UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KLTP FRAKSI ETIL ASETAT DAN PETROLEUM ETER *Hydrilla verticillata*

SKRIPSI

Oleh:
VIVI SEPTYA WATI
NIM. 16630061

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

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KLTP FRAKSI ETIL ASETAT DAN PETROLEUM ETER *Hydrilla verticillata*

SKRIPSI

Oleh:
VIVI SEPTYA WATI
NIM. 16630061

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

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KLTP FRAKSI ETIL ASETAT DAN PETROLEUM ETER *Hydrilla verticillata*

SKRIPSI

Oleh:
VIVI SEPTYA WATI
NIM. 16630061

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 28 Desember 2020

Pembimbing I	Pembimbing II
A. Ghanaim Fasya, M.Si	**Ahmad Hanapi, M.Sc**
NIP. 19820616 200604 1 002	**NIDT. 19851225 20160801 1 069**

Mengetahui,
Ketua Jurusan

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

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KLTP FRAKSI ETIL ASETAT DAN PETROLEUM ETER *Hydrilla verticillata*

SKRIPSI

Oleh:
VIVI SEPTYA WATI
NIM. 16630061

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**	(.....)
Sekertaris Penguji	**: A. Ghanaim Fasya, M.Si** **NIP. 19820616 200604 1 002**	(.....)
Anggota Penguji	**: Ahmad Hanapi, M.Sc** **NIDT. 19851225 20160801 1 069**	(.....)

Mengetahui,
Ketua Jurusan

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

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama	: Vivi Septya Wati
NIM	: 16630061
Jurusan	: Kimia
Fakultas	: Sains dan Teknologi
Judul Penenlitian	: Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Etil Asetat dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan 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 tetrsebut.

Malang, 28 Desember 2020
Yang membuat pernyataan,

Vivi Septya Wati
NIM. 16630061

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirabbil'alamin dengan mengucap syukur kepada Allah Swt.
Saya persembahkan skripsi ini kepada:

Bapak dan Mamakku yang tercinta, tersayang, terbaik, dan terhebat Sugiminanto dan Yulia Pranawati

Kupersembahkan skripsi ini kepada kalian atas semua yang telah kalian berikan kepadaku, do'a-do'a yang selalu kalian panjatkan, nasehat, motivasi untuk selalu kuat, kasih sayang yang begitu besar, dukungan baik secara riil maupun materiil yang tak akan mungkin bisa kubalas. Terima kasih banyak mak pak, kalian adalah Orang tua terhebat dan terbaik sepanjang masa. Tanpa kasih dan sayang kalian anakmu tidak bisa menjadi seorang sarjana. Semoga kalian sehat selalu dan semoga hasil dan perjuangan ini dapat berbuah manis dan membawa kebahagiaan untuk bapak dan mamak kedepannya, aamiin.

Adikku (Muhammad Nurfaiq), mbah-mbahku, om-tanteku, dan seluruh saudara-saudaraku

Kupersembahkan skripsi ini kepada kalian semua yang telah menjadi semangatku untuk segera menyelesaikan pendidikan S1 ini, dengan besar harapan semoga kedepannya ilmu yang saya dapat ini bisa bermanfaat untuk kalian semua, aamiin.

Dosen-dosen yang mengajariku banyak hal, dosen waliku, dosen pembimbingku, dan dosen pengujiku

Kupersembahkan skripsi ini kepada kalian semua yang telah banyak membimbing dan memberikan ilmu baru kepada saya, terkhusus kepada Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si selaku doswal dan juga dospem, Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc selaku dospem agama, Bapak Dr. Anton Prasetyo, M.Si dan Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si selaku penguji, yang telah sabar membimbing, mengarahkan, memberikan nasehat, motivasi dan ilmunya dalam penyusunan dan penulisan skripsi ini. Semoga segala ilmu, nasihat, dan bimbingan yang telah kalian berikan bermanfaat dan membawa berkah bagi kalian semua dan menjadikannya amal jariyah yang tak terputus, aamiin.

Teman-teman dan sahabat-sahabatku yang tersayang

Kupersembahkan skripsi ini kepada kalian yang senantiasa memberikan bantuan, perhatian, dukungan, nasihat, motivasi, dan semangat untuk terus berjuang bersama-sama. Khususnya Organik Squad, Squad Delight, Hydrilla Squad, Kimia B, Kimia Angkatan 16, terima kasih sudah sabar dengan saya, terima kasih sudah menjadi bagian dari hidup saya, tanpa kalian perjalan ini tak akan berwarna. Semoga silahturahmi kita tetap terjalin dan semoga Allah selalu melancarkan urusan kalian kedepannya, aamiin.

Jurusanku (kimia), kampusku (UIN MALIKI), dan negaraku (Indonesia)

Kupersembahkan skripsi ini kepada kalian almamaterku, yang telah memberikan banyak hal. Semoga karya ini dapat memberikan kontribusi pada ilmu pengetahuan dan lembaga akademis di Indonesia, sehingga kedepannya dapat dikembangkan dan dimanfaatkan untuk kesejahteraan rakyat Indonesia.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

MOTTO

Setiap orang memiliki tantangan dan kesulitanya masing-masing
Janganlah membanding-bandingkan dengan orang lain
Cukup berusahalah lebih keras, jangan mudah menyerah, sabar, nikmati saja prosesnya dan terus berdoa

Karena
Allah tidak membebankan seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya
(Q.S. al-Baqarah: 286)
Sesungguhnya dalam setiap kesulitan itu ada kemudahan
(Q.S. al-Insyirah: 6)

Yakinlah segala usaha tidak akan mengkhianati hasil
Dan apa yang kita tanam akan kita tuai
(lek kesel leren sek, refresing sek hirup udara segar tapi ojok suwe" ngkok terlena, iling target, ojok lali reward gawe awak dewe untuk suatu pencapaian besar)

Kegagalan itu pasti ada
Karena kegagalan adalah awal dari kesuksesan
Yang penting jangan mengulangi kesalahan yang sama

Dalam hal baru
Beranilah dan yakinlah jangan jadi penakut atau bimbang
Segala sesuatu iku pokok yakin lan PD

Liatlah orang diatasmu sebagai motivasi
Dan jangan lupa liatlah orang dibawahmu untuk selalu bersyukur

Bersyukurlah karna kamu masih diberi rasa ingin terus berusaha lebih baik

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil'alamin, segala puji bagi Allah Swt. yang telah melimpahkan rahmat serta hidayah-Nya, sehingga penulis mampu menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul "**Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Etil Asetat dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata***". Sholawat serta salam, tidak lupa penulis haturkan kepada Nabi besar Muhammad saw. yang telah menunjukkan jalan kebenaran melalui ajaran agama Islam.

Tanpa bimbingan, bantuan dan perhatian dari semua pihak yang terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung tentulah penulisan skripsi ini tidak dapat berjalan dengan lancar dan semestinya. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak dan Mamak tersayang yang tidak pernah berhenti mendoakan, memberi nasihat, semangat, motivasi, serta yang selalu tulus dan ikhlas memberikan dukungan baik secara moril maupun material.
2. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si, selaku dosen pembimbing I dan dosen wali yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing, memberi arahan, masukan dalam penyusunan skripsi, serta terima kasih banyak atas segala ilmu yang telah diberikan hingga terselesainya skripsi ini.
3. Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc selaku dosen pembimbing II, Bapak Dr. Anton Prasetyo, M.Si selaku penguji utama, Ibu Rahmawati Ningsih, M.Si selaku ketua penguji. Terima kasih atas bimbingan, nasehat, saran, motivasi, serta ilmu yang telah diberikan hingga terselesainya skripsi ini.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
6. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si, selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
7. Seluruh dosen dan laboran jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu pengetahuan, pengalaman dan wawasannya sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
8. Rekan-rekan penelitian saya di Tim Organik 2016, khususnya Tim Organik Bahan Alam dan *Hydrilla squad*. Terima kasih telah banyak membantu, memberikan informasi, motivasi, semangat, hiburan serta dukungan dalam menyusun skripsi ini.
9. Teman-teman Kimia angkatan 2016 khususnya Kimia B. Terimakasih untuk semangat, motivasi, dukungan, canda, tawa, serta kebersamaan selama ini yang membuat perjalanan penulis lebih berwarna.
10. Semua pihak yang telah mendukung, membantu, memotivasi, dan memberikan semangat baik secara langsung maupun tidak langsung dalam penyusunan skripsi.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi ini, oleh karenanya saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan agar penulis dapat lebih baik lagi dalam penyusunan karya tulis lainnya.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca, peneliti selanjutnya, maupun bagi masyarakat luas.

Malang, 12 November 2020

Penulis

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL i
HALAMAN PERSETUJUAN ii
HALAMAN PENGESAHAN iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN iv
PERSEMBAHAN v
MOTTO vi
KATA PENGANTAR vii
DAFTAR ISI x
DAFTAR LAMPIRAN xii
DAFTAR GAMBAR xiii
DAFTAR TABEL xiv
ABSTRAK xv
ABSTRACT xvi
مستخلص البحث xvii

BAB I PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 9
1.3 Tujuan Penelitian 10
1.4 Batasan Masalah 10
1.5 Manfaat Penelitian 10

BAB II TINJAUAN PUSTAKA 11
2.1 Hydrilla verticillata 11
2.2 Kandungan dan Manfaat *Hydrilla verticillata* 13
2.3 Steroid 15
2.4 Ekstraksi Maserasi *Hydrilla verticillata* 18
2.5 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak *Hydrilla verticillata* 20
2.5.1 Hidrolisis 20
2.5.2 Partisi 23
2.6 Uji Fitokimia Fraksi *Hydrilla verticillata* 24
2.6.1 Alkaloid 24
2.6.2 Flavonoid 25
2.6.3 Saponin 27
2.6.4 Triterpenoid dan Steroid 28
2.6.5 Tanin 31
2.7 Isolasi Steroid menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) 32
2.8 Uji Toksisitas dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) 36
2.9 Analisis Probit 39
2.10 Identifikasi Steroid Menggunakan Spektrofotometer FTIR 40

BAB III METODE PENELITIAN 42
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian 42
3.2 Alat dan Bahan Penelitian 42
3.2.1 Alat Penelitian 42

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

3.2.2 Bahan Penelitian 42
3.3 Tahapan Penelitian 43
3.4 Pelaksanaan Penelitian 43
3.4.1 Preparasi Sampel 43
3.4.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri 44
3.4.3 Ekstraksi Senyawa Aktif 44
3.4.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak *Hydrilla verticillata* 45
3.4.5 Uji Fitokimia Senyawa Aktif 46
3.4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTA 48
3.4.7 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP 49
3.4.8 Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach 49
3.4.9 Analisis Data 51
3.4.10 Identifikasi Steroid Menggunakan FTIR 51

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN 52
4.1 Preparasi Sampel 52
4.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri 52
4.3 Ekstraksi Senyawa Aktif 53
4.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol 53
4.5 Uji Fitokimia 57
4.5.1 Flavonoid 58
4.5.2 Triterpenoid dan Steroid 58
4.6 Pemisahan Steroid Menggunakan KLTA 59
4.7 Pemisahan Steroid Menggunakan KLTP 62
4.8 Uji Toksisitas terhadap Larva Udang *Artemia salina* L 66
4.8.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina* L 66
4.8.2 Uji Toksisitas 67
4.9 Identifikasi Isolat Steroid Menggunakan Spektrofotometer FTIR 74
4.10 Pemanfaatan Senyawa Steroid dalam Prespektif Islam 79

BAB V PENUTUP 83
5.1 Kesimpulan 83
5.2 Saran 83

DAFTAR PUSTAKA 84
LAMPIRAN 93

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian 93
Lampiran 2. Diagram Alir..... 94
Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan 100
Lampiran 4. Data Pengamatan dan Hasil Perhitungan 106
Lampiran 5. Data Hasil KLTA dan KLTP 109
Lampiran 6. Data Hasil Uji Toksisitas.....114
Lampiran 7. Spektrum Hasil Identifikasi Isolat Menggunakan FTIR 131
Lampiran 8. Dokumentasi 135

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Hydrilla verticillata 12
Gambar 2.2 Struktur dasar steroid 16
Gambar 2.3 Reaksi hidrolisis 20
Gambar 2.4 Grafik hubungan antara waktu dengan berat glukosa hasil hidrolisis pada berbagai konsentrasi 22
Gambar 2.5 Struktur dasar flavonoid 26
Gambar 2.6 Dugaan reaksi uji flavonoid 26
Gambar 2.7 Reaksi Liebermann-Burchard dan triterpenoid 29
Gambar 2.8 Jalur tahapan reaksi Liebermann-Burchard 30
Gambar 2.9 Larva *Artemia salina* L. fase Nauplii 37
Gambar 4.1 Hasil hidrolisis dan netralisasi 54
Gambar 4.2 Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis 55
Gambar 4.3 Hasil partisi dengan pelarut (a) etil asetat, dan (b) petroleum eter 56
Gambar 4.4 Ilustrasi penampakan noda KLTA pada 366 nm 60
Gambar 4.5 Hasil KLTP fraksi petroleum eter dengan eluen 16:4, (b) fraksi petroleum eter dengan eluen 17:3, (c) fraksi etil asetat eluen 17:3 63
Gambar 4.6 Struktur steroid A) stigmasta-5,22-dien-3-*β*-ol dan B) stigmasta-5, 22-dien-3-on 71
Gambar 4.7 Kurva hasil uji toksisitas isolat PE_4 73
Gambar 4.8 Spektra hasil FTIR isolat EA dan fraksi EA 75
Gambar 4.9 Spektra hasil FTIR isolat PE dan fraksi PE 77
Gambar L.5.1 Ilustrasi penampakan noda KLTA pada 366 nm 111
Gambar L.5.2 Hasil KLTP fraksi petroleum eter menggunakan eluen *n*-heksana: etil asetat (16:4) 112
Gambar L.5.3 Hasil KLTP fraksi petroleum eter menggunakan eluen *n*-heksana: etil asetat (17:3) 113
Gambar L.5.4 Hasil KLTP fraksi etil asetat menggunakan eluen *n*-heksana: etil asetat (17:3) 114
Gambar L.7.1 Spektra hasil identifikasi fraksi EA 131
Gambar L.7.2 Spektra hasil identifikasi fraksi PE 132
Gambar L.7.3 Spektra hasil identifikasi isolat EA 132
Gambar L.7.4 Spektra hasil identifikasi isolat PE_1 133
Gambar L.7.5 Spektra hasil identifikasi isolat PE_2 133
Gambar L.7.6 Spektra hasil identifikasi isolat PE_3 134
Gambar L.7.7 Spektra hasil identifikasi isolat PE_4 134

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan nutrisi pada *H. verticillata* 15
Tabel 2.2 Jenis steroid 17
Tabel 2.3 Uji Alkaloid 25
Tabel 2.4 Nilai LC_{50} yang berpotensi sebagai bioaktif 38
Tabel 2.5 Interpretasi serapan senyawa steroid *H. verticillata* 41
Tabel 4.1 Rendemen hasil partisi 56
Tabel 4.2 Hasil uji fitokimia masing-masing fraksi 57
Tabel 4.3 Hasil pemisahan KLTA fraksi etil asetat dan petroleum eter 60
Tabel 4.4 Hasil KLTP fraksi petroleum eter eluen *n*-Heksana:EA (16:4) dan (17:3) 64
Tabel 4.5 Hasil KLTP fraksi etil asetat (EA) 65
Tabel 4.6 Hasil uji toksisitas fraksi etil asetat (EA) dan isolat steroid EA 68
Tabel 4.7 Hasil uji toksisitas fraksi petroleum eter (PE), isolat steroid PE_1, isolat steroid PE_2, isolat steroid PE_3, isolat steroid PE_4 68
Tabel 4.8 Nilai LC_{50} sampel uji 69
Tabel 4.9 Interpretasi hasil spektra FTIR isolat EA dan fraksi EA 76
Tabel 4.10 Interpretasi hasil spektra FTIR isolat PE dan fraksi PE 78
Tabel L.4.1 Data berat cawan kosong 106
Tabel L.4.2 Data berat cawan + sampel 106
Tabel L.4.3 Data hasil rendemen ekstrak metanol 107
Tabel L.4.4 Data hasil rendemen fraksi etil asetat dan petroleum eter 108
Tabel L.4.5 Hasil uji fitokimia masing-masing fraksi 108
Tabel L.5.1 Hasil pemisahan KLTA fraksi etil asetat dan petroleum eter 109
Tabel L.5.2 Hasil KLTP fraksi petroleum eter eluen *n*-heksana:EA (16:4) 111
Tabel L.5.3 Hasil KLTP fraksi petroleum eter eluen *n*-heksana:EA (17:3) 112
Tabel L.5.4 Hasil KLTP fraksi etil asetat eluen *n*-heksana:EA (17:3) 113
Tabel L.6.1 Hasil uji toksisitas fraksi etil asetat (EA) dan isolat steroid EA 114
Tabel L.6.2 Hasil uji toksisitas fraksi petroleum eter (PE), isolat steroid PE_1, isolat steroid PE_2, isolat steroid PE_3, isolat steroid PE_4 115
Tabel L.6.3 Nilai LC_{50} sampel uji 115
Tabel L.6.4 Data hasil uji fraksi EA 115
Tabel L.6.5 Data hasil uji fraksi PE 117
Tabel L.6.6 Data hasil uji isolat EA 120
Tabel L.6.7 Data hasil uji isolat PE_1 122
Tabel L.6.8 Data hasil uji isolat PE_2 124
Tabel L.6.9 Data hasil uji isolat PE_3 126
Tabel L.6.10 Data hasil uji isolat PE_4 129

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

ABSTRAK

Wati, V.S. 2020. **Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Etil Asetat dan Petroleum Eter *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, Fraksi Petroleum Eter, Toksisitas, FTIR

Hydrilla verticillata merupakan tumbuhan air tawar yang sering ditemukan di ekosistem danau. Beberapa penelitian menunjukkan *H. verticillata* memiliki aktivitas sebagai tumbuhan obat seperti antioksidan, antibakteri, antimalaria, dll. *H. verticillata* memiliki banyak manfaat disebabkan kandungan senyawa kimia aktif yang terdapat di dalamnya, salah satunya adalah senyawa steroid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat toksisitas isolat steroid fraksi etil asetat dan petroleum eter *H. verticillata* serta identifikasinya menggunakan spektrofotometer FTIR. Senyawa steroid diperoleh dengan cara ekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol 96%. Ekstrak metanol yang diperoleh dihidrolisis dengan HCl 2 N kemudian dipartisi dengan dua variasi pelarut yaitu etil asetat dan petroleum eter. Hasil partisi yang diperoleh diuji fitokimia dan dipisahkan senyawa steroidnya menggunakan KLTA dan KLTP. Isolat steroid yang diperoleh diuji toksisitasnya terhadap larva udang *Artemia salina* L. dan diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rendemen ekstrak metanol diperoleh sebesar 6,495%, rendemen fraksi etil asetat sebesar 50,09%, dan rendemen fraksi petroleum eter sebesar 48,55%. Hasil uji fitokimia menunjukkan fraksi etil asetat mengandung flavonoid, triterpenoid, dan steroid, sedangkan fraksi petroleum eter mengandung triterpenoid dan steroid. Adapun hasil pemisahan KLTA menunjukkan eluen n-heksana:etil asetat (17:3) merupakan eluen terbaik untuk memisahkan steroid. Pemisahan KLTP menggunakan eluen terbaik menghasilkan 1 isolat steroid pada fraksi etil asetat dan 4 isolat steroid pada fraksi petroleum eter. Uji toksisitas menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 14,7943 (isolat EA); 8,42353 (isolat PE_1); 7,95194 (isolat PE_2); 7,55361 (isolat PE_3); dan 6,34832 (isolat PE_4) ppm. Nilai LC_{50} tersebut menunjukkan kelima isolat steroid memiliki tingkat toksisitas yang sangat tinggi dan berpotensi sebagai antikanker dan antitumor. Identifikasi kelima isolat menggunakan FTIR menghasilkan gugus yang sama yaitu O-H, C-OH sekunder, geminal dimetil ($CH(CH_3)_2$), C=O ester, C-O-C, C=C nonkonjugasi.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

ABSTRACT

Wati, V.S. 2019. **The Toxicity Test Of Steroid Isolate From TLC Result Of Ethyl Acetate And Petroleum Ether Fraction Of *Hydrilla Verticillata*.** Thesis. Chemistry Department, Science and Technology Faculty State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Supervisor II: Ahmad Hanapi, M.Sc.

Kata Kunci: *Hydrilla verticillata*, Steroid, Petroleum Ether Faction, Toxicity, FTIR

Hydrilla verticillata is a freshwater plant that is often found in lake ecosystems. Some research shows *H. verticillata* has activity as a medicinal plant such as antioxidants, antibacterial, anti-malarial, etc. *H. verticillata* has many benefits due to its active chemical compounds, one of which is a steroid compound. This study aims to determine the level of toxicity of the steroid isolate ethyl acetate and petroleum ether fractions of H. verticillata and to identify using a FTIR spectrophotometer. Steroid compounds are obtained by maceration extraction using 96% methanol solvent. Then, the methanol extract was hydrolyzed with 2 N HCl and then partitioned with two variations of the solvent, ethyl acetate and petroleum ether. The partition results obtained were tested for phytochemistry and the steroid compounds were separated using ATLC and PTLC. The steroid isolates obtained were tested for their toxicity against *Artemia salina* L. shrimp larvae and identified using a FTIR spectrophotometer. The results showed that the yield of methanol extract was 6.495%, the yield of ethyl acetate fraction was 50.09%, and the yield of petroleum ether fraction was 48.55%. Phytochemical test results obtained showed that the ethyl acetate fraction contained flavonoids, triterpenoids, and steroids, while the petroleum ether fraction contained triterpenoids and steroids. The results of ATLC separation showed that n-hexane: ethyl acetate (17: 3) eluent was the best eluent for separating steroids. Separation TLC preparation using the best eluent produced 1 steroid isolate in the ethyl acetate fraction and 4 steroid isolates in the petroleum ether fraction. The toxicity test resulted in an LC_{50} value of 14,7943 (isolate EA); 8,42353 (isolate PE_1); 7,95194 (isolate PE_2); 7,55361 (isolate PE_3); and 6,34832 (isolate PE_4) ppm. The LC_{50} value obtained showed that the five steroid isolates had a very high level of toxicity and had the potential to be anticancer and anti-tumor. The identification of the five isolates using FTIR produced the same groups, namely O-H, secondary C-OH, geminal dimetil ($CH(CH_3)_2$), C=O ester, C-O-C, C=C non-conjugation.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

مستخلص البحث

واتي ، ف. س. (٢٠٢٠). اختبار السمية لعزل الستيرويد نتائج كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (KLTP) لجزء خلات الإيثيل و بترول الأثير إيتر هيدريلا فيرتيجيلاتا (*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 فيرتيجيلاتا (*Hydrilla verticillata*) ، الستيرويد ، جزء الأثير البترولي ، السمية ، تحويل الأشعة تحت الحمراء (*FTIR*)

هيدريلا فيرتيجيلاتا (*H. verticillata*) عبارة عن نبات للمياه العذبة يوجد غالبًا في النظم البيئية للبحيرة. أظهرت العديد من الدراسات أن هيدريلا فيرتيجيلاتا (*H. verticillata*) لها نشاط كنبات طبي مثل مضادات الأكسدة ، ومضادات الجراثيم ، ومضادة للملاريا ، إلخ. هيدريلا فيرتيجيلاتا (*H verticillata.*) لها فوائد عديدة بسبب مركباتها الكيميائية النشطة ، أحدها مركب الستيرويد. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد مستوى سمية عزل الستيرويد أسيتات الإيثيل وأجزاء الأثير البترولي من هيدريلا فيرتيجيلاتا (*H. verticillata*) و تحديدها باستخدام مقياس الطيف الضوئي تحويل الأشعة تحت الحمراء (*FTIR*). يتم الحصول على مركبات الستيرويد عن طريق الاستخلاص بالنقع باستخدام ٩٦٪ ميثانول كمذيب. تم تحلل مستخلص الميثانول الذي تم الحصول عليه باستخدام HC1 2N ثم تم تقسيمه باستخدام نوعين مختلفين من المذيبات ، و هما أسيتات الإيثيل وإيثر البترول. تم اختبار نتائج التقسيم التي تم الحصول عليها من أجل الكيمياء النباتية وتم فصل مركبات الستيرويد باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية (*KLTA*) و كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (*KLTP*). تم اختبار سمية عزلات الستيرويد ضد يرقات الجمبري أرتيميا سالينا ل (*A. salina L*). وتم التعرف عليها باستخدام مقياس الطيف الضوئي تحويل الأشعة تحت الحمراء (*FTIR*). أظهرت النتائج أن حاصل مستخلص الميثانول كان ٦,٤٩٥٪ ، وحاصل جزء أسيتات الإيثيل ٥٠,٠٩٤٪ ، وحاصل جزء الإيثر البترولي ٤٨,٥٥٠٪. أظهرت نتائج الاختبارات الكيميائية النباتية أن جزء أسيتات الإيثيل يحتوي على مركبات الفلافونويد والتريتربينويد والستيرويدات ، بينما احتوى جزء الأثير البترولي على ترايتيربينويدات وستيرويدات. أظهرت نتائج فصل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية (*KLTA*) أن لطيف ن الهكسان: إيثيل الأسيتات (٣:١٧) كان أفضل شطف لفصل المنشطات. فصل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (*KLTP*) باستخدام أفضل شطف ينتج عزلة ستيرويد واحدة في جزء أسيتات الإيثيل و ٤ عزلات ستيرويد في جزء إيثر البترول. أسفر اختبار السمية عن قيمة LC_{50} قدرها ١٤,٧٩٤٣ (عزل EA) ؛ ٨٤٢٣٥٣ (عزل PE_1) ؛ ٧٩٥١٩٤ (عزل PE_2) ؛ ٧٥٥٣٦١ (عزل PE_3) ؛ و ٦,٣٤٨٣٢ (عزل PE_4) جزء في المليون. أشارت قيمة التركيز المميت النصفي إلى أن عزلات الستيرويد الخمس كانت ذات مستوى عالٍ جدًا من السمية ولديها القدرة على أن تكون مضادة للسرطان والأورام. أنتج تحديد العزلات الخمس باستخدام تحويل الأشعة تحت الحمراء (*FTIR*) نفس المجموعات ، و هي O-H ، و الثانوية C-OH ، و ديميتيل جوهرة $(CH(CH_3)_2$ ، و C=O استر ، و C-O-C ، و C=C غير اقتران.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pencarian obat baru akhir-akhir ini terus ditingkatkan oleh para peneliti. Pencarian ini bertujuan untuk menemukan obat baru yang memiliki potensi sebagai antitumor, antikanker, dan dapat memerangi ancaman mikroorganisme patogen (Hamidi, dkk., 2014). Obat dan pengobatan merupakan usaha agar mendapatkan kesembuhan dari suatu penyakit. Pencarian obat tersebut perlu dilakukan sebagaimana hadis Rasulullah saw.:

حَدَّثَنَا مُحَمَّدُ بْنُ الْمُثَنَّى حَدَّثَنَا أَبُو أَحْمَدَ الزُّبَيْرِيُّ حَدَّثَنَا عُمَرُ بْنُ سَعِيدِ بْنِ أَبِي حُسَيْنٍ قَالَ حَدَّثَنِي عَطَاءُ بْنُ أَبِي رَبَاحٍ عَنْ أَبِي هُرَيْرَةَ رَضِيَ اللَّهُ عَنْهُ عَنْ النَّبِيِّ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ قَالَ مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

Telah menceritakan kepada kami Muhammad bin al-Mutsanna telah menceritakan kepada kami Abu Ahmad Az Zubair telah menceritakan kepada kami 'Umar bin Sa'id bin Abu Hurairah radliallahu 'anhu dari Nabi shallallahu 'alaihi wasallam, beliau bersabda: "Tidaklah Allah menurunkan suatu penyakit, melainkan akan menurunkan pula obat untuk penyakit tersebut"(H.R. Bukhari).

Berdasarkan hadis tersebut diketahui bahwa setiap penyakit pasti Allah Swt. menyediakan obatnya. Hadis tersebut mendorong dilakukannya pencarian obat untuk setiap penyakit. Obat dapat diperoleh dengan mengamati tumbuh-tumbuhan. Tumbuhan diciptakan di muka bumi ini tidak ada yang sia-sia baik itu kecil maupun besar, hidup di darat maupun di air. Sudah banyak penelitian yang mengatakan bahwa tumbuh-tumbuhan mengandung senyawa aktif yang dapat dimanfaatkan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

dalam kehidupan sehari-hari salah satunya sebagai obat-obatan. Sebagaimana Allah Swt. berfirman dalam al-Qur'an surat Luqman ayat 10:

خَلَقَ ٱلسَّمَٰوَٰتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۖ وَأَلْقَىٰ فِى ٱلْأَرْضِ رَوَٰسِىَ أَن تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِن كُلِّ دَآبَّةٍ ۚ وَأَنزَلْنَا مِنَ ٱلسَّمَآءِ مَآءً فَأَنۢبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿١٠﴾

Artinya: "Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang; dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik" (Q.S. Luqman:10).

Berdasarkan tafsir al-Mishbah, kata kariim yang terdapat dalam ayat di atas berarti tumbuhan yang baik (bermanfaat) yang tumbuh subur dan menghasilkan apa yang diharapkan penanamanya (Shihab, 2002). Firman Allah Swt. di atas menjelaskan bahwa Allah Swt. telah menciptakan bermacam-macam tumbuhan yang baik untuk makhluk-Nya yaitu tumbuhan yang bermanfaat. Salah satu manfaat tumbuhan adalah digunakan sebagai obat. Tumbuhan yang berpotensi sebagai obat salah satunya adalah *Hydrilla verticillata*.

H. verticillata merupakan tumbuhan air tawar berwarna hijau yang banyak ditemukan di kolam, waduk, sungai, dan danau (Das, dkk., 2015). Tumbuhan ini terdaftar dalam gulma perairan Federal Amerika Serikat. *H. verticillata* merupakan tumbuhan pengganggu yang merusak perairan dan mengganggu aktivitas perairan, seperti memancing, berperahu, berenang, dan perikanan (Sumithran dan Sanjeeva Raj, 2013). Sehingga keberadaannya tidak diharapkan dan banyak dimusnahkan begitu saja. Namun, setelah diteliti *H. verticillata* memiliki potensi yang sangat besar sebagai tumbuhan obat.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Beberapa penelitian melaporkan bahwa *H. verticillata* memiliki beberapa manfaat sebagai tumbuhan obat yaitu sebagai antioksidan (Pal dan Nimse, 2006; Ikfi, 2017), antibakteri, antimikroba (Prabha dan Rajkumar, 2015), antimalaria (Annie, dkk., 2016), CNS, analgesik dan antikonvulsan (Pal, dkk., 2006). *H. verticillata* memiliki banyak manfaat disebabkan kandungan senyawa kimia aktif di dalamnya. Berdasarkan hasil uji fitokimia yang dilakukan oleh Joselin (2014), *H. verticillata* mengandung senyawa flavonoid, glikosida, saponin, dan steroid/triterpenoid.

Penyebaran *H. verticillata* di wilayah perairan Indonesia sudah sangat luas, salah satunya di Danau Ranu Grati, Pasuruan. Berdasarkan pengamatan yang dilakukan Ikfi (2017) diketahui bahwa populasi *H. verticillata* di danau tersebut sangat banyak dan kurang dimanfaatkan. Bahkan warga sekitar menganggap tumbuhan tersebut sebagai gulma yang mengganggu kegiatan perikanan, sehingga banyak dimusnahkan begitu saja. Hal ini sangat disayangkan karena faktanya hydrilla memiliki banyak manfaat. Di California, hydrilla telah dijadikan produk suplemen kaya akan mineral, vitamin, kalsium, dan lisin (Lotus Superfoods, 2013). Namun, pemanfaatan hydrilla di Indonesia masih sebatas sebagai aerator dan tanaman hias akuarium sedangkan potensinya sebagai tumbuhan obat sangatlah besar tetapi masih kurang dieksplorasi.

Penelitian mengenai kandungan senyawa aktif dan potensi *H. verticillata* sebagai tumbuhan obat telah banyak dilakukan di beberapa Negara diantaranya Cina, India, dan Amerika. Praba dan Rajkumar (2015) telah melakukan uji antioksidan dan antimikroba terhadap ekstrak etanol *H. verticillata* dari Lotus Super Foods, California dan setelah dianalisis dengan menggunakan *Gas*

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) diperoleh senyawa *Bicyclo (3.1.1) heptane, 2, 6, 6-trimethyl-, (1.alpha.,2.beta.,5.alpha)* (4.40%), *2-penatdecanone, 6, 10, 14-trimethyl* (4.77%), *Hexadecanoic acid, ethyl ester* (9.51%), *Phytol* (70.29%), *Linoleic acid ethyl ester* (2.08%) *and 9,12,15 Octadecatrienoic acid ethyl ester,(z,z,z)* (8.96%). Lima senyawa juga telah diisolasi dari ekstrak etil asetat, etanol, dan air *H. verticillata* dari Danau Taihu, Cina oleh Xiao, dkk. (2007) senyawa tersebut diidentifikasi sebagai 1) *Ioliolide*, 2) *Octadecanedioic acid*, 3) *Thymidine*, 4) *Sulfur-gamma*, 5) 1-*(5'-Hydroxy-4'-hydroxymethyl-1'-methyl-1H-pyrrol-2'-yl)-henicosa-2,12,15-trien-1-one*. Byju, dkk. (2013) juga melakukan uji analgesik dan antikonvulsan terhadap ekstrak petroleum eter:etil asetat (1:1) *H. verticillata* dari Danau Sasthamkotta, India dan melaporkan adanya senyawa pitol, dan *3,5,11,15-tetramethyl-1-hexadecen-3-ol* sebagai komponen utamanya. Di Indonesia sendiri Khasanah (2018) telah melakukan uji toksisitas fraksi *n*-heksana, kloroform, dan *n*-butanol ekstrak metanol *H. verticillata* dari Danau Ranu Pasuruan dan diperoleh fraksi *n*-heksana memiliki toksisitas yang tinggi, setelah dianalisis diperoleh senyawa *β*-sitosterol sebagai komponen utamanya. Berdasarkan penelitian-penelitian tersebut dapat diketahui bahwa setiap ekstrak *H. verticillata* memiliki kandungan senyawa aktif yang berbeda-beda begitupun juga aktivitasnya. Selain itu, berdasarkan penelitian Khasanah (2018) dapat diduga bahwa yang memiliki toksisitas tinggi pada ekstrak *H. verticillata* dari Danau Ranu Pasuruan adalah senyawa steroid.

Beberapa penelitian melaporkan bahwa senyawa steroid memiliki beberapa bioaktivitas seperti antikanker (Nurcahyanti, dkk., 2015), antimikroba (Awad, 2000), antimalaria (Bialangi, dkk., 2018), dan antioksidan (Rahmawati, 2016).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Selain itu, berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Hafiz (2017) yaitu melakukan uji toksisitas ekstrak metanol, ekstrak kloroform, dan ekstrak *n*-heksana *H. verticillata* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Diperoleh nilai *Lethal Concentration* 50 (LC_{50}) secara berturut-turut sebesar 633,171 ppm, 624,55 ppm, dan 16,762 ppm. Nilai tersebut menunjukkan bahwa ekstrak *n*-heksana memiliki tingkat toksisitas paling tinggi (LC_{50} rendah). Setelah diuji fitokimianya diperoleh hasil bahwa ekstrak *n*-heksana *H. verticillata* positif hanya mengandung senyawa steroid/triterpenoid. Hal ini menunjukkan kemungkinan bahwa *H. verticillata* memiliki potensi sebagai tumbuhan obat dikarenakan senyawa steroid yang terkandung di dalamnya.

Suatu senyawa yang memiliki bioaktivitas seperti antioksidan, antikanker, antitumor, antibakteri, antimikroba, dan antimalaria perlu dilakukan uji toksisitas terlebih dahulu. Uji toksisitas dilakukan untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologi (BPOM, 2014). Meskipun suatu senyawa aktif memiliki banyak manfaat, beberapa dari mereka juga mungkin memberikan efek toksik pada sistem biologi. Sehingga perlu dideteksi efek toksiknya pada sistem biologi terlebih dahulu sebelum dijadikan obat-obatan. Selain itu, hasil uji toksisitas tersebut dapat digunakan sebagai gambaran dalam uji bioaktivitas yang lainnya seperti antikanker dan antitumor. Hal ini dikarenakan adanya hubungan korelasi antara kematian larva udang (metode BSLT) dengan sitotoksisitas sel kanker (uji sitotoksik), sehingga metode ini dapat digunakan untuk skrining awal aktivitas farmakologis (Carballo, dkk., 2002).

Pengujian toksisitas dilakukan dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) yaitu pengujian terhadap larva udang *Artemia salina* Leach

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

untuk mengetahui tingkat toksisitasnya. Metode BSLT dipilih karena *Artemia salina* Leach memiliki keunggulan dalam perkembangbiakan yang cepat, harga murah, memerlukan sedikit sampel, metode percobaan mudah, dan tidak membutuhkan laboratorium yang khusus (Hafiz, 2017). Tingkat toksisitas dapat diketahui dari nilai LC_{50} yang merupakan konsentrasi suatu zat yang menyebabkan kematian larva udang sebesar 50% setelah terpapar zat tersebut dalam waktu tertentu (Cahyono, 2004). Ekstrak dikatakan tidak toksik apabila nilai LC_{50} >1000 µg/mL, ekstrak dengan LC_{50} 500-1000 µg/mL toksik rendah, ekstrak dengan LC_{50} 100-500 µg/mL toksik sedang, dan ekstrak dengan LC_{50} 0-100 µg/mL sangat toksik (Clarkson, dkk., 2004). Berdasarkan Penelitian yang telah dilakukan Hasanah (2017) yaitu melakukan uji toksisitas pada ekstrak kasar etanol, etil asetat, petroleum eter *H. verticillata* dan dihasilkan nilai LC_{50} terendah adalah ekstrak petroleum eter dengan LC_{50} 39,030 ppm. Setelah diuji fitokimianya diperoleh hasil bahwa ekstrak petroleum eter *H. verticillata* hanya mengandung senyawa steroid/triterpenoid. Penelitian tersebut menunjukkan dugaan bahwa senyawa steroid yang terkandung pada *H. verticillata* memiliki toksisitas yang tinggi.

