

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL KLTP FRAKSI
ETIL ASETAT DAN PETROLEUM ETER HASIL HIDROLISIS
EKSTRAK METANOL *Hydrilla verticillata***

SKRIPSI

Oleh:
VERA VANIA
NIM. 16630056



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

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL KLTP FRAKSI
ETIL ASETAT DAN PETROLEUM ETER HASIL HIDROLISIS
EKSTRAK METANOL *Hydrilla verticillata***

SKRIPSI

Oleh:
VERA VANIA
NIM. 16630056

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

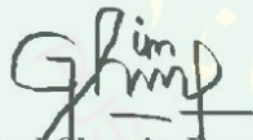
**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL KLTP FRAKSI
ETIL ASETAT DAN PETROLEUM ETER HASIL HIDROLISIS
EKSTRAK METANOL *Hydrilla verticillata***

SKRIPSI

Oleh:
VERA VANIA
NIM. 16630056

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 12 Desember 2020

Pembimbing I



Ahmad Chanaim Fasya, M.Si
NIP. 19820616 200604 1 002

Pembimbing II



Ahmad Hanapi, M.Sc
NIDT. 19851225 20160801 1 069

Mengesahkan,
Ketua Jurusan



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

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL KLTP FRAKSI
ETIL ASETAT DAN PETROLEUM ETER HASIL HIDROLISIS
EKSTRAK METANOL *Hydrilla verticillata***

SKRIPSI

Oleh:
VERA VANIA
NIM. 16630056

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 28 Desember 2020

Penguji Utama : Dr. Anton Prasetyo, M.Si
NIP. 19770925 200604 1 003

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

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

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



(.....)

(.....)

(.....)

Mengesahkan,
Ketua Jurusan



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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Vera Vania

NIM : 16630056

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi
Etil Asetat dan Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak
Metanol *Hydrilla verticillata*

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

Malang, 28 Desember 2020
Yang membuat pernyataan,



Vera Vania
NIM. 16630056

PERSEMBAHAN

Alhamdulillah rabbi 'aalamiin, dengan mengucapkan rasa syukur kepada Allah Swt., skripsi ini saya persembahkan untuk:

Ayah dan Mama tercinta, Solikan dan Nur'aini,

yang telah memberikan saya cinta, kasih sayang dan perhatian yang tiada kurangnya untuk saya, telah mendidik dan merawat saya dari kecil hingga saat ini.

Menjadi pahlawan dan bidadari yang amat saya sayangi yang senantiasa memberikan dukungan riil maupun materiil dan yang setiap hari dan setiap waktu tanpa lelah mendoakan keberhasilan saya. Selalu mendukung apapun keputusan yang saya pilih dan memberikan kekuatan mental kepada saya sehingga saya dapat menyelesaikan kewajiban saya pada pendidikan S1 ini.

Kakak tercinta, Rio Fahmi Arganata,

yang setiap kerja kerasnya menjadikan motivasi tersendiri bagi saya agar tidak pantang menyerah dan selalu bergerak maju demi meraih apa yang saya cita-citakan.

Dosen-dosen yang saya hormati,

yang telah sabar membimbing saya selama masa perkuliahan, khususnya Bapak Ahmad Ghanaim Fasya, M.Si. selaku dosen wali dan dosen pembimbing, Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc. selaku dosen pembimbing agama, dan Bapak Dr. Anton Prasetyo, M.Si. serta Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si. selaku dosen penguji yang telah sabar dan telaten membimbing saya dalam proses revisi serta selalu memberikan motivasi dan mengembalikan kepercayaan diri saya saat saya mengalami kesulitan dalam proses penelitian.

Teman-teman yang saya sayangi,

yang telah memberikan semangat dan dorongan untuk bangkit lagi ketika mengalami kesulitan dalam pengerjaan skripsi, khususnya untuk Organik Squad, Squad Delight, Saintcell Squad, Tim Hydrilla, Kimia B, dan Carbon'16, dan sahabat-sahabat saya dari SD hingga SMA yang senantiasa memberikan dukungan dan nasihat baik untuk saya sampai sekarang.

Tiada kata yang bisa saya ucapkan selain terimakasih yang sebesar-besarnya,
Jazakumullahu Khairan.

MOTTO

*“Don’t worry if you’re not where you want to be. You can’t rush good things. They take time. They have to go through a process. **Work hard, do your best.** Leave the rest to the Almighty. His timing is best. When you see the results, you’ll be glad you kept going and didn’t give up!*

~Mufti Ismail Menk~



KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah Swt. yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Etil Asetat dan Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata*”** dengan baik. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad saw. yang telah membimbing kita ke jalan yang diridhai Allah Swt. Kepenulisan skripsi ini tidak luput dari bantuan semua pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada:

1. Orang tua penulis, Nur'aini dan Solikan, serta segenap anggota keluarga penulis yang selalu memberikan nasihat, do'a, dan dukungan baik moril maupun materiil yang tak mungkin terbalaskan.
2. Bapak Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si, selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si, selaku ketua jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si, selaku dosen wali sekaligus dosen pembimbing yang selalu memberikan bimbingan, pengarahan, nasehat, serta motivasi kepada penulis.
6. Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc, selaku dosen pembimbing yang memberikan bimbingan dan arahan dalam penulisan laporan hasil penelitian ini.

7. Bapak Dr. Anton Prasetyo, M.Si, selaku penguji utama yang telah memberikan bimbingan dan arahan dalam kepenulisan laporan hasil penelitian ini.
8. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si, selaku penguji yang telah memberikan bimbingan dan arahan dalam kepenulisan laporan hasil penelitian ini.
9. Seluruh dosen dan laboran jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah mengalirkan ilmu, pengetahuan, pengalaman, dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
10. Teman-teman Organik 2016 dan Jurusan Kimia Angkatan 2016 “Carbon” yang telah berjuang bersama-sama dan saling memotivasi untuk terus menjadi pribadi yang lebih baik.
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala bantuan dan motivasinya kepada penulis.

Semoga amal perbuatan Bapak/Ibu serta semua pihak yang membantu proses penyelesaian skripsi ini diridhoi Allah Swt. dan dicatat sebagai amal baik saudara sekalian. Penulis menyadari adanya kekurangan dan keterbatasan dalam skripsi ini. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua, yaitu bagi penulis pada khususnya dan bagi pembaca pada umumnya. Aamiin.

Malang, 15 Desember 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
PERSEMBAHAN.....	v
MOTTO	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
مستخلص البحث	xvi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Batasan Masalah.....	6
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Hydrilla verticillata</i>	8
2.1.1 Deskripsi dan Klasifikasi	8
2.1.2 Kandungan dan Manfaat	9
2.2 Ekstraksi Senyawa Aktif.....	10
2.2.1 Ekstraksi Maserasi	10
2.2.2 Hidrolisis dan Partisi	11
2.3 Steroid	13
2.4 Pemisahan Steroid Menggunakan KLT	16
2.5 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH	18
2.6 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis	20
2.7 Integrasi Penelitian dengan Al-Qur'an.....	22
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	25
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	25
3.2.1 Alat Penelitian	25
3.2.2 Bahan Penelitian.....	25
3.3 Tahapan Penelitian	26
3.4 Pelaksanaan Penelitian	26
3.4.1 Preparasi Sampel.....	26
3.4.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri.....	26
3.4.3 Ekstraksi Maserasi	27

	x
3.4.4 Hidrolisis dan Partisi	28
3.4.5 Uji Fitokimia Golongan Senyawa Steroid	28
3.4.6 Pemisahan Steroid Menggunakan KLTP	29
3.4.7 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH	29
3.4.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH.....	29
3.4.7.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel	30
3.4.8 Identifikasi Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	30
3.4.9 Analisis Data	31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Preparasi Sampel.....	32
4.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri.....	32
4.3 Ekstraksi Maserasi	33
4.4 Hidrolisis dan Partisi	34
4.5 Uji Fitokimia Golongan Senyawa Steroid	35
4.6 Pemisahan Steroid Menggunakan KLTP	36
4.7 Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.....	41
4.8 Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH	43
4.8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH.....	43
4.8.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel.....	44
4.9 Pemanfaatan <i>Hydrilla verticillata</i> dalam Perspektif Islam	49
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	52
5.2 Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN.....	60

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian	60
Lampiran 2. Diagram Alir.....	61
Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan.....	66
Lampiran 4. Data Pengamatan dan Perhitungan.....	69
Lampiran 5. Data Hasil KLTP	72
Lampiran 6. Data Hasil Uji Aktivitas Antioksidan.....	74
Lampiran 7. Spektrum UV-Vis Isolat Hasil KLTP.....	83
Lampiran 8. Dokumentasi.....	88



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Hydrilla verticillata</i>	8
Gambar 2.2 Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida	12
Gambar 2.3 Reaksi netralisasi asam.....	13
Gambar 2.4 Struktur dasar steroid	14
Gambar 2.5 Struktur beberapa senyawa steroid pada tumbuhan	14
Gambar 2.6 Jalur reaksi LB dengan kolesterol	15
Gambar 2.7 Reaksi radikal DPPH dengan antioksidan.....	19
Gambar 2.8 Spektrum UV-Vis isolat steroid hasil KLTP fraksi <i>n</i> -heksana	22
Gambar 4.1 Hasil uji fitokimia steroid.....	36
Gambar 4.2 Ilustrasi hasil pemisahan KLTP fraksi etil asetat	37
Gambar 4.3 Ilustrasi hasil pemisahan KLTP fraksi petroleum eter	39
Gambar 4.4 Perbandingan struktur fitosterol dengan kepolaran berbeda.....	40
Gambar 4.5 Spektra UV-Vis isolat hasil KLTP fraksi EA dan PE.....	41
Gambar 4.6 Spektrum UV-Vis larutan DPPH 0,2 mM.....	43
Gambar 4.7 Struktur fitosterol dengan EC ₅₀ berbeda	47
Gambar L.5.1 Hasil KLTP fraksi EA dengan eluen <i>n</i> -heksana: etil asetat (17:3)	72
Gambar L.5.2 Hasil KLTP fraksi PE dengan eluen <i>n</i> -heksana: etil asetat (17:3)	73
Gambar L.6.1 Grafik % antioksidan terhadap log konsentrasi isolat 13 EA	75
Gambar L.6.2 Grafik % antioksidan terhadap log konsentrasi isolat 14 EA	76
Gambar L.6.3 Grafik % antioksidan terhadap log konsentrasi isolat 20 EA	78
Gambar L.6.4 Grafik % antioksidan terhadap log konsentrasi isolat 11 PE.....	79
Gambar L.6.5 Grafik % antioksidan terhadap log konsentrasi isolat 12 PE.....	81
Gambar L.6.6 Grafik % antioksidan terhadap log konsentrasi isolat 18 PE.....	82

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Hasil pemisahan KLTA fraksi petroleum eter alga merah	18
Tabel 2.2 Ketentuan kekuatan antioksidan	20
Tabel 4.1 Hasil partisi menggunakan pelarut etil asetat dan petroleum eter	35
Tabel 4.2 Hasil pemisahan KLTP fraksi etil asetat.....	37
Tabel 4.3 Hasil pemisahan KLTP fraksi petroleum eter.....	38
Tabel 4.4 Data hasil % aktivitas antioksidan dan EC ₅₀ isolat KLTP fraksi EA	44
Tabel 4.5 Data hasil % aktivitas antioksidan dan EC ₅₀ isolat KLTP fraksi PE	44
Tabel L.4.1 Data berat cawan kosong	69
Tabel L.4.2 Data berat cawan dan sampel	69
Tabel L.4.3 Data rendemen ekstrak metanol	70
Tabel L.4.4 Data rendemen fraksi pekat etil asetat	71
Tabel L.4.5 Data rendemen fraksi pekat petroleum eter.....	71
Tabel L.5.1 Hasil KLTP fraksi etil asetat eluen <i>n</i> -heksana:etil asetat 17:3	72
Tabel L.5.2 Hasil KLTP fraksi petroleum eter eluen <i>n</i> -heksana:etil asetat 17:3	73
Tabel L.6.1 Hasil uji antioksidan isolat 13 hasil KLTP fraksi etil asetat.....	74
Tabel L.6.2 Hasil uji antioksidan isolat 14 hasil KLTP fraksi etil asetat.....	75
Tabel L.6.3 Hasil uji antioksidan isolat 20 hasil KLTP fraksi etil asetat.....	77
Tabel L.6.4 Hasil uji antioksidan isolat 11 hasil KLTP fraksi petroleum eter...	78
Tabel L.6.5 Hasil uji antioksidan isolat 12 hasil KLTP fraksi petroleum eter...	80
Tabel L.6.6 Hasil uji antioksidan isolat 18 hasil KLTP fraksi petroleum eter...	81

ABSTRAK

Vania, V. 2020. **Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Etil Asetat dan Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata*. Skripsi.** Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Ahmad Hanapi, M.Sc.

Kata Kunci: *Hydrilla verticillata*, steroid, antioksidan, KLTP, fraksi petroleum eter

Steroid merupakan salah satu metabolit sekunder yang memiliki potensi sebagai antioksidan yang dapat menghambat radikal bebas. Salah satu tumbuhan yang memiliki kandungan steroid di dalamnya yaitu *Hydrilla verticillata*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan isolat steroid yang diperoleh dari hasil kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) fraksi etil asetat (EA) dan petroleum eter (PE) *H. verticillata* beserta identifikasinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Sampel hydrilla diperoleh dari Danau Ranu Grati Pasuruan. Komponen aktif pada sampel diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol p.a. Selanjutnya ekstrak pekat metanol dihidrolisis dengan HCl 2 N dan dipartisi dengan dua variasi pelarut yaitu etil asetat dan petroleum eter. Hasil partisi diuji fitokimia menggunakan reagen *Liebermann-Burchard* dan dipisahkan steroid yang ada dengan metode KLTP menggunakan pelarut *n*-heksana dan etil asetat (17:3). Isolat steroid hasil KLTP diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH untuk mengetahui nilai EC_{50} -nya. Selanjutnya diidentifikasi isolat steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pemisahan KLTP fraksi etil asetat menghasilkan 20 spot dengan 3 spot diantaranya diduga steroid, sedangkan pemisahan KLTP fraksi petroleum eter menghasilkan 19 spot dengan 3 spot diantaranya diduga sebagai steroid. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan nilai EC_{50} sebesar 1901 (isolat 13 EA); 239,8 (isolat 14 EA); 94,92 (isolat 20 EA); 142 (isolat 11 PE); 177,1 (isolat 12 PE); dan 61,43 (isolat 18 PE) ppm. Hasil identifikasi UV-Vis isolat KLTP fraksi etil asetat yaitu isolat 13 EA menunjukkan serapan pada panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) 203 nm, isolat 14 EA menunjukkan serapan pada λ_{maks} 204; 221,9; 275 nm, dan isolat 20 EA menunjukkan serapan pada λ_{maks} 204; 221,9 nm. Sedangkan hasil identifikasi UV-Vis isolat KLTP fraksi petroleum eter yaitu isolat 11 PE, isolat 12 PE, dan isolat 18 PE sama-sama menunjukkan serapan pada λ_{maks} 203 nm.

ABSTRACT

Vania, V. 2020. **Antioxidant Activity of Steroid Isolates from PTLC Results of Ethyl Acetate and Petroleum Ether Fraction of Methanol Extract Hydrolysis Result of *Hydrilla verticillata***. Bachelor Thesis. Chemistry Department, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang. Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Supervisor II: Ahmad Hanapi, M.Sc.

Keywords: *Hydrilla verticillata*, Steroid, Antioxidant, PTLC, Petroleum Ether Fraction

Steroids are one of the secondary metabolites which have potential as antioxidant that can inhibit free radicals. One of the plants that contains steroids is *Hydrilla verticillata*. The aim of this research was to determine the antioxidant activity of steroid isolates obtained from preparative thin layer chromatography of ethyl acetate (EA) and petroleum ether (PE) fraction of *H. verticillata* and to identify it using UV-Vis spectrophotometer. The sample was obtained from Ranu Grati Lake of Pasuruan. The active compounds in the sample were extracted with maceration method using methanol p.a. solvent. The methanol extract was hydrolyzed using HCl 2 N and partitioned using two variations of the solvents, ethyl acetate and petroleum ether. The partition results were tested for its phytochemical screening for steroid using *Liebermann-Burchard* reagent and separated its steroid with PTLC method using *n*-hexane and ethyl acetate (17:3) eluent. The steroid isolates from PTLC results were tested for its antioxidant activity using DPPH method to measure the EC₅₀ value. Then the steroid isolates were identified using UV-Vis spectrophotometer. The PTLC separation of ethyl acetate fraction showed that there were 20 spots which 3 of them were suspected as steroid. While the PTLC separation of petroleum ether fraction showed that there were 19 spots which 3 of them were suspected as steroid. The result of antioxidant activity assay showed the EC₅₀ of 1901 (isolate 13 EA); 239.8 (isolate 14 EA); 94.92 (isolate 20 EA); 142 (isolate 11 PE); 177.1 (isolate 12 PE); and 61.43 (isolate 18 PE) ppm. The spectrophotometer UV-Vis identification results of the isolates of ethyl acetate fraction showed that there were absorption at the maximum wavelength (λ_{max}) 203 nm in isolate 13 EA, λ_{max} 204; 221.9; 275 nm in isolate 14 EA, and λ_{max} 204; 221.9 nm in isolate 20 EA. While isolate 11, 12, and 18 PE showed the same absorption at λ_{max} 203 nm.

مستخلص البحث

فانيا ، ف. (٢٠٢٠). النشاط المضاد للأكسدة لعزلات الستيريود نتيجة كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (KLTP) لجزء خلاص الإيثيل و البترول الأثير هيدريلا فرتيسيلاتا (*Hydrilla verticillata*). البحث العلمي. قسم الكيمياء ، كلية العلوم و التكنولوجيا ، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: أ. غنائم فاشا الماجستير؛ المشرف الثاني: أحمد حنفي الماجستير.

الكلمات المفتاحية: هيدريلا فرتيسيلاتا (*Hydrilla verticillata*) ، الستيريود ، مضادات الأكسدة ، كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (KLTP) ، جزء الأثير البترولي

الستيريود هو مستقلب ثانوي يمكن أن تكون مضادات الأكسدة التي يمكن أن تمنع الجذور الحرة. أحد النباتات التي تحتوي على المنشطات يعني هيدريلا فرتيسيلاتا (*Hydrilla verticillata*). تحدف هذه الدراسة إلى تحديد النشاط المضاد للأكسدة لعزلات الستيريود من كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (KLTP) لكسور أسيتات الإيثيل (EA) و أثير البترول (PE) من هيدريلا فرتيسيلاتا (*Hydrilla verticillata*) و تحديدها باستخدام مقياس الطيف الضوئي (UV-Vis). تم الحصول على عينات الهيدريلا من بحيرة رانو جراي باسوروان. تم استخلاص المكون النشط في العينة بطريقة النقع باستخدام الميثانول p.a. ثم تم تحليل مستخلص الميثانول المركز مع عيار 2 N HCl و تقسيمه بنوعين مختلفين من المذيبات ، و هما أسيتات الإيثيل و إثير البترول. تم اختبار نتائج التقسيم للكيمياء النباتية باستخدام كاشف ليرمان - بورشارد (Liebermann-Burchard) و تم فصل المنشطات الموجودة بطريقة كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (KLTP) باستخدام مذيبات ن الهكسان (*n*-heksana) و إيثيل الأسيتات (١٧ : ٣). تم اختبار عزلات الستيريود الناتجة من كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (KLTP) من أجل نشاطها المضاد للأكسدة باستخدام طريقة ٢،٢ - ثنائي فينيل - بيكريل هيدرازيل (DPPH) لتحديد قيمة EC₅₀. علاوة على ذلك ، تم التعرف على عزلات الستيريود باستخدام مقياس الطيف الضوئي (UV-Vis). أدى فصل كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (KLTP) عن جزء أسيتات الإيثيل إلى ٢٠ بقعة يشتهه في ٣ منها أنها ستيريودات ، بينما أدى فصل كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (KLTP) لجزء الأثير البترولي إلى ١٩ بقعة مع ٣ نقاط يشتهه في أنها منشطات. أظهرت نتائج اختبار النشاط المضاد للأكسدة قيمة EC₅₀ تبلغ ١٩٠.١ (عزل ١٣ EA) ؛ ٢٣٩.٠٨ (عزل ١٤ EA) ؛ ٩٤.٩٢ (عزل ٢٠ EA) ؛ ١٤٢ (عزل ١١) ؛ ١٧٧.٠١ (عزل ١٢ PE) ؛ و ٦١.٤٣ (عزل ١٨ PE) جزء في المليون. أظهرت نتائج تحديد الأشعة المرئية وفوق البنفسجية لجزء أسيتات الإيثيل المعزول كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (KLTP) ، أي عزل ١٣ EA ، امتصاصًا بطول موجة ٢٠٣ (λ) نانومتر ، وأظهرت العزلة ١٤ EA امتصاصًا عند ٢٠٤ λ ؛ ٢٢١.٩ ؛ ٢٧٥ نانومتر ، و ٢٠ EA أظهرت امتصاص عند ٢٠٤ λ ؛ ٢٢١.٩ نانومتر. و في الوقت نفسه ، أظهرت نتائج التعرف على الأشعة فوق البنفسجية - فيس لعزلات كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (KLTP) مع كسر الأثير البترولي ، أي عزل ١١ PE و عزل ١٢ PE و عزل ١٨ PE تمتص عند ٢٠٣ نانومتر.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Steroid merupakan salah satu golongan senyawa aktif dengan 17 atom karbon yang membentuk 1,2-siklopentenoperhidrofenantren sebagai struktur dasarnya (Endarini, 2016). Golongan senyawa ini memiliki berbagai potensi bioaktivitas yang dapat dimanfaatkan di bidang farmakologi, diantaranya sebagai antioksidan (Fasya, dkk., 2019), antimikroba (Contini, dkk., 2003), anti-inflamasi (Patel dan Savjani, 2015), dan antikanker (Gupta, dkk., 2013). Steroid pada tumbuhan (fitosterol) dapat menurunkan kadar kolesterol darah hingga 15% dan dapat mencegah penyakit kanker (Sultan dan Raza, 2015).

Beberapa penelitian mengenai steroid membuktikan bahwa golongan senyawa tersebut memiliki aktivitas yang sangat baik sebagai antioksidan. Antioksidan merupakan komponen yang dapat menghambat radikal bebas dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tak reaktif yang relatif stabil. Radikal bebas yang terakumulasi di dalam tubuh dapat menyebabkan pengapuran tulang, peradangan, gangguan fungsi hati, gangguan pencernaan, dan meningkatkan kadar *low density lipoprotein* yang menjadi penyebab timbulnya penyakit aterosklerosis atau jantung koroner (Khaira, 2010). Krisna, dkk. (2014), telah meneliti aktivitas antioksidan steroid pada daun gayam (*Inocarpus fagiferus* Fosb) dan didapatkan hasil aktivitas antioksidan yang sangat tinggi dengan nilai IC_{50} sebesar 4 ppm. Tingginya aktivitas antioksidan steroid juga dibuktikan oleh Purwantoro (2019) pada penelitiannya tentang aktivitas

antioksidan isolat steroid fraksi *n*-heksana *Hydrilla verticillata*, dengan hasil EC₅₀ sebesar 5,109 ppm. Megawati, dkk. (2020) juga membuktikan bahwa aktivitas antioksidan isolat steroid dari fraksi kloroform *Chlorella sp.* cukup baik, dengan hasil EC₅₀ sebesar 2,26; 38,96; dan 163,10 ppm.

Steroid dapat diisolasi dari berbagai macam tumbuh-tumbuhan. Indonesia merupakan negara beriklim tropis yang mendukung tumbuhnya berbagai jenis tumbuhan yang dapat dimanfaatkan manusia sebagai objek penunjang kehidupan. Sebagaimana yang tercantum dalam firman Allah Swt. dalam QS. asy-Syu'ara (26) ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?” (QS. asy-Syu'ara/26:7)

Seperti yang tertera pada ayat di atas bahwa Allah Swt. telah menumbuhkan berbagai macam tumbuhan yang bermanfaat di bumi ini. Berdasarkan Tafsir Al-Mishbah yang disusun oleh Shihab (2002), kata *إلى* merupakan kata yang mengandung makna batas akhir, yang berarti manusia harus mengarahkan pandangan hingga batas kemampuannya memandang bumi, dengan aneka tumbuhan dan keajaiban yang terdapat di dalamnya. Sedangkan kata *كريم* menjelaskan bahwa tumbuhan yang baik yaitu adalah tumbuhan yang subur dan memiliki manfaat di dalamnya. Salah satu tumbuhan yang memiliki banyak manfaat yang dapat dieksplor manusia adalah *Hydrilla verticillata*.

