini akan menguntungkan pada saat proses ekstraksi karena mempermudah pelarut untuk menembus dinding sel (Khoiriyah, dkk., 2014). Jika kadar air bernilai tinggi akan

menyebabkan hasil rendemen yang sedikit dan membutuhkan waktu yang lama pada proses ekstraksi (Parasetia, dkk., 2012). Hasil analisa kadar air *Eucheuma cottonii* dengan metode gravimetri menggunakan pemanas oven pada suhu 100 – 105 °C ditampilkan pada Tabel 4.1

Tabel 4.1 Kadar air *Eucheuma cottonii*

<i>Eucheuma cottonii</i>	Kadar Air
Sampel Basah	86,07 %
Sampel Kering	4,71 %

Kadar air *Eucheuma cottonii* basah adalah 86,07 %, sedangkan kadar air untuk *Eucheuma cottonii* kering sebesar 4,71 %. Nilai kadar air di bawah 10 % adalah kondisi aman untuk proses penyimpanan menggunakan wadah plastik yang lebih aman karena terlindungi dari kondisi udara ruangan (Dinarto, 2010). Hasil penelitian kadar air oleh Mardaneni (2017) pada *Eucheuma cottonii* basah sebesar 89,28 %, sedangkan *Eucheuma cottonii* kering sebesar 5,07 %.

4.3 Analisa Kadar Garam

Kadar garam atau yang disebut salinitas pada suatu alga dipengaruhi oleh kondisi lingkungan tempat hidupnya. Pengujian tingkat salinitas dilakukan untuk mengetahui kadar garam pada alga merah *Eucheuma cottonii* yang mungkin dapat berpengaruh pada perkembangan dan pertumbuhan larva udang *Artemia salina* yang akan dilakukan pengujian tingkat mortalitasnya. Proses pengukuran salinitas dilakukan dengan alat salino meter yang berprinsip pada kekuatan daya hantar listrik. Air laut merupakan air dengan elektrolit yang tinggi, semakin tinggi kadar elektrolitnya maka semakin kuat salinitasnya, dengan artian semakin tinggi kadar garam yang dikandungnya (Muliawan, dkk., 2016).

Alga merah *Eucheuma cottonii* dilakukan penghalusan dan ditambahkan aquades yang berfungsi untuk melarutkan garam dengan cara pengadukan. Larutan garam tersebut diteteskan pada salinometer dan dilakukan pengukuran. Hasil pengujian kadar garam ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Kadar garam *Eucheuma cottonii*

<i>Eucheuma cottonii</i>	Kadar Garam (%)
Sampel basah	2,20
Sampel kering	24,00

Hasil uji kadar garam *Eucheuma cottonii* dari pantai Wongsorejo Banyuwangi untuk sampel basah adalah sebesar 2,20 %, sedangkan pada sampel kering lebih tinggi yaitu 24,00 %. Kandungan air yang lebih sedikit pada sampel kering mengakibatkan semakin tingginya kadar garam. Penelitian Azizah (2016) menguji kadar garam *Eucheuma spinosum* kering dari pantai Jumiang Pamekasan Madura menghasilkan kadar sebesar 13,00 %, kadar garam ini memiliki selisih yang berbeda dari hasil sampel kering pada Tabel 4.2. jenis spesies yang berbeda serta asal tempat tumbuh yang berbeda dapat memberi pengaruh pada kadar garam yang dikandung oleh masing-masing alga. Kedalaman penanaman rumput laut memberi pengaruh dalam kadar garam yang dikandungnya. Penanaman *Eucheuma cottonii* pada penelitian ini berkisar pada kedalaman 1-20 meter.

4.4 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi senyawa metabolit sekunder pada serbuk sampel alga merah *Eucheuma cottonii* dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol pada suhu ruang. Sampel yang direndam dengan metanol akan mengalami proses difusi karena adanya perbedaan konsentrasi di dalam dan di

luar sel. Metanol yang ada di luar sel akan masuk melalui dinding sel *Eucheuma cottonii*, hal ini akan membuat senyawa yang terkandung dalam sel akan dapat terekstrak dalam metanol.

Penggunaan metanol sebagai pelarut didasarkan pada prinsip like dissolved like. Senyawa metabolit sekunder dalam tanaman pada umumnya terikat dengan glikosidanya, gugus hidroksil yang ada pada glikosida akan membuat senyawa metabolit sekunder bersifat polar. Oleh karena itu, metanol yang merupakan pelarut organik polar dapat mengekstrak senyawa metabolit sekunder pada sampel *Eucheuma cottonii*. Penggantian pelarut dalam mengekstrak senyawa metabolit sekunder dilakukan sebanyak 3 kali, yang ditandai dari warna hijau pekat hingga hijau pudar (Kristanti, dkk., 2006). Warna hijau pudar teramati pada proses ekstraksi penggantian pelarut ke tiga mengasumsikan bahwa senyawa metabolit sekunder sudah banyak terekstrak pada pelarut sebelumnya. Hasil yang didapat setelah dilakukan pemekatan dengan *rotary evaporator* dari penelitian ini sebesar 13,7911 gram dengan rendemen yaitu 13,79 %. Penelitian yang dilakukan oleh Rahmawati (2017) mengekstraksi *Eucheuma cottonii* dengan pelarut metanol menghasilkan rendemen sebesar 11,87 %.

4.5 Hidrolisis Ekstrak Metanol

Senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan biasanya berikatan dengan gugus gula yang disebut dengan glikosida. Steroid termasuk senyawa metabolit sekunder yang juga berikatan dengan gugus gula, sehingga menyebabkan steroid tersebut bersifat polar. Perlunya proses hidrolisis untuk memutus gugus gula yang

bersifat polar agar steroid dapat terekstrak pada pelarut non polar pada tahap partisi.

Reaksi hidrolisis dengan HCl 2 N yang bersifat *reversible*). (dugaan reaksi hidrolisis dapat dilihat pada Gambar 2.3), maka perlu untuk dihentikan dengan cara penetralan hingga larutan yang dihidrolisis mencapai pH 7 menggunakan natrium bikarbonat (NaHCO₃). Gambar reaksi penetralan disajikan dalam gambar 4.1. Pada proses ini terbentuk gumpalan berwarna hijau pekat dan menghasilkan buih pada ekstrak metanol. Penetralan dilakukan karena pada keadaan netral, glikosida bersifat stabil (Fessenden dan Fessenden, 1986).



Gambar 4.1 Reaksi HCl dan natrium bikarbonat (Mardiyah, 2012)

4.6 Partisi dengan n-Heksana

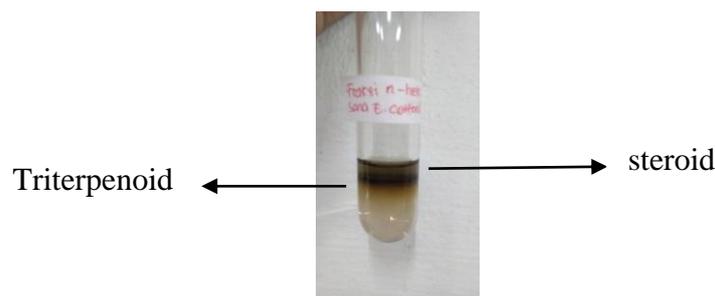
Ekstrak *Eucheuma cottonii* yang telah dihidrolisis dilakukan ekstraksi cair-cair untuk memisahkan senyawa steroid yang dalam keadaan bebas tanpa terikat oleh gugus gula. Penggunaan pelarut n-heksana yang cenderung bersifat non polar akan memaksimalkan proses pemisahan steroid yang bersifat non polar, sehingga senyawa steroid akan cenderung terdistribusi ke dalam fase organik sedangkan senyawa glikonnya akan cenderung terdistribusi ke fase air.

Fase diam dan fase organik akan menghasilkan dua lapisan larutan yang tidak bercampur karena memiliki tingkat kepolaran serta densitas yang berbeda. Fase organik berada di lapisan atas sedangkan fase air berada di lapisan bawah, sehingga mudah untuk memisahkan ke dua fase tersebut. Fase organik yang didapat dilakukan pemekatan dengan dialiri oleh gas N₂ hingga diperoleh fraksi

sebesar 1,1525 gram dengan rendemen 11,52 % dari berat ekstrak metanol. Penelitian Anggraini (2019) yang melakukan partisi ekstrak *Eucheuma cottonii* dengan pelarut etil asetat menghasilkan rendemen sebesar 17,19 %, hasil tersebut menandakan bahwa banyak senyawa semipolar yang ikut terekstrak sesuai dengan sifat etil asetat yang masuk dalam kategori pelarut semipolar, sedangkan penelitian Baderos (2017) yang melakukan partisi ekstrak metanol *Eucheuma cottonii* menggunakan pelarut petroleum eter menghasilkan rendemen sebesar 12,13 % menandakan bahwa banyak senyawa semipolar yang ikut terekstrak sesuai dengan sifat petroleum eter merupakan pelarut yang bersifat non polar.

4.7 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Untuk memastikan bahwa pada hasil fraksi pelarut n-heksana terdapat steroid maka perlu dilakukan pengujian fitokimia dengan pereaksi *Liebermann-Burchard*. Ragen *Liebermann-Burchard* terdiri dari kloroform, asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat. Kloroform digunakan untuk melarutkan fraksi. Pemakaian asam kuat berupa asam sulfat pada tahap ini akan membuat senyawa steroid terdehidrasi membentuk garam *cholestadiene* yang mengalami konjugasi dengan menghasilkan warna hijau kebiruan dan violet (Robinson, 1995). Hasil uji fitokimia fraksi n-heksana memberikan hasil positif mengandung steroid yang ditandai dengan terbentuknya cincin warna hijau dibagian atas serta positif terpenoid dengan adanya cincin berwarna coklat dibawah cincin hijau seperti yang terlihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.2 Hasil uji fitokimia steroid

4.8 Isolasi Steroid dengan Kromatografi Kolom dan Monitoring dengan KLTA

Hasil partisi alga merah *Eucheuma cottonii* yang positif mengandung steroid dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom. Prinsip kromatografi kolom yaitu distribusi senyawa diantara fase diam dan fase gerak dengan pemakaian kolom. Kolom yang digunakan pada penelitian ini berdiameter 1 cm (Mubarokah, 2017). Fase diam yang dipakai yaitu silika gel G-60 yang diaktivasi untuk menghilangkan kandungan air yang ada dalam silika, sehingga proses pemisahan berlangsung secara maksimal. Silika gel didinginkan, dan distirrer selama 1 jam dengan pemakaian pelarut perbandingan n-heksana:etil asetat (95:5). Proses pemasukan silika gel ke dalam kolom dengan cara diketuk-ketuk dinding kolom untuk memampatkan fase diam agar tidak ada gelembung atau celah yang akan mempengaruhi proses pemisahan.

Fase diam didiamkan lebih dari 24 jam untuk proses pemampatan yang lebih maksimal. Sebanyak 0,067 gram sampel yang dilarutkan ke dalam 1 mL pelarut perbandingan n-heksana:etil asetat (95:5) dimasukkan ke dalam kolom. Jumlah tersebut merupakan perbandingan antara sampel dengan silika gel 1:150 (Tyas, 2017). Sistem fase gerak yang digunakan yaitu gradien eluen non polar

karena senyawa steroid yang ingin dipisahkan memiliki sifat non polar, sehingga steroid akan lebih cepat terelusi oleh eluen dan terpisah sebagai eluat. Gradien eluen perbandingan n-heksana:etil asetat 95:5, 9:10, 85:15, 80:20, 75:25, dan 70:30 dimasukkan secara berurutan mulai dari tingkat non polar yang lebih tinggi. Selain itu, pemakaian sistem gradien eluen ini karena senyawa yang ada dalam bahan alam memiliki tingkat kepolaran yang berbeda. Proses elusi diatur laju alirnya dengan kecepatan 2 mL/menit (Fitri, 2017). Eluat yang keluar ditampung sebanyak 2 mL/botol vial, penampungan sesedikit mungkin untuk menghindari tercampurnya senyawa yang telah terpisah. Pemisahan dengan kromatografi kolom pada penelitian ini menghasilkan sebanyak 263 vial.

KLTA merupakan teknik pemisahan senyawa berdasarkan distribusi diantara fase diam dan fasa gerak. Fase diam yang digunakan yaitu plat silika gel F₂₅₄. Fase gerak yang digunakan yaitu perbandingan n-heksana:etil asetat 17:3 (Luthfiyah, 2017). Monitoring KLTA hasil isolasi senyawa steroid dilakukan setiap kelipatan 2 vial. Hasil dari monitoring KLTA akan menunjukkan keberadaan senyawa steroid dalam vial yang disajikan pada Tabel 4.3.

Hasil monitoring KLTA didapat 15 Fraksi dari penggabungan berdasarkan noda yang terbentuk dengan warna dan R_f yang sama, sehingga diperoleh 15 fraksi yaitu A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14, dan A15. Fraksi yang teridentifikasi steroid yaitu A2 dengan berat 0,0246 gram dan A4 seberat 0,0009 gram. Fraksi A2 ditandai dengan terbentuknya noda tunggal berwarna hitam pada saat disinari oleh lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dengan nilai R_f 0,7300. Azah (2019) telah melakukan identifikasi steroid dengan KLT pada *Hidrilla verticillata* memberikan warna hitam ketika disinari

lampu UV berpanjang gelombang 254 nm yang kemudian diuji dengan reagen *Liebermann-Burchard* memberikan warna hijau kebiruan yang menandakan senyawa steroid. Fraksi A4 terdapat noda tunggal berwarna hijau ketika disinari lampu UV berpanjang gelombang 366 nm dengan nilai Rf 0,3580. Perbedaan nilai Rf dari ke dua fraksi menunjukkan tingkat kepolaran senyawa steroid yang dipisahkan bersifat beda. Anggraini (2018) melakukan isolasi steroid fraksi pelarut etil asetat pada *Eucheuma cottonii* menghasilkan 3 fraksi steroid dengan noda tunggal.

Table 4.3 Hasil Monitoring dengan KLTA

No	Fraksi	Vial	Warna (UV)	Jarak Senyawa (Cm)	Jarak Elusi (Cm)	Rf	Senyawa
1	A1	0-7	-	-	-	-	-
2	A2	8-22	Hitam	5,7	7,8	0,7300	Steroid
3	A3	23-48	-	-	-	-	-
4	A4	49-61	Hijau	2,8	7,8	0,3580	Steroid
5	A5	62-70	Hijau Merah	2,9 2,3	7,8 7,8	0,3720 0,2950	Campuran steroid dan Triterpenoid
6	A6	71-72	-	-	-	-	-
7	A7	73-78	Merah	2,3	7,8	0,2950	Triterpenoid
8	A8	79-82	Merah	1,8	7,8	0,2307	Triterpenoid
9	A9	83-99	Merah	2,3	7,8	0,2948	Triterpenoid
			Merah	1,8	7,8	0,2307	
			Merah	0,3	7,8	0,0384	
10	A10	100-122	Merah	1,8	7,8	0,2307	Triterpenoid
			Merah	1,0	7,8	0,1282	
			Merah	0,3	7,8	0,0384	
11	A11	123-154	Merah	1,0	7,8	0,1282	Triterpenoid
			Merah	0,3	7,8	0,0384	
12	A12	155-157	Merah	0,3	7,8	0,0384	Triterpenoid
13	A13	158-184	Merah	1,0	8	0,1250	Triterpenoid
			Merah	0,3	8	0,0375	
14	A14	185-252	Merah	0,25	8	0,0312	Triterpenoid
15	A15	253-263	Merah	-	-	-	Triterpenoid

4.9 Uji Toksisitas Senyawa Steroid Metode BSLT

4.9.1 Penetasan Larva Udang

Uji toksisitas merupakan uji awal untuk mengetahui tingkatan toksik suatu senyawa ketika diberikan pada suatu organisme sebelum suatu dosis diberikan pada manusia sebagai obat. Pada penelitian ini digunakan telur larva udang *Artemia salina Leach* yang ditetaskan dalam air laut. Proses penetasan *Artemia salina* dibantu dengan pencahayaan yang sesuai serta aerasi untuk pemasokan oksigen (Panggabean, 1984). Penetasan dilakukan selama 48 jam, selanjutnya dapat digunakan sebagai hewan uji karena pada waktu tersebut telah terbentuk mulut. Kulit dan mulut merupakan media masuknya senyawa steroid ataupun toksik ke dalam tubuh.