Senyawa aktif yang terkandung dalam *H. verticillata* dapat diperoleh melalui ekstraksi. Ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol. Pemilihan metanol sebagai pelarut untuk mengekstrak senyawa-senyawa aktif dalam *H. verticillata* ini didukung oleh hasil penelitian yang dilakukan Hafiz (2017) yaitu menunjukkan ekstrak metanol, kloroform, dan *n*-heksana dari *H. verticillata* menghasilkan rendemen berturut-turut sebesar 12,72; 4,96; 3,80%. Begitupun dengan penelitan Hasanah (2017) yang menunjukkan ekstrak etanol, etil asetat, dan petroleum eter dari *H. verticillata* menghasilkan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

rendemen berturut-turut sebesar 6,96; 4,62; 2,24%. Berdasarkan penelitian tersebut diketahui bahwa penggunakan pelarut metanol menghasilkan rendemen terbesar.

Steroid pada tumbuhan umumnya tidak terdapat dalam bentuk bebas tetapi sebagai turunan senyawa yang lebih rumit seperti glikosida (Robinson, 1995). Sehingga senyawa ini dapat ditemukan diberbagai ekstrak *H. verticillata* mulai dari pelarut polar hingga pelarut nonpolar. Steroid pada ekstrak metanol *H. verticillata* masih dalam bentuk glikosida sehingga perlu dilakukan pemutusan ikatan antara gugus gula dan steroidnya. Pemutusan tersebut dilakukan dengan cara hidrolisis menggunakan HCl 2 N (Artati, dkk., 2012). Hasil yang diperoleh dari proses hidrolisis berupa senyawa metabolit sekunder yang terputus dari gugus gulanya. Senyawa metabolit sekunder sendiri memiliki kepolaran yang berbeda-beda. Oleh karena itu, untuk memperoleh senyawa metabolit sekunder yang lebih spesifik perlu dilakukan pemisahan. Pemisahan dapat dilakukan berdasarkan sifat kepolarannya pada pelarut tertentu yaitu dengan cara partisi.

Partisi merupakan pemisahan yang menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Prinsip metode ini yaitu berdasarkan distribusi senyawa aktif pada dua macam pelarut yang tidak saling bercampur (Khopkar, 2007). Partisi dilakukan dengan menggunakan pelarut etil asetat (semipolar) dan petroleum eter (nonpolar) yang memiliki perbedaan kepolaran dengan metanol (polar) agar pemisahan lebih efektif dan diperoleh senyawa aktif yang lebih spesifik berdasarkan kepolaran pelarut (Desianti, 2014). Pemilihan pelarut etil asetat dan petroleum eter dikarenakan proses partisi dilakukan untuk mengambil senyawa steroid yang memiliki sifat lebih ke nonpolar. Amalia, dkk. (2018) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dan petroleum eter positif mengandung steroid yang ditandai dengan perubahan warna

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

menjadi hijau kebiruan pada uji steroid. Selain itu, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Khasanah (2018) yaitu uji toksisitas senyawa aktif fraksi *n*-heksana, kloroform, dan *n*-butanol ekstrak metanol *H. verticillata* menunjukakan bahwa nilai LC_{50} fraksi *n*-heksana (30,8615 ppm), kloroform (34,6766 ppm), dan *n*-butanol (39,1573 ppm) cenderung lebih rendah dibandingkan nilai LC_{50} ekstrak kasar metanol (633,171 ppm) yang dilakukan oleh (Hafiz, 2017). Hasil tersebut menunjukkan bahwa efek toksis ekstrak metanol setelah dihidrolisis dan dipartisi lebih tinggi dibandingkan sebelum dilakukan hidrolisis dan partisi.

Hasil partisi yang diperoleh masih berupa senyawa campuran sehingga perlu dilakukan pemisahan senyawa steroid lebih lanjut menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP). KLTP merupakan salah satu metode pemisahan yang paling banyak digunakan, alat dan teknik yang digunakan sederhana, murah, hemat, dan sensitivitasnya tinggi untuk visualisasi senyawa yang dianalisis (Lisboa, 1969). Eluen yang digunakan merupakan eluen terbaik hasil Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA). Berdasarkan penelitian Amalia, dkk. (2018) eluen terbaik untuk memisahkan steroid dari fraksi etil asetat dan petroleum eter ekstrak etanol *H. verticillata* adalah campuran eluen *n*-heksana:etil asetat (4:1). Hasil pemisahan tersebut berupa 4 spot positif steroid dari 17 spot fraksi petroleum eter yaitu R_f 0,505 (biru keunguan), R_f 0,627 (hijau kebiruan), R_f 0,780 (biru keunguan), R_f 0,880 (hijau kebiruan) dan diperoleh 4 spot juga dari 14 spot fraksi etil asetat yaitu R_f 0,122 (biru), R_f 0,867 (biru), R_f 0,939 (hijau kebiruan), dan R_f 0,983 (biru).

Isolat steroid yang diperoleh diidentifikasi menggunakan spektrofotometer *Fourier Transform Infra Red* (FTIR). Mawaddah (2019) melakukan identifikasi

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

isolat steroid hasil kromatografi kolom fraksi *n*-heksana *H. verticillata* dengan UV-Vis menghasilkan panjang gelombang 206 nm yang artinya ada ikatan rangkap C=C, hasil FTIR menunjukkan adanya gugus khas steroid yaitu –OH, C=C, dan –$CH(CH_3)_2$, dan hasil identifikasi dengan LC-MS diperoleh 2 jenis senyawa steroid yaitu: *β*-sitosterol, dan stigmasterol. Selain itu, Fasya, dkk. (2020) juga melakukan identifikasi isolat steroid hasil KLTP fraksi *n*-heksana *H. verticillata* dengan UV-Vis menghasilkan panjang gelombang maksimum sebesar 203,9 dan 276 nm, hasil FTIR menunjukkan adanya gugus fungsi O-H, C=O, C=C, C-OH sekunder, =C-H (alkena) dan –$CH(CH_3)_2$ (geminal dimetil), dan hasil identifikasi dengan LC-MS menunjukkan adanya senyawa steroid *β*-sitosterol.

Berdasarkan uraian tersebut maka pada penelitian ini akan dilakukan uji toksisitas dan identifikasi isolat steroid dari fraksi etil asetat dan petroleum eter ekstrak metanol *H. verticillata*. Isolasi senyawa steroid dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif. Hasil isolasi senyawa steroid diuji tingkat toksisitasnya dengan menggunakan metode BSLT yang dilihat dari nilai LC_{50}. Dan dilakukan identifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR. Hasil penelitian yang diperoleh diharapkan dapat memberikan pengetahuan dan wawasan baru terutama dalam pemanfaatan *H. verticillata* di Indonesia dalam bidang farmakologi.

1.2 Rumusan Masalah

a) Bagaimana tingkat toksisitas isolat steroid *H. verticillata* hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter terhadap larva udang *Artemia Salina* L.?
b) Bagaimana hasil identifikasi isolat steroid *H. verticillata* hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter menggunakan spektrofotometer FTIR?

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

1.3 Tujuan Penelitian

a) Untuk mengetahui tingkat toksisitas isolat steroid *H. verticillata* hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter terhadap larva udang *Artemia Salina* L.

b) Untuk mengetahui hasil identifikasi isolat steroid *H. verticillata* hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter menggunakan spektrofotometer FTIR.

1.4 Batasan Masalah

a) Sampel yang digunakan adalah *H. verticillata* dari Danau Ranu Grati Pasuruan.

b) Ekstraksi *H. verticillata* menggunakan maserasi dengan pelarut metanol *p.a*.

c) Hidrolisis ekstrak pekat menggunakan HCl 2 N.

d) Ekstrak hasil hidrolisis dipartisi dengan pelarut etil asetat dan petroleum eter.

e) Pemisahan steroid menggunakan KLTA dan KLTP.

f) Toksisitas diuji menggunakan metode BSLT.

g) Identifikasi steroid menggunakan FTIR.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi kepada lembaga akademis atau para peneliti mengenai tingkat toksisitas dan hasil identifikasi isolat steroid fraksi etil asetat dan petroleum eter agar dapat dikembangkan dan dimanfaatkan di bidang farmakologi yang diharapkan dapat diaplikasikan penggunaanya untuk masyarakat.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Hydrilla verticillata*

Hydrilla verticillata adalah tanaman air yang terendam dalam ekosistem air tawar lentic dunia, dan merupakan gulma yang sangat kontroversional (Sumithran dan Sanjeeva Raj, 2013). Tanaman ini merupakan tanaman asli dari Asia, tetapi pertamakali diperkenalkan di Amerika Serikat, Florida pada tahun 1960. Nama ilmiah *Hydrilla verticillata* berasal dari Bahasa Yunani "*hidro*" yang artinya "air" dan Bahasa Latin "*verticillata*" yang artinya "lingkaran gelendong". Berdasarkan hal tersebut secara keseluruhan *Hydrilla verticillata* adalah tanaman akuatik (air) dengan daun yang melingkar di sekitar batang (Das, dkk., 2015).

Klasifikasi *Hydrilla verticillata* sebagai berikut (Ramesh, dkk., 2014):

Kingdom : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Liliopsida

Ordo : Hydrocharitales

Suku : Hydrocharitaceace

Genus : Hydrilla

Spesies : *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle

Hydrilla bisa dipanggil dengan tanaman air yang sempurna karena memiliki bagian-bagian yang adaptasinya luas untuk bertahan hidup di air, dan dapat tumbuh di air yang tenang dan air yang mengalir termasuk danau, sungai, kolam, dan waduk (Das, dkk., 2015). Hydrilla tumbuh terendam dalam air dan umumnya berakar ke

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

bawah meskipun kadang-kadang fragmen akan melepaskan diri dan bertahan dalam keadaan mengambang bebas. Batang tegak dan cukup panjang ketika tumbuhan hidup di air yang dalam. Percabangan terjadi saat tanaman mendekati permukaan. Daun memiliki lebar 2-4 mm, panjang 6-20 mm, 3-8 daun melingkar sekitar batang, memiliki 11-38 gigi yang tajam disepanjang tepi daun. Pelepah daun biasanya berwarna merah terdapat duri kecilnya juga (Langeland, 2008). Tumbuhan *Hydrilla verticillata* ditampilkan pada Gambar 2.1.

Gambar 2.1 *Hydrilla verticillata* (Das, dkk., 2015)

Pertumbuhan *H. verticillata* sangatlah cepat dapat memanjang hingga satu inci per hari. Tumbuhan ini dapat tumbuh di berbagai kondisi kimia air, baik itu di daerah oligotropik (nutrisi rendah) maupun di daerah eutrofik (nutrisi tinggi) (Langeland, 2008). Selain itu, tumbuhan ini dapat hidup di air dengan 7% salinitas air laut ataupun lebih tinggi dan juga dapat mentolerir berbagai pH (Steward, 1991). Pertumbuhan yang sangat cepat ini menyebabkan keberadaan hydrilla di perairan sangat melimpah. Keberadaan hydrilla yang melimpah menyebabkan kerugian pada penggunaan air, sehingga dianggap sebagai gulma. Kerugian yang disebabkan oleh

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

hydrilla yaitu merusak perairan dan mengganggu aktivitas perairan, seperti memancing, berperahu, berenang, dan perikanan (Sumithran dan Sanjeeva Raj, 2013).

2.2 Kandungan dan Manfaat *Hydrilla verticillata*

Allah Swt. berfirman dalam al-Qur'an surat asy-Syu'ara' 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?*" *(Q.S. asy-Syu'ara':7).*

Allah Swt. telah menciptakan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik di bumi yang menunjukkan kebesaran dan kekuasaan Allah Swt. (Ash-Shiddieqy, 2000). Lafadz زوج كريم diartikan sebagai tumbuhan yang baik. Tumbuhan baik dijelaskan sebagai tumbuhan yang tumbuh subur dan menghasilkan manfaat bagi manusia. Berdasarkan tafsir Shihab (2002) dijelaskan bahwa Allah Swt. telah memerintahkan hamba-Nya untuk memperhatikan dan mengamati berbagai jenis tumbuhan yang telah diciptakan-Nya, agar diketahui manfaatnya. Manusia yang mau berfikir tentang manfaat dari tumbuh-tumbuhan akan mengerti betapa agungnya kekuasaan Allah Swt. Allah tidak menciptakan sesuatu tanpa ada manfaatnya termasuk *Hydrilla verticillata*.

Beberapa penelitian menunjukkan *Hydrilla verticillata* memiliki banyak manfaat bagi lingkungan dan manusia. Hydrilla dapat membersihkan air dari kontaminasi logam berat (fitoremediasi), dapat menyerap karbon dioksida dan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

sebagai aerator alami (Sumithran dan Sanjeeva Raj, 2013). Hydrilla juga telah dijadikan produk suplemen kaya akan mineral, vitamin, kalsium, dan lisin (Lotus Superfoods, 2013). Selain itu, hydrilla juga kaya akan nutrisi dan telah dijadikan pakan ternak unggas (McDOWELL, dkk., 1990). Manfaat lain dari hydrilla adalah dapat menghasilkan senyawa aktif yang bermanfaat dalam bidang kedokteran seperti antioksidan (Pal dan Nimse, 2006; Ikfi, 2017), antibakteri, antimikroba (Prabha dan Rajkumar, 2015), antimalaria (Annie, dkk., 2016), CNS, analgesik dan antikonvulsan (Pal, dkk., 2006).

Penelitian sebelumnya melakukan pendeteksian kandungan senyawa aktif yang terkandung di dalam hydrilla dengan melakukan uji fitokimia. Uji fitokimia yang dilakukan Prabha dan Rajkumar (2015) menunjukkan bahwa *H. verticillata* positif mengandung metabolit sekunder seperti alkaloid, fenol, terpenoid, flavonoid, dan saponin. Ikfi (2017) melakukan uji fitokimia pada ekstrak metanol, kloroform, dan *n*-heksana *H. verticillata*, didapatkan hasil ekstrak metanol positif mengandung senyawa aktif alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid dan steroid. Pada ekstrak kloroform dan *n*-heksana sama-sama hanya positif mengandung senyawa triterpenoid dan steroid.

H. verticillata mengandung vitamin dan mineral dengan konsentrasi yang tinggi (Das, dkk., 2015). Hal tersebut biasanya sulit diperoleh pada makanan nabati. Contohnya mengandung 15% kalsium, selain itu *H. verticillata* merupakan sumber yang kaya vitamin B dan mineral lainnya (kromium, selenium, boron, silika, dll), asam amino, asam lemak esensial, enzim, dan antioksidan. Beberapa nutrisi yang terkandung juga ditampilkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Kandungan nutrisi pada *H. verticillata* (Das, dkk., 2015)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Nutrisi	Jumlah (mg/10,5mg)	Nutrisi	Jumlah (mg/10,5mg)
Vitamin B-1	26,25 mg	Potasium	244,65 mg
Vitamin B-2	0,084 mg	Fosfor	29,74 mg
Vitamin B-3	5,25 mg	Besi	35,8 mg
Vitamin B-5	11,36 mg	Zink	6,3 mg
Vitamin B-6	35,91 mg	Tembaga	0,22 mg
Vitamin B-1	1,05 mg	Kobalt	0,43 mg
Kalsium	1460,7 mg	Molibdenum	14,7 mg
Magnesium	76,13 mg	Beta Karoten	29593 IU

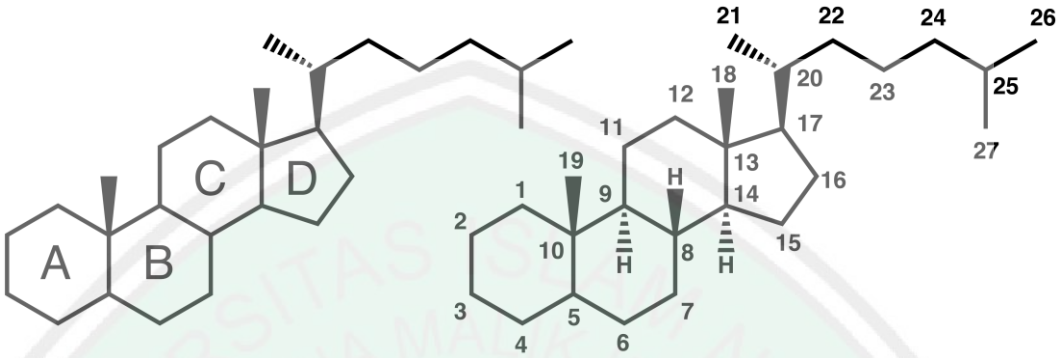
Beberapa peneliti juga telah melakukan isolasi senyawa kimia yang terkandung dalam *H. verticillata* diantaranya melaporkan adanya senyawa steroid (*Ergost -5-en-ol, 22, 23-dimethyl acetate*) pada ekstrak etanol *H. verticillata*, selain itu juga terdapat beberapa senyawa lainnya seperti sesquiterpen (*Coryan-17-ol, 18,19-didehydro-10-methoxy-acetate*), linoleat (*10-octadecanoic acid, methyl ester*), asam stearat, dan pitol (Kensa dan Neelamegum, 2016). Byju, dkk. (2013) juga melaporkan adanya senyawa pitol, dan *3,5,11,15-tetramethyl-1-hexadecen-3-ol* sebagai komponen utama dalam ekstrak lipofilik unsaponifibel *H. verticillata*. Lima senyawa telah diisolasi dari ekstrak *H. verticillata* oleh Xiao, dkk. (2007) senyawa tersebut diidentifikasi sebagai 1) *Ioliolide*, 2) *Octadecanedioic acid*, 3) *Thymidine*, 4) *Sulfur-gamma*, 5) 1-*(5'-Hydroxy-4'-hydroxymethyl-1'-methyl-1H-pyrrol-2'-yl)-henicosa-2,12,15-trien-1-one*.

2.3 Steroid

Steroid adalah jenis senyawa terpenoid yang juga tergolong dalam senyawa lemak dan mengandung susunan empat cincin spesifik yang bergabung satu sama lain. Steroid tersusun dari 17 atom karbon yang terikat bersama untuk membentuk

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4 cincin menyatu, 3 cincin sikloheksana (ditunjuk sebagai cincin A, B, dan C pada Gambar 2.2) dan 1 cincin siklopentana (cincin D) (Geyter, 2012).



Gambar 2.2 Struktur dasar steroid (Geyter, 2012)

Senyawa steroid yang terdapat pada tumbuhan disebut dengan fitosterol. Nama "sterol" dipakai khusus untuk steroid alkohol, tetapi karena semua steroid tumbuhan berupa alkohol dengan gugus hidroksil yang terletak pada C-3 sehingga semuanya disebut sterol (Robinson, 1995). Sebagian besar steroid tumbuhan semua cincinya disambungkan satu sama lain oleh ikatan *trans*. Akibatnya seluruh cincin terletak dalam satu bidang, dan gugus yang menempel lainya tegak lurus pada bidang cincin. Gugus metil pada C-10 selalu mengarah ke atas. Sehingga gugus apapun yang letaknya *trans* terhadap gugus metil C-10 dinyatakan sebagai konfigurasi alfa (α) dan gugus yang letaknya *cis* sebagai beta (β). Semua sterol alam mempunyai rantai samping C-17 β (Robinson, 1995). Salah satu cara penggolongan sterol didasarkan pada putaran optiknya, cara ini mencerminkan perbedaan struktur yang penting. Penggolongan sterol berdasarkan putaran optiknya ditampilkan pada Tabel 2.2.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Tabel 2.2 Jenis steroid (Robinson, 1995)

Rotasi Jenis	Jenis Struktur	Contoh
Lebih kecil dari -90°	Ikatan rangkap dua terkonjugasi pada cincin B	Ergosterol
-70°--90°	Ikatan rangkap dua pada 5,6 dan 22,23	Stigmasterol
-45°--30°	Ikatan rangkap dua pada 5,6	*β*-sitosterol
-25°-+10°	Ikatan rangkap dua pada 7,8 dan mungkin juga pada 22,23	*α*-spinasterol
+10°-+30°	Sistem cincin jenuh seluruhnya	Stigmastanol
+40°-+50°	Ikatan rangkap dua pada 8,9 dan mingkin juga rangkap pada rantai samping	Zimosterol
>+50°	Bukan sterol	

Mawaddah (2019) berhasil mengisolasi senyawa steroid dari *H. verticillata* fraksi *n*-heksana yang dipisahkan menggunakan kromatografi kolom dan diidentifikasi dengan UV-Vis, FTIR, dan LC-MS hasil yang diperoleh berupa dua senyawa steroid yaitu *β*-sitosterol dan stigmasterol. Hal yang sama juga dilakukan oleh Purwantoro (2019) dengan teknik pemisahan yang berbeda yaitu menggunakan KLTP, hasil yang diperoleh berupa satu senyawa steroid yaitu *β*-sitosterol. Kensa dan Neelamegum (2016) juga melaporkan adanya senyawa steroid *Ergost-5-en-ol, 22, 23-dimethyl acetate* pada ekstrak etanol *H. verticillata* .

Beberapa penelitian melaporkan bahwa senyawa steroid memiliki beberapa bioaktivitas seperti menghambat pertumbuhan tumor pada hewan dan dapat membunuh insekta, bakteri, serta jamur (Vickrey dan Vickrey, 1981). Awad (2000) menunjukkan senyawa steroid dari alga hijau *Ulva lactuca* dapat menghambat pertumbuhan beberapa mikroba. Senyawa steroid stigmasterol dan fukosterol dari tumbuhan *Paperomia pellucida* juga memiliki aktivitas sebagai antimalaria (Bialangi, dkk., 2018). Selain itu, Nurcahyanti, dkk. (2015) juga menyatakan bahwa

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

senyawa steroid stigmasterol dan stigmast-5-en-3*β*-ol dari kulit batang *Dysoxylum alliaceum* aktif dalam menghambat sel kanker payudara MCF-7.

Senyawa steroid dalam *H. verticillata* dapat diperoleh dengan melakukan isolasi. Isolasi senyawa steroid dari suatu tumbuhan terdiri dari 4 tahap penting yaitu ekstraksi, pemisahan, pemurnian, dan identifikasi (Sulastry dan Kurniawati, 2010). Sedangkan menurut Setiyawan (2015) isolasi senyawa steroid dapat dilakukan dengan cara maserasi, hidrolisis dan partisi, kemudian dipisahkan dengan kromatografi lapis tipis.

2.4 Ekstraksi Maserasi *Hydrilla verticillata*

Ekstraksi digunakan untuk memperoleh kandungan senyawa aktif yang ada di dalam suatu sampel. Metode ekstraksi yang umum digunakan adalah maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi yang dilakukan dengan cara peredaman sampel dengan pelarut organik pada suhu ruang. Prinsip maserasi adalah pelarut yang memiliki konsentrasi tinggi akan masuk ke dalam sel tumbuhan melewati dinding sel, isi sel akan larut dalam pelarut dan akibatnya larutan di dalam sel memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan di luar sel sehingga larutan akan terdesak keluar sel dan terjadi difusi kembali. Peristiwa tersebut akan terjadi berulang-ulang hingga konsentrasi cairan di dalam sel dan di luar sel seimbang (Ansel, 1989).

Maserasi tidak memerlukan pemanasan sehingga semua komponen kimia dapat terekstrak dan tidak merusak metabolit sekunder yang sebagian besar tidak tahan terhadap panas (Voight, 1994). Selain itu, keuntungan metode ini adalah sederhana, tidak memerlukan alat yang rumit, dan relatif murah (Kiswandono,

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

2011). Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa hasil rendemen metode maserasi lebih besar dibandingan dengan metode ekstraksi dingin yang lain yaitu ekstraksi ultrasonik, dengan nilai rendemen pada ekstraksi maserasi sebesar 7,7% dan pada ekstraksi ultasonik sebesar 5,63% (Sayuti, 2017).

Faktor yang mempengaruhi proses ekstraksi salah satunya adalah jenis pelarut yang digunakan. Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan pelarut yaitu dapat melarutkan senyawaan sesuai kepolaranya, memiliki titik didih rendah sehingga mudah diuapkan, bersifat inert, dan harga terjangkau (Guenther, 1987). Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah metanol. Metanol termasuk pelarut golongan alkohol yang merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik. Pelarut metanol memiliki titik didih yang lebih rendah dibandingkan dengan etanol yaitu 64°C sehingga lebih mudah diuapkan pada suhu rendah (Atun, 2014). Selain itu, metanol merupakan pelarut universal yang memiliki konstanta dielektrik tinggi yaitu 33,60 yang menandakan bersifat sangat polar yang dapat menarik semua senyawa organik baik polar maupun nonpolar (masih berikatan dengan glikon) (Atun, 2014).

Kemampuan metanol yang dapat melarutkan seluruh senyawa metabolit sekunder dibuktikan oleh Hafiz (2017) yang menyatakan bahwa ekstrak metanol *H. verticillata* menghasilkan rendemen yang lebih besar (12,72%) dibandingkan ekstrak kloroform (4,96%) dan *n*-heksana (3,80%). Dan setelah diuji fitokimianya senyawa metabolit sekunder yang diperoleh dari ekstrak metanol *H. verticillata* lebih banyak dari yang lainya meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, dan steroid/triterpenoid (Hafiz, 2017). Savitri, dkk. (2017) juga menunjukkan bahwa ekstrak metanol dari *Sargassum polycystum* memiliki rendemen terbesar (4,18%)

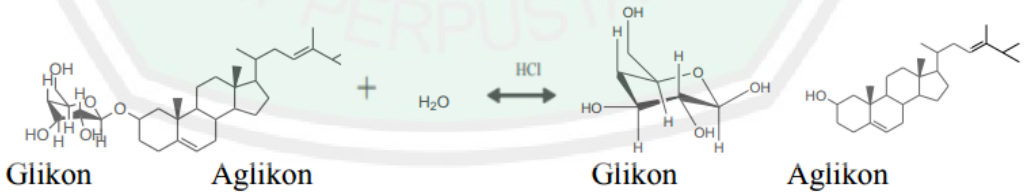
CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

dibandingkan ekstrak etanol (2,59%), aseton (1,57%), isopropil alkohol (1,19%), dan etil asetat (0,91%).

2.5 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak *Hydrilla verticillata*

2.5.1 Hidrolisis

Pemisahan senyawa metabolit sekunder yang lebih spesifik dapat melalui proses hidrolisis dan partisi. Senyawa organik dalam tumbuhan umumnya berbentuk glikosida yang terdiri dari glikon dan aglikon yang dihubungkan dengan ikatan glikosida. Senyawa metabolit sekunder tergolong senyawa aglikon (Fasya, dkk., 2016). Sehingga untuk memperoleh senyawa metabolit sekunder yang lebih spesifik perlu dilakukan pemutusan ikatan glikosida. Pemutusan ikatan glikosida dapat dilakukan dengan menggunakan air yang disebut dengan reaksi hidrolisis. Reaksi hidrolisis membutuhkan bantuan katalis untuk mempercepat reaksinya (Fasya, dkk., 2016). Katalis yang sering digunakan adalah katalis asam seperti asam klorida, dan asam sulfat (Artati, dkk., 2012). Reaksi hidrolisis ditampilkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Reaksi hidrolisis (Lawoko, dkk., 2009)

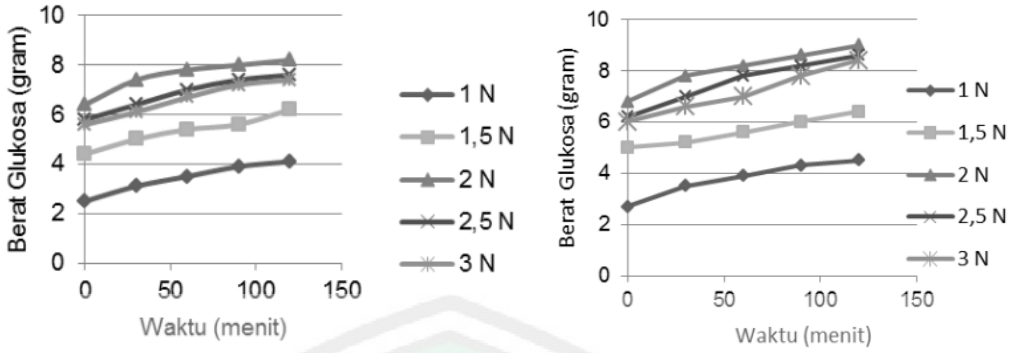
Steroid pada ekstrak metanol *H. verticillata* masih dalam bentuk glikosida sehingga perlu dilakukan pemutusan ikatan antara gugus gula dan steroidnya.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Pemutusan tersebut dilakukan dengan cara hidrolisis menggunakan HCl 2 N (Artati, dkk., 2012). HCl merupakan asam kuat yang mudah melepas ion H^+ secara sempurna di dalam air. Penggunaan asam lemah tidak dianjurkan karena asam lemah relatif lebih sukar melepas ion H^+ secara sempurna dan lebih cenderung terionisasi sebagian dalam pelepasa ion H^+ (Handoko, 2006). HCl memiliki jumlah H^+ satu, sehingga proses pelepasan ion H^+ pada HCl terjadi hanya dalam satu tahap. Sedangkan, pada H_2SO_4 jumlah H^+ yang dimiliki lebih banyak. Akibatnya, reaksi hidrolisis pada HCl berlangsung lebih cepat dibandingkan pada H_2SO_4 (Saleh, dkk., 2016). HCl juga dipilih karena memiliki kekuatan asam yang lebih besar dibanding H_2SO_4, semakin kuat jenis asam yang digunakan maka kadar glukosa akan semakin tinggi (Artati, dkk., 2012). Selain itu, HCl merupakan asam kuat yang relatif aman karena pada saat proses penetralan dengan $NaHCO_3$ akan membentuk garam NaCl yang tidak berbahaya (Saleh, dkk., 2016).

Salah satu faktor yang mempengaruhi proses hidrolisis adalah konsentrasi asam, semakin besar konsentrasi asam maka semakin banyak kadar glukosa yang dihasilkan sampai dengan konsentrasi optimum, jika konsentrasi asam terlalu besar glukosa yang terbentuk sedikit, dikarenakan larutan menjadi kental sehingga tumbukan antar reaktan menjadi berkurang (Artati, dkk., 2012). Konsentrasi asam klorida yang optimum adalah 2 N. Artati, dkk. (2012) melakukan hidrolisis terhadap pelepah pisang untuk memperoleh glukosa optimum dengan menggunakan katalis asam H_2SO_4 dan HCl dengan variasi konsentrasi asam 1 N, 1,5 N, 2 N, 2,5 N, dan 3 N, hasil yang diperoleh ditampilkan pada Gambar 2.4.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



(a) (b)

Gambar 2.4 Grafik hubungan antara waktu dengan berat glukosa hasil hidrolisis pada berbagai konsentrasi (a) H_2SO_4 (b) HCl

Berdasarkan grafik pada Gambar 2.4 dapat dilihat bahwa konsentrasi optimum dalam menghasilkan berat glukosa tebesar di kedua asam sama-sama menunjukkan konsentrasi 2 N, begitu juga waktu optimum yang menghasilkan berat glukosa tebesar adalah 2 jam. Namun hasil yang diperoleh berbeda yakni asam sulfat 2 N menghasilkan 8,2 gram glukosa sedangkan asam klorida 2 N menghasilkan berat glukosa sebesar 9 gram. Hal ini menunjukkan bahwa kecepatan reaksi hidrolisis pada asam klorida lebih besar dibanding asam sulfat (Artati, dkk., 2012).

Reaksi hidrolisis bersifat reversibel. Apabila reaksi ini tidak dihentikan dengan cepat maka ikatan glikosida antara glikon dan aglikon yang terurai akan terbentuk kembali (Fasya, dkk., 2016). Reaksi hidrolisis dapat dihentikan dengan cara penetralan. Penetralan dilakukan karena glikosida bersifat stabil pada kondisi netral (Fessenden dan Fessenden, 1986). Penambahan HCl pada proses hidrolisis menyebabkan suasana asam, sehingga dibutuhkan larutan basa untuk penetralan. Basa yang digunakan adalah $NaHCO_3$ jenuh (Ningsih, dkk., 2015). Reaksi tersebut

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

akan membentuk produk samping yang tidak berbahaya yaitu garam NaCl. Reaksi penetralan ditampilkan di bawah ini.

$$HCl + NaHCO_3 \rightarrow NaCl + CO_2 + H_2O$$

2.5.2 Partisi

Hasil yang diperoleh dari proses hidrolisis berupa senyawa metabolit sekunder (aglikon) yang terputus dari gugus gulanya (glikon). Isolasi senyawa steroid yang lebih spesifik dapat dilakukan dengan proses partisi. Proses partisi didasarkan pada metode ekstraksi cair-cair. Prinsip dari metode ekstraksi cair-cair adalah pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan distribusinya diantara dua fase pelarut yang tidak saling bercampur dengan tingkat kepolaran yang berbeda (Khopkar, 2007). Hasil proses partisi membentuk dua lapisan yaitu fasa organik dan fasa air, letak kedua fasa tergantung dari massa jenisnya. Fasa organik mengekstrak senyawa aglikon yang sudah terputus yang mengandung senyawa metabolit sekunder dan fasa air mengekstrak komponen glikon (gula) (Fasya, dkk., 2016).

Proses partisi dilakukan dengan menggunakan variasi pelarut etil asetat (semipolar) dan petroleum eter (nonpolar). Kedua pelarut dipilih karena memiliki perbedaan kepolaran dengan metanol (polar) sehingga dapat diperoleh senyawa aktif yang lebih spesifik berdasarkan kepolaran pelarut dan juga pemisahan dapat lebih efektif (Desianti, 2014). Pemilihan pelarut etil asetat dan petroleum eter dikarenakan proses partisi dilakukan untuk mengambil senyawa steroid yang memiliki sifat lebih ke nonpolar. Amalia, dkk. (2018) menunjukkan bahwa fraksi

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

etil asetat dan petroleum eter positif mengandung steroid yang ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau kebiruan pada uji steroid. Selain itu, Desianti (2014) menunjukkan bahwa fraksi petroleum eter *Chlorella* sp. memiliki toksisitas tertinggi terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan nilai LC_{50} sebesar 32,6710 ppm dibandingkan fraksi kloroform (32,9023 ppm), fraksi *n*-heksana (34,2133 ppm), fraksi etil asetat (43,3044 ppm), dan ekstrak metanol (38,9697 ppm). Fasya, dkk. (2016) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak metanol *Chlorella* sp. memiliki rendemen terbesar yaitu 80,95% dibandingkan fraksi yang lain.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Khasanah (2018), yaitu uji toksisitas senyawa aktif fraksi *n*-heksana, kloroform, dan *n*-butanol ekstrak metanol *H. verticillata* menunjukkan bahwa nilai LC_{50} fraksi *n*-heksana (30,8615 ppm), kloroform (34,6766 ppm), dan *n*-butanol (39,1573 ppm) cenderung lebih rendah dibandingkan nilai LC_{50} ekstrak kasar metanol (633,171 ppm) yang dilakukan oleh (Hafiz, 2017). Hasil tersebut menunjukkan bahwa efek toksik setelah dihidrolisis dan dipartisi lebih tinggi dibandingkan sebelum dilakukan hidrolisis dan partisi.

2.6 Uji Fitokimia Fraksi *Hydrilla verticillata*

2.6.1 Alkaloid

Alkaloid tersebar luas di dunia tumbuhan. Berbagai perkiraan menyatakan bahwa presentase jenis tumbuhan yang mengandung alkaloid sekitar 15-30% (Robinson, 1995). Umumnya alkaloid merupakan senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam gabungan, sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid sering kali beracun bagi manusia dan banyak mengandung kegiatan fisiologi yang menonjol, jadi digunakan secara luas dalam

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

bidang pengobatan (Harborne, 1987). Bukti kualitatif untuk menunjukkan adanya alkaloid dan pencirian kasar dapat diperoleh dengan menggunakan berbagai pereaksi alkaloid. Beberapa pereaksi (reagen) yang digunakan untuk mengetahui adanya alkaloid dirangkum pada Tabel 2.3 (Sarker dan Nahar, 2009).

Tabel 2.3 Uji Alkaloid

Reagen/Uji	Komposisi Reagen	Hasil
Reagen Meyer	Larutan kalium tetraiodomerkurat	Endapan krim
Reagen Wagner	Iodium dalam kalium iodida	Endapan cokelat kemerahan
Asam Tanat	Asam tanat 5%	Endapan
Reagen Hager	Larutan asam pikrat jenuh	Endapan kuning
Reagen Dragendorf	Larutan kalium tetraiodobismutat	Endapan orange atau cokelat kemerahan (kecuali dengan kafein dan beberapa alkaloid lain)

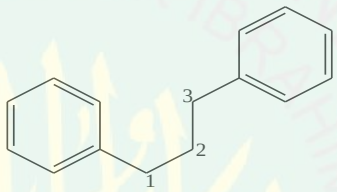
Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan *H. verticillata* positif mengandung senyawa golongan alkaloid diantaranya adalah Hafiz (2017) menunjukkan bahwa ekstrak metanol *H. verticillata* positif mengandung senyawa alkaloid. Hasanah (2017) juga menunjukkan hasil uji fitokimia dari ekstrak etanol *H. verticillata* positif mengandung alkaloid. Fraksi kloroform dan *n*-butanol hasil hidrolisis ekstrak metanol *H. verticillata* juga berdasarkan hasil uji fitokimianya dinyatakan positif alkaloid (Khasanah, 2018).