Hydrilla verticillata dapat ditemukan di danau oligotrofik maupun eutrofik (Phukan, dkk., 2015). Salah satu danau yang memiliki populasi *Hydrilla verticillata* adalah Danau Ranu Grati, Pasuruan. Lestariani (2014), dalam penelitiannya menyatakan bahwa status trofik Danau Ranu Grati berkisar antara eutrofik (subur) dan hipereutrofik (sangat subur). Hal inilah yang menyebabkan hydrilla dapat tumbuh cepat hingga mendominasi perairan Ranu Grati. Namun kehadiran hydrilla dianggap sebagai tanaman liar oleh masyarakat. Padahal sebenarnya hydrilla menyimpan banyak manfaat di dalamnya. Hydrilla dapat diaplikasikan penggunaannya di bidang farmakologi sebagai antioksidan, antibakteri (Jannah, 2020), antitumor, agen pendetoksifikasi, antiosteoporosis (Pal dan Nimse, 2006), dan antimalaria (Annie, dkk., 2016).

Ekstraksi *Hydrilla verticillata* pada penelitian ini dilakukan dengan metode maserasi, yaitu perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada suhu ruang. Pelarut yang digunakan adalah metanol. Penelitian yang dilakukan Hafiz (2017) menunjukkan ekstrak metanol, kloroform, dan *n*-heksana dari *Hydrilla verticillata* menghasilkan rendemen berturut-turut sebesar 12,72; 4,96; dan 3,80%. Senyawa aktif yang diperoleh dari ekstrak metanol meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan steroid/triterpenoid, sedangkan pada ekstrak kloroform dan *n*-heksana hanya mengandung steroid/triterpenoid. Begitupun dengan penelitian yang dilakukan Ikfi (2007) menunjukkan bahwa ekstrak metanol menghasilkan rendemen paling besar dibandingkan ekstrak kloroform dan *n*-heksana. Selain itu, ekstrak metanol menghasilkan aktivitas antioksidan tertinggi, ditunjukkan dengan nilai EC_{50} sebesar 256,6 ppm, sedangkan ekstrak kloroform dan *n*-heksana memiliki nilai EC_{50} berturut-turut 457,6 dan 2763 ppm.

Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa ekstrak metanol *Hydrilla verticillata* menghasilkan rendemen paling besar dan juga menghasilkan metabolit sekunder lebih banyak serta memiliki aktivitas antioksidan tertinggi.

Senyawa metabolit sekunder yang diperoleh dari hasil ekstrak metanol selanjutnya dihidrolisis menggunakan HCl 2N. Menurut Fasya, dkk. (2016), hidrolisis dilakukan dengan penambahan katalis asam untuk mempercepat reaksi pemutusan ikatan glikosida. Hasil hidrolisis selanjutnya dilakukan partisi untuk mengambil metabolit sekunder yang diinginkan yang memiliki kesamaan kepolaran dengan pelarut. Partisi dilakukan dengan pelarut yang memiliki tingkat kepolaran di bawah metanol, yaitu etil asetat (semi polar) dan petroleum eter (non polar). Penelitian yang dilakukan oleh Mardiyah (2012) menunjukkan bahwa 3 fraksi tertinggi dari ekstrak metanol *Eucheuma spinosum* yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi yaitu fraksi petroleum eter ($EC_{50} = 12,65$ mg/L), kemudian fraksi kloroform ($EC_{50} = 19,23$ mg/L), dan fraksi etil asetat ($EC_{50} = 41,94$ mg/L). Selain itu, Faten, dkk. (2009) mengekstrak alga merah *Gracilaria verrucosa* dengan pelarut etanol 70 % lalu dipartisi dengan etil asetat, *n*-butanol dan petroleum eter, didapatkan bahwa fraksi etil asetat dan petroleum eter merupakan fraksi yang cukup aktif dalam menghambat radikal bebas DPPH.

Steroid dapat diisolasi menggunakan metode kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP). Penelitian yang dilakukan Al-Quais (2015) menunjukkan bahwa komposisi campuran eluen terbaik yang digunakan untuk pemisahan steroid pada uji kromatografi lapis tipis analitik (KLTA) ekstrak *n*-heksana akar rumput bambu (*Lophaterum gracile Brongn*) adalah campuran *n*-heksana dan etil asetat (8:2) dengan menghasilkan 7 noda di bawah lampu ultraviolet (UV) 366

nm. Sedangkan hasil penelitian Baderos (2017) menunjukkan bahwa eluen dengan perbandingan terbaik yang digunakan untuk pemisahan steroid pada uji KLTP pemisahan steroid fraksi petroleum eter alga merah (*Euchema cottonii*) adalah *n*-heksana:etil asetat (17:3). Hal ini dikarenakan pada perbandingan eluen tersebut dihasilkan 11 noda dengan 6 noda diantaranya teridentifikasi sebagai senyawa steroid. Noda yang teridentifikasi sebagai senyawa steroid ditunjukkan pada R_f 0,294 (biru), R_f 0,394 (hijau), R_f 0,439 (biru), R_f 0,606 (hijau), R_f 0,778 (hijau), dan R_f 0,894 (hijau).

Hasil dari isolasi steroid dilanjutkan dengan uji antioksidan menggunakan metode DPPH. Metode DPPH merupakan metode peredaman radikal bebas dengan reagen DPPH sebagai radikal bebasnya. Metode ini dipilih karena mudah dilakukan, biayanya relatif murah, cepat, memerlukan sedikit sampel, dan hasil yang diperoleh dapat dipercaya (Koleva, dkk., 2002). Parameter yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan sampel adalah persen (%) aktivitas antioksidan dan nilai EC_{50} . EC_{50} merupakan konsentrasi larutan sampel yang menyebabkan reduksi terhadap aktivitas DPPH sebesar 50% (Rohman dan Riyanto, 2005). Identifikasi senyawa aktif dilakukan menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis. Hasil penelitian yang diperoleh diharapkan dapat memberikan pengetahuan dan wawasan baru terutama dalam pemanfaatan *Hydrilla verticillata* di Indonesia.

1.2 Rumusan Masalah

- a). Bagaimana aktivitas antioksidan isolat steroid hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter *Hydrilla verticillata* dengan metode DPPH?

- b). Bagaimana hasil identifikasi isolat steroid hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter *Hydrilla verticillata* menggunakan spektrofotometer UV-Vis?

1.3 Tujuan Penelitian

- a). Untuk mengetahui aktivitas antioksidan isolat steroid hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter *Hydrilla verticillata* dengan metode DPPH.
- b). Untuk mengetahui hasil identifikasi isolat steroid hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter *Hydrilla verticillata* menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

1.4 Batasan Masalah

- a). Sampel yang digunakan adalah *Hydrilla verticillata* dari Danau Ranu Grati Pasuruan.
- b). Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol.
- c). Hidrolisis ekstrak pekat dilakukan menggunakan HCl 2N.
- d). Ekstrak hasil hidrolisis dipartisi dengan pelarut etil asetat dan petroleum eter.
- e). Isolasi steroid dilakukan menggunakan metode KLTP.
- f). Aktivitas antioksidan diuji menggunakan metode DPPH.
- g). Identifikasi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi kepada lembaga akademis atau para peneliti mengenai aktivitas antioksidan isolat steroid hasil KLTP dari fraksi etil asetat dan petroleum eter *Hydrilla verticillata* agar dapat

dikembangkan dan dimanfaatkan di bidang farmakologi yang diharapkan dapat diaplikasikan penggunaannya untuk masyarakat.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Hydrilla verticillata*

2.1.1 Deskripsi dan Klasifikasi

Hydrilla verticillata merupakan salah satu gulma yang hidup di perairan dan memiliki sifat tahan herbisida. Selain itu, tumbuhan ini juga dapat beradaptasi dengan semua keadaan air di berbagai benua. Phukan, dkk. (2015) dalam penelitiannya menjelaskan bahwa *Hydrilla verticillata* dapat ditemukan di danau oligotrofik (danau yang memiliki nutrisi rendah) maupun eutrofik (danau yang memiliki nutrisi tinggi). *Hydrilla* mempunyai akar serabut berwarna putih atau merah kecoklatan jika tumbuh pada sedimen, ataupun berwarna hijau karena adanya klorofil ketika terpapar sinar matahari (Langeland, 1996). Batangnya berwarna hijau, bercabang, tegak, ramping, dan dapat tumbuh sepanjang 7 m (Marer dan Garvey, 2001). Daun *hydrilla* berwarna hijau dan berukuran kecil mengelilingi batang. Ujung daun runcing dengan tepi bergerigi (UF IFAS CAIP, 2015). Morfologi tumbuhan *Hydrilla verticillata* dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 *Hydrilla verticillata*

Berikut merupakan klasifikasi *Hydrilla verticillata* (Ramesh, dkk., 2014):

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

Tumbuhan hydrilla bereproduksi secara vegetatif (Prabha dan Rajkumar, 2015). Pertumbuhannya dapat mencapai beberapa inchi dalam satu hari (Netherland, 2007). Hydrilla dapat hidup pada kedalaman 10-15 m di bawah permukaan air pada habitat air tawar seperti kolam, parit, sungai, dan danau (Marer dan Garvey, 2001). Hydrilla yang mencapai permukaan air dapat menghalangi penetrasi cahaya dan oksigen ke dalam air (UF IFAS CAIP, 2015).

2.1.2 Kandungan dan Manfaat

Hydrilla mengandung bermacam-macam nutrisi, diantaranya saponin, garam kalsium dan magnesium, β -karoten, polisakarida, asam amino, mikro dan makronutrien, serta agen antioksidan dan detoksifikasi. Ia juga kaya akan vitamin dan mineral, seperti vitamin B-1, B-2, B-3, B-5, B-6, B-12, kalium, fosfor, besi, mangan, seng, tembaga, kobalt, dan molibdenum (Pal dan Nimse, 2006). Menurut Kurniawan, dkk. (2010), dalam penelitiannya menyatakan bahwa hydrilla memiliki kandungan klorofil total sebesar 4,43 mg/L; karotenoid sebesar 0,92 mg/L; dan vitamin C sebesar 4,70 mg/30 g.

Penelitian yang dilakukan Ikfi (2017) menunjukkan bahwa ekstrak metanol *Hydrilla verticillata* positif mengandung metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan triterpenoid/steroid. Hasanah (2017) meneliti *Hydrilla verticillata* yang diekstrak dengan pelarut etil asetat ternyata mengandung metabolit sekunder berupa flavonoid, triterpenoid, dan steroid. Sedangkan hydrilla yang diekstrak menggunakan petroleum eter mengandung triterpenoid dan steroid. Hydrilla juga memiliki berbagai potensi bioaktif, yakni sebagai antitumor, antioksidan, dan antimikroba (Prabha dan Rajkumar, 2015).

2.2 Ekstraksi Senyawa Aktif

2.2.1 Ekstraksi Maserasi

Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang sering dilakukan dalam penelitian. Keuntungan dari metode maserasi dibandingkan metode lainnya yaitu prosedur dan peralatan yang digunakan sederhana. Metode ekstraksi ini tidak melalui proses pemanasan sehingga zat aktif dalam sampel tidak akan rusak (Nurhasnawati, dkk., 2017).

Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk simplisia dalam pelarut organik pada suhu ruang. Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Kemudian, zat aktif tersebut akan larut sesuai prinsip *like-dissolves like*. Karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan di luar sel, maka larutan yang terpekat akan didesak keluar. Peristiwa tersebut terjadi secara berulang hingga terbentuk kesetimbangan konsentrasi antara larutan di dalam sel dan di luar sel (Depkes RI, 1995). Selama proses maserasi (biasanya 2-14 hari) dilakukan pengocokan dan

penggantian pelarut setiap hari agar pelarut bisa masuk ke seluruh permukaan simplisia yang telah halus (Ansel, 2014).

Kriteria pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, selektif hanya menarik zat yang berkhasiat yang dikehendaki, dan tidak mempengaruhi zat yang berkhasiat (Sitepu, 2010). Selain itu, titik didih pelarut harus lebih kecil dari titik didih sampel dan titik didih keduanya tidak boleh terlalu dekat (Nasir, dkk., 2009). Pelarut yang sering digunakan untuk mengekstrak simplisia dari bahan alam adalah metanol. Metanol merupakan senyawa polar yang disebut sebagai pelarut universal karena selain mampu mengekstrak komponen polar juga dapat mengekstrak komponen non polar (Houghton dan Raman, 1998).

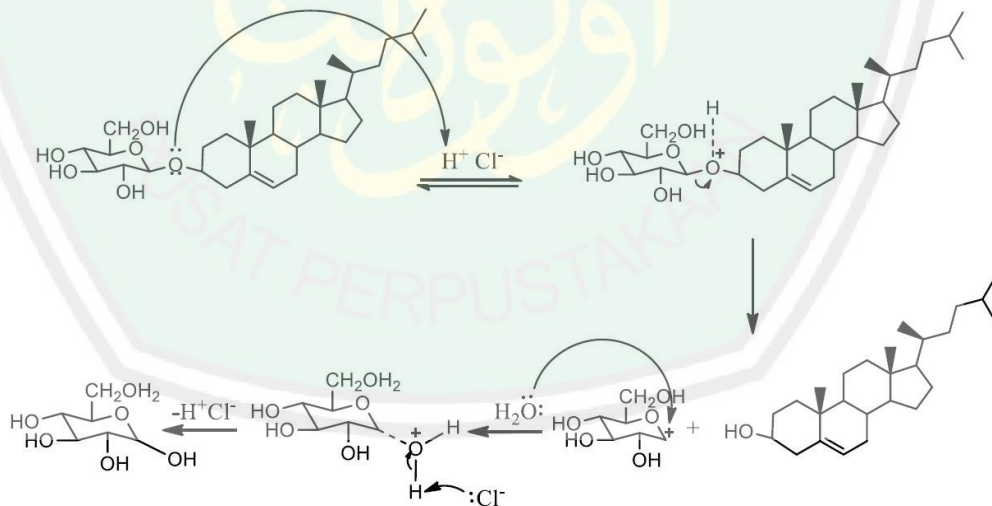
Penelitian yang dilakukan Ikfi (2007) menunjukkan bahwa ekstrak metanol *Hydrilla verticillata* menghasilkan rendemen terbesar (12,72%) dibandingkan dengan ekstrak kloroform (4,96%) dan ekstrak *n*-heksana (3,80%). Selain itu, ekstrak metanol *Hydrilla verticillata* menghasilkan aktivitas antioksidan tertinggi ($EC_{50} = 256,6$ ppm) dibandingkan dengan ekstrak kloroform ($EC_{50} = 457,6$ ppm) dan *n*-heksana ($EC_{50} = 2763$ ppm).

2.2.2 Hidrolisis dan Partisi

Senyawa metabolit sekunder yang lebih spesifik dapat diperoleh melalui hidrolisis dan partisi. Senyawa organik umumnya berbentuk glikosida yang terdiri dari glikon dan aglikon yang dihubungkan dengan ikatan glikosida. Senyawa metabolit sekunder termasuk dalam senyawa aglikon (Fasya, dkk., 2016). Hidrolisis adalah jenis reaksi kimia yang terjadi antara air dan senyawa lain

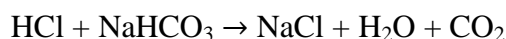
(Lehninger, 1982). Reaksi hidrolisis dalam air berlangsung dengan lambat sehingga hidrolisis dilakukan dengan menambah katalis asam untuk mempercepat reaksi pemutusan ikatan glikosida (Fasya, dkk., 2016).

Katalis asam yang sering digunakan adalah asam klorida (HCl) dan asam sulfat (H_2SO_4) (Mardina, dkk., 2014). Namun, penggunaan HCl lebih dianjurkan karena HCl akan membentuk garam NaCl yang tidak berbahaya ketika proses netralisasi (Budiyati dan Bandi, 2015). Laju proses hidrolisis akan bertambah oleh konsentrasi asam yang tinggi (Mardina, dkk., 2014). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Artati, dkk. (2012) tentang pengaruh jenis dan konsentrasi asam terhadap reaksi hidrolisis, didapatkan hasil bahwa konsentrasi HCl yang optimum untuk reaksi hidrolisis pada pelepah pisang (*Musa Paradisiaca* L.) yaitu HCl dengan konsentrasi 2 N. Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis pada senyawa steroid dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida

Proses hidrolisis yang dilakukan bersifat reversibel, sehingga diperlukan penghentian reaksi yaitu dengan reaksi netralisasi. Kondisi asam oleh HCl dinetralisasi oleh NaHCO₃, reaksinya yaitu (Day dan Underwood, 1993):



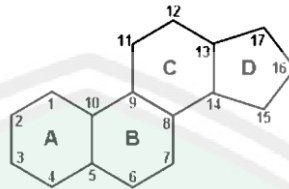
Gambar 2.3 Reaksi netralisasi asam (Day dan Underwood, 1993)

Hasil dari hidrolisis kemudian dipartisi untuk mengambil metabolit sekunder yang memiliki kepolaran yang mirip dengan pelarut (Fasya, dkk., 2016). Pada penelitian ini digunakan 2 variasi pelarut, yaitu etil asetat dan petroleum eter. Penelitian yang dilakukan oleh Mardiyah (2012) menunjukkan bahwa 3 fraksi tertinggi dari ekstrak metanol *Eucheuma spinosum* yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi yaitu fraksi petroleum eter (EC₅₀ = 12,65 mg/L), kemudian fraksi kloroform (EC₅₀ = 19,23 mg/L), dan fraksi etil asetat (EC₅₀ = 41,94 mg/L). Selain itu, Faten, dkk. (2009) mengekstrak alga merah *Gracilaria verrucosa* dengan pelarut etanol 70 % lalu dipartisi dengan etil asetat, *n*-butanol, dan petroleum eter, didapatkan bahwasannya fraksi etil asetat dan petroleum eter merupakan fraksi yang cukup aktif dalam menghambat radikal bebas menggunakan DPPH.

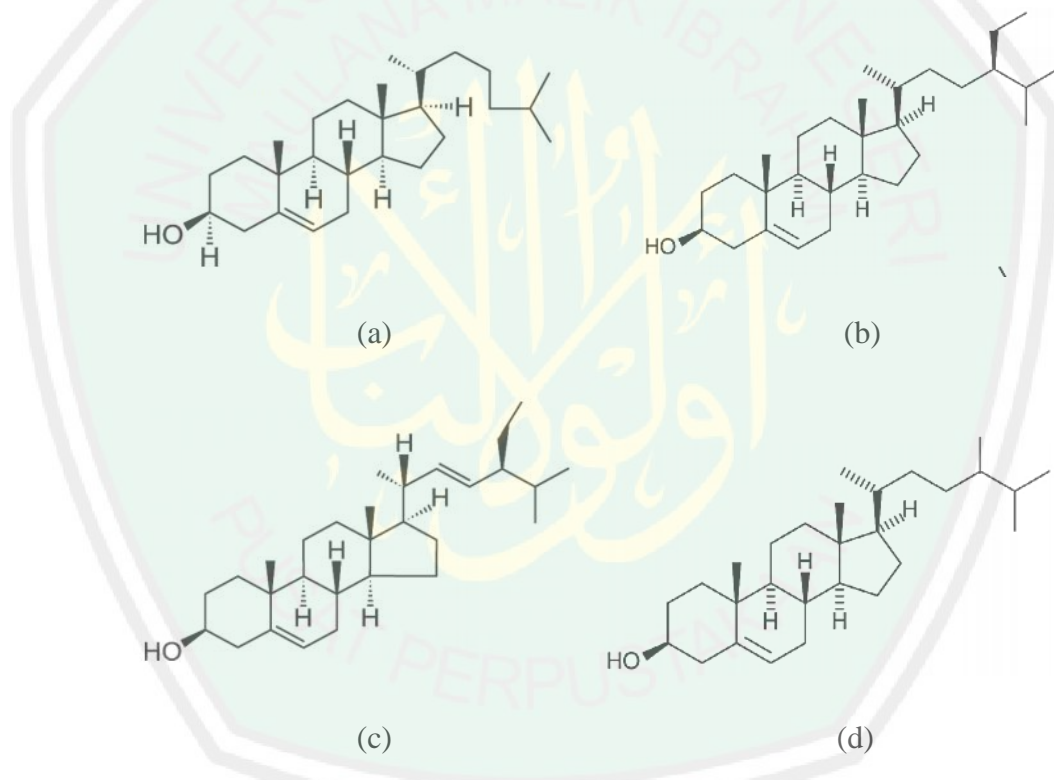
2.3 Steroid

Steroid merupakan senyawa bahan alam yang umumnya memiliki struktur yang terdiri atas 17 atom karbon dengan membentuk struktur 1,2-siklopentenoperhidrofenantren seperti pada Gambar 2.4. Perbedaan antara senyawa satu dengan yang lain ditentukan oleh panjangnya rantai karbon substituen, gugus fungsi yang ada pada substituen, jumlah dan posisi gugus fungsi

oksigen dan ikatan rangkap pada kerangka dasar, serta konfigurasi pusat asimetris pada kerangka dasar (Endarini, 2016). Beberapa struktur senyawa steroid pada tumbuhan (fitosterol) ditunjukkan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.4 Struktur dasar steroid (Sultan dan Raza, 2015)

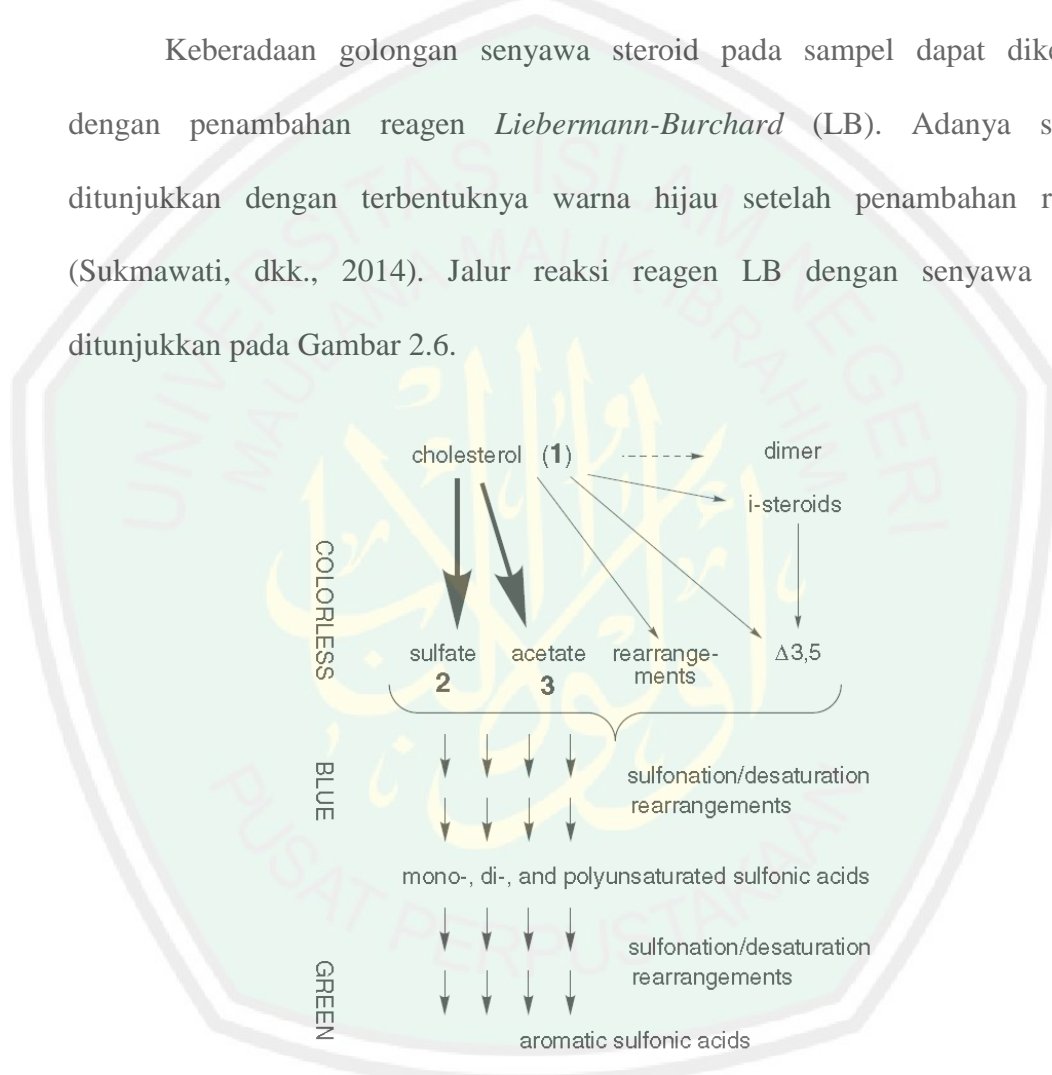


Gambar 2.5 Struktur beberapa senyawa steroid pada tumbuhan (a) kolesterol, (b) β -sitosterol, (c) stigmasterol, (d) kampesterol (Wang, 2008)

Steroid yang ada pada tumbuhan memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang cukup tinggi. Hal tersebut dapat dilihat pada penelitian yang dilakukan oleh Krisna, dkk. (2014), yaitu aktivitas antioksidan steroid pada daun gayam

(*Inocarpus fagiferus* Fosb) yang sangat tinggi dengan nilai IC_{50} sebesar 4 ppm. Selain itu didapatkan hasil penelitian oleh Purwantoro (2019), yakni aktivitas antioksidan isolat steroid fraksi *n*-heksana *Hydrilla verticillata* yang juga sangat tinggi dengan nilai EC_{50} sebesar 5,109 ppm dan diketahui senyawa steroid yang berhasil diidentifikasi yaitu β -sitosterol.

