

**UJI TOKSISITAS SENYAWA STEROID HASIL KROMATOGRAFI
KOLOM BASAH FRAKSI n-BUTANOL EKSTRAK METANOL ALGA
MERAH *Eucheuma cottonii* DARI PERAIRAN WONGSOREJO
BANYUWANGI**

SKRIPSI

Oleh:
FITRI FATIMAH
NIM. 16630016



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**UJI TOKSISITAS SENYAWA STEROID HASIL KROMATOGRAFI
KOLOM BASAH FRAKSI n-BUTANOL EKSTRAK METANOL ALGA
MERAH *Eucheuma cottonii* DARI PERAIRAN WONGSOREJO
BANYUWANGI**

SKRIPSI

Oleh:
FITRI FATIMAH
NIM. 16630016

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
2020

**UJI TOKSISITAS SENYAWA STEROID HASIL KROMATOGRAFI
KOLOM BASAH FRAKSI n-BUTANOL EKSTRAK METANOL ALGA
MERAH *Eucheuma cottonii* DARI PERAIRAN WONGSOREJO
BANYUWANGI**

SKRIPSI

Oleh:
FITRI FATIMAH
NIM. 16630016

Telah Diperiksa dan Disetujui Untuk Diuji:
Tanggal: 9 Desember 2020

Pembimbing I



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

Pembimbing II



Oky Bagas Prasetyo, M.Si
NIDT. 19890113 20180201 1 244

**Mengetahui,
Ketua Jurusan**



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

**UJI TOKSISITAS SENYAWA STEROID HASIL KROMATOGRAFI
KOLOM BASAH FRAKSI n-BUTANOL EKSTRAK METANOL ALGA
MERAH *Eucheuma cottonii* DARI PERAIRAN WONGSOREJO
BANYUWANGI**

SKRIPSI

Oleh:
FITRI FATIMAH
NIM. 16630016

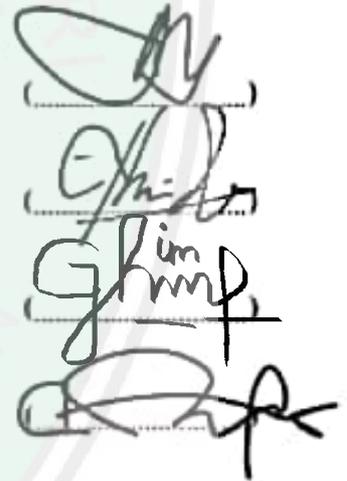
Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 23 Desember 2020

Penguji Utama : Himmatul Baroroh, M. Si
NIP. 19750730 200312 2 001

Ketua Penguji : Ahmad Hanapi, S.Si., M. Sc
NIDT. 19851225 201608011 069

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

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



Mengetahui,
Ketua Jurusan



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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Fitri Fatimah

NIM : 16630016

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Uji Toksisitas Senyawa Steroid Hasil Kromatografi Kolom Basah Fraksi n-Butanol Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma cottonii* dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi.

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

Malang, 24 Desember 2020

Yang membuat pernyataan,



Fitri Fatimah
NIM. 16630016

PERSEMBAHAN

Assalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh

Saya persembahkan skripsi ini untuk :

1. Kedua orangtua saya, Bapak H.Suliono dan Ibu Hj.Sujiati yang telah membimbing, membesarkan, menerima saya baik kekurangan maupun kelebihan saya, memberi segalanya baik lahir maupun batin, yang selalu memberikan doa, restu, keberhakahan dan segalanya dalam langkah kehidupan saya.
2. Kakak saya Erik Ari Setiawan, Panji Fitroh Santoso, anak-anak dari ayah saya, kakak ipar saya Lila Safaida dan keponakan saya Risma, Hanida dan Ahfa yang selalu memberikan dukungan, semangat dan doa dalam setiap keputusan saya.
3. Bapak Ibu Dosen dari semester 1 hingga semester akhir yang telah membimbing dan memberikan ilmunya tanpa pamrih selama saya kuliah di kampus UIN Malang.
4. Para laboran yaitu Mas Abi dan laboran lainnya yang membantu dalam proses penelitian saya.
5. Teman-teman saya (Khumaini, Niken, Galuh, Ajes, Bagus, Alan, Izza dan Usman) yang selalu memberikan semangat dan dukungannya kepada saya dalam menyelesaikan tugas akhir ini dan tak pernah lelah untuk menyemangati saya untuk selalu bekerja keras, sabar, dan ikhlas dalam menjalani hidup dan selalu berada disamping saya baik saya dalam keadabain senang atau sedih.
6. Teman-teman organik saya khususnya Ismi, Vivi dan Vinna yang telah berjuang bersama dan saling memotivasi dalam penelitian untuk memperoleh gelar sarjana.
7. Teman-teman Himaska Helium 2017-2019 yaitu para pejuang OKI dan program kerja Himaska Helium lainnya yang telah memotivasi saya untu semangat dalam kuliah dan membuka mata saya melihat potensi besar disekeliling saya.
8. Teman-teman seperjuangan saya mulai dari awal masuk kuliah jurusan KIMIA 2016 khususnya kelas A yang memberi saya semangat dan doa kepada saya.

Semoga kebaikan, keberkahan, keimanan dan keislaman yang kuat akan selalu berpihak pada kita semua, amin.

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum wa Rahmatullahi wa Barakatuh

Syukur alhamdulillah kehadiran Allah Swt yang telah melimpahkan rahmat, taufik dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Shalawat beserta salam semoga tetap tercurah limpahkan kepada junjungan kita Nabi Agung Nabi Besar Nabi Muhammad saw yang menuntun umat islam agar senantiasa berpegang teguh pada al-Quran dan al-Hadits. Penyusun mengucapkan syukur Alhamdulillah atas terselesaikannya skripsi yang berjudul **“Uji Toksisitas Senyawa Steroid Hasil Kromatografi Kolom Basah Fraksi n-Butanol Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma cottonii* Dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi”** ini, ternyata tidak semudah yang dibayangkan sebelumnya. Namun, berkat dorongan, semangat, dan dukungan dari berbagai pihak merupakan kekuatan yang sangat besar hingga terselesaikannya penelitian ini. Khususnya dorongan dan semangat serta doa dari ayahanda H. Suliono yang sudah berjuang melawan penyakitnya semenjak saya diterima di jurusan kimia ini, ibunda Hj. Sujati yang mendidik serta menjadi menjadi orang tersabar yang menghadapi saya dari kecil hingga saat ini. Ayahanda, ibunda, kakak-kakak saya dan adik-adik saya merupakan inspirator dan pemacu penulis agar tidak pernah berhenti untuk menempuh cita-cita yang diharapkan.

Pada kesempatan kali ini penulis juga mengucapkan terimakasih yang tak terhingga kepada :

1. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku ketua jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

2. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si selaku dosen pembimbing penelitian saya yang merangkap seperti ayah saya dengan sabar dan ikhlas membimbing saya, Bapak Oky Bagas Prasetyo, M.Si sebagai pembimbing agama saya, Ibu Himmatul Baroroh, M. Si dan Bapak Ahmad Hanapi, S.Si., M. Sc sebagai penguji saya yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan ilmu, nasehat serta perhatiannya hingga selesainya skripsi ini.
3. Seluruh dosen dan staf jurusan Kimia UIN Malang yang telah memberikan ilmu pengetahuan, wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal.
4. Teman-teman Pengurus Himpunan Himaska “Helium”, OC, CO, dan SC OKI XII dan XIII Nasional, dan teman-teman kimia angkatan 2016 yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, namun tidak mengurangi arti keberadaan mereka.

Sebagai seorang manusia dengan keterbatasan ilmu pengetahuan yang dikuasai, penulis menyadari bahwa skripsi ini masih sangat jauh dari sempurna sehingga membutuhkan masukan dan kritikan yang bersifat membangun. Oleh karena itu penulis membuka luas bagi yang ingin menyumbangkan masukan dan kritikan demi kesempurnaan skripsi ini. Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat bagi penulis sendiri maupun pembaca. Terima kasih.

Wassalamualaikum wr. wb

Malang, 24 Desember 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
LEMBAR ORISINALITAS	iv
LEMBAR PERSEMBAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR PERSAMAAN	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
مستخلص البحث	xvi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian.....	7
1.4 Batasan Masalah.....	8
1.5 Manfaat.....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Alga merah (<i>Eucheuma cottonii</i>)	9
2.2 Senyawa Steroid	11
2.3 Teknik Pemisahan Steroid Alga Merah (<i>Eucheuma cottonii</i>).....	12
2.3.1 Ekstraksi Maserasi	12
2.3.2 Hidrolisis	14
2.3.3 Partisi.....	17
2.3.4 Kromatografi Kolom	18
2.3.5 Kromatografi Lapis Tipis pada Monitoring Senyawa Aktif.....	23
2.4 Uji Fitokimia	25
2.5 Uji Toksisitas.....	26
2.6 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan Spektroskopi FTIR	29
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan.....	32
3.2 Alat dan Bahan	32
3.2.1 Alat	32
3.2.2 Bahan	32
3.3 Tahapan Penelitian	33
3.4 Cara Kerja	34
3.4.1 Preparasi Sampel	34
3.4.2 Analisis Kadar Air secara Thermogravimetri	34
3.4.3 Ekstraksi Maserasi <i>Eucheuma cottonii</i>	35
3.4.4 Hidrolisis dengan HCl 2N dan Partisi dengan n-Butanol	35

3.4.5 Uji Fitokimia Golongan Senyawa Steroid	36
3.4.6 Pemisahan Metode Kromatografi Kolom Basah	36
3.4.6.1 Pembuatan Bubur Silika.....	36
3.4.6.2 Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi n-Butanol dengan Kromatografi Kolom	37
3.4.7 Monitoring Hasil Isolat Steroid dengan KLTA	48
3.4.8 Uji Toksisitas Menggunakan Larva Udang <i>Artemia salina L.</i> ..	38
3.4.8.1 Penetesan Larva Udang	38
3.4.8.2 Uji Toksisitas.....	39
3.4.9 Identifikasi Menggunakan Spektroskopi FT-IR.....	39
3.5 Analisis Data	40
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Preparasi Sampel	41
4.2 Analisa Kadar Air	42
4.3 Ekstraksi	43
4.3.1 Ekstraksi Maserasi	43
4.3.2 Hidrolisis	45
4.3.3 Partisi Menggunakan n-Butanol	45
4.4 Uji Fitokimia	47
4.5 Isolasi Steroid dengan Kromatografi Kolom dan Monitoring dengan KLTA	49
4.6 Uji Toksisitas Golongan Senyawa Steroid Metode BSLT	53
4.7 Identifikasi Menggunakan FTIR	58
4.8 Pemanfaatan <i>Eucheuma cottonii</i> dalam Prespektif Islam	63
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	69
5.2 Saran	70
DAFTAR PUSTAKA	71
LAMPIRAN.....	80

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Alga Merah (<i>Eucheuma cottonii</i>).....	9
Gambar 2.2	Struktur dasar steroid	11
Gambar 2.3	Struktur β -sitosterol	12
Gambar 2.4	Dugaan reaksi hidrolisis ikatan <i>O</i> -glikosida dan penetralan	16
Gambar 2.5	Reaksi antara HCl dan natrium bikarbonat	16
Gambar 2.6	Struktur silika gel	21
Gambar 2.7	Spektrum FTIR steroid	30
Gambar 2.8	Spektrum FTIR steroid	31
Gambar 4.1	Hasil uji fitokimia steroid	48
Gambar 4.2	Ilustrasi hasil KLTA pengelompokan fraksi besar	51
Gambar 4.3	Kurva nilai LC ₅₀ fraksi n-butanol	55
Gambar 4.4	Kurva nilai LC ₅₀ isolat B.....	55
Gambar 4.5	Kurva nilai LC ₅₀ isolat D	56
Gambar 4.6	Serapan hasil identifikasi FTIR isolat B	59
Gambar 4.7	Serapan hasil identifikasi FTIR isolat D	59

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi nilai nutrisi <i>Eucheuma cottonii</i>	10
Tabel 2.2 Konstanta dielektrik, titik didih dan tingkat kelarutan pelarut.....	13
Tabel 2.3 Potensi senyawa dengan nilai toksisitas	27
Tabel 4.1 Hasil analisa kadar air	43
Tabel 4.2 Hasil skrining fitokimia fraksi n-butanol <i>Eucheuma cottonii</i>	48
Tabel 4.3 Hasil monitoring dengan KLTA	51
Tabel 4.4 Nilai mortalitas dan nilai LC ₅₀ <i>Eucheuma cottonii</i>	56
Tabel 4.5 Interpretasi spektra FTIR isolat B dan D	60



DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 2.1 Perhitungan HETP	19
Persamaan 2.2 Perhitungan harga R_f	24
Persamaan 3.1 Perhitungan kadar air	34
Persamaan 3.2 Perhitungan faktor koreksi	34
Persamaan 3.3 Perhitungan rendemen	35
Persamaan 3.4 Perhitungan % mortalitas	39



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian	80
Lampiran 2 Diagram Alir	81
Lampiran 3 Perhitungan Pembuatan Larutan dan Reagen.....	87
Lampiran 4 Data Pengamatan dan Perhitungan Hasil Penelitian	91
Lampiran 5 Dokumentasi Penelitian	102
Lampiran 7 Spektra FTIR	109



ABSTRAK

Fatimah, Fitri. 2020. **Uji Toksisitas Senyawa Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi n-butanol Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma cottonii* Dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi. Seminar Hasil.** Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Oki Bagas Prasetyo, M. Si.

Kata kunci : *Eucheuma cottonii*, Steroid, Kromatografi Kolom, BSLT, FTIR

Alga merah *Eucheuma cottonii* mengandung senyawa metabolit sekunder yang bermanfaat sebagai antioksidan dan bersifat toksik. Golongan senyawa yang bersifat toksik salah satunya adalah steroid. Penelitian ini bertujuan untuk menguji toksisitas isolat senyawa steroid hasil kromatografi kolom basah dengan metode elusi gradien. *Eucheuma cottonii* dikering anginkan dan dihaluskan 90 mesh, kemudian di ekstraksi maserasi menggunakan metanol. Hasil ekstrak dihidrolisis menggunakan HCl 2N dan difraksinasi menggunakan n-butanol. Hasil fraksi dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom basah dengan campuran pelarut n-heksana:etil asetat (95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25 dan 70:30) dengan kecepatan laju alir 2 mL/menit hingga dihasilkan 272 vial. Selanjutnya dimonitoring menggunakan KLTA dengan pelarut n-heksana:etil asetat (17:3). Hasilnya diperoleh 10 fraksi besar dengan 2 isolat steroid menunjukkan warna hijau (B) dan biru (D) pada lampu UV 366. Isolat B dan D dilakukan uji toksisitas pada larva udang *Artemia salina* L menggunakan metode BSLT dengan konsentrasi 1,2,3,4 dan 5 ppm. Untuk mengetahui nilai LC₅₀, dilakukan analisis probit uji toksisitas menggunakan MINITAB17 dan dilihat berdasarkan kematian larva udang. Nilai LC₅₀ isolat B adalah 10,37 ppm dan isolat D adalah 7,55 ppm. Hasil isolat diidentifikasi menggunakan spektroskopi FTIR menghasilkan serapan gugus OH, C_{SP}³-H, C_{SP}²-H, -CH₂-, C=C, C-C dan CH(CH₃)₂ atau geminal dimetil.

ABSTRACT

Fatimah, Fitri. 2020. **Toxicity Test of Steroid Compound in Column Chromatography n-butanol Fraction Methanol Extract from Red Algae *Euclima cottonii* Wongsorejo Banyuwangi Waters.** *Results Seminar*. Chemistry Department, Science and Technology Faculty, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Supervisor II: Oki Bagas Prasetyo, M. Si.

Keywords : *Euclima cottonii*, Steroids, Column Chromatography, BSLT, FTIR

Red algae *Euclima cottonii* contain secondary metabolite compound that is beneficial as an antioxidant and toxic. one of the red algae that is toxic is steroids. the purpose of this research is steroid toxicity test using column chromatography with gradient elution method. *Euclima cottonii* dredged and smoothed 90 mesh, then in maceration extraction using methanol, then hydrolyzed using HCl 2N and fractionation using n-butanol. Fractional results are split with column chromatography with n-hexane:ethyl acetate solvent (95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25 and 70:30) with a flow rate of 2 mL/minute until 272 vials are generated. Furthermore, it is monitored using analytic thin layer chromatography (ATLC) with n-hexane:ethyl acetate solvent (17:3) produces 10 large fractions with 2 steroid isolates showing green (B) and blue (D) colors on UV 366 lights. Steroid isolates performed toxicity tests on shrimp larvae *Artemia salina* L using BSLT methods with concentrations of 1,2,3,4 and 5 ppm. To find out the value of LC₅₀, a probit analysis of toxicity tests with MINITAB17 was conducted based on the death of shrimp larvae. The value of LC₅₀ isolate B is 10.37 ppm and isolate D is 7.55 ppm. Isolate results identified using FTIR spectroscopy and results in the absorption of OH, C_{sp}³-H, C_{sp}²-H, -CH₂-, C=C, C-C and CH(CH₃)₂ clusters or dimethyl geminals.

مستخلص البحث

فاطمة ، فطر. (٢٠٢٠). اختبار السمية لمركبات الستيرويد من كروماتوجرافيا العمود لجزء ن بوتانول مستخلص ميثانول الطحالب الحمراء (*Eucheuma cottonii*) من مياه وونكسوريجو بانويانجي. نتائج الندوة. البحث العلمي. قسم الكيمياء ، كلية العلوم و التكنولوجيا ، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: أ. غنائم فاشا الماجستير؛ المشرف الثاني: أوكي باكاس فراستيو الماجستير.

الكلمات المفتاحية: الطحالب الحمراء (*Eucheuma cottonii*) ، الستيرويد ، العمود اللوني ، اختبار قاتلة الجمبري البحري (BSLT)، فوربييه تحويل الأشعة تحت الحمراء (FTIR)

الطحالب الحمراء (*Eucheuma cottonii*) يحتوي عن مركب مستقلب ثانوي مفيد كمضاد للأكسدة وسام. الستيرويدات هي إحدى فئات المركبات السامة. تهدف هذه الدراسة إلى اختبار سمية عزلات مركب الستيرويد من كروماتوجرافيا العمود الرطب باستخدام طريقة التصفية المتدرجة. تم تجفيف الطحالب الحمراء (*Eucheuma cottonii*) وطحن ٩٠ شبكة ، ثم استخلاص منقوع باستخدام ميثانول. تم تحلل المستخلص باستخدام HCl وتجزئته باستخدام ن بوتانول. تم فصل الكسر بواسطة كروماتوجرافيا العمود الرطب بمزيج مذيب من ن الهكسان: إيثيل الأسيتات (٩٥:٥ ، ٩٥:١٠ ، ٨٥:١٥ ، ٨٠:٢٠ ، ٧٥:٢٥ و ٧٠:٣٠) بمعدل تدفق ٢ مل/دقيقة. مما أدى إلى ٢٧٢ قارورة. ثم تمت مراقبته باستخدام طبقة رقيقة اللوني (TLC) مع ن الهكسان: إيثيل الأسيتات (١٧:٣) كمذيب. تم الحصول على ١٠ كسور كبيرة مع عزلتين من الستيرويد النقي يظهر اللون الأخضر (B) والأزرق (D) على مصباح الأشعة فوق البنفسجية ٣٦٦.

تم اختبار عزلات الستيرويد النقية من أجل السمية على يرقات الجمبري أرتيميا ساليينا ل (*Artemia salina* L) باستخدام طريقة اختبار قاتلة الجمبري البحري (BSLT) بتركيز ١ ، ٢ ، ٣ ، ٤ ، ٥ جزء في المليون. لتحديد قيمة LC₅₀ ، تم إجراء تحليل اختبار السمية بناءً على نفوق يرقات الجمبري مع MINITAB ١٧. كانت قيمة LC₅₀ للعزل B ١٥,٣٧ جزء في المليون والعزل D ٧,٥٥ جزء في المليون. تم تحديد نتائج العزلات باستخدام موجات أدى التعرف على العزلات B و D باستخدام فوربييه تحويل الأشعة تحت الحمراء (FTIR) إلى امتصاص مجموعات OH ، C_{SP}³-H ، C_{SP}²-H ، -CH₂ ، C=C ، C-C و CH(CH₃)₂ أو ثنائي ميثيل.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara dengan keanekaragaman hayati laut terbesar di dunia yang memiliki total luas perairan nusantara 2,8 juta Km² yaitu 17.504 pulau dan garis pantai lebih dari 81.000 Km. Laut beserta kawasan pesisir Indonesia seperti Banyuwangi, Lombok dan lainnya memiliki manfaat dan potensi ekonomi yang sangat besar (Kusumastanto, 2011). Tidak perlu diragukan lagi bahwa laut nusantara menyimpan mega potensi sumber daya alam yang tidak ternilai harganya yang merupakan suatu tanda kekuasaan Allah Swt. Dalam al Quran disebutkan tentang potensi pemanfaatan kelautan, salah satunya terdapat dalam surat an Nahl ayat 14 :

وَهُوَ الَّذِي سَخَّرَ الْبَحْرَ لِتَأْكُلُوا مِنْهُ لَحْمًا طَرِيًّا وَتَسْتَخْرِجُوا مِنْهُ حِلْيَةً تَلْبَسُونَهَا وَتَرَى الْفُلْكَ
مَوَاحٍ فِيهِ وَلِتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ وَلِعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ [النحل: ١٤]

Artinya: “Dan Dialah, Allah yang menundukkan lautan (untukmu), agar kamu dapat memakan daripadanya daging yang segar, dan kamu mengeluarkan dari lautan itu perhiasan yang kamu pakai dan kamu melihat bahtera berlayar padanya, dan supaya kamu mencari (keuntungan) dari karunia-Nya, dan supaya kamu bersyukur” QS. An-Nahl (16) :14.

Lafadz *سَخَّرَ الْبَحْرَ* menjelaskan bahwa Allah Swt menurunkan kepada hambanya sumber daya alam laut yang banyak dimanfaatkan dan digunakan oleh hambanya (Asy-Syanqithi, 2007). Dalam ayat tersebut, Allah Swt memerintahkan untuk memakan (*لِتَأْكُلُوا*), mengeluarkan (*تَسْتَخْرِجُوا*), melihat (*تَرَى*) dan mencari (*لِتَبْتَغُوا*) agar manusia bisa mengambil manfaat sumber daya laut (Al-Qurtubi, 2008). Allah menciptakan segala sesuatu tidak ada yang sia-sia, termasuk juga

rumpun laut (alga merah) sebagai salah satu biota laut yang dijadikan sebagai obat tradisional.

Penggunaan biota laut sebagai obat tradisional dalam masyarakat harus dijamin keamanannya. Sebelum menjadi sediaan fitofarmaka, setiap bahan alam melewati beberapa tahapan seperti uji toksisitas. Toksisitas memiliki peranan penting untuk mengetahui resiko yang mungkin ditimbulkan dari suatu zat kimia. Penelitian Sharo, dkk. (2013) tentang uji toksisitas dan identifikasi senyawa ekstrak *Eucheuma cottonii* menyatakan bahwa salah satu senyawa yang dominan terdapat dalam alga jenis alga merah (*Rhodophyceae*) yaitu senyawa metabolit sekunder jenis steroid.

Alga merah jenis *Eucheuma cottonii* selain mengandung steroid, juga mengandung senyawa metabolit sekunder lainnya yaitu saponin, flavonoid, triterpenoid (Lutfiyanti, dkk., 2012), glikosida (Antonisamy dan Eahamban, 2012), dan florotanin (Varier, dkk., 2013). Penelitian yang dilakukan oleh Fasya, dkk., (2019) dan Anggraini (2018), menunjukkan bahwa terdapat berbagai jenis steroid mengandung stigmasterol, β -sitosterol, fukosterol, kolesterol dan desmosterol dari alga merah jenis *Eucheuma cottonii* dapat diperoleh dari perairan Wongsorejo Bayuwangi.

Senyawa steroid Alga merah *Eucheuma cottonii* dalam pemanfaatannya perlu dikaji kembali untuk mengisolasinya. Isolasi senyawa steroid diawali dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol (Hanapi, dkk., 2013). Metode maserasi menguntungkan proses isolasi, karena perendaman mampu memecah dinding sel dan membran sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel, sehingga senyawa metabolit sekunder dalam sitoplasma akan

terbawa keluar sel dengan pelarut organik (Atun, 2014). Saat proses maserasi dilakukan pengadukan agar tetap terjaga derajat perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dan larutan di luar sel (Lenny, 2006). Hafiz (2017) mengekstrak *Hydrilla verticillata* dengan variasi pelarut, diperoleh randemen tertinggi pada metanol 12,72%, dan randemen pada kloroform 4,96% dan n-heksana 3,80 %. Beberapa penelitian sebelumnya mengekstraksi *Eucheuma cottonii* menggunakan pelarut metanol diperoleh randemen sebesar 13,93% (Mardaneni, 2017), 15,587% (Fitri, 2017), 6,316% (Anggraini, 2018), 13,791% (Pramitania, 2019), 15,59% (Fasya, dkk., 2019) dan 11,86% (Madjid, 2020).

Ekstrak pekat hasil ekstraksi maserari dihidrolisis menggunakan HCl. Hidrolisis asam digunakan untuk memutus ikatan glikosida menjadi senyawa gula (glikon) dan aglikon (senyawa metabolit sekunder) (Andriani, dkk., 2015). Sebagaimana penelitian Khalaf, dkk. (2011) bahwa senyawa sterol dari salah satu jenis steroid ditemukan ditumbuhkan dalam keadaan berikatan dengan gula. Asih (2009) menyatakan untuk memisahkan glikon dan aglikon dilakukan hidrolisis menggunakan HCl 2N selama 2-3 jam. Selanjutnya dipartisi menggunakan pelarut n-butanol, untuk memisahkan glikon (hasil hidrolisis) dengan senyawa metabolit sekunder.

Proses partisi *Eucheuma cottonii* menggunakan n-butanol dilakukan oleh Rudiyanto (2013) dengan uji fitokimia diperoleh steroid lebih banyak dari pada flavonoid, triterpenoid, dan alkaloid. Khasanah, (2018) mengekstrak *Hydrilla Verticillata* menggunakan fraksi n-heksana, kloroform dan n-butanol menghasilkan rendemen n-heksana 90,66%, n-butanol 76,00%, dan kloroform 40,66%. Menurut konstanta dielektrik steroid akan jauh lebih terdistribusi pada

fase non polar yaitu n-heksana, tetapi pada kloroform dan n-butanol lebih terdistribusi pada fraksi n-butanol yang konstanta dielektriknya lebih besar dari kloroform. Ratnasari, (2017) melakukan ekstraksi partisi menggunakan n-butanol diperoleh rendemen sebesar 33,89%. Hasil ini lebih besar dibandingkan dengan hasil partisi menggunakan pelarut non polar pada n-heksana yaitu sebesar 6,03% (Ningsih, 2015), dan petroleum eter 9,25% (Fasya,dkk., 2019).