2.6.2 Flavonoid

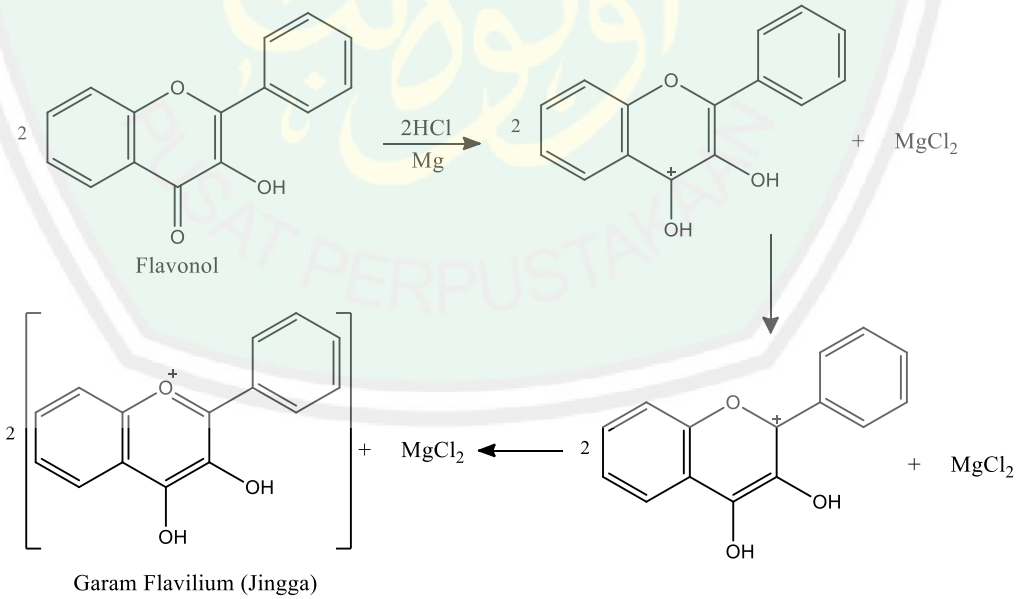
Senyawa flavonoid adalah senyawa yang mengandung C_{15} terdiri atas dua inti fenolat yang dihubungkan dengan tiga satuan karbon (Sastrohamidjojo, 1996).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa C_6-C_3-C_6, artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C_6 (cincin benzena tersubtitusi) yang disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon seperti yang ditampilkan pada Gambar 2.5 (Robinson, 1995). Berdasarkan strukturya flavonoid dibagi menjadi beberapa jenis tergantung pada tingkat oksidasi rantai propan, diantaranya yaitu flavan, flavanol, flavanon, flavon, flavanonol, flavononon, antosianidin, kalkon, dan auron (Endarini, 2016).



Gambar 2.5 Struktur dasar flavonoid



Gambar 2.6 Dugaan reaksi uji flavonoid (Ritna, dkk., 2016)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Uji skrining fitokimia senyawa flavonoid dilakukan dengan menggunakan pereaksi Willstater/Sianidin. Pereaksi Willstater menggunakan serbuk Mg dan HCl pekat dalam pengujiannya. Adanya flavonoid ditandai dengan warna merah atau orange tergantung pada stuktur flavonoid yang terkandung dalam sampel tersebut (Kristanti, dkk., 2008). Perkiraan reaksi uji flavonoid yang terjadi ditampilkan pada Gambar 2.6.

Ikfi (2017) menunjukkan bahwa ekstrak metanol *H. verticillata* positif mengandung senyawa flavonoid. Hasanah (2017) juga menunjukkan hasil uji fitokimia dari ekstrak etanol dan etil asetat *H. verticillata* positif mengandung flavonoid. Fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak etanol *H. verticillata* juga berdasarkan hasil uji fitokimianya dinyatakan positif flavonoid (Amalia, dkk., 2018).

2.6.3 Saponin

Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat yang menimbulkan busa jika dikocok di dalam air dan pada konsentrasi yang rendah dapat menyebabkan hemolisis sel darah merah. Dalam larutan yang sangat encer saponin sangat beracun untuk ikan, dan tumbuhan yang mengandung saponin telah digunakan sebagai racun ikan selama beratus-ratus tahun. Beberapa saponin bekerja sebagai antimikroba (Robinson, 1995). Dikenal dua jenis saponin yaitu glikosida struktur steroid dan glikosida triterpenoid alkohol. Aglikonnya disebut sapogenin yang diperoleh melalui hidrolisis asam atau enzim.

Saponin dapat dideteksi dengan penambahan HCl. Positif saponin ditandai dengan terbentuknya busa, busa menunjukkan adanya glikosida yang membentuk

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

buih dalam air karena terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Rusdi, 1990). Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ekstrak metanol (Hafiz, 2017) dan ekstrak etanol (Hasanah, 2017) *H. verticillata* positif mengandung senyawa saponin. Fraksi *n*-heksana, kloroform, dan *n*-butanol hasil hidrolisis ekstrak metanol *H. verticillata* berdasarkan hasil uji fitokimianya juga dinyatakan positif mengandung senyawa saponin (Khasanah, 2018).

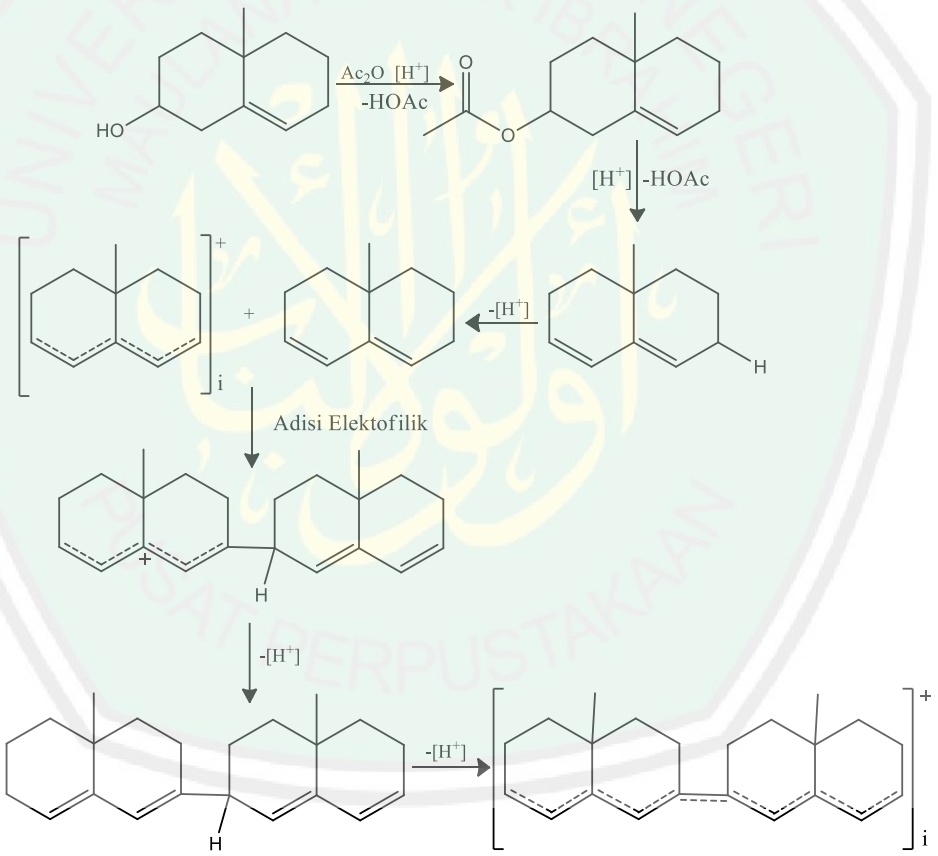
2.6.4 Triterpenoid dan Steroid

Triterpenoid merupakan senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari 6 satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C_{30} asiklik yaitu skualena (Harborne, 1987). Sifat-sifat triterpenoid diantaranya adalah terasa sangat pahit, tidak berwarna, berbentuk kristal, titik leleh tinggi, optis aktif, mempunyai bau dan dapat diisolasi dari bahan nabati dengan penyulingan. Senyawa ini biasanya ditemukan pada tumbuhan berbiji, bebas, dan sebagai glikosida (Robinson, 1987).

Steroid adalah jenis senyawa terpenoid yang juga tergolong dalam senyawa lemak dan mengandung susunan empat cincin spesifik yang bergabung satu sama lain. Steroid tersusun dari 17 atom karbon yang terikat bersama untuk membentuk 4 cincin menyatu, 3 cincin sikloheksana (ditunjuk sebagai cincin A, B, dan C pada Gambar 2.2) dan 1 cincin siklopentana (cincin D) (Geyter, 2012). Triterpenoid dalam jaringan tumbuhan dapat dijumpai dalam bentuk bebasnya, tetapi tidak jarang juga ditemui dalam bentuk glikosidanya, sehingga triterpenoid dan steroid bisa terdapat diberbagai ekstrak tumbuhan.

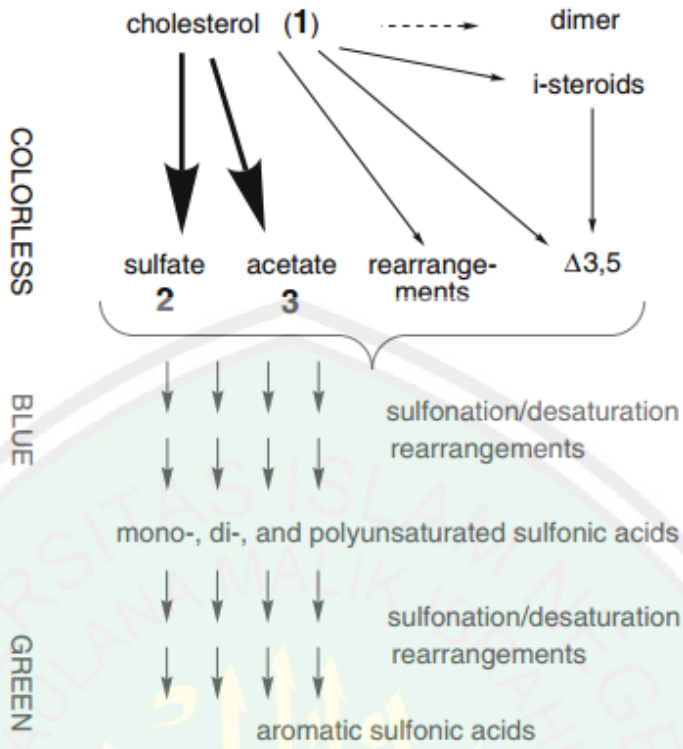
CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Uji golongan triterpenoid dan steroid dilakukan dengan menggunakan reagen Liebermann-Burchard (LB) yang berisi campuran asam asetat anhidrat, asam sulfat, dan kloroform. Positif triterpenoid ditandai dengan terbentuknya cincin kecokelatan atau violet pada perbatasan kedua pelarut (Harbone, 1987). Perubahan warna yang terjadi dikarenakan adanya perpanjangan konjugasi yang akan menggeser panjang gelombang ke arah yang lebih besar yaitu daerah visibel (Fasya, 2016). Reaksi Liebermann-Burchard ditampilkan pada Gambar 2.7 (Siadi, 2012).



Gambar 2.7 Reaksi Liebermann-Burchard dan triterpenoid (Siadi, 2012)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



Gambar 2.8 Jalur tahapan reaksi Liebermann-Burchard (Xiong, dkk., 2007)

Positif steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kebiruan (Harbone, 1987). Hasil reaksi antara reagen LB dan steroid dalam sampel yang menyebabkan terjadinya perubahan warna tersebut. Xiong, dkk. (2007) membuktikan bahwa reaksi LB dengan steroid (kolesterol) menghasilkan warna biru atau hijau. Xiong menjelaskan bahwa reagen LB dengan cepat mengubah kolesterol menjadi turunan asetat dan sulfatnya (produk mayor), disertai dengan produk minor berupa steroid-i, kolesta-3,5-diena, dan dimer. Kemudian produk mayor secara perlahan diubah menjadi asam sulfonat tak jenuh tunggal, tak jenuh ganda dan tak jenuh jamak (*mono-*, *di-*, *polyunsaturated*) melalui proses penataan ulang sulfonasi/desaturasi. Senyawa poliena secara bertahap diubah juga menjadi steroid aromatik melalui proses yang sama. Kinetika yang berbeda diantara tahapan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

tersebut yang menghasilkan respon warna yang berbeda. Jalur tahapan reaksi LB ditampilkan pada Gambar 2.8.

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ekstrak metanol, kloroform, dan *n*-heksana *H. verticillata* positif mengandung senyawa triterpenoid dan steroid (Ikfi, 2017). Begitu juga pada ekstrak etanol, etil asetat, dan petroleum eter *H. verticillata* (Hasanah, 2017). Fraksi *n*-heksana, kloroform, dan *n*-butanol hasil hidrolisis ekstrak metanol *H. verticillata* berdasarkan hasil uji fitokimianya dinyatakan positif steroid (Khasanah, 2018). Amalia, dkk. (2018) juga menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dan petroleum eter dari ekstrak etanol *H. verticillata* posisif mengandung senyawa triterpenoid/steroid.

2.6.5 Tanin

Tanin merupakan sejenis kandungan tumbuhan yang bersifat fenol mempunyai rasa sepat dan mempunyai kemampuan menyamak kulit, tetapi secara kimia tanin tumbuhan dibagi menjadi dua golongan yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis (Robinson, 1987). Tanin terkondensasi secara biosintesis dianggap terbentuk dengan cara kondensasi katekin tunggal. Tanin terkondensasi ini biasanya disebut proantosianidin karena bila direaksikan dengan asam panas akan menghasilkan monomer antosianidin (Harborne, 1987). Sedangkan tanin terhidrolisis mengandung ikatan ester yang dapat terhidrolisis jika dididihkan dalam asam klorida encer. Bagian alkohol dari ester ini biasanya gula dan sering kali glukosa (Robinson, 1987). Tanin terkondensasi terdapat pada paku-pakuan dan gimnospermae, serta tersebar luas dalam angiospermae, terutama pada jenis

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

tumbuhan berkayu. Sebaliknya tanin terhidrolisis penyebarannya terbatas pada tumbuhan berkeping dua (Harborne, 1987).

Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan *H. verticillata* positif mengandung senyawa golongan tanin diantaranya adalah Hafiz (2017) menunjukkan bahwa ekstrak metanol *H. verticillata* positif mengandung senyawa tanin. Hasanah (2017) juga menunjukkan hasil uji fitokimia dari ekstrak etanol *H. verticillata* positif mengandung tanin. Fraksi *n*-butanol hasil hidrolisis ekstrak metanol *H. verticillata* juga berdasarkan hasil uji fitokimianya dinyatakan positif tanin (Khasanah, 2018).

2.7 Isolasi Steroid menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Hasil partisi yang diperoleh masih berupa senyawa campuran sehingga perlu dilakukan pemisahan senyawa steroid lebih lanjut menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). KLT merupakan salah satu metode pemisahan yang paling banyak digunakan, alat dan teknik yang digunakan sederhana, murah, hemat, dan sensitivitasnya tinggi untuk visualisasi senyawa yang dianalisis (Lisboa, 1969). Pemisahan menggunakan KLT dibagi menjadi dua tahap yaitu KLTA dan KLTP. KLTA digunakan untuk mengetahui eluen terbaik. Sedangkan KLTP digunakan untuk memisahkan senyawa dari sampel dalam jumlah besar (gram) berdasarkan fraksinya, selanjutnya hasil pemisahan senyawa tersebut (bercak) dikerok dan dikumpulkan menjadi satu untuk dianalisis lebih lanjut (Rohman dan Gandjar, 2007). Kromatorafi lapis tipis merupakan suatu metode pemisahan yang didasarkan pada perbedaan distribusi dari dua fase yaitu fase diam dan fase gerak (Sastrohamidjodjo, 2004).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Fase diam yang digunakan dalam KLT berupa senyawa yang tak bereaksi seperti silika gel atau alumina yang dilapiskan pada penyokongnya yang berupa gelas, kaca atau logam. Silika gel biasa diberi perekat untuk memberi kekuatan pada lapisan dan menambah adesi pada penyokong. Pengikat yang biasa digunakan adalah kalium sulfat (Sastrohamidjodjo, 2002). Fase gerak bertindak sebagai pembawa dan fase diam bertindak sebagai penahan. Penggunaan fase gerak pelarut tunggal tidak memungkinkan resolusi yang memuaskan, sehingga direkomendasikan menggunakan pelarut campuran sederhana yaitu sistem dua komponen (Lisboa, 1969).

Pemilihan fase gerak campuran sebaiknya menggunakan pelarut non polar, kemudian ditingkatkan kepolarannya dengan pelarut yang lebih polar (Sidora, dkk., 2017). Campuran pelarut yang biasa digunakan untuk memisahkan senyawa steroid diantaranya: *n*-heksana (atau sikloheksana)-etil asetat, kloroform-etanol (atau metanol), benzena-etanol (atau metanol), dan kloroform (atau benzena)-aseton (Lisboa, 1969). Al-Quais (2015) memisahkan senyawa steroid dari akar rumput bambu dengan KLTA menggunakan variasi eluen kloroform:metanol (3:7), *n*-heksana:etil asetat:kloroform (5:3:1), *n*-heksana:etil asetat (7:3), sikloheksana:etil asetat (1:1), dan *n*-heksana:etil asetat (8:2), diperoleh eluen terbaik adalah *n*-heksana:etil asetat (8:2) karena noda yang dihasilkan paling banyak yaitu 7 noda, noda tidak berekor dan pemisahannya jelas. Berdasarkan penelitian tersebut eluen yang digunakan pada penelitian ini adalah *n*-heksana-etil asetat dengan variasi perbandingan eluen berdasarkan beberapa penelitian terdahulu.

Beberapa penelitian telah melakukan pemisahan senyawa metabolit sekunder dengan menggunakan variasi perbandingan eluen *n*-heksana-etil asetat

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

dan menghasilkan perbandingan eluen terbaik yang berbeda-beda. Muharram (2010) melakukan pemisahan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak *n*-heksana daun pare, hasil KLTA menunjukkan bahwa eluen *n*-heksana:etil asetat (19:1) memberikan pemisahan noda yang jelas dan komponen terpisah dengan baik dibandingkan dengan eluen yang lainnya. Baderos (2017) memisahkan senyawa steroid fraksi petroleum eter alga merah, hasil KLTA menunjukkan bahwa eluen *n*-heksana:etil asetat (17:3) adalah eluen terbaik dengan menghasilkan 7 spot dengan pemisahan yang jelas dan tanpa adanya ekor. Purwantoro (2019) melakukan isolasi senyawa steroid pada ekstrak *n*-heksana *H. verticillata* dengan menggunakan KLTP, hasil KLTA menunjukkan bahwa eluen *n*-heksana:etil asetat (16:4) menghasilkan pemisahan yang baik dari eluen yang lain. Sedangkan Azah (2018) melakukan isolasi senyawa steroid pada ekstrak *n*-heksana dan petroleum eter *H. verticillata* menggunakan KLTP dan dihasilkan eluen terbaik adalah *n*-heksana:etil asetat (15:5) yang menghasilkan jumlah noda terduga steroid terbanyak dengan pola pemisahan terbaik. Berdasarkan hasil tersebut isolasi senyawa steroid dapat dilakukan dengan variasi perbandingan eluen tersebut.

Identifikasi senyawa steroid yang berhasil diisolasi dengan kromatografi lapis tipis dapat dilakukan dengan melihat warna bercak yang dihasilkan. Bercak yang diperoleh umumnya tidak berwarna. Penampakan bercak dapat dilakukan dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi penampakan bercak dengan cara penyemprotan (Atun, 2014). Steroid dapat dideteksi dengan reagen Lieberman-Burchard menghasilkan bercak yang berwarna hijau biru (Robinson, 1995). Selain itu, bercak dapat dilihat di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm, bercak yang berflouresens warna hitam, hijau, atau biru di bawah lampu

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

UV 366 nm menunjukkan senyawa steroid (Atun, 2014). Pemisahan yang baik ditandai dengan banyaknya bercak noda yang dihasilkan, bercak noda tidak berekor, dan jarak antara bercak noda yang satu dengan yang lainnya jelas (Harbone, 1987).

Analisis secara kuantitatif dapat dilakukan dengan menentukan nilai R_f senyawa yang berhasil diisolasi. Nilai R_f yang diperoleh dibandingkan dengan nilai R_f standar dari senyawanya. Nilai R_f diperoleh dengan mengukur jarak antara titik awal dan pusat bercak yang dihasilkan senyawa, dan jarak ini kemudian dibagi dengan jarak antara titik awal dan garis batas atas (jarak yang ditempuh cairan pengembang) (Harbone, 1987). Nilai R_f selalu berupa pecahan dan terletak antara 0,01 dan 0,99. Penentuan nilai R_f dilakukan menggunakan persamaan (2.1).

$$\text{Nilai } R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}} \quad \text{.....(2.1)}$$

Sulistiyani (2018) melakukan isolasi senyawa steroid pada ekstrak *n*-heksana dan petroleum eter *H. verticillata* menggunakan KLTP dengan eluen *n*-heksana:etil asetat (15:5) setelah di semprot dengan reagen Lieberman-Burchard diperoleh 4 noda positif steroid pada ekstrak *n*-heksana dengan nilai R_f 0,69 (hijau), R_f 0,88 (biru), R_f 0,93 (hitam), R_f 0,95 (hijau), dan diperoleh 2 noda positif pada ekstrak petroleum eter dengan nilai R_f 0,71 (hijau), dan R_f 0,96 (hitam). Amalia, dkk. (2018) juga melakukan pemisahan senyawa steroid fraksi petroleum eter dan etil asetat hasil hidrolisis ekstrak etanol *H. verticillata* menggunakan KLTP dengan eluen *n*-heksana:etil asetat (8:2), pada fraksi petroleum eter diperoleh 17 spot dengan 4 spot yang diduga senyawa steroid dengan nilai R_f 0,505 (biru keunguan),

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

R_f 0,627 (hijau), R_f 0,780 (biru keunguan), R_f 0,880 (hijau kebiruan). Adapun pada fraksi etil asetat diperoleh 14 spot dengan 4 spot yang diduga senyawa steroid yaitu isolat dengan R_f 0,122 (biru), R_f 0,867 (biru), R_f 0,939 (hijau kebiruan), R_f 0,983 (biru).

2.8 Uji Toksisitas dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Cahyono (2004) menyatakan bahwa toksisitas adalah kemampuan suatu zat untuk merusak organisme hidup. Sedangkan uji toksisitas merupakan suatu uji untuk mendeteksi efek toksik suatu zat pada sistem biologi (BPOM, 2014). Uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan metode BSLT yaitu pengujian terhadap larva udang untuk mengetahui tingkat toksisitasnya. Parra, dkk. (2001) menunjukkan adanya korelasi yang baik antara dua metode uji toksisitas yaitu metode BSLT dan metode uji toksisitas akut oral pada mencit dengan nilai koefisien korelasi r=0,85 p<0,05. Artinya metode BSLT sangat cocok untuk pengujian awal toksisitas pada manusia dengan menggunakan udang air garam sebagai model alternatifnya. Kelebihan dari metode ini adalah cepat, sederhana (tanpa teknik aseptik), murah (tidak perlu serum hewan), jumlah organisme banyak, dan dapat memenuhi validasi statistik dengan sedikit sampel (Meyer, dkk., 1982).

BSLT merupakan uji pendahuluan untuk mengetahui bioaktivitas suatu sampel. Janakiraman dan Johnson (2016) menyatakan bahwa uji BSLT dapat digunakan sebagai dasar dari uji aktivitas antitumor, aktivitas antikanker dan uji toksisitas terhadap sel line. Hal ini dikarenakan adanya hubungan korelasi antara kematian larva udang (metode BSLT) dengan sitotoksisitas sel kanker (uji

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

sitotoksik), sehingga metode ini dapat digunakan untuk skrining awal aktivitas farmakologis (Carballo, dkk., 2002).

Jenis larva udang yang sering digunakan pada uji BSLT adalah *Artemia salina* Leach. *Artemia salina* L. merupakan model hewan yang ekstremofil yaitu dapat hidup di daerah yang ekstrim (Gajardo dan Beardmore, 2012). Artemia hidup planktonik di dalam air dengan kadar garam tinggi (15-300/mil), pH sekitar 7,3-8,4 dan suhu lingkungan 25-30°C dengan kadar oksigen sekitar 3 mg/L (Farihah, 2008). Keistimewaan larva ini adalah memiliki toleransi (kemampuan beradaptasi dan mempertahankan diri) terhadap lingkungan dengan kadar garam yang sangat tinggi dan luas dimana tidak ada satupun organisme lain yang mampu bertahan hidup (Gajardo dan Beardmore, 2012). Selain itu, Panjaitan (2011) menyatakan bahwa artemia memiliki kesamaan tanggapan dengan mamalia seperti tipe DNA-*dependent* RNA-*polymerase* (DNA yang mengarahkan proses transkripsi RNA).

Gambar 2.9 Larva *Artemia salina* L. fase Nauplii (Gajardo dan Beardmore, 2012)

Artemia salina L. memiliki beberapa fase dalam pertumbuhannya yaitu kista, panggung payung, nauplii, remaja, dan dewasa (Gajardo dan Beardmore, 2012). Fase yang digunakan untuk uji toksisitas adalah saat larva udang dalam

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

bentuk nauplii aktif. Vanhaecke, dkk. (1981) menunjukkan bahwa usia yang paling sensitif untuk sebagian besar senyawa diuji adalah nauplii usia 48 jam. Fase nauplii ditampilkan pada Gambar 2.7. Parameter yang ditunjukkan saat suatu senyawa memiliki aktivitas biologi terhadap *Artemia salina* L. adalah kematian (Meyer, dkk., 1982).

Kematian *Artemia salina* L. disebabkan adanya senyawa uji yang masuk ke dalam tubuh hewan uji dan bertindak sebagai racun perut atau *stomach poisoning* yang dapat menghambat daya makan larva. Senyawa uji dapat membunuh suatu larva karena menyerang sistem pencernaan sehingga mengganggu metabolisme dan menghambat reseptor perasa di mulut larva. Hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga larva tidak dapat mengenali makanannya dan menyebabkan larva mati karena kelaparan (Sadino, dkk., 2017).

Tabel 2.4 Nilai LC_{50} yang berpotensi sebagai bioaktif (McLaughlin, 1991)

LC_{50} (ppm)	**Potensi**
<30	Antitumor dan antikanker
30-200	Antimikroba
200<x<1000	Pestisida

Tingkat toksisitas diketahui dari nilai LC_{50} yang merupakan konsetrasi suatu zat yang menyebabkan kematian larva udang sebanyak 50% setelah terpapar zat tersebut dalam waktu tertentu (Cahyono, 2004). Ekstrak dikatakan tidak toksik apabila nilai LC_{50} >1000 µg/mL, ekstrak dengan LC_{50} 500-1000 µg/mL toksik rendah, ekstrak dengan LC_{50} 100-500 µg/mL toksik sedang, dan ekstrak dengan LC_{50} 0-100 µg/mL sangat toksik (Clarkson, dkk., 1982). Nilai LC_{50} tersebut dapat

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

memberikan makna terhadap potensi bioaktivitasnya seperti yang ditampilkan pada Tabel 2.4.

Hasanah (2017) melakukan uji toksisitas pada ekstrak kasar etanol, etil asetat, petroleum eter *H. verticillata* dan dihasilkan nilai LC_{50} terendah adalah ekstrak petroleum eter dengan LC_{50} 39,030 ppm (sangat toksik). Khasanah (2018) juga melakukan uji toksisitas senyawa aktif fraksi *n*-heksana, kloroform, dan *n*-butanol ekstrak metanol *H. verticillata* diperoleh nilai LC_{50} fraksi *n*-heksana (30,8615 ppm), kloroform (34,6766 ppm), dan *n*-butanol (39,1573 ppm), ketiganya bersifat sangat toksik. Selain itu, Mawaddah (2019) juga melakukan uji toksisitas isolat steroid hasil KLTP fraksi *n*-heksana *H. verticillata* diperoleh nilai LC_{50} isolat B sebesar 14,794 ppm. Isolat steroid tersebut bersifat sangat toksik dan berpotensi sebagai antitumor dan antikanker.

2.9 Analisis Probit

Tingkat toksisitas diketahui dari nilai LC_{50} yang merupakan konsentrasi suatu zat yang menyebabkan kematian larva udang sebanyak 50% setelah terpapar zat tersebut dalam waktu tertentu (Cahyono, 2004). Nilai LC_{50} ditentukan dengan analisis probit menggunakan MINITAB. Sebelum dianalisis perlu diketahui nilai kematian larva dan persentase kematian dari larva dengan persamaan (2.2) dan (2.3) (Nurhayati, dkk., 2006).

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{Modus (Jumlah larva yang mati)}}{\text{Jumlah larva uji dalam 1 vial (10)}} \times 100\% \quad \text{.....(2.2)}$$

$$\text{Mortalitas} = \% \text{ Mortalitas} \times \text{Jumlah keseluruhan larva (50)} \quad \text{.....(2.3)}$$

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Analisis probit dilakukan dengan menguji respon (berupa mortalitas) suatu organisme terhadap senyawa kimia dengan konsentrasi yang bervariasi. Hubungan yang ditunjukkan berbentuk sigmoid. Analisis probit berfungsi untuk mengubah hubungan yang sigmoid menjadi linear (Kanwar, 2007). MINITAB diakui sebagai program statistik yang sangat akurat dengan tingkat akurasi taksiran statistik yang tinggi (95%) dibandingkan program statistik lainnya (Iriawan dan Astuti, 2006).

2.10 Identifikasi Steroid Menggunakan Spektrofotometer FTIR

Spektrofotometer inframerah merupakan salah satu jenis spektroskopi didasarkan pada interaksi materi dengan radiasi elektromagnetik berupa sinar inframerah. Spektrofotometer inframerah digunakan untuk menganalisis senyawa kimia campuran dan mengidentifikasi senyawa dengan mendeteksi gugus fungsi senyawa tersebut menggunakan sinar inframerah (IR) (Day dan Underwood, 1986). Senyawa yang dikenai radiasi IR akan mengalami vibrasi molekular pada ikatan kovalennya. Vibrasi tersebut digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi suatu senyawa. Setiap gugus fungsi mempunyai tipe ikatan yang berbeda dan mempunyai serapan IR yang khas (Hidayah, 2015).

Gugus-gugus fungsi yang khas dari senyawa steroid yaitu O-H, C=C, -$CH(CH_3)_2$ (geminal dimetil). Sulistiyani (2018) telah mengidentifikasi isolat steroid hasil KLTP dari ekstrak pertoleum eter *H. verticillata* menggunakan FTIR. Mawaddah (2019) mengisolasi senyawa steroid dari fraksi *n*-heksana *H. verticillata* dengan kromatografi kolom dan diidentifikasi senyawa steroidnya menggunakan spektrofotometer FTIR. Keduanya menghasilkan beberapa serapan yang khas yang

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

diduga serapan dari senyawa steroid. Interpretasi serapan dari kedua penelitian tersebut dirangkum pada Tabel 2.5.

Tabel 2.5 Interpretasi serapan senyawa steroid *H. verticillata*

Bilangan gelombang (cm^{-1})		**Referensi (cm^{-1})**	**Jenis vibrasi**
Sulistiyani (2018)	**Mawaddah (2019)**	**Socrates (1994)**	
3462,68	3480,17	3550-3250	OH (*stretch*)
2924,41	2958,89	3000-2800	$-CH_2-$ (*stretch*)
1650,09	1652,07	1690-1620	C=C (*stretch*)
1460,11	1461,07	1600-1450	C-C (*stretch*)
1381,45	1383,28	1395-1365	$-C(CH_3)_2$ (*stretch*)
669,42	668,96	995-650	=C-H siklik (*bend*)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret-Juli 2020 di Laboratorium Kimia 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 seperangkat alat gelas, spatula, bola hisap, cawan porselen, desikator, timbangan analitik, oven, *shaker*, *aluminium foil*, kertas saring, erlenmeyer vakum, corong Buchner, pompa vakum, seperangkat *rotary evaporator vacuum*, *stirrer*, corong pisah, statif, lemari asap, plat silika $G_{60}F_{254}$, pinset, bejana pengembang, lampu UV, *centrifuge*, tabung *centrifuge*, *fortex*, wadah penetasan, aerator, lampu penetasan, botol vial, pipet mikro, spektrofotometer FTIR.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Hydrilla verticillata* yang berasal dari Danau Ranu Pasuruan dan hewan uji yang digunakan berupa larva udang *Artemia salina* Leach. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah metanol *p.a*, petroleum eter *p.a*, etil asetat *p.a*, HCl 2 N, air laut, ragi roti, natrium bikarbonat, dimetil sulfoksida (DMSO), HCl 37%, HCl 1 N, HCl 2%, metanol 50%, H_2SO_4, asam asetat anhidrida, aseton, $FeCl_3$ 1%, gelatin, pereaksi

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Mayer dan Dragendorf, serbuk logam Mg, NaCl, pereaksi Libermann-Burchard, dan aquades.

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui tahapa-tahapan berikut:

a) Preparasi sampel.
b) Penentuan kadar air secara termogravimetri.
c) Ekstraksi senyawa aktif.
d) Hidrolisis dan partisi ekstrak *H. verticillata*.
e) Uji fitokimia senyawa aktif.
f) Pemisahan senyawa steroid dengan KLTA dan KLTP.
g) Uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.
h) Analisis data.
i) Identifikasi isolat steroid dengan FTIR.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Preparasi Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di permukaan air Danau Ranu yang jarak antara permukaan dengan dasar airnya adalah ± 2 m. Sampel diambil sebanyak 14 Kg dan dicuci dengan air. Selanjutnya sampel dikering anginkan pada tempat yang tidak terkena cahaya matahari langsung dan pada suhu ruang, sampel dikeringkan sampai benar-benar kering yaitu selama 3 hari 2 malam. Setelah kering, sampel dihaluskan dengan ukuran ± 90 mesh di Materia Medika Kota Batu (Hafiz, 2017).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

3.4.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri

Penentuan kadar air dilakukan secara termogravimetri yaitu dengan cara menentukan stabilitas termal suatu material dengan menghitung perubahan berat. Pertama-tama cawan porselen kosong dipanaskan dalam oven dengan suhu 100-105°C selama 20 menit untuk menghilangkan kadar airnya. Selanjutnya cawan disimpan dalam desikator selama 10 menit, lalu ditimbang. Kemudian dilakukan perlakuan yang sama hingga diperoleh berat cawan kosong yang konstan. Setelah itu, sampel ditimbang sebesar 1 g, lalu dimasukan ke dalam cawan porselen kosong yang telah diperoleh berat konstannya, kemudian dikeringkan di dalam oven dengan suhu 100-105°C selama ± 20 menit. Selanjutnya sampel disimpan di dalam desikator selama 10 menit, lalu ditimbang. Dilakukan perlakuan yang sama hingga diperoleh berat cawan berisi sampel yang konstan. Kadar air *H. verticillata* dihitung dengan menggunakan persamaan (3.1) (AOAC, 1984).

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

A adalah berat cawan kosong, b adalah berat cawan ditambah sampel sebelum dikeringkan, dan c adalah berat cawan ditambah sampel setelah dikeringkan.

3.4.3 Ekstraksi Senyawa Aktif

Ekstraksi senyawa aktif *H. verticillata* dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi. Ekstraksi ini dilakukan dengan cara ditimbang sampel hydrilla serbuk sebesar 100 g, lalu sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer tutup 1000 mL, kemudian sampel direndam dengan pelarut metanol *p.a* sebanyak 500 mL.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Ekstraksi dilakukan dengan diiringi pengocokan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu kamar selama 24 jam. Setelah itu, dilakukan penyaringan dengan menggunakan corong Buchner. Residu yang diperoleh dimaserasi kembali hingga filtrat yang diperoleh bening. Kemudian filtrat yang diperoleh digabung menjadi satu lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum*. Ekstrak pekat yang diperoleh dikeringkan dengan dialiri gas N_2 sehingga diperoleh ekstrak kering. Ekstrak kering ditimbang dan dihitung *yield*nya dengan menggunakan persamaan (3.2) (Hafiz, 2017).

$$\%\ Yield = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \text{ x } 100\% \quad \text{.....(3.2)}$$

3.4.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak *Hydrilla verticillata*

Hidrolisis ekstrak metanol *H. verticillata* dilakukan dengan cara menambahkan 10 mL HCl 2 N dalam 5 g ekstrak pekat metanol, kemudian distirer dengan *hot plate stirrer* selama 2 jam pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan natrium bikarbonat hingga pH netral (Khasanah, 2018).

Hidrolisat yang diperoleh dipartisi dengan pelarut etil asetat dan petroleum eter. Ekstrak hasil hidrolisis dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan pelarut petroleum eter sebanyak 25 mL. Selanjutnya dilakukan pengocokan selama 15 menit, lalu didiamkan beberapa saat hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan organik dan lapisan air. Masing-masing lapisan yang terbentuk kemudian dipisahkan. Lapisan organik fraksi petroleum eter yang diperoleh ditampung dalam *beaker glass* dan lapisan air yang diperoleh dipartisi kembali dengan pelarut petroleum eter. Perlakuan ini diulang hingga 3 kali pengulangan. Lapisan organik

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

yang diperoleh dikumpulkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* hingga diperoleh fraksi pekat petroleum eter. Selanjutnya dilakukan hal yang sama untuk pelarut etil asetat. Fraksi pekat petroleum eter dan etil asetat yang diperoleh dikeringkan dengan dialiri gas N_2 sehingga diperoleh fraksi kering. Masing-masing fraksi kering ditimbang dan dihitung *yield*nya menggunakan persamaan (3.2) (Khasanah, 2018).

3.4.5 Uji Fitokimia Senyawa Aktif

Fraksi etil asetat dan petroleum eter dari *H. verticillata* dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui golongan senyawa aktif yang terdapat didalamnya, golongan senyawa aktif itu meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, steroid/triterpenoid, dan tanin.