4.9.2 Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan pada fraksi n-heksana dan isolat steroid A2 hasil kromatografi kolom secara *in vitro* yaitu memberikan senyawa isolat steroid ke lingkungan tempat hidup *Artemia salina Leach*. Konsentrasi yang digunakan ialah 0, 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm dengan kontrol DMSO. Penggunaan DMSO sebagai surfaktan yang memiliki gugus hidrofobik yang bersifat non polar akan berinteraksi dengan steroid, sedangkan gugus hidrofilik yang bersifat polar akan berinteraksi dengan air laut.

Sampel dimasukkan ke dalam botol vial lalu diuapkan pelarutnya untuk menghindari pelarut yang mungkin memberi efek toksik pada larva udang *Artemia salina Leach*. Selanjutnya ditambah DMSO dan air laut serta di vortex untuk menghomogenkan. Pemberian larutan ragi 1 tetes dalam tiap vial sebagai

sumber makanan *Artemia salina* Leach. Larva udang *Artemia salina* Leach yang digunakan sebanyak 10 ekor/botol vial dengan total volume larutan dari semua komponen adalah 10 mL. Hasil dari uji toksisitas ditampilkan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Hasil Pengamatan Kematian Larva Udang

Fraksi n-Heksana		Isolat steroid A2	
Konsentrasi (ppm)	Modus mati	Konsentrasi (ppm)	Modus mati
Kontrol DMSO	0	Kontrol DMSO	0
0	0	0	0
1	2	1	1
2	2	2	1
3	2	3	1
4	3	4	2
5	2	5	2

Dari data pada tabel 4.4 menunjukkan nilai modus terjadi kematian tertinggi pada konsentrasi 4 ppm dan menurun kembali pada konsentrasi 5 ppm. Steroid merupakan senyawa metabolit sekunder yang memiliki sifat toksik pada larva udang. Senyawa metabolit sekunder akan masuk ke dalam tubuh *Artemia salina* Leach melalui kulit dan mulut. Senyawa yang memasuki saluran pencernaan akan terabsorpsi ke dalam membran sel dan terdistribusi ke dalam tubuh (Ningdiyah, dkk., 2015). Senyawa metabolit sekunder di dalam tubuh *Artemia salina* Leach akan menghambat enzim RNA polymerase dalam pemutusan rantai DNA yang mengakibatkan tidak berlangsungnya sintesis protein (Anggraini, 2019). Selain itu, membran protein integral pada sel akan berikatan dengan gugus OH milik steroid yang mengakibatkan terjadinya proses transport ion oleh Na^+/K^+ tidak dapat dihentikan ke dalam sel. Tidak terkendalinya proses transport ion akan membuat membran sel pecah dan *Artemia salina* Leach mengalami kematian (Budaraga, 2016). Data modus kematian larva udang *Artemia salina* Leach memberikan hasil analisis probit yang ditampilkan pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Nilai toksisitas *Eucheuma cottonii*

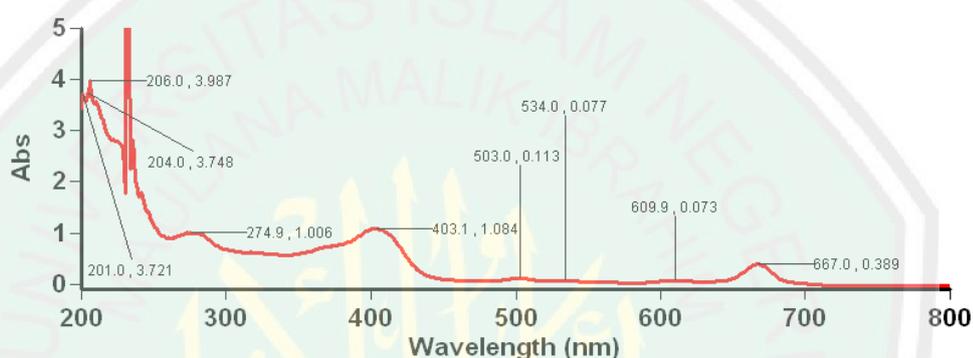
Larutan Uji	Nilai LC ₅₀ (ppm)
Fraksi n-Heksana	25,7238
Isolat Steroid A2	11,0746

Nilai LC₅₀ memberikan informasi bahwa pemberian senyawa pada konsentrasi tersebut akan membunuh sebanyak 50 % dari jumlah total larva udang yang diujikan (Sari, 2015). Nilai analisis probit menghasilkan nilai LC₅₀ dibawah 30 ppm yang menunjukkan fraksi n-heksana dan isolat steroid A2 memiliki aktivitas toksik yang tinggi. Nilai LC₅₀. Menurut Ningdiyah, dkk, (2015) nilai LC₅₀ senyawa yang berasal dari tumbuhan jika nilai LC₅₀ ≤ 30 ppm bersifat sangat toksik, LC₅₀ sebesar 31 ppm – 1000 ppm bersifat toksik, dan LC₅₀ ≥ 1000 ppm bersifat tidak toksik. Alga merah *Eucheuma cottonii* merupakan tumbuhan dengan kandungan senyawa bioaktif yang sering digunakan sebagai obat (Sharo, 2013).

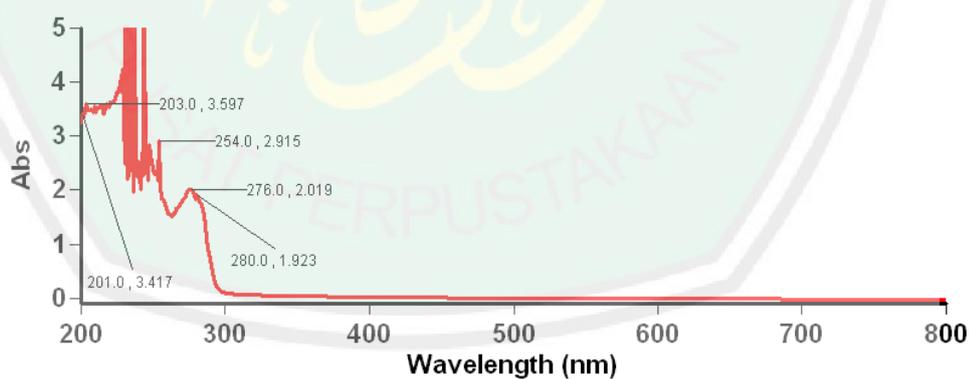
Nilai LC₅₀ fraksi n-heksana yaitu 25,7238 ppm yang lebih besar jika dibandingkan dengan isolat steroid A2 yang memiliki nilai LC₅₀ yang lebih kecil yaitu 11,0746 ppm. Hal ini dimungkinkan pada fraksi n-heksana yang masih dalam bentuk campuran terkandung senyawa yang memberi efek antagonis, sehingga menghambat sifat toksik pada senyawa steroid. Isolat steroid A2 yang merupakan hasil isolasi memiliki sifat toksik yang tinggi, namun sifat ini akan menurun jika dalam bentuk campuran fraksi. Hasil nilai LC₅₀ pada penelitian ini lebih baik jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Afif, dkk. (2015) pada *Eucheuma cottonii* memberikan nilai LC₅₀ sebesar 194,4000 ppm untuk ekstrak metanol dan 635,000 ppm untuk fraksi n-heksana. Tingkat toksisitas yang tinggi pada penelitian ini maka dapat dikembangkan sebagai obat untuk sel kanker (Ningdiyah, 2015).

4.10 Identifikasi Steroid menggunakan UV-Vis

Hasil isolasi steroid dengan kromatografi kolom yang telah dilakukan monitoring dengan KLTA selanjutnya dilakukan identifikasi menggunakan spektroskopi UV-Vis. Berdasarkan identifikasi fraksi n-heksana isolat steroid A2 menghasilkan serapan pada panjang gelombang yang ditampilkan pada Gambar 4.3 dan 4.4.



Gambar 4.3 Spektra UV-Vis fraksi *Eucheuma cottonii*



Gambar 4.4 Spektra UV-Vis isolat steroid A2

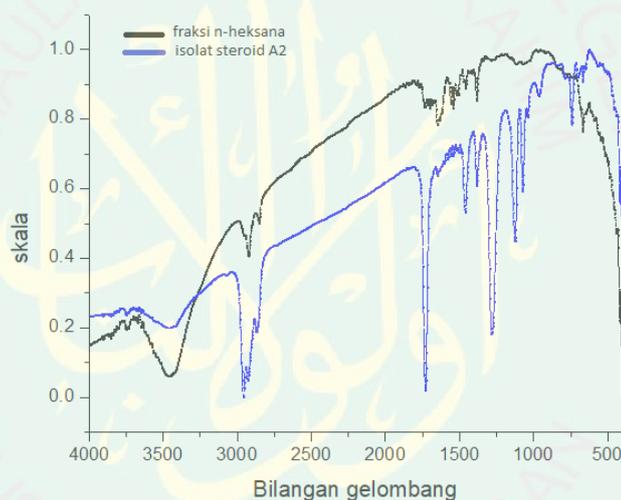
Gambar 4.3 menunjukkan adanya serapan pada panjang gelombang 403,1 nm yang merupakan transisi elektron non bonding milik gugus jenuh O-H. Sukanda, dkk (2018) melakukan identifikasi isolasi senyawa aktif antimakan daun

Tenggulum memberikan serapan pada panjang gelombang 403 nm yang merupakan senyawa golongan triterpenoid alkohol. Serapan terlihat pada panjang gelombang 667,0 nm, Aisyah, dkk (2017) melakukan pengamatan pengaruh senyawa pada ekstrak daun Ketapang menggunakan UV-Vis memberikan serapan 667,0 nm yang merupakan senyawa golongan alkaloid yaitu klorofil. Serapan pada panjang gelombang 233,0 nm, Zahrina (2015) melakukan identifikasi pada ekstrak etanol daun Sambiloto dengan UV-Vis menunjukkan serapan panjang gelombang maksimum pada 233,0 nm milik senyawa androgragolin yang merupakan golongan diterpenoid. Hasil identifikasi dengan UV-Vis menunjukkan banyaknya serapan panjang gelombang maksimum milik beberapa golongan senyawa, sehingga dapat diketahui bahwa hasil dari proses partisi dengan pelarut n-heksana masih dalam bentuk campuran.

Gambar 4.3 dan 4.4 menampilkan adanya serapan pada panjang gelombang 274,9 nm dan 276,0 nm terjadi transisi elektronik $n-\pi^*$ yang mengindikasikan ikatan C=C terkonjugasi. Serapan tersebut mendekati hasil penelitian yang dilakukan oleh Susilawati, dkk (2010) yang mengidentifikasi steroid hasil isolasi dari daun rimbang memberikan serapan UV-Vis di panjang gelombang 271 nm. Serapan pada panjang gelombang 201,0 dan 203,0 nm terjadi karena transisi elektronik $\pi-\pi^*$ yang menunjukkan ikatan C=C tidak terkonjugasi. Penelitian yang dilakukan oleh Aprelia dan Suyatno (2013) memberikan spektra pada panjang gelombang 203 nm yang menunjukkan adanya senyawa steroid kampesterol dan β -sitosterol dengan pengujian GC-MS.

4.11 Identifikasi Steroid dengan FTIR

Proses identifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR berdasarkan vibrasi oleh setiap gugus fungsi yang dapat memberikan informasi mengenai dugaan senyawa steroid yang akan diidentifikasi. Fraksi *Eucheuma cottonii* hasil partisi pelarut n-heksana dan isolat steroid A2 dihaluskan dengan mortar agate bersama garam KBr sebagai *background*. Selanjutnya dilakukan pengepresan pada tekanan 80 torr selama 10 menit, sehingga terbentuk pelet tipis untuk dilakukan proses penganalisa dengan spektrofotometer FTIR. Hasil spektra FTIR disajikan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Spektra FTIR fraksi n-heksana dan isolat steroid A2

Interpretasi bilangan gelombang fraksi n-heksana dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Interpretasi spektra FTIR fraksi n-heksana

Bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Referensi (Socrates, 1994)	Jenis Vibrasi	Intensitas
3639,639	3550 – 3250	OH (stretch)	M-S
2923,778	2870 – 2840	-CH ₂ - (stretch) sym	M
1650,914	1680 – 1620	C=C non konjugasi	M
1541,096	1600 – 1450	C=C (stretch)	W
1384,310	1385 – 1365	-C(CH ₃) ₂	S
1071,963	1085 – 1030	C-O (stretch) pimary alcohol	S
668,875	690 – 580	C=C-H (bend)	W

Keterangan : S = strong, M = medium, W = weak

Hasil identifikasi steroid pada fraksi *Eucheuma cottonii* hasil partisi pelarut n-heksana memberi serapan pada bilangan gelombang 3639,639 cm^{-1} milik gugus O-H, 2923,778 cm^{-1} adanya gugus $\text{C}_{\text{sp}^3} - \text{H}$ simetri. Adanya serapan pada 1650,914 cm^{-1} milik gugus $\text{C}=\text{C}$ non konjugasi, 1541,096 cm^{-1} adanya gugus $\text{C}=\text{C}$, 1384,310 cm^{-1} serapan gugus $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$, 1071,963 cm^{-1} milik gugus $\text{C}-\text{O}$ alkohol dan 668,875 cm^{-1} adanya gugus $\text{C}=\text{C}-\text{H}$.

Serapan dari fraksi n-heksana ke isolat steroid A2 menunjukkan adanya penajaman intensitas. Dalam keadaan isolat terlihat serapan yang lebih banyak karena senyawa steroid lebih murni jika dibandingkan dalam keadaan fraksi yang masih berupa campuran senyawa yang sebelumnya telah teridentifikasi dengan UV-Vis pada Gambar 4.3. Interpretasi bilangan gelombang isolat steroid A2 dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Interpretasi spektra FTIR isolat steroid A2

Bilangan gelombang (cm^{-1})	Referensi (Socrates, 1994)	Jenis Vibrasi	Intensitas
3463,638	3550 – 3250	OH (stretch)	M-S
2958,857	3000 – 2800	$\text{C}_{\text{sp}^3} - \text{H}$ (stretch) asym	M-S
2929,127	2870 – 2840	$-\text{CH}_2-$ (stretch) sym	M
1730,624	1745 – 1715	$\text{C}=\text{O}$ keton	M
1651,965	1680 – 1620	$\text{C}=\text{C}$ (stretch)	M
1462,615	1480 – 1440	$-\text{CH}_2$ (bend)	W
1382,719	1385 – 1365	$-\text{C}(\text{CH}_3)_2$	M-S
1283,927	1335 – 1115	$\text{C}-\text{C}$ (stretch) alifatik keton	W
1125,911	1125 – 1085	$\text{C}-\text{O}$ (stretch) secondary alcohol	S
1073,837	1085 – 1030	$\text{C}-\text{O}$ (stretch) primary alcohol	S
743,098	995 – 650	$\text{C}=\text{C}-\text{H}$ siklik	W
668,875	690 – 580	$\text{C}=\text{C}-\text{H}$ (bend)	W

Keterangan : *S* = strong, *M* = medium, *W* = weak

Hasil spektra FTIR isolat steroid A2 menunjukkan serapan pada bilangan gelombang 3459,782 cm^{-1} milik gugus O-H, serapan 2958,857 cm^{-1} adanya gugus $\text{C}_{\text{sp}^3} - \text{H}$ asimetri dan 2929,127 cm^{-1} adanya gugus $\text{C}_{\text{sp}^3} - \text{H}$ simetri. Pada

serapan $1730,624\text{ cm}^{-1}$ oleh gugus $\text{C}=\text{O}$, serapan $1651,965\text{ cm}^{-1}$ milik gugus $\text{C}=\text{C}$, serapan $1462,615\text{ cm}^{-1}$ milik gugus $-\text{CH}_2$, serapan $1382,719\text{ cm}^{-1}$ adanya gugus $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$, serta serapan $1283,927\text{ cm}^{-1}$ milik gugus $\text{C}-\text{C}$ keton. Serapan $1125,911\text{ cm}^{-1}$ adanya gugus $\text{C}-\text{O}$ alkohol sekunder dan $1073,837\text{ cm}^{-1}$ milik gugus $\text{C}-\text{O}$ alkohol primer (Anggraini, 2019). Serapan $743,098\text{ cm}^{-1}$ oleh gugus $\text{C}=\text{C}-\text{H}$ siklik dan $668,875\text{ cm}^{-1}$ milik gugus $\text{C}=\text{C}-\text{H}$. Adanya serapan gugus $\text{O}-\text{H}$ dan $\text{C}-\text{O}$ pada spektra hasil FTIR isolat steroid A2 menunjukkan dugaan senyawa steroid dengan jenis sterol (Aprelia dan Suyatno, 2013).