Fraksi hasil partisi masih berupa campuran, sehingga perlu dilakukan isolasi lebih lanjut. Salah satunya dengan kromatografi kolom cara basah, yang merupakan salah satu teknik pemisahan senyawa aktif dari sampel bahan alam (Atun, 2014). Fasya, dkk., (2019) mengisolasi senyawa steroid *Eucheuma cottonii* dengan kromatografi kolom menghasilkan 5 fraksi tunggal steroid. Sholikah, (2016) mengisolasi senyawa steroid *Eucheuma spinosum* dengan kromatografi kolom cara basah menghasilkan 5 fraksi tunggal steroid dan dengan cara kering menghasilkan 2 fraksi tunggal steroid. Handoko, (2016) mengisolasi senyawa steroid *Chlorella sp* menggunakan cara kering diperoleh 3 vial atau 7 mg steroid dan cara basah diperoleh lebih banyak yaitu sebanyak 5 vial atau 7,7 mg steroid. Kromatografi kolom basah ini menggunakan metode elusi gradien. Anggraini, (2018) mengisolasi senyawa steroid alga merah dan dengan metode elusi gradien, didapatkan 5 fraksi tunggal steroid dan 4 fraksi tunggal triterpenoid. Hasil ini jauh lebih banyak dibandingkan dengan metode isokratik yang dilakukan oleh Rahmawati, (2017) yang mengisolasi senyawa steroid alga merah dengan metode isokratik yaitu di peroleh 1 fraksi tunggal steroid dan 2 fraksi tunggal triterpenoid.

Hal yang berperan dalam keberhasilan kromatografi kolom adalah pemilihan adsorben, pemilihan pelarut dan pengemasan kolom (Kristanti, dkk.,

2008) adsorben (silika gel) mempengaruhi fase gerak yang mengalir dalam kolom. Semakin banyak silika gel yang digunakan akan memperluas waktu pemisahan yang terjadi (Chaudhari, et.al, 2012). Pengisian adsorben dilakukan dengan pencampuran silika dan fase geraknya (Kristanti, dkk., 2008). Sholikah (2016), mengisolasi senyawa steroid fraksi petroleum eter alga merah *Eucheuma spinosum* dengan pengisian adsorben pelarut silika dan fase gerak digunakan sebanyak 10 mg diperoleh 5 kelompok fraksi steroid.

Pemisahan senyawa aktif selain dipengaruhi oleh adsorben juga dipengaruhi perbandingan eluen (Saifudin, 2014), kecepatan laju alir (Wonorahardjo, 2013), variasi rasio sampel (Ratnasari, 2017), dan diameter kolom (Mubarokah, 2017). Fitri (2017) mengisolasi steroid dan triterpenoid *Eucheuma cottonii* menggunakan laju alir 1; 1,5; dan 2 mL/menit diperoleh hasil yang maksimal pada laju alir 2 mL/menit dengan dihasilkan 3 fraksi tunggal yaitu 2 triterpenoid dan 1 steroid. Tyas (2017) memvariasikan rasio sampel dan silika gel steroid *Eucheuma cottonii* 1:150, dan 1:100 diperoleh resolusi terbaik pada 1:150. Mubarokah (2017) memvariasikan diameter kolom steroid *Eucheuma cottonii* 1; 1,5 dan 2 cm diperoleh diameter terbaik 1 cm. maka pada penelitian ini menggunakan metode elusi gradien dengan laju alir 2 mL/menit, rasio sampel 1:150, dan diameter kolom 1 cm.

Fraksi-fraksi hasil pemisahan kromatografi kolom dimonitoring menggunakan KLT untuk melihat noda dengan R_f yang sama. Perbandingan komposisi eluen untuk monitoring menggunakan KLTA adalah 17:3 (n-heksana:etil asetat). Ratnasari (2017) mengisolasi senyawa steroid *Eucheuma cottonii* fraksi n-butanol dengan perbandingan n-heksana:etil asetat 14:6, 15:5,

16:4, 17:3, dan 18:2 diperoleh perbandingan terbaik pada 17:3 yang dihasilkan 8 noda tunggal yaitu 3 steroid dan 5 triterpenoid. Mulyani, dkk., (2013) menyatakan fraksi yang memiliki noda dan nilai *R_f* yang sama pada KLT digabung dan diuapkan pelarutnya sehingga didapatkan fraksi yang lebih sederhana. Hasil monitoring dengan KLTA dilihat profil pemisahan komponennya pada plat KLT menggunakan lampu UV 254 dan 366 nm.

Fraksi n-butanol hasil kromatografi kolom isolat steroid yang diperoleh akan dilakukan uji toksisitas dengan menggunakan metode BSLT untuk pengujian senyawa secara umum yang dapat mendeteksi beberapa bioaktivitas dalam suatu ekstrak. Pengujian dengan metode tersebut merupakan pengujian toksisitas yang cepat, aman, praktis, dan ekonomis untuk skrining, fraksinasi, dan penentuan bioaktivitas senyawa bahan alam yang nilai toksisitasnya dinyatakan dengan nilai *LC₅₀* (Aras, 2013). Afif, dkk., (2016) mengekstrak alga merah *Eucheuma cottonii* menggunakan beberapa pelarut. Fraksi n-butanol memiliki nilai toksisitas tertinggi dibandingkan dengan pelarut petroleum eter dan pelarut n-heksana. Nilai *LC₅₀* yang diperoleh yaitu n-butanol 70,32 ppm; petroleum eter 195,3 ppm; dan n-heksana 635,0 ppm.

Selanjutnya fraksi isolat hasil kromatografi kolom dilakukan identifikasi menggunakan spektroskopi FTIR untuk mengidentifikasi golongan senyawa steroid yang terdapat pada alga merah *Eucheuma cottonii*. Berdasarkan uraian yang telah dijelaskan diatas, maka perlu dilakukan isolasi senyawa steroid pada alga merah *Eucheuma cottonii* dari perairan laut terbuka yang memiliki potensi sumber daya laut yang besar salah satunya adalah perairan Wongsorejo Banyuwangi dengan menggunakan sampel serbuk kering alga merah *Eucheuma*

cottonii dengan tahapan ekstraksi, hidrolisis dan partisi, selanjutnya dilakukan pemisahan menggunakan kromatografi kolom basah metode elusi gradien, dan hasil isolat dilakukan uji toksisitas dengan metode BSLT serta identifikasi menggunakan spektroskopi FTIR.

1.2 Rumusan Masalah

1. Berapakah jumlah isolat steroid hasil kromatografi kolom basah menggunakan metode elusi gradien dari hasil ekstrak metanol fraksi n-butanol alga merah *Eucheuma cottonii*?
2. Berapakah nilai LC_{50} dari uji toksisitas isolat steroid hasil pemisahan menggunakan kromatografi kolom alga merah *Eucheuma cottonii*?
3. Apakah identifikasi gugus fungsi dari pemisahan isolat menggunakan kromatografi kolom alga merah *Eucheuma cottonii* dari hasil identifikasi spektroskopi FTIR merupakan gugus fungsi isolat steroid?

1.3 Tujuan

1. Untuk mengetahui jumlah isolat steroid hasil kromatografi kolom basah menggunakan metode elusi gradien dari hasil ekstrak metanol fraksi n-butanol alga merah *Eucheuma cottonii*.
2. Untuk mengetahui nilai LC_{50} dari uji toksisitas isolat steroid hasil pemisahan menggunakan kromatografi kolom alga merah *Eucheuma cottonii*.
3. Untuk mengidentifikasi gugus fungsi dari pemisahan isolat menggunakan kromatografi kolom alga merah *Eucheuma cottonii* dari hasil identifikasi spektroskopi FTIR merupakan gugus fungsi isolat steroid.

1.4 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah alga merah *Eucheuma cottonii* yang berasal dari pantai Wongsorejo, Banyuwangi.
2. Metode yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut metanol dilanjutkan hidrolisis dengan katalis asam yaitu HCl 2N dan partisi menggunakan pelarut n-butanol.
3. Uji golongan senyawa steroid menggunakan pereaksi *Liemberman burchard*.
4. Pemisahan steroid *Eucheuma cottonii* menggunakan kromatografi kolom basah dengan menggunakan metode elusi gradien dengan diameter kolom 1 cm, perbandingan rasio sampel 1:150, laju alir 2 mL/menit, dan perbandingan eluen 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25 dan 70:30.
5. Monitoring dengan KLTA menggunakan perbandingan eluen n-heksana:etil asetat 17:3.
6. Uji toksisitas menggunakan metode BSLT dengan menghitung nilai LC₅₀.
7. Identifikasi senyawa steroid menggunakan FT-IR.

1.5 Manfaat

Hasil riset ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat mengenai pemanfaatan tanaman alga merah *Eucheuma cottonii* sebagai alternatif dalam rangka pemberdayaan atau usaha pembuatan obat-obatan, sehingga mempermudah pengkajian lebih lanjut tentang aktifitas dan pemanfaatan senyawa steroid dalam berbagai bidang, terutama bidang industri dan kesehatan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga merah (*Eucheuma cottonii*)

Alga merah merupakan salah satu jenis tumbuhan tingkat rendah, memiliki *thallus* berwarna kuning kecoklatan hingga merah keungu-unguan, bentuk pipih, dan cabang tidak beraturan sebanyak dua buah (*dichotome*) atau tiga buah (*trichotome*) (Hidayat, 2006). Secara morfologis alga merah memiliki duri-duri yang tumbuh berderet melingkari *thallus* dengan interval yang bervariasi sehingga terbentuk ruas-ruas *thallus* diantara lingkaran duri. Taksonomi alga merah *Eucheuma cottonii* diklasifikasikan sebagai berikut (Anggadiredja, dkk., 2006) :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Rhodophyta
Kelas	: Rhodophyceae
Ordo	: Gigartinales
Family	: Solieracea
Genus	: <i>Eucheuma</i>
Species	: <i>Eucheuma cottonii</i> (<i>Kappaphycus alvarezii</i>)



Gambar 2.1 Alga Merah (*Eucheuma cottonii*)

Alga merah *Eucheuma cottonii* memerlukan sinar matahari untuk proses fotosintesis. Umumnya alga merah hidup pada lapisan fotik, yaitu kedalaman sejauh sinar matahari yang masih mampu mencapainya. Alga merah tumbuh

direrataan terumbu karang dangkal hingga kedalaman 6 meter, yang melekat ke substrat dengan alat perekat berupa cakram, cabang pertama dan kedua tumbuh dengan membentuk alga yang rimbun dengan ciri khusus mengarah ke arah datangnya sinar matahari. Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan jenis ini yaitu cukup arus dengan salinitas yang stabil yaitu 28-34 (Anggadiredja, dkk., 2006).

Kandungan gizi alga merah *Euclima cottonii* dalam rumput laut dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah musim, habitat, dan jenis rumput laut (Chapman and Chapman, 1980) dalam (Dirahmi, dkk., 2011). Beberapa kandungan kimia pada *Euclima cottonii* disajikan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi nilai nutrisi alga merah *E. cottonii* (Yunizal, 2004)

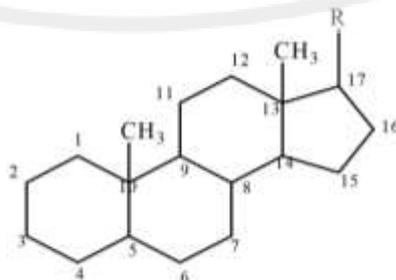
Komponen	Jumlah
Karbohidrat	57,52 %
Protein	3,46%
Lemak	0,93%
Air	14,96%
Abu	16,05%
Serat kasar	7,08%
Mineral Ca	22,39 ppm
Mineral Fe	0,121 ppm
Mineral Cu	2,763 ppm
Riboflavin	2,7 mg/100 g
Vitamin C	12 mg/100 mg
Karagenan	61,51 %

Penelitian yang dilakukan oleh Rudiyanto (2013), menunjukkan bahwa alga merah *Euclima cottonii* menunjukkan adanya beberapa golongan metabolit

sekunder seperti golongan senyawa flavonoid, triterpenoid, steroid dan alkaloid. Sharo, dkk., (2013) menyatakan bahwa senyawa dominan pada alga merah *Eucheuma cottonii* adalah senyawa golongan steroid.

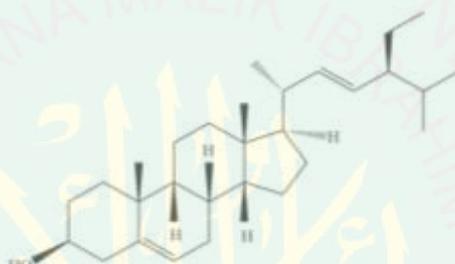
2.2 Senyawa Steroid

Senyawa steroid merupakan salah satu senyawa aktif yang terdapat dalam alga merah *Eucheuma cottonii*. Steroid adalah salah satu golongan senyawa triterpenoid yang mengandung inti siklopentana perhidrofenantren yaitu dari tiga cincin sikloheksana dan sebuah cincin siklopentana. Tiga senyawa yang biasa disebut fitosterol terdapat pada hampir setiap tumbuhan tinggi yaitu sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol (Harbone, 1987; Robinson, 1995). Steroid tersusun dari isopren-isopren dari rantai panjang hidrokarbon yang menyebabkan sifatnya non polar. Beberapa senyawa steroid mengandung gugus –OH yang sering disebut dengan sterol, sehingga membuat steroid sifatnya cenderung lebih polar. Steroid antara lain asam-asam empedu, hormon seks (androgen dan estrogen) dan hormon kortikosteroid (Robinson, 1995). Struktur senyawa steroid umumnya terdiri atas 17 atom karbon membentuk struktur dasar 1,2-siklopentenoperhidrofenantren seperti Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur dasar steroid (Lenny, 2006)

Anggraini (2018) melakukan identifikasi senyawa steroid pada fraksi etil asetat menggunakan kromatografi kolom alga merah *Eucheuma cottonii* dari pantai Wongsorejo Banyuwangi. Identifikasi dilakukan menggunakan UV-Vis, FT-IR dan LC-MS/MS menunjukkan senyawa steroid yang berhasil diidentifikasi adalah stigmasterol, β -sitosterol, kampesterol, dan kolesterol. Hasil terbanyak yang diperoleh yaitu β -sitosterol. Adapun struktur β -sitosterol ditampilkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Struktur β -sitosterol

2.3 Teknik Pemisahan Steroid Alga Merah (*Eucheuma cottonii*)

2.3.1 Ekstraksi Maserasi

Pemisahan senyawa aktif *Eucheuma cottonii* dapat dilakukan dengan ekstraksi menggunakan metode maserasi. Maserasi adalah proses perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada suhu ruang. Metode ini memiliki keuntungan pada isolasi bahan alam karena perendaman sampel dapat diatur waktu lama perendamannya. Selain itu, metode ini dapat menghindari faktor suhu yang dapat mengakibatkan terdegradasinya senyawa-senyawa metabolit sekunder pada suhu tinggi (Widodo, 2007). Kekurangan metode ini adalah waktu perendaman yang dibutuhkan cukup lama dan perendaman menggunakan pelarut

yang selalu baru sehingga membutuhkan volume pelarut cukup banyak (Kristanti, dkk., 2008). Proses maserasi menyebabkan terjadinya proses 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 berjalan hingga terjadi keseimbangan konsentrasi di dalam dan di luar sel (Pramana dan Saleh 2013).

Steroid bersifat nonpolar, namun steroid dialam berada dalam bentuk glikosida. maka ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut yang bersifat semi polar atau polar. Ekstraksi maserasi dapat menggunakan pelarut metanol. Membran sel dapat dilisiskan oleh metanol karena mampu menembus semua jaringan tumbuhan (Pramana dan Saleh 2013). Pelarut metanol memiliki titik didih yang rendah, sehingga mudah diuapkan pada suhu rendah namun bersifat toksik (Atun, 2014). Titik didih beberapa pelarut ditampilkan pada Tabel 2.2

Tabel 2.2 Konstanta dielektrik, titik didih dan tingkat kelarutan pelarut

Jenis pelarut	Konstanta dielektrik	Tingkat kelarutan	Titik didih (°C)
Heksana	1,9	Tidak larut	68,7
Petroleum eter	2,28	Tidak larut	60
Benzene	2,38	Tidak larut	80,1
Toluene	4,81	Tidak larut	111
Kloroform	4,81	Sedikit larut	61,3
Etil asetat	6,02	Sedikit larut	77,1
Metil asetat	6,68	Sedikit larut	57
Metil klorida	9,08	Sedikit larut	39,75
Butanol	15,80	Sedikit larut	117,2
Propanol	20,1	Larut	97,22
Aseton	20,70	Larut	56,2
Etanol	24,30	Larut	78,5
Metanol	33,60	Larut	64
Air	78,4	Larut	100

Pramana (2013) menyatakan, metanol dapat melisiskan membran sel tanaman dan memiliki partikel yang kecil sehingga mampu menembus semua jaringan tumbuhan untuk menarik semua senyawa aktif. Kutsiyah, (2012) mengekstrak alga merah *Eucheuma spinosum* menggunakan pelarut n-heksana dan metanol diperoleh randemen 0,88% dan 16,25%. Pramitania, (2019) mengekstrak *Eucheuma cottonii* menggunakan pelarut metanol dengan perbandingan 1:5, kemudian dilakukan shaker dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam sebanyak 3 kali pengulangan kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dan diperoleh randemen 13,7911%.

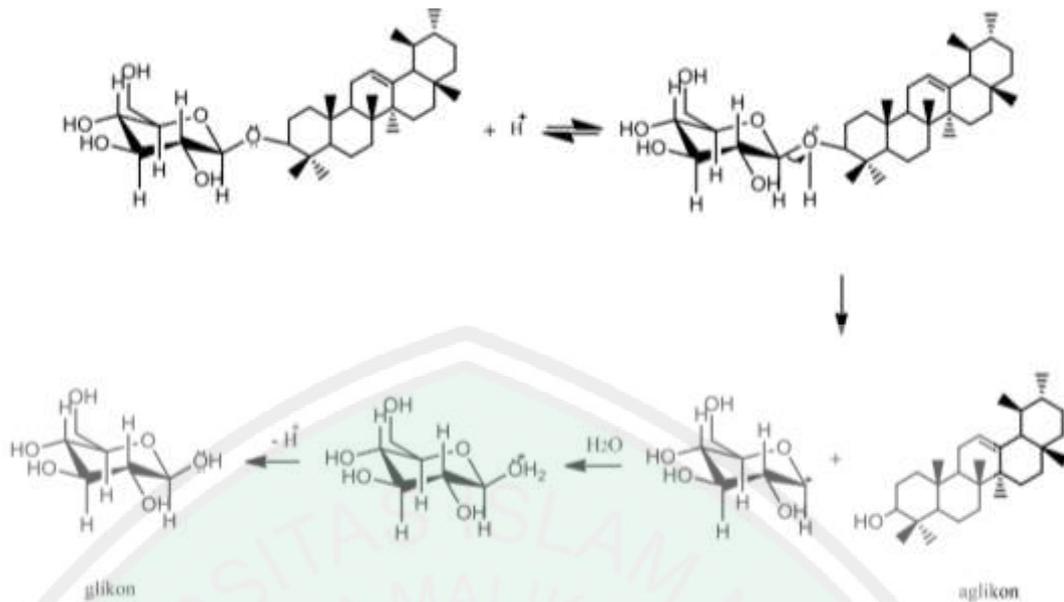
Pemekatan filtrat menggunakan *rotary evaporator*. Prinsipnya adalah penurunan tekanan pada labu alas bulat sehingga dapat menguap lebih cepat dibawah titik didihnya. Pelarut akan menguap menuju kondensor dan tertampung dalam labu alas bulat penampung sehingga terpisah dari ekstrak (Vogel, 1978). Setelah proses maserasi selanjutnya dilakukan proses pemutusan ikatan glikosida melalui proses hidrolisis.

2.3.2 Hidrolisis

Hidrolisis merupakan proses dekomposisi kimia yang terjadi dengan adanya pemutusan ikatan glikosida yang menjadi penghubung antar monomer melalui reaksi menggunakan air (H₂O) sehingga membentuk bagian-bagian yang lebih sederhana (Adhiatama, dkk., 2012). Tetapi, reaksi hidrolisis membutuhkan bantuan katalisator asam karena hidrolisis menggunakan air berlangsung secara lambat (Nihlati, dkk., 2008). Penambahan asam kuat pada reaksi hidrolisis akan mempengaruhi kekuatan asam dalam melepaskan proton tersebut, sehingga proton

akan membantu pemutusan ikatan glikosida yaitu pengikat antara glikon dan aglikon. Asam yang biasa digunakan adalah asam kuat seperti H_2SO_4 dan HCl . Namun HCl lebih menguntungkan dari pada H_2SO_4 karena sifatnya lebih reaktif, mudah dipisahkan dari produknya karena sifatnya mudah menguap (Wahyudi, dkk., 2011). Katalisator asam HCl akan membentuk garam yang tidak berbahaya yaitu $NaCl$ (Nihlati, dkk., 2008). Katalisator HCl juga memiliki sifat yang lebih asam, hal ini dilihat dari nilai pK_a HCl -8,00. Nilai ini lebih kecil dibandingkan dengan pK_a H_2SO_4 yaitu -3,00. Selain itu pada H_2SO_4 akan terdapat sisa H^+ pada proses hidrolisis yang tidak bereaksi sehingga menyebabkan glukosa yang dihasilkan lebih sedikit.

Hidrolisis asam menggunakan HCl 2N karena semakin besar konsentrasi asam maka akan semakin banyak kadar glukosa yang dihasilkan sehingga konsentrasi dapat optimal (Fchry, 2013). HCl 2N menghasilkan laju konsentrasi yang lebih besar yaitu sebesar ($0,036\text{ cm}^{-1}$) dari pada konsentrasi 1 N dengan laju konsentrasi sebesar ($0,052\text{ cm}^{-1}$). Artati, (2012) melakukan hidrolisis pada pelepah pisang menggunakan HCl dan H_2SO_4 pada konsentrasi yang sama yaitu 1; 1,5; 2; 2,5 dan 3N selama 2 jam menghasilkan nilai yang optimum pada HCl 2N dengan diperoleh berat glukosa 9 gram. Afif (2013) mengekstrak alga merah *Eucheuma cottonii* melalui proses hidrolisis diperoleh nilai LC_{50} 70,32 ppm. Hasil ini jauh lebih bersifat toksik dibandingkan dengan nilai toksisitas ekstrak metanol sebelum dilakukan hidrolisis yaitu diperoleh LC_{50} 194,40 ppm. Reaksi pemutusan ikatan *O*-glikosida dari senyawa metabolit sekunder dengan HCl ditunjukkan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Dugaan reaksi hidrolisis ikatan *O*-glikosida (Lawoko,dkk., 2009).

Setelah proses pemecahan ikatan glikosida atau reaksi hidrolisis terjadi, ekstrak selanjutnya perlu dilakukan penetralan hingga mencapai pH 7 untuk menghentikan reaksi hidrolisis yang bersifat dapat terjadi kembali (*reversible*). Jika tidak dihentikan, maka akan terbentuk kembali ikatan glikosida antara glikon dan aglikon. Penetralan dilakukan karena glikosida bersifat stabil pada kondisi netral. Maka, untuk menetralkan hidrolisis yang bersifat asam, digunakan larutan yang bersifat basa yaitu natrium bikarbonat (NaHCO_3). Larutan ini dipilih karena lebih aman daripada NaOH yang bersifat korosif (Ningsih, dkk., 2015). Reaksi penetralan ditunjukkan pada Gambar 2.5. Setelah proses hidrolisis selanjutnya perlu dilakukan proses pemisahan steroid dari glikon (gula) melalui proses ekstraksi partisi (fraksinasi).



Gambar 2.5 Reaksi antara HCl dan natrium bikarbonat (Mardaneni, 2017)

2.3.3 Partisi

Partisi didasarkan pada sifat kelarutan komponen target dan distribusinya dalam dua pelarut yang tidak saling campur yang membentuk dua fase. Kedua fase yang mengandung zat terdispersi, dikocok untuk memperluas area permukaan kontak antara kedua pelarut sehingga meratakan pendistribusiannya. Kemudian didiamkan hingga terpisah sempurna dan terbentuk dua lapisan fase cair. Komponen kimia akan terpisah ke dalam kedua fase tersebut sesuai dengan tingkat kepolarannya. Syarat pelarut untuk ekstraksi cair-cair adalah memiliki kepolaran yang sesuai dengan bahan yang diekstraksi dan harus terpisah secara pengocokan (Khopkar, 2007). Senyawa steroid dalam bentuk aglikon merupakan senyawa non polar, sehingga perlu dilakukan partisi menggunakan pelarut non polar. Salah satu pelarut yang dapat digunakan adalah n-butanol (Ratnasari, 2017).

Kelarutan suatu komponen tergantung pada derajat polaritas pelarut yang ditentukan oleh konstanta dielektrum yang ditampilkan pada Tabel 2.2. pelarut n-butanol bersifat semi polar yang mampu memisahkan senyawa dengan kepolaran yang sama dari hasil hidrolisis. Senyawa metabolit sekunder akan terdistribusi ke fase organik (n-butanol) sedangkan senyawa lain yang bersifat polar akan terdistribusi ke fase air. Karena berat jenis n-butanol adalah $0,81 \text{ g/cm}^3$ dan air adalah $0,98 \text{ g/cm}^3$ maka steroid yang berada pada fase organik atau pada pelarut maka terletak diatas karena berat jenisnya lebih kecil.

Setelah dilakukan pengocokan selanjutnya fase organik dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* untuk menguapkan pelarutnya. *rotary evaporator* mampu menguapkan pelarut dibawah titik didih sehingga zat yang

terkandung didalam pelarut tidak rusak oleh suhu yang tinggi. titik didih n-butanol adalah 117,2°C, maka digunakan *rotary evaporator* pada suhu 60-65°C pada tekanan 15-20 Psi dan pemekatan selanjutnya dialiri oleh gas nitrogen.

Ratnasari, (2017) melakukan isolasi *Eucheuma cottonii* menggunakan fraksi n-butanol diperoleh randemen 33,89%. Afif, dkk. (2015) menunjukkan bahwa pelarut terbaik untuk mengekstrak *Eucheuma cottonii* menggunakan partisi adalah n-butanol. Fraksi n-butanol memiliki nilai toksisitas 70,32 ppm, nilai ini jauh lebih tinggi dibandingkan dengan metanol, etil asetat, kloroform, petroleum eter dan n-heksana. Nilai LC₅₀ secara berturut-turut adalah 194,40; 143,43; 303,66; 195,28 dan 634,97 ppm. Pemisahan lebih lanjut perlu dilakukan untuk mendapatkan isolat yang lebih murni. Salah satu metode pemisahannya adalah dengan menggunakan kromatografi kolom.