3.4.5.1 Uji Alkoloid

Fraksi etil asetat dan petroleum eter *H. verticillata* masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah HCl 2% sebanyak 0,5 mL, kemudian dibagi ke dalam dua tabung. Tabung I ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorf, dan pada tabung II ditambahkan 2-3 reagen Mayer. Jika terbentuk endapan berwarna jingga pada tabung I dan endapan berwarna kekuning-kuningan pada tabung II menandakan adanya alkaloid (Sastrohamidjojo, 1996).

3.4.5.2 Uji Flavonoid

Fraksi etil asetat dan petroleum eter *H. verticillata* masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan metanol 50% panas

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

sebanyak 1-2 mL. Selanjutnya ditambahkan serbuk Mg dan 0,5 mL HCl pekat. Jika terbentuk larutan berwarna merah atau jingga itu menunjukkan adanya flavonoid (Harbone, 1987).

3.4.5.3 Uji Saponin

Fraksi etil asetat dan petroleum eter *H. verticillata* masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan air dengan perbandingan ekstrak dan air (1:1), kemudian dikocok selama 1 menit. Apabila dihasilkan busa ditambahkan HCl 1 N, jika busa yang dihasilkan bertahan selama 10 menit dengan ketinggian 1-3 cm, maka ekstrak positif mengandung saponin (Harbone, 1987).

3.4.5.4 Uji Steroid dan Triterpenoid

Fraksi etil asetat dan petroleum eter *H. verticillata* masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dengan kloroform sebanyak 0,5 mL, kemudian ditambahkan asam asetat anhidrat sebanyak 0,5 mL. Selanjutnya campuran tersebut ditambahkan dengan H_2SO_4 pekat sebanyak 1-2 mL dengan cara dilewatkan dinding tabung. Hasil yang menunjukkan adanya triterpenoid akan terbentuk cincin kecokelatan atau violet pada perbatasan kedua pelarut dan positif steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kebiruan (Harbone, 1987).

3.4.5.5 Uji Tanin

Uji tanin dapat dilakukan dengan dua cara yaitu dengan gelatin dan dengan $FeCl_3$. Pertama, sebesar 2 mg fraksi etil asetat dan petroleum eter *H. verticillata* masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

larutan gelatin. Jika terbentuk endapan putih berarti positif mengandung tanin. Kedua, fraksi etil asetat dan petroleum eter *H. verticillata* masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan larutan $FeCl_3$ 1% sebanyak 2-3 tetes. Jika terbentuk larutan berwarna hijau kehitaman atau biru tua berarti positif mengandung tanin (Sarker dan Nahar, 2009).

3.4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)

Pemisahan senyawa steroid dengan KLTA dilakukan dengan menggunakan plat silika GF_{254} ukuran 2 cm x 10 cm yang telah diaktivasi pada suhu 60-100°C selama 30 menit. Sebesar 0,04 g sampel (fraksi petroleum eter dan etil asetat) dilarutkan dalam 10 ml pelarutnya (setara 4000 ppm). Kemudian sampel yang sudah dilarutkan masing-masing ditotolkan sebanyak 10 kali totolan pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat menggunakan pipa kapiler. Selanjutnya, plat dikeringkan dan dielusi menggunakan fasa gerak *n*-heksana-etil asetat dengan perbandingan tertentu (Sulistiyani, 2018). Pada percobaan ini digunakan 5 macam variasi perbandingan fasa gerak sebagai berikut:

V1 = 19:1 (*n*-heksana:etil asetat) (Muharram, 2010)

V2 = 18:2 (*n*-heksana:etil asetat) (Zahra, dkk., 2013)

V3 = 17:3 (*n*-heksana:etil asetat) (Baderos, 2017)

V4 = 16:4 (*n*-heksana:etil asetat) (Purwantoro, 2019)

V5 = 15:5 (*n*-heksana:etil asetat) (Azah, 2018)

Proses elusi dihentikan setelah eluen mencapai garis batas atas. Noda-noda pada permukaan plat diamati di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Setelah itu ditentukan nilai *retention factor* (R_f) masing-masing noda.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Eluen terbaik ditentukan dari banyaknya noda yang terpisah dan jarak antar nodanya. Eluen terbaik digunakan untuk pemisahan selanjutnya mengunakan KLTP (Amalia, dkk., 2018).

3.4.7 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Pemisahan senyawa steroid dengan KLTP dilakukan dengan menggunakan plat silika GF_{254} ukuran 10 cm x 20 cm yang telah diaktivasi pada suhu 60-100°C selama 30 menit. Sampel (fraksi petroleum eter dan etil asetat) yang telah dilarutkan dengan pelarutnya menjadi konsentrasi 4000 ppm ditotolkan disepanjang garis batas bawah yakni jarak 1 cm dari tepi bawah plat. Selanjutnya, plat dielusi menggunakan eluen terbaik hasil analisis KLTA. Elusi dihentikan ketika eluen mencapai garis batas atas. Noda hasil pemisahan diamati dibawah lampu UV 254 dan 366 nm, lalu dihitung masing-masing R_f noda yang terbentuk. Spot noda yang terbentuk disemprotkan dengan reagen Libermann-Burchard untuk diamati perubahan warnanya. Spot noda yang diduga steroid dikerok dan dilarutkan dengan pelarutnya. Selanjutnya, disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit dan diambil supernatannya. Supernatan yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan menggunakan gas N_2 hingga diperoleh isolat pekat (Amalia, dkk., 2018).

3.4.8 Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

3.4.8.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina* Leach

Air laut sebanyak 250 mL dimasukkan ke dalam wadah penetasan, kemudian ditambahkan telur udang *Artemia salina* Leach sebesar 2,5 mg lalu diaerasi di bawah pencahayaan lampu pijar 60 watt agar suhu penetasan 25-30°C

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

tetap terjaga. Selanjutnya telur didiamkan selama ± 48 jam hingga telur menetas dan siap untuk digunakan sebagai target uji toksisitas (Hafiz, 2017).

3.4.8.2 Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan pada setiap sampel (isolat steroid fraksi etil asetat dan fraksi petroleum eter). Isolat steroid hasil KLTP ditimbang masing-masing sebesar 1 mg lalu dilarutkan dengan pelarutnya masing-masing 10 ml agar diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 100 ppm. Selanjutnya, dipipet larutan stok masing-masing sebesar 100, 200, 300, 400, dan 500 µL ke dalam botol vial kemudian diuapkan pelarutnya hingga kering. Setelah itu, ditambahkan DMSO sebesar 100 µL, 1 tetes larutan ragi roti, dan 2 mL air laut ke dalam botol vial tersebut, kemudian dikocok hingga ekstrak larut. Konsentrasi masing-masing larutan diubah menjadi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm dengan cara ditambahkan air laut sampai volumenya sebanyak 10 ml. Selanjutnya 10 ekor larva udang *Artemia salina* dimasukkan ke dalam botol vial dan dilakukan pengamatan terhadap kematian larva udang setelah 24 jam.

Kematian larva udang dibandingkan dengan beberapa kontrol yaitu kontrol tanpa isolat, kontrol pelarut, dan kontrol DMSO. Dilakukan hal yang sama untuk ketiga kontrol. Kontrol tanpa isolat dibuat dengan menggunakan 100 µL pelarut sebagai pengganti isolat sampelnya kemudian pelarut diuapkan. Selanjutnya ditambahkan DMSO sebesar 100 µL, 1 tetes larutan ragi roti, dan air laut hingga 10 mL. Kontrol pelarut dibuat menggunakan 100 µL pelarut tanpa penambahan isolat dan DMSO. Begitu sebaliknya kontrol DMSO dibuat tanpa penambahan isolat dan pelarut. Ketiga kontrol ditambahkan satu tetes ragi roti dan air laut hingga 10 mL

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

kemudian ditambahkan 10 ekor larva udang. Selanjutnya diamati dan dihitung jumlah larva udang yang mati setelah 24 jam. Kemudian dihitung semua kematian larva dan persen kematian dari larva menggunakan persamaan (3.3) dan (3.4). Setelah itu, dilakukan analisis data yang diperoleh dengan menggunakan analisa probit untuk mencari nilai LC_{50} (Mawaddah, 2019).

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{Modus (Jumlah larva yang mati)}}{\text{Jumlah larva uji (10 ekor)}} \times 100\% \quad \text{.....(3.3)}$$

$$\text{Mortalitas} = \% \text{ Mortalitas x Jumlah keseluruhan larva (50)} \quad \text{.....(3.4)}$$

3.4.9 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa nilai hasil uji toksisitas dibuat tabel. Kemudian dianalisis menggunakan analisa data probit dengan program MINITAB 17 untuk mencari nilai LC_{50}.

3.4.10 Identifikasi Steroid Menggunakan FTIR

Isolat steroid hasil pemisahan KLTP diidentifikasi menggunakan FTIR. Hasil isolat steroid kering dicampur dengan KBr lalu digerus bersama dalam mortar agat dan dipres dengan tekanan 80 torr selama 10 menit agar dihasilkan lempeng yang transparan. Selanjutnya lempeng tersebut dianalisis menggunakan FTIR dengan bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} (Panji, 2012).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Sampel *Hydrilla verticillata* diperoleh dari Danau Ranu Grati Pasuruan. Pencucian sampel bertujuan untuk membersihkan kotoran yang menempel pada sampel agar nantinya tidak mempengaruhi proses ekstraksi, berat bersih diperoleh sebesar 14 Kg. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kandungan air dalam sampel dengan cara diangin-anginkan tanpa sinar matahari langsung, agar metabolit sekunder di dalamnya tidak rusak akibat suhu yang tinggi dan cahaya matahari. Berat sampel kering diperoleh sebesar 1,2 Kg, kemudian sampel dihaluskan untuk menyeragamkan ukuran dan memperluas permukaan partikel sampel sehingga mempermudah proses ekstraksi. Hal ini didasarkan pada Voight (1995) yang menyatakan bahwa semakin kecil ukuran partikel sampel maka semakin besar luas permukaannya, kontak antara sampel dengan pelarut akan semakin besar pula, sehingga proses ekstraksi akan berjalan semakin cepat. Serbuk *H. verticillata* kering diperoleh sebesar 1 Kg dengan *yield* serbuk sebesar 7,14% (Lampiran 4.1).

4.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimatri

Penentuan kadar air bertujuan untuk mengetahui besarnya kandungan air dalam sampel. Hasil penentuan kadar air serbuk kering *H. verticillata* pada penelitian ini yaitu sebesar 7,59% (Lampiran 4.2). Hasil tersebut memenuhi standar Depkes RI (1994) yang menyatakan bahwa batas maksimum kadar air dalam sediaan obat tradisional termasuk serbuk simplisia adalah sebesar 10%. Hasil

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

tersebut menunjukkan bahwa kadar air serbuk *H. verticillata* tidak mengganggu proses ekstraksi dan penyimpanan. Hal ini dikarenakan kadar air tinggi pada sampel dapat menghambat proses penarikan zat aktif karena adanya gangguan dari molekul air. Sehingga *yield* ekstrak yang diperoleh lebih sedikit. Selain itu, kadar air sampel yang tinggi dapat mempercepat proses pembusukan sampel, sehingga dapat mempengaruhi lama waktu penyimpanan.

4.3 Ekstraksi Senyawa Aktif

Ekstraksi bertujuan untuk mengambil senyawa-senyawa aktif (diantaranya steroid) dalam sampel. Pengocokan yang dilakukan bertujuan untuk memaksimalkan kontak pelarut dengan sampel sehingga mempercepat proses ekstraksi. Filtrat yang diperoleh setelah proses penyaringan pertama berwarna hijau pekat. Warna tersebut menunjukkan bahwa senyawa aktif *H. verticillata* telah terekstrak ke dalam pelarut. Proses remaserasi dihentikan saat filtrat yang diperoleh berwarna hijau bening yaitu setelah 5 kali remaserasi. Warna tersebut menunjukkan bahwa senyawa aktif telah terekstrak dengan maksimal. Ekstraksi maserasi ini dilakukan hingga 3 kali pengulangan. Hasil yang diperoleh berupa ekstrak pekat berwarna hijau kehitaman dengan berat rata-rata sebesar 6,4949 g dan *yield* ekstrak sebesar 6,495% (Lampiran 4.3).

4.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol

Senyawa metabolit sekunder pada ekstrak metanol *H. verticillata* masih berbentuk glikosida sehingga perlu dilakukan pemutusan ikatan glikosidanya dengan cara hidrolisis. Penambahan $NaHCO_3$ pada proses hidrolisis bertujuan

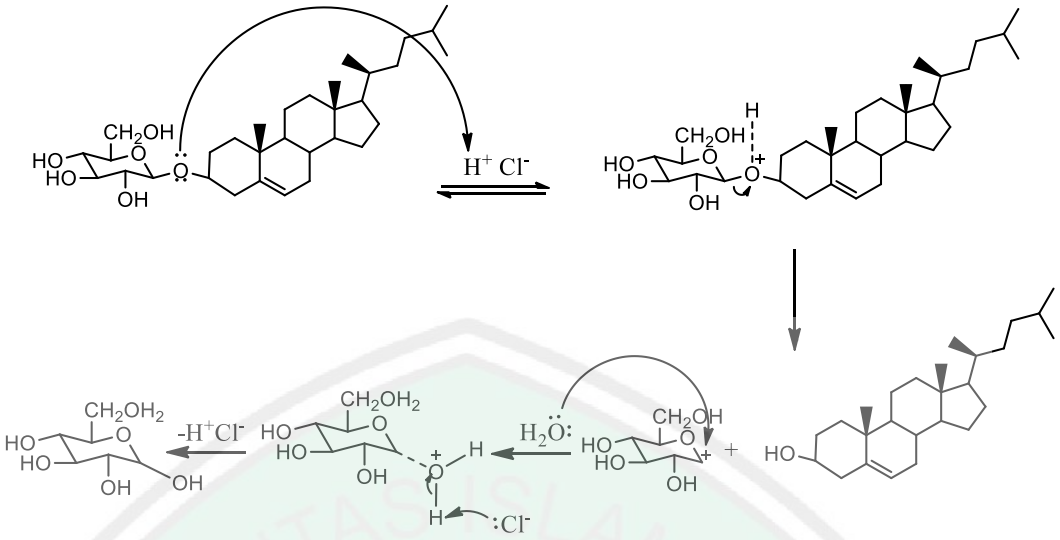
CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

untuk menghentikan reaksi hidrolisis yang bersifat *reversible* dengan jalan penetralan. Proses penambahan ini menghasilkan gelembung-gelembung busa yang menunjukkan telah terbentuknya gas CO_2 yang menandakan HCl dan $NaHCO_3$ sedang bereaksi. Berhentinya proses hidrolisis ditandai dengan tidak munculnya gelembung-gelembung busa pada hidrolisat dan hasil pengukuran pH hidrolisat menunjukkan pH 7 (netral), fenomena tersebut menunjukkan bahwa HCl telah habis bereaksi dengan $NaHCO_3$. Hasil yang diperoleh dari proses hidrolisis berupa larutan berwarna hijau kehitaman dan terbentuk gumpalan berwarna hitam seperti yang ditampilkan pada Gambar 4.1.

Gambar 4.1 Hasil hidrolisis dan netralisasi

Gumpalan-gumpalan yang tidak larut tersebut menunjukkan bahwa ikatan antara metabolit sekunder dengan gugus gula telah terputus sehingga menyebabkan perbedaan kepolaran pada senyawa yang diperoleh. Dugaan mekanisme reaksi pemutusan ikatan glikosida senyawa steroid ditampilkan pada Gambar 4.2.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



Gambar 4.2 Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis

Hidrolisat yang diperoleh masih berupa senyawa metabolit sekunder (aglikon) yang terputus dari gugus gulanya (glikon). Sehingga, dilakukan pemisahan lebih lanjut dengan cara partisi untuk memperoleh senyawa metabolit sekunder yang lebih spesifik. Partisi dilakukan dengan menggunakan variasi pelarut etil asetat (semipolar) dan petroleum eter (nonpolar). Hasil partisi kedua pelarut menghasilkan lapisan atas berupa fasa organik dan lapisan bawah berupa fasa air. Hal ini dikarenakan, berdasarkan Mulyono (2005) etil asetat dan petroleum eter memiliki berat jenis yang lebih kecil dibandingkan air (1 g/mL) yaitu etil asetat sebesar 0,902 g/mL dan petroleum eter sebesar 0,653 g/mL. Partisi dengan pelarut etil asetat menghasilkan lapisan atas berwarna hijau kehitaman, sedangkan dengan pelarut petroleum eter menghasilkan lapisan atas berwarna cokelat kehitaman seperti yang ditampilkan pada Gambar 4.3.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

(a) (b)

Gambar 4.3 Hasil partisi dengan pelarut (a) etil asetat, dan (b) petroleum eter

Fraksi etil asetat yang diperoleh setelah pemekatan juga berwarna hijau kehitaman. Begitupun, fraksi petroleum eter pekat yang dihasilkan juga berwarna cokelat kehitaman. *Yield* hasil partisi masing-masing pelarut yang diperoleh ditampilkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 *Yield* hasil partisi

Pelarut	Warna Fraksi Pekat	Berat Fraksi Pekat (g)	*Yield*
Etil Asetat	Hijau Kehitaman	2,5047	**50,09%**
Petroleum Eter	Cokelat Kehitaman	2,4275	**48,55%**

Berdasarkan Tabel 4.1 dapat diketahui bahwa nilai *yield* fraksi etil asetat lebih besar dibandingkan dengan *yield* fraksi petroleum eter, sehingga dapat diasumsikan senyawa metabolit sekunder dalam *H. verticillata* lebih terdistribusi ke pelarut etil asetat dibandingkan pelarut petroleum eter. Hal ini dimungkinkan karena metabolit sekunder yang terkandung dalam *H. verticillata* lebih banyak bersifat semipolar.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4.5 Uji Fitokimia

Uji fitokimia merupakan dugaan awal untuk mengetahui golongan senyawa aktif yang terdapat di dalam fraksi etil asetat dan petroleum eter. Hasil uji fitokimia ditampilkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil uji fitokimia masing-masing fraksi

Uji Golongan Senyawa Aktif	Fraksi	
	Etil Asetat	Petroleum Eter
Alkaloid		
-Meyer	-	-
-Dragendrof	-	-
Flavonoid	+	-
Saponin	-	-
Steroid	+	+
Triterpenoid	+	+
Tanin		
-FeCl 1%	-	-
-Gelatin	-	-

Berdasarkan hasil uji fitokimia pada Tabel 4.2 dapat diketahui bahwa kedua fraksi positif mengandung golongan steroid yang merupakan senyawa target. Amalia, dkk. (2018) juga menyatakan bahwa fraksi etil asetat dan petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak etanol *H. verticillata* positif mengandung steroid. Penelitian yang dilakukan Fasya, dkk. (2020) juga menunjukkan bahwa fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak etanol *H. verticillata* positif mengandung steroid. Selain itu, dalam fraksi etil asetat juga terdapat kandungan senyawa golongan flavonoid. Hal tersebut diduga menjadi salah satu penyebab besarnya nilai *yield* fraksi etil asetat dibandingkan petroleum eter.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4.5.1 Flavonoid

Fraksi etil asetat memberikan hasil positif flavonoid ditandai dengan adanya perubahan warna fraksi menjadi berwarna jingga setelah penambahan HCl, sedangkan fraksi petroleum eter tidak terjadi perubahan warna. Perubahan warna yang terjadi dikarenakan adanya endapan garam favilium hasil reduksi gugus OH oleh magnesium dan asam klorida. Reaksi yang terjadi antara logam Mg dan HCl pekat pada uji flavonoid adalah reduksi inti bensopiron yang terdapat pada struktur flavonoid sehingga terjadi perubahan warna menjadi merah atau jingga (Achmad, 1986). Dugaan reaksi yang terjadi pada uji flavonoid ditampilkan pada Gambar 2.6.

Berdasarkan hasil pada Tabel 4.3 dapat diketahui bahwa senyawa flavonoid tidak terlarut dalam pelarut petroleum eter yang bersifat nonpolar. Hasil ini diperkuat oleh penelitian Amalia, dkk. (2018) yang menunjukkan bahwa fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak etanol *H. verticillata* juga negatif flavonoid, sedangkan fraksi etil asetatnya positif flavonoid. Ritna, dkk. (2016) juga menyatakan bahwa uji flavonoid pada fraksi *n*-heksana *Begonia* sp yang bersifat nonpolar menunjukkan hasil yang negatif, sedangkan pada fraksi etil asetatnya positif mengandung golongan senyawa flavonoid. Hal ini dikarenakan flavonoid mengandung gugus OH berlebih dan memiliki kepolaran yang tinggi.

4.5.2 Triterpenoid dan Steroid

Hasil uji fitokimia pada Tabel 4.2 menunjukkan fraksi etil asetat dan petroleum eter positif mengandung steroid dan triterpenoid. Hasil ini diperkuat oleh penelitian Amalia, dkk. (2018) yang nunjukkan bahwa fraksi etil asetat dan petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak etanol *H. verticillata* juga positif steroid dan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

triterpenoid. Selain itu, Madjid, dkk. (2020) juga menyatakan bahwa fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol *Eucheuma cottonii* positif mengandung golongan senyawa steroid dan triterpenoid. Mahmia, dkk. (2017) juga menunjukkan bahwa fraksi etil asetat positif mengandung senyawa steroid dan triterpenoid.

Positif triterpenoid ditandai dengan terbentuknya cincin kecokelatan. Terbentuknya cincin berwarna cokelat atau ungu dikarenakan adanya reaksi oksidasi golongan senyawa triterpenoid pada sampel melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi. Reaksi yang terjadi ditampilkan pada Gambar 2.7. Sedangkan, positif steroid ditandai dengan terjadinya perubahan warna menjadi hijau. Secara garis besar tahapan reaksi LB pada steroid yang terjadi yaitu mengalami asetilasi, pembentukan i-steroid, dimerisasi, penataan ulang, sulfonasi, oksidasi/desaturasi, dan aromatisasi. Kinetika yang berbeda diantara tahapan tersebut yang menghasilkan respon warna yang berbeda. Jalur tahapan reaksi LB dengan steroid ditampilkan pada Gambar 2.8.

4.6 Pemisahan Steroid Menggunakan KLTA

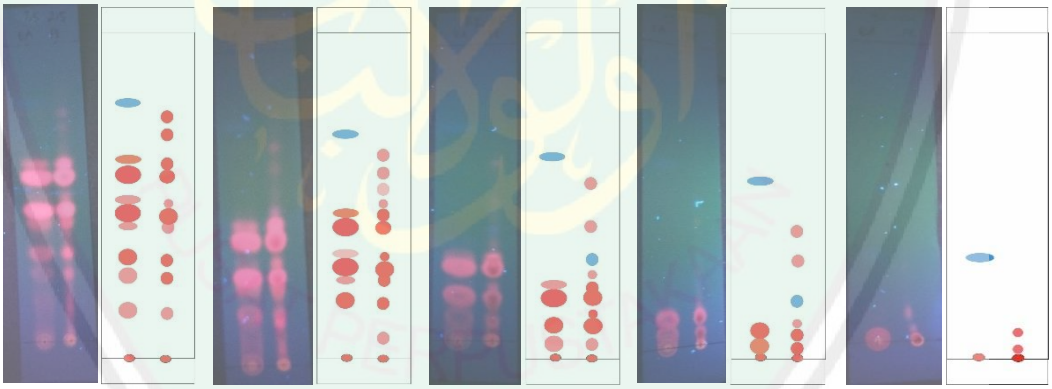
Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dan petroleum eter *H. verticillata* positif mengandung steroid. Pemisahan steroid lebih lanjut dapat dilakukan dengan KLTA. KLTA bertujuan untuk mencari eluen terbaik yang dapat memisahkan senyawa steroid dengan baik. Hasil pemisahan KLTA fraksi etil asetat dan petroleum eter *H. verticillata* dari beberapa variasi perbandingan eluen terangkum pada Tabel 4.3. Eluen terbaik dapat dilihat dari pola pemisahan noda steroid yang dihasilkan dari masing-masing perbandingan eluen. Berdasarkan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Hidayah (2016) senyawa steroid ditunjukkan dengan noda berwarna biru kehijauan. Hasil pola pemisahan KLTA saat diamati di bawah lampu UV 366 nm diilustrasikan pada Gambar 4.4.

Tabel 4.3 Hasil pemisahan KLTA fraksi etil asetat dan petroleum eter

Variasi Eluen (*n*-heksana:etil asetat)	Fraksi	Jumlah Noda pada 366 nm	Jumlah Noda Terduga Steroid
15:5	Etil asetat	9	1
	Petroleum eter	10	0
16:4	Etil asetat	7	1
	Petroleum eter	11	0
17:3	**Etil asetat**	**5**	**1**
	Petroleum eter	**9**	**1**
18:2	Etil asetat	3	1
	Petroleum eter	6	1
19:1	Etil asetat	1	1
	Petroleum eter	2	0



15:5 16:4 17:3 18:2 19:1

Gambar 4.4 Ilustrasi penampakan noda KLTA pada 366 nm, spot kiri (fraksi EA) dan spot kanan (fraksi PE)

Hasil pemisahan pada Tabel 4.3 menunjukkan bahwa fraksi petroleum eter menghasilkan jumlah noda yang lebih besar dibanding fraksi etil asetat pada setiap variasi eluennya. Hal ini dikarenakan kepolaran eluen yang digunakan mirip dengan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

kepolaran fraksi petroleum eter (nonpolar) akibat perbandingan *n*-heksana yang lebih besar. Berdasarkan Tabel 4.3 dan Gambar 4.4 diketahui bahwa tidak semua fraksi menghasilkan noda terduga steroid pada setiap variasi perbandingan eluennya. Perbandingan eluen *n*-heksana:etil asetat (17:3) menghasilkan pola pemisahan yang tepat dibanding yang lainnya, dikarenakan noda terduga steroid terlihat jelas pada kedua fraksi dan jarak antar noda terlihat jelas tidak berekor. Berdasarkan hasil tersebut eluen dengan perbandingan 17:3 merupakan eluen terbaik yang akan digunakan untuk analisis lebih lanjut menggunakan KLTP.

Tabel 4.3 juga menunjukkan bahwa dari kelima variasi perbandingan eluen yang digunakan, pada perbandingan 19:1 menghasilkan jumlah noda paling sedikit untuk kedua fraksi, perbandingan 16:4 menghasilkan jumlah noda tertinggi untuk fraksi petroleum eter, sedangkan untuk fraksi etil asetat jumlah noda tertinggi dihasilkan oleh perbandingan eluen 15:5. Hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa aktif yang terkandung pada fraksi petroleum eter lebih banyak memiliki kepolaran yang sesuai dengan eluen *n*-heksana:etil asetat 16:4, sedangkan senyawa aktif pada fraksi etil asetat lebih banyak memiliki kepolaran yang sesuai dengan eluen *n*-heksana:etil asetat 15:5.

Eluen dengan perbandingan 17:3 memberikan hasil pemisahan senyawa steroid terbaik. Hasil tersebut didukung oleh Baderos (2017) yang menunjukkan eluen *n*-heksana:etil asetat 17:3 merupakan eluen terbaik untuk pemisahan senyawa fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol *Eucheuma cottonii*. Mardaneni (2017) juga menghasilkan eluen *n*-heksana:etil asetat 17:3 sebagai eluen terbaik pada pemisahan senyawa fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak metanol *Eucheuma cottonii*. Namun, hasil tersebut berbeda dengan penelitian

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

terdahulu oleh Amalia, dkk. (2018) yang melakukan pemisahan senyawa aktif fraksi etil asetat dan petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak etanol *H. verticillata* menggunakan KLT dan eluen terbaik yang diperoleh berupa *n*-heksan:etil asetat dengan perbandingan 16:4. Perbedaan tersebut dimungkinkan karena pelarut yang digunakan saat maserasi berbeda, sehingga senyawa yang terekstrak juga memiliki kepolaran yang berbeda, hasil pemisahan senyawa aktifnya juga berbeda.

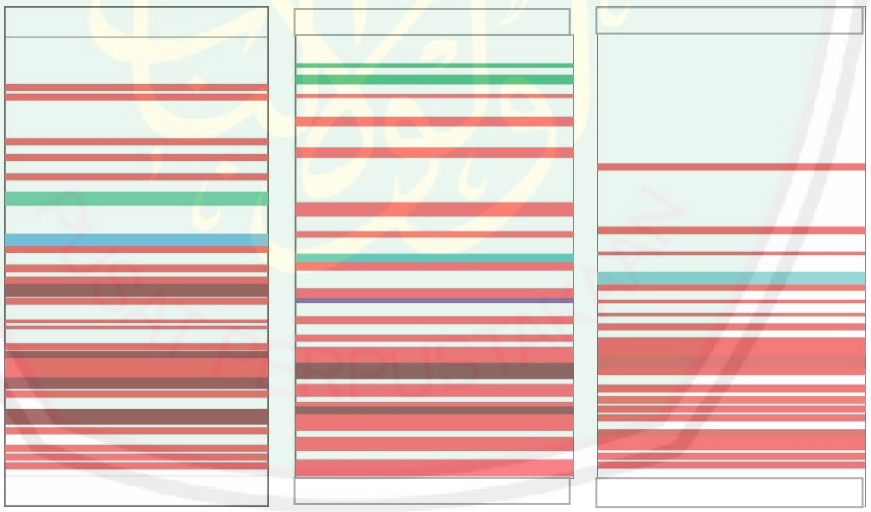
4.7 Pemisahan Steroid Menggunakan KLTP

Senyawa steroid dapat dipisahkan lebih lanjut dengan menggunakan KLTP. Pemisahan menggunakan KLTP bertujuan untuk mendapatkan isolat steroid dalam jumlah besar yang akan digunakan dalam uji toksisitas dan identifikasi senyawa steroid menggunakan spektrofotometer FTIR. Pemisahan KLTP fraksi petroleum eter (PE) menggunakan fase gerak berupa campuran pelarut *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17:3 yang merupakan eluen terbaik hasil pemisahan KLTA. Selain itu, pada pemisahan KLTP ini digunakan pula eluen *n*-heksana:etil asetat (16:4) yang merupakan eluen terbaik hasil penelitian terdahulu oleh Amalia, dkk. (2018) sebagai pembanding. Hasil pemisahan senyawa steroid fraksi petroleum eter mengunakan eluen *n*-heksana:etil asetat (16:4) dan (17:3) saat diamati di bawah lampu UV 366 nm diilustrasikan pada Gambar 4.5 dan Tabel 4.4.

Berdasarkan Gambar 4.5 (a) dan Tabel 4.4 dapat diketahui bahwa hasil pemisahan fraksi petroleum eter dengan eluen *n*-heksana:etil asetat (16:4) dihasilkan 24 spot dan 2 spot diantaranya diduga steroid yaitu spot 18 berwarna biru kehijauan dan spot 19 berwarna hijau. Berbeda dengan Amalia, dkk. (2018) yang telah melakukan pemisahan KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter hasil

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

hidrolisis ekstrak etanol *H. verticillata* dengan menggunakan eluen terbaik *n*-heksana-etil asetat (16:4), hasil yang diperoleh berupa 17 spot pada fraksi petroleum eter dan 4 spot diantaranya diduga steroid. Jumlah spot terduga steroid yang dihasilkan keduanya berbeda. Hasil ini menunjukkan bahwa senyawa steroid pada fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak etanol memiliki kepolaran yang sesuai dengan eluen *n*-heksana:etil asetat 16:4 dibandingkan pada fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol. Hal ini dikarenakan adanya perbedaan pelarut yang digunakan pada saat ekstraksi, sehingga senyawa yang terkandung dan hasil pemisahannya juga berbeda. Pernyataan tersebut dibuktikan juga dengan hasil pemisahan fraksi petroleum eter menggunakan eluen dengan perbandingan 17:3 yang diilustrasikan pada Gambar 4.5 (b).



(a) (b) (c)

Gambar 4.5 Hasil KLTP (a) fraksi petroleum eter dengan eluen 16:4, (b) fraksi petroleum eter dengan eluen 17:3, (c) fraksi etil asetat eluen 17:3

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Tabel 4.4 Hasil KLTP fraksi petroleum eter eluen *n*-Heksana:EA (16:4) dan (17:3)

No	Fraksi PE eluen *n*-Heksana:EA (16:4)			No	Fraksi PE eluen *n*-Heksana:EA (17:3)		
	R_f	Warna noda 366 nm	Dugaan Senyawa		R_f	Warna noda 366 nm	Dugaan Senyawa
1	0,02	Merah	Triterpenoid	1	0,031	Merah	Triterpenoid
2	0,042	Merah	Triterpenoid	2	0,089	Merah	Triterpenoid
3	0,061	Merah	Triterpenoid	3	0,133	Merah	Triterpenoid
4	0,119	Merah	Triterpenoid	4	0,153	Merah	Triterpenoid
5	0,164	Merah	Triterpenoid	5	0,167	Merah	Triterpenoid
6	0,214	Merah	Triterpenoid	6	0,194	Merah	Triterpenoid
7	0,233	Merah	Triterpenoid	7	0,272	Merah	Triterpenoid
8	0,267	Merah	Triterpenoid	8	0,284	Merah	Triterpenoid
9	0,297	Merah	Triterpenoid	9	0,314	Merah	Triterpenoid
10	0,317	Merah	Triterpenoid	10	0,350	Merah	Triterpenoid
11	0,369	Merah	Triterpenoid	**11**	**0,403**	**Biru keunguan**	**Steroid**
12	0,383	Merah	Triterpenoid	12	0,422	Merah	Triterpenoid
13	0,422	Merah	Triterpenoid	13	0,483	Merah	Triterpenoid
14	0,447	Merah	Triterpenoid	**14**	**0,494**	**Biru kehijauan**	**Steroid**
15	0,481	Merah	Triterpenoid	15	0,561	Merah	Triterpenoid
16	0,525	Merah	Triterpenoid	16	0,627	Merah	Triterpenoid
17	0,578	Merah	Triterpenoid	17	0,755	Merah	Triterpenoid
18	**0,6**	**Biru kehijauan**	**Steroid**	18	0,810	Merah	Triteroenoid
19	**0,703**	**Hijau**	**Steroid**	19	0,875	Merah	Triteroenoid
20	0,758	Merah	Triterpenoid	**20**	**0,894**	**Hijau**	**Steroid**
21	0,792	Merah	Triterpenoid	**21**	**0,938**	**Hijau**	**Steroid**
22	0,836	Merah	Triterpenoid				
23	0,906	Merah	Triterpenoid				
24	0,931	Merah	Triterpenoid				

Hasil pemisahan fraksi petroleum eter dengan eluen *n*-heksana:etil asetat (17:3) berdasarkan Gambar 4.5 (b) dan Tabel 4.4 menghasilkan 21 spot dan 4 spot diantaranya diduga steroid. Empat spot diduga steroid yaitu spot 11 berwarna biru keunguan, spot 14 berwarna biru kehijauan, spot 20 berwarna hijau, dan spot 21 berwarna hijau. Berdasarkan hasil tersebut, jika dibandingkan dengan hasil pemisahan menggunakan eluen *n*-heksana-etil asetat (16:4) pada Gambar 4.5 (a),

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

maka dapat diketahui bahwa pemisahan senyawa steroid mengunakan eluen *n*-heksana-etil asetat (17:3) menghasilkan pemisahan yang lebih baik. Hal ini dikarenakan spot terduga steroid yang diperoleh mengunakan eluen *n*-heksana-etil asetat (17:3) jumlahnya lebih besar dibanding mengunakan eluen *n*-heksana-etil asetat (16:4). Selain itu, hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa steroid pada fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol memiliki kepolaran yang sesuai dengan eluen *n*-heksana:etil asetat (17:3) dibandingkan dengan eluen *n*-heksana:etil asetat (16:4).

Tabel 4.5. Hasil KLTP fraksi etil asetat (EA)

No.	Fraksi EA eluen *n*-Heksana:EA (17:3)		
	R_f	Warna noda 366 nm	Dugaan Senyawa
1	0,037	Merah	Triterpenoid
2	0,052	Merah	Triterpenoid
3	0,075	Merah	Triterpenoid
4	0,083	Merah	Triterpenoid
5	0,124	Merah	Triterpenoid
6	0,147	Merah	Triterpenoid
7	0,179	Merah	Triterpenoid
8	0,189	Merah	Triterpenoid
9	0,233	Merah	Triterpenoid
10	0,248	Merah	Triterpenoid
11	0,264	Merah	Triterpenoid
12	0,312	Merah	Triterpenoid
13	0,351	Merah	Triterpenoid
14	0,411	Merah	Triterpenoid
15	0,428	Merah	Triterpenoid
16	**0,450**	**Biru kehijauan**	**Steroid**
17	0,505	Merah	Triterpenoid
18	0,556	Merah	Triteroenoid
19	0,674	Merah	Triteroenoid

Hasil pemisahan senyawa steroid dari fraksi etil asetat menggunakan eluen *n*-heksana:etil asetat (17:3) ditampilkan pada Gambar 4.5 (c). Berdasarkan Gambar

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4.5 (c) dapat diketahui bahwa, pada hasil pemisahan fraksi etil asetat terbentuk 19 spot dan 1 diantaranya terduga steroid. Spot terduga steroid ditunjukkan pada spot nomor 16 dengan warna biru kehijauan. Hasil pemisahan KLTP senyawa steroid dari fraksi etil asetat terangkum pada Tabel 4.5.

Berdasarkan Tabel 4.4 dan 4.5 dapat diketahui bahwa kedua fraksi menghasilkan sebagian besar spot berwarna merah dengan rentang R_f 0,03-0,8, spot tersebut diduga merupakan golongan triterpenoid (Rugayah, dkk., 2017). Hasil tersebut menunjukkan bahwa eluen yang digunakan juga cocok untuk memisahkan golongan triterpenoid. Berdasarkan eluen yang digunakan, triterpenoid yang terpisah bersifat lebih nonpolar. Jumlah spot berwarna merah menunjukkan bahwa golongan triterpenoid memiliki bermacam jenis senyawa dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Pernyataan tersebut sesuai dengan Harbone (1987) menyatakan bahwa triterpenoid memiliki empat golongan senyawa yaitu triterpena sebenarnya, steroid, saponin/sapogenin, dan glikosida jantung dan setiap golongan masih terdapat berbagai jenis senyawa di dalamnya.