4.12 Identifikasi Steroid menggunakan LCMS/MS

LCMS/MS merupakan salah satu jenis teknik pemisahan senyawa dengan pemakaian kolom sebagai media pemisahan yang kemudian diionisasi berdasarkan massa sehingga dapat diketahui struktur dari senyawa yang dipisahkan. Spesifikasi LCMS/MS yang digunakan yaitu UHPLC dengan tenaga ultra. Hasil pengidentifikasi ini memiliki hasil yang lebih valid karena adanya sistem penganalisa massa ganda. Metode penganalisa massa ganda yang dipilih lebih menguntungkan jika dibandingkan metode penganalisa massa penyaringan. Pada metode penganalisa massa penyaringan hanya didapat intensitas sinyal ion utama dengan isomer serta berat molekul yang sama sehingga memungkinkan bukan milik senyawa hendak diidentifikasi, sedangkan pada metode penganalisa massa ganda tertuju pada senyawa target tanpa adanya gangguan senyawa lain (Khalaf, dkk., 2011). *Selective reaction monitoring* atau SRM digunakan karena memiliki sensitivitas dan selektivitas yang optimal untuk analisis kuantitatif berupa kelimpahan senyawa (Mo, dkk., 2013).

Pemilihan metode APCI dengan mode positif dalam sistem penganalisa massa menghasilkan kelimpahan sinyal yang baik untuk proses identifikasi sterol jika dibandingkan dengan metode ESI . Mode positif yang digunakan mengubah tegangan kerucut antara 20 dan 60 V, dalam kisaran m/z antara 70 sampai 1000 memiliki efektifitas yang lebih baik dari mode negative (Diaz, dkk., 2007). Mode positif APCI memberikan sensitivitas yang lebih tinggi (Mo, dkk., 2013). Pengidentifikasi pada metode APCI berdasarkan ion fragmen terprotonasi $[M+H-H_2O]^+$ (Diaz, dkk., 2007). Proses identifikasi senyawa steroid didasarkan pada massa induk (*Parent mass*) dan massa anakan (*daughter mass*) (Mardaneni, 2017). Hasil identifikasi isolat steroid A2 di tampilkan pada gambar 4.7 dan tabel 4.8 berdasarkan literatur pada tabel 4.9.

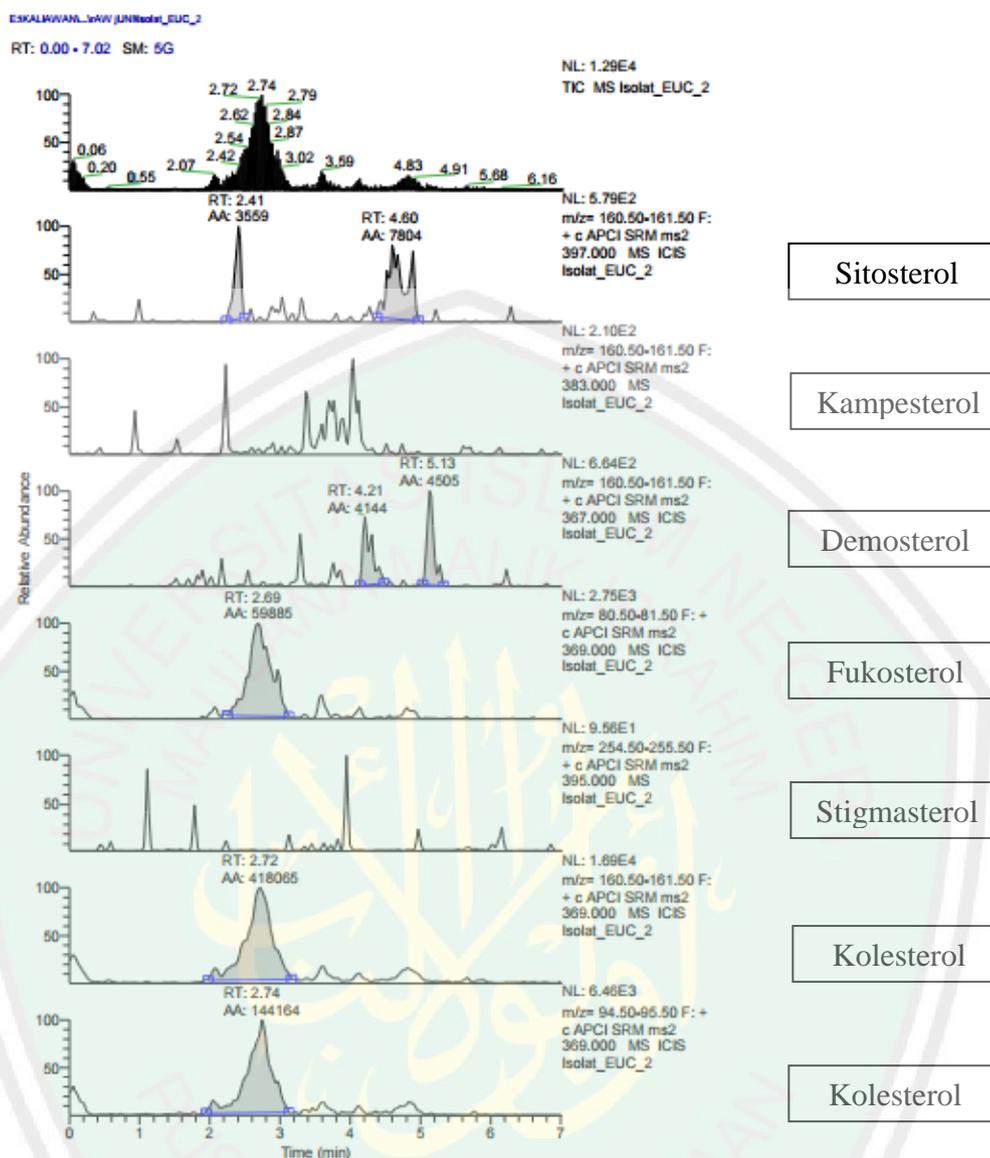
Tabel 4.8 Interpretasi Kromatogram LCMS/MS Isolat Steroid A2

Jenis Steroid	Massa Molekul (g/mol)	Parent Mass (m/z)	Daughter Mass (m/z)	Waktu Retensi (menit)	Luas Area
Sitosterol	414	397	160,50-161,50	4,60	7804
Fukosterol	386	369	80,50-81,50	2,69	59885
Kolesterol	386	369	160,50-161,50	2,72	418065
			94,50-95,50	2,74	144164
Demosterol	384	367	160,50-161,50	4,21	4144

Tabel 4.9 Hasil Identifikasi LCMS/MS referensi

Jenis Steroid	Parent Mass (m/z)	Daughter Mass (m/z)
*Sitosterol	397,4	161 135,2
**Fukosterol	369	80,50-81,50
*Kolesterol	369,4	161,2 95,2
*Demosterol	367	161,1 95

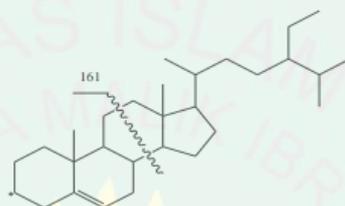
Sumber: *Fu dan Joseph (2012)
** Mardaneni (2017)



Gambar 4.6 Kromatogram isolat steroid A2

Bedasarkan hasil identifikasi menggunakan LCMS/MS dengan 6 target senyawa steroid yaitu sitosterol, stigmasterol, kampesterol, fukosterol, kolesterol, dan demosterol dapat diketahui bahwa didalam isolat steroid A2 hanya terkandung 4 jenis steroid diantaranya sitosterol, fukosterol, kolesterol dan demosterol. Pola fragmentasi yang didapat berbentuk melebar yang mengindikasikan bahwa pemisahan tidak berlangsung secara baik, karena indikasi

pemisahan yang baik akan menghasilkan puncak fragmentasi yang tinggi dan lurus (Mardaneni, 2017). Mo, dkk., (2013) yang telah mengidentifikasi pola fragmentasi β -sitosterol pada minyak nabati menyebutkan bahwa terjadi pemutusan pada cincin C karena adanya ikatan C=C pada cincin B, namun pemutusan akan terjadi pada cincin B apabila ikatan C=C berada pada cincin A. pola fragmentasi β -sitosterol diperlihatkan pada gambar 4.8.



Gambar 4.7 Fragmetasi β -sitosterol (Mo, dkk., 2013)

Urutan kepolaran steroid pada isolat steroid A2 dapat diketahui dari waktu retensi yang dihasilkan. Waktu retensi yang semakin kecil menunjukkan bahwa senyawa tersebut bersifat lebih polar. Kolom yang digunakan bersifat non polar maka steroid yang memiliki sifat lebih non polar akan tertahan di fase diam, sedangkan steroid yang bersifat lebih polar akan ikut terelusi oleh fase gerak yang bersifat polar. Akibatnya, senyawa steroid yang lebih polar memiliki waktu retensi yang kecil jika dibandingkan dengan yang bersifat lebih non polar. Urutan kepolaran steroid yang terkandung dari yang lebih polar yaitu fukosterol, kolesterol, demosterol dan sitosterol. Tingkatan kepolaran berhubungan dengan berat molekul, semakin besar nilai berat molekul maka semakin rendah kepolarannya. Hal ini terjadi pada sitosterol yang memiliki berat molekul 414 g/mol bersifat lebih non polar dari fukosterol dan kolesterol yang memiliki berat 386 g/mol, sehingga waktu retensi sesuai dengan kepolaran dan berat molekulnya.

Fukosterol dan kolesterol yang memiliki berat yang sama yaitu 386 g/mol, namun fukosterol bersifat lebih polar dari kolesterol, hal ini sesuai dengan waktu retensi fukosterol yang lebih kecil dari kolesterol. Penyebab fukosterol bersifat lebih polar karena fukosterol memiliki ikatan rangkap atau ikatan π yang menyebabkan fukosterol lebih bersifat polar dari pada kolesterol.

Kelimpahan ditunjukkan dari nilai luas area yang diperoleh masing-masing senyawa steroid pada hasil kromatogram. Alga merah *Eucheuma cottonii* mengandung senyawa steroid dengan urutan kelimpahan tertinggi dimulai dari kolesterol, fukosterol, sitosterol dan demosterol. Narwal, dkk (2019) menyebutkan bahwa kolesterol di dalam tubuh merupakan prekursor penting dalam mensintesis hormon steroid, vitamin D, dan asam empedu. Rensburg, dkk (2000) menyebutkan bahwa β -sitosterol dan kolesterol akan dikompare oleh melatonin sebagai antioksidan yang baik untuk menurunkan peroksida lemak.

4.13 Pemanfaatan rumput laut *Eucheuma cottonii* dalam Prespektif Islam

Firman Allah SWT dalam surat an Nahl ayat 14 menyebutkan :

وَهُوَ الَّذِي سَخَّرَ الْبَحْرَ لِتَأْكُلُوا مِنْهُ لَحْمًا طَرِيًّا وَتَسْتَخْرِجُوا مِنْهُ حَبْلًا مَلْبُورًا وَنَارًا كَرِيمًا
وَمَوَاجِرَ فِيهِ وَلِيَلْتَبْتَعُوا مِنْ فَضْلِهِ وَاللَّكُمْ تَشْكُرُونَ

Artinya : “Dan Dialah, Allah yang menundukkan lautan (untukmu), agar kamu dapat memakan daripadanya daging yang segar (ikan), dan kamu mengeluarkan dari lautan itu perhiasan yang kamu pakai; dan kamu melihat bahtera berlayar padanya, dan supaya kamu mencari (keuntungan) dari karunia-Nya, dan supaya kamu bersyukur”

Lafal “*Taskhir*” pada surat Nahl ayat 14 tersebut terdapat banyak penafsiran oleh para ulama mengenai maksud ayat tersebut. Menurut Ar-razi (2000) *taskhir* adalah menjadikan laut sebagai tempat yang dapat diambil

manfaatnya oleh manusia, baik dengan mencari ikan atau mengambil mutiara dan yang lainnya. Menurut Thahir bin Asyur (1988) *Taskhir* adalah membuat laut menjadi lentur mudah untuk diarungi dan dapat dieksploitasi. Menurut Tantawi (1998) *taskhir* adalah Allah SWT mempersiapkan segala hal yang dapat dimanfaatkan di laut. Lafadz وَلْيَتَنَّقُوا مِنْ فَضْلِهِ dalam tafsir al-Maraghi (1992), Allah SWT memerintahkan kepada manusia untuk memanfaatkan sumber daya hayati laut yang mana telah Allah SWT limpahkan untuk kepentingan manusia. Menilik pendapat para ulama, maka dapat diartikan bahwa laut dan segala isinya pada dasarnya adalah sesuatu yang telah Allah SWT ciptakan dan siapkan bagi umat manusia untuk dapat dimanfaatkan. Qurtubi (1996) menambahkan bahwa salah satu nikmat Allah SWT atas laut adalah segala sesuatu yang ada dilaut dihalalkan bagi manusia. Begitupula perhiasan laut seperti mutiara dapat dikenakan oleh siapa saja, baik laki-laki atau perempuan Hal ini menjadi bukti bahwa laut memiliki manfaat yang luas bagi kehidupan manusia. Berkaitan dengan manfaat laut yang luas, terdapat tanaman yang dapat tumbuh dengan subur didalam laut seperti alga merah yang tumbuh liar dan dibudidayakan dalam skala besar di laut.