2.3.4 Kromatografi Kolom

Isolasi senyawa steroid alga merah dapat menggunakan kromatografi kolom yang tergolong dalam pemisahan preparatif. Prinsip kromatografi kolom adalah suatu pemisahan yang didasarkan pada pemisahan daya adsorpsi suatu adsorben terhadap suatu senyawa (Sastrohamidjojo, 2005). Metode kromatografi kolom cara basah memiliki hasil pemisahan yang lebih baik dibandingkan menggunakan metode kromatografi kolom cara kering. Hal ini dibuktikan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Sholikah, (2016) yang mengisolasi senyawa steroid alga merah *Eucheuma spinosum* dengan cara basah dihasilkan 5 fraksi besar dan cara kering 2 fraksi besar. Handoko, (2016) mengisolasi senyawa steroid diperoleh hasil pemisahan cara kering 7 mg dan cara basah 7,7 mg.

Dua teori yang menjelaskan efisien kinerja dari kromatografi yaitu teori plate dan teori laju. Teori plat untuk mengukur efisien kolom dengan cara menentukan jumlah plat teoritis dalam kolom dengan menyatakan tinggi ekuivalen dari plat teoritis (HETP = *Height Equivalent to a Theoretical Plate*) semakin kecil nilai HETP maka semakin bagus kolomnya. Sesuai dengan persamaan 2.1 (Wonoraharjo, 2013) :

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu \dots\dots\dots(2.1)$$

Persamaan diatas menunjukkan A adalah difusi Eddy yang menyatakan ukuran dan keseragaman butiran fase diam. Faktor B difusi longitudinal yang berhubungan pada sepanjang kolom. Faktor C transfer massa dan μ adalah laju alir. Teori lainnya adalah teori kelajuan. Digambarkan dengan terjadinya gerakan random saat memasuki kolom dan terelusi hingga keluar dari kolom dalam keadaan terpisah dari komponen campurannya. Faktor yang mempengaruhi adalah jarak yang ditempuh oleh molekul sepanjang kolom, difusi analit dari kumpulannya ke konsentrasi yang lebih rendah, serta dinamika molekul dipermukaan fase diam, yang dapat terjadi dengan cepat namun belum tentu seimbang (Wonoraharjo, 2103).

Pemisahan pada kromatografi kolom dipengaruhi oleh ukuran kolom, ukuran partikel pada fase diam, komposisi fase gerak dan sebagainya (Kondeti, 2014). Pemilihan fase gerak bergantung pada kemampuan pelarut untuk menggerakkan suatu senyawa yang berhubungan dengan kekuatan elusi pelarut. Urutan kekuatan elusi beberapa pelarut air > metanol > etanol > aseton > etil

asetat > kloroform > dietil eter > metilen diklorida > benzena > toluena > karbon tetraklorida > heksana > petroleum eter (Atun, 2014).

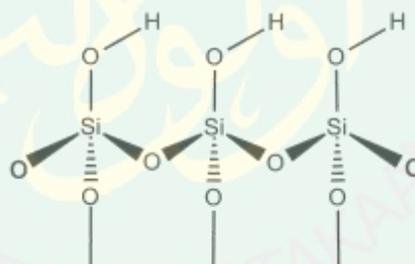
Penelitian ini menggunakan metode elusi gradien dengan eluen campuran dari n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, dan 70:30. Elusi gradien menggunakan fase gerak yang berubah-ubah sifat kepolarannya. Pemisahan dilakukan dari yang bersifat non polar ke pelarut yang polar. Menurut Gandjar dan Rohman, (2007) bahwa gradien eluen digunakan untuk meningkatkan resolusi campuran yang kompleks, terutama jika sampel memiliki kisaran polaritas yang luas. Variasi cenderung bersifat non polar dikarenakan senyawa steroid bersifat non polar. Senyawa non polar akan ikut dengan eluen sedangkan senyawa yang bersifat polar akan tertahan dalam kolom.

Silika gel adalah fase diam (adsorben) yang paling sering digunakan untuk pemisahan produk alam (Cannel, 1998). Banyaknya adsorben yang digunakan bergantung pada tingkat kesulitan pemisahan dari suatu senyawa dan jumlah sampel yang akan dipisahkan. Secara umum, tiap gram sampel yang dipisahkan membutuhkan adsorben 30–50 gram. Jika pemisahan yang dilakukan cukup sulit, jumlah adsorben yang dibutuhkan dapat mencapai 200 gram. Jumlah adsorben yang dibutuhkan akan lebih sedikit untuk pemisahan senyawa-senyawa yang perbedaan kepolarannya cukup besar (Kristanti, dkk., 2008).

Permukaan silika gel memiliki luas kurang lebih 500 m²/g dan mengandung gugus silanol. Gugus hidroksil ini merupakan pusat aktif dan berpotensi dapat membentuk ikatan hidrogen kuat dengan senyawa yang dipisahkan. Silika gel membentuk ikatan hidrogen terutama dengan donor H seperti alkohol, fenol, amina, amida, dan asam karboksilat (Palleros, 2000).

Semakin kuat kemampuan ikatan hidrogen suatu senyawa, semakin kuat akan tertahan oleh silika gel. Seberapa kuat senyawa tertahan dalam silika gel tergantung pada kepolaran fase gerak. Semakin kuat kemampuan ikatan hidrogen suatu solvent, semakin baik eluen untuk melulusi senyawa polar yang teradsorb pada kolom silika gel (Cannel, 1998). Kepolaran adsorben dalam kromatografi menurut Noviyanti, (2010) alumunium oksida (alumina) > florisisil (magnesium silikat) > asam silika (silica gel) > gula > selulosa.

Fase diam menggunakan silika gel G-60 (0,063-0,200 nm). Silica gel memberikan luas permukaan besar karena ukuran partikel silika gel yang kecil (Noviyanti, dkk., 2010). Tinggi silika gel yang biasa digunakan berkisar 15-20 cm (Atun, 2014). Struktur dasar silika gel ditampilkan pada Gambar 2.6 (Noviyanti, dkk., 2010).



Gambar 2.6 Struktur silika gel

Sampel yang dimasukkan ke dalam kolom yang berisikan fase diam, dialiri dengan fase gerak dengan sifat kepolarannya dari non polar menuju semi polar. Sampel yang bersifat non polar melewati fase diam dan sampel yang bersifat polar akan tertahan pada gugus hidroksil silanol. Semakin kuat ikatan hidrogen antara silika dengan senyawa yang akan dipisahkan, maka semakin kuat

akan tertahan pada fase diam atau silika. Sehingga kandungan senyawa non polar dapat dipisahkan dari kandungan senyawa polar pada sampel yang dipisahkan. Dimana sampel yang dipisahkan merupakan steroid yang bersifat non polar.

Pengisian adsorben dalam kolom dapat dilakukan dengan cara membuat campuran antara adsorben dengan eluen yang akan digunakan untuk elusi. Campuran dibuat dengan kekentalan tertentu agar dapat dituang dalam kolom. Adsorben ditambahkan pada pelarut sedikit demi sedikit agar tidak terjadi gumpalan dalam campuran. Selama proses pemasukan adsorben campuran, dinding kolom diketuk-ketuk agar lapisan yang terbentuk benar-benar mampat dan juga tidak terdapat gelembung. Kran bagian bawah dari kolom dibuka untuk mengeluarkan pelarut. Fase diam harus dijaga agar tidak kering dan selalu terendam eluen sehingga tidak terjadi retakan (Kristanti, dkk., 2008).

Kecepatan laju alir, ukuran kolom, elusi dan rasio sampel dengan silika gel mempengaruhi keberhasilan pemisahan dari metode kromatografi kolom (Wonorahardjo, 2013). Laju alir harus dapat dikontrol dan diatur dengan tepat dan cukup lambat sehingga senyawa selalu berada dalam keseimbangan fase diam dan fase gerak (Lisiyana, 2016). Laju alir yang terlalu cepat akan mengakibatkan pemisahan senyawa aktif pada kolom belum sempurna, karena kurangnya kontak antara senyawa yang akan dipisahkan dengan silika, sebaliknya apabila laju alir yang terlalu lambat menyebabkan senyawa akan berdifusi kedalam eluen dan akan menyebabkan penumpukan senyawa (Kristanti, dkk., 2008).

Hasil pemisahan menggunakan kromatografi kolom selanjutnya dimonitoring menggunakan KLTA. Keberhasilan pemisahan steroid pada KLTA ini didasarkan pada pemilihan fase gerak. Ratnasari (2017) menyatakan fase gerak

yang digunakan pada KLTA *Eucheuma cottonii* adalah n-heksana:etil asetat (17:3) yang menghasilkan 3 noda positif steroid.

2.3.5 Kromatografi Lapis Tipis pada Monitoring Senyawa Aktif

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan salah satu alat pemisahan dan alat uji senyawa kimia secara kualitatif dan kuantitatif (Stahl, 1985). Analisis kualitatif didasarkan pada nilai R_f , dimana suatu senyawa dapat dikatakan identik bila memiliki nilai R_f yang sama. Analisis kuantitatif dilakukan dengan mengukur luas spot dengan pengerokan secara langsung terhadap spot kemudian ditentukan kadar senyawa yang terdapat dalam spot dengan metode analisis (Gandjar dan Rohman, 2007).

Analisis KLT dilakukan untuk menentukan pelarut terbaik untuk kromatografi kolom, analisis fraksi hasil kolom, identifikasi senyawa, monitoring jalannya suatu reaksi kimia (Kristanti, dkk., 2008). Pengujian menggunakan KLT ini dilakukan untuk memonitoring hasil pemisahan kromatografi kolom serta identifikasi senyawa steroid dengan bantuan reagen *Lieberman burchard*. Eluat semprot menggunakan pereaksi *Lieberman burchard*, kemudian dilihat dibawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Warna hijau hingga biru menandakan isolat mengandung golongan senyawa steroid (Indrayani, dkk., 2006). Monitoring ini menggunakan plat KLT yang terdapat lapisan tipis diatasnya yaitu plat silika gel F_{254} ditambahkan *indicator fluoresensi* yang dapat membantu kenampakan bercak berwarna pada lapisan tersebut. Indikator fluoresensi merupakan senyawa yang dapat memancarkan sinar dengan lampu UV (Gritter, 1991).

Identifikasi senyawa yang telah terpisah dilakukan dengan menggunakan nilai *Retention factor* (*Rf*) sebagai dasar penggabungan isolat hasil kromatografi kolom yang memiliki nilai *Rf* sama dengan persamaan (Kusmiyati, dkk., 2011).

$$\text{harga } R_f = \frac{\text{jarak tempuh senyawa}}{\text{jarak tempuh pelarut}} \dots\dots\dots(2.2)$$

Teknik pemisahan KLT menggunakan prinsip distribusi suatu senyawa pada fase diam dan fase gerak yang didasarkan pada perbedaan kepolaran. Penelitian ini menggunakan pelarut n-heksana dan etil asetat sebagai fase gerak. Senyawa n-heksana bersifat non polar dan etil asetat bersifat semi polar. Namun n-heksana digunakan lebih banyak sehingga memberikan kontribusi yang lebih besar dan senyawa cenderung bersifat non polar. Senyawa steroid akan lebih terdistribusi pada eluen dibandingkan pada plat KLT yang bersifat polar (Ningsih, dkk., 2015).

Eluen yang digunakan pada monitoring KLTA ini adalah campuran n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 17:3. Mardaneni (2017) mengisolasi senyawa steroid *Eucheuma cottonii* pada fraksi etil asetat menggunakan variasi eluen n-heksana:etil asetat 18:2, 17:3, 16:4, 15:5, dan 14:6 menghasilkan pemisahan yang paling baik pada 17:3 dengan adanya 3 noda positif steroid. noda yang dihasilkan tidak berekor dan jarak antara spot satu dengan lainnya jelas.

Ratnasari (2017) menggunakan fase gerak n-heksana dan etil asetat untuk mengisolasi senyawa steroid pada *Eucheuma cottonii*. Hasil disemprot dengan pereaksi *Lieberman burchard* menunjukkan terbentuknya 8 noda terpisah.

Golongan senyawa steroid hasil KLT setelah disemprot dengan reagen *Lieberman burchard* ditunjukkan dengan terbentuknya cincin hijau kebiruan. Hasil tersebut dapat diasumsikan sebagai senyawa steroid.

2.4 Uji Fitokimia

Uji fitokimia pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui adanya senyawa steroid pada ekstrak hasil partisi menggunakan n-butanol dari alga merah *Eucheuma cottonii*. Berdasarkan penelitian Hanapi, dkk., (2013) uji fitokimia senyawa steroid dilakukan menggunakan pereaksi *Lieberman burchard* dengan komposisi kloroform, asam asetat anhidrida dan asam sulfat pekat pada dinding tabung reaksi. Uji fitokimia dilakukan dengan cara menambahkan reagen ke dalam hasil partisi. Prinsip dasar uji *Lieberman burchard* adalah senyawa steroid dapat mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat yang akan membentuk garam dengan memberikan sejumlah reaksi warna (Robinson, 1995). Hasil positif senyawa steroid memberikan perubahan warna hijau hingga biru (Zamroni, 2011). Senyawa steroid ketika direaksikan dengan reagen *Lieberman burchard* akan mengalami perpanjangan konjugasi sehingga terbentuk warna hijau kebiruan dan violet saat uji fitokimia.

Penelitian yang dilakukan Novadiana, dkk., (2014), melakukan uji fitokimia pada fraksi kloroform dari ekstrak metanol daun kerebau menggunakan pereaksi *Lieberman burchard* terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan senyawa positif steroid. Pramitania (2019) melakukan uji fitokimia senyawa steroid fraksi n-heksana alga merah (*Eucheuma cottonii*) dengan reagen *Lieberman burchard* menunjukkan hasil yang positif yaitu terbentuknya cincin berwarna hijau. Untuk

mendeteksi beberapa bioaktivitas senyawa steroid dalam suatu ekstrak maka perlu dilakukan pengujian dengan menggunakan uji toksisitas metode BSLT.

2.5 Uji Toksisitas

Uji toksisitas menggunakan larva udang *Artemina salina* L. atau disebut dengan uji BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Metode ini termasuk dalam skrining awal untuk menentukan sifat sitotoksik suatu ekstrak. Prinsip uji toksisitas adalah komponen bioaktif selalu bersifat toksik jika diberikan dengan dosis tinggi dan menjadi obat pada dosis rendah. Uji toksisitas bertujuan untuk memaparkan adanya efek toksik atau menilai batas keamanan dalam kaitannya menggunakan suatu senyawa. Metode BSLT digunakan sebagai *bioassay-guided fractionation* dari bahan alam, karena mudah, cepat, murah, dan cukup *reproducible*. Penggunaan larva *Artemia salina* L. adalah cara yang paling efektif dan sederhana karena ketersediaan telur udang yang mudah menetas, pertumbuhan cepat, dan relatif mudah dalam pengaturan populasi pada kondisi laboratorium. Larva udang dapat menerima segala jenis zat dan bahan tanpa seleksi dahulu (McLaughlin, 1991 dan Meyer, dkk., 1982).

Bioaktivitas yang dapat dideteksi dari skrining awal dengan metode BLST diantaranya adalah antikanker, antimikroba, antitumor, antimalaria, *immunosuppressive*, *antifeedant* dan residu pestisida (Colegate dan Molyneux, 2007). Toksik atau racun adalah zat yang berbahaya bagi kehidupan organisme karena efeknya dapat merusak jaringan, organ, atau proses biologis didalam tubuh. Paparan toksik dapat melalui kulit, pernafasan dan pencernaan. Beberapa senyawa membutuhkan dosis yang cukup tinggi namun ada pula beberapa

senyawa yang membutuhkan dosis rendah sudah dapat menjadi racun bagi organisme. Dosis ini dapat diketahui melalui nilai dari LC_{50} (konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% larva).

Apabila harga dari $LC_{50} < 1000$ ppm maka dikatakan toksik, dan sebaliknya apabila harga dari $LC_{50} > 1000$ ppm maka dikatakan tidak toksik (Meyer, dkk., 1982). Lisdawati (2002) menunjukkan semakin kecil nilai LC_{50} yang dimiliki ekstrak tanaman maka semakin berpotensi untuk memiliki aktifitas biologi atau efek farmakologi. (Meyer, et.al., 1982) dalam Wawan (2003) menyatakan bahwa Suatu senyawa dikatakan bersifat sangat toksik apabila memiliki nilai $LC_{50} < 30$ ppm. Pembagian nilai LC_{50} untuk ekstrak atau senyawa murni yang berpotensi sebagai senyawa bioaktif ditampilkan dalam Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Potensi senyawa dengan nilai toksisitas dengan metode BSLT menggunakan larva udang *Artemia salina L.*

LC_{50} (ppm)	Potensi
< 30	Anti tumor atau anti kanker
30-200	Anti mikroba
> 200 – < 1000	Pestisida

Analisis data menggunakan metode BSLT dilakukan dengan analisis probit untuk menghitung LC_{50} (*Probability Unit*). Analisis regresi probit ini digunakan untuk menguji daya racun suatu jenis pestisida terhadap hama atau penyakit, sehingga akan bermanfaat untuk menentukan tingkat dosis terhadap persentase kematian hama yang diinginkan (Lenny, 2006). Senyawa metabolit sekunder dalam larva udang *Artemia salina L.* akan bersifat toksik dengan cara

menghambat kinerja enzim seperti DNA-*dependent RNA polymerase* dan Na^+/K^+ *ATPase* sehingga merusak proses biologis didalam tubuh larva udang. DNA-*dependent RNA polymerase* berperan dalam sintesis protein. RNA *polymerase* akan berikatan dengan DNA pada tahap transkripsi didalam nukleus dimana DNA berperan sebagai cetakan dalam pembuatan nukleotida RNA yang baru. Jenis molekul RNA yang dimaksud adalah RNA messenger (mRNA) yang akan membawa pesan genetika dari DNA kebagian-bagian pensintesis protein dari sel tersebut. pesan genetik yang dibawa oleh mRNA akan diterjemahkan oleh tRNA pada tahap translasi didalam sitoplasma, tRNA juga akan mentransfer asam amino dari sitoplasma menuju ribosom (Campbell, Reece, and Mitchell, 2002). Tiap molekul tRNA akan menghubungkan kodon mRNA tertentu dengan asam amino spesifik tersebut akan dibawa ke ujung rantai polipeptida yang sedang tumbuh di ribosom. Polipeptida akan dihubungkan dengan asam amino oleh ikatan peptida, rRNA berguna mengkatalisis proses pembentukan ikatan peptide. Selama proses ini rantai polipeptida menggulung dan melipat secara spontan membentuk protein fungsional dengan spesifik (Corwin, 1996)

Na^+/K^+ *ATPase* berperan transport ion, ditemukan dalam semua bagian tubuh manusia. Na^+/K^+ *ATPase* mengkatalisis hidrolisis ATP ke ADP serta menggunakan tenaga untuk mengeluarkan 3 Na^+ dari sel dan mengambil 2 K^+ kedalam tiap sel bagi tiap mol ATP yang dihidrolisis, aktivitas Na^+/K^+ *ATPase* dihambat oleh ouabain (Ganong, 1995). Apabila enzim tersebut dihambat, maka ion Na^+ tidak dapat keluar dari sel sehingga akan menyebabkan protein membran integral mengembung dan pecah (Budagara, et.al., 2016). Pompa Na^+ dan K^+ bila tidak ada maka Cl^- dan Na^+ akan memasuki sel menuruni perbedaan

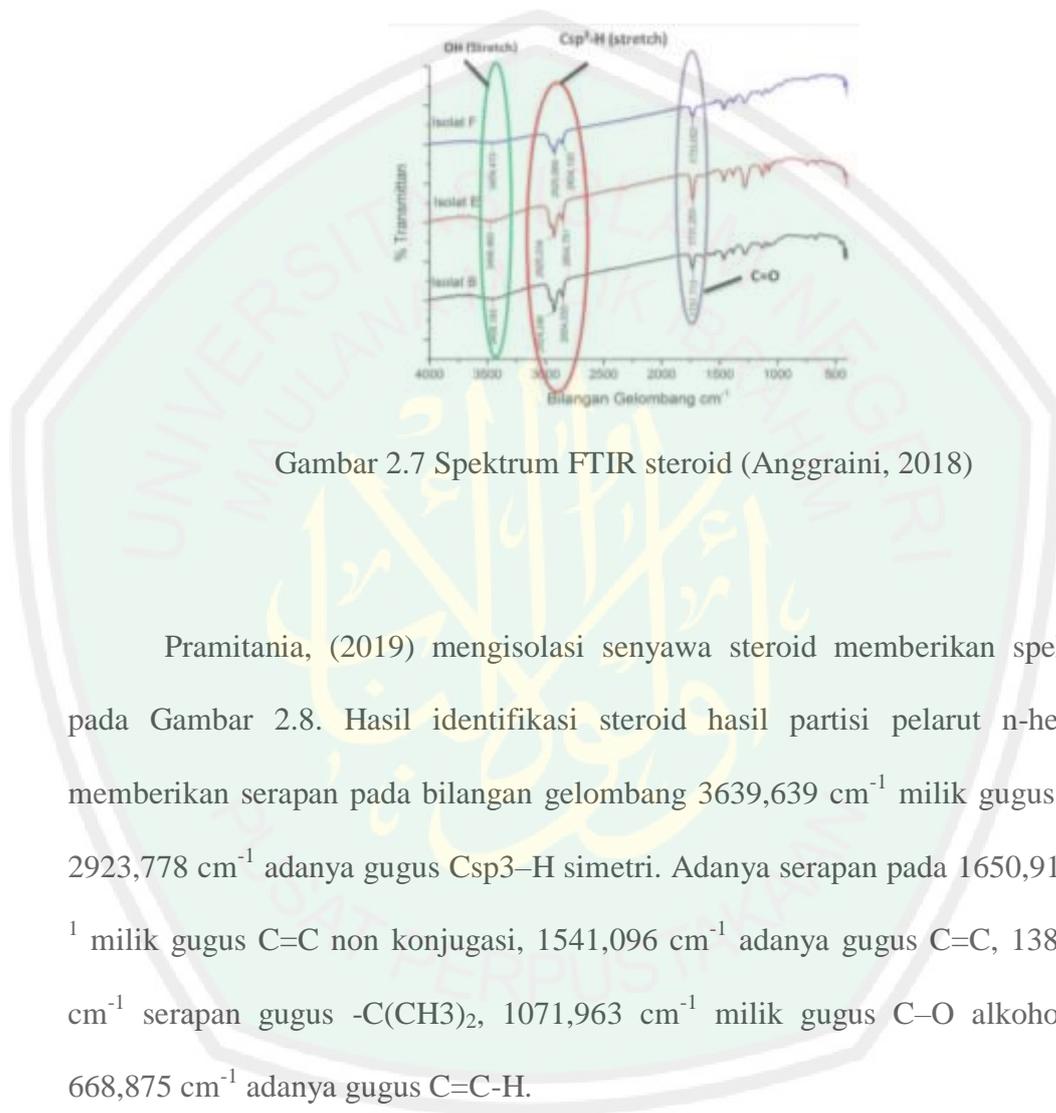
konsentrasinya, serta air akan mengikuti sepanjang perbedaan osmotik yang diciptakan sehingga menyebabkan sel membengkak (Ganong, 1995). Sel yang membengkak selanjutnya bisa mengalami lisis sehingga sel tersebut mati.

Jannah (2014) melakukan uji toksisitas ekstrak n-heksana alga coklat *Sargassum vulgare* menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 143,4 ppm. Anggraini (2018) melakukan uji toksisitas hasil kromatografi kolom pada fraksi etil asetat makroalga *Eucheuma spinosum* menggunakan metode BSLT menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 4,853; 5,294; dan 5,138 ppm pada masing-masing isolat 1, 2 dan 3. Afif (2015) melakukan uji toksisitas ekstrak kasar makroalga *Eucheuma cottoni* menggunakan pelarut fraksi n-butanol, n-heksana, dan petroleum eter secara berturut-turut didapatkan nilai LC_{50} sebesar 70,32; 635,0; dan 195,3 ppm.

2.6 Analisa Senyawa Steroid Menggunakan Spektroskopi FTIR

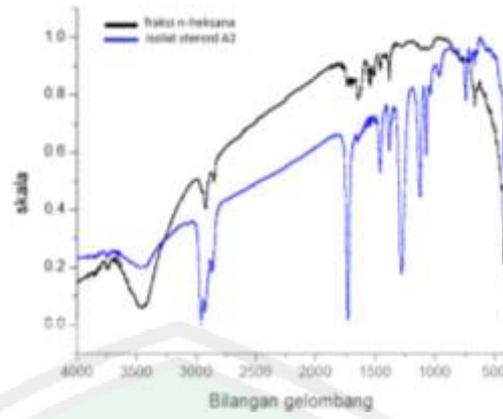
Spektroskopi infra merah merupakan instrumen untuk identifikasi suatu senyawa berdasarkan serapan yang ditimbulkan oleh vibrasi molekul. Vibrasi molekul akan memberikan *peak* pada bilangan gelombang dan intensitas tertentu pada setiap gugus molekulnya. Besarnya bilangan yang dihasilkan bernilai sama dengan frekuensi yang dihasilkan (Panji, 2012). Daerah spektroskopi IR dibagi menjadi 3, yaitu IR dekat (antara 0,8-2,5 μm atau 12.500-4.000 cm^{-1}), IR tengah (antara 2,5-25 μm atau 4.000-400 cm^{-1}), dan IR jauh (antara 23-1.000 μm atau 40-10 cm^{-1}). Keuntungan dari FTIR adalah memiliki kepekaan tinggi sehingga resolusi yang akan dihasilkan tinggi dengan waktu yang cepat (Williams dan Fleming, 2008).

Anggraini (2018) melakukan isolasi senyawa steroid alga merah *Eucheuma cottonii*. Hasil memberikan spectrum pada Gambar 2.7. Hasil spectrum memberikan serapan khas gugus O-H stretching, Csp³-H stretching, dan C=O.



Gambar 2.7 Spektrum FTIR steroid (Anggraini, 2018)

Pramitania, (2019) mengisolasi senyawa steroid memberikan spektrum pada Gambar 2.8. Hasil identifikasi steroid hasil partisi pelarut n-heksana memberikan serapan pada bilangan gelombang 3639,639 cm⁻¹ milik gugus O-H, 2923,778 cm⁻¹ adanya gugus Csp³-H simetri. Adanya serapan pada 1650,914 cm⁻¹ milik gugus C=C non konjugasi, 1541,096 cm⁻¹ adanya gugus C=C, 1384,310 cm⁻¹ serapan gugus -C(CH₃)₂, 1071,963 cm⁻¹ milik gugus C-O alkohol dan 668,875 cm⁻¹ adanya gugus C=C-H.



Gambar 2.8 Spektrum FTIR steroid (Pramitania, 2019)



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Edukasi Organik dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, pada bulan Januari 2020 – Agustus 2020.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain alat-alat gelas seperti *erlenmeyer* tutup 1000 mL, *erlenmeyer* vakum, batang pengaduk, gelas arloji, corong *buchner*, spatula, gelas ukur 250 mL, *beaker glass* 100 dan 250 mL, pipet ukur 5, 10 dan 25 mL, pipet volume 50 mL, corong pisah 50 mL, labu ukur 50 mL, kolom silika gel, *magnetic stirrer*, tabung reaksi, rak tabung, spatula, pipet tetes, *rotary evaporator vacuum*, timbangan analitik, desikator, gunting, pipa kapiler, inkubator shaker, statif, botol vial, lampu penerang, wadah penetasan larva udang, bejana pengembang, dan oven. Instrumentasi yang digunakan yaitu FT-IR merk Varian tipe FT-100.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Alga merah *Eucheuma cottonii* yang berasal dari pantai Wongsorejo Banyuwangi. Bagian yang

digunakan adalah seluruh bagian alga merah *Eucheuma cottonii*. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva udang *Artemia salina* L.