4.8 Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

4.8.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina* Leach

Penetasan larva udang dilakukan dengan memasukkan telur *A. Salina* L. ke dalam air laut yang diaerasi di bawah lampu pijar selama 48 jam. Aerasi bertujuan untuk memberikan asupan oksigen yang cukup bagi kelangsungan hidup *A. Salina* L. Penggunaan lampu pijar berfungsi sebagai penghangat suhu dan penerangan selama penetasan. larva yang digunakan untuk uji toksisitas adalah saat larva udang dalam bentuk nauplii aktif yaitu yang berumur 48 jam. Pada fase ini organ-organ *A. Salina* L. yang terbentuk sudah lengkap, salah satunya mulut sehingga dapat

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

meminum air laut yang berisi sampel uji. Selain itu, Vanhaecke, dkk. (1981) juga menunjukkan bahwa usia yang paling sensitif untuk sebagian besar senyawa diuji adalah nauplii usia 48 jam.

4.8.2 Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan metode BSLT, uji ini bertujuan untuk mengetahui efek toksik dari senyawa steroid terhadap sistem biologi, dimana hasil yang diperoleh nantinya akan digunakan sebagai gambaran dalam uji bioaktivitas lainnya. Pada penelitian ini, sampel yang diuji adalah fraksi etil asetat, fraksi petroleum eter, isolat steroid EA (spot 16), isolat steroid PE_1 (spot 11), isolat steroid PE_2 (spot 14), isolat steroid PE_3 (spot 20), isolat steroid PE_4 (spot 21). Kontrol yang digunakan yaitu kontrol tanpa isolat, kontrol tanpa isolat berisi seluruh komponen yang ada dalam satu vial kecuali isolatnya. Kontrol ini bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh kematian larva dari selain isolat. Untuk memperkuat hasil kontrol tanpa isolat dibuat juga kontrol pelarut, dan kontrol DMSO untuk mengetahui adakah pengaruh kematian larva oleh pelarut ataupun DMSO. Adanya kontrol DMSO dikarenakan terdapat penambahan DMSO pada sampel uji. Penambahan DMSO bertujuan untuk melarutkan komponen-komponen nonpolar pada isolat dan fraksi ke dalam air laut yang bersifar polar. Hal ini dikarenakan DMSO bertindak sebagai surfaktan yang memiliki ujung hidrofilik dari gugus S=O dan hidrofobik dari gugus $–CH_3$ yang dapat mengikat keduanya. Masing-masing konsentrasi dimasukkan 10 larva uji dan dilakukan sebanyak 5 kali ulangan. Nilai yang sering muncul (modus) dinyatakan sebagai banyaknya larva yang mati.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Hasil uji toksisitas fraksi etil asetat (EA) dan isolat steroid EA ditampilkan pada Tabel 4.6, dan hasil uji toksisitas fraksi petroleum eter (PE), isolat steroid PE_1, isolat steroid PE_2, isolat steroid PE_3, isolat steroid PE_4 ditampilkan pada Tabel 4.7.

Tabel 4.6 Hasil uji toksisitas fraksi EA dan isolat steroid EA

Konsentrasi (ppm)	Fraksi EA		Isolat EA	
	Modus (ekor)	% Mortalitas	Modus (ekor)	% Mortalitas
0*	0	0	0	0
0**	0	0	0	0
0	0	0	0	0
1	1	1	10	10
2	1	2	10	20
3	1	2	10	20
4	1	2	10	20
5	2	2	20	20

Keterangan: 0 = Kontrol tanpa isolat
0* = Kontrol Pelarut
0** = Kontrol DMSO

Tabel 4.7 Hasil uji toksisitas fraksi PE, isolat steroid PE_1, isolat steroid PE_2, isolat steroid PE_3, isolat steroid PE_4

Konsentrasi (ppm)	Fraksi PE		Isolat PE_1		Isolat PE_2		Isolat PE_3		Isolat PE_4	
	Modus	%M	Modus	%M	Modus	%M	Modus	%M	Modus	%M
0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	1	10	0	0	0	0
2	0	0	1	10	1	10	1	10	1	10
3	0	0	1	10	1	10	2	20	2	20
4	1	10	1	10	2	20	2	20	2	20
5	1	10	2	20	3	30	2	20	3	30

Keterangan: 0 = Kontrol tanpa isolat
0* = Kontrol Pelarut
0** = Kontrol DMSO

Hasil uji toksisitas pada Tabel 4.6 dan 4.7 menunjukkan bahwa pengujian ketiga kontrol pada setiap sampel tidak menyebabkan kematian pada larva udang yang artinya semua kontrol tidak memiliki pengaruh terhadap kematian larva udang.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Tingkat toksisitas diketahui dari nilai LC_{50} yang merupakan konsentrasi suatu zat yang menyebabkan kematian larva udang sebesar 50% setelah terpapar zat tersebut dalam waktu tertentu (Cahyono, 2004). Berdasarkan hasil di atas diperoleh nilai LC_{50} dari semua sampel uji yang dirangkum pada Tabel 4.8.

Tabel 4.8 Nilai LC_{50} sampel uji

Sampel Uji	Nilai LC_{50} (ppm)	Kategori
Fraksi etil asetat (EA)	15,0155	Sangat toksik
Isolat steroid EA	14,7943	Sangat toksik
Fraksi petroleum eter (PE)	7,06102	Sangat toksik
Isolat steroid PE_1	8,42353	Sangat toksik
Isolat steroid PE_2	7,95194	Sangat toksik
Isolat steroid PE_3	7,55361	Sangat toksik
Isolat steroid PE_4	**6,34832**	**Sangat toksik**

Nilai LC_{50} yang diperoleh pada Tabel 4.8 menunjukan bahwa urutan tingkat toksisitas dari yang tertinggi berturut-turut yaitu isolat PE_4 > fraksi PE > isolat PE_3 > isolat PE_2 > isolat PE_1 > isolat EA > fraksi EA. Berdasarkan hasil di atas juga diketahui bahwa baik isolat maupun fraksi petroleum eter memiliki tingkat toksisitas yang lebih tinggi dibandingkan isolat dan fraksi etil asetat. Selain itu, pada Tabel 4.8 juga diketahui bahwa isolat PE memiliki urutan toksisitas dari yang tertinggi yaitu isolat PE_4 > isolat PE_3 > isolat PE_2 > isolat PE_1. Urutan tersebut menunjukkan bahwa semakin besar nilai R_f (nonpolar) isolat PE toksisitas semakin tinggi. Namun, hal tersebut tidak dapat disimpulkan bahwa kepolaran suatu senyawa mempengaruhi toksisitas, dikarenakan belum ada literatur yang membuktikan hal tersebut.

Tabel 4.8 juga menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dan petroleum eter memiliki nilai LC_{50} yang lebih rendah dibandingkan dengan nilai LC_{50} ekstrak

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

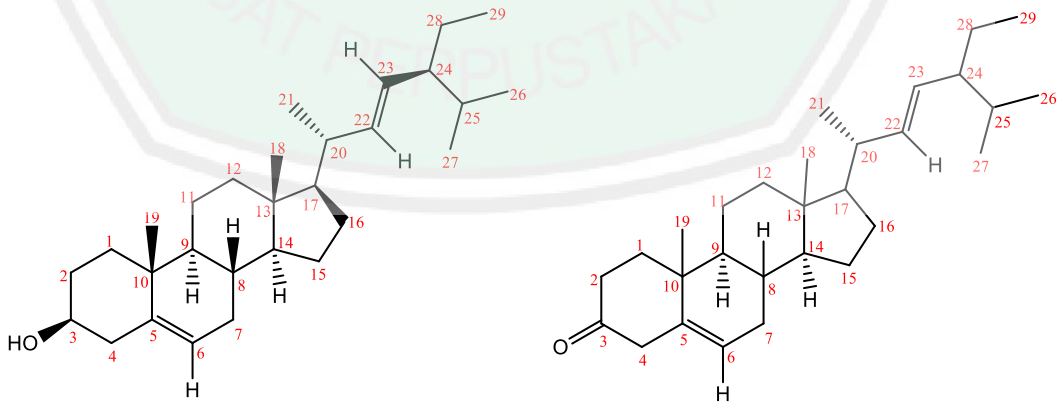
metanol (633,171 ppm) yang telah dilakukan oleh Hafiz (2017), hal ini mengartikan bahwa hasil hidrolisis dan partisi kedua pelarut cenderung lebih toksik dibandingkan hasil ekstrak kasar metanol. Perbedaan nilai LC_{50} pada setiap sampel uji dikarenakan adanya kandungan metabolit sekunder yang berbeda di dalamnya. Perlu diketahui bahwa penggabungan senyawa akan bereaksi terhadap biota dengan respon sinergis, antagonis, atau netral (Trianto, dkk., 2004). Lemahnya toksisitas pada ekstrak kasar metanol disebabkan karena pada ekstrak metanol masih mengandung senyawa campuran, dan dimungkinkan terdapat senyawa yang memberi efek antagonis terhadap sifat toksik senyawa lainnya, sehingga dapat menurunkan tingkat toksisitas ekstrak metanol. Begitupun pada fraksi etil asetat, efek antagonis senyawa yang terkandung didalam fraksi etil asetat kemungkinan lebih besar dibandingkan fraksi petroleum eter, sehingga menurunkan toksisitasnya. Pada Tabel 4.8 juga menunjukkan bahwa isolat EA memiliki toksisitas yang lebih tinggi dibanding fraksi EA nya, namun tidak semua isolat PE memiliki nilai LC_{50} yang lebih rendah dari fraksi PE nya. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung dalam fraksi PE memiliki efek sinergis yang lebih besar dibandingkan sifat toksik senyawa steroid pada isolat PE. Sedangkan, pada fraksi EA efek antagonis dari senyawa yang dikandungnya lebih besar dibandingkan sifat toksik senyawa steroid yang terdapat pada isolat EA.

Hasil uji toksisitas pada Tabel 4.8 menunjukkan bahwa semua sampel uji memiliki tingkat toksisitas yang sangat tinggi, hal ini dikarenakan adanya metabolit sekunder yang terkandung didalamnya. Metabolit sekunder memiliki gugus-gugus yang dapat memecah ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, dan ikatan garam pada protein integral di membran sel larva, sehingga menyebabkan denaturasi protein.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Gugus tersebut dapat berupa karbonil, hidroksil, karboksil, sulfhidril, dan amino. Denaturasi protein dapat menyebabkan hilangnya aktivitas pada senyawa protein (Triyono, 2010). Oleh karena itu, denaturasi yang terjadi pada protein integral di membran sel larva menyebabkan transpor aktif ion Na^+/K^+ terganggu sehingga proses pemasukan ion Na^+ dan pengeluaran ion K^+ menjadi tidak terkendali, hal ini menyebabkan pembengkakan sel dan akhirnya pecah. Pecahnya sel inilah yang dapat menyebabkan larva udang mati (Nurhayati, dkk., 2006).

Perbedaan tingkat toksisitas pada setiap sampel dapat dipengaruhi oleh struktur senyawa yang dikandungnya. Usman, dkk. (2020) melakukan uji toksisitas pada isolat steroid fraksi *n*-heksana dan kloroform dari batang kulit kayu *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf var. degrabrata K. menghasilkan nilai LC_{50} berturut-turut sebesar 584,48 dan 410,81 µg/mL. Dan setelah diidentifikasi diperoleh isolat seteroid fraksi *n*-heksana berupa stigmasta-5,22-dien-3-*β*-ol dan isolat steroid fraksi kloroform berupa stigmasta-5,22-dien-3-on. Struktur kedua steroid ditampilkan pada Gambar 4.6.



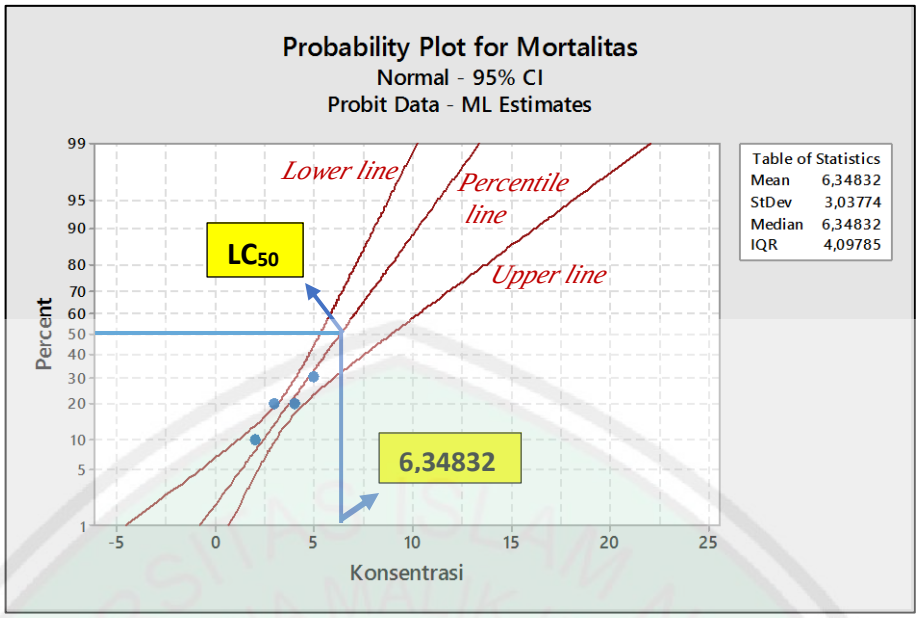
A B

Gambar 4.6 Struktur steroid A) stigmasta-5,22-dien-3-*β*-ol dan B) stigmasta-5,22-dien-3-on

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Berdasarkan Gambar 4.6 dapat dilihat bahwa stigmasta-5,22-dien-3-*β*-ol dan stigmasta-5,22-dien-3-on memiliki struktur yang hampir sama, namun nilai LC_{50} yang diperoleh cukup berbeda. Perbedaan kedua senyawa tersebut terletak pada subtituen yang terikat pada atom C_3, senyawa stigmasta-5,22-dien-3-*β*-ol terikat gugus hidroksil sedangkan pada stigmasta-5,22-dien-3-on terikat gugus karbonil. Kedua gugus tersebut akan membentuk ikatan hidrogen dengan protein pada membran sel larva dan menyebabkan terjadinya denaturasi protein, yang berakhir pada kematian larva. Keduanya dapat berikatan hidrogen dengan protein, namun aktivitasnya berbeda. Perbedaan aktivitas tersebut diduga disebabkan adanya perbedaan afinitas pengikatan proteinnya. Berdasarkan Nugraha (2018) yang melakukan *docking* pada protein dan beberapa senyawa uji untuk mengetahui interaksi yang terjadi. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ikatan hidrogen antara atom O pada gugus karbonil dan asam amino memiliki persentase pengikatan yang lebih besar dibanding ikatan hidrogen antara atom H/O gugus hidroksil dengan asam amino. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan ikatan hidrogen yang terjadi maka afinitas terhadap reseptor juga berbeda. Selain itu, jika diperhatikan lagi pada Gambar 4.6 kemungkinan kedua senyawa tersebut memiliki perbedaan pada isomer cis dan trans ikatan rangkap C_5=C_6, isomer konformasi dan adanya kiralitas sehingga memberikan toksisitas yang berbeda. Hal ini sesuai dengan Smith (2009) yang menyatakan bahwa senyawa yang identik dalam berbagai rumus molekul, keterkaitan atom ke-atom, dan jarak ikatan, tetapi berbeda dalam pengaturan tiga dimensinya (stereoisomer) seperti kiralitas juga dapat memberikan efek toksikologi yang berbeda.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



Gambar 4.7 Kurva hasil uji toksisitas isolat PE_4

Nilai LC_{50} yang diperoleh pada Tabel 4.8 menunjukan bahwa dari semua sampel uji, isolat PE_4 memiliki nilai LC_{50} terkecil, yang artinya senyawa steroid pada isolat PE_4 memiliki toksisitas tertinggi. Kurva nilai LC_{50} isolat PE_4 menggunakan program MINITAB 17 ditampilkan pada Gambar 4.7. Kurva tersebut menunjukkan hubungan antara konsentrasi (sumbu *x*) dan persen mortalitas (sumbu *y*). Pada kurva tersebut terdapat tiga garis yaitu *lower line*, *percentile line* dan *upper line*. *Lower line* merupakan batas bawah yang menunjukkan konsentrasi terendah pada setiap persen mortalitas. *Percentile line* merupakan garis yang menunjukkan konsentrasi pada setiap persen mortalitas dan juga garis yang menunjukkan adanya hubungan linear antara konsentrasi dengan persen mortalitas. *Upper line* merupakan batas atas yang menunjukkan konsentrasi tertinggi pada setiap persen mortalitas (Ulfa, 2014). Nilai LC_{50} dapat dilihat dengan menarik garis tegak lurus dengan sumbu *y* pada titik 50% mortalitas menuju *percentile line* sehingga diperoleh titik temu yang saat ditarik tegak lurus dengan sumbu *x* akan diperoleh

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

nilai konsentrasi seperti pada Gambar 4.7. Berdasarkan gambar tersebut diperoleh nilai 50% mortalitas (LC_{50}) isolat PE_4 sebesar 6,34832 ppm.

Hasil yang diperoleh pada penelitian ini mununjukkan potensi toksisitas yang lebih baik dibanding penelitian yang lain, dilihat dari nilai LC_{50} yang lebih kecil. Rohmawati dan Sutoyo, (2018) melakukan uji toksisitas pada isolat steroid dari ekstrak dikorometana batang kulit kayu *Pometia pinnata* dan diperoleh nilai LC_{50} sebesar 41,334 µg/mL. Selain itu, Usman, dkk. (2020) juga melakukan uji toksisitas pada isolat steroid fraksi *n*-heksana dan kloroform dari batang kulit kayu *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf var. degrabrata K. menghasilkan nilai LC_{50} berturut-turut sebesar 584,48 dan 410,81 µg/mL.

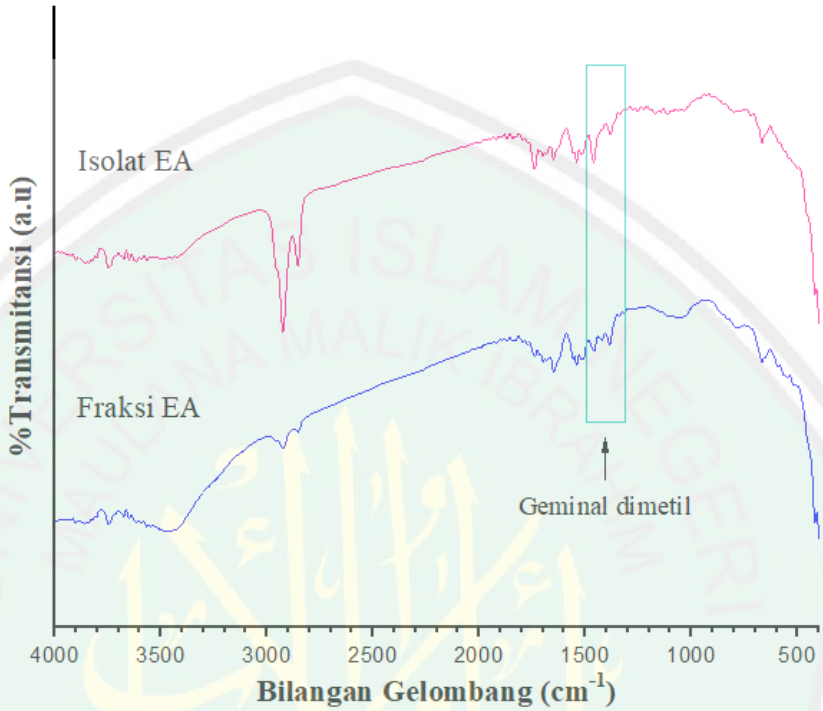
Berdasarkan literatur menurut McLaughlin (1991) maka semua sampel uji berpotensi sebagai antitumor dan antikanker dikarenakan memiliki nilai LC_{50} di bawah 30 ppm. Namun, hasil uji toksisitas metode BSLT tersebut tidak dapat secara langsung menyatakan bahwa sampel uji tersebut dapat membunuh sel kanker, dikarenakan uji tersebut merupakan skrining awal dalam pencarian antikanker, sehingga masih perlu dilakukan uji antikanker lebih lanjut. Tingkat toksisitas yang tinggi pada hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai gambaran untuk dilakukannya penelitian lebih lanjut dan dikembangkan menjadi obat antikanker.

4.9 Identifikasi Isolat Steroid Menggunakan Spektrofotometer FTIR

Isolat terduga steroid hasil KLTP diperkuat dugaanya dengan melakukan identifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi dari isolat steroid berdasarkan serapan yang dihasilkan. Identifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR juga dilakukan terhadap fraksi

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

etil asetat dan petroleum eter sebagai pembanding. Spektra hasil identifikasi FTIR dari isolat EA dan fraksi EA ditampilkan pada Gambar 4.8.



Gambar 4.8 Spektra hasil FTIR isolat EA dan fraksi EA

Berdasarkan Gambar 4.8 dapat diketahui bahwa spekra isolat EA yang diperoleh identik dengan senyawa steroid yang ditandai dengan munculnya serapan gugus khas senyawa steroid yaitu geminal dimetil ($CH(CH_3)_2$) pada 1382 cm^{-1}. Pada fraksi EA juga muncul serapan gugus geminal dimetil pada 1385 cm^{-1}. Hal ini sesuai dengan Pierre dan Moses (2015) yang mengisolasi campuran senyawa steroid stigmasterol dan *β*-sitosterol dari *Odontonema Strictum* (Acanthaceae), hasil identifikasi dengan FTIR menunjukkan adanya serapan gugus geminal dimetil pada 1382 cm^{-1}. Rosandy, dkk. (2017) juga berhasil mengisolasi senyawa steroid stigmasta-4, 22-dien-3-on dari daun pakis *Adiantum latifolium* Lam, dan hasil

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

identifikasi FTIR menunjukan adanya serapan gugus geminal dimetil pada 1376 cm^{-1}. Interpretasi spektra hasil FTIR dari isolat EA dan fraksi EA ditampilkan pada Tabel 4.9.

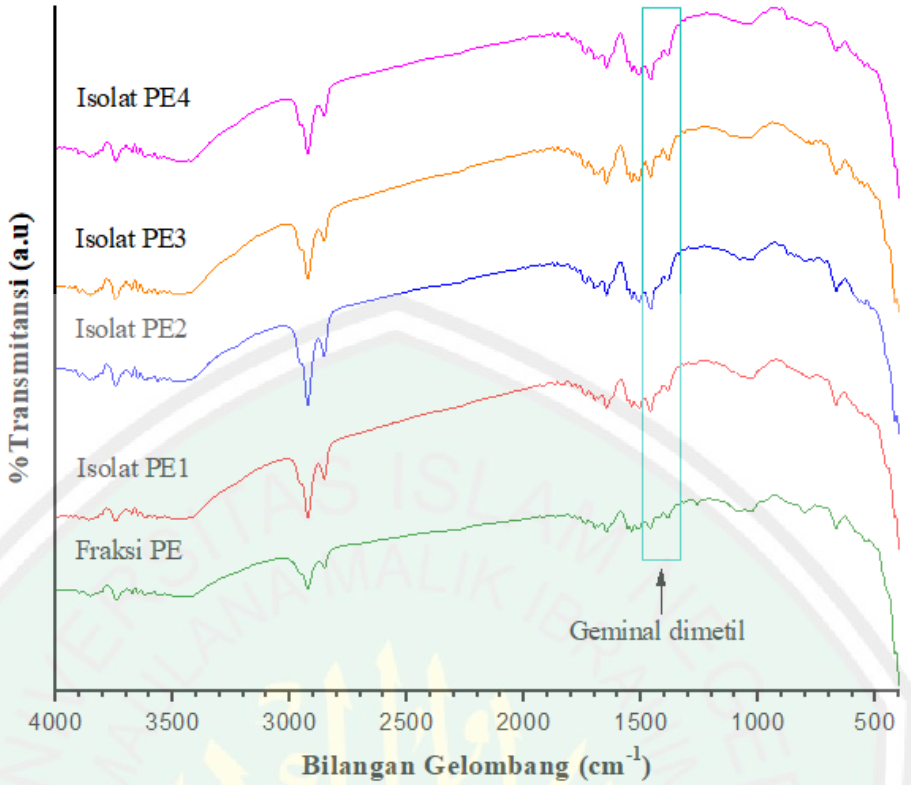
Tabel 4.9 Interpretasi hasil spektra FTIR isolat EA dan fraksi EA

Bilangan Gelombang (cm^{-1})		Range Pustaka	Jenis Vibrasi
Fraksi EA	Isolat EA		
3481	3425	3550-3200[a]	O-H *stretching* (alkohol)
2928	2924	3000-2840[a]	C-H *stretching* (alkana)
2856	2853	2962-2853[a]	C-H *stretching* (alkil)
1739	1739	1750-1735[a]	C=O *stretching* (ester)
1649	1650	1667-1640[a]	C=C *stretching* nonkonjugasi
1458	1460	1480-1440[b]	C-H pada CH_2 *bending*
1385	1382	1395-1365[b]	C-H pada CH_3 *bending*
1054	1113	1124-1000[a]	C-O *stretching* (alkohol 2º)
		1300-1000[a]	C-O *stretching* (ester)
779	797	1000-650[a]	C-H *out-of-plane bending* (alkena)
668	668		

Ket: a = (Shriner dkk., 2004); b = (Socrates, 1994)

Hasil identifikasi menggunakan FTIR pada Gambar 4.8 dan Tabel 4.9 menunjukkan bahwa fraksi EA dan isolat EA menghasilkan serapan yang tidak jauh berbeda serta mengandung gugus yang sama yaitu O-H, C-OH sekunder, $CH(CH_3)_2$, C=O ester, C-O-C, dan C=C nonkonjugasi. Perbedaan fraksi EA dan isolat EA terletak pada nilai %T dari pita serapan yang terbentuk. Serapan C-H *stretching*, C=O *stretching*, C-H pada CH_2 *bending* pada isolat EA menghasilkan nilai %T yang lebih kecil dari fraksi EA. Sedangkan pada fraksi EA, serapan O-H *stretching* menghasilkan nilai %T yang lebih kecil dari isolat EA. Nilai %T kecil menunjukkan konsentrasi gugus tersebut tinggi. Spektra hasil identifikasi FTIR dari isolat PE dan fraksi PE ditampilkan pada Gambar 4.9.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



Gambar 4.9 Spektra hasil FTIR isolat PE dan fraksi PE

Berdasarkan Gambar 4.9 dapat diketahui bahwa gugus khas senyawa steroid (geminal dimetil) juga muncul pada spekra isolat PE1, PE2, PE3, dan PE4 yang menunjukkan bahwa keempat isolat PE yang diperoleh identik dengan senyawa steroid. Serapan gugus geminal dimetil pada isolat PE1 muncul pada 1387 cm^{-1}. Pada isolat PE2 muncul pada 1389 cm^{-1}. Pada isolat PE3 muncul pada 1385 cm^{-1}. Dan pada isolat PE4 muncul pada 1389 cm^{-1}. Selain itu, pada fraksi PE juga muncul serapan gugus geminal dimetil pada 1385 cm^{-1}. Hal ini sesuai dengan Ahmed, dkk. (2013) yang melakukan isolasi senyawa steroid *β*-sitosterol dan stigmasterol dari ekstrak *n*-heksana daun *Saurauia roxbughii*, dan hasil identifikasi IR menunjukkan adanya serapan gugus geminal dimetil yang sama pada 1375,25 cm^{-1}. Jain dan Bari (2010) juga mengisolasi senyawa stigmasterol dari ekstrak petroleum eter batang

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Wrightia tinctoria, hasil identifikasi dengan IR menunjukkan adanya serapan gugus geminal dimetil pada 1388 cm^{-1}. Interpretasi spektra hasil FTIR dari isolat PE dan fraksi PE ditampilkan pada Tabel 4.10.

Tabel 4.10 Interpretasi hasil spektra FTIR isolat PE dan fraksi PE

Bilangan Gelombang (cm^{-1})					Range Pustaka	Jenis Vibrasi
Fraksi PE	Isolat PE_1	Isolat PE_2	Isolat PE_3	Isolat PE_4		
3423	3452	3481	3427	3465	3550-3200[a]	O-H *stretching* (alkohol)
2923	2923	2924	2924	2924	3000-2840[a]	C-H *stretching* (alkana)
2855	2854	2854	2854	2854	2962-2853[a]	C-H *stretching* (alkil)
1740	1739	1740	1739	1739	1750-1735[a]	C=O *stretching* (ester)
1649	1649	1649	1649	1649	1667-1640[a]	C=C *stretching* nonkonjugasi
1459	1459	1459	1458	1459	1480-1440[b]	C-H pada CH_2 *bending*
1388	1387	1389	1385	1389	1395-1365[b]	C-H pada CH_3 *bending*
1261	-	-	-	-	1300-1000[a]	C-O *stretching* (ester)
1083 dan 1033	1031	1076 dan 1028	1051	1057	1124-1000[a]	C-O *stretching* (alkohol 2º)
					1300-1000[a]	C-O *stretching* (ester)
801	780	800	771	779	1000-650[a]	C-H *out-of-plane bending* (alkena)
668	668	668	668	669		

Ket: a = (Shriner dkk., 2004); b = (Socrates, 1994)

Interpretasi hasil spektra FTIR pada Tabel 4.10 menunjukkan bahwa fraksi PE dan keempat isolat seroid sama-sama menghasilkan gugus yang sama yaitu O-H, C-OH sekunder, $CH(CH_3)_2$, C=O ester, C-O-C, dan C=C nonkonjugasi. Perbedaan fraksi PE dan isolat PE terletak pada nilai %T dari pita serapan yang terbentuk, begitupun perbedaan diantara keempat isolat PE. Selain itu, berdasarkan Tabel 4.10 dapat dilihat bahwa fraksi PE menghasilkan serapan dengan jumlah yang lebih besar dibandingkan isolatnya. Pada fraksi PE terdapat serapan pada

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

bilangan gelombang 1261 cm^{-1} yang tidak dimiliki oleh keempat isolat PE. Serapan tersebut menunjukkan adanya vibrasi ulur (*stretching*) C-O ester. Pada daerah bilangan gelombang 1000-1300 cm^{-1} juga terdapan dua serapan yang menunjukkan adanya vibrasi ulur (*stertching*) C-O. Munculnya serapan dengan jumlah yang lebih besar tersebut dapat diasumsikan bahwa pada fraksi PE masih terdapat berbagai macam senyawa dengan gugus yang berbeda.

4.10 Pemanfaatan Senyawa Steroid dalam Prespektif Islam

Penciptaan langit dan bumi yang telah sempurna beserta segala macam isinya, semua itu tidak ada yang sia-sia. Allah Swt. menciptakan itu semua pasti ada manfaat dan hikmahnya. Semua itu merupakan bukti jelas keesaan, keagungan dan kekuasaan Allah Swt. Sebagaimana Allah Swt. berfirman dalam al-Qur'an surat Ali 'Imron ayat 190-191:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِأُولِي الْأَلْبَابِ ۝ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَٰذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ۝

"Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan pergantian malam dan siang terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berakal. (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri, duduk, atau dalam keadaan berbaring, dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata), "Ya Tuhan kami, tidaklah Engkau menciptakan semua ini sia-sia, Maha Suci Engkau, lindungilah kami dari azab neraka." (QS. Ali 'Imron:190-191).

Tafsir al Azhar oleh Buya Hamka (2015) menjelaskan bahwa dalam ayat tersebut Allah Swt. mengarahkan hamba-Nya untuk merenungkan penciptaan alam, langit, dan bumi serta pergantian siang dan malam. Karena semua itu penuh dengan tanda-tanda kebesaran Allah Swt. Orang yang mampu memahami hal tersebut

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

mereka itulah yang disebut ulul albab. Ulul albab adalah orang yang banyak berdzikir dan berpikir. Menurut Ibnu Katsir (1999) insan yang ulul albab adalah insan yang memiliki kemampuan pemikiran dan intelektualitas yang bersih dan sempurna sehingga dapat memahami hakikat sesuatu secara benar. Ayat di atas senantiasa mendorong manusia untuk menjadi insan yang ulul albab dengan merenungkan penciptaan alam semesta beserta isinya sehingga dapat mengetahui bahwa Allah Swt. menciptakan segala sesuatunya tidak ada yang sia-sia (kebesaran Allah) tak terkecuali tumbuhan.

H. verticillata merupakan salah satu tumbuhan yang diciptakan oleh Allah Swt. Tumbuhan ini dianggap sebagai gulma (tumbuhan pengganggu) yang merusak perairan. Namun, karena Allah Swt. menciptakan segala sesuatunya tidak ada yang sia-sia, sebagai usaha menjadi insan yang ulul albab telah dilakukan penelitian yang berkelanjutan untuk menggali manfaat dari *H. verticillata*. Setelah diteliti *H. verticillata* memiliki banyak manfaat dan berpotensi sebagai tumbuhan obat. *H. verticillata* memiliki banyak manfaat dikarenakan senyawa aktif yang dikandungnya. Salah satu diantara senyawa aktif yang banyak diteliti yaitu senyawa steroid.

Steroid merupakan salah satu ciptaan Allah Swt. yang memiliki bentuk yang sangat mikroskopis yang terdapat di dalam tumbuhan, diantaranya ditemukan di *H. verticillata*. Namun dibalik bentuknya yang sangat mikroskopis itu Allah Swt. memberikan hikmah yang begitu besar, yaitu dapat digunakan sebagai obat. Hal tersebut dibuktikan dengan penelitian terdahulu yang melaporkan bahwa senyawa steroid memiliki beberapa bioaktivitas seperti antikanker (Nurcahyanti, dkk., 2015), antimikroba (Awad, 2000), antimalaria (Bialangi, dkk., 2018), dan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

antioksidan (Rahmawati, 2016). Selain itu, hal tersebut juga dibuktikan dalam penelitian ini yang mengisolasi senyawa steroid dari *H. verticillata* dan dilakukan uji toksisitas terhadap larva udang *A. Salina* L. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa isolat steroid fraksi etil asetat dan petroleum eter berpotensi sebagai antikanker dan antitumor dengan nilai LC_{50} terendah sebesar 6,34832 ppm. Penggunaan steroid sebagai obat merupakan usaha agar mendapatkan kesembuhan dari suatu penyakit, karena setiap penyakit pasti ada obatnya. Namun, kita harus tetap ingat dan sadar bahwa segala penyakit itu datangnya dari Allah Swt., maka hanya Allah Swt. yang dapat menyembuhkannya. Sesuai firman Allah Swt. dalam surat asy-Syu'ara' ayat 80:

وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ

"Dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkanku." (QS asy-Syu'ara':80).

Menurut tafsir Kementrian Agama RI (2006) dalam QS asy-Syu'ara':80 menjelaskan bahwa Allah Swt. yang menyembuhkan manusia apabila ia sakit. Allah Swt. juga yang berkuasa menyembuhkan penyakit apa saja yang diderita oleh seseorang. Meskipun begitu, manusia juga harus berusahan mencari tahu cara memperoleh kesembuhan itu. Dengan kata lain, manusia diharuskan mencari obat dari penyakit yang diderita.

Hasil uji toksisitas didapat nilai LC_{50} terendah dari isolat steroid fraksi etil asetat sebesar 14,7943 ppm dan isolat steroid petroleum eter sebesar 6,34832 ppm. Hasil tersebut menunjukkan bahwa Allah Swt. menciptakan segala sesuatu dengan ukurannya masing-masing. Sebagaiman firman Allah Swt. dalam al-Qur'an surat al-Furqon ayat 2:

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

ٱلَّذِى لَهُۥ مُلْكُ ٱلسَّمَٰوَٰتِ وَٱلْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَّلَمْ يَكُن لَّهُۥ شَرِيكٌ فِى ٱلْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَىْءٍ فَقَدَّرَهُۥ تَقْدِيرًا

"Yang memiliki kerajan langit dan bumi, tidak mempunyai anak, tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan (Nya), dan Dia menciptakan segala sesuatu, lalu menetapkan ukuran-ukuranya dengan tepat" (QS al-Furqon:2).

Berdasarkan tafsir Kementrian Agama RI (2006) ayat diatas menjelaskan bahwa Allah Swt. lah yang menciptakan segala sesuatu, dan menyempurnakan ukuran-ukurannya dengan tepat, teliti dan penuh hikmah. Dalam penelitian ini, senyawa steroid memiliki ukuran kemampuan sebagai toksisitas yang disebut dengan nilai LC_{50}. Nilai LC_{50} merupakan konsentrasi suatu zat yang menyebabkan kematian larva uji (udang) sebesar 50%. Penelitian ini menghasilkan nilai LC_{50} yang sangat kecil yang mengartikan bahwa isolat steroid yang diperoleh sangat toksik dan berpotensi sebagai antikanker dan anti tumor.

Berdasarkan penelitian ini kita menyadari bahwa *H. verticillata* yang dianggap sebagai tumbuhan pengganggu, ternyata mengandung senyawa steroid yang memiliki manfaat yang luar biasa. Hasil penelitian ini merupakan salah satu bukti kebesaran Allah Swt. Dengan adanya penelitian ini menjadikan kita menyadari dan berfikir bahwa sesungguhnya dibalik penciptaan langit dan bumi beserta isinya terdapat keajaiban-keajaiban dan bukti-bukti kekuasaan Allah Swt., maka hendaknya kita selalu bedzikir kepada Allah Swt. disetiap waktu dan keadaan guna memperkuat iman dan takwa.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

a) Isolat etil asetat (EA) dan petroleum eter (PE) hasil KLTP fraksi etil asetat dan petroleum eter memiliki tingkat toksisitas yang sangat tinggi terhadap larva udang *A. Salina* L. dan berpotensi sebagai antikanker dan antitumor. Nilai LC_{50} yang diperoleh masing-masing isolat sebesar 14,7943 (isolat EA); 8,42353 (isolat PE_1); 7,95194 (isolat PE_2); 7,55361 (isolat PE_3); dan 6,34832 (isolat PE_4) ppm.

b) Hasil identifikasi isolat EA hasil KLTP fraksi etil asetat dan isolat PE_1, PE_2, PE_3, PE_4 hasil KLTP fraksi petroleum eter menggunakan FTIR menunjukkan adanya gugus yang sama yaitu O-H, C-OH sekunder, $CH(CH_3)_2$, C=O ester, C-O-C, dan C=C nonkonjugasi.