Terdapat tiga contoh dalam al-Quran mengenai manfaat laut seperti dapat dikonsumsi ikannya, terdapat perhiasan didalamnya dan dapat dilalui oleh perahu. Ketiga manfaat ini pada dasarnya adalah manfaat umum yang memang dapat dilakukan oleh masyarakat pada waktu itu. Sehingga contoh demikian hanya bermaksud untuk memudahkan pemahaman orang-orang pada zaman tersebut tentang nikmat laut pada waktu itu. Namun yang perlu digaris bawahi adalah masih banyak terdapat manfaat lain yang tersimpan dan terkandung di dalam lautan yang banyak belum diketahui oleh orang-orang pada kurun masa

Rasululloh SAW (As-syinqiti, 1995). Penutup ayat mengenai laut diatas menggunakan lafal “*fadl*” yang memiliki arti Karunia Allah SWT. Hal ini mengisyaratkan bahwa Karunia Allah SWT dalam laut tidak terbatas hanya pada tiga contoh tersebut melainkan jauh lebih luas dan lebih besar sebagaimana firman Allah SWT:

وَعَلَّمَكَ مَا لَمْ تَكُنْ تَعْلَمُ وَكَانَ فَضْلُ اللَّهِ عَلَيْكَ عَظِيمًا

Artinya : “Dan Allah Swt mengajarkan kepadamu apa yang belum kamu ketahui, Dan karunia Allah yang dilimpahkan kepadamu sangatlah besar (QS. An-Nisa’:113)”

Salah satu sumber daya hayati laut yang berpotensi untuk dimanfaatkan adalah makroalga dengan jenis alga merah. Masyarakat pada umumnya hanya mengkonsumsi rumput laut tanpa pengetahuan bahwa didalam rumput laut terkandung berbagai macam zat yang bermanfaat bagi pengonsumsinya. Maka perlu kita untuk berfikir tentang manfaat yang bisa kita gunakan dengan baik atas kelimpahan karunia Allah SWT. Atas kekuasaan dan kemurahan-Nya, Allah SWT menciptakan dan menumbuhkan berbagai tumbuhan yang sangat berguna untuk setiap makhluknya. Alga merah merupakan salah satu tumbuhan baik golongan makroalga yang mengandung metabolit sekunder. *Eucheuma cottonii* termasuk ke dalam jenis rumput laut merah yang memiliki banyak manfaat. Tidak hanya sebagai sumber makanan dalam memenuhi kehidupan sehari-hari, namun juga dapat digunakan sebagai obat dalam beberapa jenis penyakit. Sesuai dengan firman Allah SWT :

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا لَاعِبِينَ

Artinya: “Dan tidaklah kami ciptakan langit dan bumi dan segala yang ada di antara keduanya dengan bermain-main” (QS. Al-Anbiya’:16)

Alusi menafsiri ayat tersebut bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu di langit dan di bumi dan seisinya bukan tanpa faidah. Melainkan banyak sekali terdapat manfaat dan potensi yang dapat diserap dan dioptimalkan oleh manusia. Ciptaan Allah Swt sejatinya memiliki nilai manfaat yang dapat dioptimalkan dan difungsikan dengan baik guna meningkatkan kualitas kehidupan manusia. Ayat di atas memberi gambaran yang jelas bahwa ciptaan Allah SWT bukan sembarang ciptaan yang tidak memiliki nilai faidah. Manusia dituntut untuk mengenal lebih jauh potensi-potensi dari segala ciptaan Allah SWT agar dapat bermanfaat bagi kehidupannya. Sebab segala hal yang Allah ciptakan di muka bumi pada dasarnya adalah untuk manusia itu sendiri (Al-Alusi, 2000).

Alga merah jenis *Eucheuma cottonii* memiliki kandungan metabolit sekunder salah satunya adalah senyawa steroid. Senyawa steroid terbukti dapat digunakan sebagai obat karena memiliki tingkat toksisitas yang tinggi (Azizah, 2016). Semua penyakit yang diturunkan oleh Allah SWT pasti memiliki obat. Berikut ini disebutkan dalam hadist yang menyebutkan (Al-albani, 2008):

إِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ، فَإِذَا أَصَابَ الدَّوَاءُ الدَّاءَ، بَرَأَ ب

Artinya : “Setiap penyakit pasti memiliki obat. Bila sebuah obat sesuai dengan penyakitnya maka dia akan sembuh dengan seizin Allah Subhanahu wa Ta’ala.” (HR. Muslim).

Diriwayatkan pula dari musnad Imam Ahmad dari shahabat Usamah bin Suraik, bahwasanya Nabi SAW bersabda :

كُنْتُ عِنْدَ النَّبِيِّ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ، وَجَاءَتِ الْأَعْرَابُ، فَقَالَ: يَا رَسُولَ اللَّهِ، أَنْتَدَاوِي؟ فَقَالَ:

نَعَمْ يَا عِبَادَ اللَّهِ، تَدَاوُوا، فَإِنَّ اللَّهَ عَزَّ وَجَلَّ لَمْ يَضَعْ دَاءً إِلَّا وَضَعَ لَهُ شِفَاءً غَيْرَ دَاءٍ وَاحِدٍ.

قَالُوا: مَا هُوَ؟ قَالَ: الْهَرَمُ

Artinya : *“Aku pernah berada di samping Rasulullah. Lalu datanglah serombongan Arab dusun. Mereka bertanya, “Wahai Rasulullah, bolehkah kami berobat?” Beliau menjawab: “Iya, wahai para hamba Allah, berobatlah. Sebab Allah tidaklah meletakkan sebuah penyakit melainkan meletakkan pula obatnya, kecuali satu penyakit.” Mereka bertanya: “Penyakit apa itu?” Beliau menjawab: “Penyakit tua.”* (HR. Ahmad, Al-Bukhari dalam Al-Adabul Mufrad, Abu Dawud, Ibnu Majah, dan At-Tirmidzi, beliau berkata bahwa hadits ini hasan shahih. Syaikhuna Muqbil bin Hadi Al-Wadi’i menshahihkan hadits ini dalam kitabnya Al-Jami’ Ash-Shahih mimma Laisa fish Shahihain, 4/486).

Meskipun telah ada obat yang dapat menyembuhkan suatu penyakit, tetapi pemberi kesembuhan hanyalah Allah SWT. Tidak seharusnya manusia untuk menggantungkan rasa percaya kepada selain Allah SWT, obat dan tabib atau dokter hanyalah perantara Allah SWT dalam menyembuhkan suatu penyakit. Hendaknya manusia hanya perlu bertawakal kepada Allah SWT (Mahmud, 2007).

Sejak jaman dahulu telah dilakukan pengobatan dari jenis tumbuh-tumbuhan yang alami. Abu Qurath menyebutkan bahwa *“Jadikanlah makananmu sebagai obat mu, dan obatilah setiap penderita dengan nabati yang tumbuh di bumi, karena nabati itulah yang pantas untuk penyembuhnya”* (Mahmud, 2007). Hal ini menunjukkan bahwa bahan yang berasal dari alam memiliki kegunaan tidak hanya sebagai makanan tetapi juga sebagai obat suatu penyakit. Pada penelitian ini dilakukan tahapan isolasi senyawa steroid dengan metode pemisahan kromatografi kolom. Isolat steroid yang didapat dari hasil pemisahan dilakukan pengujian tingkat toksisitasnya pada larva udang. Tingkat toksisitas dapat diketahui dari banyaknya angka kematian pada larva udang. Perolehan angka LC₅₀ pada isolat steroid yaitu 11, 0746 ppm yang masuk ke dalam kategori sangat toksik. Proses identifikasi senyawa steroid dengan LSMS/MS menunjukkan bahwa steroid yang terkandung dalam isolat steroid A2 yaitu kolesterol, fukosterol, sitosterol dan demosterol. Becerra, dkk. (2015) fukosterol

dapat digunakan untuk perlindungan dari sinar UV dan pertahanan terhadap penyakit metabolik sindrom seperti tekanan darah tinggi, kadar gula tinggi, kolesterol tinggi serta permasalahan obesitas. Rensburg, dkk (2000) menyebutkan bahwa β -sitosterol dan kolesterol akan dikomper oleh melatonin sebagai antioksidan yang baik untuk menurunkan peroksida lemak.

Pemanfaatan Alga Merah sebagai obat-obatan adalah salah satu bentuk pemanfaatan ciptaan Allah SWT yang memang dianjurkan. Sudah semestinya manusia berusaha mengungkap kegunaan dibalik segala ciptaan Allah SWT, karena apa yang diciptakan Allah SWT di bumi hakikatnya adalah untuk manusia itu sendiri. Alga merah adalah salah satu bukti dari kebesaran Allah SWT atas makhluknya, dimana Allah SWT menitipkan manfaat yang besar di dalamnya untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit. Hal ini sesuai dengan firman Allah SWT:

هُوَ الَّذِي خَلَقَ لَكُمْ مَا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا

Artinya : *Dialah Allah Swt yang menciptakan segala yang ada di bumi untuk kamu (manusia). (QS. Al-Baqarah: 29)*

Ayat diatas mengemukakan bahwa segala hal yang terdapat dibumi baik dari tumbuhan, binatang, pertambangan, gunung, laut dan lain sebagainya adalah disiapkan dan diperuntukkan untuk umat manusia. Allah SWT menciptakan itu semua agar manusia dapat memanfaatkannya dengan baik dan semaksimal mungkin baik untuk agama dan dunianya. Pemanfaat untuk maksud agama adalah dengan mengambil teladan akan keangungan dan keesaan Allah SWT. Adapun pemanfaatan dunia adalah dengan mengambil segala potensi dari segala hal yang diciptakan Allah SWT di muka bumi (Al-Khozin, 2001).

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah :

1. Isolat steroid A2 dari *Eucheuma cottonii* hasil pemisahan dengan kromatografi kolom memberikan nilai LC_{50} yang tinggi yaitu 11,0746 ppm, sedangkan hasil fraksi n-heksana memberikan nilai LC_{50} 25,7238 ppm. Nilai LC_{50} tersebut termasuk dalam golongan sangat toksik.
2. Hasil identifikasi isolat steroid A2 dari *Eucheuma cottonii* hasil pemisahan dengan kromatografi kolom dengan spektroskopi UV-Vis, FTIR dan LCMS/MS menunjukkan adanya steroid berjenis sterol yaitu kolesterol, fukosterol, demosterol, dan sitosterol.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian yang mendatang yaitu:

1. Proses isolasi pada penelitian ini memberikan hasil isolat steroid yang masih terkandung beberapa jenis steroid. Penggunaan metode pemisahan lain seperti kromatografi vakum cair atau pun kromatografi kolom tekanan akan menghasilkan yang lebih murni dengan nilai rendemen yang banyak.
2. Kelimpahan senyawa triterpenoid yang banyak dalam *Eucheuma cottonii* dapat dikaji lebih mendalam sehingga dapat diperoleh proses pemisahan yang baik dan dapat diketahui kegunaannya dari hasil pengujian aktivitas.
3. Nilai LC_{50} yang tinggi pada penelitian ini dapat digunakan sebagai antikanker dalam penelitian selanjutnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Afif, S., Fasya, A.G., dan Ningsih, R. 2015. Extraction Toxicity Assay and Identification of Active Compounds of Red Algae (*Euचेuma cottonii*) from Sumenep Madura. *Alchemy*, 4(2): 101-106.
- Aisyah., Putri, K.A., Suriani., Iswadi., dan Ilyas, A. 2017. Pengaruh Kandungan Senyawa pada EKstrak Daun Ketapang n-Heksan, Etil Asetat, Metanol, dan Campuran Terhadap Nilai Efisiensi Dye Sensitized Solar Cell (DSSC). *Al-kimia*, 5(2): 170.
- Al-Alusi, S. 2000. *Rauhil Bayan Juz 3*. Beirut: Darul Kutub Ilmiah.
- Al-Albani, M.N. 2008. *Mukhtashar Shahih Muslim*. Jakarta : Gema Insani.
- Al-Khozin, A. 2001. *Tafsir al-Khazin Juz 1*. Beirut: Darul Kutub Ilmiah.
- Al-Maraghi, A.M. 1992. *Tafsir Al Maraghi 14 Juz 14*. Semarang: CV. Toha Putra Semarang.
- Amora, S.D., dan Sukezi. 2013. Ekstraksi Senyawa Antioksidan pada Nugget Rumput Laut Merah, *Euचेuma cottonii*. *Jurnal Sainst dan Seni Pomits*, 2(2): C23-C25.
- Anam, K. 2015. Isolasi Senyawa Triterpenoid dari Alga Merah (*Euचेuma cottonii*) Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Analisisnya Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Andriani, Z., Fasya, A.G., dan Hanapi, A. 2015. Antibacterial Activity of the Red Algae (*Euचेuma cottonii*) Extract from Tanjung Coast Sumenep Madura. *Alchemy*, 4(2): 93-100.
- Anggraini, V. 2019. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom dengan Variasi Gradien Eluen Fraksi Etil Asetat Makroalga *Euचेuma Cottonii*. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. Inc.* Washington DC, 185-189.
- Ar-razi, F. 2000. *Mafatihul Ghaib Juz 20* . Beirut: Dar Ihya' Turats Al-Arabi.
- As-Syinqiti, M.A. 1995. *Adlwa 'ul Bayan Juz 2*. Beirut: Darul Fikr, Beirut.
- Atun, S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Konservasi Cagar Budaya Borobudur*, 8(2): 53 – 61.

- Azah, S.N. 2019. Uji Toksisitas dan Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLTP Ekstrak n-Heksana dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata* Menggunakan UV-Vis dan LC-MS/MS. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Azizah, L.N. 2016. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*). *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Baderos, A. 2017. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan Identifikasi Menggunakan LC-MS. *Skripsi*. Malang : UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Becerra, M., dkk. 2015. Antileishmanial activity of fucosterol recovered from *Lessonia vadosa* 4 Searles (*Lessoniaceae*) by SFE, PSE and CPC. *Journal of Phytochemistry Letters*, 11: 418-423.
- Behmer, S.T., Olszewski, N., Sebastiani, J., Palka, S., Sparacino, G., Sciarnno, E., and Grebenok, R.J. 2013. Plant Phloem Sterol Content: forms, Putative Functions, and Implications for Phloem-Feeding Insects. *Original Research Article*, 4(370): 1-8.
- Budaraga, I.K., Arnim, M.Y., dan Bulanin, U. 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.
- Diaz, B.C., Carretero, A.S., Gutierrez, A.F., Vega, B.A., Frenich, A.G., Vidal, J. L.M., & Martos, J.D. (2007). Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Journal Food Chemistry*. 102 (2007): 593–598
- Diharmi, A., Dedi, F., Nuri, A., dan Endang, S.H.. 2011. Karakteristik Komposisi Kimia Rumput Laut Merah *Eucheuma spinosum* yang Di Budidayakan dari Perairan Nusa Penida, Takalar, dan Sumenep. *Jurnal Berkala Perikanan Terburuk*, 39(2): 61-66.
- Dinarto, W. 2010. Pengaruh Kadar Air dan Wadah Simpan terhadap Viabilitas Benih Kacang Hijau dan Populasi Hama Kumbang Bubuk Kacang Hijau *Callosobruchus Chinensis* L. *Jurnal AgriSains*, 1(1): 68-78
- Dumitrascu, M. 2011. *Artemia salina*. *Balneo-Research Journal*, 2(4): 119-121.
- Fernandez, V.P., Rocca, L.M., Tomai, P., Fanali, S., dan Gentili, A. Recent advancements and future trends in environmental analysis: Sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 983: 9-41.

- Fessenden dan Fessenden. 1986. Kimia Organik. Jakarta: Erlangga
- Fitri, K.N. 2017. Variasi Laju Alir pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma Cottonii* Metode Kromatografi Kolom. *Skripsi*. Malang : UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Fu, R., & Joseph, M. (2012). LC/ELSD and LC/MS/MS of Cholesterol and Related Sterol on a Poroshell 120 Column. *Journal BioPharma*. (24): 1-6
- Handoko, S. 2016. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter (PE) Mikroalga *Chlorella Sp.* Dengan Metode Kromatografi Kolom Pembuatan Fasa Diam Cara Basah Dan Kering. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Hendayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elktroforesis Modern*. Bandung : PT Remaja Rosdakarya.
- 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 Nature Acta*, 3(3): 119-123.
- Izzati, M. 2007. Skreening Potensi Antibakteri pada Beberapa Spesies Rumput Laut terhadap Bakteri Patogen pada Udang Windu. *Jurnal BIOMA*. Semarang: Universitas. *Bioma*, 9(2): 62 – 67.
- Khalaf, I., Corciova, A., Vlaseb, L., Ivanescuc, B., dan Lazar, D. 2011. LC/MS Analysis of Sterolic Compounds from Glycyrrhiza Glabra. *Journal Studia Ubb Chemia*, 3(1): 97-102.
- Khazanda, K.A., Wazir, S.T.G., Samina, K., dan Shahzadi, S. 2007. Antifungal Activity, Elemental Analysis And Determination Of Total Protein Of Seaweed, Solieria Robusta (*Greville*) Kylin From The Coast Of Karachi. *National Center of Excellence for Aanalytical Chemistry*, 39(3): 931-937.
- Khoiriyah, S., Hanapi, A., dan Fasya, A.G. 2014. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat, Kloroform dan Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga Coklat *Sargassum Vulgare* dari Pantai Kapong Pamekasan Madura. *Alchemy*, 3(2): 133-144
- Kristanti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M., dan Kurniadi, B. 2008 *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: UNAIR Press.
- Kusmiyati., Aznam, N., dan Handayani, S. 2011. Isolasi dan Identifikasi Zat Aktif Ekstrak Metanol Rimpang Kunyit Putih (*Curcuma mangga Val*) Fraksi Etil Asetat. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 1(2): 1-10.