Keberadaan golongan senyawa steroid pada sampel dapat diketahui dengan penambahan reagen *Liebermann-Burchard* (LB). Adanya steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau setelah penambahan reagen (Sukmawati, dkk., 2014). Jalur reaksi reagen LB dengan senyawa sterol ditunjukkan pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Jalur reaksi LB dengan kolesterol (Xiong, dkk., 2007)

Xiong, dkk. (2007) menjelaskan bahwa campuran reagen LB berupa asam sulfat, asam asetat, dan asetat anhidrida dalam kloroform mengubah kolesterol menjadi turunan asetat dan sulfatnya (produk mayor) melalui proses asetilasi dan sulfonasi. Bersamaan dengan itu dihasilkan juga produk minor berupa i-steroid,

kolesta-3-5-diena, dan senyawa tak jenuh lainnya. Kemudian produk-produk tersebut secara perlahan diubah menjadi asam sulfonat *mono-*, *di-*, dan *polyunsaturated* melalui penataan ulang sulfonasi/desaturasi. Senyawa poliena secara bertahap mengalami penataan ulang sulfonasi/desaturasi membentuk steroid aromatik. Adanya respon warna disebabkan karena perbedaan kinetika diantara tahapan-tahapan yang telah disebutkan sebelumnya.

2.4 Pemisahan Steroid Menggunakan KLT

Kromatografi lapis tipis atau disingkat KLT adalah salah satu jenis kromatografi yang bertujuan untuk mendapatkan isolat senyawa yang diinginkan dengan menggunakan eluen terbaik. Kromatografi lapis tipis adalah kromatografi serapan, dimana sebagai fasa tetap (diam) berupa zat padat yang disebut adsorben (penyerap) dan fasa gerak adalah zat cair yang disebut larutan pengembang. Penyerap untuk KLT ialah silika gel, alumina, kiselgur, dan selulosa (Masfufah, 2016). Prinsip dari KLT di mana suatu analit bergerak melintasi lapisan fase diam dan di bawah pengaruh fase gerak yang bergerak melalui fase diam (Syahmani, dkk., 2017). Keuntungan menggunakan metode KLT ini yaitu sampel yang digunakan lebih sedikit, dapat dianalisis secara bersamaan, dan prosesnya cepat (Bhawani, dkk., 2019).

Penotolan sampel pada plat KLT dilakukan menggunakan pipa kapiler. Tujuannya yaitu agar totolan bisa sekecil mungkin sehingga sampel tidak melebar pada plat KLT. Parameter penting yang sering digunakan untuk analisis kualitatif KLT adalah nilai R_f (*Retention factor*). Harga R_f dapat dihitung dengan persamaan 2.1 (Cai, 2014).

$$\text{Harga } R_f = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}} \dots\dots\dots (2.1)$$

Namun, nilai R_f tidak bisa digunakan sebagai acuan atau standar. Untuk mengetahui jenis komponen yang ada pada noda hasil KLT dilakukan dengan penyemprotan reagen tertentu (Cai, 2014). Identifikasi adanya steroid dapat dilakukan dengan penyemprotan reagen *Liebermann-Burchard*. Adanya steroid akan ditunjukkan dengan timbulnya noda yang berwarna hijau (Sukmawati, dkk., 2014).

Eluen yang digunakan untuk mengelusidasi sampel bergantung pada polaritasnya. Penelitian yang dilakukan Al-Quais (2015) menunjukkan bahwa komposisi campuran eluen terbaik yang digunakan untuk pemisahan steroid pada uji KLTA ekstrak *n*-heksana akar rumput bambu (*Lophaterum gracile* Brongn) adalah campuran *n*-heksana dan etil asetat (8:2). Pemisahan tersebut menghasilkan noda terbanyak dibandingkan dengan campuran eluen lain, yaitu 7 noda tidak berekor dengan 1 noda diantaranya diduga sebagai steroid. Sedangkan pada penelitian yang dilakukan Baderos (2017) menunjukkan bahwa eluen terbaik yang digunakan untuk pemisahan steroid pada uji KLTP pemisahan steroid fraksi petroleum eter alga merah (*Euchema cottonii*) adalah *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17:3. Hal ini dibuktikan melalui hasil pemisahan KLTA menggunakan beberapa perbandingan eluen seperti yang dirangkum pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Hasil pemisahan KLTA fraksi petroleum eter alga merah (Baderos, 2017)

No	Perbandingan Eluen <i>n</i> -Heksana:Etil Asetat	Jumlah Noda	Jumlah Dugaan Noda Steroid
1	14:6	9	3
2	15:5	9	3
3	16:4	7	3
4	17:3	7	4
5	18:2	7	3

Berdasarkan Tabel 2.1, dapat diketahui bahwa 17:3 merupakan eluen dengan perbandingan terbaik karena dapat menghasilkan 7 noda dengan pemisahan yang jelas dengan 4 diantaranya berwarna biru dan hijau yang diduga sebagai noda steroid. Baderos lalu melakukan pemisahan KLTP dengan perbandingan eluen *n*-heksana: etil asetat 17:3 dan didapatkan hasil berupa 11 noda dengan 6 noda diantaranya merupakan noda steroid.

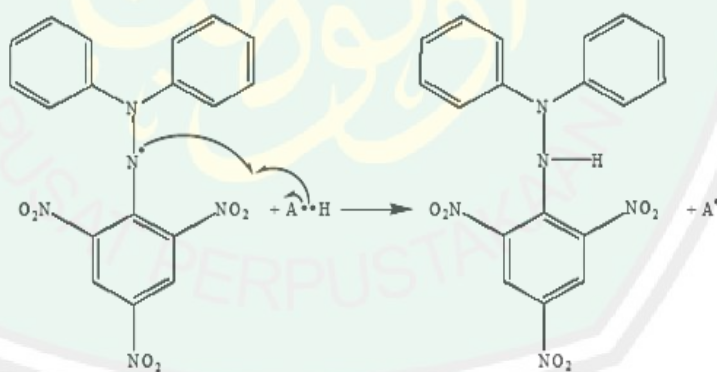
2.5 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Radikal bebas adalah suatu atom atau gugus yang memiliki satu atau lebih elektron tak berpasangan. Radikal bebas dapat ditemui pada lingkungan seperti asap rokok, makanan dalam kemasan, obat, bahan aditif, dan lain-lain. Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga dapat menghambat reaksi radikal bebas. Senyawa ini mempunyai berat molekul yang kecil, namun mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal (Winarsi, 2007).

Radikal bebas yang biasanya digunakan dalam penelitian antioksidan atau peredam radikal bebas yaitu 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). DPPH merupakan radikal bebas sintetik yang ditemukan oleh Goldschmidt dan Renn

pada tahun 1922, yang digunakan di berbagai penelitian seperti menentukan aktivitas antioksidan amina, fenol, atau senyawa alami (vitamin, ekstrak tumbuhan, dan obat) dan untuk menghambat reaksi homolitik (Indranila dan Ulfah, 2015; Ionita, 2005). Metode DPPH merupakan metode uji antioksidan yang sederhana, tidak membutuhkan banyak reagen, dan cepat (Karadag, dkk., 2009).

Gugus kromofor dan auksokrom yang ada pada radikal bebas DPPH memberikan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 517 nm dan menimbulkan warna ungu. Saat elektron tunggal pada DPPH berpasangan dengan hidrogen dari senyawa antioksidan, warna DPPH yang semula ungu akan berubah menjadi kuning, membentuk senyawa 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin (DPPH-H) (Dehpour, dkk., 2009; Ionita, 2005). Mekanisme penangkapan radikal bebas oleh senyawa antioksidan ditunjukkan pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Reaksi radikal DPPH dengan antioksidan (Da'i, dkk., 2011)

Efficiency Concentration (EC_{50}) digunakan sebagai parameter pada pengujian menggunakan metode DPPH. Nilai EC_{50} menunjukkan konsentrasi ekstrak uji yang mampu menangkap radikal bebas sebanyak 50% yang didapatkan

melalui persamaan regresi. Regresi yang digunakan adalah reegresi nonlinear. Analisis regresi nonlinear digunakan untuk menyesuaikan data dengan model yang mendefinisikan Y (respon) sebagai fungsi dari X (dosis). Variabel X merupakan bentuk logaritma dari konsentrasi larutan uji, sedangkan variabel Y merupakan nilai dari % aktivitas antioksidan. Adanya transformasi variabel X dalam bentuk logaritma berfungsi untuk membuat data lebih terdistribusi normal (Motulsky dan Christopoulos, 2003). Semakin kecil nilai EC_{50} , semakin efektif senyawa tersebut bertindak sebagai penangkal radikal bebas (Rohman dan Riyanto, 2005). Ketentuan kekuatan antioksidan dapat dirangkum pada Tabel 2.2 (Hidajat, 2005).

Tabel 2.2 Ketentuan kekuatan antioksidan

Kekuatan Antioksidan	IC_{50}/EC_{50} (mg/L)
Sangat kuat	< 50
Kuat	50-100
Sedang	100-150
Lemah	150-200
Sangat lemah	> 200

2.6 Identifikasi Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

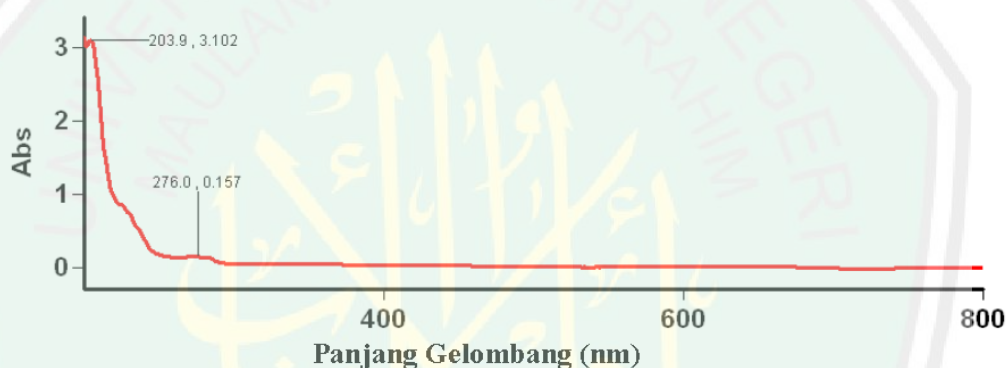
Spektrofotometer UV-Vis adalah pengukuran panjang gelombang dan intensitas sinar ultraviolet dan cahaya tampak yang diabsorpsi oleh sampel. Sinar ultraviolet berada pada panjang gelombang 200-400 nm sedangkan sinar tampak berada pada panjang gelombang 400-800 nm (Dachriyanus, 2004). Analisis dengan spektrofotometer UV-Vis dapat dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Analisis kualitatif meliputi pemeriksaan kemurnian spektra UV-Vis dan penentuan panjang gelombang serapan maksimum. Analisis kuantitatif meliputi

penentuan konsentrasi sampel (Apratiwi, 2016). Hal-hal yang mempengaruhi analisis UV-Vis adalah kromofor, auksokrom, dan pelarut (Suhartati, 2017).

Prinsip kerja dari instrumen ini adalah interaksi senyawa organik dengan sinar ultraviolet dan sinar tampak. Bagian dari molekul yang paling cepat bereaksi dengan sinar tersebut adalah elektron-elektron ikatan dan elektron-elektron non ikatan (elektron bebas). Sinar ultraviolet dan sinar tampak merupakan energi, yang bila mengenai elektron-elektron tersebut maka elektron akan tereksitasi dari keadaan dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Eksitasi elektron-elektron ini direkam dalam bentuk spektrum yang dinyatakan sebagai panjang gelombang dan absorbansi, sesuai jenis elektronnya. Makin mudah elektron-elektron bereksitasi makin besar panjang gelombang yang diabsorpsi, makin banyak elektron yang bereksitasi makin tinggi absorbansi (Suhartati, 2017).

Tipe-tipe transisi elektronik meliputi $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, dan $n \rightarrow \pi^*$. Kromofor yang menyebabkan eksitasi dari $\sigma \rightarrow \sigma^*$ adalah sistem yang mempunyai elektron σ pada orbital molekul. Senyawa-senyawa yang hanya mempunyai orbital σ adalah senyawa organik jenuh yang tidak mempunyai pasangan elektron bebas. Transisi dari $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ini akan menghasilkan serapan pada λ_{maks} sekitar 150 nm. Transisi dari $n \rightarrow \sigma^*$ menyerap pada λ_{maks} kecil dari 200 nm, yang diberikan oleh sistem yang mempunyai elektron yang tidak berikatan dan adanya orbital σ pada molekul. Kromofor yang memberikan transisi dari $\pi \rightarrow \pi^*$ menyerap pada λ_{maks} kecil dari 200 nm (tidak terkonjugasi). Kromofor ini merupakan tipe transisi dari sistem yang mengandung elektron π pada orbital molekulnya. Sedangkan kromofor yang memberikan transisi dari $n \rightarrow \pi^*$ memberikan serapan pada λ_{maks} 300 nm (Dachriyanus, 2004).

Hasil identifikasi isolat steroid hasil KLTP fraksi *n*-heksana *Hydrilla verticillata* yang dilakukan oleh Purwantoro (2019) menghasilkan spektrum seperti pada Gambar 2.8. Berdasarkan spektrum tersebut, identifikasi senyawa steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis menghasilkan serapan maksimum pada panjang gelombang 203,9 dan 276 nm. Panjang gelombang 203,9 nm menunjukkan adanya senyawa steroid jenis β -sitosterol dan terdapat ikatan C=C tidak terkonjugasi dengan transisi $\pi \rightarrow \pi^*$. Sedangkan panjang gelombang 276 nm menunjukkan adanya ikatan rangkap terkonjugasi pada senyawa.



Gambar 2.8 Spektrum UV-Vis isolat steroid hasil KLTP fraksi *n*-heksana (Purwantoro, 2019)

2.7 Integrasi Penelitian dengan Al-Qur'an

Al-Qur'an merupakan petunjuk dan pedoman hidup bagi manusia khususnya mereka yang beriman dan bertakwa kepada Allah Swt. Tiada keraguan di dalamnya, kebenaran al-Qur'an sepanjang masa. Al-Quran tidak hanya mengandung ayat-ayat yang mengatur tentang hukum syariah atau fiqih, tetapi juga ilmu pengetahuan yang perlu dikaji dan diaplikasikan oleh umat Islam. Contoh pengaplikasiannya yaitu dengan mengetahui hubungan atau integrasi penelitian ini dengan al-Qur'an. Allah Swt. berfirman dalam QS. an-Naba' (78) ayat 14-15:

وَأَنْزَلْنَا مِنَ الْمُعْصِرَاتِ مَاءً ثَجَّاجًا ﴿١٤﴾ لِنُخْرِجَ بِهِ حَبًّا وَنَبَاتًا ﴿١٥﴾

Artinya: “Dan Kami turunkan dari awan, air hujan yang tercurah dengan hebatnya, untuk Kami tumbuhkan dengan air itu biji-bijian dan tanam-tanaman.” (QS. An-Naba’/78:14-15)

Berdasarkan Tafsir Al-Mishbah, kata المعصرات adalah bentuk jamak dari kata المعصر yang terambil dari kata عصر yang artinya memeras. Hujan merupakan hasil kumpulan uap air lautan dan samudra yang membentuk awan dan berubah menjadi tetesan-tetesan air. Uap-uap air yang terkumpul bagaikan diperas lalu tercurah dalam bentuk hujan atau embun. Kata لنخرج berarti “supaya Kami mengeluarkan”. Maksudnya, dari air hujan yang tercurah dengan hebat itu, Allah Swt. menumbuhkan biji-bijian maupun tumbuhan yang dapat dimanfaatkan oleh manusia (Shihab, 2002). *Hydrilla verticillata* merupakan salah satu tumbuhan akuatik yang telah diciptakan oleh Allah Swt. Kita sebagai manusia harus mensyukuri apa yang diciptakan oleh Allah Swt. dan mengeksplor ciptaan Allah Swt. tersebut, salah satunya dengan adanya penelitian ini. Adanya penelitian ini dimaksudkan agar kita dapat mengetahui manfaat dari *Hydrilla verticillata* itu sendiri, karena Allah Swt. tidak menciptakan sesuatu secara sia-sia, seperti yang tertera dalam QS. Shad (38) ayat 27:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَاطِلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا ۚ قَوِيلٌ لِّلَّذِينَ
كَفَرُوا مِنَ النَّارِ ﴿٢٧﴾

Artinya: “Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada di antara keduanya dengan sia-sia. Itu anggapan orang-orang kafir, maka celakalah orang-orang kafir itu karena mereka akan masuk neraka.” (QS. Shad/38:27)

Kata *باطلا* berarti sia-sia tanpa tujuan atau dengan permainan. Dalam ayat ini, dijelaskan bahwa Allah Swt. menciptakan langit dan bumi juga segala yang ada di antara keduanya dengan tata aturan yang demikian rapi, indah, serta harmonis. Ini menunjukkan bahwa Dia tidak bermain-main yakni tidak menciptakan secara sia-sia tanpa arah dan tujuan yang benar (Shihab, 2002). Begitupun dengan *Hydrilla verticillata*. Walaupun tumbuhan ini dianggap sebagai pengganggu/gulma oleh sebagian besar masyarakat, namun ternyata tumbuhan ini memiliki manfaat yang sangat besar, salah satunya yaitu potensinya sebagai penangkal radikal bebas (sebagai antioksidan). Allah Swt. berfirman dalam QS. Yasin (36) ayat 36:

سُبْحٰنَ الَّذِيْ خَلَقَ الْاَزْوَاجَ كُلَّهَا مِمَّا تُنْبِتُ الْاَرْضُ وَمِنْ اَنْفُسِهِمْ وَمِمَّا لَا يَعْلَمُوْنَ (۳۶)

Artinya: "Maha Suci (Allah) yang telah menciptakan semuanya berpasang-pasangan, baik dari apa yang ditumbuhkan oleh bumi dan dari diri mereka sendiri, maupun dari apa yang mereka tidak ketahui." (QS. Yasin/36:36)

Kata *أزواج* dari segi bahasa adalah bentuk jamak dari kata *زوج* yang artinya pasangan. Kata ini menurut pakar bahasa al-Qur'an, Ar-Raghib Al-Ashfahani, digunakan untuk hal-hal yang berdampingan, baik jantan maupun betina, binatang, manusia, dan juga bagi selain binatang (bukan makhluk hidup). Ar-Raghib menegaskan bahwa keberpasangan tersebut bisa akibat kesamaan dan bisa juga karena bertolak belakang (Shihab, 2002). Begitupun dengan senyawa oksidan (radikal bebas) yang berpasangan dengan antioksidan (memiliki atom hidrogen yang dapat meredam radikal bebas). Dengan adanya atom hidrogen dari senyawa antioksidan, senyawa radikal bebas yang mulanya berbahaya bagi tubuh dapat diubah menjadi senyawa yang tidak membahayakan tubuh.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September sampai November 2020 di Laboratorium Edukasi Organik, Jurusan Kimia, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cawan porselen, spatula, timbangan analitik, oven, desikator, aluminium foil, kertas saring, erlenmeyer vakum, corong *Buchner*, pompa vakum, seperangkat *rotary evaporator*, seperangkat alat gelas, pipet ukur 1 mL, pipet ukur 5 mL, pipet ukur 10 mL, pipet tetes, mikro pipet, bola hisap, *magnetic stirrer hot plate*, corong pisah, statif, corong gelas, lemari asap, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *vortex mixer*, botol vial, dan seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis.

3.2.2 Bahan Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Hydrilla verticillata* yang berasal dari Danau Ranu Grati Pasuruan. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah metanol *p.a.*, petroleum eter *p.a.*, etil asetat *p.a.*, HCl 2 N, larutan DPPH 0,20 mM, gas N₂, HCl 37%, H₂SO₄, kloroform, asam asetat anhidrida, reagen *Liebermann-Burchard*, *n*-heksana, etanol, dan akuades.

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

- a). Preparasi sampel;
- b). Penentuan kadar air secara termogravimetri;
- c). Ekstraksi senyawa aktif;
- d). Hidrolisis dengan HCl dan partisi dengan etil asetat dan petroleum eter;
- e). Uji fitokimia golongan senyawa steroid;
- f). Pemisahan steroid menggunakan KLTP;
- g). Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH;
- h). Identifikasi steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis;
- i). Analisis data.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Preparasi Sampel

Pengambilan *H. verticillata* dilakukan di permukaan air Danau Ranu Grati. Sampel diambil sebanyak 14 kg dan dicuci dengan air sampai bersih. Kemudian sampel dikering-anginkan di bawah naungan. Setelah kering, sampel dihaluskan dan diayak dengan ukuran 90 mesh di Materia Medica Batu.

3.4.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri

Cawan porselen dipanaskan dalam oven pada suhu 100-105°C selama 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya. Kemudian cawan disimpan dalam desikator selama 10 menit, ditimbang, dan dilakukan perlakuan yang sama sampai cawan mencapai berat konstan. Sebanyak 5 g sampel dimasukkan ke dalam cawan porselen yang telah diperoleh berat konstannya, lalu dikeringkan di dalam oven

pada suhu 100-105°C selama 15 menit. Selanjutnya sampel disimpan dalam desikator selama 10 menit, ditimbang, dan dilakukan perlakuan yang sama hingga cawan yang berisi sampel mencapai berat konstan. Kadar air *H. verticillata* dihitung menggunakan persamaan 3.1 (Association of Official Analytical Chemists, 1984) dengan *a* adalah berat cawan kosong, *b* adalah berat cawan + sampel sebelum dikeringkan, dan *c* adalah berat cawan + sampel setelah dikeringkan.

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

3.4.3 Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi komponen aktif *Hydrilla verticillata* dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk *H. verticillata* sebanyak 100 g direndam dengan 500 mL metanol *p.a* dalam erlenmeyer tutup 1000 mL selama 24 jam dengan diiringi pengocokan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Ekstrak hasil perendaman disaring menggunakan corong *Buchner*. Filtrat disimpan pada erlenmeyer dan residu yang diperoleh dimaserasi kembali hingga 5 kali pengulangan. Kelima filtrat digabung menjadi satu lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat ditimbang dan dihitung rendemennya menggunakan persamaan 3.2.

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

3.4.4 Hidrolisis dan Partisi

Hidrolisis ekstrak metanol *Hydrilla verticillata* dilakukan dengan cara menambahkan 2 mL HCl 2N dalam 1 g ekstrak pekat metanol, kemudian dihomogenkan dengan magnetik stirrer selama 2 jam pada suhu ruang dan ditambahkan natrium bikarbonat hingga pH netral. Hidrolisat yang diperoleh dipartisi dengan pelarut etil asetat dan petroleum eter. Hidrolisat dimasukkan ke dalam corong pisah, ditambahkan 5 mL etil asetat/petroleum eter, dikocok selama 15 menit, dan didiamkan beberapa saat hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan organik dan lapisan air. Masing-masing lapisan yang terbentuk kemudian dipisahkan. Lapisan organik yang diperoleh ditampung dalam gelas kimia. Masing-masing fraksi pelarut (lapisan organik) dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh fraksi pekat etil asetat dan petroleum eter. Fraksi pekat dialiri gas N₂ sehingga diperoleh fraksi kering. Masing-masing fraksi kering ditimbang dan dihitung rendemennya menggunakan persamaan 3.2.

3.4.5 Uji Fitokimia Golongan Senyawa Steroid

Fraksi etil asetat dan petroleum eter dari *Hydrilla verticillata* diuji fitokimia untuk mengetahui keberadaan golongan senyawa steroid di dalamnya. Uji fitokimia dilakukan dengan cara fraksi *H. verticillata* dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, dan ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya campuran tersebut ditambahkan dengan 1-2 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung. Adanya steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau (Sukmawati, dkk., 2014).

3.4.6 Pemisahan Steroid Menggunakan KLTP

Metode KLT preparatif dilakukan dengan menggunakan plat silika gel GF₂₅₄ ukuran (10 x 20) cm yang telah diaktivasi dalam oven pada suhu 100°C selama 30 menit. Ekstrak pekat hasil ekstraksi ditotolkan sepanjang plat pada jarak 1 cm dari bawah dan dari garis tepi. Selanjutnya dikeringkan dan dielusi menggunakan eluen *n*-heksana:etil asetat 17:3 (Baderos, 2017). Proses elusi dihentikan setelah fase gerak mencapai garis batas pada plat. Selanjutnya, diamati noda-noda yang muncul pada plat di bawah lampu UV panjang gelombang 254 dan 366 nm. Noda yang diduga sebagai steroid dikerok dan dilarutkan dalam pelarut etil asetat/petroleum eter. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit dan diambil supernatannya. Masing-masing supernatan diuapkan pelarutnya dengan gas N₂ hingga diperoleh isolat pekat dari masing-masing noda.

3.4.7 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

3.4.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Etanol 95% dipipet sebanyak 3 mL dan ditambahkan larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 mL. Selanjutnya ditutup tabung reaksi dengan aluminium foil dan dihomogenkan. Larutan yang telah homogen dimasukkan ke dalam kuvet hingga penuh. Kemudian dicari λ_{maks} DPPH pada daerah panjang gelombang sinar tampak, yaitu 400-800 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan dicatat hasil pengukuran λ_{maks} untuk digunakan pada tahap selanjutnya.

3.4.7.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel

Sampel isolat hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter dibuat variasi konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm dalam etanol 95%. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 3 mL dan ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,2 mM, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Sedangkan kontrol yang digunakan yaitu larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 mL dalam 3 mL etanol 95%. Selanjutnya diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh sebelumnya. Data absorbansi yang didapatkan tiap konsentrasi ekstrak dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya menggunakan persamaan 3.3 (Katrin dan Bendra, 2015).

$$\text{Aktivitas antioksidan} = \left(\frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \right) \times 100 \% \dots\dots\dots(3.3)$$

Nilai % aktivitas antioksidan yang diperoleh kemudian digunakan untuk menghitung nilai EC₅₀ dengan prinsip regresi nonlinear menggunakan program “*GraphPad Prism7, Regression for analyzing doseresponse data*”. Konsentrasi sampel diinputkan ke kolom X dan % aktivitas antioksidan diinputkan ke kolom Y. Konsentrasi sampel selanjutnya ditransformasi ke dalam bentuk logaritma. Kemudian dipilih *nonlinear regression* diklik persamaan pada *Dose-response – Stimulation* yaitu “*log(agonist) vs. Normalized response – Variable slope*” dan diatur interval kepercayaannya pada menjadi 95%

3.4.8 Identifikasi Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Isolat steroid hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Konsentrasi isolat yang dipakai adalah 5

ppm. Isolat yang telah dikeringkan dilarutkan dalam pelarut *n*-heksana. Kemudian isolat dimasukkan ke dalam kuvet lalu diukur pada rentang panjang gelombang 200-800 nm.

3.4.9 Analisis Data

Data hasil analisis pada program *GraphPad Prism7* berupa data grafik dan angka (termasuk nilai EC_{50}) yang kemudian dideskripsikan hasilnya. Identifikasi senyawa steroid dilakukan dengan menganalisis isolat hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya spektra yang didapat dibandingkan dengan literatur.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Sampel *Hydrilla verticillata* yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Danau Ranu Grati, Pasuruan. Proses preparasi sampel diawali dengan pencucian sampel untuk menghilangkan pengotor yang dapat mempengaruhi nilai rendemen yang diperoleh. Kemudian dilakukan pengeringan yang bertujuan untuk mengurangi kandungan air pada sampel sehingga sampel memiliki waktu penyimpanan yang lebih lama. Pengeringan dilakukan dengan cara sampel dikering-anginkan di bawah naungan, hal ini bertujuan untuk menghindari rusaknya senyawa metabolit sekunder oleh sinar matahari.

Penghalusan sampel selanjutnya dilakukan untuk memaksimalkan proses ekstraksi dengan meningkatkan kerusakan sel-sel sehingga senyawa aktif pada sampel lebih mudah untuk larut dalam pelarut. Selain itu, penghalusan juga berfungsi untuk memperluas permukaan sampel sehingga kontak antara sampel dengan pelarut dapat berjalan dengan maksimal. Penghalusan sampel menggunakan pengayak berukuran 90 mesh menghasilkan 1 kg serbuk kering dari 14 kg sampel basah, sehingga diperoleh rendemen serbuk kering *Hydrilla verticillata* sebesar 7,14% (Lampiran 4.1).

4.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri

Analisis kadar air ini dilakukan untuk mengetahui kadar air yang terkandung dalam sampel serbuk *Hydrilla verticillata*. Kadar air yang terlalu

tinggi menyebabkan tumbuhnya mikroba yang dapat menurunkan kualitas hasil ekstraksi serta menurunkan waktu simpan dari sampel tersebut. Pada penelitian ini diperoleh hasil analisis kadar air dari serbuk *Hydrilla verticillata* secara termogravimetri sebesar 7,60% (Lampiran 4.2). Hasil tersebut sesuai dengan aturan yang ditetapkan oleh Menteri Kesehatan Republik Indonesia, bahwa batasan kadar air dari simplisia yang berupa serbuk yaitu tidak lebih dari 10% (Depkes RI, 1994).

4.3 Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi maserasi *Hydrilla verticillata* dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol *p.a.* yang bersifat polar, sehingga metabolit sekunder yang masih terikat dengan gugus glikosida dapat larut dengan maksimal, sesuai dengan prinsip *like dissolves like*. Perendaman sampel dalam pelarut bertujuan untuk merusak membran sel sampel sehingga senyawa aktif yang terkandung dalam sampel dapat tertarik keluar dan larut ke dalam pelarut. Proses perendaman dilakukan selama 24 jam disertai dengan pengocokan menggunakan *shaker* untuk memaksimalkan kontak antara sampel dan pelarut.

Proses maserasi dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan dengan menggunakan pelarut baru di setiap pengulangannya. Proses remaserasi menyebabkan warna filtrat berubah menjadi lebih bening yang menandakan bahwa senyawa aktif yang terkandung dalam sampel *Hydrilla verticillata* telah terekstrak dengan maksimal. Selanjutnya filtrat hasil ekstraksi diuapkan menggunakan *rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarut metanol sehingga diperoleh ekstrak pekat dari *Hydrilla verticillata*. Proses ekstraksi pada penelitian

ini menghasilkan ekstrak pekat berwarna hijau tua dengan rendemen sebesar 6,49% (Lampiran 4.3.1).

4.4 Hidrolisis dan Partisi

Senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak metanol *Hydrilla verticillata* merupakan senyawa yang masih berbentuk glikosida. Maka dari itu, dilakukan hidrolisis untuk memutus ikatan glikosida menjadi glikon (gugus gula) dan aglikon (metabolit sekunder) dengan bantuan katalis asam untuk mempercepat reaksi yaitu HCl 2 N. Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis ikatan glikosida dapat dilihat pada Gambar 2.2. Hidrolisis merupakan reaksi yang bersifat reversibel, sehingga perlu dilakukan penetralan menggunakan NaHCO_3 agar tidak terjadi reaksi pembentukan ikatan glikosida kembali. Reaksi penetralan oleh NaHCO_3 ditunjukkan pada Gambar 2.3.

Hasil hidrolisis selanjutnya dipartisi menggunakan pelarut etil asetat dan petroleum eter. Proses partisi kedua pelarut menghasilkan dua lapisan yang tidak saling bercampur, yaitu fasa organik yang mengandung steroid dan fasa air yang mengandung glikon dan garam hasil hidrolisis. Baik pada partisi menggunakan pelarut etil asetat maupun petroleum eter, fasa organik berada pada lapisan atas dan fasa air berada pada lapisan bawah. Hal ini dikarenakan adanya perbedaan massa jenis dari air ($\rho_{\text{air}} = 0,997 \text{ g/mL}$) yang lebih besar daripada pelarut ($\rho_{\text{EA}} = 0,902 \text{ g/mL}$; $\rho_{\text{PE}} = 0,693 \text{ g/mL}$). Hasil partisi kedua pelarut ditunjukkan pada Tabel 4.1.

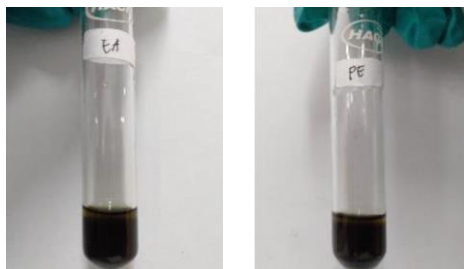
Tabel 4.1 Hasil partisi menggunakan pelarut etil asetat dan petroleum eter

Pelarut	Warna Fraksi Pekat	Berat Fraksi Pekat (g)	Rendemen
Etil asetat	Hijau kehitaman	0,3304	33,04 %
Petroleum eter	Cokelat kehitaman	0,3076	30,76 %

Berdasarkan Tabel 4.1 diketahui bahwa rendemen fraksi etil asetat lebih besar daripada rendemen fraksi petroleum eter dengan selisih 2,28%, sehingga dapat disimpulkan bahwa secara kuantitatif metabolit sekunder yang terkandung dalam hydrilla lebih terdistribusi ke dalam etil asetat dibandingkan petroleum eter. Hal ini diasumsikan karena jumlah metabolit sekunder yang kepolarannya mirip dengan etil asetat lebih banyak daripada metabolit sekunder yang kepolarannya mirip dengan petroleum eter. Pola nilai rendemen ini juga ditemukan pada penelitian Amalia, dkk. (2018) dan Jannah (2020) yang mendapati bahwa rendemen fraksi etil asetat lebih besar daripada fraksi petroleum eter *Hydrilla verticillata* dengan selisih rendemen berturut-turut 8,53% dan 1,54%.

4.5 Uji Fitokimia Golongan Senyawa Steroid

Uji fitokimia ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan golongan senyawa steroid pada fraksi etil asetat maupun petroleum eter *Hydrilla verticillata* dengan penambahan reagen *Liebermann-Burchard* (LB). Reaksi steroid dengan reagen LB menghasilkan respon warna yang disebabkan karena perbedaan kinetika diantara tahapan-tahapan dari reaksi tersebut. Jalur reaksi LB dengan steroid dapat dilihat pada Gambar 2.6. Hasil uji fitokimia steroid pada fraksi etil asetat dan petroleum eter *Hydrilla verticillata* ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil uji fitokimia steroid (a) fraksi etil asetat (b) fraksi petroleum eter

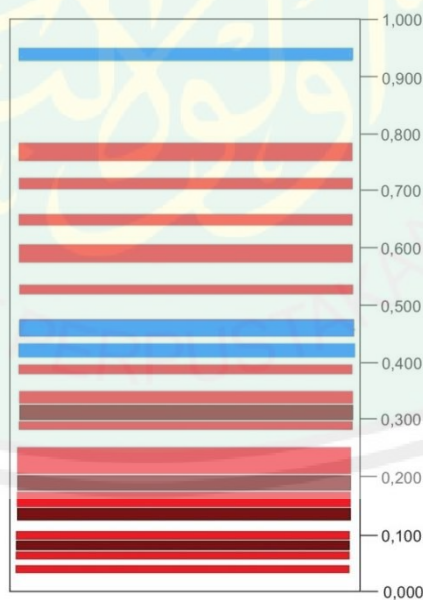
Hasil uji fitokimia menunjukkan terdapat golongan senyawa steroid pada fraksi etil asetat maupun petroleum eter yang ditandai dengan terbentuknya warna hijau setelah diteteskan reagen LB. Begitupun juga dengan uji fitokimia yang dilakukan Amalia, dkk. (2018) dan Anggraeni, dkk. (2014) yang menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dan petroleum eter *Hydrilla verticillata* dan mikroalga *Chlorella* sp. positif mengandung steroid.

4.6 Pemisahan Steroid Menggunakan KLTP

Pemisahan KLTP dilakukan untuk mendapatkan isolat steroid menggunakan plat GF₂₅₄ berukuran (10 x 20) cm. Eluen yang digunakan untuk pemisahan KLTP fraksi etil asetat (EA) dan petroleum eter (PE) *Hydrilla verticillata* yaitu *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17:3. Pemilihan eluen didasarkan pada hasil penelitian Baderos (2017) yang menyatakan bahwa *n*-heksana:etil asetat (17:3) merupakan eluen dengan perbandingan terbaik pada pemisahan KLTA fraksi petroleum eter alga merah (Tabel 2.1). Hasil pemisahan KLTP fraksi etil asetat saat diamati di bawah lampu UV 366 nm ditunjukkan pada Tabel 4.2 dan Gambar 4.2.

Tabel 4.2 Hasil pemisahan KLTP fraksi etil asetat

No.	R_f	Warna Noda	Dugaan Senyawa
1	0,044	Merah	Triterpenoid
2	0,069	Merah	Triterpenoid
3	0,089	Merah	Triterpenoid
4	0,100	Merah	Triterpenoid
5	0,139	Merah	Triterpenoid
6	0,158	Merah	Triterpenoid
7	0,181	Merah	Triterpenoid
8	0,219	Merah	Triterpenoid
9	0,283	Merah	Triterpenoid
10	0,311	Merah	Triterpenoid
11	0,331	Merah	Triterpenoid
12	0,381	Merah	Triterpenoid
13	0,422	Biru	Steroid
14	0,469	Biru	Steroid
15	0,528	Merah	Triterpenoid
16	0,594	Merah	Triterpenoid
17	0,650	Merah	Triterpenoid
18	0,708	Merah	Triterpenoid
19	0,772	Merah	Triterpenoid
20	0,931	Biru	Steroid



Gambar 4.2 Ilustrasi hasil pemisahan KLTP fraksi etil asetat

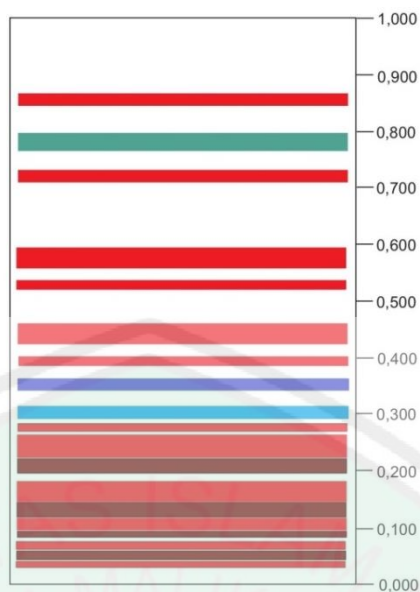
Pemisahan KLTP fraksi etil asetat menghasilkan 20 noda dengan 3 noda diantaranya diduga sebagai steroid. Hal ini sesuai dengan penelitian Megawati,

dkk. (2019) bahwa noda berwarna biru pada pemisahan KLTP fraksi kloroform *Chlorella* sp. merupakan noda yang diduga sebagai steroid. Amalia, dkk. (2018) juga menemukan noda berwarna biru dengan R_f 0,983 pada hasil KLTP fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak etanol *Hydrilla vericillata*.

Noda yang diduga sebagai steroid pada hasil KLTP fraksi etil asetat memiliki kepolaran yang berbeda-beda. Hal tersebut dapat dilihat dari perbedaan R_f masing-masing noda. Noda 20 memiliki nilai R_f yang paling besar yang mengindikasikan bahwa noda ini memiliki kepolaran yang paling rendah. Noda dengan kepolaran yang rendah menandakan bahwa noda tersebut berinteraksi lebih kuat dengan fasa geraknya. Hal ini dikarenakan fasa gerak pada penelitian ini (*n*-heksana-etil asetat) cenderung memiliki kepolaran yang lebih rendah daripada fasa diamnya (silika). Hasil pemisahan KLTP fraksi petroleum eter saat diamati di bawah lampu UV 366 nm ditunjukkan pada Tabel 4.3 dan Gambar 4.3.

Tabel 4.3 Hasil pemisahan KLTP fraksi petroleum eter

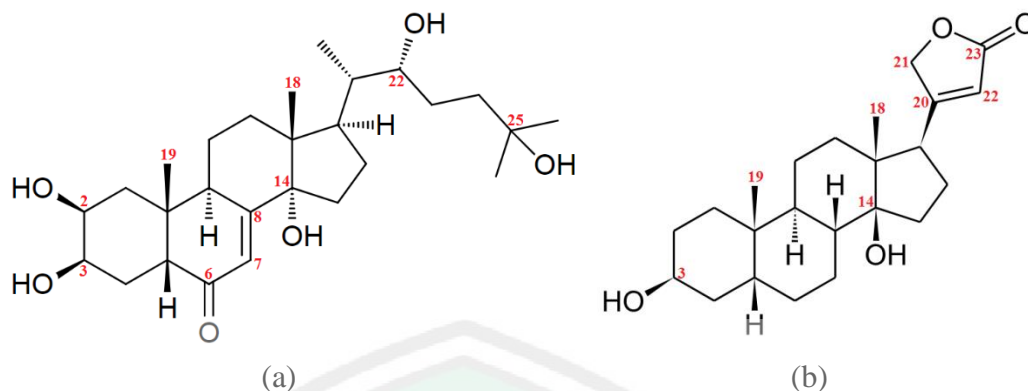
No.	R_f	Warna Noda	Dugaan Senyawa
1	0,030	Merah	Triterpenoid
2	0,058	Merah	Triterpenoid
3	0,069	Merah	Triterpenoid
4	0,091	Merah	Triterpenoid
5	0,105	Merah	Triterpenoid
6	0,127	Merah	Triterpenoid
7	0,163	Merah	Triterpenoid
8	0,215	Merah	Triterpenoid
9	0,240	Merah	Triterpenoid
10	0,276	Merah	Triterpenoid
11	0,301	Biru kehijauan	Steroid
12	0,343	Biru keunguan	Steroid
13	0,398	Merah	Triterpenoid
14	0,439	Merah	Triterpenoid
15	0,530	Merah	Triterpenoid
16	0,580	Merah	Triterpenoid
17	0,710	Merah	Triterpenoid
18	0,785	Hijau	Steroid
19	0,867	Merah	Triterpenoid



Gambar 4.3 Ilustrasi hasil pemisahan KLTP fraksi petroleum eter

Pemisahan KLTP fraksi petroleum eter menghasilkan 19 noda dengan 3 noda diantaranya diduga sebagai steroid. Amalia, dkk. (2018) menemukan noda biru keunguan yang diduga sebagai steroid pada pemisahan KLTP fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak etanol *Hydrilla verticillata*. Azizah (2016) juga menemukan noda hijau yang diduga sebagai steroid pada hasil KLTP fraksi petroleum eter alga merah menggunakan eluen *n*-heksana:etil asetat (17:3).

Baik pada pemisahan KLTP fraksi etil asetat maupun petroleum eter, keduanya menunjukkan hasil berupa noda-noda yang diduga sebagai steroid dengan kepolaran yang berbeda. Adanya perbedaan kepolaran tersebut diakibatkan oleh perbedaan struktur dari steroid yang terkandung pada masing-masing noda. Sebagaimana yang telah dijelaskan Dinan, dkk. (2001) bahwa jenis steroid pada tumbuhan (fitosterol) bermacam-macam dan memiliki kepolaran yang berbeda. Perbandingan senyawa steroid dengan kepolaran yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 4.4.

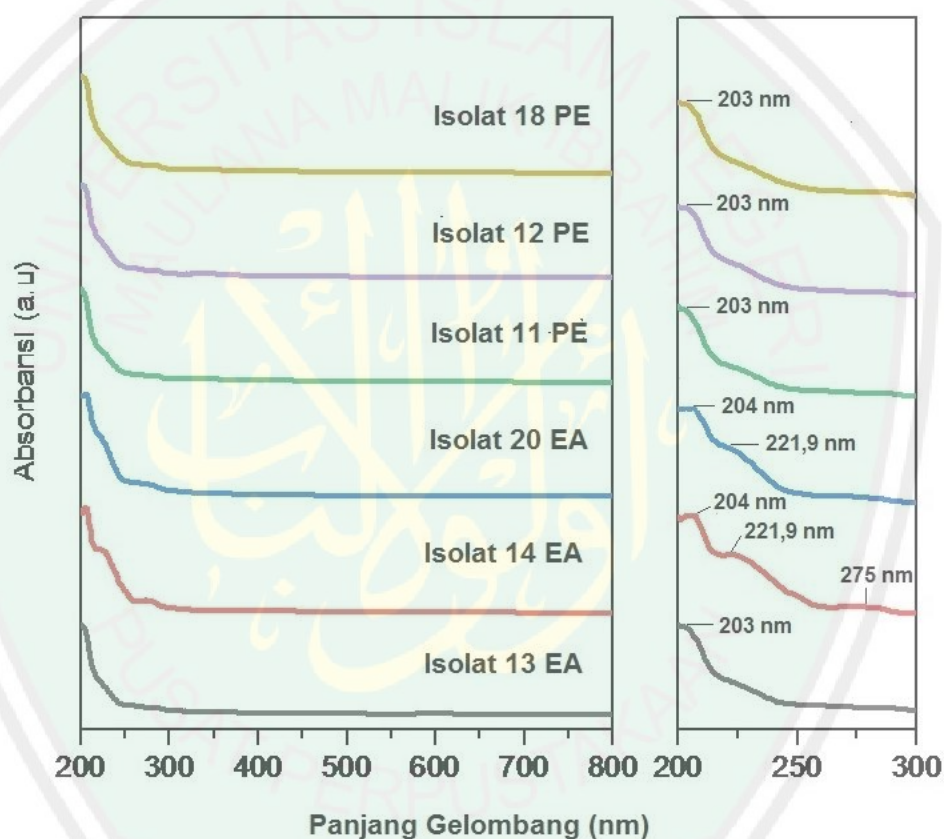


Gambar 4.4 Struktur fitosterol dengan kepolaran yang berbeda (a) ekdison (b) digitoksigenin (Dinan, dkk., 2001)

Struktur ekdison pada Gambar 4.4 memiliki kepolaran yang lebih tinggi daripada digitoksigenin (Dinan, dkk., 2001). Ekdison memiliki rantai samping berupa alkanal alifatik dengan 2 gugus hidroksil (-OH) yang terikat pada strukturnya, sedangkan digitoksigenin memiliki rantai samping berupa ester siklik dengan terdapat ikatan rangkap pada struktur siklisnya. Gugus -OH pada ekdison dan gugus ester pada digitoksigenin dapat meningkatkan kepolaran dari kedua struktur tersebut. Namun, kepolaran dari struktur ekdison lebih tinggi daripada digitoksigenin karena ekdison memiliki jumlah gugus -OH yang lebih banyak daripada digitoksigenin, baik pada rantai utama maupun rantai sampingnya. Gugus -OH memiliki perbedaan keelektronegatifan yang tinggi sehingga dapat menambah kepolaran struktur (Effendy, 2017). Karbonil pada rantai utama ekdison juga menambah kepolaran struktur tersebut. Selain itu, adanya ikatan rangkap ($C_7=C_8$) dengan orbital hibrida sp^2 pada rantai utama ekdison juga berkontribusi pada kepolaran struktur. Hal ini disebabkan karena keelektronegatifan atom C yang bertambah seiring dengan bertambahnya karakter s dalam orbital hibridanya, sehingga keelektronegatifan atom C sp^2 (karakter $s = 33,33\%$) $>$ C sp^3 (karakter $s = 25\%$) (Effendy, 2017).

4.7 Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Identifikasi sampel menggunakan spektrofotometer UV-Vis bertujuan untuk mengetahui tipe-tipe transisi elektronik yang terjadi melalui panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) yang dihasilkan pada spektra. Identifikasi ini diukur pada rentang panjang gelombang 200-800 nm. Spektra UV-Vis isolat hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter ditunjukkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Spektra UV-Vis isolat hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter

Gambar 4.5 menunjukkan bahwa λ_{maks} yang terdeteksi pada isolat hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter memiliki kemiripan. Panjang gelombang maksimum 203; 204; dan 221,9 nm pada keenam isolat menunjukkan

transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ yang dapat disebabkan karena adanya ikatan rangkap C=C. Panjang gelombang tersebut dapat menjadi serapan maksimum dari steroid. Hal ini dapat diperkuat oleh penelitian Mawaddah (2019) yang mendapatkan hasil serapan steroid pada λ_{maks} 203 nm dan Sulistiyani (2018) yang juga menemukan serapan pada λ_{maks} 204,1 dan 205 nm. Pada hasil penelitian Saputri, dkk. (2016) juga didapatkan serapan dari steroid pada λ_{maks} 223 nm. Isolat 14 EA menunjukkan serapan pada λ_{maks} 275 nm yang mengindikasikan bahwa terdapat ikatan rangkap terkonjugasi. Hal ini sesuai dengan penelitian Fasya, dkk. (2020) dan Purwanto (2019) yang berhasil menemukan serapan steroid pada λ_{maks} serupa yaitu 275 dan 276 nm.

Berdasarkan aturan Woodward-Fieser, λ_{maks} yang dihasilkan pada spektrum UV-Vis dipengaruhi oleh jenis kromofor yang ada pada struktur senyawa dan substituen yang terikat pada kromofor. Kromofor dan/atau substituen yang berbeda menghasilkan perbedaan energi pada transisi elektronik, sehingga λ_{maks} yang terdeteksi akan berbeda pula. Sedangkan kromofor dan substituen yang sama akan menghasilkan λ_{maks} yang sama, seperti yang terjadi pada isolat 11, 12, dan 18 PE.

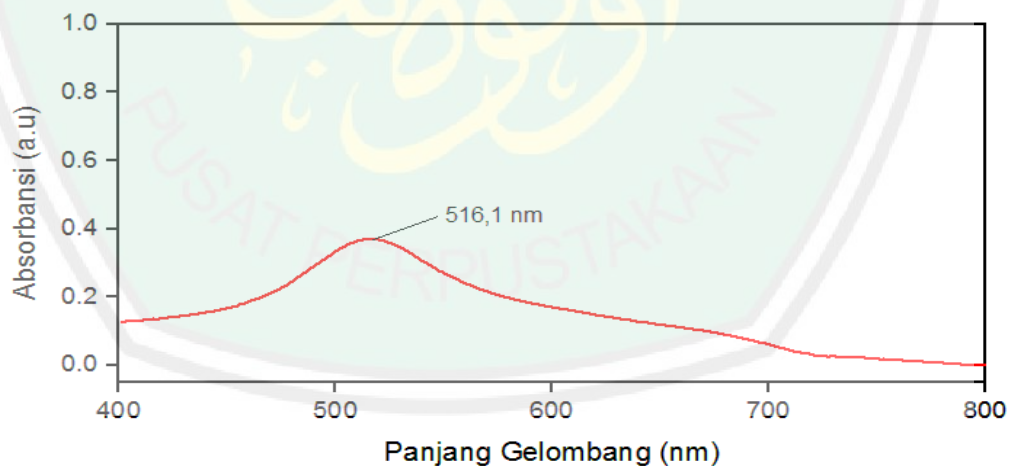
Spektra UV-Vis isolat hasil KLTP fraksi etil asetat maupun petroleum eter menunjukkan bahwa tidak ada serapan yang muncul pada λ_{maks} 400-800 nm. Sedangkan identifikasi yang dilakukan Hafiz (2017) pada ekstrak metanol *Hydrilla verticillata* menunjukkan bahwa terdapat serapan pada λ_{maks} 404 dan 669 nm yang merupakan transisi elektronik $\pi \rightarrow \pi^*$ dan $\sigma \rightarrow \pi^*$. Begitu juga pada fraksi etil asetat dan petroleum eter yang ditemukan serapan pada λ_{maks} 406 dan 665 nm serta 408,5 dan 668 nm (Jannah, 2020). Perbedaan λ_{maks} yang terdeteksi pada

isolat dan ekstrak diakibatkan karena pada sampel berupa isolat telah terjadi serangkaian proses seperti ekstraksi, hidrolisis, partisi, dan pemisahan dengan KLTP sehingga senyawa yang diperoleh lebih spesifik.

4.8 Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH

4.8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH dilakukan untuk mengetahui panjang gelombang DPPH yang menghasilkan absorbansi maksimum pada spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran sampel harus dilakukan pada panjang gelombang maksimum untuk memaksimalkan kepekaan serta meminimalkan kesalahan ketika analisis (Winahyu, dkk., 2019). Radikal bebas DPPH menghasilkan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 515-520 nm (Molyneux, 2004). Hasil spektrum UV-Vis larutan DPPH 0,2 mM dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Spektrum UV-Vis larutan DPPH 0,2 mM

Hasil penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH 0,2 mM yang diperoleh sebesar 516,1 nm. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang

dilakukan Schwarz, dkk. (2001), yang menunjukkan bahwa DPPH memiliki panjang gelombang maksimum 516 nm.

4.8.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan pada isolat hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter dalam larutan kontrol DPPH 0,2 mM. Masing-masing variasi konsentrasi dari isolat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 516,1 nm. Data yang diperoleh berupa absorbansi kontrol dan absorbansi isolat yang selanjutnya digunakan untuk menentukan persen (%) aktivitas antioksidan. Persen (%) aktivitas antioksidan menunjukkan kemampuan isolat dalam menghambat radikal bebas. Data hasil % aktivitas antioksidan terangkum pada Tabel 4.4 dan 4.5.

Tabel 4.4 Data hasil % aktivitas antioksidan dan nilai EC_{50} isolat hasil KLTP fraksi etil asetat

Konsentrasi (ppm)	Isolat 13 EA		Isolat 14 EA		Isolat 20 EA	
	% Aktivitas Antioksidan	EC_{50} (ppm)	% Aktivitas Antioksidan	EC_{50} (ppm)	% Aktivitas Antioksidan	EC_{50} (ppm)
5	2,37		1,18		0,1	
10	4,11		3,01		1,13	
15	4,34	1901	6,05	239,8	2,02	94,92
20	4,88		6,76		5,17	
25	6,79		8,09		6,35	

Tabel 4.5 Data hasil % aktivitas antioksidan dan nilai EC_{50} isolat hasil KLTP fraksi petroleum eter

Konsentrasi (ppm)	Isolat 11 PE		Isolat 12 PE		Isolat 18 PE	
	% Aktivitas Antioksidan	EC_{50} (ppm)	% Aktivitas Antioksidan	EC_{50} (ppm)	% Aktivitas Antioksidan	EC_{50} (ppm)
5	6,10		3,76		0,55	
10	9,33		4,90		2,72	
15	12,36	142	6,73	177,1	6,58	61,43
20	17,44		9,58		8,09	
25	18,36		12,72		14,79	

Tabel 4.4 dan 4.5 menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi larutan uji, maka semakin besar pula kemampuan larutan uji dalam menghambat radikal bebas DPPH. Hal tersebut ditandai dengan menurunnya intensitas warna ungu pada larutan uji seiring dengan bertambahnya konsentrasi. Selanjutnya data hasil % aktivitas antioksidan dianalisis menggunakan regresi nonlinear dengan *GraphPad Prism7*, sehingga didapatkan nilai EC_{50} dari masing-masing isolat.

Berdasarkan Tabel 4.4, isolat 20 EA memiliki EC_{50} terendah diantara isolat hasil KLTP fraksi etil asetat lainnya, yaitu sebesar 94,92 ppm dan tergolong sebagai antioksidan kuat. Sedangkan isolat 14 EA dan isolat 13 EA memiliki EC_{50} berturut-turut 239,8 dan 1901 ppm dan tergolong sebagai antioksidan sangat lemah. Urutan pontensi isolat hasil KLTP fraksi etil asetat sebagai antioksidan dari yang tertinggi yaitu isolat 20 EA > isolat 14 EA > isolat 13 EA.

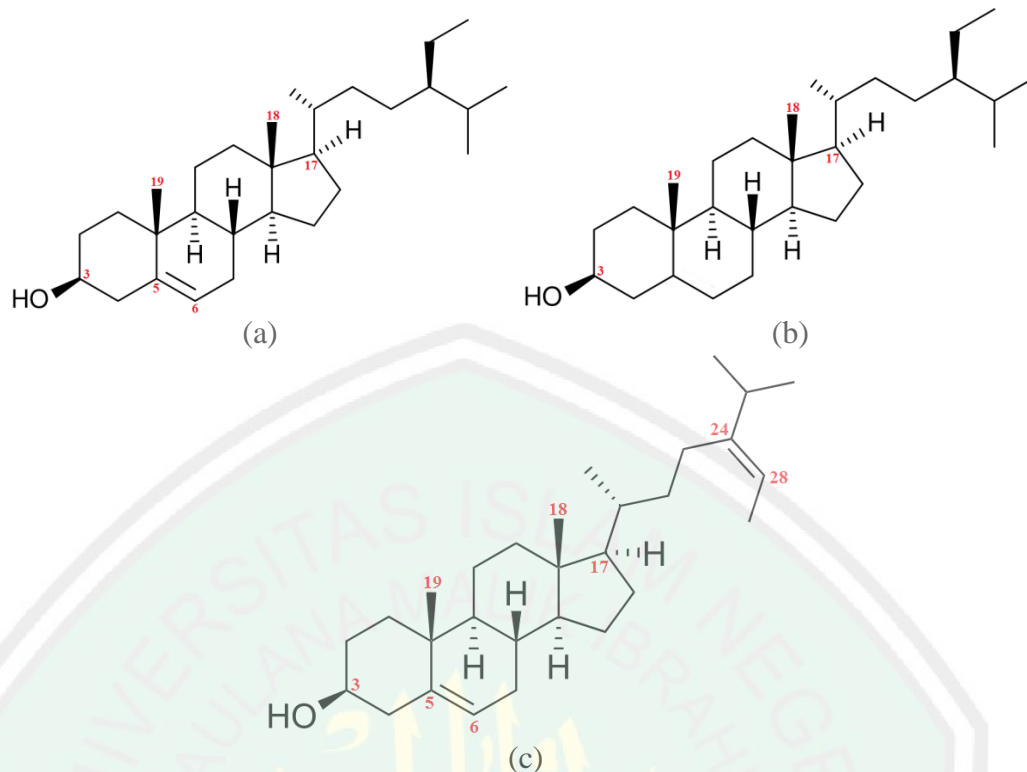
Tabel 4.5 menunjukkan bahwa isolat 18 PE memiliki EC_{50} terendah diantara isolat hasil KLTP fraksi petroleum eter lainnya, yaitu sebesar 61,43 ppm dan tergolong sebagai antioksidan kuat. Sedangkan isolat 11 PE memiliki EC_{50} 142 ppm yang tergolong sebagai antioksidan sedang, serta isolat 12 PE memiliki EC_{50} 177,1 ppm yang tergolong sebagai antioksidan lemah. Urutan pontensi isolat hasil KLTP fraksi petroleum eter sebagai antioksidan dari yang tertinggi yaitu isolat 18 PE > isolat 11 PE > isolat 12 PE.

Berdasarkan nilai EC_{50} yang diperoleh, baik pada isolat hasil KLTP etil asetat maupun petroleum eter, diketahui bahwa isolat dengan antioksidan yang paling baik adalah isolat yang sifatnya paling non polar. Hal tersebut bertolak belakang dengan penelitian Sulistiyani (2018) yang meneliti aktivitas antioksidan isolat hasil KLTP fraksi *n*-heksana dan petroleum eter *Hydrilla verticillata*, serta

Fasya, dkk. (2019) yang meneliti isolat hasil kromatografi kolom fraksi petroleum eter alga merah. Berdasarkan hasil penelitian Sulistiyani dan Fasya, dkk., tidak ditemukan pola yang menunjukkan jika isolat yang lebih non polar memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik. Hal tersebut menunjukkan bahwa kepolaran suatu senyawa belum dipastikan dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan.

Isolat-isolat hasil KLTP fraksi etil asetat maupun petroleum eter merupakan isolat yang masih terdiri dari senyawa campuran. Maka dari itu, dapat diduga bahwa efek sinergis dan antagonis menjadi salah satu faktor yang dapat mempengaruhi hasil aktivitas antioksidan. Campuran senyawa yang memiliki efek sinergis dapat meningkatkan aktivitas antioksidan, sedangkan campuran senyawa yang memiliki efek antagonis dapat menurunkan aktivitas antioksidan (Sonam dan Guleria, 2017). Isolat 20 EA dan isolat 18 PE memiliki efek sinergis yang besar sehingga menghasilkan aktivitas antioksidan yang lebih baik dari keempat isolat lainnya. Hal tersebut bertolak belakang dengan isolat 13 EA yang memiliki efek antagonis yang paling besar diantara kelima isolat lainnya sehingga menghasilkan aktivitas antioksidan yang sangat lemah.

Perbedaan hasil aktivitas antioksidan juga dapat dipengaruhi oleh struktur dari sampel yang diteliti. Komati, dkk. (2017) meneliti EC_{50} beberapa senyawa tunggal fitosterol dan didapatkan nilai EC_{50} β -sitosterol, sitostanol, dan fukosterol berturut-turut 42, 136, dan 33 nM. Struktur ketiga steroid tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Struktur fitosterol dengan EC_{50} yang berbeda (a) β -sitosterol (b) sitostanol (c) fukosterol (Komati, dkk., 2017)

Nilai EC_{50} β -sitosterol dan sitostanol memiliki perbedaan yang cukup signifikan, sedangkan EC_{50} β -sitosterol dan fukosterol tidak berbeda secara signifikan. Berdasarkan Gambar 4.7, dapat dilihat bahwa β -sitosterol dan sitostanol memiliki struktur yang hampir sama. Perbedaan kedua struktur tersebut hanya terletak pada ikatan rangkap $C_5=C_6$ yang dimiliki β -sitosterol dan tidak terdapat pada struktur sitostanol. Menurut Safitri, dkk. (2019), keberadaan ikatan rangkap $C=C$ berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan dengan cara menstabilkan radikal bebas. Hal inilah yang menyebabkan β -sitosterol memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi daripada sitostanol. Perbedaan struktur β -sitosterol dan fukosterol terletak pada substituen yang diikat oleh rantai utama. Substituen β -sitosterol dan fukosterol sama-sama tersusun atas 10 rantai karbon, namun pada fukosterol terdapat ikatan rangkap $C=C$ pada C_{24} . Ikatan rangkap

yang ada pada substituen fukosterol memberikan perbedaan yang tidak terlalu signifikan terhadap aktivitas antioksidan jika dibandingkan dengan β -sitosterol. Jika ditinjau berdasarkan kajian stereokimia, maka baik pada struktur β -sitosterol, sitostanol, maupun fukosterol berkemungkinan memiliki isomer *cis/trans* serta kiralitas yang dapat mempengaruhi hasil aktivitas antioksidan. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Liu dan Osawa (2007) adanya perbedaan struktur *cis* dan *trans* pada senyawa astaxantin memberikan pengaruh terhadap hasil aktivitas antioksidan. Senyawa *trans* astaxantin relatif tidak stabil dan seringkali terisomerisasi menjadi bentuk isomer *cis*. Hal tersebut mempengaruhi aktivitas antioksidan sehingga didapatkan aktivitas antioksidan senyawa astaxantin dalam bentuk isomer *trans* lebih rendah daripada bentuk isomer *cis*-nya. Selain itu, Khan, dkk. (2010) dalam penelitiannya menyatakan bahwa kiralitas pada struktur berperan penting terhadap aktivitas antioksidan suatu senyawa. Berdasarkan penelitian tersebut dapat diketahui bahwa bentuk enantiomer *S* (*sinister*) pada senyawa kompleks lebih efektif dalam menangkal radikal bebas daripada bentuk enantiomer *R* (*rectus*)-nya.

Berdasarkan uraian mengenai faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas antioksidan, dapat disimpulkan bahwa pada isolat hasil KLTP dalam satu fraksi yang sama (baik itu etil asetat maupun petroleum eter) dapat memiliki EC_{50} yang berbeda. Hal tersebut dapat disebabkan oleh efek sinergis dan antagonis pada senyawa campuran, perbedaan gugus fungsi pada struktur senyawa, dan perbedaan struktur senyawa secara stereokimia.

4.9 Pemanfaatan *Hydrilla verticillata* dalam Perspektif Islam

Al-Qur'an diturunkan Allah Swt. melalui Nabi Muhammad saw. sebagai petunjuk dan pedoman bagi umat manusia. Di dalam al-Qur'an terdapat banyak anjuran yang mengajak manusia untuk menghayati alam semesta dan segala isinya. Maka dari itu, sudah sepatutnya manusia sebagai makhluk ciptaan Allah Swt. yang dikaruniai akal untuk menggunakan akal pikirannya dalam melakukan observasi alam sehingga diperoleh penemuan baru yang selaras dengan al-Qur'an (Shihab, 1999), salah satunya dengan adanya penelitian mengenai *Hydrilla verticillata* ini.

Hydrilla verticillata merupakan tumbuhan akuatik yang diciptakan Allah Swt. dengan berbagai manfaat di bidang farmakologi, diantaranya sebagai antioksidan (Fasya, dkk., 2019), antimikroba (Contini, dkk., 2003), anti-inflamasi (Patel dan Savjani, 2015), dan antikanker (Gupta, dkk., 2013). Bioaktivitas *Hydrilla verticillata* yang beragam menyebabkan tumbuhan ini memiliki potensi untuk dijadikan sebagai obat. Nabi Muhammad saw. bersabda:

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ

Artinya: "Setiap penyakit ada obatnya. Apabila ditemukan obat yang tepat untuk suatu penyakit, maka akan sembuhlah si penderita dengan izin Allah." (HR. Muslim).

Hadits tersebut menjelaskan bahwa segala jenis penyakit pasti ada obatnya dan Allah Swt. akan menyembuhkan suatu penyakit asalkan ada usaha untuk mengatasi penyakit tersebut. Penelitian ini merupakan salah satu bentuk usaha kita untuk mengetahui potensi *Hydrilla verticillata* sebagai antioksidan. Antioksidan merupakan komponen yang dapat dijadikan sebagai obat untuk

menangkal radikal bebas yang dapat menyebabkan berbagai penyakit. Allah Swt. berfirman dalam QS. al-Furqan (25) ayat 2:

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُنْ لَهُ شَرِيكٌ فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا (٢)

Artinya: “Yang memiliki kerajaan langit dan Bumi, tidak mempunyai anak, tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan(Nya), dan Dia menciptakan segala sesuatu, lalu menetapkan ukuran-ukurannya dengan tepat.” (QS. al-Furqan/25:2)

Berdasarkan Tafsir Ibnu Katsir, ﴿ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا ﴾ memiliki arti segala sesuatu selain Dia (Allah) adalah *makhluk* (yang diciptakan) dan *marbub* (yang berada di bawah kekuasaan-Nya). Dia-lah pencipta segala sesuatu, Rabb, Raja dan Ilahnya. Sedangkan segala sesuatu berada di bawah kekuasaan, aturan, tatanan, dan takdir-Nya (Ad-Damasyqi, 2004). Sebagaimana Allah Swt. menciptakan *Hydrilla verticillata* sebagai makhluk yang memiliki potensi sebagai antioksidan dengan kadar atau ukuran tertentu. Steroid merupakan salah satu metabolit sekunder yang terdapat pada *Hydrilla verticillata* yang memiliki potensi sebagai antioksidan. Hal tersebut dapat dibuktikan pada penelitian ini, bahwa isolat yang diduga sebagai steroid pada hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter *Hydrilla verticillata* memiliki potensi sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan isolat 20 EA dan isolat 18 PE tergolong dalam kategori antioksidan kuat dengan nilai EC₅₀ berturut-turut 94,92 ppm dan 61,43 ppm.

Setelah mengetahui bahwa *Hydrilla verticillata* memiliki berbagai manfaat khususnya di bidang farmakologi, sudah sepatutnya kita untuk bersyukur dan menambah keimanan dan ketaqwaan kita kepada Allah Swt., karena Allah-lah

yang menciptakan segala sesuatu dengan membawa manfaatnya masing-masing. Allah Swt. berfirman dalam QS. al-Baqarah (2) ayat 152:

فَاذْكُرُونِي أَذْكُرْكُمْ وَاشْكُرُوا لِي وَلَا تَكْفُرُونِ ﴿١٥٢﴾

Artinya: “Maka ingatlah kepada-Ku, Aku pun akan ingat kepadamu. Bersyukurlah kepada-Ku dan janganlah kamu ingkar kepada-Ku.” (QS. al-Baqarah/2:152)

Berkenaan dengan firman Allah, ﴿ فَاذْكُرُونِي أَذْكُرْكُمْ ﴾ Sa'id bin Jubair mengatakan, (artinya) “Ingatlah kalian kepada-Ku dengan cara mentaati-Ku, niscaya Aku pun akan mengingat kalian melalui pemberian ampunan.” Dalam riwayat lain disebutkan: “Melalui pemberian rahmat-Ku.” Serta firman Allah ﴿ وَاشْكُرُوا لِي وَلَا تَكْفُرُونِ ﴾ berarti Allah Swt. memerintahkan hamba-hambanya agar bersyukur kepada-Nya dan atas rasa syukur itu Dia menjanjikan tambahan kebaikan (Ad-Damasyqi, 2004). Maka dari itu hendaknya kita selalu bersyukur atas segala nikmat dan anugerah yang diberikan Allah Swt. dan tidak mengkhufuri nikmat-Nya dengan menyia-nyiakan apa yang Allah Swt. berikan kepada kita.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh maka dapat disimpulkan bahwa:

- a). Hasil EC_{50} isolat KLTP 13, 14, dan 20 fraksi etil asetat berturut-turut sebesar 1901; 239,8; dan 94,92 ppm. Sedangkan isolat KLTP 11, 12, dan 18 fraksi petroleum eter memiliki EC_{50} berturut-turut sebesar 142; 177,1; dan 61,43 ppm. Isolat yang memiliki aktivitas antioksidan kategori kuat yaitu isolat 18 PE dan isolat 20 EA.
- b). Hasil identifikasi UV-Vis isolat KLTP fraksi etil asetat menunjukkan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) pada 203 nm (isolat 13 EA), λ_{maks} 204; 221,9; 275 nm (isolat 14 EA), dan λ_{maks} 204; 221,9 nm (isolat 20 EA). Sedangkan hasil identifikasi UV-Vis isolat KLTP fraksi petroleum eter menunjukkan λ_{maks} pada 203 nm (isolat 11 PE, isolat 12 PE, dan isolat 18 PE). Panjang gelombang tersebut menunjukkan adanya transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ yang berasal dari golongan senyawa steroid.

5.2 Saran

Perlu dilakukan pemisahan lebih lanjut seperti KLT dua dimensi agar dapat diketahui apakah spot isolat yang didapatkan spot tunggal atau campuran. Kemudian diidentifikasi lebih lanjut menggunakan FTIR, LC-MS/MS, dan H-NMR untuk mengetahui struktur dari masing-masing isolat secara spesifik.

DAFTAR PUSTAKA

- Ad-Damasyqi, A.F.I.I.K. 2004. *Tafsir Ibnu Katsir*, terjemahan M. Abdul Ghoffar E.M., Abdurrahim M., dan Abu Ihsan A. Bogor: Pustaka Imam Asy-Syafi'i.
- Al-Quais, K. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak *n*-Heksana dan Identifikasi Senyawa Steroid Akar Rumpun Bambu (*Lophatherum gracile* Brongn). *Skripsi*. Fakultas Saintek UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Amalia, S., Fasya, A.G., Hasanah, F., & Yuliani, D. 2018. Pemisahan Senyawa Aktif Fraksi Petroleum Eter dan Etil Asetat Hasil Hidrolisis Ekstrak Etanol *Hydrilla verticillata* dari Ranu Grati Pasuruan. *ALCHEMY*, 6(2): 50-56.
- Anggraeni, O.N., Fasya, A.G., Abidin, M., & Hanapi, A. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan *n*-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* *ALCHEMY*, 3(2): 173-188.
- Annie, S.W., Raveen, R., Paulraj, M.G., Samuel, T., & Arivoli, S. 2016. Screening Of *Hydrilla verticillata* (L. F.) Royle (Hydrocharitaceae) Crude Leaf Extracts for Larvicidal Efficacy Against The Filarial Vector *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). *International Journal of Entomology Research*, 1(3): 43-48.
- Ansel, H.C. 2014. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi Edisi IV*, diterjemahkan oleh Ibrahim. Jakarta: UI Press.
- Apratiwi, N. 2016. Studi Penggunaan Uv-Vis Spectroscopy untuk Identifikasi Campuran Kopi Luwak dengan Kopi Arabika. *Skripsi*. Lampung: Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
- Artati, E.K., Irvina, F., & Fatimah. 2012. Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Asam Terhadap Kinetika Reaksi Hidrolisis Pelepah Pisang (*Musa Paradisiaca* L). *Ekulibrium*, 11(2): 73-77.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1984. *Official Methods for Analysis, 11st edition*. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists Inc.
- Azizah, L.N. 2016. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*). *Skripsi*. Malang: Fakultas Saintek UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Baderos, A. 2017. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan Identifikasi Menggunakan LC-MS. *Skripsi*. Fakultas Saintek UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Bhawani, S.A., Sulaiman, O., Hashim, R., & Ibrahim, M.N.M. 2019. Thin-Layer Chromatographic Analysis of Steroids: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 9(3): 301-313.
- Budiyati, E. & Bandi, U. 2015. The Effects of Hydrolysis Temperature and Catalyst Concentration on Bio-ethanol Production from Banana Weevil. *Proceedings of The 9th Conference on Chemistry*. Chemistry Department, Diponegoro University.
- Cai, L. 2014. *Thin Layer Chromatography*. South Carolina: University of South Carolina Salkehatchie.
- Contini, S.H.T., Salvador, M.J., Watanabe, E., Ito, I.Y., & Oliveira, D.C.R. 2003. Antimicrobial Activity of Flavonoids and Steroids Isolated from Two *Chromolaena* species. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39(4): 403-408.
- Da'i, M., Wulandari, R.R., & Utami, W. 2011. Uji Aktivitas Penangkap Radikal Analog Kurkumin Siklik dan N-Heterosiklik Monoketon. *PHARMACON*, 12(1): 19-25.
- Dachriyanus. 2004. *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi*. Padang: Lembaga Pengembangan Teknologi Informasi dan Komunikasi (LPTIK) Universitas Andalas.
- Day, R.A. & Underwood, A.L. 1993. *Analisa Kimia Kuantitatif* Edisi 4. Jakarta: Erlangga.
- Dehpour, A.A., Ebrahimzadeh, M.A., Fazel, N.S., & Mohammad, N.S. 2009. Antioxidant Activity of Methanol Extract of Ferula Assafoetida and Its Essential Oil Composition. *Grasas Aceites*, 60(4): 405-412.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1994. *Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 661/MENKES/SK/VII/1994 tentang Persyaratan Obat Tradisional*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. *Farmakope Indonesia Edisi V*. Jakarta: Depkes RI.
- Dinan, L., Harmatha, J., & Lafont, R. 2001. Chromatographic Procedures for The Isolation of Plant Steroids. *Journal of Chromatography A*, 93: 105-123.
- Effendy. 2017. *Molekul, Struktur, dan Sifat-Sifatnya*. Malang: Indonesian Academic Publishing.
- Endarini, L.H. 2016. *Farmakognisi dan Fitokimia*. Jakarta Selatan: Pusdik SDM Kesehatan.

- Fasya, A.G., Amalia, S., Megawati, D.S., Salima, F., Kusuma, V.A., & Purwantoro, B. 2020. Isolation, Identification, and Bioactivity of Steroid Isolates from *Hydrilla verticillata* Petroleum Ether Fraction. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 456: 1-8.
- Fasya, A.G., Baderos, A., Madjid, A.D.R., Amalia, S., & Megawati, D.S. 2019. Isolation, Identification, and Bioactivity of Steroids Compounds from Red Algae *Eucheuma cottonii* Petroleum Ether Fraction. *AIP Conference Proceeding*, 2120: 030025-1-030025-7.
- Fasya, A.G., Dinasti, A.R., Syofiyah, M., Rahmawati, L.M., Millati, N., Safitri, D.A., Handoko, S., Hanapi, A., & Ningsih, R. 2016. Ekstraksi, Hidrolisis dan Partisi Metabolit Sekunder dari Mikroalga *Chlorella sp.* *Alchemy Journal of Chemistry*, 5(1): 5-9.
- Faten, M., Abou, E., & Emad, A.S. 2009. Antioxidant Activity of Extract and Semi-Purified Fractions of Marine Red Macroalga, *Gracilaria verrucosa*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4): 3179-3185.
- Gupta, A., Kumar, B.S., & Negi, A.S. 2013. Current Status on Development of Steroids as Anticancer Agents. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 137: 242-270.
- Hafiz, M.N. 2017. Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Metanol, Kloroform, dan *n*-Heksana *Hydrilla verticillata* (L.f) Royle dari Danau Ranu Kab. Pasuruan Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hasanah, F. 2017. Uji Toksisitas Ekstrak Etanol, Etil Asetat, dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata* (L.F) Royle dari Danau Ranu Grati Pasuruan Terhadap Larva Udang *Artemia sania* Leach. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hidajat, B. 2005. Penggunaan Antioksidan pada Anak. *Artikel Kimia*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Houghton, P.J. & Raman, A. 1998. *Laboratory Handbook for The Fractionation of Natural Extracts*. London: Thomson Science.
- Ikfi, S. 2017. Uji Antioksidan Ekstrak Kasar Metanol, Kloroform, dan *n*-Heksana *Hydrilla verticillata* (L.F) Royle dari Danau Ranu Pasuruan Menggunakan Metode DPPH. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Indranila & Ulfah, M. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Karika (*Carica pubescens*) dengan Metode DPPH Beserta Identifikasi Senyawa Alkaloid, Fenol, dan Flavonoid. *Prosiding Seminar Nasional Peluang Herbal Sebagai Alternatif Medicine*, Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim.

- Ionita, P. 2005. Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species? *Chemical Papers*, 59(1): 11-16.
- Jannah, M. 2020. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat dan Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata* Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner S. 2009. Review Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, 2: 41-60.
- Katrin & Bendra, A. 2015. Aktivitas Antioksidan Ekstrak, Fraksi dan Golongan Senyawa Kimia Daun *Premna oblongata* Miq. *Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(1): 21-31.
- Khaira, K. 2010. Menangkal Radikal Bebas dengan Antioksidan. *Jurnal Sainstek*, 2(2): 183-187.
- Khan, N.H., Pandya, N., Kumar, M., Bera, P.K., Kureshy, R.I., Abdi, S.H.R., & Bajaj, H.C. 2010. Influence of Chirality Using Mn(III) Salen Complexes on DNA Binding and Antioxidant Activity. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 8: 4297-4307.
- Koleva, I.I., Beek, T.A.V., Linssen, J.P.H., Groot, A.D., & Evstatieva, L.N. 2002. Screening Plant Extract for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochemical Analysis*, 13: 8-17.
- Komati, R., Spadoni, D., Zheng, S., Sridhar, J., Riley, K.E., & Wang, G. 2017. Ligands of Therapeutic Utility for The Liver X Receptors. *Molecules*, 22: 1-24.
- Krisna, I.G.A.P.S.A., Santi, S.R., & Rustini, N.L. 2014. Senyawa Steroid pada Daun Gayam (*Inocarpus fagiferus* Fosb) dan Aktivitasnya Sebagai Antioksidan Terhadap DPPH. *Jurnal Kimia*, 8(2): 251-256.
- Kurniawan, M., Izati, M., & Nurchayati, Y. 2010. Kandungan Klorofil, Karotenoid, dan Vitamin C pada Beberapa Spesies Tumbuhan Akuatik. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*, 18(1): 28-40.
- Langeland, K.A. 1996. *Hydrilla verticillata*: The Perfect Aquatic Weed. *Center for Aquatic and Inovatic Plants*, 61: 293-304.
- Lehninger. 1982. *Dasar-dasar Biokimia Jilid I* diterjemahkan oleh Maggy T. Bogor: Gelora Aksara Pratama.
- Lestariani, N. 2014. Analisis status trofik Ranu Grati, Pasuruan dan pengembangannya sebagai modul perkuliahan limnologi. *Thesis Program Studi Pendidikan Biologi*, Pascasarjana Universitas Negeri Malang.

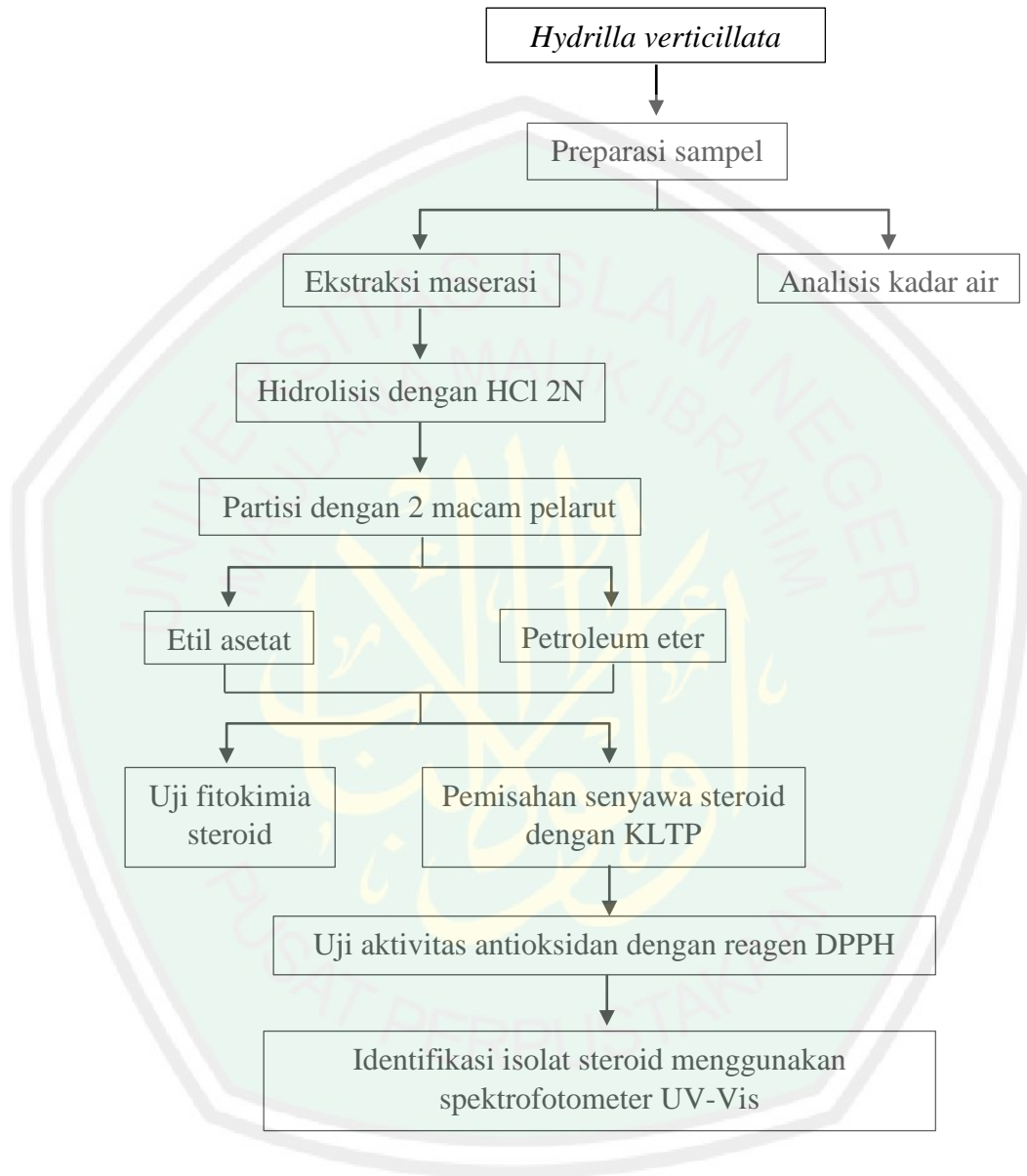
- Liu, X. & Osawa, T. 2007. Cis Astxanthin and Especially 9-cis Astaxanthin Exhibits a Higher Antioxidant Activity in vitro Compared to The All-trans Isomer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357: 187-193.
- Mardina, P., Prathama, H.A., & Hayati, D.M. 2014. Pengaruh Waktu Hidrolisis dan Konsentrasi Katalisator Asam Sulfat Terhadap Sintesis Furfural dari Jerami Padi. *Konversi*, 3(2): 1-8.
- Mardiyah, U. 2012. Ekstraksi Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Identifikasi Senyawa Golongan Aktif Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Skripsi*. Fakultas Saintek UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Marer, P.J. & Garvey, K.K. 2001. *Aquatic Pest Control*. California: University of California.
- Masfufah, N.L. 2016. Isolasi dan Uji Aktivitas Senyawa Alkaloid dari Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* L.) pada Sel Kanker Payudara T47D. *Skripsi*. Malang: Fakultas Saintek UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Mawaddah. 2019. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi *n*-Heksana *Hydrilla verticillata*. *Skripsi*. Fakultas Saintek UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Megawati, D.S., Fasya, A.G., Pratiwi, R.A., & Maghfiroh, N. 2020. Pharmacology Potency of Thin Layer Chromatography Steroid Isolates of *Chlorella sp.* Chloroform Fraction. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 456: 1-9.
- Molyneux, P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 26(2): 211-219.
- Motulsky, H. & Christopoulos, A. 2003. *Fitting Models to Biological Data using Linear and Nonlinear Regression. A Practical Guide to Curve Fitting*. San Diego CA: GraphPad Software Inc.
- Nasir, S., Fitriyanti, & Kamila, H. 2009. Ekstraksi Dedak Padi Menjadi Minyak Mentah Dedak Padi (*Crude Rice Bran Oil*) dengan Pelarut *n*-Heksana dan Etanol. *Jurnal Teknik Kimia*, 2(16): 1-10.
- Netherland, M. 2007. *Hydrilla as a Competitor in The Upper Midwest: Strengths and Weaknesses*. Midwest Aquatic Plant Management Society 27th Annual Conference. Milwaukee, Wisconsin.

- Nurhasnawati, H., Sukarmi, & Handayani, F. 2017. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Bol (*Syzygium malaccense* L.). *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 3(1): 91-95.
- Pal, D.K. & Nimse, S.B. 2006. Little Known Uses Of Common Aquatic Plant, *Hydrilla verticillata* (Linn. F.) Royle. *Research Article*, 5(2): 108-111.
- Patel, S.S. & Savjani, J.K. 2015. Systematic Review of Plant Steroids as Potential Anti-inflammatory Agents: Current Status and Future Perspectives. *The Journal of Phytopharmacology*, 4(2): 121-125.
- Phukan, P., Phukan, R., & Phukan, S.N. 2015. Heavy Metal Uptake Capacity of *Hydrilla verticillata*: A Common Available Aquatic Plant. *International Research Journal of Environment Sciences*, 4(3): 35-40.
- Prabha, P. & Rajkumar, J. 2015. Research Article Phytochemical Screening and Bioactive Potential of *Hydrilla verticillata*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(3): 1809-1815.
- Purwanto, B. 2019. Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil KLT Fraksi *n*-Heksana *Hydrilla verticillata*. *Skripsi*. Fakultas Saintek UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ramesh, S., Rajan, R., & Santhanam, R. 2014. *Freshwater Phytopharmaceutical Compounds*. Florida: CRC Press.
- Rohman, A. & Riyanto. 2005. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia* L.). *Agritech*, 25(3): 131-136.
- Safitri, A., Roosdiana, A., Rosyada, I., Evindasari, C.A., Muzayyana, Z., & Rachmawanti, R. 2019. Phytochemicals Screening and Anti-oxidant Activity of Hydroethanolic Extract of *Ruellia tuberosa* L. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 509: 1-8.
- Saputri, R., Astuti, M.D., & Kuntorini, E.M. 2016. Isolasi dan Identifikasi Steroid dari Fraksi Etil Asetat Herba Lampasau (*Diplazium esculentum* Swartz). *Jurnal Pharmascience*, 3(2): 107-111.
- Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L.R., Gardner, P.T., Heinonen, M.I., Hopia, A., Hyunh-Ba, T., Lambelet, P., McPhail, D., Skibsted, L.H., & Tijburg, L. 2001. Investigation of Plant Extracts for The Protection of Processed Foods Against Lipid Oxidation. Comparison of Antioxidant Assays Based on Radical Scavenging, Lipid Oxidation and Analysis of The Principal Antioxidant Compounds. *European Food Research and Technology*, 212: 319-328.

- Shihab, M.Q. 1999. *Membumikan Al-Qur'an: Fungsi dan Peran Wahyu dalam Kehidupan Masyarakat*. Bandung: Mizan.
- Shihab, M.Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan, dan Keserasian al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati.
- Sitepu, J.S.G. 2010. Pengaruh Metode Ekstraksi Secara Maserasi dan dengan Alat Soxhlet Terhadap Kandungan Kurkuminoid dan Minyak Atsiri dalam Ekstrak Etanolik Kunyit. *Skripsi*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.
- Sonam , K.S. & Guleria, S. 2017. Synergistic Antioxidant Activity of Natural Product. *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics*, 2(8): 1-6.
- Suhartati, T. 2017. *Dasar-dasar Spektrofotometri UV-Vis dan Spektrometri Massa untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Lampung: AURA.
- Sukmawati, D.A.N., Hayati, E.K., & Muti'ah, R. 2014. Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Tanaman Kesembukan (*Paederia foetida* Linn.) dengan Metode BSLT. *ALCHEMY*, 3(2): 189-193.
- Sulistiyani, L.M. 2018. Pemisahan dan Uji Antioksidan Isolat Steroid Hasil KLTP Ekstrak *n*-Heksana dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata* Danau Ranu Grati. *Skripsi*. Fakultas Saintek UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Sultan, A. & Raza, A.R. 2015. Steroids: A Diverse Class of Secondary Metabolites. *Medicinal Chemistry*, 5(7): 310-317.
- Syahmani, Leny, Iriani, R., dan Elfa, N. 2017. Penggunaan Kitin sebagai Alternatif Fase Diam Kromatografi Lapis Tipis dalam Praktikum Kimia Organik. *Jurnal Vidya Karya*, 32(1).
- UF IFAS CAIP. 2015. *Hydrilla: Hydrilla verticillata*. University of Florida IFAS Center for Aquatic and Invasive Plants: Florida.
- Wang, T. 2008. *Minor Constituents and Phytochemicals of Soybean*. Iowa State University: Department of Food Science and Human Nutrition.
- Winahyu, D.A., Retnaningsih, A., & Aprillia, M. 2019. Penetapan Kadar Flavonoid pada Kulit Batang Kayu Raru dengan Metode Spektrofotometer UV-Vis. *Jurnal Analis Farmasi*, 4(1): 29-36.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Xiong, Q., Willson, W.K., & Pang, J. 2007. The Liebermann-Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangement of Cholesterol in Acid. *Lipids*, 42: 87-96.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian



Lampiran 2. Diagram Alir

L.2.1 Preparasi *Hydrilla verticillata*

Hydrilla verticillata

- diambil sebanyak 14 kg
- dicuci dengan air sampai bersih
- dikering-anginkan di bawah naungan
- dihaluskan dan diayak dengan ukuran ayakan 90 mesh

Hasil

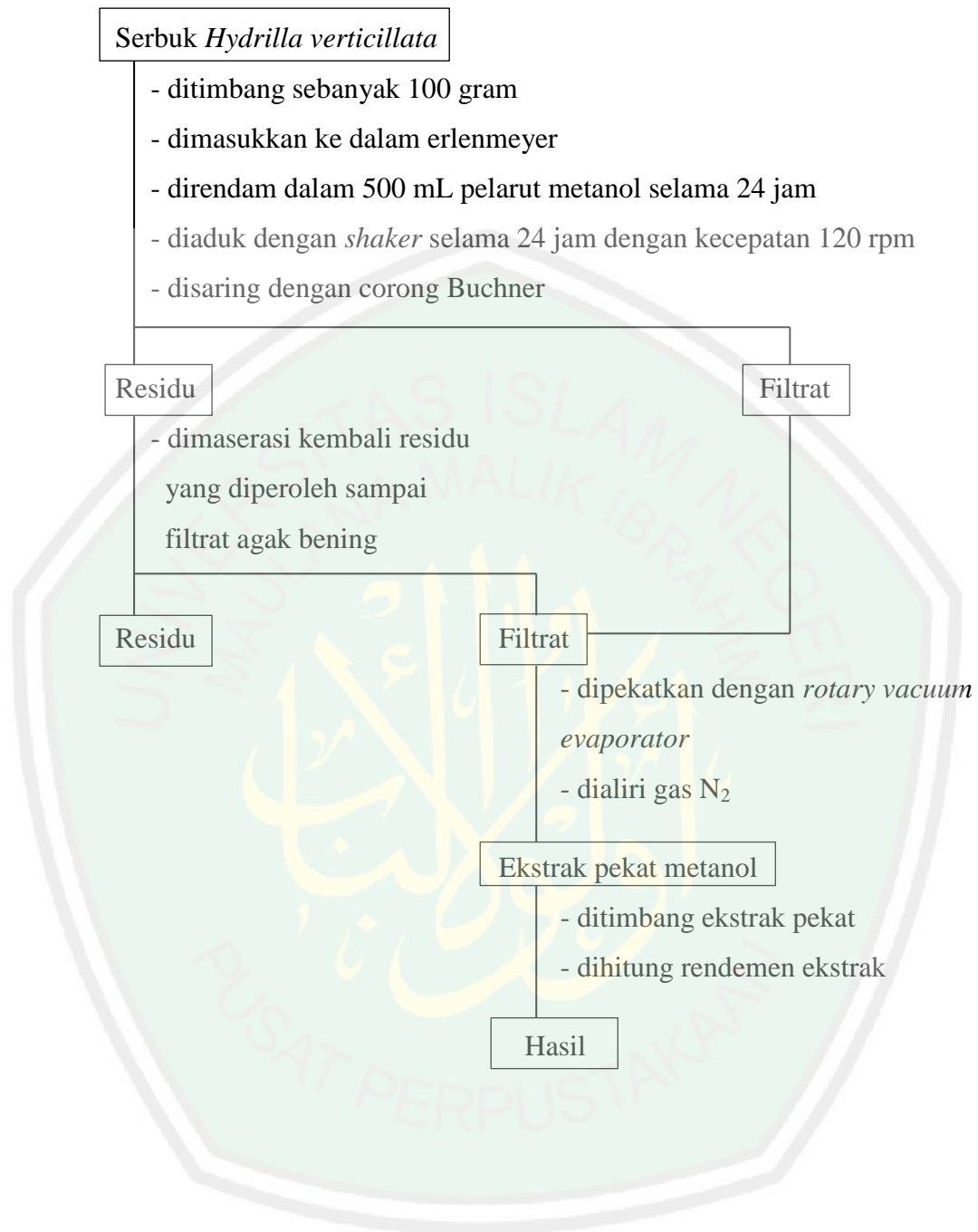
L.2.2 Penentuan Kadar Air Secara Termogravimetri

Serbuk *Hydrilla verticillata*

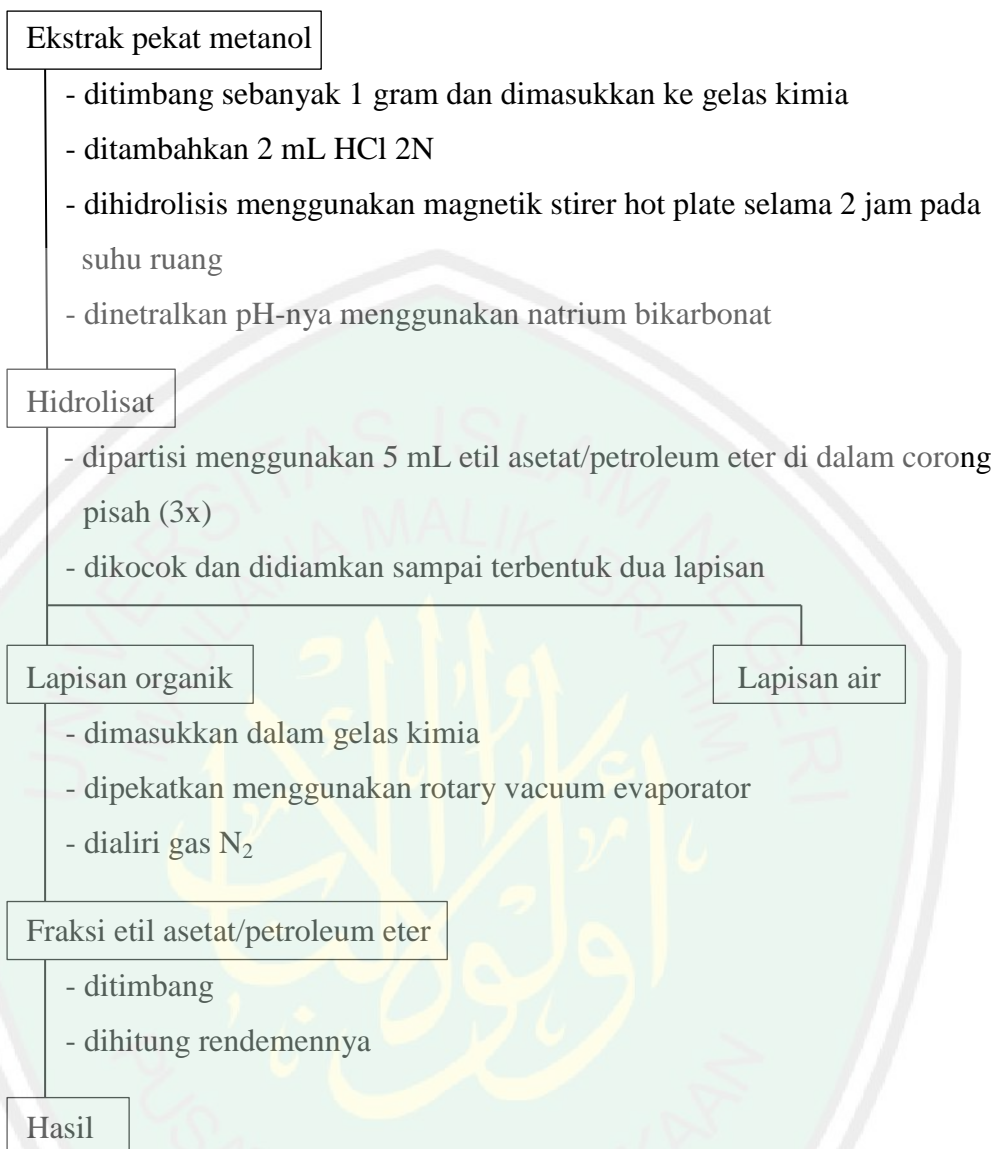
- diambil sebanyak 5 gram
- dimasukkan ke cawan porselen yang sudah diketahui berat konstannya
- dioven pada suhu 100° - 105°C selama ± 15 menit
- didinginkan dalam desikator ± 10 menit
- ditimbang cawan yang berisi sampel
- diulangi hingga diperoleh berat yang konstan
- dihitung kadar air dengan rumus: % Kadar air = $\frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\%$

Hasil

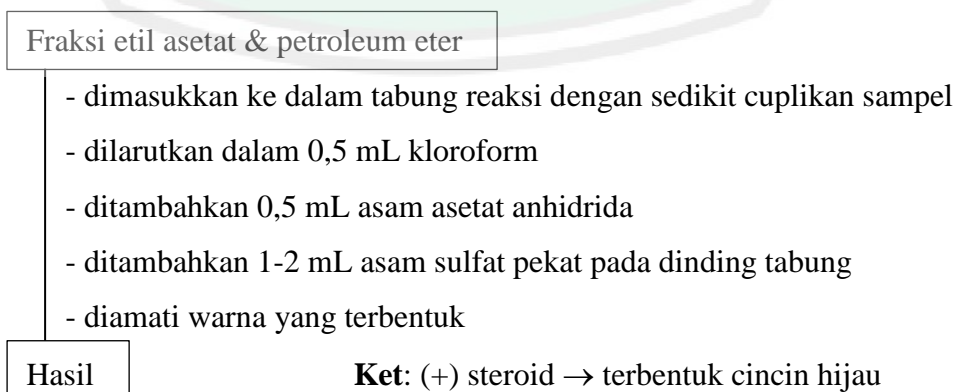
L.2.3 Ekstraksi Maserasi *Hydrilla verticillata*



L.2.4 Hidrolisis dan Partisi



L.2.5 Uji Fitokimia Golongan Senyawa Steroid



L.2.6 Pemisahan Senyawa Menggunakan KLT Preparatif

Ekstrak pekat fraksi etil asetat/petroleum eter

- dilarutkan dalam pelarutnya
- ditotolkan pada jarak 1 cm dari garis bawah dan 1 cm dari garis tepi pada plat GF₂₅₄ 10 x 20 cm yang telah diaktivasi
- diulangi penotolan hingga 10 kali
- dielusi menggunakan eluen *n*-heksana: etil asetat (17:3) sampai garis batas
- diamati noda di bawah lampu UV pada panjang gelombang 366 nm
- dihitung nilai R_f -nya
- dikerok noda yang diduga sebagai senyawa steroid
- dilarutkan dengan etil asetat/petroleum eter
- disentrifugasi

Supernatan

- diuapkan dan diperoleh isolat pekat

Hasil

Endapan

L.2.7 Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH

L.2.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Etanol 95%

- dipipet sebanyak 4,5 mL
- ditambah larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1,5 mL
- dimasukkan ke dalam kuvet
- dihitung λ_{maks}

Hasil

L.2.7.2 Uji Aktivitas Antioksidan

a. Penentuan Absorbansi Kontrol

Larutan DPPH 0,2 mM

- diambil 1 mL
- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan 3 mL etanol 95%
- diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit
- dimasukkan dalam kuvet
- dihitung absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis dengan λ_{maks} yang diketahui

Hasil

b. Penentuan Absorbansi Masing-masing Sampel

Isolat *H. verticillata* Konsentrasi 5,10,15,20,25 ppm

- diambil tiap konsentrasi sebanyak 3 mL
- ditambah 1 mL DPPH 0,2 mM
- diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit
- dihitung absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis dengan λ_{maks} yang diketahui
- dihitung presentase aktivitas antioksidannya

Hasil

L.2.8 Identifikasi Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis

Isolat

- dibuat konsentrasi 5 ppm dalam *n*-heksana
- dimasukkan ke dalam kuvet hingga sepertiganya
- dianalisis pada panjang gelombang 200-800 nm

Hasil

Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan

L.3.1 Pembuatan Larutan HCl 2 N

$$\rho \text{ HCl } 37\% = 1,19 \text{ g/mL} = 1190 \text{ g/L}$$

$$\text{BM HCl} = 36,42 \text{ g/mol}$$

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

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

- Mol HCl dalam konsentrasi 37% = $\frac{\text{gram HCl}}{\text{BM HCl}}$
 $= \frac{37 \text{ gram}}{36,42 \text{ g/mol}}$
 $= 1,0159 \text{ mol}$
- Volume larutan HCl dalam larutan HCl 37% = $\frac{m}{\rho}$
 $= \frac{100 \text{ gram}}{1,19 \text{ g/ml}}$
 $= 84,033 \text{ mL} = 0,084 \text{ L}$
- Molaritas HCl 37% = $\frac{\text{Mol}}{\text{V(L)}}$
 $= \frac{1,0159 \text{ mol}}{0,084 \text{ L}} = 12,094 \text{ mol/L}$
- Normalitas HCl 37% = $n \times \text{Molaritas HCl}$
 $= 1 \times 12,094 \text{ mol/L}$
 $= 12,094 \text{ N}$

Sehingga untuk membuat larutan HCl 2 N sebanyak 100 mL dari larutan HCl 12,094 N menggunakan prinsip pengenceran berikut:

$$\begin{aligned} N_1 \times V_1 &= N_2 \times V_2 \\ 12,094 \text{ N} \times V_1 &= 2 \text{ N} \times 100 \text{ mL} \\ V_1 &= 16,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Larutan HCl pekat 37% diambil sebanyak 16,5 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL. selanjutnya ditambahkan akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.2 Pembuatan Larutan $\text{Na}(\text{CO}_3)_2$ 5% (b/v)

Sebanyak 5 gram padatan $\text{Na}(\text{CO}_3)_2$ dilarutkan dengan sedikit akuades dalam gelas kimia 10 mL. Kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas lalu dihomogenkan.

L.3.3 Pembuatan Reagen *Lieberman Burchard* (LB)

Pembuatan reagen LB yaitu dengan memipet 0,5 mL kloroform, kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat, dan selanjutnya ditambahkan 1 mL H_2SO_4 95%.

L.3.4 Pembuatan Larutan DPPH 0,2 mM

Konsentrasi DPPH = 0,2 mM

Volume DPPH = 50 mL

Mr DPPH = 349,33 g/mol = 349,33 mg/mmol

$$\begin{aligned} \text{Mol DPPH} &= V \times C \\ &= 20 \text{ mL} \times 0,2 \text{ mM} \\ &= 20 \text{ mL} \times \frac{0,2}{1000} \text{ M} \\ &= 0,004 \text{ mmol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa DPPH} &= \text{Mol DPPH} \times \text{Mr DPPH} \\ &= 0,004 \text{ mmol} \times 349,33 \text{ mg/mmol} \\ &= 1,4 \text{ mg} \end{aligned}$$

Cara pembuatan larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 20 mL yaitu dengan menimbang 1,4 mg padatan DPPH, kemudian dilarutkan dengan 20 mL etanol dalam labu ukur 20 mL. Selanjutnya dikocok hingga homogen.

L.3.5 Pembuatan Larutan Sampel untuk Uji Antioksidan

L.3.5.1 Pembuatan Larutan Stok 50 ppm

Larutan stok sampel 50 ppm dibuat dengan melarutkan 1,25 mg isolat steroid hasil KLTP dalam 25 mL pelarutnya lalu dihomogenkan.

L.3.5.2 Pembuatan Larutan Sampel Variasi Konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm sebanyak 4 mL dari Larutan Stok 50 ppm

a) 5 ppm

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 50 \text{ ppm} \times V_1 &= 5 \text{ ppm} \times 4 \text{ mL} \\ V_1 &= 20 \text{ ppm.mL} / 50 \text{ ppm} \\ V_1 &= 0,4 \text{ mL} \end{aligned}$$

d) 20 ppm

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 50 \text{ ppm} \times V_1 &= 20 \text{ ppm} \times 4 \text{ mL} \\ V_1 &= 80 \text{ ppm.mL} / 50 \text{ ppm} \\ V_1 &= 1,6 \text{ mL} \end{aligned}$$

b) 10 ppm

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 50 \text{ ppm} \times V_1 &= 10 \text{ ppm} \times 4 \text{ mL} \\ V_1 &= 50 \text{ ppm.mL} / 40 \text{ ppm} \\ V_1 &= 0,8 \text{ mL} \end{aligned}$$

e) 25 ppm

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 50 \text{ ppm} \times V_1 &= 25 \text{ ppm} \times 4 \text{ mL} \\ V_1 &= 100 \text{ ppm.mL} / 50 \text{ ppm} \\ V_1 &= 2 \text{ mL} \end{aligned}$$

c) 15 ppm

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 50 \text{ ppm} \times V_1 &= 15 \text{ ppm} \times 4 \text{ mL} \\ V_1 &= 60 \text{ ppm.mL} / 50 \text{ ppm} \\ V_1 &= 1,2 \text{ mL} \end{aligned}$$

Cara pembuatannya yaitu dengan memipet sebanyak volume masing-masing konsentrasi larutan sampel dan dimasukkan ke dalam vial dan dikeringkan. Kemudian ditambahkan etanol 95% sebanyak 4 mL.

Lampiran 4. Data Pengamatan dan Perhitungan

L.4.1 Rendemen Sampel Serbuk Kering *Hydrilla verticillata*

Berat sampel basah = 14 kg

Berat sampel serbuk kering = 1 kg

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat sampel serbuk kering}}{\text{Berat sampel basah}} \times 100\% \\ &= \frac{1 \text{ kg}}{14 \text{ kg}} \times 100\% \\ &= 7,14\% \end{aligned}$$

L.4.2 Data Pengukuran Kadar Air

Tabel L.4.1 Data berat cawan kosong

Berat Cawan Kosong	Ulangan Cawan			Berat Konstan (g)	
	Sebelum dioven	U1	U2		U3
C1	56,9821	56,9809	56,9807	56,9810	56,9809
C2	49,8438	49,8427	49,8426	49,8425	49,8426
C3	51,2572	51,2558	51,2558	51,2557	51,2558

Keterangan: C = cawan, U = ulangan

Tabel L.4.2 Data berat cawan dan sampel

Berat Cawan + Sampel	Ulangan Cawan			Berat Konstan (g)	
	Sebelum dioven	U1	U2		U3
C1	57,9810	57,9039	57,9039	57,9036	57,9038
C2	50,8425	50,7675	50,7677	50,7677	50,7676
C3	52,2557	52,1795	52,1799	52,1799	52,1798

Keterangan: C = cawan, U = ulangan

1. Kadar air sampel pada cawan ke-1

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{(57,9810-57,9083) \text{ g}}{(57,9810-56,9809) \text{ g}} \times 100\% \\ &= 7,72 \% \end{aligned}$$

2. Kadar air sampel pada cawan ke-2

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{(50,8425-50,7676) \text{ g}}{(50,8425-49,8426) \text{ g}} \times 100\% \\ &= 7,49 \% \end{aligned}$$

3. Kadar air sampel pada cawan ke-3

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{(52,2557-52,1798) \text{ g}}{(52,2557-51,2558) \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 7,59 \% \end{aligned}$$

$$\text{Kadar air rata-rata serbuk kering } H. \text{ verticillata} = \frac{(7,72\%+7,49\%+7,59\%)}{3} = 7,60\%$$

L.4.3 Perhitungan Rendemen Ekstrak dan Fraksi

L.4.3.1 Rendemen Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata*

Tabel L.4.3 Data rendemen ekstrak metanol

Ulangan	Berat Sampel (g)	Berat wadah kosong (g)	Berat wadah + sampel (g)	Berat ekstrak pekat <i>Hydrilla verticillata</i> (g)
1	100	127,8848	134,7298	6,8450
2	100	105,5821	111,9717	6,3896
3	100	101,0362	107,2864	6,2502

$$\begin{aligned} \text{Rendemen 1} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat } Hydrilla \text{ verticillata}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{6,8450 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 6,84 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rendemen 2} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat } Hydrilla \text{ verticillata}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{6,3896 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 6,38 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rendemen 3} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat } Hydrilla \text{ verticillata}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{6,2502 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100 \% \end{aligned}$$

$$= 6,25 \%$$

$$\text{Rendemen rata-rata ekstrak } H. \text{ verticillata} = \frac{(6,84\%+6,38\%+6,25\%)}{3} = 6,49 \%$$

L.4.3.2 Rendemen Fraksi Etil Asetat

Tabel L.4.4 Data rendemen fraksi pekat etil asetat

Berat sampel (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + fraksi pekat (g)	Berat fraksi pekat (g)	Rendemen
1	33,8194	34,1498	0,3304	33,04 %

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat fraksi pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{0,3304 \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 33,04 \% \end{aligned}$$

L.4.3.3 Rendemen Fraksi Petroleum Eter

Tabel L.4.5 Data rendemen fraksi pekat petroleum eter

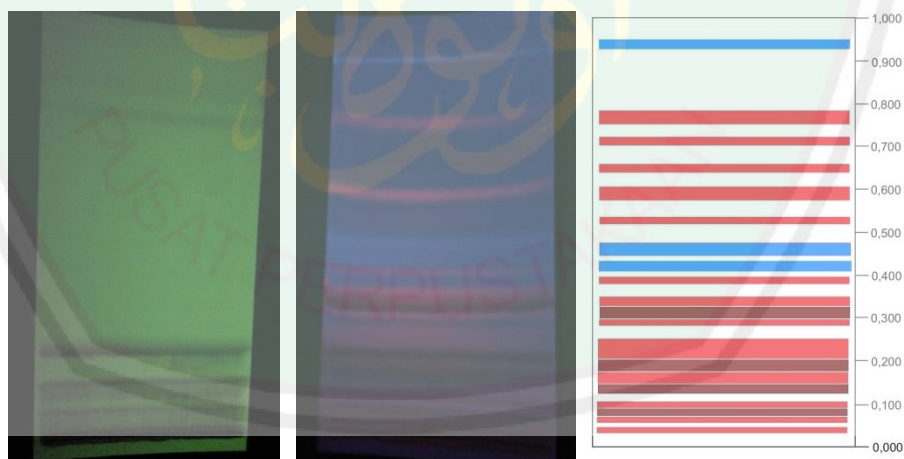
Berat sampel (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + fraksi pekat (g)	Berat fraksi pekat (g)	Rendemen
1	36,6620	36,9696	0,3076	30,76 %

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat fraksi pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{0,3076 \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 30,76 \% \end{aligned}$$

Lampiran 5. Data Hasil KLTP

Tabel L.5.1 Hasil KLTP fraksi etil asetat eluen *n*-heksana: etil asetat (17:3)

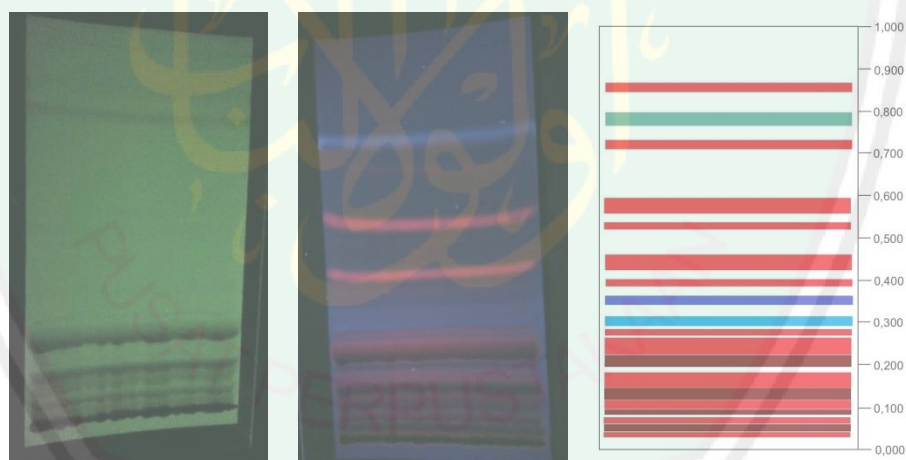
No.	Jarak Noda (cm)	Jarak Pelarut (cm)	R_f	Warna	Dugaan Senyawa
1	0,8	18	0,044	Merah	Triterpenoid
2	1,25	18	0,069	Merah	Triterpenoid
3	1,6	18	0,089	Merah	Triterpenoid
4	1,8	18	0,100	Merah	Triterpenoid
5	2,5	18	0,139	Merah	Triterpenoid
6	2,85	18	0,158	Merah	Triterpenoid
7	3,25	18	0,181	Merah	Triterpenoid
8	3,95	18	0,219	Merah	Triterpenoid
9	5,1	18	0,283	Merah	Triterpenoid
10	5,6	18	0,311	Merah	Triterpenoid
11	5,95	18	0,331	Merah	Triterpenoid
12	6,85	18	0,381	Merah	Triterpenoid
13	7,6	18	0,422	Biru	Steroid
14	8,45	18	0,469	Biru	Steroid
15	9,5	18	0,528	Merah	Triterpenoid
16	10,7	18	0,594	Merah	Triterpenoid
17	11,7	18	0,650	Merah	Triterpenoid
18	12,75	18	0,708	Merah	Triterpenoid
19	13,9	18	0,772	Merah	Triterpenoid
20	16,75	18	0,931	Biru	Steroid



Gambar L.5.1 Hasil KLTP fraksi etil asetat menggunakan eluen *n*-heksana: etil asetat (17:3)

Tabel L.5.2 Hasil KLTP fraksi petroleum eter eluen *n*-heksana: etil asetat (17:3)

No.	Jarak Noda (cm)	Jarak Pelarut (cm)	R_f	Warna	Dugaan Senyawa
1	0,55	18,1	0,030	Merah	Triterpenoid
2	1,05	18,1	0,058	Merah	Triterpenoid
3	1,25	18,1	0,069	Merah	Triterpenoid
4	1,65	18,1	0,091	Merah	Triterpenoid
5	1,9	18,1	0,105	Merah	Triterpenoid
6	2,3	18,1	0,127	Merah	Triterpenoid
7	2,95	18,1	0,163	Merah	Triterpenoid
8	3,9	18,1	0,215	Merah	Triterpenoid
9	4,35	18,1	0,240	Merah	Triterpenoid
10	5	18,1	0,276	Merah	Triterpenoid
11	5,45	18,1	0,301	Biru kehijauan	Steroid
12	6,2	18,1	0,343	Biru keunguan	Steroid
13	7,2	18,1	0,398	Merah	Triterpenoid
14	7,95	18,1	0,439	Merah	Triterpenoid
15	9,6	18,1	0,530	Merah	Triterpenoid
16	10,5	18,1	0,580	Merah	Triterpenoid
17	12,85	18,1	0,710	Merah	Triterpenoid
18	14,2	18,1	0,785	Hijau	Steroid
19	15,7	18,1	0,867	Merah	Triterpenoid

Gambar L.5.2 Hasil KLTP fraksi petroleum eter menggunakan eluen *n*-heksana: etil asetat (17:3)

Lampiran 6. Data Hasil Uji Aktivitas Antioksidan

L.6.1 Hasil Uji Antioksidan Isolat 13 Hasil KLTP Fraksi Etil Asetat

Tabel L.6.1 Hasil uji antioksidan isolat 13 hasil KLTP fraksi etil asetat

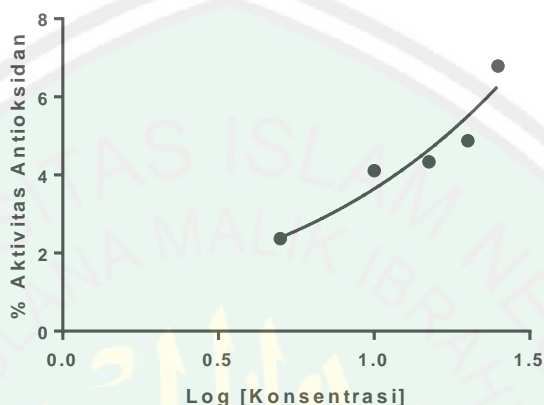
Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	% Aktivitas Antioksidan	EC ₅₀
5	0,4009	0,3914	2,37%	1901
10	0,4068	0,3901	4,11%	
15	0,4076	0,3899	4,34%	
20	0,4079	0,388	4,88%	
25	0,3504	0,3266	6,79%	

Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		Different curve for each data set
Alternative hypothesis		One curve for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		Different curve for each data set
F (DFn, DFd)		
Different curve for each data set		
Best-fit values		
LogEC50	3,279	
HillSlope	0,6242	
EC50	1901	
Std. Error		
LogEC50	0,4415	
HillSlope	0,1346	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	2,374 to 6,796	
HillSlope	0,2328 to 1,138	
EC50	236,4 to 6256480	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	
R square	0,9044	
Absolute Sum of Squares	0,9656	
Sy.x	0,5673	
One curve for all data sets		
Best-fit values		
LogEC50	3,279	3,279
HillSlope	0,6242	0,6242
EC50	1901	1901
Std. Error		
LogEC50	0,4415	0,4415
HillSlope	0,1346	0,1346
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	2,374 to 6,796	2,374 to 6,796
HillSlope	0,2328 to 1,138	0,2328 to 1,138
EC50	236,4 to 6256480	236,4 to 6256480
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R square	0,9044	0,9044
Absolute Sum of Squares	0,9656	0,9656

Sy.x
 Constraints
 LogEC50 LogEC50 is shared
 HillSlope HillSlope is shared
 Number of points
 # of X values 5
 # Y values analyzed 5

0,5673

Normalize of Transform of Isolat 13 EA



Gambar L.6.1 Grafik % aktivitas antioksidan terhadap log konsentrasi isolat 13 etil asetat

L.6.2 Hasil Uji Antioksidan Isolat 14 Hasil KLTP Fraksi Etil Asetat

Tabel L.6.2 Hasil uji antioksidan isolat 14 hasil KLTP fraksi etil asetat

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	% Aktivitas Antioksidan	EC ₅₀
5	0,38	0,3755	1,18%	239,8
10	0,489	0,4743	3,01%	
15	0,4516	0,4243	6,05%	
20	0,4509	0,4204	6,76%	
25	0,4514	0,4149	8,09%	

Comparison of Fits

Null hypothesis

Alternative hypothesis

P value

Conclusion (alpha = 0.05)

Preferred model

F (DFn, DFd)

Different curve for each data set

Best-fit values

LogEC50

HillSlope

EC50

2,38

1,055

239,8

Can't calculate

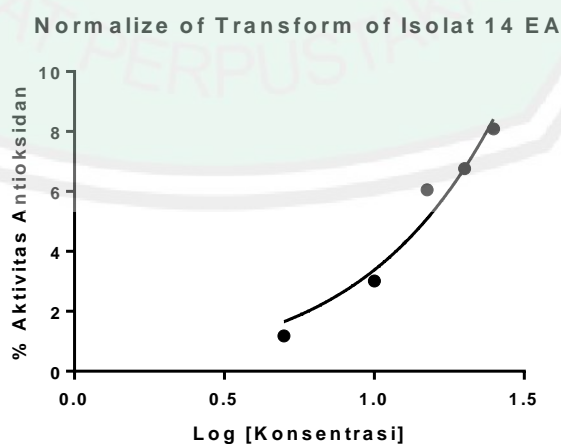
Different curve for each data set

One curve for all data sets

Models have the same DF

Different curve for each data set

Std. Error		
LogEC50	0,184	
HillSlope	0,1761	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	1,98 to 3,285	
HillSlope	0,5885 to 1,685	
EC50	95,42 to 1928	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	
R square	0,9569	
Absolute Sum of Squares	1,391	
Sy.x	0,681	
One curve for all data sets		
Best-fit values		
LogEC50	2,38	2,38
HillSlope	1,055	1,055
EC50	239,8	239,8
Std. Error		
LogEC50	0,184	0,184
HillSlope	0,1761	0,1761
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	1,98 to 3,285	1,98 to 3,285
HillSlope	0,5885 to 1,685	0,5885 to 1,685
EC50	95,42 to 1928	95,42 to 1928
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R square	0,9569	0,9569
Absolute Sum of Squares	1,391	1,391
Sy.x		0,681
Constraints		
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
# of X values	5	
# Y values analyzed	5	



Gambar L.6.2 Grafik % aktivitas antioksidan terhadap log konsentrasi isolat 14 etil asetat

L.6.3 Hasil Uji Antioksidan Isolat 20 Hasil KLTP Fraksi Etil Asetat

Tabel L.6.3 Hasil uji antioksidan isolat 20 hasil KLTP fraksi etil asetat

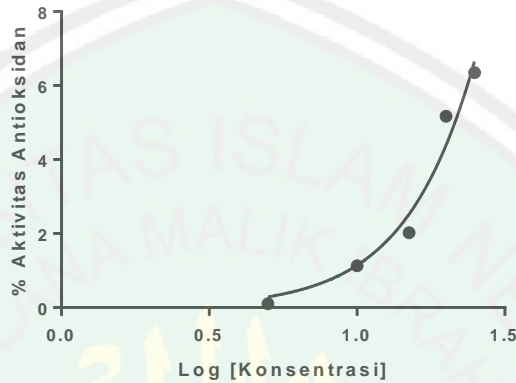
Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	% Aktivitas Antioksidan	EC ₅₀
5	0,4051	0,4047	0,10%	94,92
10	0,4081	0,4035	1,13%	
15	0,4066	0,3984	2,02%	
20	0,4508	0,4275	5,17%	
25	0,4506	0,422	6,35%	

Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		Different curve for each data set
Alternative hypothesis		One curve for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		Different curve for each data set
F (DFn, DFd)		
Different curve for each data set		
Best-fit values		
LogEC50	1,974	
HillSlope	1,988	
EC50	94,29	
Std. Error		
LogEC50	0,1144	
HillSlope	0,3556	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	1,723 to 2,512	
HillSlope	1,105 to 3,365	
EC50	52,84 to 325,1	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	
R square	0,965	
Absolute Sum of Squares	1,008	
Sy.x	0,5798	
One curve for all data sets		
Best-fit values		
LogEC50	1,974	1,974
HillSlope	1,988	1,988
EC50	94,29	94,29
Std. Error		
LogEC50	0,1144	0,1144
HillSlope	0,3556	0,3556
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	1,723 to 2,512	1,723 to 2,512
HillSlope	1,105 to 3,365	1,105 to 3,365
EC50	52,84 to 325,1	52,84 to 325,1
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R square	0,965	0,965
Absolute Sum of Squares	1,008	1,008

Sy.x
 Constraints
 LogEC50 LogEC50 is shared
 HillSlope HillSlope is shared
 Number of points
 # of X values 5
 # Y values analyzed 5

0,5798

Normalize of Transform of Isolat 20 EA



Gambar L.6.3 Grafik % aktivitas antioksidan terhadap log konsentrasi isolat 20 etil asetat

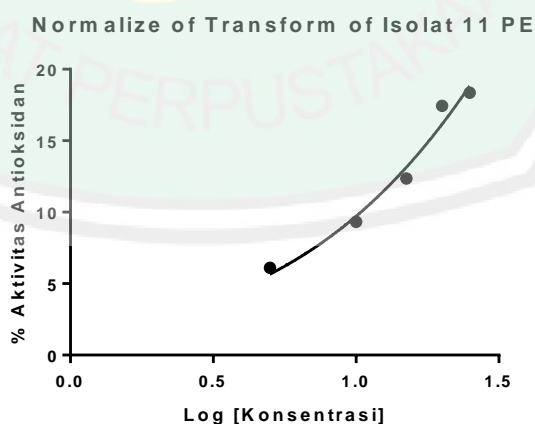
L.6.4 Hasil Uji Antioksidan Isolat 11 Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter

Tabel L.6.4 Hasil uji antioksidan isolat 11 hasil KLTP fraksi petroleum eter

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	% Aktivitas Antioksidan	EC ₅₀
5	0,4489	0,4215	6,10%	142
10	0,449	0,4071	9,33%	
15	0,4492	0,3937	12,36%	
20	0,4508	0,3722	17,44%	
25	0,4499	0,3673	18,36%	

Comparison of Fits
 Null hypothesis
 Alternative hypothesis
 P value
 Conclusion (alpha = 0.05)
 Preferred model
 F (DFn, DFd)
 Different curve for each data set
 Best-fit values
 LogEC50 2,152
 HillSlope 0,8402
 EC50 142
 Std. Error
 Can't calculate
 Different curve for each data set
 One curve for all data sets
 Models have the same DF
 Different curve for each data set

LogEC50	0,1041	
HillSlope	0,09505	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	1,896 to 2,631	
HillSlope	0,5572 to 1,175	
EC50	78,79 to 427,4	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	
R square	0,974	
Absolute Sum of Squares	2,845	
Sy.x	0,9738	
One curve for all data sets		
Best-fit values		
LogEC50	2,152	2,152
HillSlope	0,8402	0,8402
EC50	142	142
Std. Error		
LogEC50	0,1041	0,1041
HillSlope	0,09505	0,09505
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	1,896 to 2,631	1,896 to 2,631
HillSlope	0,5572 to 1,175	0,5572 to 1,175
EC50	78,79 to 427,4	78,79 to 427,4
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R square	0,974	0,974
Absolute Sum of Squares	2,845	2,845
Sy.x		0,9738
Constraints		
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
# of X values	5	
# Y values analyzed	5	



Gambar L.6.4 Grafik % aktivitas antioksidan terhadap log konsentrasi isolat 11 petroleum eter

L.6.5 Hasil Uji Antioksidan Isolat 12 Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter

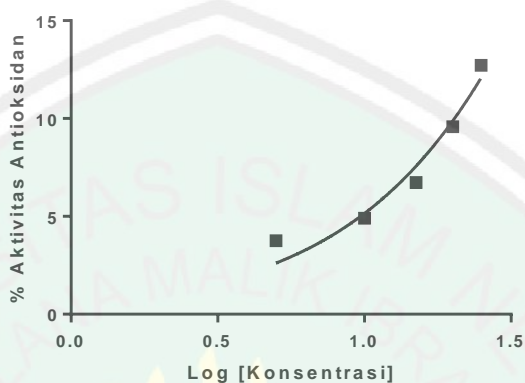
Tabel L.6.5 Hasil uji antioksidan isolat 12 hasil kltf fraksi petroleum eter

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	% Aktivitas Antioksidan	EC ₅₀
5	0,3453	0,3323	3,76%	177,1
10	0,3816	0,3629	4,90%	
15	0,3789	0,3534	6,73%	
20	0,379	0,3427	9,58%	
25	0,3796	0,3313	12,72%	

Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		Different curve for each data set
Alternative hypothesis		One curve for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		Different curve for each data set
F (DFn, DFd)		
Different curve for each data set		
Best-fit values		
LogEC50	2,248	
HillSlope	1,014	
EC50	177,1	
Std. Error		
LogEC50	0,1563	
HillSlope	0,1613	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	1,871 to 3,158	
HillSlope	0,5347 to 1,687	
EC50	74,27 to 1440	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	
R square	0,9515	
Absolute Sum of Squares	2,564	
Sy.x	0,9245	
One curve for all data sets		
Best-fit values		
LogEC50	2,248	2,248
HillSlope	1,014	1,014
EC50	177,1	177,1
Std. Error		
LogEC50	0,1563	0,1563
HillSlope	0,1613	0,1613
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	1,871 to 3,158	1,871 to 3,158
HillSlope	0,5347 to 1,687	0,5347 to 1,687
EC50	74,27 to 1440	74,27 to 1440
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R square	0,9515	0,9515
Absolute Sum of Squares	2,564	2,564
Sy.x		0,9245

Constraints	
LogEC50	LogEC50 is shared
HillSlope	HillSlope is shared
Number of points	
# of X values	5
# Y values analyzed	5

Normalize of Transform of Isolat 12 PE



Gambar L.6.5 Grafik % aktivitas antioksidan terhadap log konsentrasi isolat 12 petroleum eter

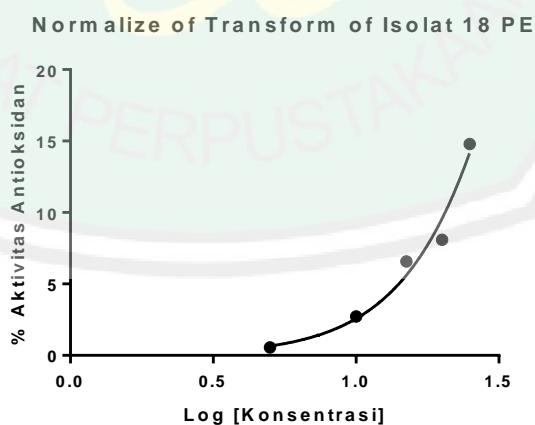
L.6.6 Hasil Uji Antioksidan Isolat 18 Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter

Tabel L.6.6 Hasil uji antioksidan isolat 18 hasil KLTP fraksi petroleum eter

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	% Aktivitas Antioksidan	EC ₅₀
5	0,3816	0,3795	0,55%	
10	0,3818	0,3714	2,72%	
15	0,3827	0,3575	6,58%	61,43
20	0,3831	0,3521	8,09%	
25	0,3841	0,3273	14,79%	

Comparison of Fits	Can't calculate
Null hypothesis	Different curve for each data set
Alternative hypothesis	One curve for all data sets
P value	
Conclusion (alpha = 0.05)	Models have the same DF
Preferred model	Different curve for each data set
F (DFn, DFd)	
Different curve for each data set	
Best-fit values	
LogEC50	1,788
HillSlope	2,002
EC50	61,43
Std. Error	
LogEC50	0,07229

HillSlope	0,3125	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	1,614 to 2,143	
HillSlope	1,162 to 3,334	
EC50	41,09 to 139	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	
R square	0,971	
Absolute Sum of Squares	3,508	
Sy.x	1,081	
One curve for all data sets		
Best-fit values		
LogEC50	1,788	1,788
HillSlope	2,002	2,002
EC50	61,43	61,43
Std. Error		
LogEC50	0,07229	0,07229
HillSlope	0,3125	0,3125
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	1,614 to 2,143	1,614 to 2,143
HillSlope	1,162 to 3,334	1,162 to 3,334
EC50	41,09 to 139	41,09 to 139
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R square	0,971	0,971
Absolute Sum of Squares	3,508	3,508
Sy.x		1,081
Constraints		
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
# of X values	5	
# Y values analyzed	5	

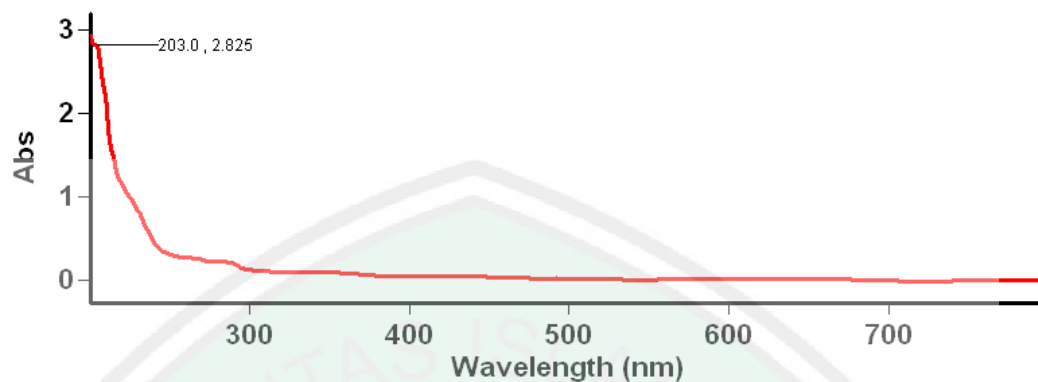


Gambar L.6.6 Grafik % aktivitas antioksidan terhadap log konsentrasi isolat 18 petroleum eter

Lampiran 7. Spektrum UV-Vis Isolat Hasil KLTP

L.7.1 Hasil Identifikasi Isolat 13 Etil Asetat

Lamdha Maks Isolat 13 EA



Scan Analysis Report

Report Time : Tue 03 Nov 10:45:34 AM 2020

Method:

Batch: D:\Vera Vania\Lamdha Maks Isolat 13 EA (03-11-2020).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: Isolat 13 EA

Collection Time 11/3/2020 10:45:43 AM

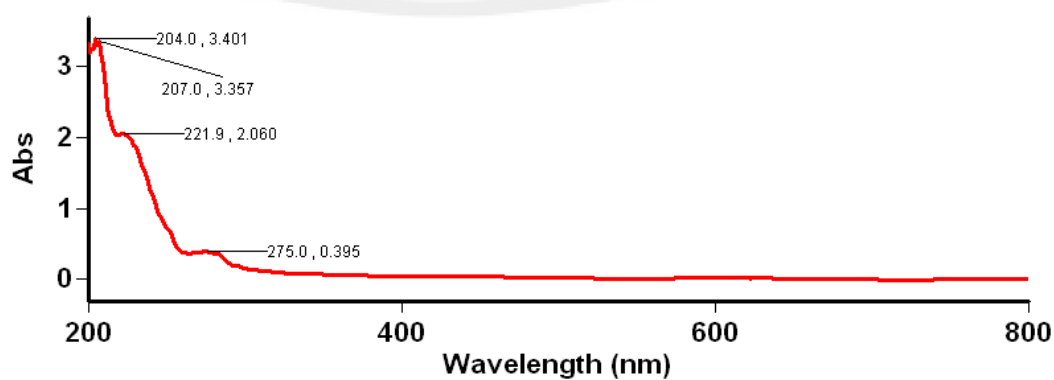
Peak Table

Peak Style Peaks
 Peak Threshold 0.0100
 Range 800.0nm to 200.1nm

Wavelength (nm)	Abs
203.0	2.825

L.7.2 Hasil Identifikasi Isolat 14 Etil Asetat

Lamdha Maks Isolat 14 EA



Scan Analysis Report

Report Time : Wed 04 Nov 02:17:01 PM 2020

Method:

Batch: D:\Vera Vania\Lamdha Maks Isolat 14 EA (04-11-2020).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: Isolat 14 EA

Collection Time 11/4/2020 2:17:57 PM

Peak Table

Peak Style	Peaks
Peak Threshold	0.0100
Range	800.0nm to 199.9nm

Wavelength (nm)	Abs
-----------------	-----

275.0	0.395
221.9	2.060
204.0	3.401

L.7.3 Hasil Identifikasi Isolat 20 Etil Asetat

Lamdha Maks Isolat 20 EA



Scan Analysis Report

Report Time : Wed 04 Nov 02:19:40 PM 2020

Method:

Batch: D:\Vera Vania\Lamdha Maks Isolat 20 EA (04-11-2020).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: Isolat 20 EA

Collection Time 11/4/2020 2:20:39 PM

Peak Table

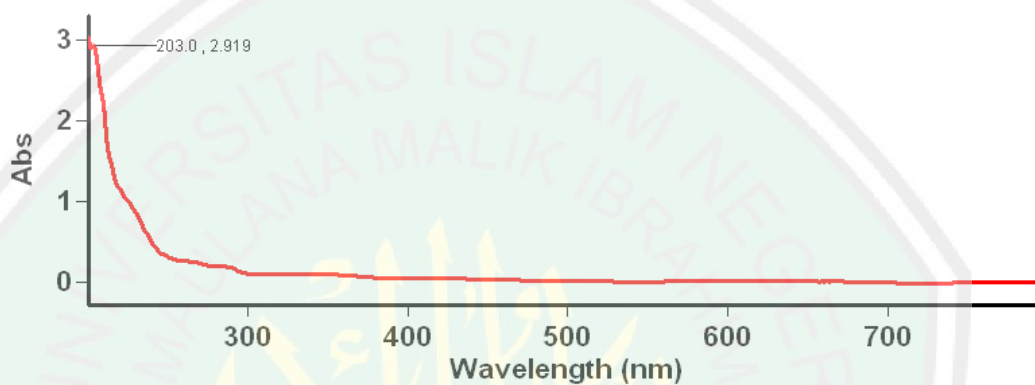
Peak Style	Peaks
Peak Threshold	0.0100
Range	800.0nm to 199.9nm

Wavelength (nm)	Abs
-----------------	-----

204.0	3.325
-------	-------

L.7.4 Hasil Identifikasi Isolat 11 Petroleum Eter

Lamdha Maks Isolat 11 PE



Scan Analysis Report

Report Time : Tue 03 Nov 10:55:22 AM 2020

Method:

Batch: D:\Vera Vania\Lamdha Maks Isolat 11 PE (03-11-2020).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: Isolat 11 PE

Collection Time 11/3/2020 10:55:31 AM

Peak Table

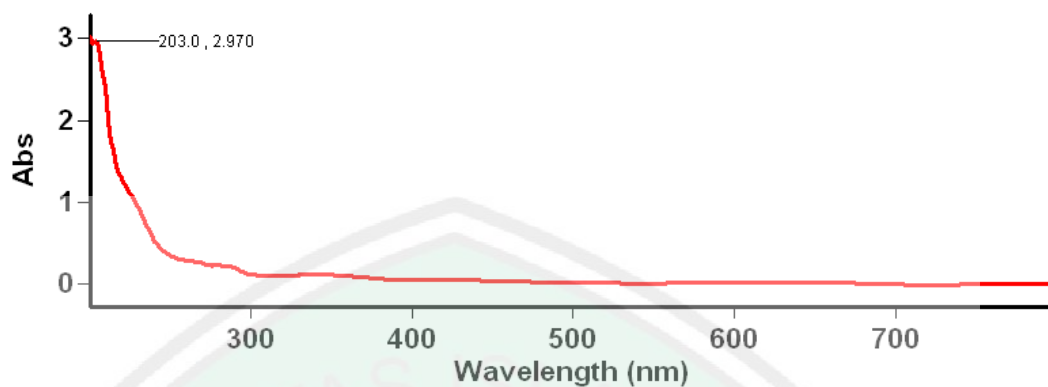
Peak Style	Peaks
Peak Threshold	0.0100
Range	800.0nm to 200.1nm

Wavelength (nm)	Abs
-----------------	-----

203.0	2.919
-------	-------

L.7.5 Hasil Identifikasi Isolat 12 Petroleum Eter

Lamdha Maks Isolat 12 PE



Scan Analysis Report

Report Time : Tue 03 Nov 10:57:22 AM 2020

Method:

Batch: D:\Vera Vania\Lamdha Maks Isolat 12 PE (03-11-2020).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: Isolat 12 PE

Collection Time 11/3/2020 10:58:20 AM

Peak Table

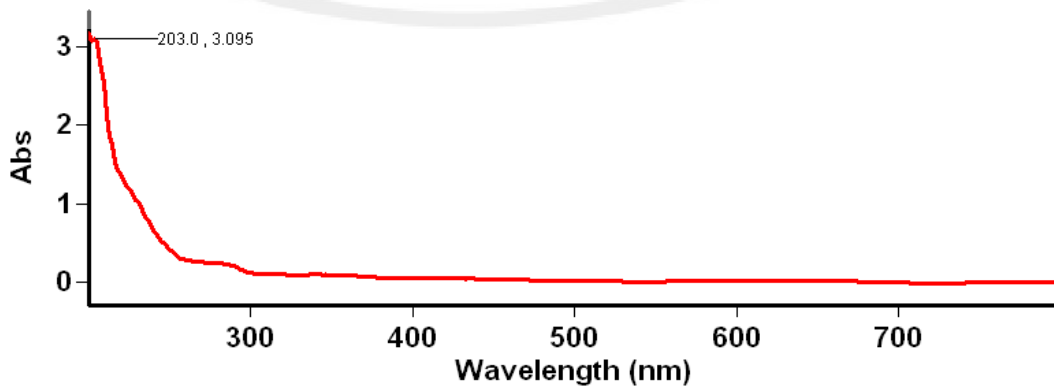
Peak Style	Peaks
Peak Threshold	0.0100
Range	800.0nm to 200.1nm

Wavelength (nm)	Abs
-----------------	-----

203.0	2.970
-------	-------

L.7.6 Hasil Identifikasi Isolat 18 Petroleum Eter

Lamdha Maks Isolat 18 PE



Scan Analysis Report

Report Time : Tue 17 Nov 01:54:25 PM 2020

Method:

Batch: D:\Vera Vania\Lamdha Maks Isolat 18 PE (17-11-2020).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: Isolat 18 PE

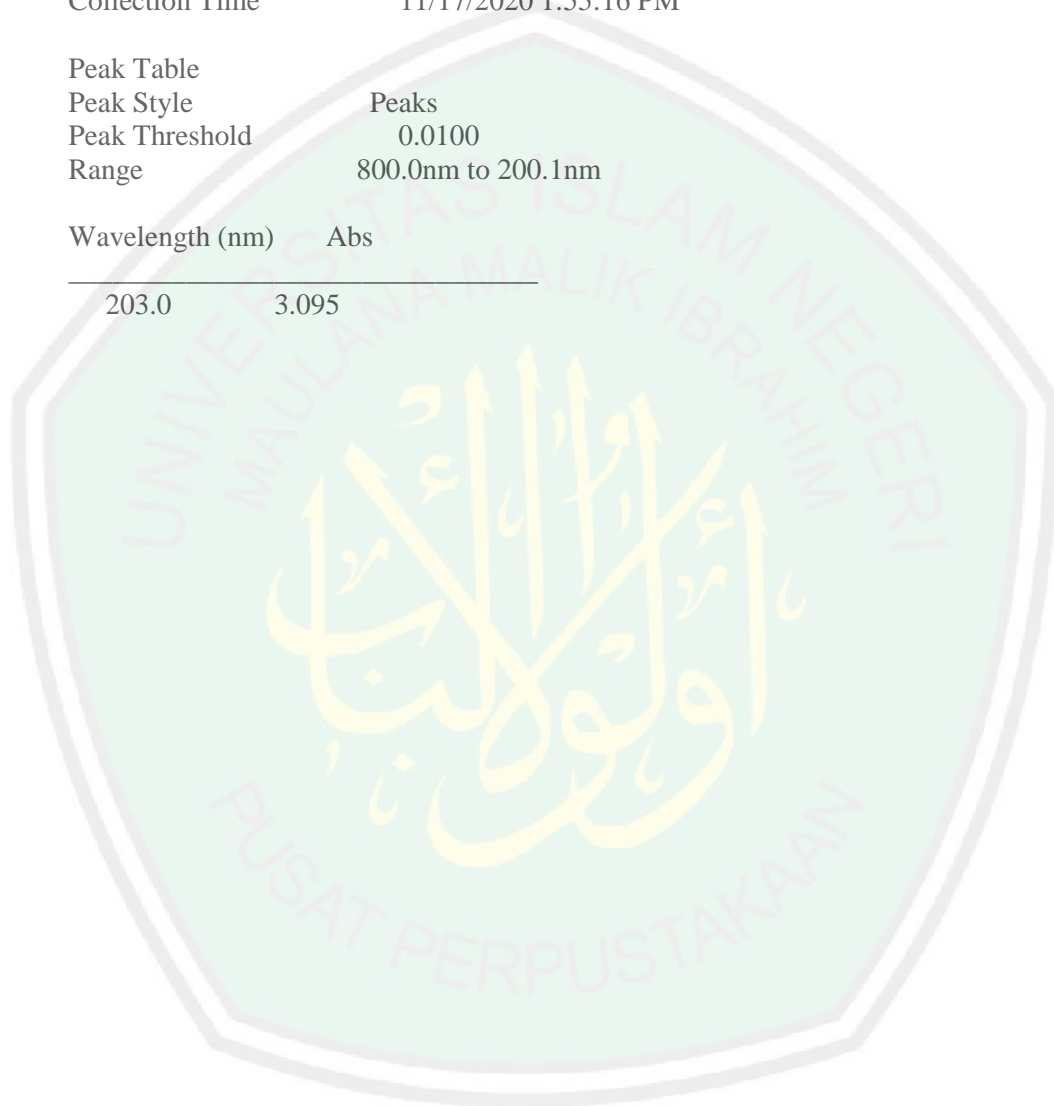
Collection Time 11/17/2020 1:55:16 PM

Peak Table

Peak Style	Peaks
Peak Threshold	0.0100
Range	800.0nm to 200.1nm

Wavelength (nm)	Abs
-----------------	-----

203.0	3.095
-------	-------



Lampiran 8. Dokumentasi

L.8.1 Preparasi Sampel *Hydrilla verticillata*



Pencucian



Pengeringan



Hasil penghalusan

L.8.2 Analisis Kadar Air



Pengovenan
cawan kosong



Desikator
cawan kosong



Penimbangan
cawan kosong



Pengovenan
cawan + sampel



Desikator
cawan + sampel



Penimbangan
cawan + sampel

L.8.3 Ekstraksi Sampel



Proses ekstraksi maserasi
+ dishaker



Penyaringan



Pemekatan

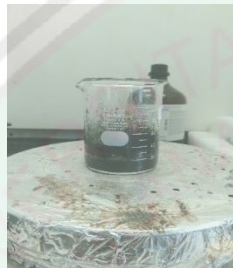


Filtrat
hasil penyaringan



Ekstrak pekat
metanol

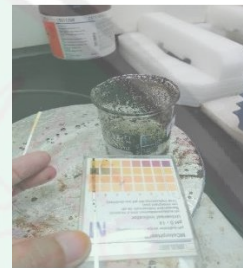
L.8.4 Hidrolisis



Proses hidrolisis



Penjenuhan larutan
 NaHCO_3



Proses penetralan

L.8.5 Partisi

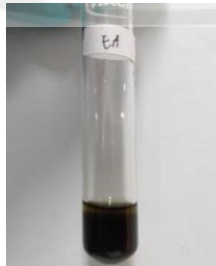


Partisi dengan
pelarut EA



Partisi dengan
pelarut PE

L.8.6 Uji Fitokimia Steroid



Fraksi EA
(+) steroid



Fraksi PE
(+) steroid

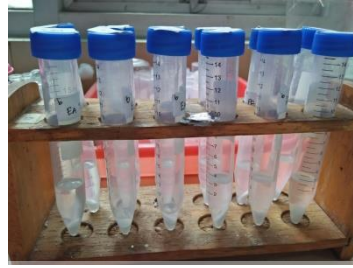
L.8.7 Pemisahan dengan KLTP



Proses elusi
fraksi EA



Proses elusi
fraksi PE



Proses sentrifuge untuk
pengambilan isolat

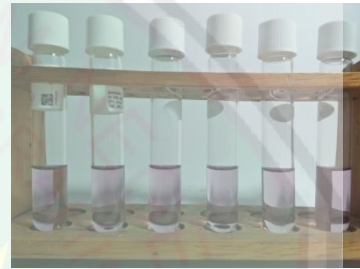
L.8.8 Uji Aktivitas Antioksidan



Proses
inkubasi



Sampel yang akan diukur
absorbansinya



Penampakan warna
sampel+DPPH