5.2 Saran

Hasil uji toksisitas isolat steroid bersifat sangat toksik dan berpotensi sebagai antikanker dan antitumor, sehingga perlu dilakukan uji bioaktivitas lebih lanjut. Selain itu, diperlukan identifikasi lebih lanjut dengan instrumentasi LC-MS, H-NMR atau C-NMR agar lebih diketahui struktur senyawa yang diisolasi dan juga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan metode pemisahan lain seperti KLT 2D atau kromatografi kolom untuk memaksimal pemisahan senyawa steroid dan mendapatkan isolat steroid yang lebih murni.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

DAFTAR PUSTAKA

Achmad, S.A. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam.* Jakarta: Karnunika.

Ahmed, Y., Rahman, S., Akhtar, P., Islam, F., Rahman, M., Yaakob, Z. 2013. Isolation of Steroid from *n*-hexane Extract of The Leaves of *Saurauia roxburghii*. *International Food Research Journal*, 20(5): 2939-2943.

Al-Quais, K. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak *n*-Heksana dan Identifikasi Senyawa Steroid Akar Rumput Bambu. *Skripsi*. Malang: 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 Journal of Chemistry*, 6(2): 50-56.

Annie, S.W., Raveen, R., Paulraj, M.G., Samuel, T., dan Arivoli, S. 2016. Screening of *Hydrilla verticillata* (L. F.) Royle (Hydrocharitaceae) Crude Leaf Extracts for Larvicidal Efficacy Against The Filarial Vector Culex Quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae). *International Journal of Entomology Research*, 1(3): 43-48.

Ansel, H.C. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi, diterjemahkan oleh Farida Ibrahim, Asmanizar, Iis Aisyah, Edisi keempat*. Jakarta: UI Press.

AOAC. 1984. Official Methods of Analysis Association of Official. *Agricultural Chemists*, 2: 771.

Ar-Rifa'i, M., dan Nasib. 1999. Ringkasan Tafsir Ibnu Katsir. Jakartan: Gema Insani.

Artati, E.K., W.H., F.I., Fatimah. 2012. Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Asam Terhadap Kinetika Reaksi Hidrolisis Pelepah Pisang (*Musa Paradisiaca* L). *Ekuilibrium*, 11(2): 73-77.

Ash-Shiddieqy, T.M.H. 2000. *Tafsir Al-Qur'anul Majid An-Nuur*. Semarang: PT. Pustaka Rizki Putra.

Atun, S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Konversi Cagar Budaya Borobudur*, 8(2).

Awad, N.E. 2000. Biologically Active Steroid from The Green Alga *Ulva lactuca*. *Phytotherapy Researc*, 14: 641-643.

Azah, S.N. 2018. Uji Toksisitas dan Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLTP Ekstrak *n*-Heksana dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata* Menggunakan UV-Vis dan LC-MS/MS. *Skripsi.* Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Baderos, A. 2017. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma cottoni*) dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan Diidentifikasi Menggunakan LC-MS. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Bialangi, N., Mustapa, A., Salimi, Y., Widiantoro, A., Situmeang, B. 2018. Isolation of Steroid Compounds from Suruhan (*Paperomia pellucida L*. Kunth) and Their Antimalarial Activity. *Asian Journal of Chemistry*, 30(8): 1751-1754.

BPOM. 2014. *Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 2014 Tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik Secara In Vivo*. Jakarta: Berita Negara Republik Indonesia.

Byju, K., Anuradha, V., Rosmine, E., Kumar, N.C., Nair, S.M. 2013. Chemical Characterization of The Lipophilic Extract of *Hydrilla verticillata*: a Widely Spread Aquatic Weed. *Journal Plant Biochemistry Biotechnology*, 22(3): 304–311.

Cahyono, A.B. 2004. *Keselamatan Kerja Bahan Kimia di Industri*. Yogyakarta: UGM Press.

Carballo, J.L., Hernández-Inda, Z.L., Pérez, P., García-Grávalos, M.D. 2002. A Comparison Between Two Brine Shrimp Assays to Detect in Vitro Cytotoxicity in Marine Natural Products. *BioMed Central Biotechnology*, 2: 17.

Clarkson, C., Maharaj, V.J., Crouch, N.R., Grace, O.M., Pillay, P., Matsabisa, M.G., dkk. 2004. *In Vitro* Antiplasmodial Activity of Medicinal Plants Native to or Naturalized in South Africa. *Journal Ethnopharm*, 92: 177-191.

Das, B., Pal, D., dan Haldar, A. 2015. Pharmacognostical and Physiochemical Study of The Aquatic Weed *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royale Known as Nutrient Power House. *International Journal of Research in Pharmacy and Science*, 5(1): 1-5.

Day, Jr. R.A., dan Underwood, A.L. 1986. *Analisis Kimia Kuantitatif* (terjemahan Pudjaatmaka, A.H.). Jakarta: Airlangga.

Departemen Kesehatan RI. 1994. Keputusan Menteri Kesehatan RI Nomer 661/MENKES/SK/VII/1994 tentang Persyaratan Obat Tradisional. Jakarta: Depkes.

Desianti, N. 2014. Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan *n*-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Endarini, L.H. 2016. *Farmakognisi dan Fitokimia*. Jakarta Selatan: Pusdik SDM Kesehatan.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Farihah. 2008. Uji Toksisitas Ekstrak Daun *Ficus bencamina* L. Terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Skripsi*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Fasya, A.G. 2016. Potensi Antikanker dan Antioksidan Serta Identifikasi Isolat Steroid Mikroalga *Chlorella* sp. *Laporan Penelitian Kompetitif Individual*. Malang: Kementrian Agama Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat UIN Maulan Malik Ibrahim.

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.

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 Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 456.

Fasya, A.G., Purwantoro, B., Ulya, L.H., Ahmad, M. 2020. Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis dari Fraksi *n*-Heksana *Hydrilla verticillata*. *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, 8(1): 23-34.

Fessenden, R.J., dan Fessenden, J.S. 1986. *Kimia Organik Cetakan Ketiga.* Bandung: ITB.

Gajardo, G.M., dan Beardmore, J.A. 2012. The Brine Shrimp Artemia: Adapted to Critical Life Conditions. *Frontiers In Physiology*, 3(185): 1-8.

Geyter, Lic.E.D. 2012. *Toxicity and Mode of Action of Steroid and Terpenoid Secondary Plant Metabolites Against Economically Important Pest Insects in Agriculture*. Belgia: Universiteit Gent.

Guenther, E. 1987. *Minyak Atsiri Jilid I* terjemahan Ketaren S. Jakarta: Universitas Jakarta Press.

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.

Hamidi, M.R., Jovanova, B., dan Panovska, T.K. 2014. Toxicological Evaluation of The Plant Products Using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) Model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 60(1): 9-18.

Hamka. 2015. *Tafsir Al-Azhar, Jilid 1*. Jakarta: Gema Insani.

Handoko, D.S. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis. *Jurnal SIGMA*, 9(1).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Harbone, J.B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan K. Padmawinata & I. Sudiro. Bandung: ITB.

Hasanah, F. 2017. Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Etanol, Etil Asetat, dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata* (L.F) Royle dari Danau Ranu Grati Kab. Pasuruan Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Hidayah, H. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid pada Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasinya menggunakan FTIR. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang

Hidayah, W.W., Kusrini, D., Fachriyah, E. 2016. Isolasi, Identifikasi Senyawa Steroid dari Daun Getih-Getihan (*Rivina humilis* L.) dan Uji Aktivitas sebagai Antibakteri. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 19(1): 32-37.

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.

Iriawan, N., dan Astuti, S.P. 2006. *Mengolah Data Statistika dengan Mudah Menggunakan Minitab 14*. Yogyakarta: CV. Andi Offiser.

Jain, P.S., dan Bari, S.B. 2010. Isolation of Lupeol, Stigmasterol and Campesterol from Petroleum Ether Extract of Woody Stem of *Wrightia tinctoria*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 9(3): 163-167.

Janakiraman, N., dan Johnson, M. (2016). Ethanol Extracts of Selected Cyathea Species Decreased Cell Viability and Inhibited Growth in MCF 7 Cell Line Cultures. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 9(3): 151–155.

Joselin, M. 2014. Karakterisasi Simplisia dan Skrining Fitokimia Serta Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air dan Ekstrak Etanol Hidrilla (*Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle). *Skripsi*. Medan: Universitas Sumatera Utara.

Kanwar, M. 2007. Brine Shrimp (*Artemia salina*) a Marine Animal for Simple and Rapid Biological Assays. J*ournal of Chinese Clinical Medicine*, 2.

KEMENAG RI. 2006. *Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Bandung: Dipenogoro.

Kensa, V., dan Neelamegum, R. 2016. GC-MS Determination of Bioactive Constituents of *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. Collected from Unpolluted and Polluted Water Sources. *Asian Journal of Biology*, 1(1): 1-6.

Khasanah, N.F. 2018. Uji Toksisitas Senyawa Aktif Fraksi *n*-Heksana, Kloroform, dan *n*-butanol *Hydrilla verticillata* Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol dari Perairan Danau Ranu Pasuruan. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Khopkar, S. 2007. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.

Kiswandono, A.A. 2011. Perbandingan Dua Ekstraksi Yang Berbeda Pada Daun Kelor (*Moringa Oleifera* L.) Terhadap Rendemen Ekstrak Dan Senyawa Bioaktif Yang Dihasilkan. *Jurnal Sains Natural Universitas Nusa Bangsa*, 1(1): 45-51.

Kristanti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M., Kurniadi, B. 2008. *Buku Ajar Fitokimia.* Surabaya: Airlangga University Press.

Langeland, K.A. 2008. *Hydrilla verticillata* (L.F.) Royle "The Perfect Aquatic Weed". *Castanea*, 61: 293-304

Lawoko, Martin, dan Sagar, D. 2009. Pre-Hydrolisis of The Phenyl Glycosidic Bond in a Model Compound. *Lenzinger Berichte*, 77-87.

Lisboa, B.P. 1969. Thin-layer Chromatography of Steroids, Sterols, and Related Compounds, in: Methods in Enzymology. *Elsevier*, pp. 3–158.

Lotus Superfoods. 2013. *Give your energy and mood a major boost with this powerful green superfood*. Tanggal diakses 5 Agustus 2019. http://www.lotussuperfoods.com/hydrilla-verticillata-green-superfood-powder/.

Madjid, A.D.R., Rahmawati, D.A., dan Fasya, A.G. 2020. Variasi Komposisi Eluen pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* dengan Kromatografi Kolom Basah. *ALCHEMY Journal of Chemistry*, 8(1): 35-40.

Mahmiah, Sudjarwo, G.W., O.M., M.H. 2017. Kandungan Senyawa Metabolit Sekunder dari Fraksi Etil Asetat Kulit Batang *Rhizopora mucronata* L. *Seminar Nasional Kelautan XII*. Surabaya: Fakultas Teknik dan Ilmu Kelautan Universitas Hang Tuah. Tanggal 20 Juli.

Mardaneni, I. 2017. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Alga Merah *Eucheuma cottonii* Perairan Wongsorejo Banyuwangi Menggunakan Metode KLT dan LC-MS. Skripsi, Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.

Mawaddah. 2019. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi *n*-Heksana *Hydrilla verticillata*. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.

McDOWELL, L.R., Lizama, L.C., Marion, J.E., Wilcox, C.J. 1990. Utilization of Aquatic Plants *Elodea canadensis* and *Hydrilla verticillata* in Diets for Laying Hens.: 1. Performance and Egg-Yolk Pigmentation. *Poultry Science*, 69, 673–678.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

McLaughlin, J. L. 1991. Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality Two Simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractionation Methods in Plants. *Biochemistry journal*, 6(1): 1-30.

Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobson, L.B., Nichols, D.E., dan McLaughin, J.L. 1982. Brine Shrimp: A Convient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of Medicininal Plant Research*, 31-34.

Muharram. 2010. Isolasi dan Uji Bioaktivitas Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak *n*-Heksana Daun Pare (*Momordica charantia* L.). *Bionature*, 11(2): 70–78.

Mulyono. 2005. *Kamus Kimia*. Jakarta: Bumi Aksara.

Ningsih, E.M., Fasya, A.G., Adi, T.K. dan Hanapi, A. 2015. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid pada Fraksi *n*-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma spinosum*. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.

Nugraha, R. 2018. Studi Hubungan Kuantitatif Struktur Aktivitas, *Searching* Farmakofor, *Virtual Screening, Docking* Molekul, Uji Toksisitas dan Profil Farmakokinetik Senyawa Turunan Capsaicin Sebagai Antagonis Reseptor TRPV1 Secara *In Silico*. *Skripsi*. Makassar: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Alauddin.

Nurcahyanti, O., Julaeha, E., dan Mayanti, T. 2015. Senyawa Steroid Dari Kulit Batang *Dysoxylum alliaceum* Dan Aktivitasnya Terhadap Sel Kanker Payudara Mcf-7. *Chimica et Natura Acta*, 3(2): 62-65.

Nurhayati, A.P.D., Abdulgani, N., dan Febrianto, R. 2006. Uji Toksisitas Ekstrak *Eucheuma Alvarezii* terhadap *Artemia salina* sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker. *Akta Kimindo*, 2(1): 41-46

Pal, D., S.B., N., Khatun, S., K.B., P. 2006. CNS Activities of Aqueous Extract of *Hydrilla verticillata* in Mice. *Natural Product Sciences*, 12(1): 44-49.

Panjaitan, R.B. 2011. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Batang Pulasari (*Alixiae cortex*) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Skripsi*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Sanata Dharma

Panji, T. 2012. *Teknik Spektroskopi untuk Elusidasi Struktur Molekul*. Yogyakarta: Graha Ilmu.

Parra, A.L., Yhebra, R.S., Sardiñas, I.G., Buela, L.I. 2001. Comparative Study of The Assay of *Artemia salina* L. and The Estimate of The Medium Lethal Dose (LD50 value) in Mice, to Determine Oral Acute Toxicity of Plant Extracts. *Phytomedicin*, 8(6).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Pierre, L.L., dan Moses, M.N. 2015. Isolation and Characterisation of Stigmasterol and *β*-Sitosterol dari *Odontonema Strictum* (Acanthaceae). *Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Science*, 2(1): 88-95.

Prabha, S.P., dan Rajkumar, J. 2015. Phytochemical Screening and Bioactive Potential of *Hydrilla verticillata*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(3): 1809-1815.

Purwantoro, B. 2019. Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis Fraksi *n*-Heksana *Hydrilla verticillata*. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.

Rahmawati, L.M. 2016. Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Senyawa Steroid Isolat Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Mikroalga (*Chlorella* sp.) Menggunakan UV-Vis. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.

Ramesh, S., Rajan, R., dan Santhanam, R. 2014. *Freshwater Phytopharmaceutical Compounds*. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Ritna, A., Anam, S., dan Khumaidi, A. 2016. Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Fraksi Etil Asetat Benalu Batu (*Begonia sp.*) Asal Kabupaten Morowali Utara. *GELENIKA Journal of Pharmacy*, 2(2): 83-89.

Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi* Diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.

Rohman, A., dan Gandjar, I.G. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

Rohmawati, D., dan Sutoyo, S. 2018. Steroid Isolated from The Dichlorometane Extract of Matoa's Stem Bark (*Pometia pinnata*) and Toxicity Tests Against *Artemia salina* Leach. *Atlantis Press: Advances in Engineering Research*, 171: 103-105.

Rosandy, A.R., Kamal, N.M., Talip, N., Khalid, R., Bakar, M.A. 2017. Isolation of Four Steroid from The Leaves of Fern *Adiantum latifolium* Lam. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 21(2): 298-303.

Rugayah, Rusdiyansyah, Jayuska, A. 2017. Karakterisasi Senyawa Triterpenoid dari Daun Jabon (*Anthocephalus cadamba* (Roxb.) Miq). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 6(2): 56-63

Rusdi. 1990. *Tetumbuhan Sebagai Sumber Bahan Obat*. Padang: Pusat Penelitian Universitas Andalas.

Sadino, A. Sahidin, I., dan Wahyuni, W. 2017. Acute Toxicity of Ethanol Extract of *Polygonum pulchrum* Blume Using Brine Shrimp Lethality Test Method. *Pharmacology and Clinical Pharmacy Research*, 2(2): 46-50.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Saleh, H.A., Saokani, J., dan Rijal, S. 2016. Penentuan Nilai Kalor Serta Pengaruh Asam Klorida (HCl) terhadapa Kadar Bioetanol Bonggol Pisang (*Mussa paradisiacal*). *Al-Kimia*, 4(1): 68-77.

Sarker, S.D., dan Nahar, L. 2009. *Kimia untuk Mahasiswa Farmasi Bahan Kimia Organik, Alam dan Umum.* Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

Sastrohamidjojo, H. 1996. *Sintesis Bahan Alam*. Yogyakarta: UGM Press.

Sastrohamidjojo, H. 2002. *Kromatografi*. Yogyakarta: Liberty.

Sastrohamidjojo, H. 2004. *Kimia Minyak Atsiri*. Yogyakarta: UGM Press.

Savitri, I., Suhendra, L., dan Wartini, N.M. 2017. Pengaruh Jenis Pelarut Pada Metode Maserasi Terhadap Karakteristik Ekstrak *Sargasum polycystum*. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, 5(3): 93-101.

Sayuti, M. 2017. Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi, Bagian dan Jenis Pelarut Terhadap Rendemen dan Aktifitas Antioksidan Bambu Laut (*Isis Hippuris*). *Technology Science and Engineering Journal*, 1(3): 166-174.

Setiyawan, M.I. 2015. Isolasi Senyawa Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Euchema spinosum*) Hasil Hidrolisisi Ekstrak Metanol dan Identifikasinya Menggunakan FTIR. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.

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

Shriner, T.L., Hermann, C.K.F., Morrill, T.C., Curtin, D.Y., Fuson, R.C. 2004. *The Systematic Identification of Organic Compounds, Eighth Edition*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.

Siadi, K. 2012. Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) sebagai Biopestisida yang Efektif dengan Penambahan Larutan NaCl. *Jurnal MIPA*, 35(1):77-83.

Smith, S.W. 2009. Review Chiral Toxicology: It's The Same Thing...Only Different. *Toxicological Sciences*, 110(1): 4-30.

Socrates, G. 1994. *Infrared Characteristic Group Frequencies Table and Chart Second Edition.* New York: John Wiley and Sons Inc.

Steward, K.K. 1991. Growth of Various Hydrilla Races in Waters of Differing pH. *Florida Scientist*, 54: 117-125.

Sulastry, T., dan Kurniawati, N. 2010. Isolasi Steroid dari Ekstrak Metanol Daun Beluntas (*Plucea indica* L.). *Jurnal Chemica*, 11(1): 52-56.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Sulistiyani, L.M. 2018. Pemisahan dan Uji Antioksidan Isolat Steroid Hasil KLTP Ekstrak *n*-Heksana dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata* Danau Ranu Grati. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.

Sumithran, S., dan Sanjeeva Raj, P.J., 2013. Keystone Functions of *Hydrilla verticillata*. *Resonance,* 18: 156-162.

Trianto, A., HAS, Y.Y., Ambariyanto, Mirwani, R. 2004. Uji Toksisitas Ekstrak Gorgonian *Isis hippuris* Terhadap Nauplius *Artemia salina*. *Jur. Ilmu Kelautan*, 9(2): 61-66.

Triyono, A. 2010. Mempelajari Pengaruh Penambahan Beberapa Asam pada Proses Isolasi Protein Terhadap Tepung Protein Isolat Kacang Hijau (*Phaseolus radiatus* L.). *Seminar Rekayasa kimia dan Proses.* Semarang: Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Diponegoro. Tanggal 4-5 Agustus.

Ulfa, A. 2014. Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kulit Dahan Sirsak (*Annona muricata* Linn) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.

Usman, U., Soekamto, N.H., Natsir, M., Maulidiyah, M. 2020. Isolation of Natural Derivated Steroidal from Bark Steam of *Melochia umbellata* (Houtt) Stapf var. degrabrata K. *Asian Journal of Chemistry*, 32(4): 765-770.

Vanhaecke, P., Persoone, G., Claus, C., Sorgeloos, P. 1981. Proposal for a Short Term Toxicity Test with *Artemia* Nauplii. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 5: 382-387

Vickery, M. L., dan Vickery, B. 1981. *Secondary Plant Metabolism*. London: The McMillan Pr Ltd.

Voight, R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi Edisi 5.* Yogyakarta: UGM Press.

Xiao, Y., Wang, Y.L., Gao, S.X., Sun, C., Zhou, Z.Y. 2007. Chemical Composition of *Hydrilla verticillata* (L. f.) Royle in Taihu Lake. *Chinese Journal of Chemistry*, 25(5): 661–665.

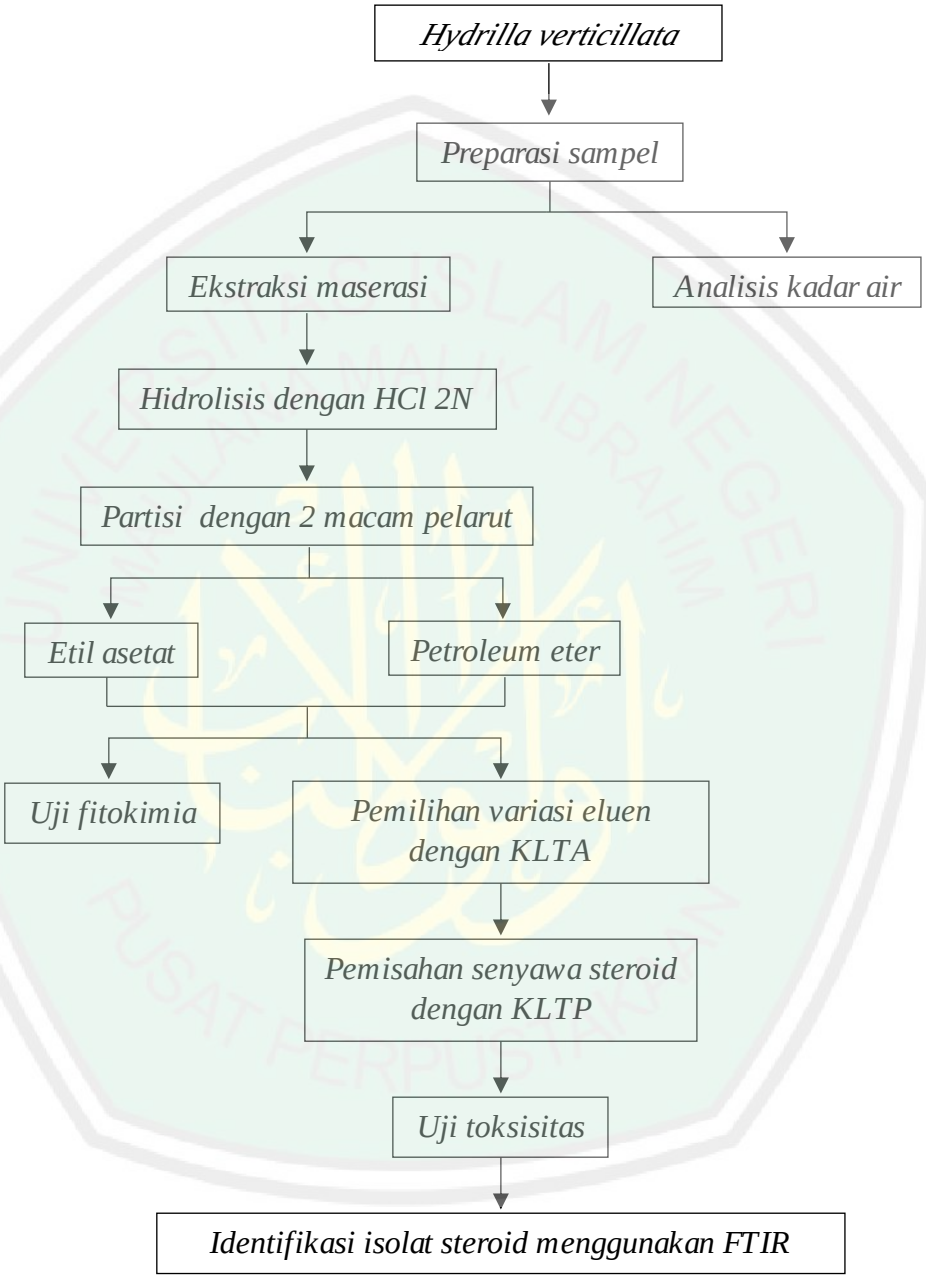
Xiong, Q., Wilson, W.K., dan Pang, J. 2007. The Liebermann-Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangment of Cholesterol in Acid. *Lipids*, 42:87-96.

Zahra, U., Muharram, dan Ilyas, A. 2013. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak *n*-Heksana dari Umbi Lobak. *Al-kimia*.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Lampiran 2. Diagram Alir

L2.1 Preparasi *Hydrilla verticillata*

Hydrilla verticillata

- dicuci dengan air sampai bersih
- dikeringkan tanpa menggunakan sinar matahari (kering angin)
- dihaluskan sampai menjadi serbuk dengan ukuran 90 mesh

Hasil

L2.2 Analisis Kadar Air

Serbuk *Hydrilla verticillata*

- ditimbang sebanyak 1 gram
- dimasukkan kedalam cawan porselen yang telah diketahui berat konstannya
- dikeringkan dalam oven pada suhu 100-105 °C selama ± 15 menit
- didinginkan dan di masukkan ke dalam desikator selama ± 10 menit
- ditimbang kembali
- diulangi sampai diperoleh berat cawan berisi sampel yang konstan
- dihitung kadar air

Hasil

L2.3 Ekstraksi *Hydrilla verticillata*

Serbuk *H. verticillata*

- ditimbang sebanyak 100 gram
- dimasukkan kedalam erlenmeyer
- direndam dalam 500 mL pelarut metanol selama 24 jam
- dishaker selama 24 jam dengan kecepatan 150 rpm
- disaring menggunakan corong buchner
- diambil filtratnya
- dimaserasi kembali residu yang diperoleh sampai diperoleh filtrat yang agak bening
- digabung filtrat yang diperoleh

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Filtrat — Residu

- dipekatkan menggunakan rotary evaporator vacuum
- dialiri gas N_2

Ekstrak pekat metanol

- ditimbang ekstrak pekat
- dihitung *yield* ekstrak

Hasil

L2.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata*

Ekstrak pekat metanol

- ditimbang sebanyak 5 g dan dimasukkan ke gelas kimia
- ditambahkan 10 mL asam klorida (HCl) 2 N
- distirer dengan magnetik stirer hot plate selama 2 jam pada suhu ruang
- ditambahkan larutan natrium bikarbonat jenuh sampai pHnya netral

Hidrolisat

- dimasukkan ke dalam corong pisah
- ditambahkan 25 mL etil asetat
- dikocok dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan, lapisan organik dan lapisan air
- diambil lapisan organik
- dipartisi kembali lapisan air yang diperoleh dengan etil asetat hingga tiga kali pengulangan
- digabung lapisan organik yang diperoleh

Lapisan organik — Lapisan air

- dipekatkan menggunakan rotary evaporator vakum
- dialiri gas N_2

Fraksi etil asetat

- ditimbang
- dihitung *yield*nya

Hasil

Ket: Diulangi langkah diatas untuk fraksi petroleum eter.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

L2.5 Uji Fitokimia Senyawa Aktif

L2.5.1 Uji Alkaloid

Fraksi etil asetat & petroleum eter
- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan 0,5 mL HCl 2%
- dibagi ke dalam dua tabung

Tabung I	Tabung II
ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorf	ditambahkan 2-3 reagen Mayer
Hasil I	Hasil II

Ket: Positif mengandung alkaloid jika terbentuk endapan berwarna jingga pada tabung I dan endapan kekuning-kuningan pada tabung II.

L2.5.2 Uji Flavonoid

Fraksi etil asetat & petroleum eter
- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan 1-2 mL metanol panas 50%
- ditambahkan serbuk Mg dan 50 mL HCl 37%

Hasil

Ket: Positif mengandung flavonoid jika terbentuk warna merah, kuning, atau jingga.

L2.5.3 Uji Saponin

Fraksi etil asetat & petroleum eter
- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan air (1:1) sambil dikocok selama 1 menit
- ditambahkan HCl 1N jika dihasilkan busa

Hasil

Ket: Positif mengandung saponin jika busa yang dihasilkan bertahan selama 10 menit dengan ketinggian 1-3 menit

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

L2.5.4 Uji Triterpenoid dan Steroid

Fraksi etil asetat & petroleum eter

- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform
- ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat
- ditambahkan 1-2 mL H_2SO_4

Hasil

Ket: - Positif mengandung triterpenoid ditandai dengan terbentuknya cincin kecokelatan atau violet pada perbatasan kedua pelarut.

- Positif mengandung steroid ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan.

L2.5.5 Uji Tanin

a. Uji dengan Gelatin

Fraksi etil asetat & petroleum eter

- dimasukkan 2 mg ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan larutan gelatin

Hasil

Ket: Positif mengandung tanin jika terbentuk endapan putih.

b. Uji dengan $FeCl_3$

Fraksi etil asetat & petroleum eter

- Dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- Ditambahkan 2-3 tetes larutan $FeCl_3$ 1%

Hasil

Ket: positif mengandung tanin jika terbentuk larutan berwarna hijau kehitam atau biru tua.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

L2.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTA

Fraksi etil asetat & petroleum eter

- Dilarutkan dengan pelarutnya masing-masing konsentrasi 4000 ppm
- Ditotolkan pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat silika $G60F_{254}$ ukuran 1x10 cm^2 yang sebelumnya telah diaktivasi selama 30 menit
- Dielusi dengan fase gerak *n*-heksana-etil asetat dengan perbandingan tertentu yang sebelumnya telah dijenuhkan selama 1 jam
- Dihentikan elusi saat eluen mencapai garis batas
- Dikeringkan sebentar
- Diamati pemisahan noda yang terbentuk di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm

Hasil

Ket: diulangi dengan variasi perbandingan eluen *n*-heksana-etil asetat yang lain.

L2.7 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP

Fraksi etil asetat & petroleum eter

- Dilarutkan dengan pelarutnya masing-masing konsentrasi 4000 ppm
- Ditotolkan di sepanjang garis batas dengan jarak 1 cm dari tepi bawah plat silika $G60F_{254}$ ukuran 20x10 cm^2 yang telah diaktivasi selama 30 menit
- Dielusi dengan eluen terbaik hasil KLTA yang sebelumnya telah dijenuhkan selama 1 jam
- Dihentikan elusi saat eluen mencapai garis batas lalu dikeringkan sebentar
- Diamati pemisahan noda yang terbentuk di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm
- Dipotong sedikit untuk disemprot dengan reagen *Lieberman Burchard*
- Ditandai noda yang terbentuk dan dihitung nilai Rf nya
- Dikerok noda yang terbentuk dan dilarutkan dalam masing-masing pelarut
- Divortex dan disentrifugasi

Supernatan (filtrat)

- Diuapkan

Hasil

Pelet (endapan)

- dilarutkan lagi hingga 3x

Hasil

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

L2.8 Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

L2.8.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina* Leach

Telur larva udang

- Diambil sebanyak 2,5 mg
- Dimasukkan ke dalam 250 ml air laut
- Diaerasi selama 48 jam dengan suhu 25-30°C di bawah lampu pijar

Hasil

L2.8.2 Uji toksisitas

Isolat steroid

- Ditimbang sebanyak 1 mg
- Ditambahkan pelarut masing-masing sebanyak 10 mL untuk membentuk larutan stok dengan konsentrasi 100 ppm
- Dipipet larutan stok 100 ppm sebanyak 100, 200, 300, 400, dan 500 µL ke dalam botol vial
- Diuapkan pelarutnya hingga kering
- Ditambahkan 100 µL dimetil sulfoksida (DMSO)
- Ditambah 1 tetes larutan ragi roti
- Ditambahkan 2 ml air laut dan dikocok hingga isolat larut
- Ditambah air laut hingga volumenya 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi larutan 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm
- Dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina*
- Dibiarkan selama 24 jam
- Dihitung kematian larva udang setelah 24 jam

Hasil

L2.9 Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer FTIR

Isolat steroid

- Dicampur dengan pellet KBr dan digerus bersama
- Dibuat pellet
- Dianalisis menggunakan FTIR dengan bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1}

Hasil

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan

L3.1 Pembuatan larutan HCl 2 N

ρ HCl 37% = 1,19 g/mL = 1190 g/L

BM HCl = 36,42 g/mol

n = 1 (jumlah ion H^+)

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

- Mol HCl dalam konsentrasi 37% = $\frac{gram\ HCl}{BM\ HCl}$

  = $\frac{37\ gram}{36{,}42\ g/mol}$

  = 1,0159 mol

- Volume larutan HCl dalam = $\frac{m}{\rho}$

  Larutan HCl 37% = $\frac{100\ gram}{1{,}19\ g/ml}$ = 84,033 mL = 0,084 L

- Molaritas HCl 37% = $\frac{Mol}{V(L)}$

  = $\frac{1{,}0159\ mol}{0{,}084\ L}$ = 12,094 mol/L

- Normalitas HCl 37% = n x Molaritas HCl

  = 1 x 12,094 mol/L

  = 12,094 N

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

$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$

12,0894 N x V_1 = 2 N x 100 mL

V_1 = 16,5 mL

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

L3.2 Pembuatan larutan $NaHCO_3$ Jenuh

Padatan $NaHCO_3$ dilarutkan dengan sedikit akuades dalam gelas beaker hinga jenuh (tidak larut). Kemudian disaring dan ditampung dalam gelas beaker.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

L3.3 Pembuatan HCl 2%

M1 x V1 = M2 x V2

37% x V_1 = 2% x 10 mL

V_1 = 0,5 mL

Cara pembuatannya adalah dipipet larutan HCl pekat 37% sebanyak 0,5 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL yang berisi 5 mL aquades. Selanjutnya ditambah aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L3.4 Pembuatan Reagen Dragendorff

- Larutan I 0,6 gram $Bi(NH_3)_3.5H_2O$ dalam 2 mL HCl pekat dan 10 mL H_2O
- Larutan II 6 gram KI dalam 10 mL H_2O

Cara pembuatannya adalah larutan I dibuat dengan 0,6 gram $Bi(NH_3)_3.5H_2O$ yang dilarutkan ke dalam 2 mL HCl pekat dan 10 mL aquades dan larutan II dibuat dengan 6 gram KI yang dilarutkan ke dalam 10 mL aquades. Kedua larutan tersebut dicampur dengan 7 mL HCl pekat dan 15 mL H_2O.

L3.5 Pembuatan Reagen Mayer

- Larutan I $HgCl_2$ 1,358 gram dalam aquades 60 mL
- Larutan II KI 5 gram dalam aquades 10 mL

Cara pembuatannya yaitu larutan I dibuat dengan $HgCl_2$ 1,358 gram yang dilarutkan dengan aquades 60 mL dan larutan II dibuat dengan KI 5 gram yang dilarutkan dengan aquades 10 mL. Larutan I dituangkan ke dalam larutan II, diencerkan dengan aquades sampai tanda batas pada labu ukur 100 mL.

L3.6 Pembuatan metanol 50%

M_1 x V_1 = M_2 x V_2

99,8% x V_1 = 50% x 10 mL

V_1 = 5 mL

Cara pembuatannya adalah diambil larutan metanol 99,8% sebanyak 5 mL kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang berisi ± 5 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

L3.7 Pembuatan $FeCl_3$ 1%

BM $FeCl_3$ = 162,2 g/mol

Massa $FeCl_3$ = 1% x BM $FeCl_3$ x V

22,4 x g = 1% x 162,2 g/mol x 0,01 L

g = 0,072 g = 72 mg

Jadi untuk membuat larutan $FeCl_3$ 1% diambil sebanyak 72 mg serbuk $FeCl_3$ dan dilarutkan hingga volume 10 mL.

L3.8 Pembuatan Larutan Gelatin

Cara pembuatan larutan gelatin adalah 2,5 g serbuk gelatin dicampur dengan 50 mL larutan garam NaCl jenuh, kemudian dipanaskan sampai gelatin larut seluruhnya. Setelah dingin, ditambahkan larutan NaCl jenuh kemudian diencerkan dalam labu ukur 100 mL dan dikocok hingga homogen.

L3.9 Pembuatan HCl 1 N

ρ HCl 37% = 1,19 g/mL = 1190 g/L

BM HCl = 36,42 g/mol

n = 1 (jumlah ion H^+)

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

- Mol HCl dalam konsentrasi 37% = $\frac{gram\ HCl}{BM\ HCl}$

  = $\frac{37\ gram}{36{,}42\ g/mol}$

  = 1,0159 mol

- Volume larutan HCl dalam = $\frac{m}{\rho}$

  Larutan HCl 37% = $\frac{100\ gram}{1{,}19\ g/ml}$ = 84,033 mL = 0,084 L

- Molaritas HCl 37% = $\frac{Mol}{V(L)}$

  = $\frac{1{,}0159\ mol}{0{,}084\ L}$ = 12,094 mol/L

- Normalitas HCl 37% = n x Molaritas HCl

  = 1 x 12,094 mol/L

  = 12,094 N

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Sehingga untuk membuat larutan HCl 1 N sebanyak 10 mL dari larutan HCl 12,094 N menggunakan prinsip pengenceran berikut:

$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$

$12{,}094\ N \times V_1 = 1\ N \times 10\ mL$

$V_1 = 0{,}83\ mL$

Larutan HCl pekat 37% diambil sebanyak 0,83 mL kemudian diencerkan dengan aquades hingga volume 10 mL dan dikocok hingga homogen.