- Lawoko, M., Deshpande, S., dan Heiningen, A.R.P.V 2009. Pre-Hydrolysis Of The Phenyl Glycosidic Bond In A Model Compound. *Lenzinger Berichte* 87: 77-87.
- Lestario, N.L., Sugiarto, S., dan Timotius, K. H. 2008. Aktivitas antioksidan dan Kadar Fenolik Total dari Ganggang Merah (*Gracilaria verucosa*). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, XIX (2).
- Lopez, G., Sousa, C., Bernardo, J., Andrade, P.B., dan Valentao, P. 2011. Sterol Profiles in 18 Macroalgae of the Portuguese Coast. *Journal Phycol*, 5(47): 1210-1218.
- Luki, C.E. 2018. Pemisahan Steroid Fraksi Etil Asetat Makroalga *Euचेuma cottonii* Menggunakan Kromatografi Kolom Gradien Eluen secara Eksperimen dan Studi *In Silico* serta Uji Antioksidannya. *Skripsi*, Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Luthfiyah, E.N. 2017. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Euचेuma cottonii*) Perairan Wongsorejo Banyuwangi Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dan LC-MS. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Mahmud, M.H. 2007. *Mukjizat Kedokteran Nabi*. Jakarta: Kesehatan Alami Qultum Medika.
- Manilal. A., Sujith, S., Selvin, J., Kiran, G.S., dan Shakir, C. 2009. In vivo Antiviral Activity of Polysaccharide from the Indian Green Alga, *Acrosiphonia orientalis* (J. Agardh): Potential Implication in Shrimp Disease Management, *Journal of Fish and Marine Sciences*, 1 (4): 278-282.
- Mardaneni, I. 2017. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid Alga Merah (*Euचेuma cottonii*) Fraksi Etil Asetat Perairan Wongsorejo Banyuwangi dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis Dan LC-MS/MS. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Mardiyah, U. 2012. Ekstraksi, Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Euचेuma Spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Matanjon, P., Mohamed, S., Musthapa, N.M., dan Muhammad, K. 2009. Nutrient content of tropical edible seaweeds *Euचेuma cottonii*, *Caulerpa lentillifera* and *Sargassum polycystum*. *Journal Appl Phycol*, 21: 75-80.
- Mo, S., Dong, L., Hurst, W.J., & Breemen, R.B. Van. (2013). Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. 949–956

- Mubarokah, F.A. 2017. Variasi Diameter Kolom pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* Metode Kromatografi Kolom. Skripsi tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Muhimmah, A.A. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Dan n-Heksana Rumpun Laut Merah (*Eucheuma cottonii*) Pesisir pantai Lobuk Madura Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Skripsi. Malang : UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Muliawana, N.R.E., Sampurnoa, J., dan Jumaranga, M. I. 2016. Identifikasi Nilai Salinitas Pada Lahan Pertanian di Daerah Jungkat Berdasarkan Metode Daya Hantar Listrik (DHL). *Jurnal Prisma Fisika*, 4(2): 69-72.
- Narwal, V., dkk. 2019. Cholesterol Biosensors. *Journal Steroid*, 143: 6-17.
- Ningdiyah, A.W., Alimuddin, A.H., Jayasuka, A. 2015. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) terhadap Hasil Fraksinasi Ekstrak Kulit Buah Tampoi (*baccaurea macrocarpa*). *Jurnal UKK*, 4(1): 75-83.
- Noviyanti, L. 2010. Modifikasi Teknik Kromatografi Kolom untuk Pemisahan Trigliserida dari Ekstrak Buah Merah (*Pandanus conoideus Lamk*). Skripsi. Surakarta : Universitas Sebelas Maret.
- Nurhayati, A.P.D., Abdulgani, N., dan Febrianto, R. 2006. Uji Toksisitas Ekstrak *Eucheuma Alvarezii* terhadap *Artemia salina* sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker. *Akta Kimindo*, 2(1): 41– 46.
- Panggabean, M.G.L. 1984. Teknik Penetasan dan Pemanenan *Artemia salina*. *Jurnal Oseana*, 9(2): 57-65.
- Panji, T. 2012. *Teknik Spektroskopi untuk Elusidasi Struktur Molekul*. Yogyakarta: Graha Ilmu
- Parasetia, D.E., Ritaningsih., Purwanto. 2012. Pengambilan Zat Warna Alami dari Kayu Nangka. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*, 1(1): 502-507.
- Parenrengi, A., dan Sulaeman. 2007. Mengenal Rumpun Laut *Kappaphycus alvarezii*. *Media Akuakultur*, 2(1): 142-146.
- Pereira, C.M.P., dkk. 2016. Extraction of Sterols In Brown Macroalgae from Antarctica and Their Identification by Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. *J Appl Phycol*.
- Pramana, M.R.A., dan Saleh, C. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Steroid pada Fraksi N-Heksana dari Daun Kukang (*Lepisanthes amoena* (Hassk.) Leenh.). *Jurnal Kimia Mulawarman*, 10(2): 85-89.

- Qurtubi. 1996. *Tafsir Qurtubi Juz 6*. Kairo: Darul Kutub al-Misriyah.
- Rahmawati, D.A. 2017. Variasi Komposisi Eluen pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Makroalga (*Eucheuma cottonii*) dengan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Rensburg, V.S.J., Daniels, W.M., Zyl, V.J.M., dan Taljaard, J.J. 2000. A Comparative Study of The Effects of Cholesterol, Beta-Sitosterol, Beta-Sitosterol Glucoside, Dehydroepiandrosterone Sulphate and Melatonin on in Vitro Lipid Peroxidation. *Journal Issue Metab Brain Dis*. 15(4): 257-65.
- Robinson, T. 1995. Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi. Diterjemahkan Prof. Dr. Kosasih Padmawinata (2003). Bandung: ITB.
- Saifuddin, A., Suparti, F.A., dan Da'i, M. 2006. Biotransformation Kurkumin Melalui Kultur Suspensi Sel Daun *Catharanthus roseus* (L) G. dan Berbunga Merah. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*, 7(2): 92-102.
- Sapar, A., Kumanireng, A., Voogd, N.de., dan Noor, A.. 2004. Isolasi dan Penentuan Struktur Metabolit Sekunder Aktif dari Spons *Biemna triraphis* Asal Pulau Kapodasang (Kepulauan Spermonde). *Marina Chimica Acta*, 5(1): 2-5.
- Sari, A.A., Saleh, Chairul., dan Erwin. 2015. Uji Fitokimia, Toksisitas Dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Berbagai Fraksi Daun Mara (*Macaranga tanarius* (L.) M.A) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia Mulawarman*, 12(2): 53-58.
- Sari, I.P. (2017). Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid Fraksi Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Perairan Wongsorejo Banyuwangi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dan LC-MS/MS. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Sastrohamidjojo. 2007. *Kromatografi*. Yogyakarta : UGM Press
- Setiyawan, M.I., Ningsih, R., Syarifah, U., dan Adi, T.K. 2015. Isolasi Senyawa Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol dan Identifikasi Menggunakan FT-IR. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Sharo, N.M., Ningsih, R., Nasichuddin, A., dan Hanapi, A. (2013). Uji Toksisitas dan Identifikasi Senyawa Ekstrak Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Terhadap Larva Udang *Artemia Salina Leach*. *Alchemy*, 2(3): 170-177.

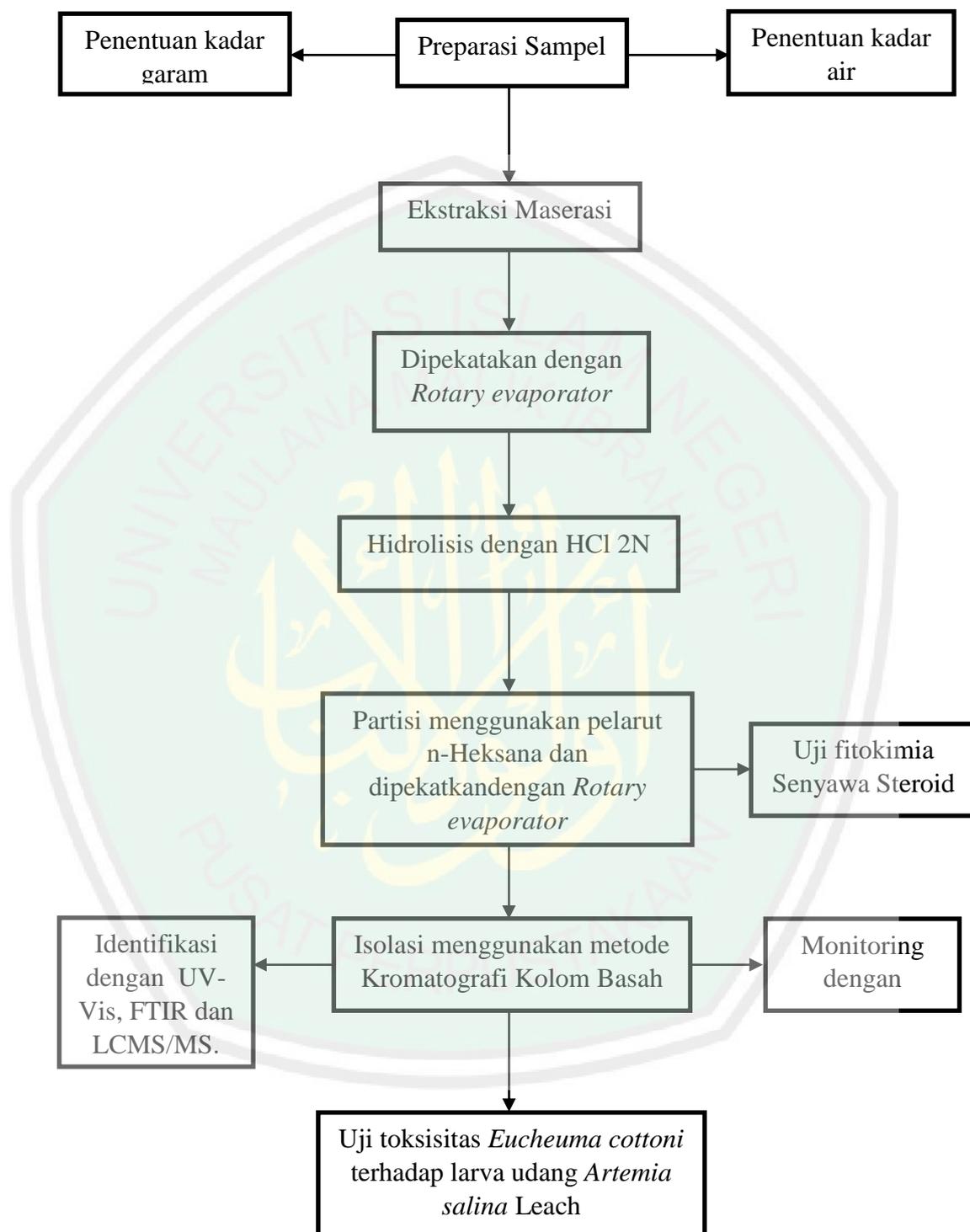
- Sholikah, A.N.L. 2016. Isolasi Senyawa Steroid dari Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) Menggunakan Metode Kromatografi Kolom. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Socrates, G. 1994. *Infrared Characteristic Group Frequencies Tables and Charts Second Edition*. UK: The University of West London.
- Sukadana, I.M., Santi, S.R., dan Monikayani, N.W. 2018. Aktivitas Antimakan Daun Tenggulum (*Protitium javanicum* Burm. F.) terhadap Ulat Kubis *Plutella xylostella*. *Journal Media Sains*, 2(2): 90-95.
- Susilawati. I.H., dan Limra, W. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid dari Daun Rimbang (*Solanum torvum*). Jurusan MIPA FKIP: Universitas Riau Pekanbaru.
- Thahir, B.A. 1988. *Tahrir Wa Tanwir juz 14*. Tunisia: Tanusi Linnasyr.
- Tambun, R., Limbong, H.P., Pinem, C., Manurung, E. 2016. Influence of Particle Size, Time and Temperature to Extract Phenol from Galangal. *Jurnal Teknik Kimia*, 5(4): 53-56.
- Tantawi, M.S. 1998. *Tafsir Wasith Juz 8*. Kairo : Dar Nahdloh Mesir.
- Tasic, B.M., Budimir, V.K., Miodrag, L.L., dan Vlada, B.V. 2009. The acid hydrolysis of potato tuber mash in bioethanol production. *Biochemical Engineering Journal* 43 (209): 208-211.
- Tyas, A.P. 2017. Variasi Rasio Sampel dan Silika Gel pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Makroalga *Eucheuma cottonii* dengan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Wahyudi, J., Wibowo, W.A., Rais, Y.A., Kusumawardani, Atika. 2011. Pengaruh Suhu Terhadap Kadar Glukosa Terbentuk dan Konstanta Kecepatan Reaksi pada Hidrolisa Kulit Pisang. Didalam : Seminar Nasional Teknik Kimia. Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan”; Yogyakarta, 22 Februari 2011. Yogyakarta : B09-1-B09-5.
- Williams, D.H., dan Fleming, I. 2008. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. UK: McGraw-Hill International.
- Wonorahardjo, S. 2013. *Metode-Metode Pemisahan Kimia*. Jakarta: Akademia Permata.
- Yunus. 2009. Daya Hambat Ekstrak Metanol Rumput Laut (*Eucheuma spinosum*) Terhadap Bakteri *Aeromonashydrophilia*. *Jurnal Kelautan*, 2(2): 99-105.

- Zahrina, A.D. 2015. Uji Aktivitas Antifertilitas Ekstrak Etanol 96 % Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) pada Tikus Jantan Galur *Sprague-dawley* secara in Vivo. *Skripsi*: UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Zandi, K., Saeed, T. Iraj, N., Zahra, R., Forough, Y., Samin, S., dan Kohzad, S. 2010. In Vitro Antitumor Activity of *Gracilaria corticata* (A Red Alga) Against Jurkat And Molt-4 Human Cancer Cell Lines. *Journal of Biotechnology*, 9(40): 6787-6790.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan penelitian



Lampiran 2. Diagram Alir

1. Preparasi Sampel

Alga merah *Eucheuma cottonii* kering

Dikeringanginkan lalu dioven pada suhu 38° C selama 24 jam

Dihaluskan dengan mesin berukuran 90 mesh

Hasil

2. Analisa Kadar Air

Cawan penguap

Dipanaskan pada oven dengan suhu 100 – 105 °C

Dimasukkan desikator sekitar 10 menit

Ditimbang

Diulangi langkah diatas sampai berat cawan konstan

Cawan penguap kering

Dimasukkan serbuk alga merah sebanyak 1 gram

Dikeringkan dalam oven pada suhu 100 – 150 °C selama 15 menit

Dimasukkan dalam desikator selama 10 menit

Ditimbang

Diulangi langkah diatas sampai berat konstan

Dihitung kadar air

Hasil

3. Ekstraksi Sampel

Serbuk *Eucheuma cottonii*

- Ditimbang 100 gram
- Ditambah metanol p.a sebanyak 500 mL kedalam setiap erlenmeyer
- Diaduk selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm
- Diganti pelarut setiap 24 jam sekali
- Diulangi sebanyak 3 kali
- Disaring

Filtrat

Residu

- Digabung semua filtrat menjadi satu
- Dipekatkan dengan *rotary evaporator* bersuhu 50 °C
- Dihitung rendemen dengan persamaan 3.2

Hasil

4. Hidrolisis dengan HCl dan Partisi dengan n-Heksana

Ekstrak pekat metanol *Eucheuma cottonii*

- Ditimbang sebanyak 10 gram
- Ditempatkan dalam beaker glass
- Ditambah dengan 20 mL HCl 2N perbandingan 1:2
- Dihidrolisis selama 1 jam dengan magnetik stirer hot plate pada suhu ruang
- Ditambahkan natrium bikarbonat pada hidrolisat yang diperoleh sampai PH-nya netral

Hasil

Hasil hidrolisis *Eucheuma cottonii*

- Dipartisi dengan 25 mL pelarut n-heksana
- Diulangi sebanyak 3 kali pengulangan

Hasil

5. Uji Fitokimia Steroid

Ekstrak Fraksi n-heksana

- Diambil 1 mg
- Ditambahkan 0,5 mL kloroform
- Ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrida
- Ditambahkan 1-2 mL H₂SO₄ pekat

Hasil

6. Pemisahan senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom Basah

Ekstrak Pekat Fraksi n-heksana

- Disiapkan fasa diam kolom silika gel G-60 (0,063-0,200 mm) metode basah
- Dimasukkan silika gel dalam kolom diameter 1 cm dan sampel dengan perbandingan 1:150
- Dimasukkan eluen campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 95:5; 90:10; 85:15; 80:20, 75:25; 70:30
- Ditampung eluat setiap 2 mL pada 270 botol vial
- Dihentikan proses elusi setelah semua senyawa steroid diperkirakan telah keluar dari kolom

Hasil

6.1 Pembuatan Kolom Kromatografi

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

- Diaktivasi 10 gram silika gel selama 2 jam pada suhu 110°C dan didinginkan dalam desikator selama 15 menit
- Disiapkan campuran homogen antara pelarut n-heksana:etil asetat (18:2) dan silika gel menggunakan *magnetic stirrer* di atas *hot plate* sampai terbentuk suspensi
- Dimasukkan suspensi ke dalam kolom menggunakan corong
- Diketuk-ketuk dinding kolom
- Dibuka kran bagian kolom setelah terbentuk lapisan setebal 2 cm
- Dibiarkan kolom beberapa saat agar cairan yang berada di atas adsorben menjadi jernih

Hasil

7. Monitoring dengan KLTA

Fraksi hasil K. Kolom

- Disiapkan eluen campuran n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 18:2 dalam bejana pengembang
- Dijenuhkan selama 1 jam
- Dioven plat KLT pada suhu 110°C selama 30 menit
- Ditotolkan masing-masing kelompok fraksi
- Dimasukkan dalam bejana pengembang berisi eluen yang telah dijenuhkan
- Diamati noda yang terbentuk

Hasil

8. Uji Toksisitas Makroalga *Eucheuma cottonii* terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

8.1 Penetasan Larva Udang

Larva udang *Artemia salina* Leach

- Dimasukkan 250 mL air laut dalam wadah penetasan
- Dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina* Leach
- Diaerasi dan diberi lampu
- Ditunggu hingga menetas selama 48 jam

Hasil

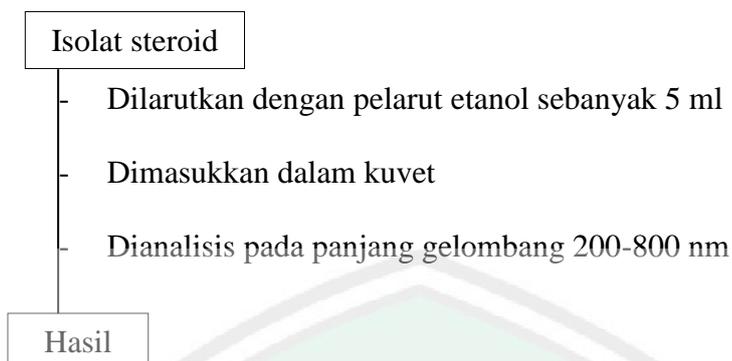
8.2 Uji Toksisitas

Isolat senyawa steroid konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm

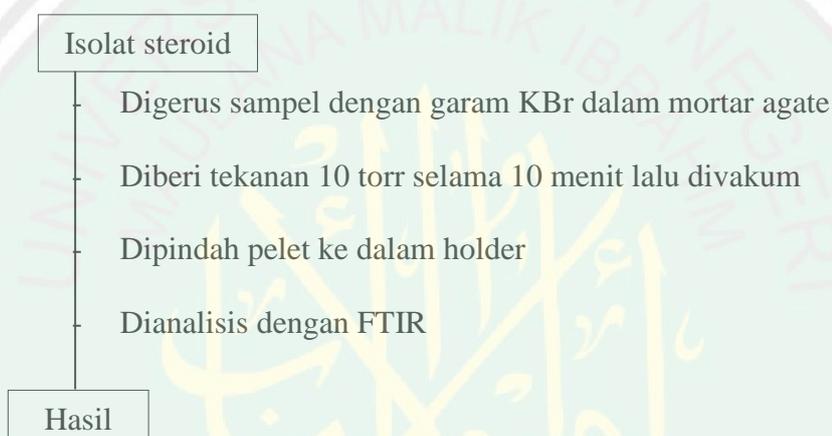
- Dimasukkan dalam vial
- Diupkan pelarutnya
- Ditambahkan dengan 100 μ L dimetil sulfoksida (DMSO), setetes larutan ragi roti
- Diberi air laut hingga volumenya 10 mL
- Di ditambahkan dengan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L.
- Dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan

Hasil

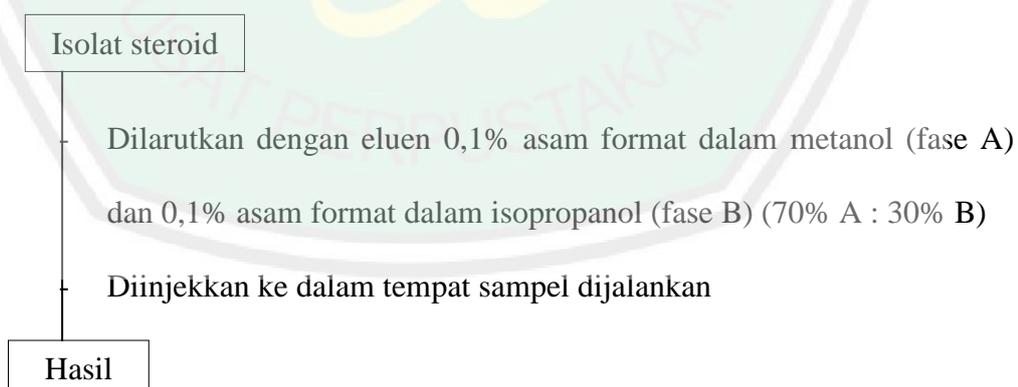
9. Identifikasi Menggunakan UV-Vis



10. Identifikasi Menggunakan FTIR



11. Identifikasi Menggunakan LC-MS/MS



Lampiran 3 Pembuatan Reagen

1. Pembuatan larutan HCl 2 N

$$\text{BJ HCl pekat} = 1,267 \text{ g/mL}$$

$$\text{Konsentrasi} = 37 \% = \frac{37 \text{ g HCl}}{100 \text{ g larutan}}$$

$$\text{BM HCl} = 36,5 \text{ g/mol}$$

$$n = 1 \text{ (jumlah mol ion H}^+\text{)}$$

$$\text{mol} = \frac{\text{g HCl}}{\text{Mr HCl}} = \frac{37 \text{ g}}{36,5 \text{ g/mol}} = 1,014 \text{ mol}$$

$$100 \text{ gram larutan} = \frac{100 \text{ g}}{1,267 \text{ g/mL}} = 78,9 \text{ mL} = 0,0789 \text{ L}$$

$$\text{Molaritas} = \frac{\text{mol}}{\text{L}} = \frac{1,014 \text{ mol}}{0,0789 \text{ L}} = 12,85 \text{ M}$$

$$\begin{aligned} \text{Normalitas} &= n \times \text{Molaritas} \\ &= 1 \times 12,85 \text{ M} = 12,85 \text{ N} \end{aligned}$$

$$N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$$

$$12,85 \text{ N} \cdot V_1 = 2 \text{ N} \cdot 100 \text{ mL}$$

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

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.

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. Pembuatan Reagen Liberman-Burchard

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

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

4. Pembuatan Eluen n-heksana : etil asetat

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

4.1 Eluen Kromatografi kolom

- 95:5
 - N-heksana = $\frac{95}{100} \times 100 = 95$ ml
 - Etil asetat = $\frac{5}{100} \times 100 = 5$ ml
- 90:10
 - N-heksana = $\frac{90}{100} \times 100 = 90$ ml
 - Etil asetat = $\frac{10}{100} \times 100 = 10$ ml
- 85:15
 - N-heksana = $\frac{85}{100} \times 100 = 85$ ml
 - Etil asetat = $\frac{15}{100} \times 100 = 15$ ml
- 80:20
 - N-heksana = $\frac{80}{100} \times 100 = 80$ ml
 - Etil asetat = $\frac{20}{100} \times 100 = 20$ ml
- 75:25
 - N-heksana = $\frac{75}{100} \times 100 = 75$ ml
 - Etil asetat = $\frac{25}{100} \times 100 = 25$ ml
- 70:30
 - N-heksana = $\frac{70}{100} \times 100 = 70$ ml
 - Etil asetat = $\frac{30}{100} \times 100 = 30$ ml

4.2 Eluen monitoring KLTA

- 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)

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

5. Pembuatan larutan stok 50 ppm dalam 20 ml pelarut

$$\begin{aligned} \text{ppm} &= \frac{\text{mg}}{\text{L}} \\ 50 \text{ ppm} &= \frac{\text{mg}}{0,02 \text{ L}} \\ &= 1 \text{ mg} \end{aligned}$$

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

6. Pembuatan larutan sampel 1 ppm

$$\begin{aligned} V_1.M_1 &= V_2.M_2 \\ 5 \text{ ml. } 1 \text{ ppm} &= V_2. 50 \text{ ppm} \\ V_2 &= \frac{5 \text{ ml} \times 1 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}} \\ &= 0,1 \text{ ml} \end{aligned}$$

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

7. Pembuatan larutan sampel 2 ppm

$$\begin{aligned} V_1.M_1 &= V_2.M_2 \\ 5 \text{ ml. } 2 \text{ ppm} &= V_2. 50 \text{ ppm} \\ V_2 &= \frac{5 \text{ ml} \times 2 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}} \\ &= 0,2 \text{ ml} \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat 5 ml larutan sampel 2 ppm diperlukan larutan stok 50 ppm sebanyak 1 ml

8. Pembuatan larutan sampel 3 ppm

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$5 \text{ ml. } 3 \text{ ppm} = V2. 50 \text{ ppm}$$

$$V2 = \frac{5 \text{ ml} \times 3 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}}$$
$$= 0,3 \text{ ml}$$

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

9. Pembuatan larutan sampel 4 ppm

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$5 \text{ ml. } 4 \text{ ppm} = V2. 50 \text{ ppm}$$

$$V2 = \frac{5 \text{ ml} \times 4 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}}$$
$$= 0,4 \text{ ml}$$

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

10. Pembuatan larutan sampel 5 ppm

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$5 \text{ ml. } 5 \text{ ppm} = V2. 50 \text{ ppm}$$

$$V2 = \frac{5 \text{ ml} \times 5 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}}$$
$$= 0,5 \text{ ml}$$

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

Lampiran 4 Perhitungan Kadar Air

Data Hasil Penimbangan Kadar Air *Eucheuma cottonii* basah

Cawan Kosong (g)	Cawan Kosong + Sampel (g)
52,1661	51,9365

Ulangan	Cawan 1 (g)	Cawan 2 (g)
Sebelum dioven	54,4983	46,5816
Ulangan 1	52,2841	44,4540
Ulangan 2	52,2827	44,4469
Ulangan 3	52,2809	44,4456
Ulangan 4	52,2814	44,4456

$$\frac{b-c}{b-a} \times 100\%$$

Cawan 1

$$\begin{aligned} \% \text{ Kadar air} &= \frac{54,4983 - 52,2814}{54,4983 - 51,9365} \times 100\% \\ &= \frac{2,2169}{2,5618} \times 100\% \\ &= 86,54 \% \end{aligned}$$

Cawan 2

$$\begin{aligned} \% \text{ Kadar air} &= \frac{46,5816 - 44,4456}{46,5816 - 44,0867} \times 100\% \\ &= \frac{2,1360}{2,4949} \times 100\% \\ &= 86,61 \% \end{aligned}$$

Rata-rata Cawan 1 dan 2

$$\begin{aligned} \% \text{ Kadar air} &= \frac{(86,54 \% + 85,61 \%)}{2} \\ &= \frac{172,15 \%}{2} \\ &= 86,07 \% \end{aligned}$$

Data Hasil Penimbangan Kadar Air *Eucheuma cottonii* kering

Ulangan	Cawan Kosong + Serbuk <i>Eucheuma cottonii</i>	
	Cawan 1 (g)	Cawan 2 (g)
Sebelum dioven	34,5476	28,4107
Ulangan 1	34,5474	28,4107
Ulangan 2	34,5464	28,4108
Ulangan 3	34,5478	28,4108
Ulangan 4	34,5477	28,4108

Ulangan	Cawan Kosong + Serbuk <i>Eucheuma cottonii</i>	
	Cawan 1 (g)	Cawan 2 (g)
Sebelum dioven	35,5463	29,4150
Ulangan 1	35,5001	29,3664
Ulangan 2	35,5001	29,3664
Ulangan 3	35,5003	29,3664
Ulangan 4	35,5003	29,3664

Cawan 1

$$\begin{aligned}\% \text{ Kadar air} &= \frac{35,5463 - 35,5003}{35,5463 - 34,5462} \times 100\% \\ &= \frac{0,0460}{1,000} \times 100\% \\ &= 4,60 \%\end{aligned}$$

Cawan 2

$$\begin{aligned}\% \text{ Kadar air} &= \frac{29,4150 - 29,3664}{29,4150 - 28,4100} \times 100\% \\ &= \frac{0,0486}{1,005} \times 100\% \\ &= 4,83 \%\end{aligned}$$

Rata-rata Cawan 1 dan 2

$$\begin{aligned}\% \text{ Kadar air} &= \frac{(4,60 \% + 4,83 \%)}{2} \\ &= \frac{9,43 \%}{2} \\ &= 4,71 \%\end{aligned}$$

Data hasil kadar garam

Sampel	Kadar Garam (ppt)
<i>Eucheuma cottonii</i> basah	22
<i>Eucheuma cottonii</i> kering	80

Eucheuma cottonii basah

$$\text{ppt} = \frac{g}{L}$$

$$22 \text{ ppt} = 22 \frac{g}{L} = \frac{g}{0,001 L}$$

$$g = \frac{22 g \times 0,001 L}{1 L}$$

$$= 0,022 \text{ g}$$

$$\% \text{ kadar garam} = \frac{\text{berat garam}}{\text{berat sampel}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,022 \text{ gram}}{1 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 2,20 \%$$

Eucheuma cottonii kering

$$\text{ppt} = \frac{g}{L}$$

$$80 \text{ ppt} = 80 \frac{g}{L} = \frac{g}{0,012 L}$$

$$g = \frac{80 g \times 0,012 L}{1 L}$$

$$= 0,96 \text{ g}$$

$$\% \text{ kadar garam} = \frac{\text{berat garam}}{\text{berat sampel}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,96 \text{ gram}}{4 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 24,00 \%$$

Lampiran 6 Perhitungan Rendemen

A. Perhitungan Rendemen Hasil Preparasi

Diketahui :

Berat segar = 10 Kg

Berat serbuk = 0,48 Kg

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat serbuk}}{\text{berat segar}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,48 \text{ Kg}}{10 \text{ Kg}} \times 100 \% \\ &= 4,8 \% \end{aligned}$$

B. Perhitungan Rendemen Hasil Maserasi

Diketahui :

Berat sampel = 100 gram

Berat ekstrak = 13,7911 gram

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{13,7911 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} \times 100 \% \\ &= 13,79 \% \end{aligned}$$

C. Perhitungan Rendemen Hasil Partisi dengan n-Heksana

Diketahui :

Berat ekstrak metanol = 10 gram

Berat fraksi n-heksana = 1,1525 gram

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat fraksi n-heksana}}{\text{berat ekstrak metanol}} \times 100 \% \\ &= \frac{1,1525 \text{ gram}}{10 \text{ gram}} \times 100 \% \\ &= 11,52 \% \end{aligned}$$

Lampiran 7 Perhitungan Rf Hasil Monitoring KLTA**a. Vial 8 - 22**

$$\text{Rf noda 1} = \frac{5,7 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,7300 \text{ cm}$$

b. Vial 49 - 61

$$\text{Rf noda 1} = \frac{2,8 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,3580 \text{ cm}$$

c. Vial 62 - 70

$$\text{Rf noda 1} = \frac{2,9 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,3720 \text{ cm}$$

d. Vial 73 - 78

$$\text{Rf noda 1} = \frac{2,3 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,2948 \text{ cm}$$

e. Vial 79 - 82

$$\text{Rf noda 1} = \frac{1,8 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,2307 \text{ cm}$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{2,3 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,2948 \text{ cm}$$

f. Vial 83 - 99

$$\text{Rf noda 1} = \frac{0,3 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,0384 \text{ cm}$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{1,8 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,2307 \text{ cm}$$

$$\text{Rf noda 3} = \frac{2,3 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,2948 \text{ cm}$$

g. Vial 100 - 122

$$\text{Rf noda 1} = \frac{0,3 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,0384 \text{ cm}$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{1,0 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,1282 \text{ cm}$$

$$\text{Rf noda 3} = \frac{1,8 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,2307 \text{ cm}$$

h. Vial 123 – 154

$$Rf \text{ noda } 1 = \frac{0,3 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,0384 \text{ cm}$$

$$Rf \text{ noda } 2 = \frac{1,0 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,1282 \text{ cm}$$

i. Vial 155 – 157

$$Rf \text{ noda } 1 = \frac{0,3 \text{ cm}}{7,8 \text{ cm}} = 0,0384 \text{ cm}$$

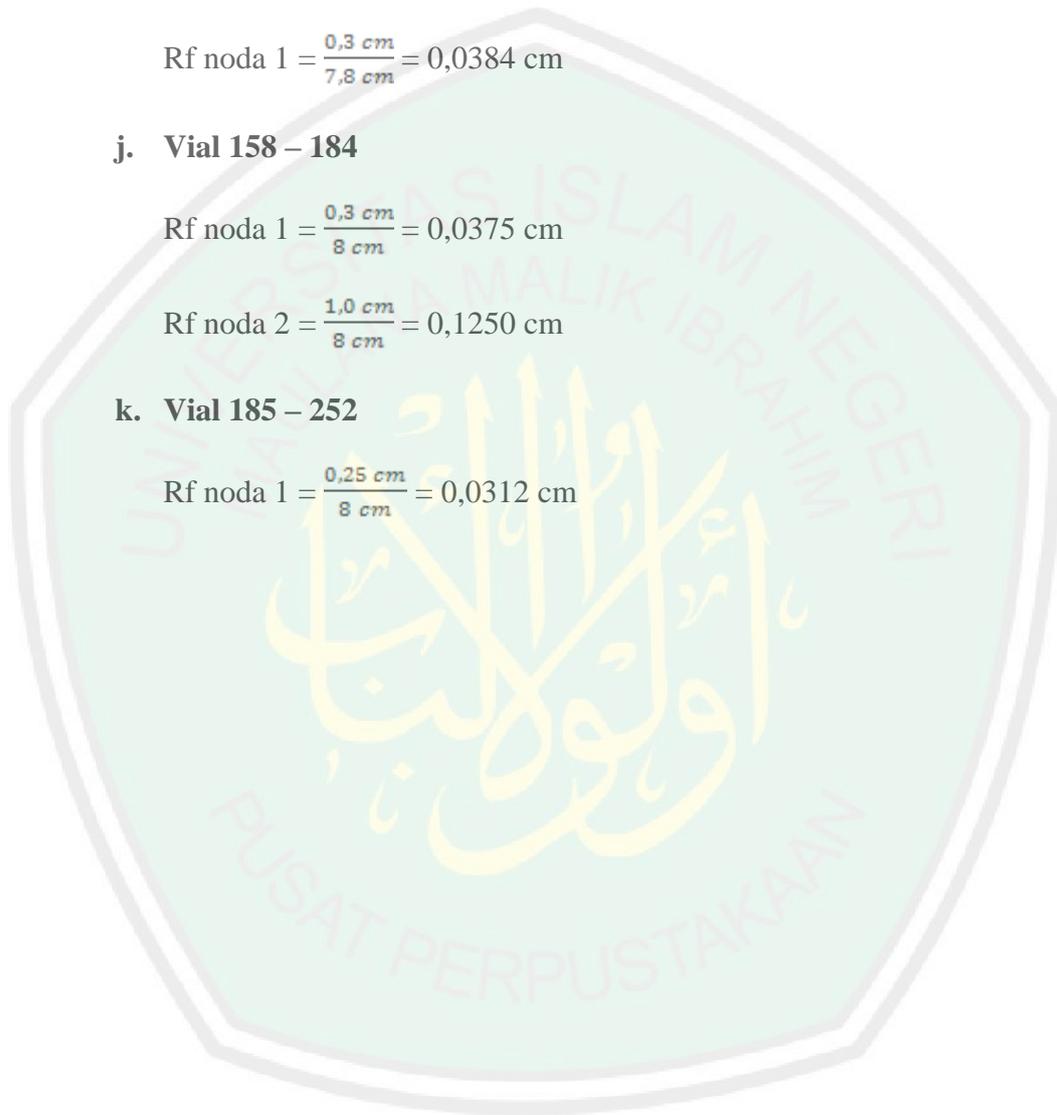
j. Vial 158 – 184

$$Rf \text{ noda } 1 = \frac{0,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,0375 \text{ cm}$$

$$Rf \text{ noda } 2 = \frac{1,0 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,1250 \text{ cm}$$

k. Vial 185 – 252

$$Rf \text{ noda } 1 = \frac{0,25 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,0312 \text{ cm}$$



Lampiran 8 Hasil Monitoring KLTA

No	Fraksi	Vial	Warna (UV)	Jarak Senyawa (Cm)	Jarak Elusi (Cm)	Rf	Senyawa
1	A1	0-7	-	-	-	-	-
2	A2	8-22	Hitam	5,7	7,8	0,7300	Steroid
3	A3	23-48	-	-	-	-	-
4	A4	49-61	Hijau	2,8	7,8	0,3580	Steroid
5	A5	62-70	Hijau Merah	2,9 2,3	7,8 7,8	0,3720 0,2950	Campuran Steroid- Triterpenoid
6	A6	71-72	-	-	-	-	-
7	A7	73-78	Merah	2,3	7,8	0,2950	Triterpenoid
8	A8	79-82	Merah Merah	1,8 2,3	7,8 7,8	0,2307 0,2948	Triterpenoid
9	A9	83-99	Merah Merah Merah	2,3 1,8 0,3	7,8 7,8 7,8	0,2948 0,2307 0,0384	Triterpenoid
10	A10	100-122	Merah Merah Merah	1,8 1,0 0,3	7,8 7,8 7,8	0,2307 0,1282 0,0384	Triterpenoid
11	A11	123-154	Merah Merah	1,0 0,3	7,8 7,8	0,1282 0,0384	Triterpenoid
12	A12	155-157	Merah	0,3	7,8	0,0384	Triterpenoid
13	A13	158-184	Merah Merah	1,0 0,3	8 8	0,1250 0,0375	Triterpenoid
14	A14	185-252	Merah	0,25	8	0,0312	Triterpenoid
15	A15	253-263	Merah	-	-	-	Triterpenoid

Gambar ilustrasi plat A pada panjang gelombang 254 nm



Gambar ilustrasi plat A pada panjang gelombang 366 nm



Gambar ilustrasi plat B pada panjang gelombang 366 nm



Gambar ilustrasi plat C pada panjang gelombang 366 nm



Gambar ilustrasi plat D pada panjang gelombang 366 nm



Lampiran 9 Perhitungan Rendemen Kromatografi Kolom

Vial	Fraksi	Dugaan senyawa	Berat fraksi (g)	Rendemen (%)
0 - 7	A1	-	0,0018	2,67
8 - 22	A2	Steroid	0,0246	36,72
23 - 48	A3	-	0,0018	2,67
49 - 61	A4	Steroid	0,0009	1,34
62 - 70	A5	Steroid, Terpenoid	0,0021	3,13
71 - 72	A6	-	0,0003	0,45
73 - 78	A7	Terpenoid	0,0007	1,04
79 - 82	A8	Terpenoid	0,0007	1,04
83 - 99	A9	Terpenoid	0,0015	2,24
100 - 122	A10	Terpenoid	0,0022	3,28
123 - 154	A11	Terpenoid	0,0019	2,83
155 - 157	A12	Terpenoid	0,0005	0,75
158 - 184	A13	Terpenoid	0,0018	2,67
185 - 252	A14	Terpenoid	0,0022	3,28
253 - 263	A15	-	0,0016	2,39

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat fraksi}}{\text{berat sampel}} \times 100 \%$$

a. Fraksi A1

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen} &= \frac{0,0018 \text{ g}}{0,067 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 2,7 \% \end{aligned}$$

b. Fraksi A2

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen} &= \frac{0,0246 \text{ g}}{0,067 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 36,72 \% \end{aligned}$$

c. Fraksi A3

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen} &= \frac{0,0018 \text{ g}}{0,067 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 2,67 \% \end{aligned}$$

d. Fraksi A4

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{0,0009 \text{ g}}{0,067 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 1,34 \%\end{aligned}$$

e. Fraksi A5

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{0,0021 \text{ g}}{0,067 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 3,13 \%\end{aligned}$$

f. Fraksi A6

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{0,0003 \text{ g}}{0,067 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 0,45 \%\end{aligned}$$

g. Fraksi A7

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{0,0007 \text{ g}}{0,067 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 1,04 \%\end{aligned}$$

h. Fraksi A8

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{0,0007 \text{ g}}{0,067 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 1,04 \%\end{aligned}$$

i. Fraksi A9

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{0,0015 \text{ g}}{0,067 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 2,24 \%\end{aligned}$$

j. Fraksi A10

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{0,0022 \text{ g}}{0,067 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 3,28 \%\end{aligned}$$

k. Fraksi A11

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{0,0019 \text{ g}}{0,067 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 2,83 \%\end{aligned}$$

l. Fraksi A12

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{0,0005 \text{ g}}{0,067 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 0,75 \%\end{aligned}$$

m. Fraksi A13

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{0,0018 \text{ g}}{0,067 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 2,67 \%\end{aligned}$$

n. Fraksi A14

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{0,0022 \text{ g}}{0,067 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 3,28 \%\end{aligned}$$

o. Fraksi A15

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{0,0016 \text{ g}}{0,067 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 2,39 \%\end{aligned}$$

Lampiran 10 Data Kematian Larva Udang dan Perhitungan LC₅₀ Uji Toksisitas Isolat Steroid

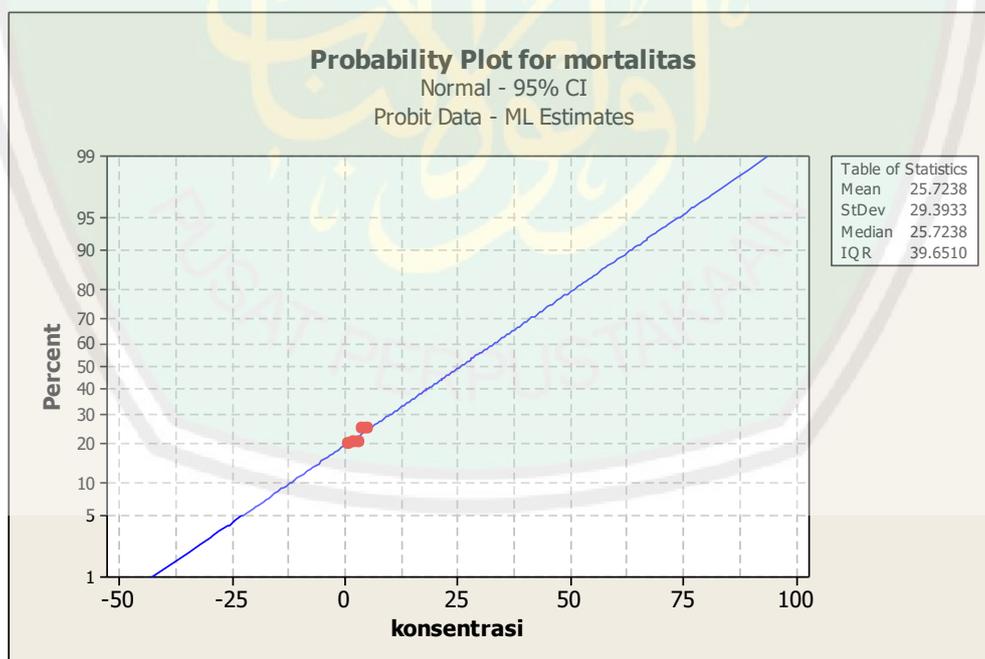
a. Fraksi n-heksana *Eucheuma cottonii*

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

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

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

$$\text{mortalitas} = \% \text{ mortalitas} \times \text{jumlah hewan uji}$$



Probit Analysis: mortalitas, C3 versus konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	55
	Non-event	195
C3	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-0.875158	0.210501	-4.16	0.000
konsentrasi	0.0340213	0.0628251	0.54	0.588

Natural Response 0

Log-Likelihood = -131.580

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	1.97561	3	0.577
Deviance	1.91314	3	0.591

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	25.7238	41.9698	-56.5355	107.983
StDev	29.3933	54.2788	0.787748	1096.76

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-42.6553	84.4225	*	*
2	-34.6427	69.6347	*	*
3	-29.5590	60.2545	*	*
4	-25.7347	53.1998	*	*
5	-22.6239	47.4631	*	*
6	-19.9762	42.5818	*	*
7	-17.6546	38.3037	*	*
8	-15.5759	34.4750	*	*
9	-13.6854	30.9950	*	*
10	-11.9453	27.7942	*	*
20	0.985758	4.59994	*	*
30	10.3099	13.6751	*	*
40	18.2771	28.2577	*	*
50	25.7238	41.9698	*	*
60	33.1705	55.7012	*	*
70	41.1377	70.4010	*	*
80	50.4618	87.6099	*	*
90	63.3929	111.481	*	*
91	65.1330	114.693	*	*
92	67.0235	118.183	*	*
93	69.1022	122.021	*	*
94	71.4238	126.307	*	*
95	74.0715	131.196	*	*
96	77.1823	136.939	*	*
97	81.0066	144.000	*	*
98	86.0903	153.386	*	*
99	94.1029	168.181	*	*

Probability Plot for mortalitas

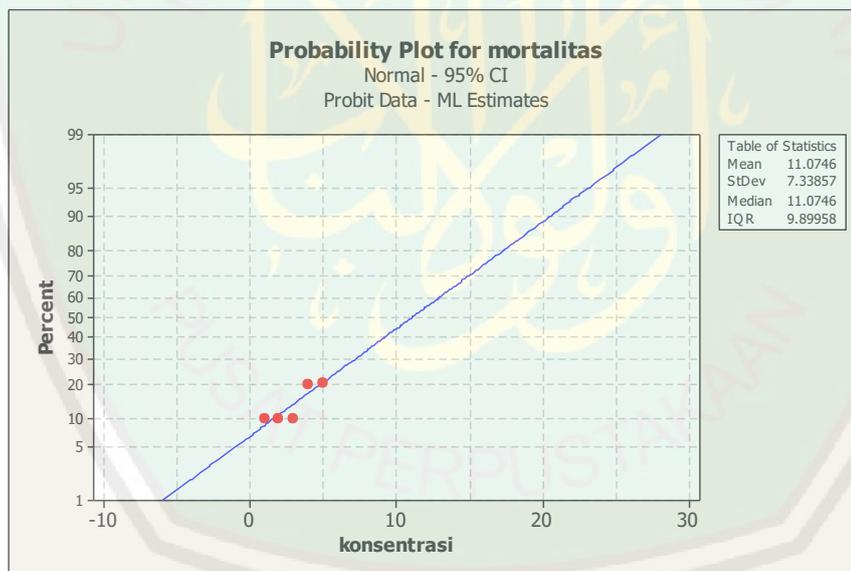
b. Isolat steroid A2 *Eucheuma cottonii*

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

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

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

$$\text{mortalitas} = \% \text{ mortalitas} \times \text{jumlah hewan uji}$$



4/4/2019 8:20:38 PM

Probit Analysis: mortalitas, C3 versus konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	35
	Non-event	215

C3 Total 250

Estimation Method: Maximum Likelihood
Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1.50910	0.249835	-6.04	0.000
konsentrasi Natural Response	0.136266	0.0710256	1.92	0.055
	0			

Log-Likelihood = -99.366
Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	1.10461	3	0.776
Deviance	1.12673	3	0.771

Tolerance Distribution
Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	11.0746	4.15552	2.92994	19.2193
StDev	7.33857	3.82505	2.64206	20.3836

Table of Percentiles

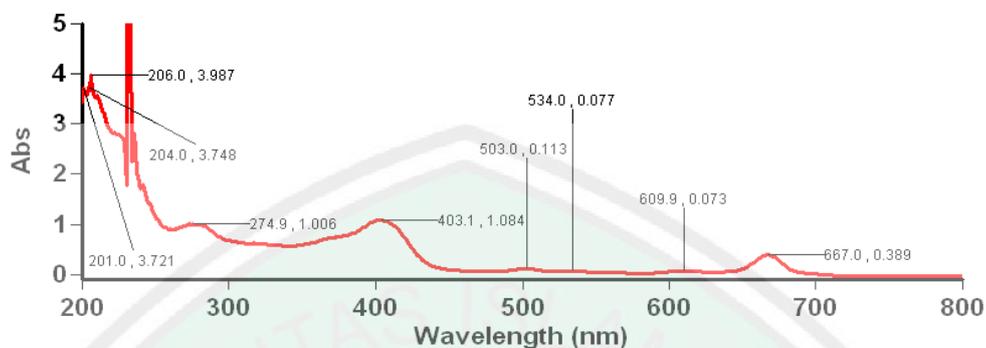
Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-5.99746	4.86281	*	*
2	-3.99698	3.83514	*	*
3	-2.72773	3.18819	*	*
4	-1.77293	2.70617	*	*
5	-0.996271	2.31896	*	*
6	-0.335212	1.99490	*	*
7	0.244407	1.71734	*	*
8	0.763387	1.47703	*	*
9	1.23538	1.26906	*	*
10	1.66985	1.09171	*	*
20	4.89831	1.13725	*	*
30	7.22625	2.20923	*	*
40	9.21540	3.20607	*	*
50	11.0746	4.15552	*	*
60	12.9338	5.11233	*	*
70	14.9230	6.14027	*	*
80	17.2509	7.34645	*	*
90	20.4794	9.02242	*	*
91	20.9138	9.24815	*	*
92	21.3858	9.49342	*	*
93	21.9048	9.76314	*	*
94	22.4844	10.0644	*	*
95	23.1455	10.4081	*	*
96	23.9221	10.8120	*	*
97	24.8769	11.3086	*	*
98	26.1462	11.9688	*	*
99	28.1467	13.0097	*	*

Probability Plot for mortalitas

Lampiran 11 Spektrum UV-Vis

Lamdha Maks Fraksi Euchema cottonii 500 ppm

Tanggal Analisa : 15 April 2019



Scan Analysis Report

Report Time : Mon 15 Apr 03:48:19 PM 2019

Method:

Batch: D:\Vioreta\Lamdha Maks Fraksi Euchema cottonii 500 ppm (15-04-2019).DSW

Software version: 3.00 (339)

Operator: Rika

Sample Name: Fraksi cottonii 500 ppm

Collection Time 4/15/2019 3:49:17 PM

Peak Table

Peak Style Peaks

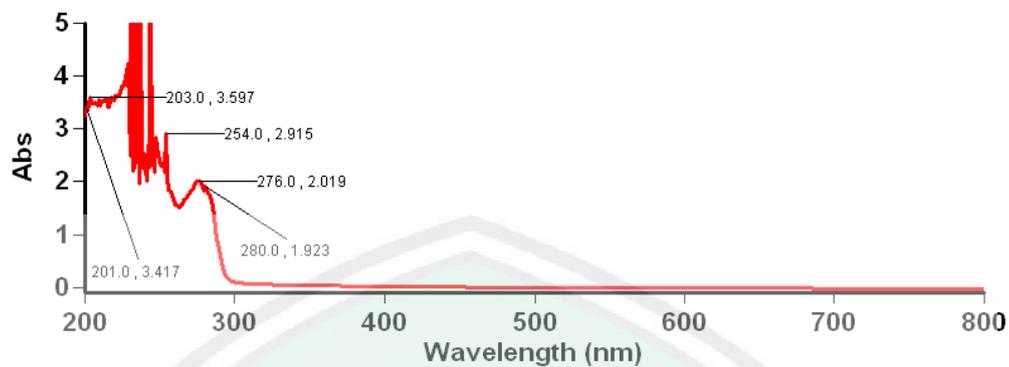
Peak Threshold 0.0100

Range 800.0nm to 200.0nm

Wavelength (nm)	Abs
667.0	0.389
609.9	0.073
534.0	0.077
503.0	0.113
403.1	1.084
274.9	1.006
263.0	0.916
241.0	1.799
235.0	2.820
233.0	10.000
209.9	3.585
206.0	3.987
204.0	3.748
201.0	3.721

Lamdha Maks Isolat A2 Encer

Tanggal Analisa : 15 April 2019



Scan Analysis Report

Report Time : Mon 15 Apr 04:02:58 PM 2019

Method:

Batch: D:\Vioreta\Lamdha Maks Isolat Steroid Euchema cottonii A2 Encer (15-04-2019).DSW

Software version: 3.00 (339)

Operator: Rika

Sample Name: Isolat steroid cottoni A2

Collection Time 4/15/2019 4:03:30 PM

Peak Table

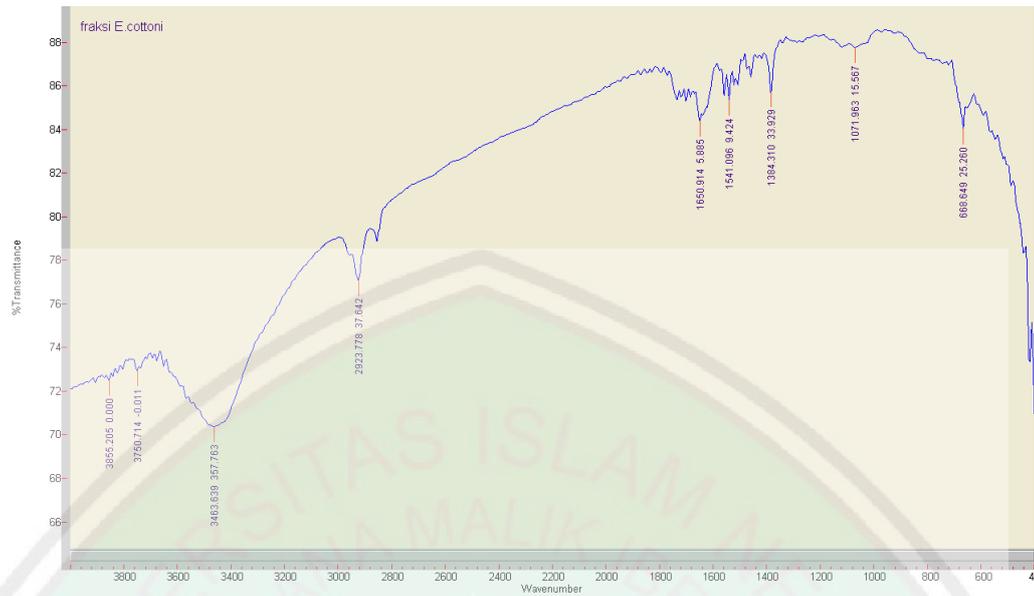
Peak Style Peaks

Peak Threshold 0.0100

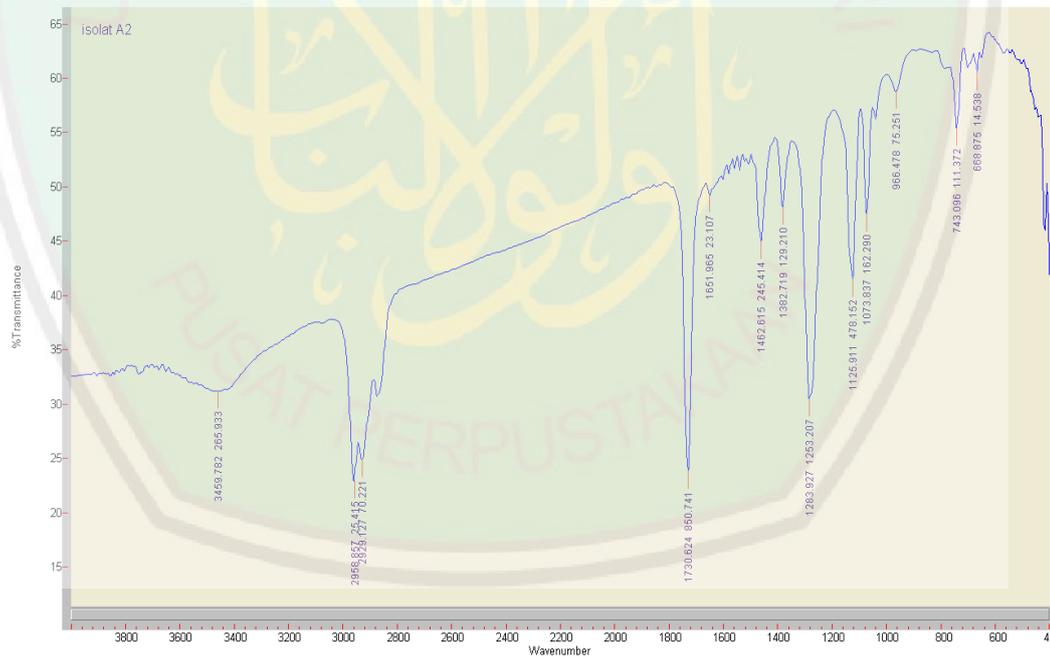
Range 800.0nm to 200.0nm

Wavelength (nm)	Abs
280.0	1.923
276.0	2.019
254.0	2.915
252.0	2.377
247.0	2.836
244.0	10.000
241.9	2.708
240.1	2.531
236.9	10.000
235.0	10.000
231.0	10.000
228.9	4.231
222.0	3.654
217.9	3.597
214.0	3.569
211.0	3.524
209.0	3.557
206.9	3.498
203.0	3.597
201.0	3.417

Lampiran 12 Spektra FTIR



Spektra FTIR Fraksi n-Heksana *Eucheuma cottonii*



Spektra FTIR Isolat Steroid A2 *Eucheuma cottonii*

Lampiran 13 Senyawa Steroid Target Identifikasi LCMS/MS

No.	Jenis Steroid	M (g/mol)	(M+H- H ₂ O)	Parent Mass (m/z)	Daughter Mass (m/z)	Referensi
1.	Sitosterol	414	397	397	161	Fu & Joseph, 2012
2.	Stigmasterol	412	395	395	254-255	Mardaneni, 3017
3.	Kampesterol	400	383	383	161,5	Fu & Joseph, 2012
4.	Fukosterol	386	369	369	80,5-81,5	Mardaneni, 3017
5.	Kolesterol	386	369,4	369,4	161,2 95,2	Fu & Joseph, 2012
6.	Demosterol	384	367,3	367,3	161,1 95	Fu & Joseph, 2012

Lampiran 14 Dokumentasi Penelitian

	
Perajangan <i>Eucheuma cottonii</i>	Serbuk <i>Eucheuma cottonii</i>
	
Penentuan kadar garam	Salinometer
	
Filtrat hasil maserasi	Proses hidrolisis
	
Partisi ke 1	Partisi ke 2

 <p>Partisi ke 3</p>	 <p>Fraksi n-heksana pekat</p>
 <p>Pembuatan bubuk silika</p>	 <p>Proses elusi</p>
 <p>Plat A di panjang gelombang 254 nm</p>	 <p>Plat A di panjang gelombang 366 nm</p>
 <p>Plat B di panjang gelombang 366 nm</p>	 <p>Plat C di panjang gelombang 366 nm</p>
 <p>Plat D di panjang gelombang 366 nm</p>	 <p>Uji toksisitas</p>



KEMENTERIAN AGAMA RI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN) MALIKI MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN KIMIA

Gedung Sains dan Teknologi UIN Malang Lt.2 Jl. Gajayana 50 Malang Telp./Fax +62341558933
www.uin-malang.ac.id Email: info@uin-malang.ac.id, kim@uin-malang.ac.id

KARTU KONSULTASI PENELITIAN

Nama : VIORETA APRILIA PRAMITANIA
NIM : 15220021
Judul Skripsi : Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom
Fraksi 1-Heksana Alca Merah (Cekurma) dari
Perairan Wongsorejo Pantuluwangi
Pembimbing Utama : A. GHANAIM FASYA, M.Si
Pembimbing Agama : MOHAMMAD IMAMULIDIN, L.C, M.A
Konsultan : AHMAD HANAPI K.S.

No	Tanggal	Materi Konsultasi	Catatan (ditulis tangan)	Tanda tangan (Pembimbing)
1.	6/4/2018	Penentuan tema		Gly
2.	12/4/2018	Penentuan Judul		Gly
3.	20/4/2018	Penentuan & Pembahasan outline		Gly
4.	11/5/2018	BAB I		Gly
5.	17/5/2018	BAB I, II		Gly
6.	8/8/2018	BAB I, III		Gly
7.	15/8/2018	BAB I, II, III		Gly
8.	7/9/2018	BAB I, II, III, Diagram Alir		Gly
9.	12/9/2018	BAB I, II, III		Gly
10.	8/10/2018	BAB I, II, III		Gly
11.	10/10/2018	BAB I, II, III		Gly
12.	11/10/2018	BAB I, II, III, lampiran	Proposal ACC	Gly
13.	14/3/2019	BAB I		M. Ghani
14.	8/4/2019	Data Penelitian, BAB IV		Gly
15.	10/4/2019	BAB IV		Gly
16.	11/4/2019	BAB IV		M. Ghani
17.	15/4/2019	BAB IV, V		Gly
18.	24/4/2019	Abstrak & Lampiran		Gly
19.	24/4/2019	Bab IV		M. Ghani
20.	24/4/2019	Bab IV		Gly