Bahan kimia yang digunakan meliputi metanol 99,9%, n-butanol 96%, HCl 2N, NaHCO₃ jenuh, aquades, etil asetat p.a, n-heksana 96%, kertas saring, kertas indikator pH, aluminium foil, larutan, reagen *Lieberman burchard* (asam asetat anhidrat, H₂SO₄ pekat, kloroform) dimetil sulfoksida (DMSO), ragi roti, air laut, plat silika gel G-60 (0,063-0,200 mm), *glass wool*, plat silika gel F₂₅₄, dan telur *Artemia salina* L.

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui tahapan berikut :

1. Preparasi sampel
2. Analisis kadar air secara Termogravimetri
3. Ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol
4. Hidrolisis dengan HCl 2N dan penetralan dengan NaHCO₃
5. Partisi dengan pelarut n-butanol
6. Uji Fitokimia fraksi n-butanol *Eucheuma cottonii*
7. Isolasi senyawa steroid menggunakan metode Kromatografi kolom cara basah dengan metode elusi gradien
8. Monitoring dengan KLTA
9. Uji toksisitas hasil isolat steroid menggunakan metode BSLT
10. Identifikasi senyawa steroid dengan spektroskopi FT-IR
11. Analisa data.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Preparasi Sampel

Eucheuma cottoni diambil dari permukaan air pantai Wongsorejo Banyuwangi dengan jarak antara permukaan dengan dasar air ± 2 meter. Diambil 19 Kg sampel, kemudian dikering-anginkan selama 7 hari. Sampel kering dihaluskan di Materia Medika Kota Batu dan diayak dengan ukuran ± 90 mesh.

3.4.2 Analisis Kadar Air secara Thermogravimetri (AOAC, 1984)

Cawan porselen dipanaskan dalam oven pada suhu 100-105°C selama 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya. Cawan disimpan dalam desikator selama 15 menit lalu ditimbang hingga berat konstan. Dimasukkan 1 gram serbuk *Eucheuma cottoni* ke dalam cawan porselen, kemudian dimasukkan dalam oven dan dikeringkan pada suhu 100-105°C selama ± 60 menit. Kemudian, sampel dimasukkan dalam desikator selama ± 15 menit dan ditimbang hingga berat konstan. Kadar air dalam *Eucheuma cottoni* dapat dihitung dengan menggunakan Persamaan 3.1. dan 3.2.

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

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

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

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

3.4.3 Ekstraksi Maserasi *Eucheuma cottonii* (Hafiz, 2017)

Ekstraksi komponen aktif dilakukan dengan ekstraksi maserasi atau perendaman sampel dengan pelarut metanol. Sebanyak 100 gram serbuk *Eucheuma Cottonii* halus ditambahkan metanol 500 mL, dan dilakukan pengocokan menggunakan *shaker* 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 dengan penyaringan menggunakan corong *buchner*. Ketiga filtrat digabung menjadi satu dan dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* pada suhu 50°C. Ekstrak pekat metanol yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemennya menggunakan Persamaan 3.3 (Luthfiyah, 2017) :

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

3.4.4 Hidrolisis dengan HCl 2N dan Partisi dengan n-Butanol (Pramitania, 2019)

Ekstrak pekat metanol alga merah *Eucheuma cottonii* sebanyak 5 gram ditempatkan dalam beaker glass dan ditambahkan 10 mL HCl 2 N perbandingan (1:2). Proses hidrolisis dilakukan selama 1 jam menggunakan magnetik stirer *hot*

plate pada suhu ruang. Hasil hidrolisis ditambahkan natrium bikarbonat jenuh (NaHCO_3) hingga pH netral. Selanjutnya dipartisi menggunakan n-butanol sebanyak 25 mL, dimasukkan corong pisah dikocok dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan organik dan lapisan air. Lapisan yang terbentuk kemudian dipisahkan dan dilakukan partisi kembali hingga 3 kali pengulangan dengan pelarut n-butanol. Lapisan organik dimasukkan dalam labu alas bulat dan dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum*. Selanjutnya dialiri dengan gas nitrogen. Hasil ekstrak pekat fraksi n-butanol ditimbang dan dihitung randemennya dengan Persamaan 3.3.

3.4.5 Uji Fitokimia Golongan Senyawa Steroid (Kristanti, dkk., 2008)

Uji fitokimia senyawa steroid dilakukan pada hasil ekstrak metanol dan fraksi n-butanol menggunakan pereaksi *Lieberman burchard*. Masing-masing sampel dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform dan 0,5 mL asam asetat anhidrat dan ditambahkan 1-2 mL H_2SO_4 pekat (melalui dinding tabung). Jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya golongan senyawa steroid.

3.4.6 Pemisahan Metode Kromatografi Kolom Basah

3.4.6.1 Pembuatan Bubur Silika (Fasa Diam pada Kromatografi Kolom)

Pemisahan senyawa steroid alga merah *Eucheuma cottonii* dilakukan dengan metode kromatografi kolom cara basah dengan metode elusi gradien. Fase diam menggunakan bubuk silika gel G-60 sebanyak 10 gram, yang sudah diaktivasi dalam oven selama 2 jam pada suhu $\pm 110^\circ \text{C}$. Silika gel didinginkan

dan dimasukkan dalam desikator selama ± 15 menit. Pembuatan bubuk silika dilakukan dengan cara silika gel dicampur dalam 20 mL pelarut n-heksana:etil asetat (95:5) dan dihomogenkan selama ± 1 jam menggunakan *magnetic stirrer* dan *hot plate* pada suhu ruang. Tahap persiapan, kolom mula-mula diisi *glass wool* pada bagian bawah kolom, kemudian bubuk silika dimasukkan dengan diketuk-ketuk atau di kocok hingga adsorben yang dihasilkan benar-benar mampat dan tidak terdapat gelembung udara yang dapat mempengaruhi proses elusi, kemudian didiamkan selama ± 24 jam dan dilihat kembali bubuk silika sudah dalam keadaan mampat dan siap digunakan (Kusmiyati, dkk., 2011).

3.4.6.2 Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi n-butanol dengan Kromatografi

Kolom

Hasil dari fraksi n-butanol alga merah *Eucheuma cottoni* 0,067 gram dilarutkan dalam 1 mL eluen n-heksana:etil asetat (95:5), fraksi n-butanol yang telah larut dimasukkan ke dalam kolom menggunakan pipet tetes dengan langsung tepat diatas bubuk silika yang telah di jenuhkan. Pemisahan senyawa fraksi n-butanol menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam berupa silika gel G-60, dengan diameter kolom 1 cm, dan panjang kolom 50 cm. Proses elusi dilakukan secara gradien dengan eluen yang digunakan perbandingan fase gerak n-heksana:etil asetat 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, dan 70:30. Kran dibuka dengan kecepatan alir diatur 2 mL/menit dan dilakukan elusi kemudian eluat ditampung setiap 2 mL dalam botol vial hingga didapatkan kurang lebih 270 vial. Proses elusi dilakukan dengan menjaga agar silika gel dalam kolom selalu terendam eluen.

3.4.7 Monitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) (Pramitania, 2019)

Hasil pemisahan kromatografi kolom dimonitoring senyawa steroidnya menggunakan KLTA. Plat silika gel F₂₅₄ yang berukuran 10x10 cm diaktivasi dalam oven pada suhu 110° C selama 30 menit. Penotolan dilakukan pada jarak ±1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler sebanyak 10 kali total secara berkala dengan pengeringan kemudian dielusi dengan fase gerak n-heksana:etil aasetat (17:3) (Ratnasari, 2017). Proses elusi dihentikan apabila fase gerak sudah mencapai garis batas atas, dan noda-noda pada permukaan plat hasil pemisahan dideteksi dengan menyemprotkan reagen *Liebermann burchard* dan diamati dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan panjang gelombang 366 nm dan dihitung *R_f*-nya. Kemudian di analisis terbentuknya warna hijau kebiruan yang menunjukkan adanya golongan senyawa steroid (Indrayani, dkk., 2006). Eluat yang memiliki harga *R_f* dan bercak yang sama dikumpulkan menjadi satu sebagai fraksi yang sama. Fraksi yang menunjukkan hasil positif steroid digabungkan.

3.4.8 Uji Toksisitas Menggunakan Larva Udang *Artemia salina L*

3.4.8.1 Penetasan Larva Udang (Sharo, 2013)

Sebanyak 250 mL air laut dimasukkan dalam wadah penetasan, dimasukkan 2,5 gram telur *Artemia salina Leach*, ditambahkan ragi roti 0,001 mg. Selanjutnya diaerasi dan diberi lampu. Telur menetas dalam waktu ± 24 jam dan siap digunakan sebagai target uji toksisitas pada umur 48 jam.

3.4.8.2 Uji Toksisitas (Pramitania, 2019)

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

Kontrol digunakan untuk pembandingan terhadap DMSO dan pelarut. Sehingga control dibuat dengan 3 variasi, yaitu tanpa penambahan sampel, dengan penambahan DMSO, dan dengan penambahan DMSO dan pelarut yang diperlakukan sama dengan sampel yang digunakan. Kemudian larutan control ditambahkan air laut hingga volumenya 10 mL, kemudian larva udang *Artemia salina* L sebanyak 10 ekor. Pengamatan dilakukan Selama 24 jam terhadap kematian larva udang kemudian dianalisa menggunakan analisa probit untuk menunjukkan nilai LC₅₀ dengan menghitung nilai % mortilitas larva udang.

$$\% \text{ mortilitas} = \left(\frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah larva yang diuji}} \right) \times 100 \% \dots\dots\dots(3.4)$$

3.4.9 Identifikasi Menggunakan Spektroskopi FT-IR.

Hasil isolat golongan senyawa steroid dicampur dengan pelet KBr perbandingan 2:98 kemudian digerus merata menggunakan *mortar agate*.

Campuran pelet KBr yang telah halus dipres dengan tekanan 80 torr (8-20 torr per satuan waktu) selama 10 menit hingga terbentuk pelet, kemudian isolat diidentifikasi menggunakan spektroskopi FTIR pada bilangan gelombang 4000 – 400 cm^{-1} .

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa isolat steroid yang telah dipisahkan menggunakan kromatografi kolom yang selanjutnya digunakan untuk uji toksisitas dengan hewan uji berupa larva udang *Artemia salina* L. Uji toksisitas menghasilkan data berupa angka kematian dari larva udang. Data yang didapat kemudian diolah untuk mendapatkan nilai angka probit menggunakan program MINITAB17 dengan tingkat kepercayaan 95% dan error 5%. Hasil pengolahan berupa nilai LC_{50} yang menunjukkan nilai konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian. Isolat steroid diidentifikasi dengan spektroskopi FT-IR.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan alga merah jenis *Eucheuma cottonii* yang berasal dari perairan Wongsorejo, Banyuwangi. Sampel basah yang diambil sebanyak 19 Kg dan dicuci bersih untuk menghilangkan pengotor. Sampel yang diperoleh dikeringkan untuk mengurangi kadar air dengan menggunakan cara kering angin atau tanpa terkena sinar matahari untuk menghindari terjadinya kerusakan senyawa aktif pada sampel (Septiandari, 2016). Sampel yang kering dapat meminimalkan kerusakan akibat degradasi oleh mikroorganisme dan mencegah tumbuhnya jamur agar dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama dan tidak merusak komposisi kimia (Mardiyah, dkk., 2014).

Sampel yang telah kering dihaluskan dan diayak dengan ukuran 90 mesh untuk memperluas permukaan dan menyeragamkan ukuran sampel. Ukuran sampel dengan tingkat penghalusan yang tinggi (luas permukaan yang tinggi) akan memungkinkan terjadinya kerusakan sel-sel, sehingga akan memudahkan pengambilan bahan kandungan langsung oleh pelarut (Afif, 2015). Serbuk alga merah *Eucheuma cottonii* yang didapatkan seberat 0,905 Kg dari total berat awal yaitu 19 Kg, maka rendemen sampel yang didapatkan adalah 4,76%. Hasil rendemen yang didapatkan lebih banyak dari penelitian Pramitania, (2019) yang melakukan preparasi sampel alga merah *Eucheuma cottonii* dan menghasilkan rendemen sebesar 4,71%.

4.2 Analisa Kadar Air

Analisa kadar air bertujuan untuk mengetahui kandungan air dalam sampel alga merah *Eucheuma cottonii* karena kadar air mempengaruhi konsentrasi dan kepolaran pelarut pada saat proses ekstraksi. Penentuan kadar air dalam penelitian ini menggunakan metode *thermogravimetric*. Prinsip metode *thermogravimetric* adalah menguapkan air yang ada dalam sampel dengan jalan pemanasan. Sampel dioven pada suhu 105-110°C, karena titik didih air adalah 100°C maka dibutuhkan suhu diatas titik didih air tersebut untuk menguapkan air pada sampel. Selisih antara berat sampel sebelum dan sesudah pemanasan menunjukkan total jumlah air yang terkandung dalam sampel.

Kadar air yang tinggi akan menyebabkan konsentrasi pelarut berkurang karena bercampur dengan air pada sampel sehingga menyebabkan proses ekstraksi berlangsung cukup lama dan sampel yang lembab tersebut mudah terdegradasi oleh mikroorganisme (Septiandari, 2016). Sedangkan kadar air yang rendah akan mempermudah proses penarikan zat aktif dalam sampel karena pelarut mudah menembus dinding sampel tanpa adanya gangguan dari molekul air (Khoiriyah, dkk., 2014). menurut Septyaningsih, (2010) kadar air maksimum untuk proses ekstraksi adalah < 11%. Dapat dikatakan bahwa semakin kecil kadar air, maka semakin baik sampel untuk digunakan dalam proses ekstraksi maserasi. Analisis kadar air dilakukan pengulangan hingga konstan menggunakan 4 cawan berbeda. Hasil analisis kadar air ditunjukkan pada Tabel 4.1 dengan rata-rata kadar air 5,59%. Pramitania, (2019) dan Madjid, (2020) menganalisa kadar air pada alga merah *Eucheuma cottonii* menghasilkan kadar air berturut-turut sebesar 4,71% dan 4,56%. Perbedaan kadar ini diduga karena waktu dan iklim yang berbeda.

Tabel 4.1 Hasil analisa kadar air

Pengulangan	Berat (gram)			Kadar air (%)
	Cawan kosong	Cawan kosong + sampel sebelum dioven	Cawan kosong + sampel setelah dioven	
Cawan 1	55,8046	56,8046	56,7449	5,97
Cawan 2	53,6553	54,6553	54,6013	5,40
Cawan 3	55,2989	56,2989	56,2434	5,568
Cawan 4	54,2221	55,2221	55,1658	5,461
	Rata-rata			5,5997

4.3 Ekstraksi

4.3.1 Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi maserasi merupakan proses ekstraksi tahap awal pada serbuk alga merah *Eucheuma cottonii* dengan menggunakan pelarut metanol pada suhu ruang. Proses ekstraksi ini menyebabkan dinding sel dan membran sel terpecah akibat perbedaan tekanan didalam dan diluar sel, kemudian pelarut metanol yang berkonsentrasi lebih tinggi masuk melalui dinding sel dan menarik senyawa metabolit sekunder yang ada di sitoplasma dan masih terikat dengan gugus gula akan keluar dan akan terekstrak pada metanol karena sifat kepolarannya yang sama (prinsip *like dissolve like*). Proses ini terus berlangsung hingga terjadi keseimbangan konsentrasi di dalam dan di luar sel.

Ekstraksi maserasi dilakukan selama 24 jam, karena semakin lama waktu perendaman, maka kontak antara sampel dengan pelarut akan semakin besar sehingga semakin banyak senyawa yang ikut terekstrak. Proses maserasi disertai

dengan penggojokan menggunakan shaker dengan kecepatan 120 rpm. Fungsi penggojokan untuk meratakan konsentrasi larutan di luar serbuk, sehingga tetap terjaga adanya derajat perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya sehingga mempercepat kontak antara sampel dengan pelarut dan didapatkan hasil yang maksimal (Sastromidjojo, 2005). Setelah 24 jam, dipisahkan antara filtrat dengan residunya menggunakan penyaring vakum (corong *Buchner*). Residu yang diperoleh dilakukan remaserasi untuk mengoptimalkan proses maserasi. Metabolit sekunder pada tanaman ditandai dengan warna hijau pekat hingga hijau pudar (Kristanti, dkk., 2006). Pada penelitian ini pengulangan ke tiga sudah menunjukkan warna hijau pudar (gambar dilampirkan pada Lampiran 5.2) yang mengindikasikan senyawa metabolit sekunder sudah terekstrak maksimal.

Hasil maserasi dilakukan proses pemekatan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40-50°C untuk menghilangkan pelarut melalui penguapan sehingga didapat ekstrak yang pekat. Setelah dilakukan pemekatan dengan *rotary evaporator*, ekstrak daliri dengan gas N₂ agar sisa pelarut yang ada dalam ekstrak dapat dihilangkan. Hasil ekstraksi maserasi alga merah *Eucheuma cottonii* menggunakan pelarut metanol yang didapatkan dari penelitian ini adalah 10,6201 gram dengan rendemen 10,62%. Penelitian yang dilakukan oleh Madjid, dkk., (2020), Pramitania, (2019) dan Ratnasari (2017) yang mengekstraksi alga merah *Eucheuma cottonii* dengan pelarut metanol secara berturut-turut lebih besar yaitu 11,86%, 13,79% dan 16,649%. Hasil rendemen yang berbeda ini disebabkan karena perbedaan kadar air pada sampel, waktu pengambilan dan kondisi iklim yang berbeda.

4.3.2 Hidrolisis

Senyawa metabolit sekunder umumnya di alam berikatan dengan gugus gula, sehingga diperlukan tahapan untuk memutus ikatan glikosida antara gugus glikon dan aglikon tersebut dengan cara hidrolisis dengan bantuan katalis asam yaitu HCl 2N. katalis asam ini menyebabkan penurunan pH. Proses hidrolisis dilakukan dengan pengadukan serta bantuan *magnetic stirrer* selama 2 jam dalam suhu ruang agar ekstrak pekat dapat tercampur dan dapat terputus dengan maksimal. Senyawa steroid yang merupakan turunan dari senyawa lipid sehingga ketika dihidrolisis tekstur larutan berubah menjadi sedikit berminyak.

Reaksi hidrolisis yang bersifat asam ini bersifat *reversible*. (reaksi hidrolisis dapat dilihat pada Gambar 2.4), maka untuk menghentikan agar tidak terbentuk kembali ikatan glikosida antara glikon dan aglikon diperlukan penetralan dengan cara penambahan NaHCO_3 jenuh. Penambahan NaHCO_3 jenuh dilakukan hingga pH 7 (netral), karena pada pH 7 (netral) glikosida bersifat stabil (Fessenden dan Fessenden, 1986). (reaksi antara HCl dengan NaHCO_3 dapat dilihat pada Gambar 2.5), pada penambahan ini dihasilkan gumpalan hijau dan busa pada ekstrak metanol. Busa yang dihasilkan pada hasil proses hidrolisis merupakan karbon dioksida dari hasil reaksi hidrolisis HCl dan NaHCO_3 . Hidrolisat yang didapat selanjutnya dilakukan ekstraksi cair-cair (partisi).

4.3.3 Partisi Menggunakan n-Butanol

Ekstrak alga merah *Eucheuma cottonii* yang telah dihidrolisis dilakukan ekstraksi cair-cair menggunakan n-butanol untuk mengikat senyawa metabolit sekunder tanpa terikat oleh gugus gula menggunakan prinsip *like dissolve like*.

Steroid yang umumnya bersifat non polar dapat dilakukan proses partisi menggunakan pelarut n-butanol yang bersifat semi polar. Steroid memiliki struktur dasar yang terdiri dari tiga cincin sikloheksana dan sebuah cincin siklopetana, namun pada turunan senyawanya umumnya terdapat gugus OH bebas yang menyebabkan senyawa ini bersifat semi polar hingga non polar.

Berdasarkan konstanta dielektrik pada Tabel 2.2 n-butanol bersifat semi polar atau sedikit larut dalam air. Hal ini diasumsikan sifat kepolaran dari n-butanol adalah semi polar sehingga n-butanol dapat mengekstrak steroid pada fase organik, sedangkan glikon terdistribusi pada fase air. Fase air dan fase organik akan membentuk dua lapisan yang tidak saling bercampur karena tingkat kepolaran air lebih polar (hasil partisi) dibandingkan dengan n-butanol yang semi polar dan densitas yang berbeda dimana n-butanol 0,81 g/L dan air 1 g/L. fase organik berada pada lapisan atas, dan fase air pada lapisan bawah.

Proses fraksinasi dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan hingga fase organik berubah dari warna pekat hingga berwarna bening (gambar dilampirkan pada Lampiran 5.5) yang dapat diasumsikan senyawa telah terdistribusi secara maksimal ke dalam pelarut organik. Fase organik ini selanjutnya dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* dan dialiri dengan gas N₂ hingga diperoleh fraksi yang lebih murni. Fraksi yang dihasilkan memiliki warna hijau kecoklatan dengan tekstur lengket.

Rendemen hasil partisi ekstrak alga merah *Eucheuma cottonii* menggunakan pelarut n-butanol yang diperoleh yaitu 27,058%. Hasil ini lebih besar dibandingkan dengan hasil partisi menggunakan pelarut yang non polar pada n-heksana sebesar 11,52% (Pramitania, 2019), petroleum eter 8,03%

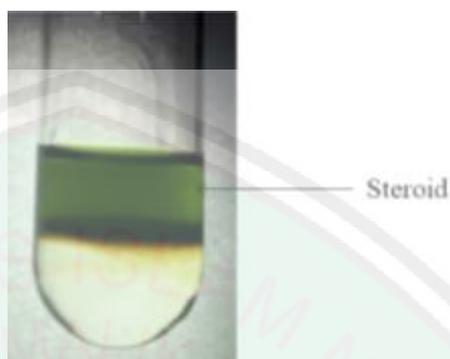
(Madjid, dkk., 2020) dan etil asetat 17,19% (Anggraini, 2018). Namun hasil rendemen Ratnasari (2017) yang melakukan partisi pada alga merah *Eucheuma cottonii* menggunakan pelarut n-butanol lebih tinggi yaitu sebesar 33,89%. Hal ini diduga karena kurang maksimalnya pengocokan sehingga kemungkinan senyawa metabolit sekunder masih belum terekstrak sempurna ke dalam pelarut n-butanol dan masih tertinggal didalam fase airnya.

4.4 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Skrining fitokimia adalah tahap awal untuk mengetahui kandungan senyawa steroid dalam fraksi n-butanol. Uji fitokimia ini merupakan uji kualitatif dengan cara penambahan reagen *Liebermann burchard* pada sampel. Reagen *Liebermann burchard* terdiri dari kloroform, asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat. Kloroform untuk melarutkan fraksi serta kloroform tidak mengandung molekul air. Sampel yang telah larut ditambahkan dengan asam asetat anhidrat untuk asetilasi gugus hidroksil yang membentuk turunan asetil. Gugus asetil adalah gugus pergi yang baik sehingga dapat membentuk ikatan rangkap. Asam sulfat pekat akan membuat senyawa steroid terdehidrasi membentuk garam *cholestadiene* yang mengalami perpanjangan konjugasi dan ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kebiruan (proses dehidrasi) (Robinson, 1995).

Hasil uji fitokimia dari fraksi n-butanol memberikan hasil positif mengandung steroid ditandai dengan terbentuknya warna hijau pada bagian atas yang ditunjukkan pada Gambar 4.1. Hal ini sesuai dengan literatur yang menyatakan bahwa larutan uji menunjukkan hasil positif steroid apabila pada

larutan uji mengalami perubahan warna larutan menjadi hijau kebiruan (Harborne,1987).



Gambar 4.1 Hasil uji fitokimia steroid

Selain dilakukan uji fitokimia golongan senyawa steroid juga dilakukan uji senyawa aktif lain yang meliputi triterpenoid, alkaloid dan flavonoid. Hasil skrining fitokimia ditunjukkan pada Tabel 4.2

Tabel 4.2 Hasil skrining fitokimia fraksi n-butanol *Eucheuma cottonii*

Golongan senyawa	Hasil fraksi n-butanol
Steroid	+++
Triterpenoid	+++
Alkaloid	
Mayer	++
Dragendroff	+
Flavonoid	+

Keterangan : +++ = Kandungan senyawa lebih banyak (warna sangat pekat)

++ = Mengandung senyawa (warna cukup pekat)

+ = Mengandung senyawa (berwarna)

4.5 Isolasi Steroid dengan Kromatografi Kolom dan Monitoring dengan KLTA

Hasil fraksi alga merah *Eucheuma cottonii* dilakukan pemisahan menggunakan kromatografi kolom untuk memperoleh isolat. Pemisahan terjadi karena adanya peristiwa adsorpsi yaitu penyerapan senyawa pada permukaan fase diam. Fase diam yang digunakan adalah silika gel G-60 F₂₅₄ dan fase gerak berupa campuran pelarut n-heksana dan etil asetat. Silika gel G-60 F₂₅₄ diaktivasi terlebih dahulu untuk menghilangkan kandungan air dalam silika agar air tidak menutupi sisi aktif dari silika dan untuk mengaktifkan gugus hidroksil (-OH). Silika di stirrer pada suhu ruang selama 1 jam menggunakan pelarut n-heksana:etil asetat (95:5). Kolom pada bagian bawah diisi dengan *glasswool* untuk menyaring dan menahan penyerapan lebih baik daripada kapas. Selanjutnya dimasukkan kedalam kolom yang berdiameter 1 cm dengan diketuk-ketuk dinding kolom hingga tidak terdapat gelembung atau celah udara yang mempengaruhi pemisahan. Fase diam didiamkan dan ditutup rapat untuk memampatkan secara maksimal selama >24 jam dalam kondisi terendam pelarut untuk menghasilkan kerapatan fase diam yang lebih baik agar semakin kuat daya serap suatu komponen.

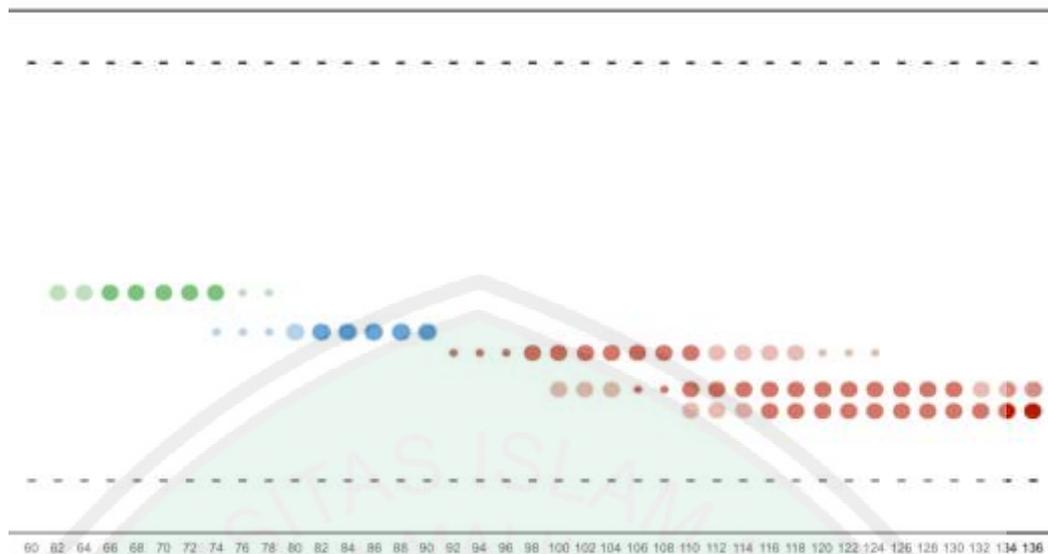
Perbandingan sampel dengan silika dalam penelitian ini adalah 1:150, maka sampel sebanyak 0,067 gram yang dilarutkan dalam pelarut 1 mL pelarut n-heksana:etil asetat (95:5) dimasukkan kedalam kolom yang telah berisi fase diam. Sistem fase geraknya menggunakan elusi gradien, yaitu tingkat kepolaran yang berbeda-beda dan hal ini meningkatkan efisiensi pemisahan. Elusi gradien menggunakan perbandingan n-heksana:etil asetat 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25 dan 70:30 dan dimulai dari tingkat yang lebih non polar. Proses elusi dilakukan

hingga selesai (eluen habis) dengan diatur kecepatan laju alir tiap vial adalah 2 mL/menit untuk mengoptimalkan pemisahan dan tidak terjadi *tailing* saat di monitoring dengan KLTA. Hasil pemisahan menggunakan kromatografi kolom menggunakan elusi gradien ini menghasilkan 272 vial dan dikelompokkan menjadi 10 fraksi besar.

Proses elusi antara pelarut dengan komponen lainnya akan teradsorpsi pada permukaan silika. Molekul komponen akan tertahan dipermukaan secara bergantian dan akan masuk kembali ke fase gerak ketika penambahan eluen. Steroid yang non polar akan terelusi terlebih dahulu meninggalkan kolom, dan akan bermigrasi bersamaan dengan laju eluen yang sama sifat kepolarannya. Namun terdapat beberapa senyawa steroid yang semi polar dikarenakan adanya gugus -OH, sehingga proses elusi senyawa akan tertahan lebih kuat oleh fase diam. Senyawa yang lebih polar akan tertahan lebih lama dipermukaan molekul silika karena memiliki afinitas yang lebih besar dan akan membentuk ikatan hidrogen antara senyawa dengan gugus silanol (Si-OH) yang dimiliki oleh silika.

Monitoring dengan KLTA bertujuan untuk mengelompokkan hasil pemisahan kromatografi kolom berdasarkan warna spot dan nilai R_f yang diperoleh. Monitoring KLTA menggunakan fase diam berupa plat silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak menggunakan pelarut n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 17:3. Monitoring dengan KLTA dilakukan setiap vial kelipatan 2. Hasil monitoring dengan KLTA dapat dilihat hasilnya menggunakan lampu UV pada 254 dan 366 nm. Hasil monitoring spot noda KLTA dapat dilihat pada Gambar 4.2 dan hasil pengelompokan fraksi besar hasil monitoring dengan KLTA dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Gambar 4.2 Ilustrasi hasil pengelompokan fraksi besar hasil monitoring KLTA



Tabel 4.3 Hasil monitoring dengan KLTA

Fraksi	Vial ke-	Σ -spot	Warna UV _{254nm} / UV _{366nm}	Dugaan Senyawa	<i>R_f</i>	Berat (mg)	Rendemen
A	1-61	-	-	-	-	-	-
B	62-72	1	Hijau	Steroid	0,45	5,9	8,8060%
C	73-79	2	Hijau Biru	Steroid	0,45 0,3625	2,7	4,0298%
D	80-91	1	Biru	Steroid	0,3625	6,6	9,8507%
E	92-98	1 (M ₁)	Merah	Triterpenoid	0,3125	4,3	6,4179%
F	99-108	2 (M _{1,2})	Merah	Triterpenoid	0,3125 0,225	2,6	3,8806%
G	109-124	3 (M _{1,2,3})	Merah	Triterpenoid	0,3125 0,225 0,175	5,6	8,3582%
H	125-156	2 (M _{2,3})	Merah	Triterpenoid	0,225 0,175	7,1	10,5970 %
I	157-189	2 (M _{3,4})	Merah	Triterpenoid	0,175 0,125	6,6	9,8507%
J	190-234	1 (M ₅)	Merah	Triterpenoid	0,05	4,9	7,3134%

Hasil monitoring dengan KLTA diperoleh 2 isolat golongan senyawa steroid dengan menghasilkan spot berwarna hijau dan biru (Ningsih, 2015). Spot berwarna hijau (B) pada lampu UV $\lambda 366$ diperoleh berat 0,0059 gram dengan R_f 0,45 dan spot berwarna biru (D) pada lampu UV $\lambda 366$ dengan berat 0,0066 gram dengan R_f 0,3625 (perhitungan R_f dan rendemen hasil kolom dilampirkan pada Lampiran 4.4 dan Lampiran 4.5). Perbedaan nilai R_f dari dua isolat yang didapat menunjukkan sifat kepolaran dan golongan senyawa steroid yang berbeda jenisnya. Pramitania (2019) mengisolasi senyawa steroid fraksi n-heksana pada alga merah *Eucheuma cottonii* didapat 2 isolat steroid dengan noda tunggal. Luki, (2018) mengisolasi senyawa steroid *Eucheuma cottonii* fraksi etil asetat diperoleh 4 isolat steroid dengan noda tunggal dan menghasilkan nilai R_f 0,81 dan 0,78 berwarna biru dan pada R_f 0,46 dan 0,32 berwarna hijau. Dilihat dari nilai R_f dan warna spotnya, nilai R_f pada 0,46 dengan warna hijau memiliki perbedaan yang tidak jauh berbeda dari hasil pemisahan dengan fraksi n-butanol yang telah dilakukan. Dilihat dari nilai R_f 0,45 isolat senyawa steroid cenderung lebih non polar daripada senyawa lain yang didapat dikarenakan nilai R_f yang lebih besar serta terelusi terlebih dahulu bersama fase gerak n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 90:10.

Distribusi dari pelarut n-heksana lebih besar dari pada etil asetat sehingga eluen bersifat non polar dan akibatnya senyawa steroid yang bersifat nonpolar akan bermigrasi terlebih dahulu bersama dengan fase gerak. Senyawa triterpenoid dengan nilai R_f yang kecil yaitu 0,05 mengartikan bahwa senyawa tersebut cenderung lebih polar karena tertahan lebih lama oleh silika yang sama sifat kepolarannya. Hasil monitoring KLTA masih terdapat fraksi campuran, hal ini

disebabkan karena adanya pelebaran pita. Pelebaran pita terjadi akibat laju alir dan efisiensi kolom yang kurang maksimal yang menyebabkan senyawa tidak terelusi secara langsung dan memiliki kesempatan untuk menyebar ke segala arah didalam eluen untuk mencari konsentrasi yang lebih rendah. Persitwa ini disebut dengan *difusy longitudinal*.

4.6 Uji Toksisitas Golongan Senyawa Steroid Metode BSLT

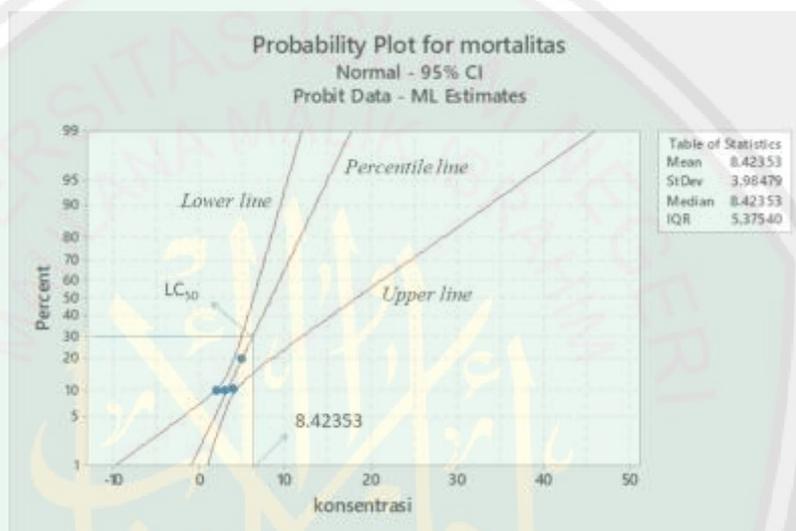
Uji toksisitas bertujuan untuk mengetahui efek toksik dari senyawa steroid yang diberikan pada suatu organisme sebelum dosis ini diberikan pada manusia sebagai obat. Metode BSLT digunakan dikarenakan cepat, aman, praktis dan ekonomis. Metode BSLT digunakan sebagai penentuan bioaktivitas senyawa bahan alam dikarenakan metode BSLT memiliki nilai korelasi statistik yang valid dengan bioaktivitas yang diinginkan (Anderson, 1992). Pada penelitian ini menggunakan telur larva udang *artemia salina* L sebagai bioindikatornya. Telur arva udang *artemia salina* L dilakukan penetasan selama 48 jam menggunakan air laut dengan bantuan pencahayaan untuk memberikan rangsangan terhadap larva udang untuk menetas karena larva udang termasuk dalam organisme fototropik (Amaliyah, dkk., 2013). Selama proses penetasan dibantu menggunakan aerasi untuk membantu memberikan oksigen yang cukup pada larva udang. Penetasan dilakukan selama 48 jam untuk waktu optimal hewan uji dapat digunakan karena telah terbentuk kulit dan mulut sebagai masuknya senyawa steroid kedalam tubuh *artemia salina* L.

Uji toksisitas dilakukan menggunakan variasi konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm dengan menggunakan 3 kontrol, yaitu kontrol air laut, kontrol pelarut n-

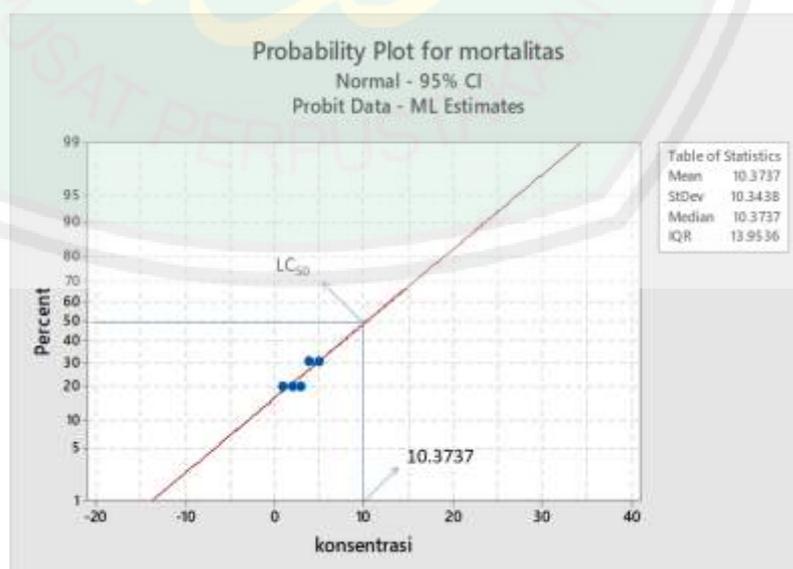
heksana dan kontrol DMSO. Pemberian DMSO berfungsi sebagai surfaktan untuk melarutkan isolat dengan air laut yang berbeda kepolarannya. DMSO memiliki gugus hidrofobik yang bersifat non polar yang akan bertinteraksi dengan steroid dan gugus hidrofilik yang bersifat polar yang akan berinteraksi dengan air laut. Fungsi dari penambahan ragi adalah sebagai makanan *artemia salina*. Pelarut diuapkan terlebih dahulu agar kematian larva udang tidak dipengaruhi oleh pelarutnya.

Steroid bertindak sebagai *stomach poisoning* (racun perut) masuk ke dalam membran sel larva dan terdistribusi ke dalam tubuh yang menyebabkan alat pencernaan larva akan terganggu (Ningdiyah, dkk., 2015). Senyawa metabolit sekunder akan menghambat enzim RNA *polymerase* dalam pemutusan rantai DNA yang mengakibatkan tidak berlangsungnya sintesis protein (Anggraini, 2018). 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* mengalami kematian (Budaraga, 2016). Senyawa steroid masuk dalam tubuh larva artemia dan bertindak sebagai racun perut atau stomach poisoning yang dapat menghambat daya makan larva. Senyawa uji menyerang sistem pencernaan sehingga mengganggu metabolisme dan menghambat reseptor perasa di mulut larva yang dapat mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga tidak dapat mengenali makanan dan mati kelaparan. Kematian larva udang diamati setelah 24 jam yang ditandai dengan tidak adanya pergerakan larva udang baik itu mengambang diatas atau berada didasar vial.

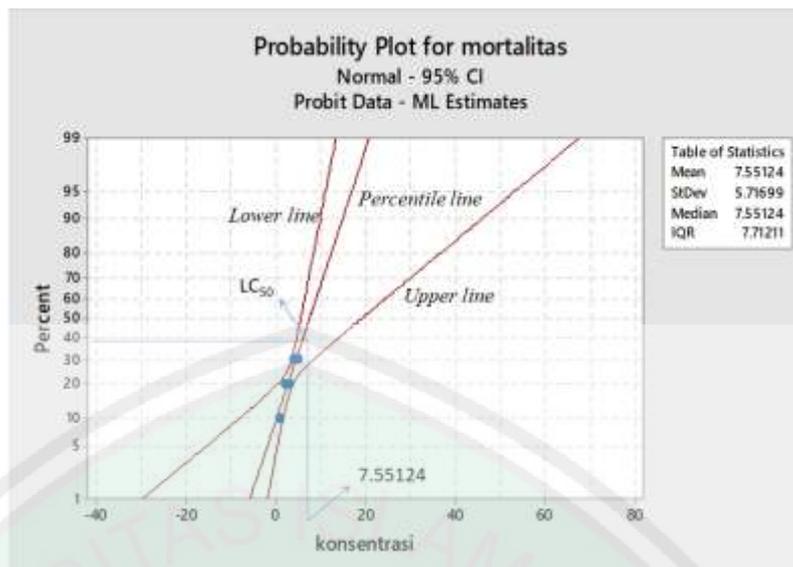
Kematian larva udang menggunakan parameter *Lethal Concentration* 50 (LC_{50}) sebagai tingkat toksisitas suatu senyawa. Semakin kecil nilai LC_{50} maka mengindikasikan isolat senyawa steroid tersebut semakin toksik atau semakin besar efek farmakologinya. Kurva nilai LC_{50} fraksi n-butanol dan isolat B dan isolat D ditunjukkan pada Gambar 4.3; 4.4 dan 4.5.



Gambar 4.3 Kurva nilai LC_{50} fraksi n-butanol



Gambar 4.4 Kurva nilai LC_{50} isolat B

Gambar 4.5 Kurva nilai LC₅₀ isolat DTabel 4.4 Nilai mortalitas dan nilai LC₅₀ *Eucheuma cottonii*

Jenis Sampel	Nilai mortalitas					Nilai LC ₅₀ (ppm)
	1 ppm	2 ppm	3 ppm	4 ppm	5 ppm	
Fraksi n-butanol	0	5	5	5	10	8,42353
Isolat B	10	10	10	15	15	10,3737
Isolat D	5	10	10	15	15	7,55124

Kurva LC₅₀ menunjukkan hubungan antara *percent* dan konsentrasi. Sumbu x menunjukkan seri variasi konsentrasi yang digunakan untuk uji toksisitas, sedangkan sumbu y menunjukkan *percent* yang diperoleh dengan memasukkan angka 50 yang merupakan penentuan nilai LC₅₀. Pada kurva fraksi n-heksana dan isolat D terdapat tiga garis yaitu *lower line*, *percentile line* dan *upper line*. *Lower line* sebagai batas bawah yang menunjukkan konsentrasi terendah pada setiap persen mortalitas. *Percentile line* sebagai konsentrasi pada setiap persen mortalitas dan *percentile line* merupakan garis normal yang

menunjukkan ada tidaknya hubungan *linear* antara konsentrasi dengan persen mortalitas. Sedangkan *upper line* merupakan batas atas konsentrasi pada setiap persen mortalitas (Nasliyana, 2013).

Uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan 3 kontrol. Hasil dari ketiga kontrol ini tidak menyebabkan kematian pada larva udang *Artemia salina*, maka 3 kontrol ini tidak memiliki pengaruh terhadap kematian larva udang. Hasil dari isolat D menghasilkan nilai toksisitas ($LC_{50} = 7,55124$ ppm) paling toksik daripada isolat B dan fraksi n-butanol karena isolat lebih murni dan telah melalui tahap pemisahan yang lebih spesifik, sedangkan pada fraksi masih terdapat campuran senyawa lain selain golongan senyawa steroid (metabolit sekunder lain). Namun hasil LC_{50} fraksi n-butanol lebih tinggi daripada isolat B, sedangkan nilai mortalitas pada isolat B pada konsentrasi 1 ppm lebih tinggi yaitu 10 sedangkan pada fraksi n-butanol nilai mortalitas pada konsentrasi 1 ppm masih 0, atau dapat dikatakan masih belum ada kematian larva udang *artemia salina* L. Hal ini mungkin disebabkan kurva pada isolat B kurang *linear* dari fraksi n-butanol yang kurvanya lebih linear. Maka nilai LC_{50} yang didapat jauh lebih toksik fraksi n-butanol daripada isolat B. selain itu perbedaan nilai LC_{50} pada setiap sampel uji dikarenakan terdapat kandungan metabolit sekunder didalamnya. Penggabungan senyawa akan bereaksi terhadap terhadap biota dengan respon sinergis, antagonis atau netral (Trianto, dkk., 2004). Pada ekstrak kasar umumnya nilai toksisitas rendah dikarenakan masih banyak mengandung senyawa campuran dan dimungkinkan terhadap senyawa yang memberikan efek antagonis terhadap sifat toksik senyawa lain, sehingga dapat menurunkan tingkat toksisitas ekstrak metanol. Pada fraksi n-butanol masih terdapat senyawa lain. Senyawa ini diduga

senyawa yang bersifat sinergis sehingga memiliki kemampuan sitotoksik yang tinggi dibandingkan kemampuan sitotoksik yang hanya terdapat pada senyawa steroid.

Nilai LC_{50} dari hasil isolat B, isolat D dan fraksi n-butanol, menghasilkan nilai LC_{50} dibawah 30 ppm (sangat toksik), maka hasil ini mengindikasikan isolat steroid memiliki aktivitas yang sangat toksik atau memiliki aktivitas biologi yang besar yang dapat menyebabkan kematian 50% hewan uji dan sekaligus memiliki potensi aktivitas sebagai antitumor atau antikanker (Meyer, dkk., 1982). Namun, metode BSLT tidak dapat secara langsung menyatakan kemampuan toksiknya terhadap sel kanker tertentu, akan tetapi sebagai uji skrining awal senyawa aktif antikanker atau antitumor.

4.7 Identifikasi Menggunakan FTIR

Hasil isolat senyawa steroid dari kromatografi kolom alga merah *eucheuma cottonii* selanjutnya dilakukan identifikasi menggunakan spektroskopi FTIR untuk mengetahui gugus fungsinya. Prinsip FTIR adalah interaksi antara radiasi inframerah dengan sampel dengan melibatkan vibrasi molekul. Senyawa yang akan diidentifikasi dihaluskan dengan mortar agate dengan garam KBr sebagai background, dan dilakukan pengepresan pada tekanan 80 torr selama 10 menit hingga didapat pellet tipis. Hasil spektra yang didapat ditampilkan pada Gambar 4.6 (isolat B) dan 4.7 (isolat D) serta interpretasi spektra FTIR ditampilkan pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Interpretasi spektra FTIR isolat B dan D

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)		Referensi (Socrates, 1994)	
	Isolat B	Isolat D	(v, cm ⁻¹)	Intensitas
-OH, <i>stretching</i> (alkohol)	3452.039	3450.475	3550-3230	m-s
-C _{sp} ² -H, <i>stretching</i> , (alkena)	3074.525	3078.383	3010-3095	m
-C _{sp} ³ -H, <i>stretching</i> asimetri (alkana)	2925.894	2956.644	3000-2800	m-s
-CH ₂ - <i>stretching</i> , (alkil) simetri	2855.859	2854.626	2870-2840	m
C=O, <i>stretching</i> (ester)	1732.811	1734.374	1750-1730	vs
C=C <i>stretching</i> nonkonjugasi	1641.049	1652.625	1680-1620	w-m
-CH pada CH ₂ <i>bending scissoring</i>	1463.246	1466.842	1454	m-s
CH ₃ pada CH ₂ <i>bending wagging</i>	1380.772	-	1396-1365	m-s
(CH ₃) ₂ pada CH ₂ <i>bending wagging</i>	-	1383.624	1396-1365	m-s
C-O (ester)	1282.802	1262.197	1250-1350	m
C-O(alkohol) sekunder	1127.020 dan 1075.544	1091.202 dan 1025.281	1125-1000	s-w
=C-H siklik (broad)	966.946 dan 892.725	802.800	995-650	m
(CH ₂) ₂ bend (<i>rocking</i>)	742.232	-	745-735	w-m
C=C-H (bend)	648.834 dan 567.458	669.123 dan 575.198	690-560	m

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

Berdasarkan hasil identifikasi dengan FTIR, serapan-serapan dari gugus fungsi yang dihasilkan adalah OH (*stretching*) pada 3452 cm^{-1} (isolat B) dan 3450 cm^{-1} (isolat D) yang didukung dengan serapan C-O alkohol sekunder pada 1127 cm^{-1} (isolat B) dan 1091 cm^{-1} (isolat D) steroid jenis sterol (Aprelia dan Suyatno, 2013)), serapan $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ pada 2925 cm^{-1} (isolat B) dan 2956 cm^{-1} (isolat D) yang didukung dengan serapan $(\text{CH}_2)_2$ pada 742 cm^{-1} (isolat B) serta didukung dengan serapan CH_2 simetri pada 2855 cm^{-1} (isolat B) dan 2854 cm^{-1} (isolat D), serapan $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-H}$ pada 3074 cm^{-1} (isolat B) dan 3078 cm^{-1} (isolat D) serta didukung dengan serapan C=C non konjugasi pada 1641 cm^{-1} (isolat B) dan 1652 cm^{-1} (isolat D) serta serapan =C-H pada 966 cm^{-1} (isolat B) dan 802 cm^{-1} (isolat D). Vibrasi C-H tekuk asimetris pada bilangan gelombang 1463 cm^{-1} (isolat B) dan 1466 cm^{-1} isolat D (*scissoring*) dan simetris pada bilangan gelombang 1380 cm^{-1} (isolat B) (*wagging*) yang mengindikasikan adanya CH_3 pada CH_2 dan bilangan gelombang 1383 cm^{-1} (isolat D) (*wagging*) yang mengindikasikan adanya gugus geminal dimetil $[\text{CH}(\text{CH}_3)_2]$ yang merupakan gugus khas senyawa steroid yang paling sering ditemukan.

Berdasarkan serapan gugus fungsi isolat B dan isolat D hasil kolom yang muncul pada spektra FTIR, dikategorikan kedalam jenis steroid golongan ester dengan serapan C=O ester pada bilangan gelombang 1732 cm^{-1} (isolat B) dan 1732 cm^{-1} (isolat D). Pratiwi, (2019) mengisolasi senyawa steroid pada mikroalga *Chlorella* sp menggunakan FTIR dan didapat serapan bilangan gelombang pada 1731 dan 1732 cm^{-1} dan identifikasi menggunakan LC-MS/MS diperoleh 3 jenis steroid yaitu β -sitosterol, kolesterol dan stigmasterol dengan jenis senyawa yang paling dominan adalah kolesterol.

Perbedaan serapan gugus fungsi dari kedua isolat terletak pada bilangan gelombang 1380 cm^{-1} (isolat B) yang mengindikasikan adanya gugus fungsi CH_3 pada CH_2 dan 1383 cm^{-1} (isolat D) yang mengindikasikan adanya gugus fungsi $(\text{CH}_3)_2$ pada CH_2 (geminal dimetil). Perbedaan dapat dilihat pada lembah yang dihasilkan jika gugus fungsi CH_3 pada CH_2 terdapat 1 lembah sedangkan pada $(\text{CH}_3)_2$ pada CH_2 (geminal dimetil) terdapat 2 lembah yang berdampingan (Supratman, 2010).

Selain gugus fungsi utamanya, terdapat perbedaan serapan gugus fungsi pada bilangan gelombang 742 cm^{-1} (CH_2)₂ bend) pada isolat B serta pada isolat D tidak terdeteksi. Perbedaan serapan pada gugus fungsi isolat B dan isolat D tidak memberikan perbedaan pada gugus fungsi penting yang kandungannya, karena Serapan isolat B pada 742 cm^{-1} merupakan pendukung dari gugus fungsi pada bilangan gelombang 2925 cm^{-1} yang merupakan serapan dari $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ serta pada bilangan gelombang dibawah 1000 cm^{-1} merupakan daerah sidik jari dimana pada daerah ini tidak dapat menentukan bentuk dari gugus fungsi *stretching*, *wegging* atau kombinasi dari keduanya. Hasil identifikasi terdapat serapan pada 2381 cm^{-1} yang merupakan serapan $\text{C}=\text{O}$ dari gugus CO_2 . Hal ini diduga merupakan *background* yang terbaca disebabkan pada saat pengepresan atau saat memasukkan sampel ke dalam spektroskopi FTIR terdapat udara yang masuk.

Luki, (2018) mengisolasi alga merah *Eucheuma cottonii* dari fraksi etil asetat hasil kromatografi kolom basah dan identifikasi menggunakan LC-MS/MS menghasilkan isolat steroid dengan nilai R_f 0,32 dengan spot berwarna hijau menghasilkan senyawa steroid jenis fukosterol, desmosterol, kampesterol, β -sitosterol dan stigmasterol. Berdasarkan dengan penelitian yang telah dilakukan,

nilai R_f yang dihasilkan hampir sama dengan isolat D (nilai R_f 0,36). Berdasarkan hasil identifikasi dengan LC-MS/MS oleh Luki, (2018), identifikasi dengan FTIR pada isolat D memiliki gugus geminal dimetil pada bilangan gelombang 1383 dan 1466 cm^{-1} dimana gugus ini dimiliki oleh kelima jenis steroid yang dihasilkan dari identifikasi oleh Luki, (2018) menggunakan LC-MS/MS.

Pendukung hasil ini berdasarkan penelitian Halilu, dkk., (1980) yang mengisolasi senyawa steroid batang kayu dari *Parinari curatellifolia* menggunakan FTIR, MS, ^1H dan ^{13}C -NMR memiliki serapan OH (3431 cm^{-1}), serapan gugus CH_3 stretching pada 2928 cm^{-1} dan geminal dimetil pada bilangan gelombang 1452 dan 1374 cm^{-1} yang merupakan jenis senyawa β -sitosterol. Pramitania, (2019) mengidentifikasi senyawa steroid *Eucheuma cottonii* menggunakan FTIR dan LC-MS/MS diperoleh bilangan gelombang pada 2958 cm^{-1} dan didukung dengan serapan pada 743 cm^{-1} yang merupakan senyawa steroid jenis sitosterol, fukosterol, kolesterol dan demosterol. Berdasarkan perbandingan serapan yang didapatkan dapat diketahui bahwa senyawa steroid yang dipisahkan menghasilkan serapan yang berbeda-beda. Perbedaan serapan ini disebabkan karena adanya perbedaan jenis golongan senyawa steroid dalam masing-masing isolat yang diperoleh.

4.8 Pemanfaatan Alga Merah *Eucheuma cottonii* dalam Prespektif Islam

Allah Swt memerintahkan manusia untuk mempelajari kandungan al Qur'an, menelaah keterangan dan tujuan firman-Nya. Manusia diberikan kelebihan berupa pikiran agar manusia menjadi makhluk cerdas dan mempelajari ilmu yang diperoleh. Allah Swt berfirman dalam Q.S al 'Ankabut ayat 43:

وَتِلْكَ الْأَمْثَالُ نَضْرِبُهَا لِلنَّاسِ وَمَا يَعْقِلُهَا إِلَّا الْعَالِمُونَ

Artinya: “Dan perumpamaan-perumpamaan ini kami buat untuk manusia dan tidak ada yang akan memahaminya kecuali mereka yang berilmu.” (Q.S al ‘Ankabut [29];43).

Ayat diatas menjelaskan bahwa Allah Swt memerintahkan manusia menggunakan akal yang telah diberikan untuk menggali ilmu pengetahuan. Islam memiliki kitab yang mengatur secara rinci dari setiap kehidupan, yang berpegang sesuai dengan al-Quran atau petunjuk Nabi Muhammad saw yang hanya akan diketahui oleh orang-orang yang memiliki keinginan dalam mendalami dan mengkaji segala sesuatu dengan sungguh-sungguh berdasarkan pada ayat-ayat Allah dan hadits Rasulullah. Laut menyimpan banyak keindahan dan manfaat didalamnya. Biota laut memiliki banyak potensi yang dapat digunakan, salah satunya adalah alga merah *Eucheuma cottonii* yang dapat dimanfaatkan untuk kepentingan manusia. Seperti firman Allah dalam Q.S Faathir ayat 12.

وَمَا يَسْتَوِي الْبَحْرَانِ هَذَا عَذْبٌ فُرَاتٌ سَائِغٌ شَرَابُهُ وَهَذَا مِلْحٌ أُجَاجٌ وَمَنْ كُلِّ تَاكُلُونَ لَحْمًا طَرِيًّا وَتَسْتَخْرِجُونَ حُلِيَّةً تَلْبَسُونَهَا وَتَرَى الْفُلْكَ فِيهِ مَوَاجِرَ لِنَبْتَعُوا مِنْ فَضْلِهِ وَلِعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ

Artinya : “Dan tiada sama (antara) dua laut’ yang ini tawar, segar, sedap diminum dan yang lain asin lagi pahit. Dan dari masing-masing laut itu kamu dapat memakan daging yang segar dan kamu dapat mengeluarkan perhiasan yang dapat kamu memakainya, dan pada masing-masingnya kamu lihat kapal-kapal berlayar membelah laut supaya kamu dapat mencari karunia-Nya dan supaya kamu bersyukur.” (Q.S. Faathir [35]:12).

Surat Faathir ayat 12, dijelaskan dalam tafsir Syaikh Abu Bakar Jabir Al-Jazaizi kalimat *لِنَبْتَعُوا مِنْ فَضْلِهِ* bahwa Allah menundukkan kapal dan lautan, “Agar kamu dapat mencari karunia-Nya” yaitu mencari rezeki dengan cara berdagang “agar kamu bersyukur”, yaitu ditundukkannya lautan agar kalian

mencari karunia-Nya agar dapat bersyukur. Kalimat ini menjelaskan bahwa Allah memerintahkan untuk mengkaji ilmu mengenai pemanfaatan biota laut (tanaman dan hewan laut) salah satunya alga merah *Eucheuma cottonii* sehingga dengan penelitian ini manusia dapat menambah khasanah keilmuan dengan menemukan manfaat ciptaan Allah yang di laut agar dipenuhi rasa syukur (لَعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ).

Dalam tafsir Bakar, (2009) Allah tidak mengatakan “*Litasykuru*” karena manusia ada yang bersyukur dan ada yang tidak, maka digunakan kata “*la*”*alla*” (agar, dengan harapan) berbeda dengan kata “*litabtaghu*” karena Allah yang menundukkan secara langsung laut agar manusia mengambil segala manfaatnya. Tafsir al-Muyassar menjelaskan bahwa dua jenis air berbeda, air tawar dan air asin tidak sama jika saling bertemu, keduanya memiliki manfaat dan kandungan masing-masing. Dalam air laut (air asin) terdapat karunia yang sangat besar yaitu hewan laut, perhiasan berupa mutiara. Mutiara tidak hanya diartikan sebagai perhiasan melainkan mutiara sebagai obat untuk berbagai hal dan manusia dapat melakukan telaah ilmu, bersyukur dan mendapatkan manfaatnya dengan mengklarifikasi macam-macam tumbuhan sesuai manfaat masing-masing. Seiring dengan berkembangnya teknologi dan ilmu pengetahuan, maka tumbuhan ini banyak diteliti dan dikaji tentang kandungan dan kegunaannya. Salah satunya adalah penelitian tentang kandungan alga merah *Eucheuma cottonii* yang dapat dijadikan sebagai obat-obatan. Senyawa golongan senyawa steroid dapat digunakan sebagai antioksidan, sebagai penghambat kanker prostat dan uji toksisitas sebagai skrining awal sebagai obat antitumor dan antikanker (Zhang dkk., 2012). Hal ini juga sesuai dengan sebuah riwayat Imam Muslim dari Jabir bin Abdillah, Rasulullah saw bersabda :

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ، فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ

Artinya : “setiap penyakit ada obatnya. Apabila ditemukan obat yang tepat untuk suatu penyakit, maka akan sembuhlah penyakit itu dengan izin Allah azza wajalla.”

Hadits diatas menjelaskan bahwa semua penyakit yang ada di muka bumi ini, Allah Swt telah menurunkan obatnya. Manusia yang diberikan pikiran hendaknya mampu mencari dan mengkaji dengan melakukan penelitian ilmiah dalam segala potensi alam ini sebagai obat dan mengembangkan ilmu pengetahuan khususnya di bidang kesehatan. Salah satu obat yang dapat digunakan di alam ini adalah alga merah *Eucheuma cottonii* yang telah dilakukan dalam penelitian ini. Hal ini dibuktikan dari hasil penelitian bahwa alga merah yang mengandung golongan senyawa steroid ini dapat digunakan sebagai senyawa sitotoksik karena hasil yang diperoleh setelah dilakukan uji toksisitas mendapatkan nilai LC_{50} yang cukup bagus yaitu 10,3737 dan 7,5512 ppm pada isolat steroid yang mengindikasikan senyawa ini sangat toksik atau memiliki efek farmakologi yang sangat baik dan hasil ini dapat digunakan sebagai uji skrining awal sebagai obat antitumor dan antikanker. Maka setelah didapatkan manfaat ini hendaknya sebagai makhluk yang selalu mensyukuri nikmat, bertawakal dan memohon penyembuhan kepada Allah Swt karena tidak ada yang dapat menyembuhkan kecuali atas izin-Nya. Di era yang modern ini hendaknya dalam belajar ilmu pengetahuan (sains) untuk mengikuti perkembangannya. Jika tidak, maka akan tertinggal jauh dibelakang. Di sisi lain, al-Quran juga menganjurkan manusia untuk menuntut ilmu. Sebagaimana yang dijelaskan dalam surat az-Zumar ayat 9 :

أَمَّنْ هُوَ قَانِتٌ آنَاءَ اللَّيْلِ سَاجِدًا وَقَائِمًا يَحْذَرُ الْآخِرَةَ وَيَرْجُو رَحْمَةَ رَبِّهِ قُلْ هَلْ يَسْتَوِي الَّذِينَ يَعْلَمُونَ وَالَّذِينَ لَا يَعْلَمُونَ إِنَّمَا يَتَذَكَّرُ أُولُو الْأَلْبَابِ

Artinya : “(Apakah kamu orang musyrik yang lebih beruntung) ataukah orang yang beribadah di waktu malam dengan sujud dan berdiri, sedang dia takut kepada (azab) akhirat dan mengharapkan rahmat tuhan nya? Katakanlah, “Apakah sama orang-orang yang mengetahui dengan orang-orang yang tidak mengetahui?” Sesungguhnya orang yang berakal sehat yang dapat menerima pelajaran.

Menurut tafsir Jalalain kata **أَمَّنْ** berarti orang yang melakukan amal ketaatan, yaitu shalat dimalam hari dan takut pada azab di hari akhir dan mengharapkan rahmat (surga) apakah dia sama dengan orang yang durhaka karena melakukan perbuatan dosa lainnya. Sedangkan menurut qiraat kata **أَمَّنْ** berarti “adakah sama orang yang mengetahui dengan orang yang tidak mengetahui?” tentu saja tidak, perihalnya sama dengan perbedaan antara orang yang alim dan orang yang jahil. (sesungguhnya orang yang dapat menerima pelajaran) artinya, menerima nasihat (hanyalah orang yang berakal) yakni orang yang mempunyai pikiran dan mau berfikir. Adapun ilmu pengetahuan sebenarnya adalah al-Quran yang membicarakan tujuan ilmu untuk mengetahui tanda-tanda kekuasaan dan menyaksikan kehadiran dengan mengagungkan Allah Swt. Dalam mengembangkan ilmu maka kita harus menemukan keteraturan, hubungan sebab akibat dan tujuan alam semesta yang diciptakan oleh Allah. Semua yang dilimpahkan dalam bumi ini hendaknya diambil manfaat dan segala apa yang ditundukkan dilangit dan bumi ini untuk kepentingan manusia dan harus dikembangkan dengan tidak menimbulkan kerusakan pada bumi ini. Apabila kita memperhatikan ayat al-Quran mengenai pentingnya menuntut ilmu kita akan tahu bahwa perintah itu bersifat umum yaitu pada ilmu agama dan ilmu umum. Kedua

ilmu ini sangat penting untuk mendekatkan diri kepada Allah dan sebagai bentuk pengabdian kepada Allah Swt. Sebagaimana dengan penelitian yang telah dilakukan bahwa senyawa steroid yang dihasilkan dari hasil isolasi dengan kromatografi kolom ini mendapatkan nilai LC_{50} dari hasil uji toksisitas yang sangat baik, sehingga dapat dijadikan sebagai uji skrining awal dan dapat dimanfaatkan sebagai obat anti kanker atau anti tumor. Hasil penelitian ini merupakan bentuk contoh amal sholeh yang dapat dimanfaatkan karena termasuk dalam perbuatan yang baik dan memanfaatkan kekayaan alam yang telah dilimpahkan oleh Allah Swt tanpa menimbulkan kerusakan pada bumi ini.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan dari penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan sebagai berikut :

1. Hasil pemisahan steroid dari alga merah *Eucheuma cottonii* menggunakan kromatografi kolom basah dengan metode elusi gradien diperoleh 2 isolat senyawa golongan steroid yang ditunjukkan dengan munculnya spot tunggal berwarna hijau (isolat B) dengan berat 5,9 mg dan berwarna biru (isolat D) dengan berat 6,6 mg.
2. Isolat steroid alga merah *Eucheuma cottonii* hasil pemisahan dengan kromatografi kolom memberikan nilai LC_{50} yang paling tinggi pada isolat steroid D yaitu 7,55 ppm sedangkan pada isolat steroid B sebesar 10,37 ppm. Nilai LC_{50} tersebut termasuk dalam golongan steroid yang sangat toksik (<30 ppm).
3. Hasil identifikasi isolat B dan D alga merah *Eucheuma cottonii* menggunakan spektroskopi FTIR didapat serapan gugus OH, $C_{sp^3}-H$, $C_{sp^2}-H$, C=C, C-OH sekunder dan gugus khas steroid geminal dimetil yang merupakan serapan khas steroid.

5.2 Saran

Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan metode pemisahan menggunakan cara lain seperti kromatografi vakum cair agar tingkat kemurnian yang diperoleh lebih

tinggi dan diperoleh rendemen yang tinggi. perlu dilakukan identifikasi isolat menggunakan LC-MS/MS. Isolat steroid yang bersifat sangat toksik dapat dilakukan uji lebih lanjut seperti uji aktivitas antikanker dengan menggunakan metode MTT (*Microculture tetrazolium*).



DAFTAR PUSTAKA

- Adhiatama, I., Zainudin, M., Rokhati, N. 2012. Hidrolisis Kitosan Menggunakan Katalis Asam Klorida. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. 1(1):245-251.
- Afif, S., Fasya, A. G., Barizi, A., Rachmawati, A., 2015. Extraction Toxicity Assay and Identification of Active Compounds of Red Algae (*Eucheuma cottonii*) from Sumenep Madura. *Jurnal Alchemy*, 4(2): 101-106.
- Aisyah., Putri, K.A., Suriani., Iswadi., dan Ilyas, A. 2017. Pengaruh Kandungan Senyawa pada Ekstrak Daun Ketapang n-Heksana, Etil Asetat, Metanol, dan Campuran Terhadap Nilai Efisiensi *Dye Sensitized Solar Cell* (DSSC). *Al-kimia*, 5(2): 170.
- Al Jazaizi, S. Abu Bakar Jabir. 2008. *Tafsir Al-Aaisar*. Jakarta: Darus Sunah Press.
- Al Qurthubi, S. I. 2008. *Tafsir Al Qurthubi*. Penerjemah: Ahmad Khotib. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Alfiyaturromah, Ningsih, R., Yusnawan, E. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Etanol, Kloroform dan n-Heksana Alga Coklat *Sargassum Vulgare* Asal Pantai Kapong Pamekasan Terhadap Bakteri *Staphilococcus Aureus* dan *Eschericia coli*. *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, vol. 2. No. 2, hal 101-149.
- Amaliyah, S. 2013. Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia salina* dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Andriani, Z., Fasya A.G., Hanapi, A., 2015 Antibacterial Activity of the Red Algae *Eucheuma cottoni* Extract from Tanjung Coast, Sumenep Madura. *Jurnal Alchemy*. 4(2): 93-100.
- Anggadiredja, J., Irmawati, S., dan Kusmiyati. 2006. *Rumput Laut*. Jakarta : Penerbit Swadaya.
- Anggraini, Vivin. 2018. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom dengan Variasi Gradien Eluen Fraksi Etil Asetat Makroalga *Eucheuma cottonii*. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Antonisamy, J.M., Eahamban, K. 2012. UV-VIS Spectroscopic and HPLC Studies on *Dictyota bartayresiana* Lamour. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(2): 514-518.

- AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist, Inc.* Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Aprilia, Suyatno. 2013 . Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Etil Asetat Tumbuhan Paku *Christella Arida* Dan Uji Pendahuluan Sebagai Antikanker. *UNESA Journal of Chemistry* 2 (3).
- Aras, T. R. 2013. Uji Toksisitas Terhadap Teripang *Holothuria scabra* Terhadap *Artemia salina*. *Skripsi*. Makasar : Universitas Hasanudin.
- Ardji. 2018. Karakterisasi Senyawa Steroid dari Fraksi Diklorometana Batang Tanaman Andong (*Cordylane fruticosa*) dan Aktivitas Sitotoksinya terhadap Sel HeLa. *JKK*. 7(1): 48-52. ISSN 2303-1077.
- Asih, I. A. R., I. W. G. Guniawan, N. M. Desi Ariani. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Golongan Triterpenoid dari Ekstrak n-Heksana Daun Kepuh (*Sterculia foetida L.*) Serta Uji Aktivitas Antiradikal Bebas. *Jurnal Kimia (ISSN 1907-9850)*. Vol. 4. No. 2, hal 135-140.
- Asy Syanqithi, S. 2007. *Tafsir Adhwa'ul Bayan*. Jakarta : Pustaka Azzam.
- Atun, S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Konservasi Cagar Budaya Borobudur*. V. 8. N. 2, hal 53 – 61.
- 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.
- Bakar, B. A. 2009. *Tafsir Jalalain* Jilid 1. Bandung: Sinar Baru al-Gesindo.
- 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.
- Cannell, R. J. P. 1998. *Natural Produk Isolation*. Totowa : Humana Press.
- Chapman VJ, DJ, Chapman. 1980. *Seaweeds and their uses*. Third edition, London, New York: Chapman and Hill, 333.
- Chaudari, H., Chaudari, F., Patel, M., Pradhan, K. P., dan Upadhyay, M. U., 2012. A Review on a Flash Chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Development and Technology*. Vol. 2: hal 80-84.
- Colegate, S. M., Molyneux, R. J. 2007. *Bioactive Natural Products: Determination, Isolation and Structural Determination Second Edition*. Prancis : CRC Press.

- Dast, B., and Srinivas, K. V. N. S. 1992. Minor C29-Steroids From The Marine Red Algae, *Gracilaria Edulis*. *Phytochemistry*, Vol.31, No.7.
- Day, R.A dan Underwood, A.L. 1999. *Analisa Kimia Kuantitatif*. Jakarta: Erlangga
- Diharmi, A., Dedi, F., Nuri, A., dan Endang, S.H. 2011. Karakteristik Komposisi Kimia Rumput Laut Merah *Euचेuma spinosum* yang di Budidayakan dari Perairan Nusa Penida, Takalar, dan Sumenep. *Jurnal Berkala Perikanan Terburuk*, 39(2): 61-66.
- Etika, S. B. dan Suryelita. 2014. Isolasi Steroid dari Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L). *Jurnal Eksakta*, 1: 60-65.
- Fasya, Ahmad Ghanaim., Ahmad Baderous., Armeida Dwi R.M., Suci Amalia., Dewi Sinta M. 2019. Isolation, Identification and Bioactivity of Steroids Compounds From Red Alga *Euचेuma cottonii* Petroleum Ether Fraction. *Intenational Conference on Biology and Applied Science (ICOBAS)*
- Fernandez, V.P., Rocca, L.M., Tomai, P., Fanali, S., Gentili, A. 2017. 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, Khumairo Nur. 2017. Variasi Laju Alir Pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Euचेuma cottonii* Kromatografi Kolom. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Gandjar, I.G. dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gritter, R.J. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Terbitan ke-2 . Terjemahan Kosasih.
- Hafiz, Nur, M. 2017. Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Metanol, Kloroform Dan n-Heksana *Hydrilla Verticillata* (L.F) Royle Dari Danau Ranu Kabupaten Pasuruan Terhadap Larva Udang *Artemia Salina L*. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hanapi, A., Fasya, A. G., Mardiyah, U., Miftahurrahmah. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Metanol Alga Merah (*Euचेuma spinosum*) dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *Jurnal Alchemy*. Vol. 2, No. 2, hal 126-137.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode fitokimia Penuntun cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. (terjemahan, Kosasih Padmawinata). ITB (Buku asli 1984). Bandung.

- Hartini, R. S. dan Suyatno. 2016. Non Fenolik Dari Ekstrak Diklorometana Batang Tumbuhan Ashitaba (*Angelica keiskei*) Identification And Preliminary Testing Anticancer Activity From The Stems Ashitaba (*Angelica keiskei*) Of Dicloromethana Extract, (September), 81-86.
- Hendayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung: Remaja Rosdakarya.
- Hidayat, A. 2006. *Budidaya Rumput Laut*. Surabaya : Penerbit Usaha Nasional.
- Indrayani L., Soetjipto H., dan Sihasale L. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Starchytarpheta jamaicensis L. Vahl*) terhadap Larva Udang *Artemia Salina Leach Berk. Jurnal Penelitian Hayati*. Vol. XII, hal 57-61.
- Jannah, Miftahul. A. Hanapi, dan A. Ghanaim, F. 2014. Uji Toksisitas dan Fitokimia Ekstrak Kasar Metanol, Kloroform dan n-Heksana Alga Coklat *Sargassum vulgare* dari Pantai Kapong Pamekasan Madura. *Alchemy*. Vol.3, No. 2. 194-203.
- Khalaf, I. Andreia C., Laurian V., Bianca I., Doina L. 2011. LC/MS Analysis of Sterolic Compounds From Glycyrrhiza Glabra. *Jurnal STUDIA UBB CHEMIA, LVI,3 2011* (p. 97-102).
- Khasanah, Nur Fitriani. 2018. Uji Toksisitas Senyawa Aktif Fraksi n-Heksana, Kloroform, dan n-Butanol *Hydrilla Verticillata* Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol dari Perairan Danau Ranu Pasuruan. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- 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.
- Khopkar SM. 2007. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. A Saptorahardjo, penerjemah. Jakarta: UI Press. Terjemahan dari: Basic Concepts of Analytical Chemistry.
- Kondeti, R. R., Mulpuri, K. S., Meruga, B. 2014. Advancements in Column Chromatography : A Review. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*.
- Kristanti, A. N., Nanik, S. A., Mulyadi, T., Bambang, K.. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Kusmiyati, Aznam N., dan Handayani S. 2011. Isolation and Identification of Active Compound Methanol Extract of Curcuma mangga Val Rhizomes of Ethyl Acetate Fraction. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. Yogyakarta: Universitas Ahmad Dahlan. Vol. 1. No. 2.

- Kusumastanto, T. 2011. Pengembangan Sumber daya Kelautan dalam Memperkokoh Perkonomian Nasional Abad 21. *Tugas Akhir Tidak Diterbitkan*. Bogor: Insitut Pertanian Bogor.
- Kutsiyah. 2012. Penentuan Kandungan Senyawa Fenolik Total Dan Kapasitas Antioksidan Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Pantai Lobak Madura. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Laili, Rumzil. 2016. Uji Aktivitas Antioksidan Dan Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma cottonii*). *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Lawoko, M., Sagar, D., Adriaan, R. P. van H. 2009. Pre-Hydrolysis of The Phenyl Glycosidic Bond in a Model Compound. *Lenzinger Berichte*: 77-87.
- Lenny, S. 2006. *Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida dan Alkaloida*. Medan: MIPA Universitas Sumatera Utara.
- Lisiyana, N., Hayati, E.K., Dewi, D.C. 2016. Isolasi Senyawa Alkaloid Pada Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica L*) Dengan Variasi Kecepatan Laju Alir Menggunakan Kromatografi Kolom. *Alchemy Journal Of chemistry*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Lutfiyanti, R., Ma'ruf, W.F., dan Dewi, E.N. 2012. Aktivitas Antijamur Senyawa Bioaktif Ekstrak *Gelidium latifolium* terhadap *Candida albicans*. *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*. 1(1): 26-33.
- Luthfiyah, E.N. 2017. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Perairan Wongsorejo Banyuwangi Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dan LC-MS. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Madjid, Armeida Dwi Ridhowati., Dwi Anik R., Ahmad Ghanaim F. 2020. Variasi Komposisi Eluen pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* dengan Kromatografi Kolom Basah. *Alchemy: Journal Of Chemistry*, 8:1.35-40.
- Mardaneni, Isma. 2017. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Alga Merah *Eucheuma cottonii* Perairan Wongsorejo Banyuwangi Menggunakan Metode KLT dan LC-MS. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Mardiyah, U. 2012. Ekstraksi, Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma Spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Mclaughlin, J. L. 1991. *Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shirmp Lethality : Two Simple Biassay for Higher Plant Screening and Fractination*. *Methods in Plants Biochemistry*. Academia Pree.

- Meyer, B. N. Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., McLaughlin J. L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*. 45: 31-34.
- Mubarokah, F. A. 2017. Variasi Diameter Kolom pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* Metode Kromatografi Kolom. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Mulyani, M., Bustanul A., Hazil N. 2013. Uji Antioksidan dan Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Daun Srikaya (*Annona squamosa* L). *Jurnal Kimia Unand, Volume 2 Nomor 1, Maret 2013*.
- Nasliyana, S. 2013. Uji Toksisitas Ekstrak Biji Sirsak (*Annonamuricata* Linn) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktifnya. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Nihlati, I., Abdul, R., Triana, H. 2008. Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* (roxb) dengan Metode Penangkap DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*). *Skripsi*. Yogyakarta: UGM Press.
- Ningsih, E. M., Fasya, A. G., Adi, T. K., Hanapi, A. 2015. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid pada Fraksi n-heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma spinosum*. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Novadiana, A. P. D., Nurita A. dan Rachmat F. 2014. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid Fraksi Kloroform dari Fraksinasi Ekstrak Metanol Daun Kerebau (*Callicarpa longifolia* Lam). *Jurnal Kimia Mulawarman* Vol 12. No 1. ISSN 1693-5616.
- Noviyanti. 2010. Modifikasi Teknik Kromatografi Kolom untuk Pemisahan Triglicerida dari Ekstrak Buah Merah (*Pandanus conoideus lamk*). *Skripsi*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret Surakarta.
- Palleros, Daniel R, John Wiley. Sons. 2000. Experimental Organic Chemistry. *Organic Process Research and Development*. 5, 666-670.
- Panji, T. 2012. Teknik Spektroskopi untuk Elusidasi Struktur Molekul. Yogyakarta: Graha Ilmu
- 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*, Vol 10. No 2: 85-89.
- Pramitania, Vioreta Aprilia. 2019. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi n-Heksana Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Pratiwi, Rynanda Ajeng. 2019. Uji Toksisitas Hasil Isolat Steroid Kromatografi Kolom Fraksi n-Heksana Mikroalga *Chlorella* sp. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Primer, A. 2001. Agilent Technology the HPLC/MSD System has been Design and Manufactured Under a Quality System That has Been Registered to ISO 9001. *Hewlett Packard Published*.
- Qurthubi, S. I. 2008. *Tafsir al-Qurthubi*. Jakarta : Pustaka Azzam.
- 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.
- Rahmawati, Dwi Anik. 2017. Variasi Komposisi Eluen pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Makroalga (*Eucheuma cottonii*) dengan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ratnasari, Ira. 2017. Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis dan Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan LC-MS pada Fraksi n-Butanol Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Diterjemahkan Prof. Dr. Kosasih Padmawinata (2003). Bandung: ITB.
- Rudiyanto. 2013. Kajian Kapasitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Kandungan Fenolik Total Ekstrak Alga Merah Jenis *Euchemia cottonii* dari Perairan Sumenep. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Saifudin, A. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder Teori Konsep dan Teknik Pemurnian*. Yogyakarta: CV Budi Utama.
- Saleh, C. 2007. Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Steroid dari Akar Tumbuhan Cendana (*Santallum album linn*). *Disertasi*. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Sastrohamidjojo. 2005. *Kromatografi*. Yogyakarta : UGM Press.
- Septiandari, N. 2016. Isolasi Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma spinosum* Menggunakan Kromatografi Kolom Cara Kering dan Basah. *Skripsi* tidak diterbitkan. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Sharo, N. M., Ningsih R., Nasichuddin, A., Hanapi, A., 2013. Uji Toksisitas dan Identifikasi Senyawa Ekstrak Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Jurnal Alchemy*. Vol. 2, No. 3, hal 170-177.

- Sholikah, Arieska 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 Malang.
- Stahl, E. 1985. *Analisis Obat secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Edisi terjemahan (diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Iwang Soediro). Bandung : ITB press.
- Sudarmadji, S., Haryono, B., Suhardi. 1996. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty Yogyakarta.
- Sukandana I.M. 2011. Kandungan Senyawa Steroid-Alkaloid pada Ekstrak nHeksana Daun Beringin (*Ficus benjamina L*). *Jurnal Kimia* 5. Bukit Jimbaran: Universitas Udayana.
- Swantara, Dira. 2010. Identifikasi Fraksi Toksik Ekstrak Rumput Laut *Eucheuma cottonii Lin*. *Indonesian Journal Of Cancer*. Vol. 4. No. 2, ISSN 2356-6811.
- Trianto A, Wibowo E, Suryono dan Sapta R. 2004. Ekstrak Daun Mangrove *Aegiceras corbiculatum* Sebagai Antibakteri *Vibrio harveyi* dan *Vibrio parahaemolyticus*. *Ilmu Kelautan* 9:186-189.
- 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.
- Utama, Permana. 2018. Variasi Rasio Sampel dan Silika Gel dalam Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma spinosum* dengan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Varier, K.M., Milton, M.C., Arulvasu, C., dan Gajendran, B. (2013). Evaluation of Antibacterial Properties of Selected Red Seaweeds from Rameshwaram Tamil Nadu India. *Journal of Academia and Industrial Research*. 1(11): 667-670.
- Vogel. 1978. *Buku Teks Analisis Anorganik Kualitatif Makro dan Semimakro*. Jakarta : PT Kalman Media Pustaka.
- 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.
- Widodo, N. 2007. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid yang Terkandung dalam Jamur Tiram Putih (*Arcangelisia flava merr*). *Jurnal Ilmu Dasar*. FMIPA Universitas Surabaya.

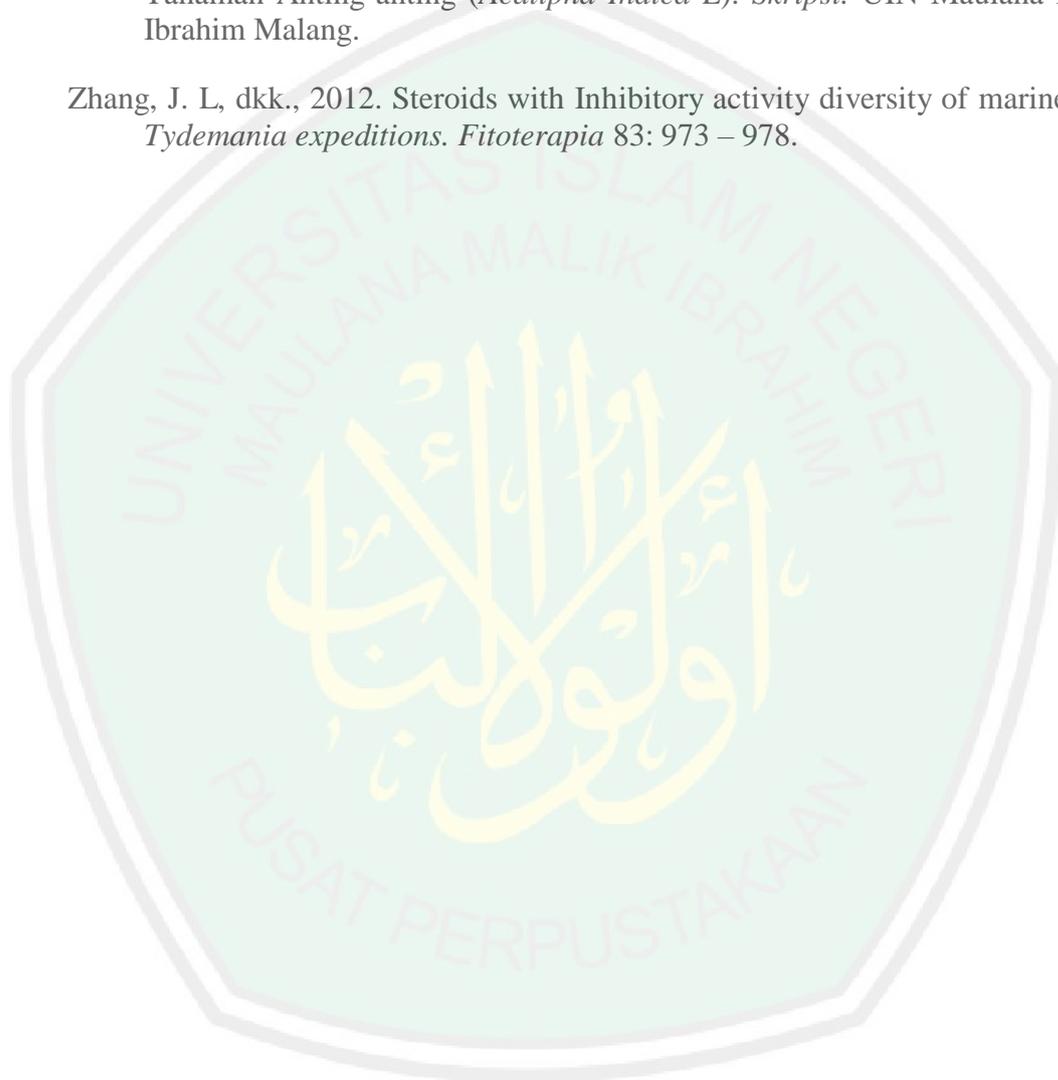
Williams, D.H., Fleming, I. 2008. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. UK: McGraw-Hill International.

Wonoraharjo, Sarjani. 2013. *Metode-metode Pemisahan Kimia*. Jakarta: Akademia Permata.

Yunizal. 2004. *Teknologi Pengolahan Alginat*. BRKP. Jakarta.

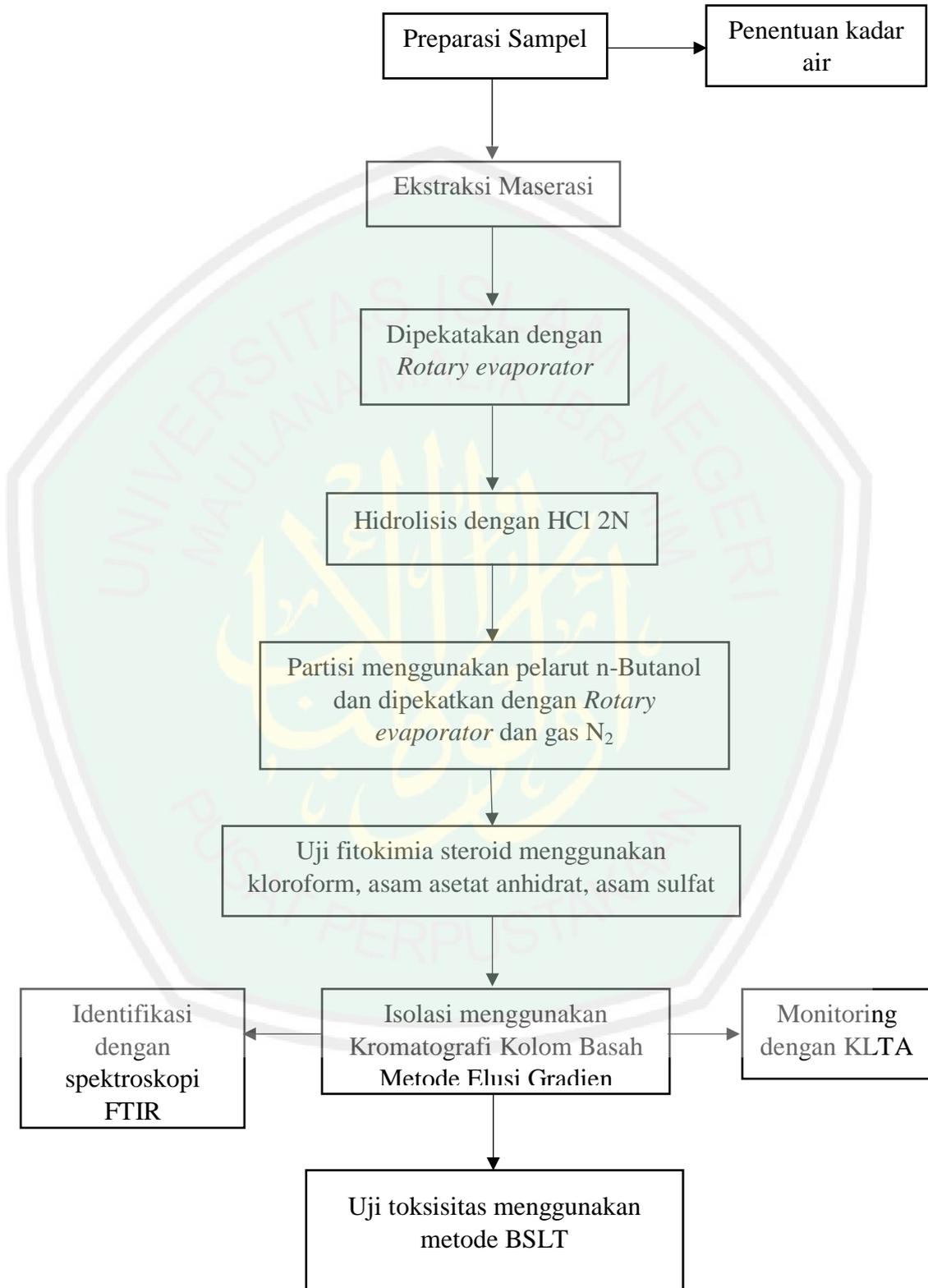
Zamroni, M. 2011. Uji Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Aktif Tanaman Anting-anting (*Acalipha Indica L*). *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Zhang, J. L, dkk., 2012. Steroids with Inhibitory activity diversity of marine alga *Tydemania expeditions*. *Fitoterapia* 83: 973 – 978.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan penelitian



Lampiran 2. Diagram Alir**1. Preparasi *Eucheuma cottonii***

Eucheuma cottonii

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

Hasil

2. Analisa Kadar Air

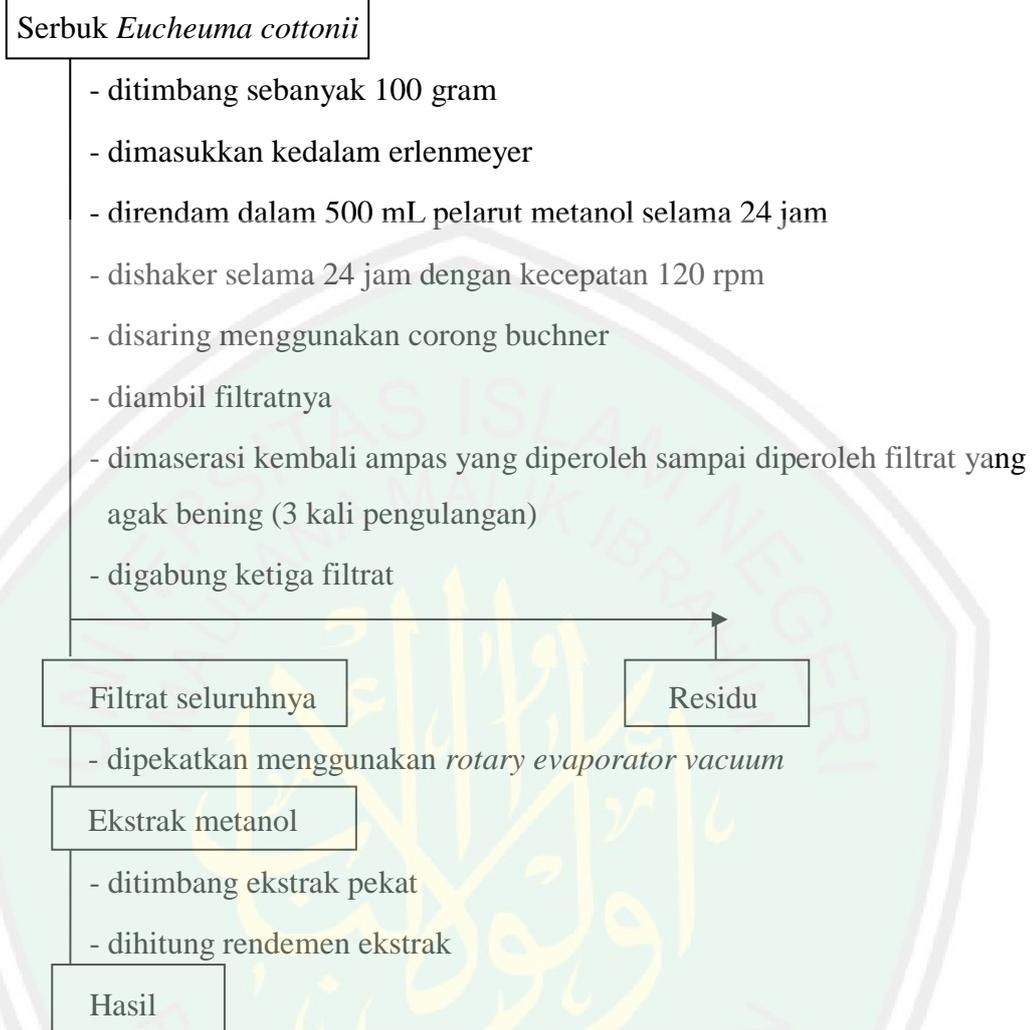
Serbuk *Eucheuma cottonii*

- ditimbang sebanyak 1 gram
- dimasukkan kedalam cawan porselen yang sudah dioven
- dioven pada suhu 100-105 °C selama ± 60 menit
- didinginkan dalam desikator selama 15 menit
- ditimbang kembali
- diulangi sampai diperoleh berat yang konstan
- dihitung dengan persamaan: $\text{Kadar air} = \frac{b-c}{b-a} \times 100\%$

Hasil

3. Ekstraksi *Eucheuma cottonii*

3.1 Ekstraksi Maserasi



3.2 Hidrolisis dan Partisi

Ekstrak pekat metanol

- ditimbang sebanyak 5 gram dan dimasukkan ke beaker glass
- ditambahkan 10 mL asam klorida (HCl) 2 N
- dihidrolisis selama 1 jam menggunakan *magnetic stirrer hot plate* pada suhu ruang

Hidrolisat

- ditambahkan natrium bikarbonat sampai pH-nya netral
- dipartisi menggunakan 25 mL n-butanol dengan tiga kali pengulangan

Ekstrak

- dipekatkan ketiga fraksi menggunakan *rotary evaporator vacum*
- dialiri gas N₂

Ekstrak pekat

- ditimbang
- dihitung rendemennya

Hasil

3.3 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 (95:5) dan silika gel dengan *magnetic stirrer* diatas *hot plate* sampai terbentuk suspense (1 jam)
- dimasukkan suspense ke dalam kolom menggunakan corong dan diketuk-ketuk dinding kolom
- dibuka kran bagian kolom setelah terbentuk lapisan setebal 2 cm
- dibiarkan kolom beberapa saat agar cairan yang berada diatas adsorben menjadi jernih
- didiamkan kolom selama >24 jam

Hasil

3.4 Pemisahan dengan Metode Kromatografi Kolom

Ekstrak pekat Fraksi n-butanol

- disiapkan fasa diam kolom yang telah didiamkan
- dimasukkan 0,067 sampel ke dalam kolom sesuai perbandingan 1:150
- dimasukkan eluen campuran n-heksana dan etil asetat dengan metode elusi gradien dengan perbandingan diawali dari 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, dan 70:30
- ditampung eluat setiap 2 mL pada botol vial
- dihentikan proses elusi setelah semua senyawa steroid diperkirakan telah keluar dari kolom

Hasil

3.5 Monitoring dengan KLTA

Fraksi hasil Kromatografi Kolom

- disiapkan eluen campuran n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 17:3 dalam bejana pengembang
- dijenuhkan selama 1 jam
- dioven plat KLT pada suhu 100°C selama 30 menit
- ditotolkan masing-masing kelompok fraksi sebanyak 10 kali totalan
- dimasukkan dalam bejana pengembang berisi eluen yang telah dijenuhkan
- diamati noda yang terbentuk

Hasil

3.6 Penggabungan Vial dan Pemekatan

Spot hasil monitoring

- dilihat spot dengan Rf yang sama
- disemprotkan pereaksi *Lieberman-Burchard*
- ditandai fraksi yang memiliki warna hijau
- digabungkan fraksi

Hasil

4. Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Sampel

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

Hasil

5. Uji Toksisitas Makroalga *Eucheuma cottonii* terhadap Larva Udang *Artemia Salina L.*

5.1 Penetasan larva udang

250 mL air laut

- dimasukkan dalam botol penetasan
- dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina L*
- dimasukkan ragi sebanyak 3 mg dalam 5 mL aquades
- diaerasi dan diberi lampu
- ditunggu hingga menetas selama 48 jam

Hasil

5.2 Uji toksisitas

Isolat steroid

- diambil sebanyak 10 mL
- dipipet masing-masing sebanyak 0,5; 1; 1,5; 2 dan 2,5 μL
- dimasukkan kedalam botol vial dan pelarutnya diuapkan hingga kering
- dimasukkan 100 μL dimetil sulfoksida, larutan ragi roti, 2 mL air laut
- dikocok dengan vortex hingga sampel dapat larut dalam air laut
- dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina L*
- ditambahkan air laut hingga volumenya menjadi 10 mL
- dihitung kematian larva udang setelah 24 jam

Hasil

6. Identifikasi Golongan Senyawa Steroid dengan FTIR

Isolat steroid

- digerus sampel dengan garam KBr dalam mortar agate
- diberi tekanan 8 torr selama 10 menit lalu divakum
- dipindah pellet ke dalam holder
- dianalisis dengan FTIR

Hasil

Lampiran 3. Pembuatan Reagen dan Larutan

1. Pembuatan Larutan HCl 2 N

BJ HCl pekat = 1,267 g/mL

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

BM HCl = 36,5 g/mol

$n = 1$ (jumlah mol ion H^+)

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

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

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

Normalitas = $n \times$ Molaritas

$$= 1 \times 12,85 \text{ M} = 12,85 \text{ N}$$

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

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

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

Adapun prosedur pembuatannya adalah diambil larutan HCl pekat 37% sebanyak 16,5 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 NaHCO_3

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

3. Pembuatan Reagen *Lieberman-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 ditambahkan dengan 0,5 mL anhidrida asetat. Campuran ini

selanjutnya ditambah dengan 1-2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung reaksi. Cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan keberhasilan terbentuknya reagen *Lieberman-Burchard*.

4. Pembuatan Eluen n-heksana : etil asetat

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

4.1 Eluen Kromatografi kolom

➤ 95:5

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

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

➤ 90:10

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

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

➤ 85:15

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

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

➤ 80:10

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

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

➤ 75:25

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

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

➤ 70:30

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

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

4.2 Eluen monitoring KLTA

- Volume n-heksana (18 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 25 mL pelarut

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

$$50 \text{ ppm} = \frac{\text{mg}}{0,025 \text{ L}}$$

$$\text{mg} = 1 \text{ mg}$$

Jadi untuk membuat 25 mL larutan sampel 50 ppm yaitu diperlukan 1,25 mg.

Kemudian di vortex hingga homogen.

6. Pembuatan Larutan Sampel Uji Toksisitas 1,2,3,4, dan 5 ppm

- 1 ppm

$$\text{ppm}_1 \times V_1 = \text{ppm}_2 \times V_2$$

$$1 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} = 50 \text{ ppm} \times V_2$$

$$V_2 = \frac{5 \text{ mL} \times 1 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}} = 0,1 \text{ mL}$$

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

- 2 ppm

$$\text{ppm}_1 \times V_1 = \text{ppm}_2 \times V_2$$

$$2 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} = 50 \text{ ppm} \times V_2$$

$$V_2 = \frac{5 \text{ mL} \times 2 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}} = 0,2 \text{ mL}$$

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

➤ 3 ppm

$$\text{ppm}_1 \times V_1 = \text{ppm}_2 \times V_2$$

$$3 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} = 50 \text{ ppm} \times V_2$$

$$V_2 = \frac{5 \text{ mL} \times 3 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}} = 0,3 \text{ mL}$$

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

➤ 4 ppm

$$\text{ppm}_1 \times V_1 = \text{ppm}_2 \times V_2$$

$$4 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} = 50 \text{ ppm} \times V_2$$

$$V_2 = \frac{5 \text{ mL} \times 4 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}} = 0,4 \text{ mL}$$

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

➤ 5 ppm

$$\text{ppm}_1 \times V_1 = \text{ppm}_2 \times V_2$$

$$5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} = 50 \text{ ppm} \times V_2$$

$$V_2 = \frac{5 \text{ mL} \times 5 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}} = 0,5 \text{ mL}$$

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

Lampiran 4. Data Pengamatan dan Perhitungan Hasil Penelitian

4.1 Perhitungan Randemen Hasil Preparasi

Diketahui :

Berat segar = 19 Kg

Berat serbuk = 0,905 Kg

$$\begin{aligned} \text{Randemen} &= \frac{\text{berat serbuk}}{\text{berat segar}} \times 100\% \\ &= \frac{0,905}{19} \times 100\% \\ &= 4,76\% \end{aligned}$$

4.2 Data Pengukuran Kadar Air Sampel Kering *Eucheuma cottonii*

4.1.1 Data Berat Cawan Kosong

Jumlah Cawan	Berat Sebelum di Oven	Ulangan Cawan 1	Ulangan Cawan 2	Ulangan Cawan 3	Berat Konstan
A1	55,8077	55,8046	55,8045	55,8046	55,8046
A2	53,6632	53,6553	53,6552	53,6553	53,6553
A3	55,3549	55,2986	55,2988	55,2989	55,2989
A4	54,2349	54,2222	54,2220	54,2221	54,2221

4.1.2 Data Berat Cawan + Sampel

Jumlah Cawan	Berat Sebelum di Oven	Ulangan Cawan 1	Ulangan Cawan 2	Ulangan Cawan 3	Berat Konstan
A1	56,8046	56,7495	56,7480	56,7449	56,7449
A2	54,6553	54,6012	54,6012	54,6013	54,6013
A3	56,2989	56,2434	56,2436	56,2434	56,2434
A4	55,2221	55,1657	55,1659	55,1658	55,1658

1. Kadar air sampel pada cawan A1

$$\begin{aligned} \text{kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum oven})-(\text{berat cawan+sampel setelah oven})}{\text{berat cawan+sampel sebelum di oven}-(\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\ &= \frac{56,8046-56,7449}{56,8046-55,8046} \times 100\% = 5,97\% \end{aligned}$$

2. Kadar air sampel pada cawan A2

$$\begin{aligned} \text{kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum oven})-(\text{berat cawan+sampel setelah oven})}{\text{berat cawan+sampel sebelum di oven}-(\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\ &= \frac{54,6553-54,6013}{54,6553-53,6553} \times 100\% = 5,40\% \end{aligned}$$

3. Kadar air sampel pada cawan A3

$$\begin{aligned} \text{kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum oven})-(\text{berat cawan+sampel setelah oven})}{\text{berat cawan+sampel sebelum di oven}-(\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\ &= \frac{56,2989-56,2434}{56,2989-55,2989} \times 100\% = 5,568\% \end{aligned}$$

4. Kadar air sampel pada cawan A4

$$\begin{aligned} \text{kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum oven})-(\text{berat cawan+sampel setelah oven})}{\text{berat cawan+sampel sebelum di oven}-(\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\ &= \frac{55,2221-55,1658}{55,2221-54,2221} \times 100\% = 5,461\% \end{aligned}$$

5. Kadar air rata-rata dari 4 cawan

$$\begin{aligned} &= (\text{Cawan 1} + \text{cawan 2} + \text{cawan 3} + \text{cawan 4}) : 4 \\ &= (5,97\% + 5,40\% + 5,568\% + 5,461\%) : 4 \\ &= 5,5997\% \end{aligned}$$

4.3 Perhitungan Rendemen

4.3.1 Perhitungan Rendemen Hasil Maserasi dengan Metanol

Diketahui :

Berat sampel awal = 100 gram

Berat Gelas Kosong = 25,6213 gram

Berat Gelas Kosong + Ekstrak Peekat = 36,6213gram

$$\text{Berat ekstrak} = 10,6201 \text{ gram}$$

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{10,6201}{100} \times 100\% \\ &= 10,62\% \end{aligned}$$

4.3.2 Perhitungan Rendemen Hasil Partisi dengan n-Butanol

Diketahui :

$$\text{Berat ekstrak metanol} = 5 \text{ gram}$$

$$\text{Berat Gelas Kosong} = 142,2075 \text{ gram}$$

$$\text{Berat Gelas Kosong + Fraksi} = 143,5604 \text{ gram}$$

$$\text{Berat fraksi n-Butanol} = 1,3529 \text{ gram}$$

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat fraksi n-butanol}}{\text{berat ekstrak metanol}} \times 100\% \\ &= \frac{1,3529}{5} \times 100\% \\ &= 27,058\% \end{aligned}$$

4.4 Lampiran Perhitungan Rf Hasil Monitoring KLTA

a. Fraksi B

$$R_f = \frac{\text{jarak senyawa (cm)}}{\text{jarak elusi (cm)}} = \frac{3,6}{8} = 0,45$$

b. Fraksi C

$$R_f = \frac{\text{jarak senyawa (cm)}}{\text{jarak elusi (cm)}} = \frac{3,6}{8} = 0,45$$

$$R_f = \frac{\text{jarak senyawa (cm)}}{\text{jarak elusi (cm)}} = \frac{2,9}{8} = 0,3625$$

c. Fraksi D

$$R_f = \frac{\text{jarak senyawa (cm)}}{\text{jarak elusi (cm)}} = \frac{2,9}{8} = 0,3625$$

d. Fraksi E

$$R_f = \frac{\text{jarak senyawa (cm)}}{\text{jarak elusi (cm)}} = \frac{2,5}{8} = 0,3125$$

e. Fraksi F

$$R_f = \frac{\text{jarak senyawa (cm)}}{\text{jarak elusi (cm)}} = \frac{2,5}{8} = 0,3125$$

$$R_f = \frac{\text{jarak senyawa (cm)}}{\text{jarak elusi (cm)}} = \frac{1,8}{8} = 0,225$$

f. Fraksi G

$$R_f = \frac{\text{jarak senyawa (cm)}}{\text{jarak elusi (cm)}} = \frac{2,5}{8} = 0,3125$$

$$R_f = \frac{\text{jarak senyawa (cm)}}{\text{jarak elusi (cm)}} = \frac{1,8}{8} = 0,225$$

$$R_f = \frac{\text{jarak senyawa (cm)}}{\text{jarak elusi (cm)}} = \frac{1,4}{8} = 0,175$$

g. Fraksi H

$$R_f = \frac{\text{jarak senyawa (cm)}}{\text{jarak elusi (cm)}} = \frac{1,8}{8} = 0,225$$

$$R_f = \frac{\text{jarak senyawa (cm)}}{\text{jarak elusi (cm)}} = \frac{1,4}{8} = 0,175$$

h. Fraksi I

$$R_f = \frac{\text{jarak senyawa (cm)}}{\text{jarak elusi (cm)}} = \frac{1,4}{8} = 0,175$$

$$R_f = \frac{\text{jarak senyawa (cm)}}{\text{jarak elusi (cm)}} = \frac{1,0}{8} = 0,125$$

i. Fraksi J

$$R_f = \frac{\text{jarak senyawa (cm)}}{\text{jarak elusi (cm)}} = \frac{0,4}{8} = 0,05$$

Lampiran Hasil monitoring KLTA

No	Isolat	Vial	Warna UV _{254/366}	Jarak Senyawa (cm)	Jarak elusi (cm)	Rf	Dugaan Senyawa
1.	A	1-61	-	-	-	-	-
2.	B	62-72	Hijau	3,6	8	0,45	Steroid
3.	C	73-79	Hijau	3,6	8	0,45	Steroid
			Biru	2,9		0,3625	
4.	D	80-91	Biru	2,9	8	0,3625	Steroid
5.	E	92-98	Merah	2,5	8	0,3125	Triterpenoid
6.	F	99-108	Merah	2,5	8	0,3125	Triterpenoid
				1,8		0,225	
7.	G	109-124	Merah	2,5	8	0,3125	Triterpenoid
				1,8		0,225	
				1,4		0,175	
8.	H	125-156	Merah	1,8	8	0,225	Triterpenoid
				1,4		0,175	
9.	I	157-189	Merah	1,4	8	0,175	Triterpenoid
				1,0		0,125	
10.	J	190-234	Merah	0,4	8	0,05	Triterpenoid

4.5 Perhitungan Randemen Kromatografi Kolom

$$\% \text{ Randemen} = \frac{\text{berat kolom}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

a. Kolom B

$$\begin{aligned} \% \text{ Randemen} &= \frac{0,0059}{0,067} \times 100\% \\ &= 8,8060 \% \end{aligned}$$

b. Kolom C

$$\begin{aligned} \% \text{ Randemen} &= \frac{0,0027}{0,067} \times 100\% \\ &= 4,0298 \% \end{aligned}$$

c. Kolom D

$$\begin{aligned} \% \text{ Randemen} &= \frac{0,0066}{0,067} \times 100\% \\ &= 9,8507 \% \end{aligned}$$

d. Kolom E

$$\begin{aligned} \% \text{ Randemen} &= \frac{0,0043}{0,067} \times 100\% \\ &= 6,4179 \% \end{aligned}$$

e. Kolom F

$$\begin{aligned} \% \text{ Randemen} &= \frac{0,0026}{0,067} \times 100\% \\ &= 3,8806 \% \end{aligned}$$

f. Kolom G

$$\begin{aligned} \% \text{ Randemen} &= \frac{0,0056}{0,067} \times 100\% \\ &= 8,3582 \% \end{aligned}$$

g. Kolom H

$$\begin{aligned} \% \text{ Randemen} &= \frac{0,0071}{0,067} \times 100\% \\ &= 10,5970 \% \end{aligned}$$

h. Kolom I

$$\begin{aligned} \% \text{ Randemen} &= \frac{0,0066}{0,067} \times 100\% \\ &= 9,8507 \% \end{aligned}$$

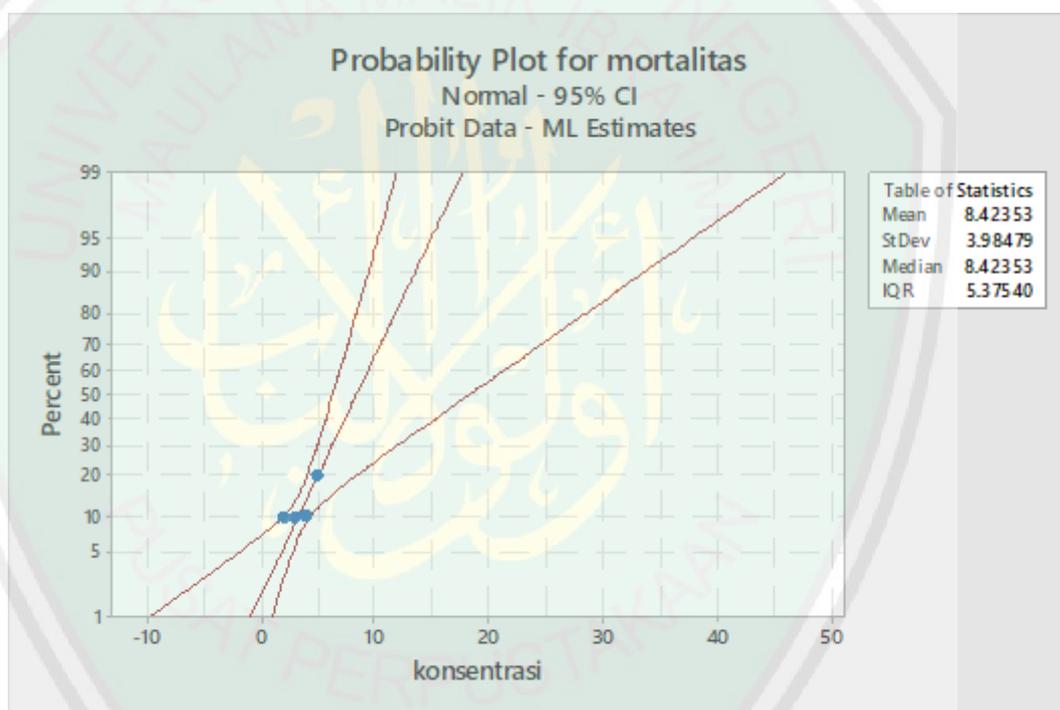
i. Kolom J

$$\begin{aligned} \% \text{ Randemen} &= \frac{0,0049}{0,067} \times 100\% \\ &= 7,3134\% \end{aligned}$$

4.6 Data Hasil Uji Toksisitas

a. Fraksi n-Butanol *Eucheuma cottonii*

konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang Mati (ekor)						% mortalitas
	I	II	III	IV	V	Modus	
0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	2	0	0	1	0	0
2	1	1	1	0	1	1	10
3	1	1	2	0	1	1	10
4	2	1	1	1	2	1	10
5	1	3	1	2	2	2	20



Probit Analysis: mortalitas Fraksi n-Butanol, N versus konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	25
	Non-event	225
N	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-2.11392	0.319625	-6.61	0.000
konsentrasi Natural Response	0.250954 0	0.0853619	2.94	0.003

Log-Likelihood = -76.549

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	4.35256	3	0.226
Deviance	5.53363	3	0.137

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

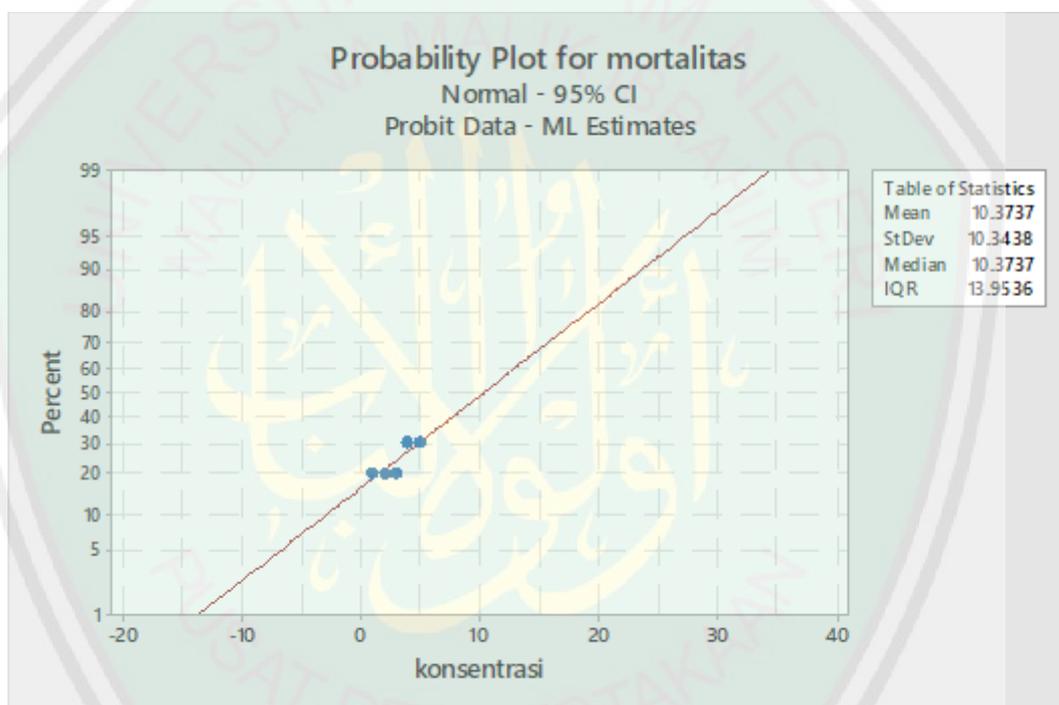
Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	8.42353	1.73046	5.03188	11.8152
StDev	3.98479	1.35542	2.04583	7.76140

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-0.846475	1.54665	-9.68512	1.02499
2	0.239774	1.19757	-6.46779	1.71827
3	0.928964	0.983850	-4.44324	2.17488
4	1.44741	0.830474	-2.93702	2.53514
5	1.86913	0.713586	-1.73085	2.84721
6	2.22808	0.622904	-0.727306	3.13592
7	2.54281	0.553422	0.123479	3.41820
8	2.82461	0.502536	0.848072	3.70812
9	3.08090	0.468648	1.46063	4.01822
10	3.31682	0.450300	1.97016	4.35801
20	5.06984	0.693465	4.10892	8.53035
30	6.33390	1.05957	5.00671	12.1833
40	7.41399	1.40144	5.70724	15.3712
50	8.42353	1.73046	6.34194	18.3710
60	9.43306	2.06417	6.96700	21.3803
70	10.5131	2.42419	7.62968	24.6061
80	11.7772	2.84793	8.40044	28.3861
90	13.5302	3.43815	9.46424	33.6334
91	13.7661	3.51773	9.60709	34.3398
92	14.0224	3.60422	9.76221	35.1074
93	14.3042	3.69936	9.93270	35.9514
94	14.6190	3.80566	10.1230	36.8941
95	14.9779	3.92694	10.3400	37.9694
96	15.3996	4.06949	10.5948	39.2329
97	15.9181	4.24483	10.9079	40.7863
98	16.6073	4.47803	11.3238	42.8515
99	17.6935	4.84582	11.9789	46.1071

b. Isolat B *Eucheuma cottonii*

konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang Mati (ekor)						% mortalitas
	I	II	III	IV	V	Modus	
0	0	0	0	0	0	0	0
1	3	0	2	2	1	2	20
2	3	2	2	2	1	2	20
3	0	1	2	3	2	2	20
4	3	3	4	2	3	3	30
5	3	2	3	3	3	3	30



Probit Analysis: mortalitas Isolat B, N versus konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	60
	Non-event	190
N	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1.00289	0.210474	-4.76	0.000
konsentrasi Natural Response	0.0966763	0.0617649	1.57	0.118
	0			

Log-Likelihood = -136.537

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	0.773112	3	0.856
Deviance	0.781311	3	0.854

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

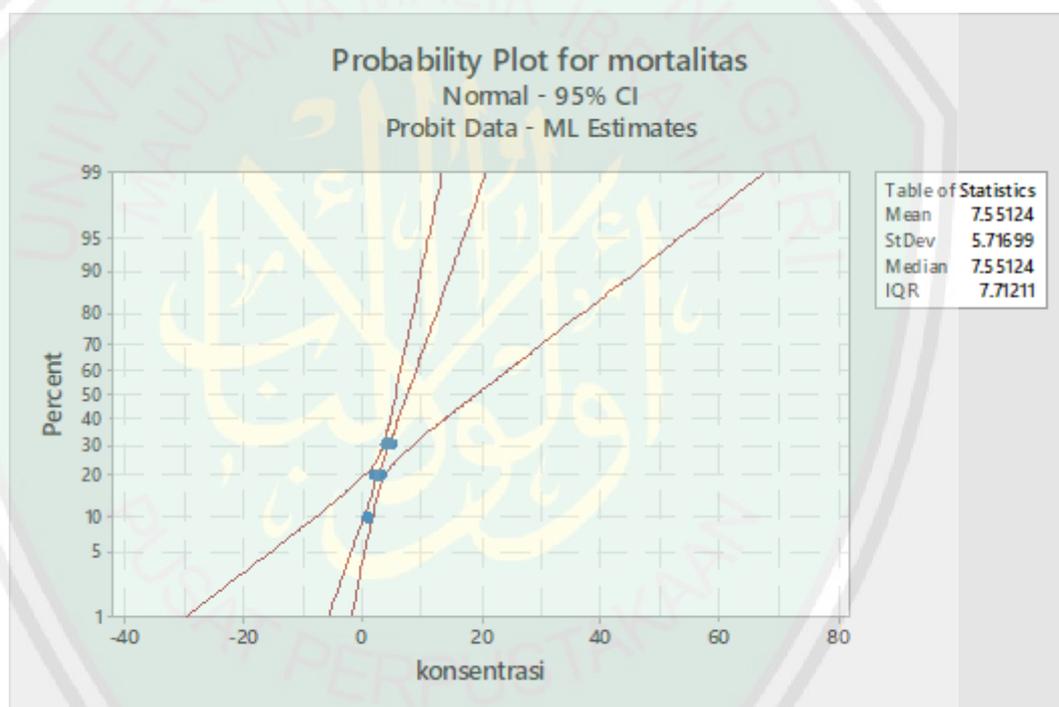
Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	10.3737	4.73314	1.09689	19.6505
StDev	10.3438	6.60848	2.95707	36.1825

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-13.6896	10.7652	*	*
2	-10.8699	8.97135	*	*
3	-9.08087	7.83502	*	*
4	-7.73506	6.98163	*	*
5	-6.64035	6.28876	*	*
6	-5.70858	5.70027	*	*
7	-4.89160	5.18555	*	*
8	-4.16010	4.72603	*	*
9	-3.49482	4.30958	*	*
10	-2.88243	3.92787	*	*
20	1.66812	1.28552	*	*
30	4.94939	1.48618	*	*
40	7.75311	3.10606	*	*
50	10.3737	4.73314	*	*
60	12.9943	6.38466	*	*
70	15.7980	8.16185	*	*
80	19.0792	10.2480	*	*
90	23.6298	13.1464	*	*
91	24.2422	13.5368	*	*
92	24.9075	13.9609	*	*
93	25.6390	14.4273	*	*
94	26.4559	14.9483	*	*
95	27.3877	15.5425	*	*
96	28.4824	16.2408	*	*
97	29.8282	17.0993	*	*
98	31.6172	18.2408	*	*
99	34.4370	20.0403	*	*

c. Isolat D *Eucheuma cottonii*

Konsentras i (ppm)	Jumlah larva Yang Mati (ekor)						% mortalitas
	I	II	III	IV	V	Modus	
0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	2	2	1	1	1	10
2	1	2	4	2	0	2	20
3	0	1	2	2	3	2	20
4	6	3	2	3	1	3	30
5	4	1	3	3	3	3	30



Probit Analysis: mortalitas Isolat D, N versus konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

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

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1.32084	0.226380	-5.83	0.000
konsentrasi Natural Response	0.174917 0	0.0647739	2.70	0.007

Log-Likelihood = -127.992

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	1.22716	3	0.746
Deviance	1.22296	3	0.748

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	7.55124	1.68779	4.24324	10.8592
StDev	5.71699	2.11707	2.76667	11.8135

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-5.74847	3.35643	-29.5357	-1.90391
2	-4.19003	2.78749	-23.8683	-0.984685
3	-3.20124	2.42851	-20.2765	-0.397442
4	-2.45742	2.16006	-17.5778	0.0475469
5	-1.85238	1.94314	-15.3856	0.412473
6	-1.33739	1.75991	-13.5226	0.726003
7	-0.885846	1.60069	-11.8922	1.00393
8	-0.481543	1.45965	-10.4355	1.25601
9	-0.113846	1.33303	-9.11430	1.48884
10	0.224620	1.21829	-7.90217	1.70719
20	2.73970	0.541407	0.588765	3.84595
30	4.55325	0.714670	3.52275	8.57672
40	6.10286	1.18801	4.65154	13.9972
50	7.55124	1.68779	5.56669	19.2035
60	8.99962	2.20482	6.44494	24.4466
70	10.5492	2.76615	7.36781	30.0730
80	12.3628	3.42835	8.43725	36.6683
90	14.8779	4.35146	9.91087	45.8244
91	15.2163	4.47595	10.1087	47.0571
92	15.5840	4.61124	10.3234	48.3964
93	15.9883	4.76006	10.5595	49.8691
94	16.4399	4.92633	10.8230	51.5140
95	16.9549	5.11604	11.1233	53.3901
96	17.5599	5.33902	11.4761	55.5946
97	18.3037	5.61325	11.9094	58.3049
98	19.2925	5.97797	12.4852	61.9081
99	20.8510	6.55314	13.3920	67.5878

Lampiran 5 Dokumentasi Penelitian

5.1 Preparasi sampel

		
<i>Eucheuma cottonii</i> basah	<i>Eucheuma cottonii</i> kering	<i>Eucheuma cottonii</i> hasil penghalusan (serbuk)

5.2 Analisa kadar air

	
Pengovenan cawan + sampel	Desikator sampel + cawan

5.3 Ekstraksi maserasi

		
Filtrat 1	Filtrat 2	Filtrat 3

	
Ekstrak metanol setelah di <i>rotary evaporator</i>	Ekstrak metanol setelah diberi N ₂

5.4 Hidrolisis

		
Proses hidrolisis ekstrak dengan HCl 2N dan stirrer	Pembuatan larutan NaHCO ₃	Hasil hidrolisis setelah penambahan NaHCO ₃

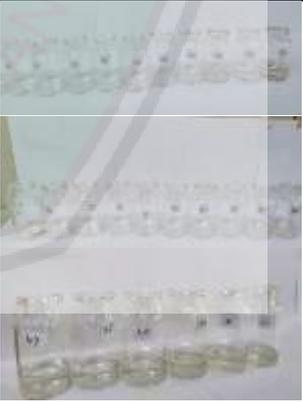
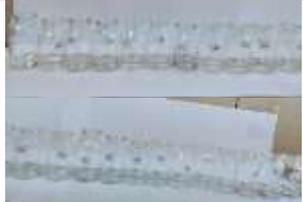
5.5 Partisi

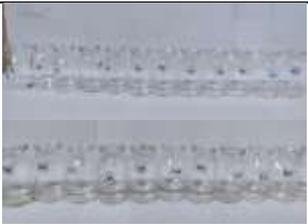
			
Hasil partisi ke-1	Hasil partisi ke-2	Hasil partisi ke-3	Hasil partisi

5.6 Uji fitokimia

		
Hasil uji steroid dan triterpenoid	Hasil uji flavonoid	Hasil uji alkaloid dragendroff (kiri) dan meyer (kanan)

5.7 Pemisahan menggunakan kromatografi kolom cara basah

		
Pembuatan bubuk silika	Proses elusi, penampungan tiap 2 mL/menit	Vial 1-30
		
Vial 31-60	Vial 61-90	Vial 91-120
		

		
Vial 151-182	Vial 184-210	Vial 211-240
		
Vial 241-272		

5.8 Monitoring dengan KLTA

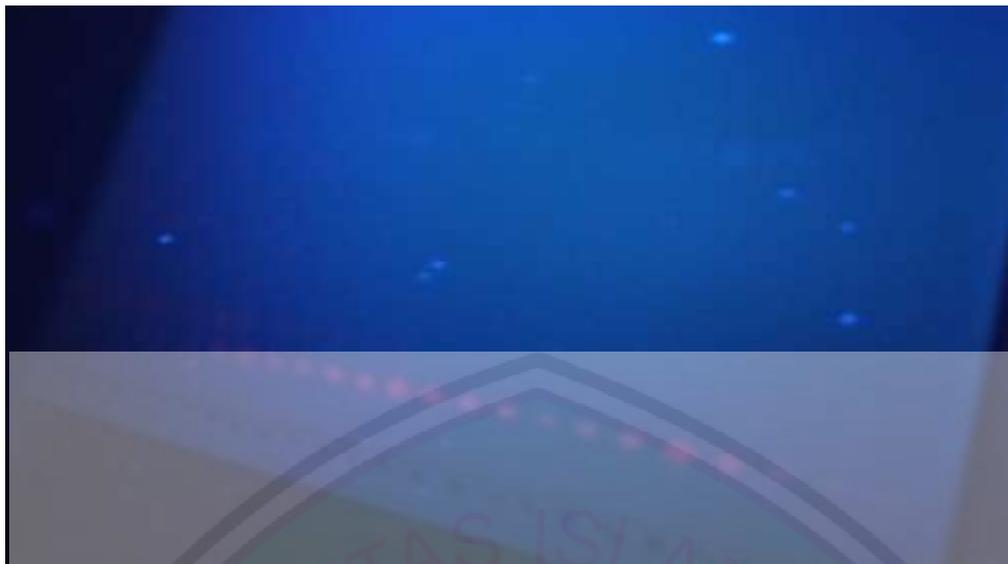


Proses elusi

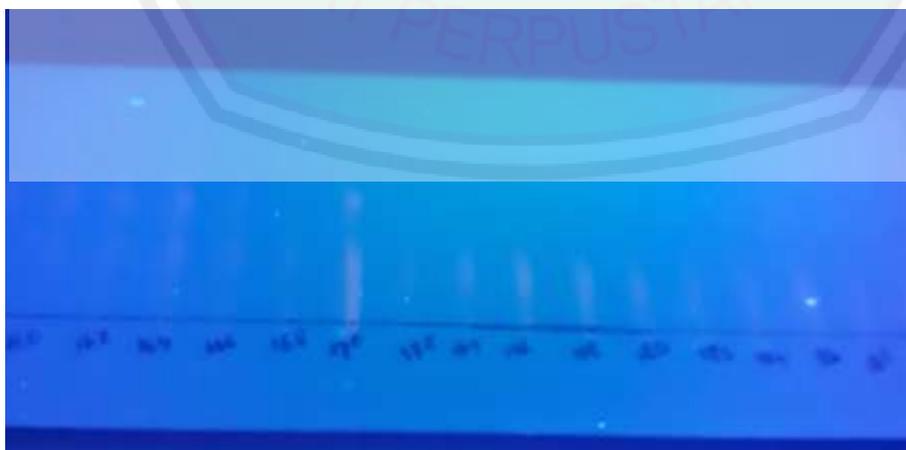
5.9 Hasil monitoring

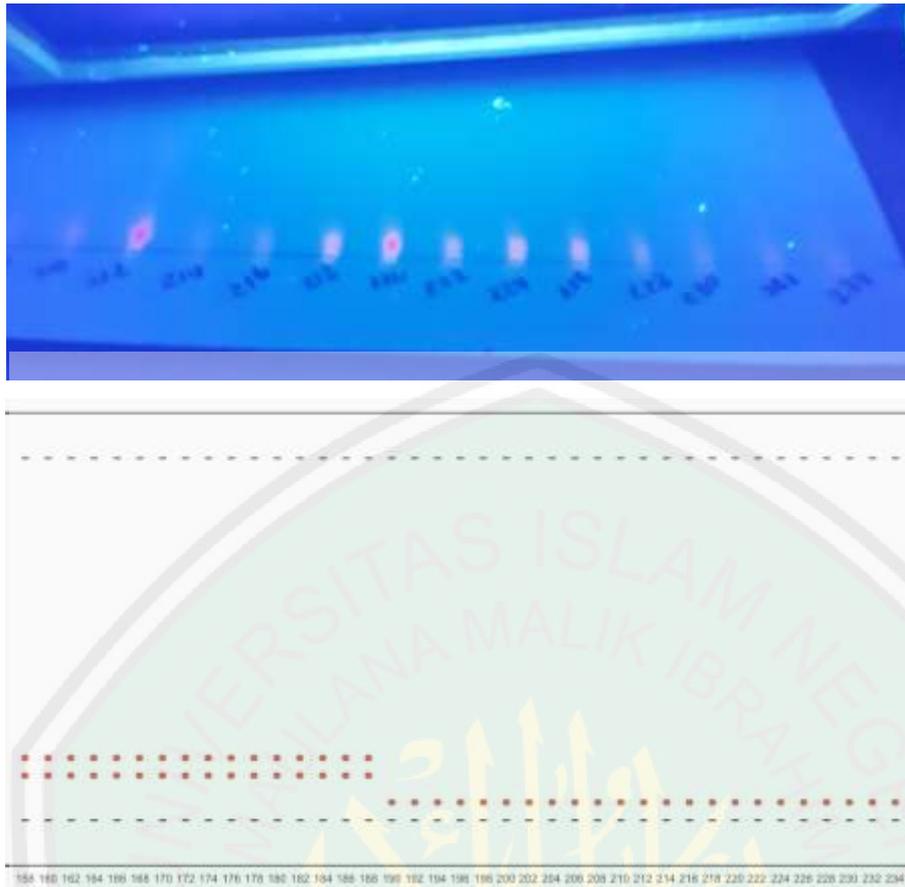


Gambar lampiran 5.9.1 Ilustrasi monitoring KLTA plat A pada lampu UV 366 nm



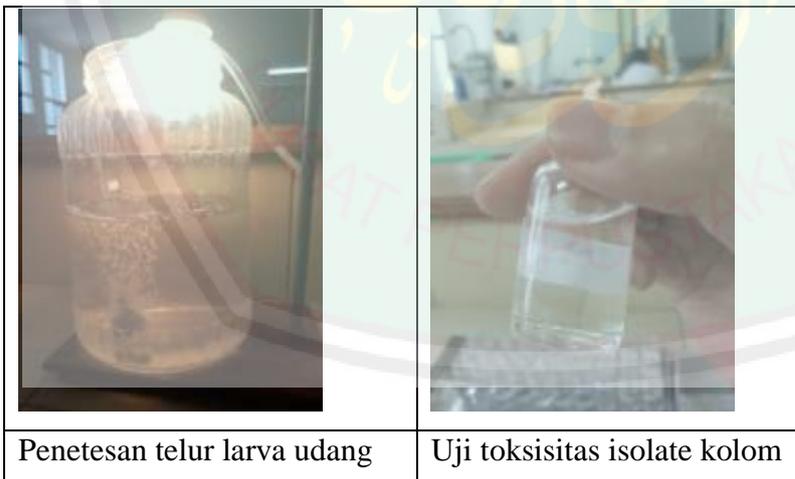
Gambar lampiran 5.9.2 Ilustrasi monitoring KLTA plat B pada lampu UV 366 nm





Gambar lampiran 5.9.3 Ilustrasi monitoring KLTA plat C pada lampu UV 366 nm

5.10 Uji Toksisitas



Lampiran 6. Hasil Spektra Spektroskopi FT-IR