L3.10 Pembuatan Reagen Libermann-Burchard

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

Cara pembuatan reagen Libermann-Burchard adalah dengan mencampur ketiga bahan di atas. Masing-masing bahan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi sampel, lalu diamati perubahan warnanya.

L3.11 Pembuatan Eluen *n*-heksana-etil asetat

Eluen yang digunakan untuk elusi pada pemisahan dengan kromatografi lapis tipis adalah *n*-heksana-etil asetat dengan beberapa variasi perbandingan dalam 20 mL.

- ***n*-heksana:etil asetat (19:1)**

  n-heksana = $\frac{19}{20}$ x 20 mL = 19 mL

  Etil asetat = $\frac{1}{20}$ x 20 mL = 1 mL

- ***n*-heksana:etil asetat (18:2)**

  n-heksana = $\frac{18}{20}$ x 20 mL = 18 mL

  Etil asetat = $\frac{2}{20}$ x 20 mL = 2 mL

- ***n*-heksana:etil asetat (17:3)**

  n-heksana = $\frac{17}{20}$ x 20 mL = 17 mL

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Etil asetat = $\frac{3}{20}$ x 20 mL = 3 mL

- ***n*-heksana:etil asetat (16:4)**

  n-heksana = $\frac{16}{20}$ x 20 mL = 16 mL

  Etil asetat = $\frac{4}{20}$ x 20 mL = 4 mL

- ***n*-heksana:etil asetat (15:5)**

  n-heksana = $\frac{15}{20}$ x 20 mL = 15 mL

  Etil asetat = $\frac{5}{20}$ x 20 mL = 5 mL

L3.12 Pembuatan Larutan Stok 100 ppm untuk Uji Toksisitas

Volume labu ukur = 10 mL

ppm = µg/mL

M larutan stok = 100 ppm = 100 µg/mL

Massa ekstrak = 100 µg/mL x 10 mL

= 1000 µg

= 1 mg

Jadi untuk pembuat larutan stok 100 ppm, dibutuhkan isolat sebanyak 1 mg, kemudian ditambahkan oleh pelarutnya hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L3.13 Pembuatan Larutan Uji Toksisitas Konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm

a. 1 ppm

M_1 x V_1 = M_1 x V_1

100 ppm x V_1 = 1 ppm x 10 mL

V_1 = 0,1 mL

= 100 µL

Jadi, untuk membuat larutan uji 1 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 100 µL.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

b. 2 ppm

$M_1 \times V_1 = M_1 \times V_1$

100 ppm x V_1 = 2 ppm x 10 mL

V_1 = 0,2 mL

= 200 µL

Jadi, untuk membuat larutan uji 2 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 200 µL.

c. 3 ppm

$M_1 \times V_1 = M_1 \times V_1$

100 ppm x V_1 = 3 ppm x 10 mL

V_1 = 0,3 mL

= 300 µL

Jadi, untuk membuat larutan uji 3 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 300 µL.

d. 4 ppm

$M_1 \times V_1 = M_1 \times V_1$

100 ppm x V_1 = 4 ppm x 10 mL

V_1 = 0,4 mL

= 400 µL

Jadi, untuk membuat larutan uji 4 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 400 µL.

e. 5 ppm

$M_1 \times V_1 = M_1 \times V_1$

100 ppm x V_1 = 5 ppm x 10 mL

V_1 = 0,5 mL

= 500 µL

Jadi, untuk membuat larutan uji 5 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 500 µL.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Lampiran 4. Data Pengamatan dan Hasil Perhitungan

L4.1 *Yield* Sampel Kering *Hydrilla verticillata*

Berat sampel basah = 14 Kg

Berat sampel kering = 1,2 Kg

Berat sampel serbuk kering = 1 Kg

Yield $= \frac{\text{Berat sampel kering}}{\text{Berat sampel basah}} \times 100\%$

$= \frac{1\ \text{Kg}}{14\ \text{Kg}} \times 100\%$

$= 7{,}14\%$

L4.2 Penentuan Kadar Air Sampel Kering *Hydrilla verticillata*

Tabel L.4.1 Data berat cawan kosong

Ulangan Cawan	Berat Cawan Kosong (g)				Berat Cawan Konstan (g)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
C1	**49,8438**	49,8427	49,8426	49,8425	**49,8426**
C2	**51,2572**	51,2558	51,2558	51,2557	**51,2558**
C3	**55,2221**	55,2217	55,2217	55,2216	**55,2217**

Keterangan: C = Cawan, P = Ulangan

Tabel L.4.2 Data berat cawan + sampel

Ulangan Cawan	Berat Cawan + Sampel (g)				Berat Cawan + Sampel Konstan (g)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
C1	**50,8425**	50,7675	50,7677	50,7677	**50,7676**
C2	**52,2557**	52,1795	52,1799	52,1799	**52,1798**
C3	**56,2216**	56,1448	56,1445	56,1447	**56,1447**

Keterangan: C = Cawan, P = Ulangan

1. Kadar air sampel pada cawan C1

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

$= \frac{(50{,}8425 - 50{,}7676)\ \text{g}}{(50{,}8425 - 49{,}8426)\ \text{g}} \times 100\%$

$= 7{,}49\%$

2. Kadar air sampel pada cawan C2

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

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

$$= \frac{(52{,}2557-52{,}1798)\ g}{(52{,}2557-51{,}2558)\ g} \text{ x } 100\%$$

$$= 7{,}59\%$$

3. Kadar air sampel pada cawan C3

$$\text{Kadar air} = \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan kosong})} \text{x } 100\%$$

$$= \frac{(56{,}2216-56{,}1447)\ g}{(56{,}2216-55{,}2217)\ g} \text{ x } 100\%$$

$$= 7{,}69\%$$

Kadar air rata-rata *Hydrilla verticillata* $= \frac{7{,}49\%+7{,}59\%+7{,}69\%}{3} = 7{,}59\%$

L4.3 *Yield* Hasil Maserasi

Tabel L.4.3 Data hasil *yield* ekstrak metanol

Ulangan	Berat Sampel (g)	Berat Wadah (g)	Berat Wadah + Ekstrak pekat (g)	Berat Ekstrak Pekat (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

Yield 1 $= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \text{ x } 100\%$

$$= \frac{6{,}8450\ g}{100\ g} \text{ x } 100\%$$

$$= 6{,}8450\%$$

Yield 2 $= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \text{ x } 100\%$

$$= \frac{6{,}3896\ g}{100\ g} \text{ x } 100\%$$

$$= 6{,}3896\%$$

Yield 3 $= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \text{x } 100\%$

$$= \frac{6{,}2502\ g}{100\ g} \text{ x } 100\%$$

$$= 6{,}2502\%$$

Yield rata-rata ekstrak *H. verticillata* $= \frac{6{,}8450\%+6{,}3896\%+6{,}2502\%}{3} = 6{,}4949\%$

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

L4.4 *Yield* Hasil Hidrolisis dan Partisi

Tabel L.4.4 Data hasil *yield* fraksi etil asetat dan petroleum eter

Fraksi	Berat Ekstrak Metanol (g)	Berat Wadah (g)	Berat Wadah + Fraksi pekat (g)	Berat Fraksi Pekat (g)
Etil Asetat	5	150,2386	152,7433	2,5047
Petroleum Eter	5	118,5411	120,9686	2,4275

Yield Etil Asetat $= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}}$ x 100%

$= \frac{2{,}5047\ \text{g}}{5\ \text{g}}$ x 100%

= 50,094%

Yield Petroleum Eter $= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}}$ x 100%

$= \frac{2{,}4275\ \text{g}}{5\ \text{g}}$ x 100%

= 48,550%

L4.5 Data Hasil Uji Fitokimia

Tabel L.4.5 Hasil uji fitokimia masing-masing fraksi

Uji Golongan Senyawa Aktif	Fraksi	
	Etil Asetat	Petroleum Eter
Alkaloid		
-Meyer	-	-
-Dragendrof	-	-
Flavonoid	+	-
Saponin	-	-
Steroid	+	+
Triterpenoid	+	+
Tanin		
-FeCl 1%	-	-
-Gelatin	-	-

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Lampiran 5. Data Hasil KLTA dan KLTP

L5.1 Data Hasil KLTA

Nilai R_f dihitung dengan rumus:

$$\text{Nilai } R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

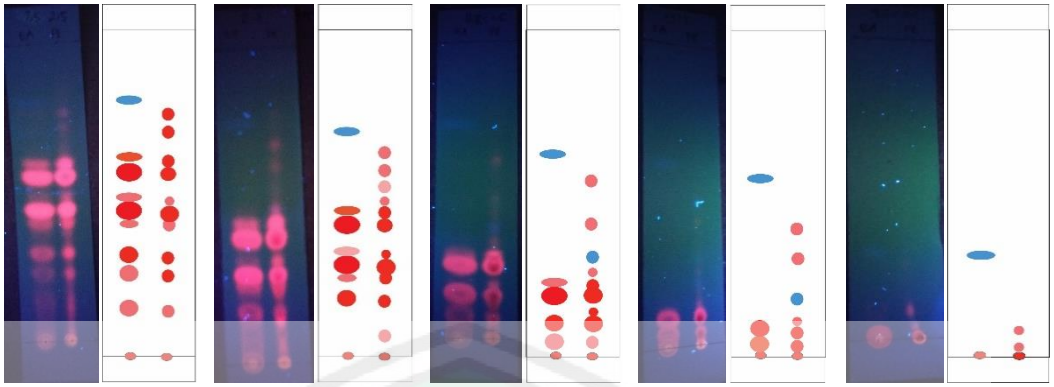
Tabel L.5.1 Hasil pemisahan KLTA fraksi etil asetat (EA) dan petroleum eter (PE)

Eluen	Fraksi	Jumlah Noda	Jarak Noda	Jarak Eluen	R_f	Warna	Dugaan Senyawa
n-heksana:Ea 7,5:2,5	EA	9	0,8	8	0,1	Merah	Triterpenoid
			1,8	8	0,225	Merah	Triterpenoid
			2,3	8	0,288	Merah	Triterpenoid
			3	8	0,375	Merah	Triterpenoid
			3,4	8	0,425	Merah	Triterpenoid
			3,7	8	0,463	Merah	Triterpenoid
			4,3	8	0,538	Merah	Triterpenoid
			4,7	8	0,588	Merah	Triterpenoid
			6,4	8	0,8	**Biru**	**Steroid**
	PE	10	1	8	0,125	Merah	Triterpenoid
			1,7	8	0,213	Merah	Triterpenoid
			2,3	8	0,288	Merah	Triterpenoid
			3,1	8	0,388	Merah	Triterpenoid
			3,4	8	0,425	Merah	Triterpenoid
			3,7	8	0,463	Merah	Triterpenoid
			4,3	8	0,538	Merah	Triterpenoid
			4,7	8	0,588	Merah	Triterpenoid
			5,5	8	0,688	Merah	Triterpenoid
			5,9	8	0,738	Merah	Triterpenoid
n-heksana:Ea 8:2	EA	7	1,3	8	0,163	Merah	Triterpenoid
			1,8	8	0,225	Merah	Triterpenoid
			2,2	8	0,275	Merah	Triterpenoid
			2,5	8	0,313	Merah	Triterpenoid
			3,1	8	0,388	Merah	Triterpenoid
			3,4	8	0,425	Merah	Triterpenoid
			6	8	0,75	**Biru**	**Steroid**
	PE	11	0,3	8	0,038	Merah	Triterpenoid
			1	8	0,125	Merah	Triterpenoid
			1,3	8	0,163	Merah	Triterpenoid
			1,8	8	0,225	Merah	Triterpenoid

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

			2,2	8	0,275	Merah	Triterpenoid
			2,5	8	0,313	Merah	Triterpenoid
			3,1	8	0,388	Merah	Triterpenoid
			3,5	8	0,438	Merah	Triterpenoid
			3,7	8	0,463	Merah	Triterpenoid
			4,9	8	0,613	Merah	Triterpenoid
			5,4	8	0,675	Merah	Triterpenoid
n-heksana:Ea 8,5:1,5	EA	5	0,6	8	0,075	Merah	Triterpenoid
			1,2	8	0,15	Merah	Triterpenoid
			1,9	8	0,238	Merah	Triterpenoid
			2,2	8	0,275	Merah	Triterpenoid
			5,6	8	0,7	**Biru**	**Steroid**
	PE	9	0,5	8	0,063	Merah	Triterpenoid
			1	8	0,125	Merah	Triterpenoid
			1,3	8	0,163	Merah	Triterpenoid
			1,8	8	0,225	Merah	Triterpenoid
			2,1	8	0,263	Merah	Triterpenoid
			2,4	8	0,3	Merah	Triterpenoid
			2,9	8	0,363	**Biru**	**Steroid**
			3,5	8	0,438	Merah	Triterpenoid
			4,8	8	0,6	Merah	Triterpenoid
n-heksana:Ea 9:1	EA	3	0,3	8	0,038	Merah	Triterpenoid
			0,7	8	0,088	Merah	Triterpenoid
			4,6	8	0,575	**Biru**	**Steroid**
	PE	6	0,3	8	0,038	Merah	Triterpenoid
			0,8	8	0,1	Merah	Triterpenoid
			1,1	8	0,138	Merah	Triterpenoid
			1,6	8	0,2	**Biru**	**Steroid**
			2,2	8	0,275	Merah	Triterpenoid
			3,1	8	0,388	Merah	Triterpenoid
n-heksana:Ea 9,5:0,5	EA	1	2,2	8	0,275	**Biru**	**Steroid**
	PE	2	0,3	8	0,038	Merah	Triterpenoid
			0,7	8	0,088	Merah	Triterpenoid

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



15:5 16:4 17:3 18:2 19:1

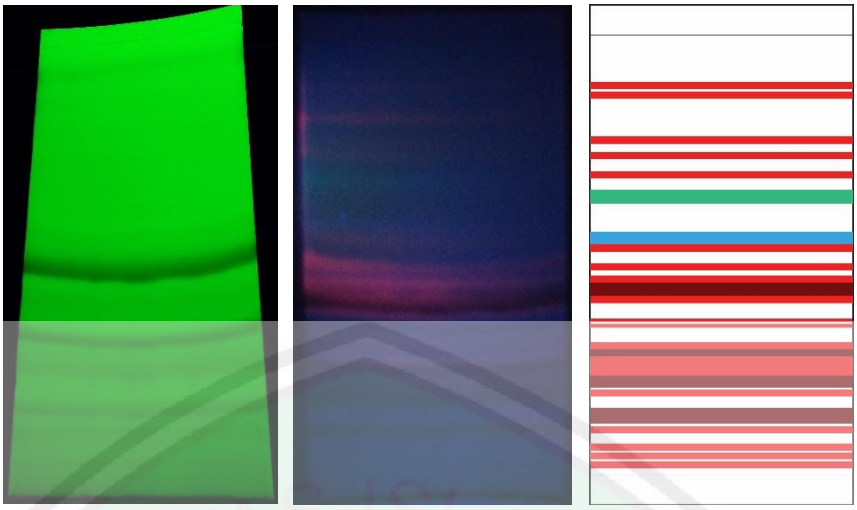
Gambar L.5.1 Ilustrasi penampakan noda KLTA pada 366 nm

L5.2 Data Hasil KLTP

Tabel L.5.2 Hasil KLTP fraksi petroleum eter eluen *n*-heksana:EA (16:4)

No	Jarak Noda	Jarak Pelarut	R_f	Warna Noda 366 nm	Dugaan Senyawa
1	0,36	18	0,02	Merah	Triterpenoid
2	0,76	18	0,042	Merah	Triterpenoid
3	1,1	18	0,061	Merah	Triterpenoid
4	2,14	18	0,119	Merah	Triterpenoid
5	2,95	18	0,164	Merah	Triterpenoid
6	3,85	18	0,214	Merah	Triterpenoid
7	4,19	18	0,233	Merah	Triterpenoid
8	4,81	18	0,267	Merah	Triterpenoid
9	5,35	18	0,297	Merah	Triterpenoid
10	5,71	18	0,317	Merah	Triterpenoid
11	6,64	18	0,369	Merah	Triterpenoid
12	6,89	18	0,383	Merah	Triterpenoid
13	7,6	18	0,422	Merah	Triterpenoid
14	8,05	18	0,447	Merah	Triterpenoid
15	8,66	18	0,481	Merah	Triterpenoid
16	9,45	18	0,525	Merah	Triterpenoid
17	10,4	18	0,578	Merah	Triterpenoid
18	**10,8**	**18**	**0,6**	**Biru kehijauan**	**Steroid**
19	**12,7**	**18**	**0,703**	**Hijau**	**Steroid**
20	13,6	18	0,758	Merah	Triterpenoid
21	14,3	18	0,792	Merah	Triterpenoid
22	15	18	0,836	Merah	Triterpenoid
23	16,3	18	0,906	Merah	Triterpenoid
24	16,8	18	0,931	Merah	Triterpenoid

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

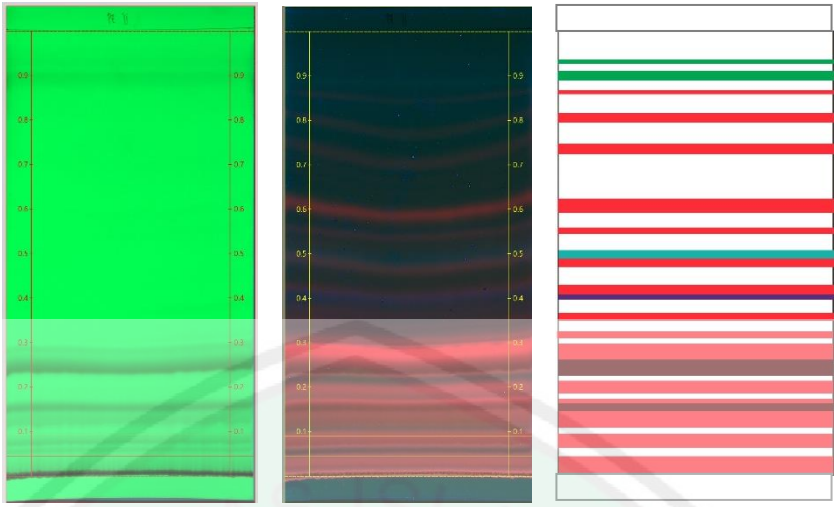


Gambar L.5.2 Hasil KLTP fraksi petroleum eter menggunakan eluen heksana:etil asetat (16:4)

Tabel L.5.3 Hasil KLTP fraksi petroleum eter eluen *n*-heksana:EA (17:3)

No	Jarak Noda	Jarak Pelarut	R_f	Warna Noda 366 nm	Dugaan Senyawa
1	0,56	18	0,031	Merah	Triterpenoid
2	1,6	18	0,089	Merah	Triterpenoid
3	2,39	18	0,133	Merah	Triterpenoid
4	2,75	18	0,153	Merah	Triterpenoid
5	3,01	18	0,167	Merah	Triterpenoid
6	3,49	18	0,194	Merah	Triterpenoid
7	4,9	18	0,272	Merah	Triterpenoid
8	5,11	18	0,284	Merah	Triterpenoid
9	5,65	18	0,314	Merah	Triterpenoid
10	6,3	18	0,350	Merah	Triterpenoid
11	**7,25**	**18**	**0,403**	**Biru keunguan**	**Steroid**
12	7,6	18	0,422	Merah	Triterpenoid
13	8,69	18	0,483	Merah	Triterpenoid
14	**8,89**	**18**	**0,494**	**Biru kehijauan**	**Steroid**
15	10,1	18	0,561	Merah	Triterpenoid
16	11,3	18	0,627	Merah	Triterpenoid
17	13,6	18	0,755	Merah	Triterpenoid
18	14,6	18	0,810	Merah	Triteroenoid
19	15,8	18	0,875	Merah	Triteroenoid
20	**16,1**	**18**	**0,894**	**Hijau**	**Steroid**
21	**16,9**	**18**	**0,938**	**Hijau**	**Steroid**

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

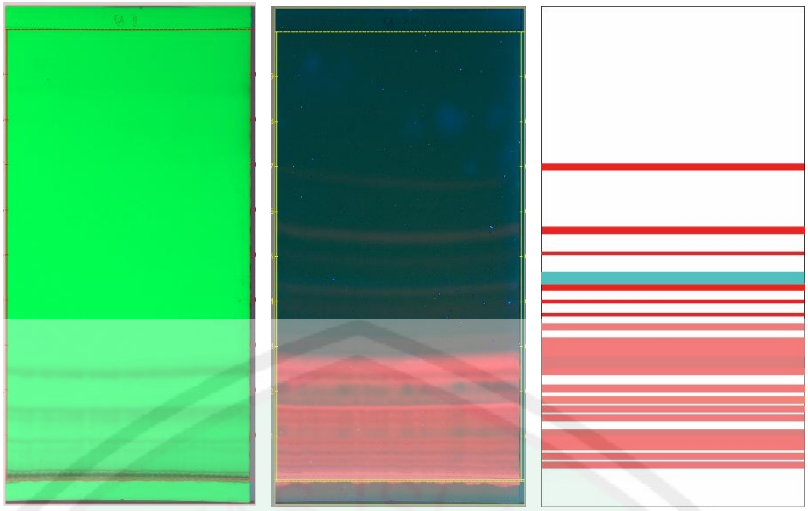


Gambar L.5.3 Hasil KLTP fraksi petroleum eter menggunakan eluen heksana:etil asetat (17:3)

Tabel L.5.4 Hasil KLTP fraksi etil asetat eluen *n*-heksana:EA (17:3)

No	Jarak Noda	Jarak Pelarut	R_f	Warna Noda 366 nm	Dugaan Senyawa
1	0,67	18	0,037	Merah	Triterpenoid
2	0,94	18	0,052	Merah	Triterpenoid
3	1,35	18	0,075	Merah	Triterpenoid
4	1,49	18	0,083	Merah	Triterpenoid
5	2,23	18	0,124	Merah	Triterpenoid
6	2,65	18	0,147	Merah	Triterpenoid
7	3,22	18	0,179	Merah	Triterpenoid
8	3,4	18	0,189	Merah	Triterpenoid
9	4,19	18	0,233	Merah	Triterpenoid
10	4,46	18	0,248	Merah	Triterpenoid
11	4,75	18	0,264	Merah	Triterpenoid
12	5,62	18	0,312	Merah	Triterpenoid
13	6,32	18	0,351	Merah	Triterpenoid
14	7,4	18	0,411	Merah	Triterpenoid
15	7,7	18	0,428	Merah	Triterpenoid
16	**8,1**	**18**	**0,450**	**Biru kehijauan**	**Steroid**
17	9,09	18	0,505	Merah	Triterpenoid
18	10	18	0,556	Merah	Triteroenoid
19	12,1	18	0,674	Merah	Triteroenoid

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



Gambar L.5.4 Hasil KLTP fraksi etil asetat menggunakan eluen heksana:etil asetat (17:3)

Lampiran 6. Data Hasil Uji Toksisitas

L6.1 Perhitungan Uji Toksisitas

Nilai %Mortalitas dan Mortalitas dihitung dengan rumus:

$$\%\text{Mortalitas} = \frac{\text{Modus}}{\text{Jumlah larva dalam 1 vial (10)}} \text{ x } 100\%$$

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

Tabel L.6.1 Hasil uji toksisitas fraksi EA dan isolat steroid EA

Konsentrasi (ppm)	Fraksi EA		Isolat EA	
	Modus (ekor)	% Mortalitas	Modus (ekor)	% Mortalitas
0*	0	0	0	0
0**	0	0	0	0
0	0	0	0	0
1	1	1	10	10
2	1	2	10	20
3	1	2	10	20
4	1	2	10	20
5	2	2	20	20

Keterangan: 0 = Kontrol tanpa isolat
0* = Kontrol Pelarut
0** = Kontrol DMSO

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Tabel L.6.2 Hasil uji toksisitas fraksi PE, isolat steroid PE_1, isolat steroid PE_2, isolat steroid PE_3, isolat steroid PE_4

Konsentrasi (ppm)	Fraksi PE		Isolat PE_1		Isolat PE_2		Isolat PE_3		Isolat PE_4	
	Modus	%M	Modus	%M	Modus	%M	Modus	%M	Modus	%M
0*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	1	10	0	0	0	0
2	0	0	1	10	1	10	1	10	1	10
3	0	0	1	10	1	10	2	20	2	20
4	1	10	1	10	2	20	2	20	2	20
5	1	10	2	20	3	30	2	20	3	30

Keterangan: 0 = Kontrol tanpa isolat
0* = Kontrol Pelarut
0** = Kontrol DMSO
%M= %Mortalitas

Tabel L.6.3 Nilai LC_{50} sampel uji

Sampel Uji	Nilai LC_{50} (ppm)	Kategori
Fraksi etil asetat (EA)	15,0155	Sangat toksik
Isolat steroid EA	**14,7943**	**Sangat toksik**
Fraksi petroleum eter (PE)	7,06102	Sangat toksik
Isolat steroid PE_1	8,42353	Sangat toksik
Isolat steroid PE_2	7,95194	Sangat toksik
Isolat steroid PE_3	7,55361	Sangat toksik
Isolat steroid PE_4	**6,34832**	**Sangat toksik**

L6.2 Data Hasil Uji Toksisitas Fraksi EA

Tabel L.6.4 Data hasil uji fraksi EA

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

Keterangan: 0 = Kontrol tanpa isolat
0* = Kontrol Pelarut
0** = Kontrol DMSO

Probit Analysis: Mortalitas; N versus Konsentrasi

```
Distribution:   Normal
```

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas	Event	30
	Non-event	220
N	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1,48257	0,253249	-5,85	0,000
Konsentrasi	0,0987356	0,0727664	1,36	0,175
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -90,800

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	1,50602	3	0,681
Deviance	1,52741	3	0,676

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95,0% Normal CI Lower	Upper
Mean	15,0155	8,78682	-2,20632	32,2374
StDev	10,1281	7,46420	2,38894	42,9385

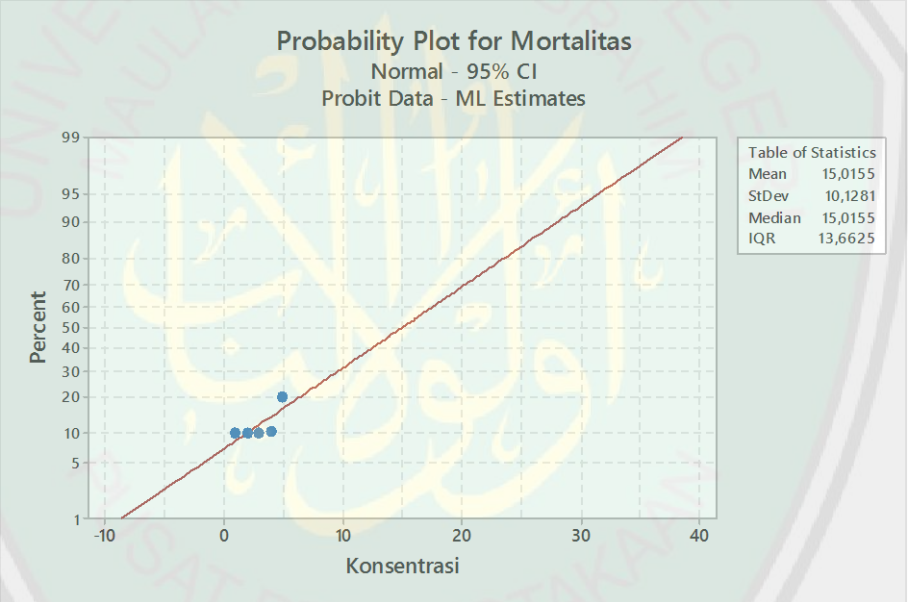
Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95,0% Fiducial CI Lower	Upper
1	-8,54586	8,70312	*	*
2	-5,78497	6,68761	*	*
3	-4,03326	5,41630	*	*
4	-2,71553	4,46738	*	*
5	-1,64365	3,70402	*	*
6	-0,731315	3,06491	*	*
7	0,0686252	2,51882	*	*
8	0,784876	2,05040	*	*
9	1,43628	1,65574	*	*
10	2,03589	1,34258	*	*
20	6,49153	2,65692	*	*
30	9,70436	4,92254	*	*

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

40	12,4496	6,91290	*	*
50	15,0155	8,78682	*	*
60	17,5814	10,6668	*	*
70	20,3267	12,6818	*	*
80	23,5395	15,0428	*	*
90	27,9952	18,3200	*	*
91	28,5948	18,7612	*	*
92	29,2462	19,2405	*	*
93	29,9624	19,7676	*	*
94	30,7624	20,3564	*	*
95	31,6747	21,0279	*	*
96	32,7466	21,8169	*	*
97	34,0643	22,7870	*	*
98	35,8160	24,0766	*	*
99	38,5769	26,1096	*	*

Probability Plot for Mortalitas



L6.3 Data Hasil Uji Toksisitas Fraksi PE

Tabel L.6.5 Data hasil uji fraksi PE

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

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4	1	0	1	1	0	1	10	5
5	0	1	1	1	1	1	10	5

Keterangan: 0 = Kontrol tanpa isolat
0* = Kontrol Pelarut
0** = Kontrol DMSO

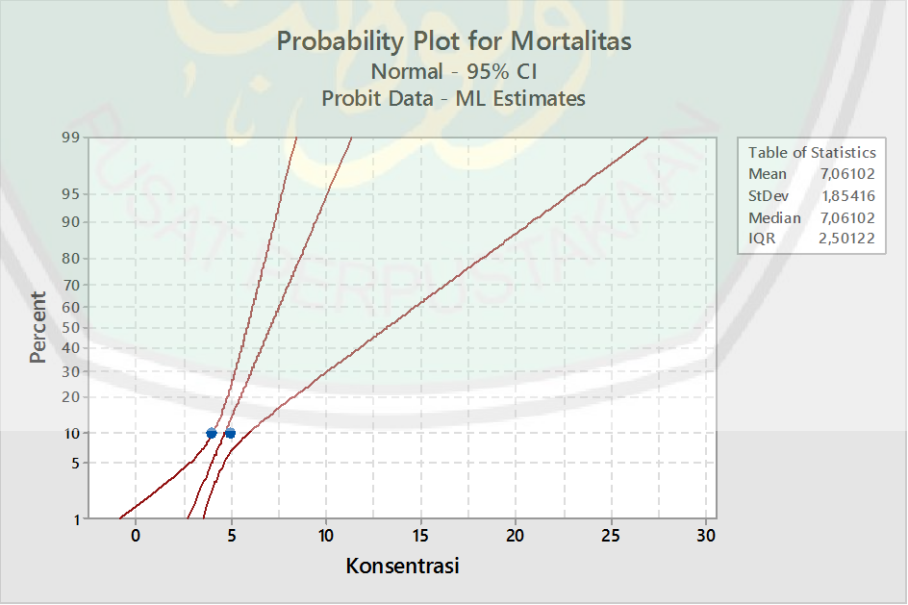
Probit Analysis: Mortalitas; N versus Konsentrasi

```
Distribution:   Normal

Response Information

Variable    Value      Count
Mortalitas  Event         10
            Non-event    240
N           Total        250

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table
                          Standard
Variable          Coef       Error       Z       P
Constant     -3,80821    0,831455   -4,58   0,000
Konsentrasi   0,539328    0,189346    2,85   0,004
Natural
Response             0

Log-Likelihood = -34,735

Goodness-of-Fit Tests

Method    Chi-Square  DF      P
Pearson      4,11478   3  0,249
Deviance     4,45363   3  0,216

Tolerance Distribution

Parameter Estimates
                      Standard   95,0% Normal CI
Parameter  Estimate      Error     Lower    Upper
Mean         7,06102   1,01306   5,07547  9,04658
StDev        1,85416  0,650952  0,931772  3,68964

Table of Percentiles
                      Standard   95,0% Fiducial CI
Percent  Percentile      Error       Lower    Upper
      1     2,74761  0,624853  -0,848032  3,53985
      2     3,25305  0,477198   0,706329  3,90542
      3     3,57374  0,396395    1,65780  4,17209
```

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4	3,81498	0,347471	2,33576	4,41048
5	4,01121	0,318926	2,84441	4,64722
6	4,17823	0,304961	3,23129	4,89478
7	4,32467	0,301695	3,52610	5,15625
8	4,45580	0,306157	3,75240	5,42803
9	4,57505	0,316037	3,92951	5,70390
10	4,68483	0,329600	4,07206	5,97832
20	5,50053	0,516482	4,81389	8,33495
30	6,08870	0,694653	5,22381	10,1592
40	6,59128	0,857026	5,55075	11,7413
50	7,06102	1,01306	5,84712	13,2293
60	7,53077	1,17152	6,13840	14,7224
70	8,03335	1,34279	6,44648	16,3233
80	8,62152	1,54470	6,80403	18,2000
90	9,43722	1,82642	7,29647	20,8060
91	9,54700	1,86444	7,36252	21,1569
92	9,66625	1,90577	7,43423	21,5382
93	9,79737	1,95123	7,51303	21,9575
94	9,94382	2,00205	7,60097	22,4258
95	10,1108	2,06003	7,70120	22,9600
96	10,3071	2,12821	7,81886	23,5878
97	10,5483	2,21208	7,96339	24,3596
98	10,8690	2,32366	8,15533	25,3858
99	11,3744	2,49972	8,45750	27,0035

Probability Plot for Mortalitas



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

L6.4 Data Hasil Uji Toksisitas Isolat EA

Tabel L.6.6 Data hasil uji isolat EA

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

Keterangan: 0 = Kontrol tanpa isolat
0* = Kontrol Pelarut
0** = Kontrol DMSO

Probit Analysis: Mortalitas; N versus Konsentrasi

```
Distribution:   Normal

Response Information

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

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table
                              Standard
Variable          Coef         Error       Z       P
Constant      -1,15528      0,226907   -5,09   0,000
Konsentrasi  0,0780894     0,0665522    1,17   0,241
Natural
Response              0

Log-Likelihood = -117,156

Goodness-of-Fit Tests

Method     Chi-Square  DF       P
Pearson       1,61757   3   0,655
Deviance      1,64266   3   0,650

Tolerance Distribution
```

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Parameter Estimates

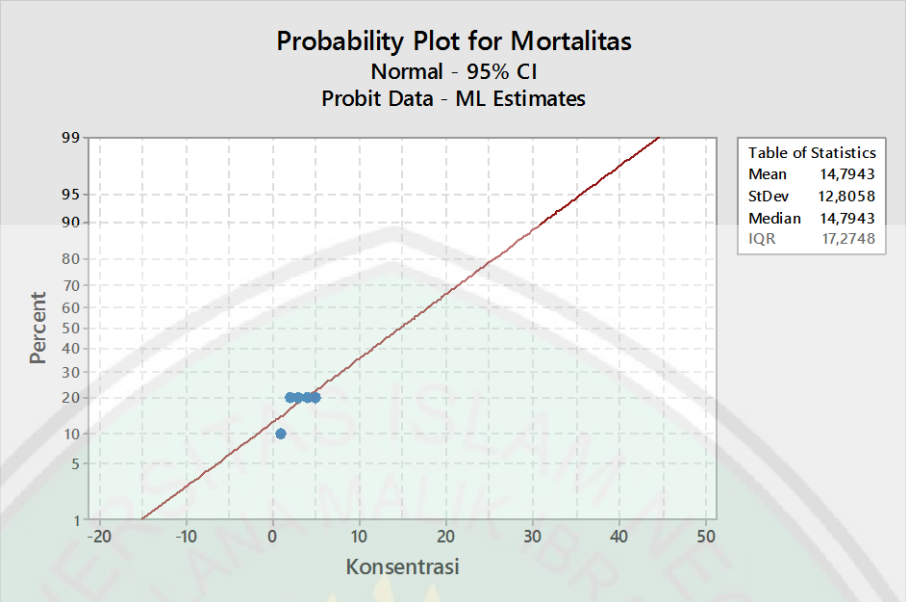
Parameter	Estimate	Standard Error	95,0% Normal CI Lower	Upper
Mean	14,7943	10,0281	-4,86041	34,4490
StDev	12,8058	10,9138	2,40972	68,0533

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95,0% Fiducial CI Lower	Upper
1	-14,9965	15,4778	*	*
2	-11,5056	12,5136	*	*
3	-9,29081	10,6361	*	*
4	-7,62468	9,22636	*	*
5	-6,26941	8,08232	*	*
6	-5,11586	7,11138	*	*
7	-4,10442	6,26317	*	*
8	-3,19880	5,50735	*	*
9	-2,37517	4,82435	*	*
10	-1,61702	4,20117	*	*
20	4,01665	1,41788	*	*
30	8,07892	4,39796	*	*
40	11,5500	7,29000	*	*
50	14,7943	10,0281	*	*
60	18,0386	12,7778	*	*
70	21,5097	15,7256	*	*
80	25,5720	19,1796	*	*
90	31,2056	23,9735	*	*
91	31,9638	24,6189	*	*
92	32,7874	25,3200	*	*
93	33,6930	26,0910	*	*
94	34,7045	26,9521	*	*
95	35,8580	27,9343	*	*
96	37,2133	29,0884	*	*
97	38,8794	30,5072	*	*
98	41,0943	32,3935	*	*
99	44,5851	35,3667	*	*

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Probability Plot for Mortalitas



L6.5 Data Hasil Uji Toksisitas Isolat PE_1

Tabel L.6.7 Data hasil uji isolat PE_1

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

Keterangan: 0 = Kontrol tanpa isolat
0* = Kontrol Pelarut
0** = Kontrol DMSO

Probit Analysis: Mortalitas; N versus Konsentrasi

```
Distribution:   Normal

Response Information

Variable    Value       Count
Mortalitas  Event          25
            Non-event     225
```

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

N Total 250

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-2,11392	0,319625	-6,61	0,000
Konsentrasi	0,250954	0,0853619	2,94	0,003

Natural Response 0

Log-Likelihood = -76,549

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	4,35256	3	0,226
Deviance	5,53363	3	0,137

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95,0% Normal CI Lower	Upper
Mean	8,42353	1,73046	5,03188	11,8152
StDev	3,98479	1,35542	2,04583	7,76140

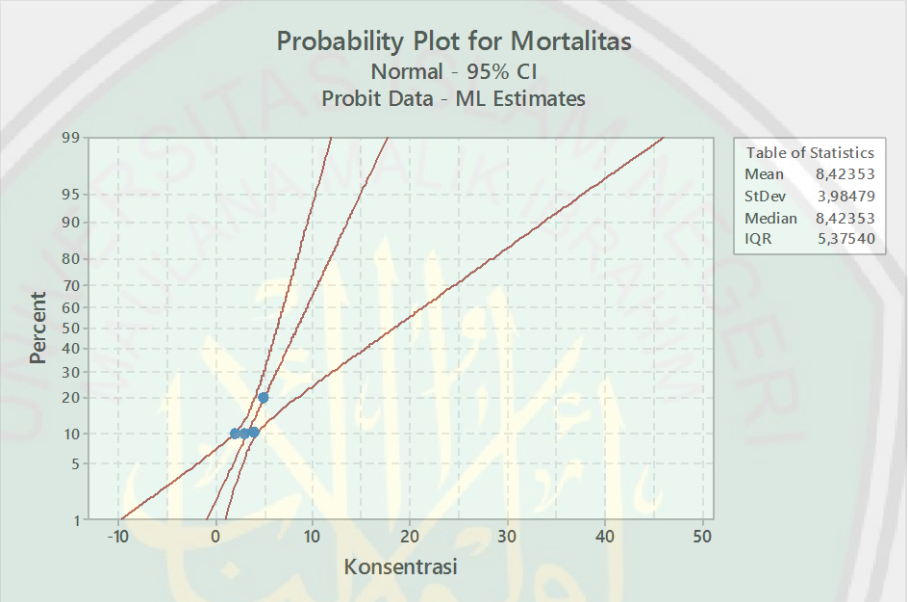
Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95,0% Fiducial CI Lower	Upper
1	-0,846475	1,54665	-9,68512	1,02499
2	0,239774	1,19757	-6,46779	1,71827
3	0,928964	0,983850	-4,44324	2,17488
4	1,44741	0,830474	-2,93702	2,53514
5	1,86913	0,713586	-1,73085	2,84721
6	2,22808	0,622904	-0,727306	3,13592
7	2,54281	0,553422	0,123479	3,41820
8	2,82461	0,502536	0,848072	3,70812
9	3,08090	0,468648	1,46063	4,01822
10	3,31682	0,450300	1,97016	4,35801
20	5,06984	0,693465	4,10892	8,53035
30	6,33390	1,05957	5,00671	12,1833
40	7,41399	1,40144	5,70724	15,3712
50	8,42353	1,73046	6,34194	18,3710
60	9,43306	2,06417	6,96700	21,3803
70	10,5131	2,42419	7,62968	24,6061
80	11,7772	2,84793	8,40044	28,3861
90	13,5302	3,43815	9,46424	33,6334

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

91	13,7661	3,51773	9,60709	34,3398
92	14,0224	3,60422	9,76221	35,1074
93	14,3042	3,69936	9,93270	35,9514
94	14,6190	3,80566	10,1230	36,8941
95	14,9779	3,92694	10,3400	37,9694
96	15,3996	4,06949	10,5948	39,2329
97	15,9181	4,24483	10,9079	40,7863
98	16,6073	4,47803	11,3238	42,8515
99	17,6935	4,84582	11,9789	46,1071

Probability Plot for Mortalitas



L6.6 Data Hasil Uji Toksisitas Isolat PE_2

Tabel L.6.8 Data hasil uji isolat PE_2

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

Keterangan: 0 = Kontrol tanpa isolat
0* = Kontrol Pelarut
0** = Kontrol DMSO

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Probit Analysis: Mortalitas; N versus Konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas	Event	40
	Non-event	210
N	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1,66606	0,251741	-6,62	0,000
Konsentrasi	0,209516	0,0700135	2,99	0,003
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -105,256

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	1,81196	3	0,612
Deviance	1,85971	3	0,602

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95,0% Normal CI Lower	Upper
Mean	7,95194	1,61750	4,78169	11,1222
StDev	4,77290	1,59495	2,47935	9,18812

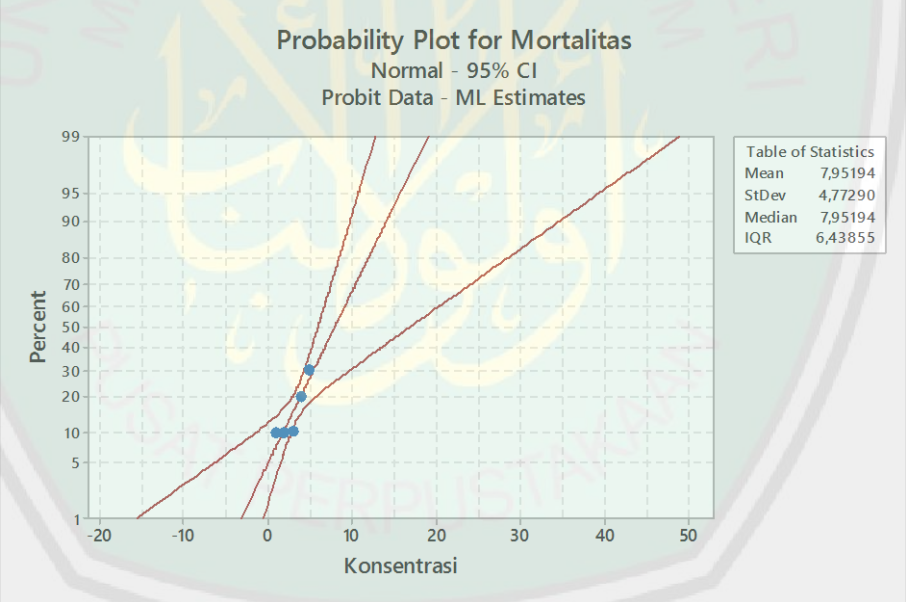
Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95,0% Fiducial CI Lower	Upper
1	-3,15150	2,21054	-15,5248	-0,494756
2	-1,85041	1,78782	-11,7780	0,315487
3	-1,02491	1,52314	-9,40806	0,836778
4	-0,403919	1,32703	-7,63148	1,23518
5	0,101209	1,17042	-6,19256	1,56544
6	0,531153	1,04013	-4,97436	1,85309
7	0,908129	0,929137	-3,91354	2,11261
8	1,24567	0,833383	-2,97214	2,35341
9	1,55264	0,750421	-2,12602	2,58245

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

10	1,83521	0,678811	-1,35941	2,80553
20	3,93496	0,508778	3,00096	5,79938
30	5,44902	0,851027	4,32390	9,77935
40	6,74274	1,23594	5,20576	13,4286
50	7,95194	1,61750	5,98218	16,8874
60	9,16114	2,00790	6,74025	20,3644
70	10,4548	2,43053	7,54123	24,0946
80	11,9689	2,92875	8,47141	28,4673
90	14,0687	3,62323	9,75434	34,5386
91	14,3512	3,71690	9,92658	35,3561
92	14,6582	3,81870	10,1136	36,2442
93	14,9957	3,93068	10,3192	37,2208
94	15,3727	4,05579	10,5486	38,3117
95	15,8027	4,19855	10,8102	39,5560
96	16,3078	4,36635	11,1174	41,0179
97	16,9288	4,57274	11,4949	42,8155
98	17,7543	4,84725	11,9963	45,2053
99	19,0554	5,28019	12,7861	48,9725

Probability Plot for Mortalitas



L6.7 Data Hasil Uji Toksisitas Isolat PE_3

Tabel L.6.9 Data hasil uji isolat PE_3

Konsentrasi (ppm)	Jumlah Larva yang Mati (Ekor)						%Mortalitas	Mortalitas
	I	II	III	IV	V	Modus		
0*	0	0	1	1	0	0	0	0
0**	0	0	1	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0	0

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

1	1	3	0	0	0	0	0	0
2	0	1	1	1	1	1	10	5
3	1	2	2	2	3	2	20	10
4	3	2	1	1	2	2	20	10
5	2	3	1	2	1	2	20	10

Keterangan: 0 = Kontrol tanpa isolat
0* = Kontrol Pelarut
0** = Kontrol DMSO

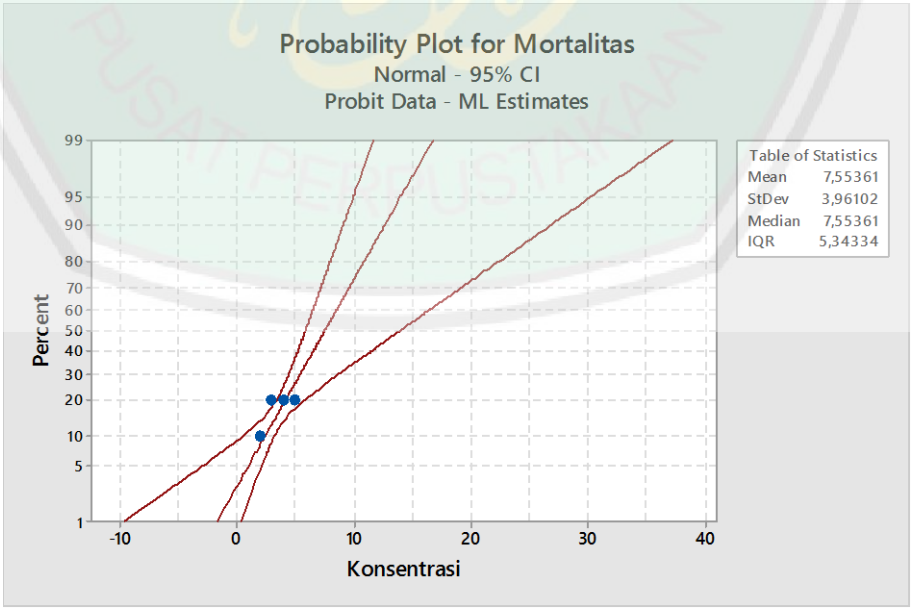
Probit Analysis: Mortalitas; N versus Konsentrasi

```
Distribution:   Normal

Response Information

Variable    Value      Count
Mortalitas  Event         35
            Non-event    215
N           Total        250

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

                          Standard
Variable        Coef         Error       Z      P
Constant    -1,90699      0,286816   -6,65  0,000
Konsentrasi  0,252460     0,0779765    3,24  0,001
Natural
Response            0

Log-Likelihood = -95,584

Goodness-of-Fit Tests

Method    Chi-Square  DF      P
Pearson      6,39296   3  0,094
Deviance     8,53820   3  0,036

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

                     Standard   95,0% Normal CI
Parameter  Estimate     Error    Lower    Upper
Mean        7,55361   1,33314  4,94070  10,1665
StDev       3,96102   1,22343  2,16222  7,25630


Table of Percentiles

                     Standard   95,0% Fiducial CI
```

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Percent	Percentile	Error	Lower	Upper
1	-1,66110	1,62601	-9,58493	0,362110
2	-0,581334	1,30552	-6,87486	1,06079
3	0,103746	1,10618	-5,16367	1,51234
4	0,619105	0,959689	-3,88373	1,85934
5	1,03831	0,843924	-2,84996	2,14897
6	1,39512	0,748937	-1,97799	2,40342
7	1,70797	0,669500	-1,22239	2,63546
8	1,98809	0,602652	-0,556242	2,85363
9	2,24285	0,546669	0,0372226	3,06442
10	2,47736	0,500565	0,568621	3,27334
20	4,21993	0,469535	3,43029	5,91284
30	5,47645	0,747168	4,47001	8,83984
40	6,55010	1,04190	5,21583	11,4834
50	7,55361	1,33314	5,87887	13,9884
60	8,55713	1,63130	6,52759	16,5077
70	9,63078	1,95435	7,21339	19,2113
80	10,8873	2,33549	8,00988	22,3816
90	12,6299	2,86715	9,10830	26,7843
91	12,8644	2,93888	9,25576	27,3772
92	13,1191	3,01684	9,41588	28,0213
93	13,3993	3,10261	9,59185	28,7296
94	13,7121	3,19844	9,78829	29,5209
95	14,0689	3,30780	10,0122	30,4233
96	14,4881	3,43635	10,2752	31,4838
97	15,0035	3,59448	10,5983	32,7876
98	15,6886	3,80482	11,0275	34,5212
99	16,7683	4,13660	11,7035	37,2539

Probability Plot for Mortalitas



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

L6.8 Data Hasil Uji Toksisitas Isolat PE_4

Tabel L.6.10 Data hasil uji isolat PE_4

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

Keterangan: 0 = Kontrol tanpa isolat
0* = Kontrol Pelarut
0** = Kontrol DMSO

Probit Analysis: Mortalitas; N versus Konsentrasi

```
Distribution:   Normal

Response Information

Variable    Value       Count
Mortalitas  Event          40
            Non-event     210
N           Total         250

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table
                          Standard
Variable        Coef         Error       Z       P
Constant    -2,08981    0,293655   -7,12   0,000
Konsentrasi  0,329192  0,0783216    4,20   0,000
Natural
Response            0

Log-Likelihood = -99,973

Goodness-of-Fit Tests

Method     Chi-Square  DF      P
Pearson       4,53730   3  0,209
Deviance      6,27015   3  0,099

Tolerance Distribution
```

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Parameter Estimates

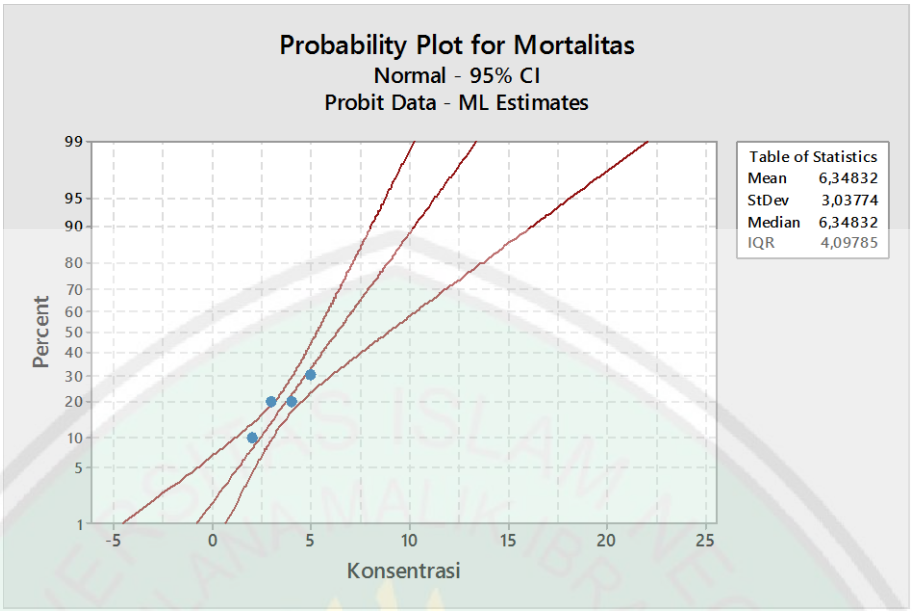
Parameter	Estimate	Standard Error	95,0% Normal CI Lower	Upper
Mean	6,34832	0,737492	4,90286	7,79377
StDev	3,03774	0,722743	1,90560	4,84250

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95,0% Fiducial CI Lower	Upper
1	-0,718530	1,05437	-4,51433	0,719157
2	0,109556	0,867590	-2,98311	1,30432
3	0,634950	0,751803	-2,01714	1,68113
4	1,03018	0,666898	-1,29503	1,96913
5	1,35167	0,599845	-0,711873	2,20763
6	1,62531	0,544736	-0,219711	2,41482
7	1,86524	0,498403	0,207488	2,60082
8	2,08007	0,458978	0,585408	2,77194
9	2,27545	0,425289	0,924173	2,93251
10	2,45529	0,396570	1,23064	3,08569
20	3,79169	0,310779	3,17336	4,55846
30	4,75532	0,422241	4,10125	6,09339
40	5,57871	0,575667	4,75216	7,54685
50	6,34832	0,737492	5,32034	8,94558
60	7,11792	0,907441	5,87160	10,3612
70	7,94131	1,09398	6,45177	11,8854
80	8,90495	1,31575	7,12381	13,6762
90	10,2413	1,62676	8,04893	16,1666
91	10,4212	1,66881	8,17303	16,5021
92	10,6166	1,71453	8,30777	16,8667
93	10,8314	1,76486	8,45583	17,2677
94	11,0713	1,82112	8,62109	17,7157
95	11,3450	1,88534	8,80944	18,2267
96	11,6665	1,96086	9,03059	18,8272
97	12,0617	2,05381	9,30227	19,5656
98	12,5871	2,17751	9,66313	20,5475
99	13,4152	2,37276	10,2314	22,0957

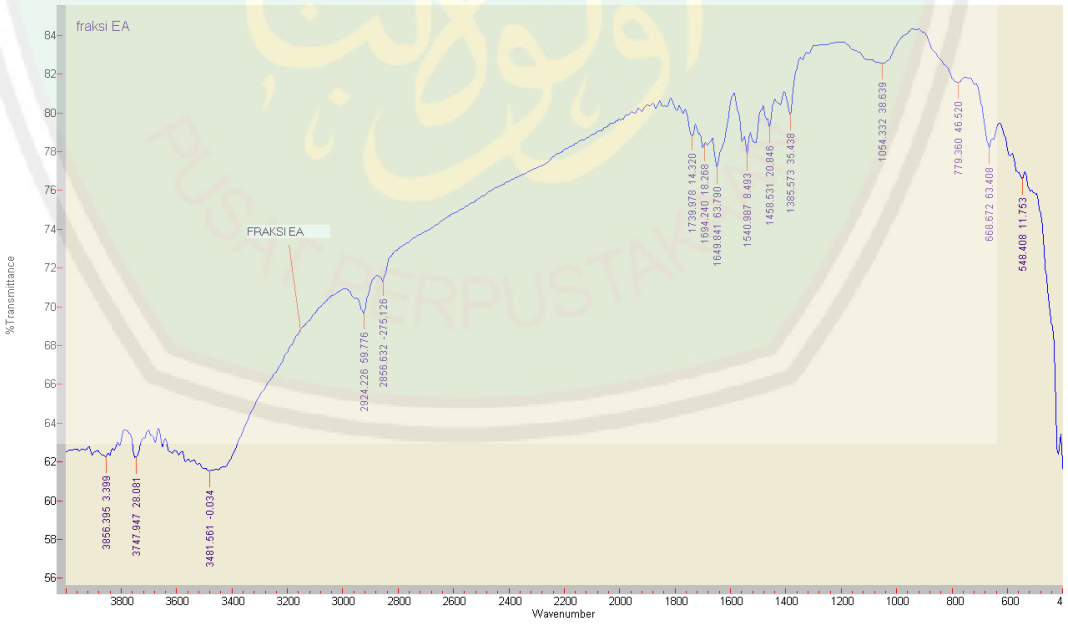
CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Probability Plot for Mortalitas



Lampiran 7. Spektrum Hasil Identifikasi Isolat Menggunakan FTIR

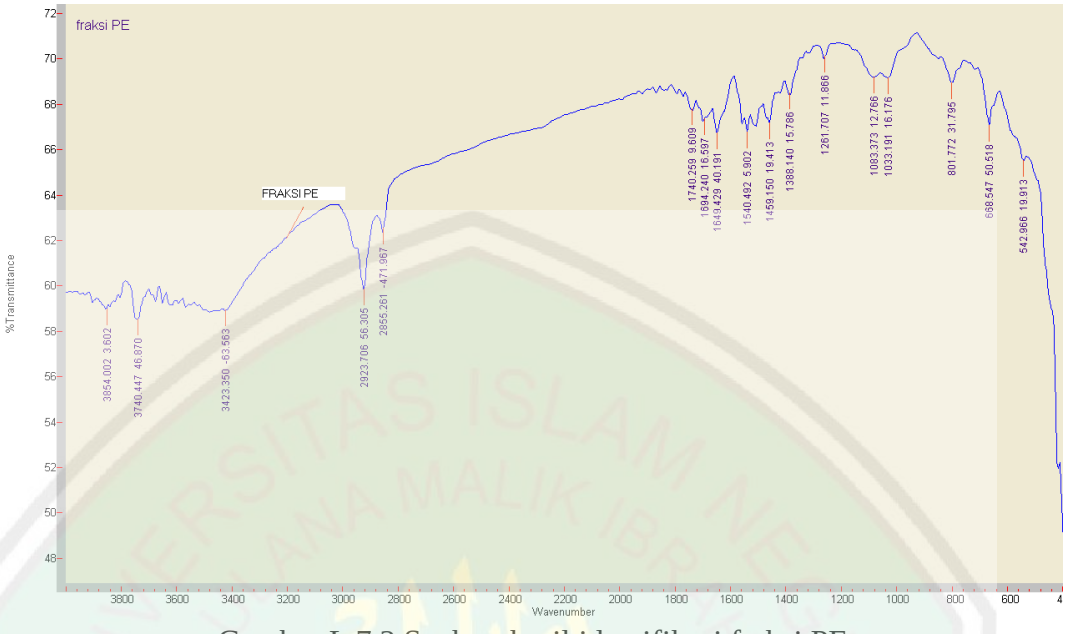
L7.1 Hasil Identifikasi Fraksi EA



Gambar L.7.1 Spektra hasil identifikasi fraksi EA

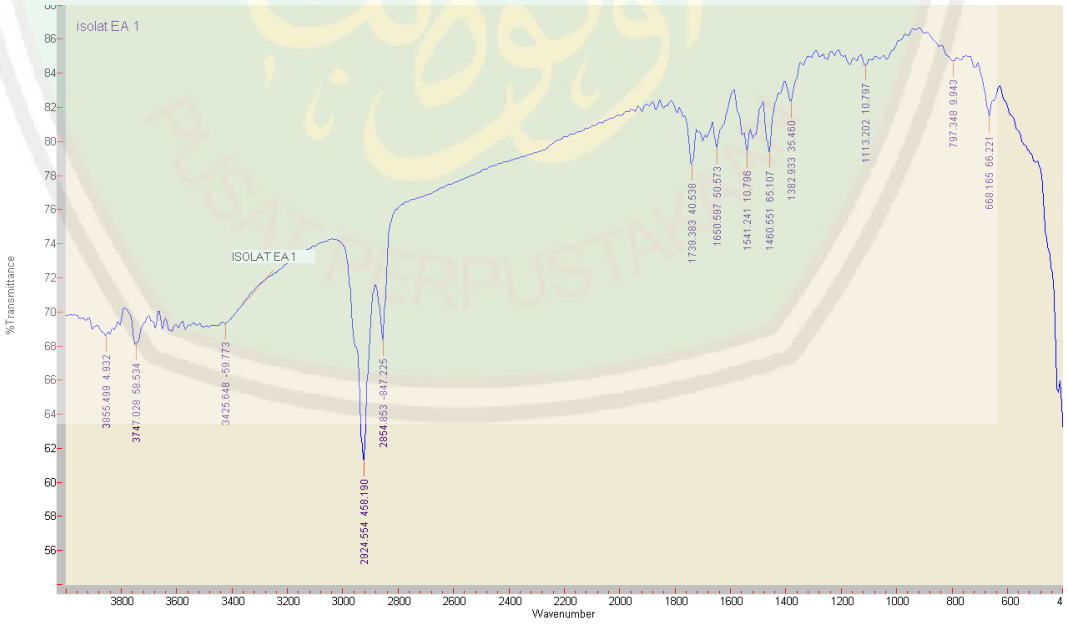
CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

L7.2 Hasil Identifikasi Fraksi PE



Gambar L.7.2 Spektra hasil identifikasi fraksi PE

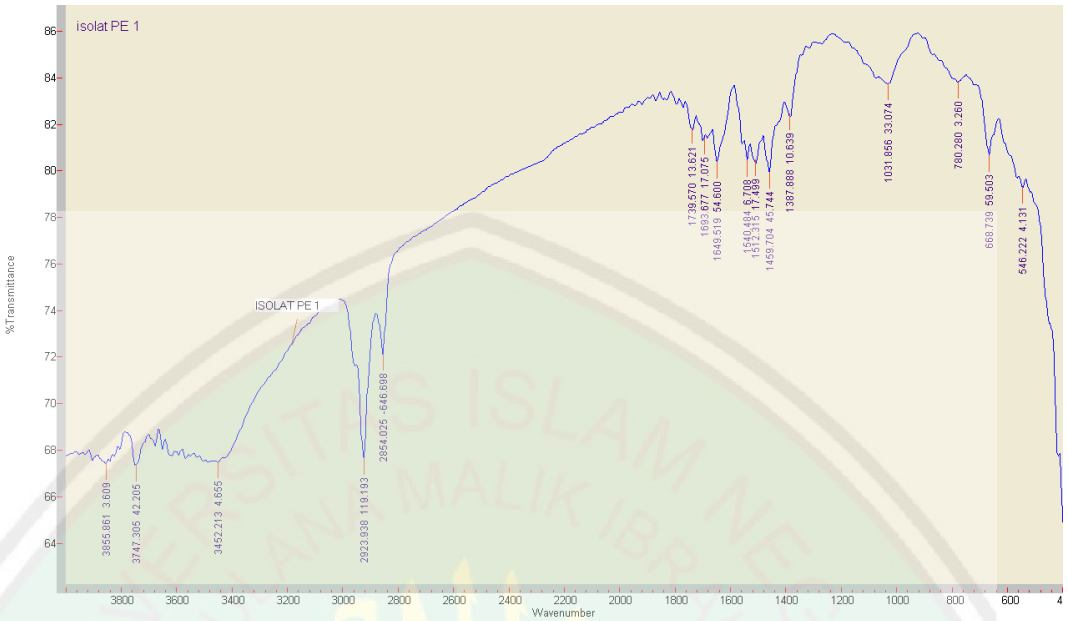
L7.3 Hasil Identifikasi Isolat EA



Gambar L.7.3 Spektra hasil identifikasi isolat EA

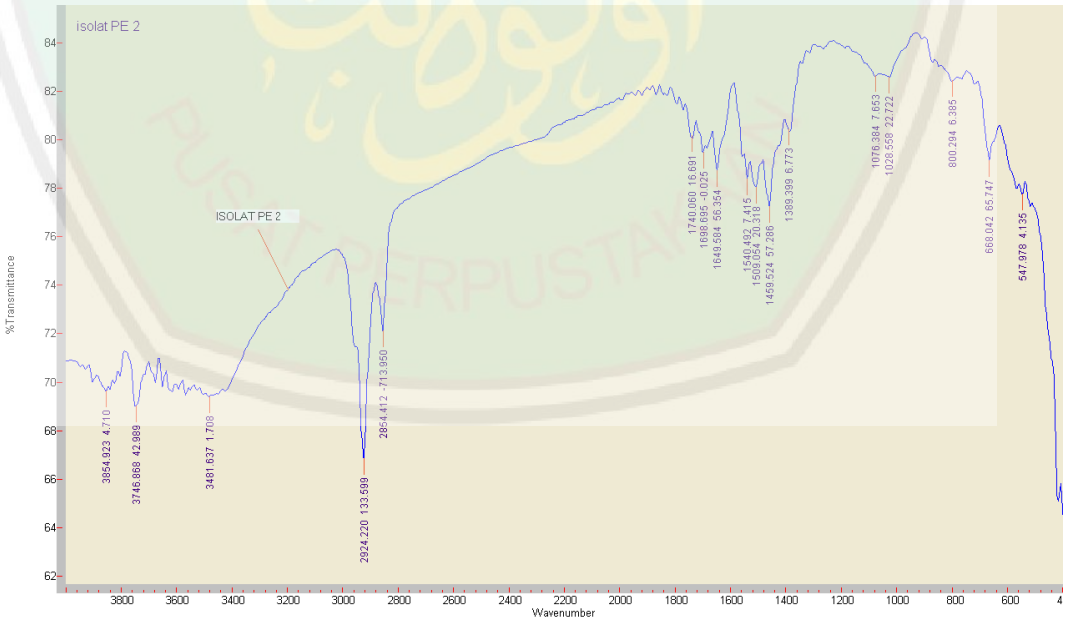
CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

L7.4 Hasil Identifikasi Isolat PE_1



Gambar L.7.4 Spektra hasil identifikasi isolat PE_1

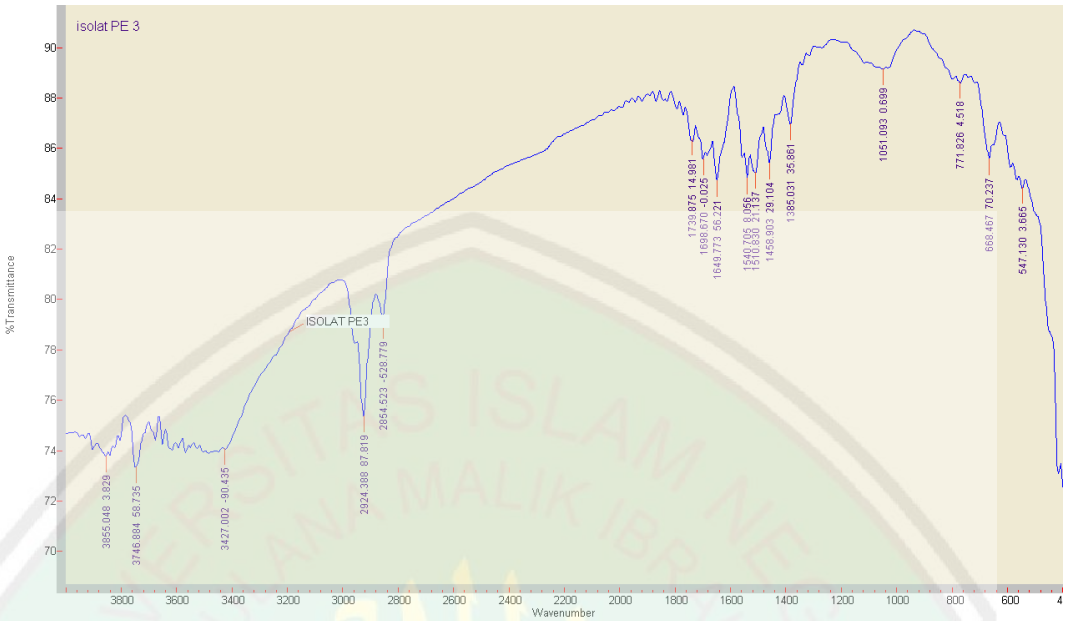
L7.5 Hasil Identifikasi Isolat PE_2



Gambar L.7.5 Spektra hasil identifikasi isolat PE_2

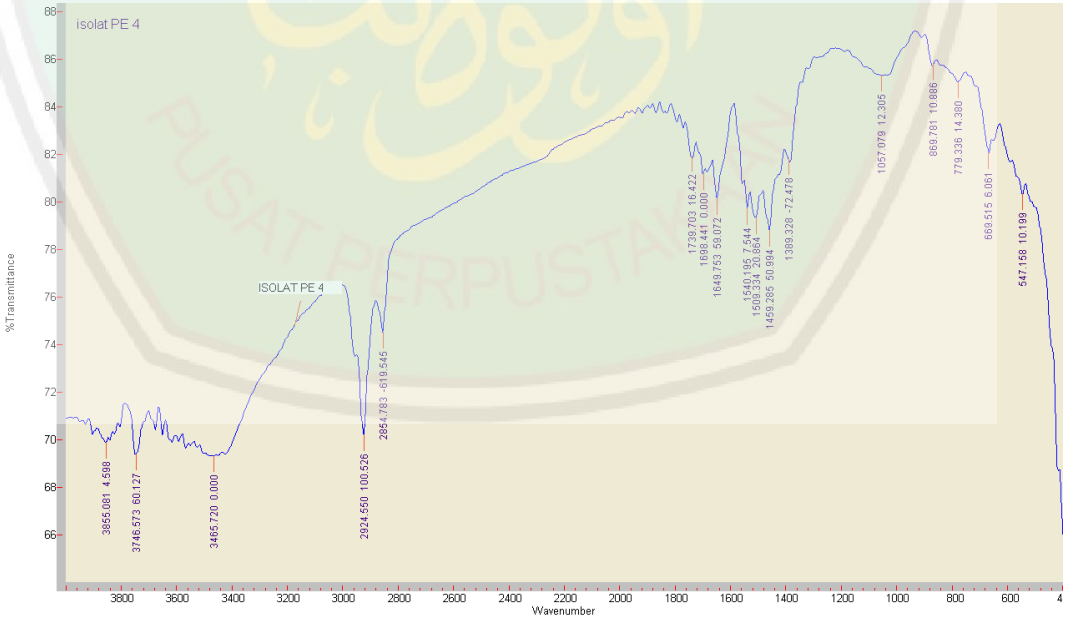
CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

L7.6 Hasil Identifikasi Isolat PE_3



Gambar L.7.6 Spektra hasil identifikasi isolat PE_3

L7.7 Hasil Identifikasi Isolat PE_4



Gambar L.7.7 Spektra hasil identifikasi isolat PE_4

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Lampiran 8. Dokumentasi

L8.1 Preparasi Sampel *H. verticillata*

Pencucian

Pengeringan

Serbuk *H. verticillata*

L8.2 Analisis Kadar Air

Pengovenan cawan kosong

Desikator cawan kosong

Penimbangan cawan kosong

Pengovenan cawan+sampel

Desikator cawan+sampel

Penimbangan cawan+sampel

L8.3 Ekstraksi Sampel

Proses ekstraksi maserasi + dishaker

Penyaringan

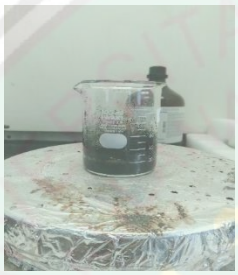
Pemekatan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Filtrat hasil penyaringan

Ekstrak pekat metanol

L8.4 Hidrolisis



Proses hidrolisis

Pembuatan larutan $NaHCO_3$ jenuh

Proses netralisasi

L8.5 Partisi

L8.5.1 Partisi dengan Pelarut Etil Asetat

Pengulangan 1

Pengulangan 2

Pengulangan 3

L8.5.2 Partisi dengan Pelarut Petroleum Eter

Pengulangan 1

Pengulangan 2

Pengulangan 3

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

L8.6 Uji Fitokimia

L8.6.1 Uji Alkaloid

Fraksi PE
Dragendrof (-)

Fraksi EA
Dragendrof (-)

Fraksi PE
Meyer (-)

Fraksi EA
Meyer (-)

L8.6.2 Uji Flavonoid

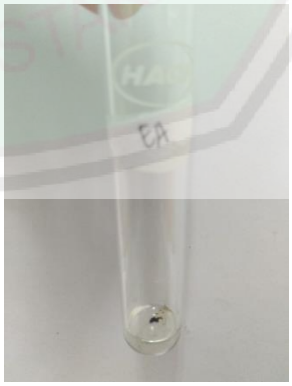
Fraksi PE
Flavonoid (-)

Fraksi EA
Flavonoid (+)

Fraksi PE-EA-
Ekstrak metanol

L8.6.3 Uji Saponin

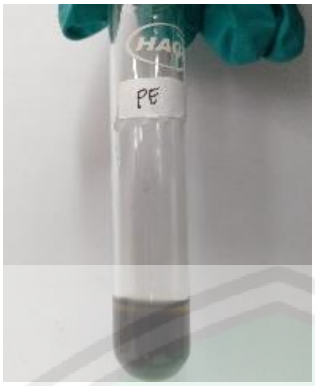
Fraksi PE
Saponin (-)



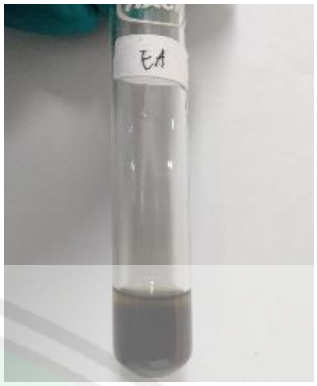
Fraksi EA
Saponin (-)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

L8.6.4 Uji Steroid/Triterpenoid



Fraksi PE
Steroid (+)
Triterpenoid (+)



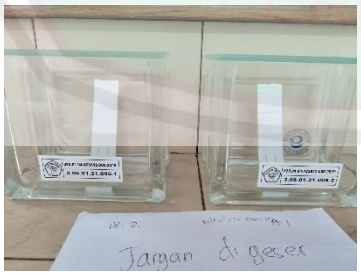
Fraksi EA
Steroid (+)
Triterpenoid (+)

L8.6.5 Uji Tanin

Fraksi PE
Gelatin (-)
$FeCl_3$ (-)

Fraksi EA
Gelatin (-)
$FeCl_3$ (-)

L8.7 Pemisahan dengan KLTA dan KLTP

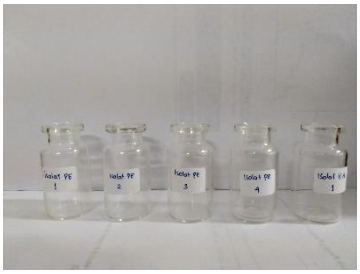


Elusi plat KLTA

Elusi plat
KLTP fraksi PE

Elusi plat KLTP
fraksi EA

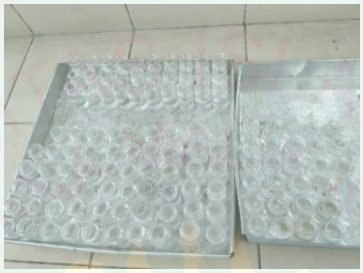
CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG



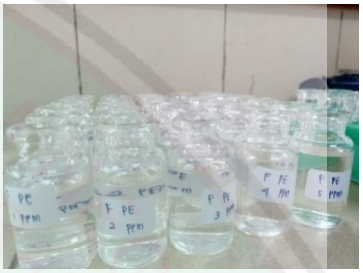
Isolat steroid
hasil KLTP

L8.8 Uji Toksisitas

Proses aerasi



Preparasi sampel uji



Proses uji toksisitas

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG