

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA STEROID HASIL  
KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI n-BUTANOL ALGA MERAH  
*Eucheuma cottonii***

**SKRIPSI**

Oleh:  
**ISMI KHOLIDAH**  
**NIM. 16630018**



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

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA STEROID HASIL  
KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI n-BUTANOL ALGA MERAH  
*Eucheuma cottonii***

**SKRIPSI**

Oleh:  
**ISMI KHOLIDAH**  
NIM. 16630018

Diajukan Kepada:  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang  
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana (S.Si)

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

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA STEROID HASIL  
KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI *n*-BUTANOLALGA MERAH  
*Euchemum cottonii*

SKRIPSI

Oleh:  
ISMI KHOLIDAH  
NIM. 16630018

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji  
Tanggal: 9 Desember 2020

Pembimbing I

Pembimbing II



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



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

Mengesahkan,  
Ketua Jurusan



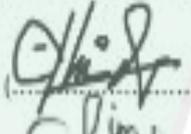
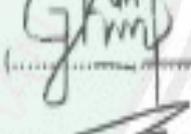
Elok Kasmah Hayati, M.Si  
NIP. 19790620 200604 2 002

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA STEROID HASIL  
KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI n-BUTANOL ALGA MERAH  
*Eucheama cottonii*

SKRIPSI

Oleh:  
ISMI KHOLIDAH  
NIM. 16630018

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 9 Desember 2020

Penguji Utama	: Diana Candra Dewi, M.Si NIP. 19770720 200312 2 001	
Ketua Penguji	: Ahmad Hanapl, S.Si., M.Sc NIDT. 19851225 20160801 1 069	
Sekretaris Penguji	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	
Anggota Penguji	: Dr. Akyumil Jannah, S.Si, M.P NIP. 19750410 200501 2 009	

Mengesahkan,  
Ketua Jurusan

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

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ismi Kholidah

NIM : 16630018

Jurusan : Sains dan Teknologi

Judu Penelitian : Uji Aktivitas Senyawa Steroid Hasil Kromatografi Kolom

Fraksi n-Butanol Alga Merah *Eucheuma cottonii*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan karya 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 dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 21 Desember 2020

Yang membuat pernyataan



Ismi Kholidah  
16630018

## KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Berkat dorongan, semangat, dan dukungan dari berbagai pihak khususnya dari ayahanda Mugiono dan Ibunda Siti Umadiyah merupakan kekuatan yang sangat besar hingga terselesaikannya skripsi ini dengan judul **“UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA STEROID HASIL KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI n-BUTANOL ALGA MERAH *Eucheuma cottonii*”**. Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada Nabi Muhamma SAW, keluarganya, sahabatnya dan para umat pengikutnya. Seiring dengan terselesaikannya skripsi ini dengan penuh rasa hormat, kesungguhan, dan kerendahan hati, penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag. selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si. selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si. selaku ketua jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si dan Ibu Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan ilmu, nasehat serta perhatiannya sehingga selesainya proposal penelitian ini.
5. Seluruh teman-teman Kimia A 2016 yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, namun tidak mengurangi arti keberadaan mereka, khususnya teman satu

penelitian bahan alam serta semua pihak yang telah memberikan motivasi dan dukungan selaman penyusunan proposal penelitian ini.

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

Malang, 19 November 2020

Penulis



## MOTTO

**“Today or tomorrow, you decide”**



## PERSEMBAHAN

### Assalamualaikum wr.wb

Bismillahirrahmanirrahim, Alhamdulillahirobbil 'alamin Penulis persembahkan skripsi ini untuk orang-orang tersayang,

- ✚ Ibu Siti Umayyah dan Bapak Mugiono yang senantiasa memberikan doa tulusnya, memberikan motivasi dan segala bantuan serta bimbingannya untuk penulis sehingga bisa mencapai titik saat ini.
- ✚ Ibu musayyadah, Bapak Mujab dan Paman Sabikh yang juga senantiasa memberikan doa tulusnya dan memberikan motivasi.
- ✚ Sahabat-sahabat penulis jangan disentuh mudah pecah khususnya Hidayahur Rohmah, Nur Hidayanti, Shonia Mahmassani N., Yeni Eliyati dan Faridatus Sholihah senantiasa mendengarkan keluh kesah.
- ✚ Sahabat-sahabat penulis dari MAN 1 Gresik khususnya Ifana Falaha S.Hub.int, Mailaturrobiatis sa'diyah, S.Pd dan M. Aminin Sabillah, S.Ars yang senantiasa mendengarkan keluh kesah.
- ✚ Sahabat-sahabat penulis Fitri Fatimah, Servita Ramadhianti dan Nanda Wulandari yang senantiasa mendengarkan keluh kesah.
- ✚ Sahabat-sahabat penulis Laylatul Ma'rufah, Vivi Ambar Kusuma Ningrum dan Shofiatu Sholehah yang juga senantiasa mendengarkan keluh kesah.

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>LEMBAR PERSETUJUAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>v</b>
<b>MOTTO</b> .....	<b>vii</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xv</b>
مستخلص البحث .....	<b>xvi</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1.Latar Belakang .....	1
1.2.Rumusan Masalah .....	6
1.3.Tujuan Penelitian .....	6
1.4.Batasan Masalah.....	7
1.5.Manfaat .....	7
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>9</b>
2.1.Alga Merah <i>Eucheumacottonii</i> .....	9
2.2.Steroid .....	12
2.3.Isolasi Senyawa Steroid .....	14
2.3.1 Ekstraksi Senyawa Steroid.....	14
2.3.2 Hidrolisis dan Partisi .....	16
2.3.3 Uji Fitokimia Senyawa Steroid .....	18
2.3.4 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom.....	19
2.3.5 Kromatografi Lapis Tipis pada Monitoring Senyawa Aktif .....	22
2.4.Uji Antioksidan <i>Eucheumacottonii</i> dengan metode DPPH .....	23
2.5.Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan UV-Vis .....	26
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	<b>28</b>
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	28
3.2 Alat dan Bahan.....	28
3.2.1 Alat.....	28
3.2.2 Bahan .....	28

3.3 Tahapan Penelitian .....	28
3.4 Cara Kerja .....	29
3.4.1 Preparasi Sampel .....	29
3.4.2 Penentuan Kadar Air Secara Termogravimetri .....	29
3.4.3 Ekstraksi Maserasi <i>Eucheumacottonii</i> .....	30
3.4.4 Hidrolisis dan Partisi .....	30
3.4.5 Uji Fitokimia Senyawa .....	31
3.4.5.1 Uji Fitokimi Senyawa Steroid dan Triterpenoid .....	31
3.4.5.2 Uji Fitokimia Senyawa Flavonoid .....	31
3.4.5.2 Uji Fitokimia Senyawa Alkaloid.....	31
3.4.6 Pemisahan Metode Kromatografi Kolom .....	32
3.4.6.1 Pembuatan Silika.....	32
3.4.6.2 Pemisahan Fraksi n-butanol <i>Eucheuma cottonii</i> .....	32
3.4.7 Monitoring Senyawa Steroid dengan KLTA .....	32
3.4.8 Uji Aktivitas Antioksidan pada Sampel.....	33
3.4.8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH.....	33
3.4.8.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel.....	35
3.4.9 Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis .....	35
3.5 Analisis Data .....	35
<b>BAB IV PEMBAHASAN.....</b>	<b>36</b>
4.1 Preparasi Sampel.....	36
4.2 Analisi Kadar Air .....	36
4.3 Ekstraksi Sampel.....	37
4.4 Hidrolisis dan Partisi .....	38
4.5 Uji Fitokimia .....	40
4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom dan Monitoring dengan KLTA.....	44
4.7 Uji Aktivitas Antioksidan .....	47
4.7.1 Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum.....	47
4.7.2 Penentuan Potensi Antioksidan Pada Sampel .....	48
4.8 Identifikasi Senyawa Steroid dengan UV-Vis .....	53
4.9 Pemanfaatan <i>E. cottonii</i> Dalam Perspektif Islam.....	54
<b>BAB V PENUTUP.....</b>	<b>58</b>
5.1 Penutup.....	58
5.2 Saran.....	58
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>60</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>70</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Eucheuma cottonii</i> .....	10
Gambar 2.2 Struktur senyawa steroid .....	13
Gambar 2.3 Dugaan reaksi antara HCl dengan natrium bikarbonat .....	17
Gambar 2.4 Persamaan <i>Van Deemter</i> .....	20
Gambar 2.5 Rumus penentuan waktu Retensi (Rf).....	22
Gambar 2.6 Reaksi antara antioksidan dengan DPPH.....	24
Gambar 4.1 Dugaan Reaksi Hidrolisis Pada Ikatan Glikosida .....	39
Gambar 4.2 Reaksi Dugaan Uji Triterpenoid .....	43
Gambar 4.3 Dugaan Reaksi Steroid dengan Liberman-Burchard.....	44
Gambar 4.4 Hasil Pengukuran Lambdha Maksimum DPPH.....	48
Gambar 4.5 Dugaan Reaksi steroid dengan DPPH.....	51
Gambar 4.6 Hasil Pengukuran serapan Maksimum Isolat A2 .....	53
Gambar 4.7 Hasil Pengukuran Serapan Maksimum Isolat A4 .....	53



## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi nutrisi pada <i>Eucheuma cottonii</i> .....	11
Tabel 2.2 Konstanta dielektrikum dan tingkat kelarutan beberapa pelarut.....	15
Tabel 2.3 Penentuan kekuatan antioksidasi .....	25
Tabel 4.1 Hasil Uji Fitokimia Fraksi n-butanol <i>Eucheuma cottonii</i> .....	41
Tabel 4.2 Hasil Monitoring dengan KLTA.....	46
Tabel 4.3 Nilai % Antioksidan Sampel dan EC <sub>50</sub> .....	50



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian .....	70
Lampiran 2 Diagram Alir .....	71
Lampiran 3 Pembuatan Reagen dan Larutan .....	77
Lampiran 4 Data Pengamatan dan Perhitungan .....	88
Lampiran 5 Hasil Monitoring KLTA .....	91
Lampiran 6 Pengujian Aktivitas Antioksidan .....	95
Lampiran 7 Hasil Identifikasi menggunakan UV-Vis .....	102
Lampiran 8 Dokumentasi Penelitian .....	104



## ABSTRAK

Kholidah, Ismi. 2019. **Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi n-Butanol Alga Merah *Eucheuma cottonii***. Proposal Penelitian. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya M.Si; Pembimbing II: Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P

---

**Kata kunci:** *Eucheuma cottonii*, Steroid, kromatografi kolom, DPPH, UV-Vis.

Alga merah (*Eucheuma cottonii*) memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder dengan manfaat yang beragam, salah satunya adalah steroid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada senyawa steroid menggunakan kromatografi kolom ekstrak n-butanol. Ekstraksi senyawa aktif steroid pada alga merah (*Eucheuma cottonii*) dapat diperoleh dengan metode maserasi dengan pelarut metanol. Ekstrak kasar dihidrolisis menggunakan HCL 2 N dan difraksinasi dengan pelarut n-butanool. Fraksi n-butanol diuji dengan reagen Lieberman-Burchard. kemudian dilakukan pemisahan dengan metode kromatografi kolom basah dengan variasi gradien (eluen n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 95:5 ; 90:10 ; 85:15 ; 80:20 ; 75:25 ; 70:30). Hasil pemisahan dimonitoring menggunakan KLTA dengan eluen n-heksana dan etil asetat 17:3. Hasil monitoring menghasilkan beberapa fraksi isolate, dua diantaranya merupakan fraksi tunggal steroid. Hasil penelitian menunjukkan isolat steroid yang dihasilkan memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai  $EC_{50}$  35,03 dan 38,11 ppm. Kedua isolate ini dikategorikan sebagai antioksidan sangat kuat. Hasil pengujian UV-Vis menunjukkan dugaan isolate steroid memiliki serapan maksimum pada Panjang gelombang 204, 223. 274 dan 276 nm.

## ABSTRACT

Kholidah, Ismi. 2019. **Antioxidant Activity Test of Steroid Compound Result of Chromatography Column of n-Butanol Fraction of Red Algae *Eucheuma cottonii***. Research Proposal. Chemistry Department, Science and Thechnology Faculty, Ste Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I : A. Ghanaim Fasya M.Si; Supervisor II : Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P

**Keywords** : *Eucheuma cottonii*, Steroid, Column Chromatography, DPPH, UV-Vis,

Red algae (*Eucheuma cottonii*) contains secondary metabolite compounds with various benefits, one of which is steroids. This study aims to determine the antioxidant activity of steroid compounds using column chromatography of n-butanol extract. The extraction of active steroid compounds in red algae (*Eucheuma cottonii*) can be obtained by maceration method with methanol as solvent. The crude extract was hydrolyzed using 2 N HCL and fractionated with n-butanol solvent. The n-butanol fraction was tested with the Lieberman-Burchard reagent. Then the separation was carried out using the wet column chromatography method with gradient variations (eluent n-hexane: ethyl acetate with a ratio of 95: 5; 90:10; 85:15; 80:20; 75: 25; 70:30). The separation results were monitored using TLC with eluent n-hexane and 17: 3 ethyl acetate. The monitoring results resulted in several fractions of the isolate, two of which were single fractions of steroids. The results showed that the steroid isolates produced had antioxidant activity with EC50 values of 35.03 and 38.11 ppm. These two isolates are categorized as very strong antioxidants. The UV-Vis test results indicated that steroid isolates had the maximum absorption at wavelengths of 204, 223. 274 dan 276 nm.

## مستخلص البحث

خليدة ، إسمي . (2020). اختبار النشاط المضاد للأكسدة لمركبات الستيرويد من نتائج الفصل الكروماتوغرافي العمودي لجزء ن بوتانول الطحالب الحمراء (*Eucheuma cottonii*). البحث العلمي. قسم الكيمياء ، كلية العلوم و التكنولوجيا ، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: أ. غنائم فاشا الماجستير؛ المشرف الثاني: أعين الجنة الماجستير.

الكلمات المفتاحية: الطحالب الحمراء (*Eucheuma cottonii*) ، الستيرويد ، الكروماتوغرافي العمودي ، 2،2 ديفينيل 1 بيكريلهيدرازيل (DPPH) ، مقياس الطيف الضوئي (UV-Vis) .

تم استخدام الطحالب الحمراء (*Eucheuma cottonii*) على نطاق واسع كدواء لأنها تحتوي على العديد من المستقلبات الثانوية ، أحدها المنشطات. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد النشاط المضاد للأكسدة لمركبات الستيرويد باستخدام كروماتوجرافيا العمود لمستخلص ن-بيوتانول. يمكن الحصول على استخلاص مركبات الستيرويد النشطة في الطحالب الحمراء (*Eucheuma cottonii*) بطريقة النقع باستخدام مذيب الميثانول. تم تحليل المستخلص الخام باستخدام HCL 2N و تجزئته باستخدام ن بوتانول المذيب. تم اختبار جزء ن بوتانول باستخدام كاشف ليبرمان-بورشارد ثم تم الفصل باستخدام طريقة كروماتوجرافيا العمود الرطب مع اختلافات متدرجة لطيف ن الهكسان: إيثيل الأسيتات بنسبة (95:5 ؛ 90:10 ؛ 85:15 ؛ 80:20 ؛ 75:25 ؛ 70:30). تمت مراقبة نتائج الفصل باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحليلية (KLTA) مع لطيف ن الهكسان و إيثيل الأسيتات 17:3. نتج عن نتائج المراقبة عدة كسور معزولة ، اثنان منها عبارة عن كسور مفردة من المنشطات. أظهرت النتائج أن عزلات الستيرويد المنتجة لها نشاط مضاد للأكسدة بقيم  $EC_{50}$  35.03 و 38.11 جزء في المليون. يتم تصنيف هاتين العزلتين على أهمهما مضادات أكسدة قوية جدًا أظهرت نتائج اختبار مقياس الطيف الضوئي (UV-Vis) أن عزلات الستيرويد كان لها أقصى امتصاص بأطوال موجية 204 و 223.274 و 276 نانومتر.

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara yang sangat kaya akan tumbuh-tumbuhan. Kekayaan alam ini diciptakan Allah Swt. semata-mata hanya untuk kepentingan kehidupan manusia. Allah Swt. menciptakan segala sesuatu dengan manfaatnya tanpa ada yang sia-sia agar manusia selalu bersyukur dan mengingat kekuasaanNya, sebagaimana firman Allah Swt. dalam surat asy-Syu'ara ayat 7 sebagai berikut :

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَيْفَ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ (7)

Artinya :

*“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?”*

Menurut tafsir Jalalain (2008) *كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ* mempunyai makna tumbuhan-tumbuhan yang baik. Tanaman yang baik merupakan tanaman yang sempurna serta dapat dimanfaatkan oleh manusia sebagai makhluk yang di ilhami ilmu pengetahuan. Allah telah menumbuhkan berbagai macam tumbuhan yang beranekaragam baik yang ada di darat maupun di perairan. Hal ini menunjukkan pertanda atas kekuasaan Allah serta anugerah-Nya yang tidak terhingga dan kasih sayang Allah kepada manusia (ash- Shiddieqy, 2000; Az- Zuhaili, 2013). Salah satu tumbuhan yang memberi manfaat di berbagai bidang adalah rumput laut (alga).

Jenis alga yang banyak diteliti salah satunya adalah *Euचेuma cottonii*. *Euचेuma cottonii* merupakan *carrageenophyte* (tumbuhan penghasil polisakarida

karaginan) yang termasuk dalam jenis alga merah (Parenregi, 2007). Alga merah (*Eucheuma cottonii*) memiliki aktivitas sebagai antibiotik dan bersifat toksik dikarenakan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkannya. Alga merah *E. Cottonii* mengandung beberapa jenis metabolit sekunder yakni flavonoid (Andriani, dkk., 2015), triterpenoid (Rahmawati, 2017;Luki, 2018 dan Anggraini, 2018), steroid (Afif, dkk.,2015;Mardaneni, 2017;Luki, 2018 dan Anggraini, 2018) dan alkaloid (Afif, dkk., 2015;Andriani, dkk.,2015. Selainitu Rudianto (2013) melakukan uji fitokimia terhadap ekstrak alga merah *E. Cottonii* menggunakan fraksi n-butanol dengan hasil steroid lebih banyak dibandingkan flavonoid, triterpenoid dan alkaloid.

*E. cottoni* merupakan salah satu jenis alga yang mengandung senyawa steroid. Senyawa steroid bermanfaat menurunkan kolesterol (Vembriaato, 2013) dan juga memiliki peranan bioaktif salah satunya sebagai antioksidan (Ismawati, 2019). Yoshida (2003) juga meneliti mengenai efek antioksidan pada fitosterol dan komponennya dengan menggunakan PMC (*2,2,5,7,8-pentamethyl-6-chromanol*) sebagai pembanding. Golongan steroid fitosterol ini memiliki efek antioksidan pada oksidasi metal linoleate dalam larutan asetonitril dan memiliki tingkatan efek antioksidan dengan urutan: PMC >> fitosterol ~ kampasterol ~  $\beta$ -sitosterol > stigmasterol dan secara fisik pada membrane dengan cara mengemas dan menstabilkan membran. Fitosterol merupakan golongan senyawa dalam kelompok steroid. Secara struktur fitosterol terdiri dari triterpene yang bentuknya mirip dengan kolesterol pada hewan. Perbedaan antara keduanya terletak pada sisi samping kerangkanya. Akibat struktur yang mirip, ketika dikonsumsi, keduanya akan berkompetisi dalam penyerapan oleh sistem pencernaan dalam tubuh sehingga

keberadaan fitosterol selain dapat digunakan sebagai antioksidan juga mampu menurunkan kadar kolesterol dalam tubuh manusia. Beberapa jenis senyawa yang termasuk ke dalam kelompok fitosterol diantaranya adalah stigmasterol, sitosterol, campasterol, fucosterol dan ergosterol (Jati, dkk., 2019).

Isolasi senyawa steroid dapat diawali dengan proses ekstraksi sampel dengan metode maserasi dengan pelarut metanol. Menurut Kristanti (2008) pelarut metanol merupakan pelarut universal yang mampu melarutkan hampir semua komponen yang bersifat polar, non polar dan semi polar. Kandukuri, dkk (2009), menyatakan bahwa ekstrak metanol dapat mengekstrak senyawa alkaloid, fenol, steroid, tanin dan saponin pada *waterhyacinth*. Selain itu, Andriani, dkk. (2015) menyatakan bahwa pelarut terbaik untuk mengekstrak senyawa aktif pada alga merah *E. Cottonii* adalah metanol. Ekstraksi alga merah dengan pelarut metanol, didapatkan ekstrak dengan rendemen sebesar 9,4136 %, 12,37% (Anam, 2015), 16,97 % (Afif., dkk., 2013), 20,7% (Andriani, 2015) dan 13,79 % (Pramitania, 2019). Setelah proses maserasi dilanjutkan dengan proses hidrolisis dan partisi.

Hidrolisis perlu dilakukan pada pemisahan senyawa steroid dari *E. cottonii* dengan tujuan untuk memutuskan ikatan glikosida antara glikon dengan senyawa metabolit sekunder (aglikon). Proses hidrolisis dilakukan dengan menggunakan HCl 2N yang mengacu pada penelitian (Afif,2013); (Rudiyanto, 2013); dan (Ratnasari, 2017). Hasil hidrolisis selanjutnya diparisi menggunakan n-butanol untuk memisahkan glikon (hasil hidrolisis) dengan senyawa metabolit sekunder (aglikon). Partisi dilakukan menggunakan pelarut n-butanol mengacu pada penelitian Rudiyanto (2013) bahwa pelarut terbaik untuk mengekstrak alga merah *E. cottonii* dari perairan Sumenep secara partisi adalah n-butanol. Fraksi n-butanol

memiliki nilai antioksidan tertinggi dibandingkan n-heksana, kloroform, etilasetat dan petroleum eter. Nilai  $EC_{50}$  yang diperoleh yaitu n-butanol 3,71 ppm; n-heksana 49,53 ppm; kloroform 54,92 ppm; etilasetat 12,98 ppm; dan petroleum eter 18,20 ppm. Nilai  $EC_{50}$  yang diperoleh dari fraksi n-butanol lebih kecil dari fraksi lainnya menunjukkan bahwa kapasitas antioksidan lebih besar dari pada lainnya yaitu 95,69%.

Hasil fraksi yang diperoleh dari hasil partisi biasanya masih berupa senyawa campuran, maka perlu dilakukan isolasi lebih lanjut. Isolasi senyawa steroid dapat dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom agar diperoleh senyawa yang lebih murni (Agustin, 2014). Kromatografi kolom dipilih karena metode ini adalah salah satu teknik untuk mengisolasi senyawa aktif dari bahan alam dalam jumlah yang sangat besar sehingga diperoleh senyawa hasil isolasi yang lebih banyak (Lisiyanadkk, 2016). Kromatografi kolom konvensional terdiri dari 2 jenis yaitu kromatografi kolom pengisian adsorben secara basah dan kering. Handoko (2016) melakukan isolasi senyawa steroid pada Mikroalga *Chorella sp.* fraksi petroleum eter menggunakan metode kromatografi kolom basah yang menghasilkan 7,7 mg dari 5 vial yang murni senyawa steroid, dimana hasil ini lebih baik dibandingkan kromatografi kolom kering yang hanya 7 mg dari 3 vial fraksi murni senyawa steroid. Sholikhah (2016) juga melakukan isolasi senyawa steroid pada *E. spinosum* fraksi petroleum eter menggunakan kromatografi kolom basah menghasilkan lima kelompok fraksi steroid, sedangkan pada pengisian fase cara kering diperoleh dua kelompok steroid.

Fraksi n-butanol yang didapat dipisahkan dengan kromatografi kolom pengisian adsorben secara basah dengan eluen campuran n-heksana dan etil asetat

dengan variasi gradien eluen 95:5 ; 90:10 ; 85:15 ; 80:20 ; 75:25 ; 70:30. Variasi gradien eluen digunakan agar senyawa terpisahkan sesuai kepolaran eluennya dan menghasilkan senyawa steroid lebih banyak. Anggraini (2018) mengisolasi steroid hasil fraksi etil asetat menggunakan kromatografi kolom pengisian adsoben cara basah yang dielusikan secara gradien dengan variasi eluen (95:5 ; 90:10 ; 85:15 ; 80:20 ; 75:25 ; 70:30), menghasilkan 11 kelompok fraksi dengan 3 noda tunggal yang mengandung senyawa steroid dan 4 noda tunggal yang mengandung senyawa triterpenoid. Rahmawati (2017) juga melakukan isolasi steroid menggunakan kromatografi kolom dengan variasi komposisi eluen n-heksan :etilasetat (16:4, 17:3, 18:2) yang dielusi secara isokratik, menghasilkan 2 noda tunggal steroid dan 3 noda tunggal triterpenoid sedangkan 3 fraksi lain senyawa campuran antara steroid dan triterpenoid.

Isolat hasil kromatografi kolom dimonitoring menggunakan KLTA. Berdasarkan penelitian Ratnasari (2017) dalam mengelusi ekstrak methanol fraksin-butanol *E. Cottonii* perbandingan eluen terbaiknya yaitu n-heksana :etilasetat (17 : 3) yang menghasilkan 8 noda dimana 3 noda tersebut adalah golongan steroid pada KLTA. Spot steroid ditunjukkan dengan warna hijau setelah disinari lampu UV 366 nm. Mardaneni (2017) juga mengelusi ekstrak methanol *E. Cottonii* fraksi etil asetat dan menunjukkan eluen terbaiknya yaitu n-heksana :etilasetat (17 : 3) dengan menghasilkan 6 noda dimana 3 noda tersebut adalah golongan steroid KLTA.

Pengujian aktivitas antioksidan dari senyawa steroid alga merah *E. Cottonii* dilakukan dengan metode DPPH (*Diphenyl picryl hydrazyl*). Pengujian DPPH ini dilakukan untuk mengetahui nilai EC<sub>50</sub>. Sedangkan metode DPPH dipilih karena

sederhana, peka dan memerlukan sedikit sampel. Metode DPPH didasarkan pada perubahan warna dan efektif untuk menentukan aktivitas antioksidan. Selanjutnya dilakukan identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui dugaan steroid yang terdapat pada *E.cottonii* fraksi n-butanol. Penelitian yang telah dilakukan Ratnasari (2017) hasil identifikasi senyawa steroid dalam alga merah *E. cottonii* dari perairan Wongsorejo Banyuwangi fraksi n-butanol menunjukkan 4 jenis senyawa steroid yaitu kampasterol, stigmasterol, kolesterol dan  $\beta$ -sitosterol.

Berdasarkan uraian yang telah dijelaskan, maka perlu dilakukan uji antioksidan senyawa steroid fraksi n-butanol alga merah *E. Cottonii* dari perairan laut terbuka yang memiliki potensi sumber daya laut yang besar salah satunya adalah perairan Wongsorejo-Banyuwangi dengan menggunakan kromatografi kolom serta identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah

1. Bagaimana hasil pemisahan steroid dari fraksi n-butanol menggunakan kromatografi kolom?
2. Bagaimana aktivitas antioksidan senyawa steroid dari fraksi n-butanol hasil hidrolisis, ekstrak methanol alga merah *Eucheuma Cottonii* ?
3. Bagaimana hasil identifikasi isolat senyawa steroid dalam alga merah *E.cottonii* menggunakan instrumentasi UV-Vis ?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah

1. Untuk mengetahui hasil pemisahan steroid dari fraksi n-butanol menggunakan kromatografi kolom.
2. Untuk mengetahui aktivitas antioksidan senyawa steroid dari fraksi n-butanol hasil hidrolisis, ekstrak methanol alga merah *Eucheuma Cottonii*
3. Untuk mengetahui hasil identifikasi isolat senyawa steroid dalam alga merah *E. Cottonii* menggunakan instrumentasi UV-Vis.

#### 1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah

1. Sampel alga merah *Eucheuma cottonii* dari pantai Wongsorejo, Banyuwangi.
2. Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dilanjutkan hidrolisis asam dan partisi menggunakan pelarut n-butanol.
3. Pemisahan steroid alga merah *Eucheuma Cottonii* menggunakan kromatografi kolom basah.
4. Ukuran kolom yang digunakan adalah berdiameter kolom 1 cm, dan panjang kolom 50 cm.
5. Pembuatan bubuk silika gel dicampur dalam 20 mL pelarut n-heksana :etil asetat (95:5).
6. Variasi eluen yang digunakan pada Kromatografi Kolom yaitu variasi n-heksana:etil asetat dengan perbandingan (95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25 dan 70:30).
7. Uji antioksidan menggunakan metode DPPH (*Diphenyl picryl hydrazyl*).
8. Identifikasi senyawa steroid menggunakan UV-Vis.

### 1.5 Manfaat Penelitian

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



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Alga Merah (*Eucheuma cottonii*)

Alga merah *E. cottonii* merupakan salah satu jenis alga yang banyak di budidayakan di Indonesia. Rumput laut ini termasuk kelompok alga merah (*Rhodophyceae*) yaitu penghasil metabolit primer (phyocolloid). Metabolit primer yang dihasilkan dari alga merah seperti keragenan, agar, serta alginatnya dapat digunakan sebagai *gelling*, *stabilizing* atau *thickening agents* pada makanan, kosmetika dan industri farmasi. Sedangkan metabolit sekunder lainnya dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antioksidan, antiinflamasi, antikanker, anti-HIV dan antikoagulan (Amaranggana, 2017).

Alga merah *E. cottonii* memiliki ciri yaitu mempunyai thallus silinder dengan percabangan pada thallus dapat berujung runcing atau tumpul, ditumbuhi nodulus (tonjolan-tonjolan) dan duri baik lunak maupun tumpul untuk melindungi gametangia, berwarna coklat kemerahan, cartilagenous (menyerupai tulang rawan atau muda). Percabangan yang dimilikinya bersifat dichotomus (percabangan dua-dua) atau trichotomus (system percabangan tiga-tiga). Alga merah *E. cottonii* memerlukan sinar matahari untuk proses fotosintesisnya. Oleh karena itu, *E. cottonii* hanya mampu hidup pada lapisan toksik, yaitu pada kedalaman sejauh sinar matahari masih mampu mencampainya (Anggadiredja *et al.*, 2006). Taksonomi dari rumput laut *Eucheuma cottonii* dapat diklasifikasikan menurut Amora dan Sukei (2013) sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Rhodophyta
Kelas	: Rhodophyceae
Ordo	: Gigartinales

Family : Solieracea  
Genus : *Eucheuma*  
Species : *Eucheuma cottonii*



Gamabar 2.1 Alga Merah (*E. cottonii*)

Alga merah *E. cottonii*, didalamnya memiliki metabolit primer dan metabolit sekunder. Senyawa metabolit primer adalah senyawa yang dihasilkan oleh makhluk hidup yang bersifat esensial pada proses metabolisme sel dan keseluruhan proses sintesis dan perombakan zat-zat ini yang dilakukan oleh organisme untuk kelangsungan hidupnya. Macam-macam senyawa yang termasuk dalam metabolit primer seperti **Tabel 2.1**. Sedangkan, metabolit sekunder yang terdapat dalam *E. cottonii* adalah flavonoid, fenol hidrokuinon, triterpenoid yang dapat berpotensi sebagai krim tabir surya (Maharany, et al., 2017). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Rudiyanto (2013) ekstrak metanol alga merah mengandung metabolit sekunder seperti flavonoid, steroid dan alkaloid. Metabolit sekunder *E. cottonii* ekstrak n-butanol adalah flavonoid, triterpenoid, steroid dan alkaloid sedangkan pada ekstrak n-heksana adalah triterpenoid dan alkaloid.

Table 2.1 Komposisi nilai nutrisi alga merah *E. Cottonii*

Komposisi	Jumlah (%)
Kadar Air	76,15
Protein	2,32
Lemak	0,11
Karbohidrat	15,8
Serat Kasar	-
Abu	5,62

Sumber : Maharany, et al., (2017)

Kandungan dan manfaat yang ada pada rumput laut *Eucheuma cottonii* sesuai dengan firman Allah Swt. dalam al Qur'an surat an Nahl ayat 14 :

وَهُوَ الَّذِي سَخَّرَ الْبَحْرَ لِتَأْكُلُوا مِنْهُ لَحْمًا طَرِيًّا وَتَسْتَخْرِجُوا مِنْهُ حَبْلًا ثَلَبُوثًا  
وَتَرَى الْفُلْكَ مَوَاحِرَ فِيهِ وَلِتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ وَلِعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ (14)

Artinya:

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

Tafsir Jalalain (2008) menjelaskan bahwa lafadz *وَلِتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ*

mengandung makna dan supaya kalian mencari keuntungan dari karunia dari karunia Allah Swt. Menurut ash-Shiddieqy (2000) dan Quthb (2003) menjelaskan bahwa Allah telah menundukkan laut yang didalamnya terdapat berbagai macam hewan, tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai kebutuhan hidup manusia. Sesungguhnya itu merupakan tanda-tanda kekuasaan Allah bagi kaum yang mengingat anugerah pemberianNya. Itu semua adalah faktor yang menjadikan manusia senantiasa bersyukur atas nikmat dan karunia Allah Swt. Salah satu

sumber daya hayati laut yang berpotensi untuk dimanfaatkan secara maksimal adalah alga (rumpun laut).

Pemanfaatan rumput laut dapat digunakan sebagai bahan dasar pembuatan produk pangan rumah tangga maupun industri makanan skala besar (Anggadiredja, 2006), obat diet dan obat-obatan, karena kaya akan protein, lipid, vitamin dan mineral yang sangat penting bagi manusia (Mitahurrahmah, 2012). Selain itu, alga merah *E. cottonii* memiliki manfaat sebagai aktivitas biologis, seperti antivirus (Manilal *et al.*, 2009), antiinflamasi (Nagarani, 2013), sitoksin (Nurhayati, dkk., 2006) antibakteri (Andriani, dkk, 2015), antijamur (Khazanda, *et al.*, 2007), antitumor (Zandi, *et al.*, 2010), dan antioksidan (Luki, 2018).

Menurut penelitian Rudiyanto (2013) senyawa steroid dalam dalam *E. cottonii* yang telah dipartisi dengan butanol menghasilkan nilai  $EC_{50}$  sebesar 3,714 ppm dalam uji antioksidan dengan metode DPPH. Senyawa steroid dan triterpenoid dalam *E. cottonii* juga memiliki kapasitas antioksidasi 95,69% dengan jumlah DPPH yang di uji sebesar 0,3  $\mu$ mol. Selain itu Andriani (2013) juga telah menguji sebagai aktivitas antibakteri *E. cottonii* terhadap pertumbuhan bakteri *S.aureus* dan *E.coli* dan menghasilkan zona hambat terbaik pada 7,85 mm dan setelah diidentifikasi ekstrak tersebut mengandung triterpenoid dan steroid.

## 2.2 Steroid

Salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam alga merah *E. cottonii* adalah steroid. Steroid merupakan salah satu senyawa bioaktif dalam alga merah *Eucheuma cottonii* yang mempunyai manfaat salah satunya sebagai antioksidan. Steroid ini termasuk kelompok senyawa bahan alam yang kebanyakan

strukturnya terdiri atas 17 atom karbon dengan membentuk struktur struktur dasar 1,2-siklopentenoperhidrofenantren. Molekul steroid relatif datar atau planar, terdapat dua kelompok besar steroid berdasarkan konfigurasi cincin-cincinnya. Steroid bersifat non polar karena tersusun dari isoprene, namun steroid yang memiliki gugus –OH lebih bersifat polar yang disebut sebagai sterol (Kristanti, dkk., 2008).



Gambar 2.2 Kerangka dasar steroid

Senyawa metabolit sekunder dikenal sebagai senyawa yang berpotensi sebagai obat. Steroid pada tanaman memiliki banyak kegunaan dalam aktivitas agrokimia seperti antitumor, immunosupresif, hepatoprotektif, antibakteri, pengatur hormone tanaman, sebagai hormone seks, *antihelminthic*, kardiotonik dan memiliki aktivitas sitotoksik. Beberapa jenis steroid yang dapat digunakan sebagai steroid antiinflamasi yaitu kortikosteroid, kardiak steroid digoxin dan digitoxin (Patel, 2015). Zhang, dkk (2012) pada ekstrak alga *Tydemnia exepditions* mengandung steroid yang dapat menghambat pertumbuhan kanker prostat. Uji aktivitas antibakteri dari ekstrak n-heksana yang mengandung senyawa steroid terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* menunjukkan penghambatan

pertumbuhan bakteri pada konsentrasi 1000 ppm (Hidayah, Wihdah Wihdatul, dkk., 2016)

Yu, *et al.* (2016) melakukan ekstraksi dari *Aglaia oligophylla* Miq. menggunakan methanol dan kloroform serta menghasilkan senyawa steroid yaitu stigmasterol dan  $\beta$ -sitosterol berdasarkan hasil EIMS. Luki (2018) melakukan identifikasi senyawa steroid pada fraksi etil asetat alga merah *E. cottonii*. Identifikasi dilakukan dengan menggunakan UV-Vis dan LC-MS menunjukkan senyawa steroid yang berhasil diidentifikasi adalah  $\beta$ -sitosterol, campasterol, desmosterol, fukosterol dan stigmasterol. Sedangkan mardaneni (2017) juga menemukan senyawa steroid pada alga merah *E. cottonii* juga ditemukan berupa demosterol, stigmasterol, kampasterol, fukosterol dan  $\beta$ -sitosterol. Beberapa jenis steroid yang dapat digunakan sebagai steroid antiinflamasi yaitu kortikosteroid, kardiak steroid digoxin dan digitoxin (Patel, 2015).

### 2.3 Isolasi Senyawa Steroid

Isolasi senyawa steroid dari alga merah *E. cottonii* dapat dilakukan dengan beberapa tahapan sebagai berikut:

#### 2.3.1 Ekstraksi Maserasi

Maserasi merupakan suatu metode ekstraksi yang paling sederhana dan banyak digunakan, dimana proses pengestrakan simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu kamar. Kelarutan suatu komponen tergantung pada derajat polaritas pelarut yang ditentukan oleh konstanta dielektrikum yang ditunjukkan pada **Tabel 2.2**. Metode maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut, kemudian pelarut

akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Proses pengerjaan metode maserasi membutuhkan waktu selama 3 x 24 jam, dimana dilakukan pengadukan secara kontinue (terus-menerus). Kemudian dilakukan remaserasi, dimana remaserasi merupakan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (Depkes RI, 2000).

Maserat yang dihasilkan nantinya akan dipekatkan dengan cara menguapkan pelarutnya menggunakan *vacum rotaryevaporator* dengan tekanan rendah pula suhu tidak lebih dari 60°C hingga diperoleh ekstrak kental. Keuntungan metode maserasi dibandingkan metode yang lainnya adalah pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana, sedangkan kerugiannya adalah memakan banyak waktu dan pelarut yang digunakan cukup banyak. Metode maserasi ini dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Tiwari *et al*, 2011).

Tabel 2.2 konstanta dielektrikum dan tingkat kelarutan beberapa pelarut

Jenis Pelarut	Konstanta Dielektrikum	Tingkat Kelarutan Dalam Air	Titik Didih (°C)
Heksana	1,9	TL	68,7
Petroleum eter	2,28	TL	60
Benzene	2,38	TL	80,1
Toluene	4,81	TL	111
Kloroform	4,81	S	61,3
Etil asetat	6,02	S	77,1
Metal asetat	6,68	S	57
Metal klorida	9,08	S	39,75
Butanol	15,80	S	117,2
Propanol	20,1	L	97,22
Aseton	20,70	L	56,2
Etanol	24,30	L	78,5
Methanol	33,60	L	64

Air	78,4	L	100
-----	------	---	-----

Keterangan: TL= tidak larut; S= sedikit larut; L= larut dalam berbagai proporsi  
 Sumber: Sax (1998) dan HAM (2006).

Steroid merupakan senyawa yang bersifat non polar. Namun di alam, steroid dalam bentuk glikosidanya (terikat dengan gugus gula), sehingga proses ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut yang bersifat semi polar atau polar (Kristanti, 2008). Lenny (2006) menyatakan bahwa pelarut-pelarut yang digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam adalah pelarut golongan alkohol seperti metanol dan etanol karena dapat melarutkan senyawa metabolit sekunder secara maksimal. Akan tetapi pada penelitian sering digunakan pelarut metanol karena pelarut metanol memiliki titik didih lebih rendah dari etanol sehingga lebih mudah diuapkan pada suhu rendah. Sedangkan etanol memiliki titik didih lebih tinggi sehingga sulit diuapkan (Atun, 2014). Pemilihan pelarut ini juga didasarkan pada koefisien dielektrik metanol sebesar 33,60 dengan tingkat kepolaran dan kelarutan lebih tinggi dibandingkan pelarut lain (Mulyono, 2006). Kandukuri, dkk (2009), menyatakan bahwa ekstrak metanol dapat mengekstrak senyawa alkaloid, fenol, steroid, tanin dan saponin pada *waterhyacinth*. Hasil ekstraksi *Eucheuma cottonii* menggunakan pelarut metanol didapatkan sebesar 15,5% (Fitri, 2017); 15,587% (Lutfiyah, 2017), 11,866% (Rahmawati, 2017) dan 13,79% (Pramitania, 2019).

### 2.3.2 Hidrolisis dan Partisi

Hidrolisis dapat didefinisikan sebagai proses dekomposisi kimia yang terjadi dengan adanya pemutusan ikatan glikosida yang menjadi penghubung antar monomer melalui suatu reaksi menggunakan air sehingga terbentuk bagian-bagian

yang lebih sederhana (Adhitama, dkk., 2012). Penelitian ini menggunakan HCL 2 N sebagai agen penghidrolisis karena menurut Tasic, dkk. (2009) hidrolisis asam menggunakan HCL 2N menghasilkan laju konsentrasi yang lebih baik dari penggunaan HCL 1 M. Pemilihan asam kuat seperti HCL sebagai katalis disebabkan karena asam kuat akan lebih mudah melepas proton ( $H^+$ ) secara sempurna di dalam air, sedangkan asam lemah relative lebih sukar sehingga asam lemah memiliki kecenderungan terionisasi sebagian dalam pelepasan ion  $H^+$ . Semakin banyak proton yang terionisasi dalam air, maka semakin kuat peranan proton dalam pemutusan ikatan glikosida (Handoko, 2006). Asam yang biasa digunakan dalam proses hidrolisis di industri adalah  $H_2SO_4$  dan HCl. Namun, HCl lebih menguntungkan dari pada  $H_2SO_4$  karena sifatnya yang lebih reaktif (Wahyudi, dkk. 2011). Selain itu, katalisator asam klorida (HCl) akan membentuk garam yang tidak berbahaya yakni NaCl (NaCl) seperti pada **Gambar 2.3**.

Setelah proses pemecahan ikatan glikon dan aglikon perlu dilakukan penetralan. Penetralan dilakukan karena glikosida stabil pada kondisi netral (Fessenden dan Fessenden, 1986). Penetralan dilakukan dengan menggunakan natrium bikarbonat jenuh ( $NaHCO_3$ ) dikarenakan lebih aman dari pada NaOH yang bersifat kororsif (Ningsih, 2015). Berikut adalah reaksi penteralan antara asam klorida dengan natrium bikarbonat :



Gambar 2.3 Reaksi antara HCl dan natrium bikarbonat (Mardiyah, 2012)

Setelah dilakukan proses hidrolisis, dilanjutkan proses partisi menggunakan n-butanol. Penggunaan fraksi n-butanol berdasarkan penelitian sebelumnya yang

dilakukan oleh Rudiyanto (2012) diperoleh fraksi terbaik pada n-butanol karena memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat sebesar 95,69 % dengan  $EC_{50}$  3,71 ppm. Suryanto dan Momuat (2017) juga melakukan uji kapasitas antioksidan isolasi fenolik dari ekstrak tongkol jagung (*Zea mays*) dengan ekstrak n-butanol menghasilkan kandungan total fenolik sebesar 83,30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dan aktivitas antioksidan sebesar 82,45 % memiliki kandungan total fenolik dan aktivitas antioksidan lebih besar dari pada fraksi petroleum eter yaitu 23,57  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dengan aktivitas antioksidan sebesar 33,07 %. Ratnasari (2017) juga melakukan partisi n-butanol terhadap *E. cottonii* menghasilkan rendemen sebesar 33,89 % lebih besardibandingkan hasil rendemen fraksi etil asetat 17,19 % (Anggraini, 2018) dan fraksi petroleum eter 6,9 % (Fitri, 2017). Afif, dkk., (2015) fraksi 1-butanol fraksi ini mengandung metabolit sekunder yang terdiri atas steroid dan alkaloid.

### 2.3.3 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Uji fitokimia termasuk uji secara kualitatif dimana pada uji ini merupakan tahap awal untuk menentukan golongan senyawa aktif pada suatu sampel baik pada tumbuhan maupun pada hewan. Prinsip kerja uji fitokimia menggunakan reagen didasarkan perubahan warna oleh suatu pereaksi warna, dimana perubahan warna tersebut dicocokkan dengan standar warna yang ada (Andriani *et al.*, 2015). Metode yang digunakan secara umum merupakan reaksi pengujian warna (*spot test*) dengan suatu pereaksi warna (Kristanti *et al.*, 2008). Reaksi warna yang digunakan untuk uji warna pada steroid adalah dengan reaksi Lieberman-Buchard hasil yang positif ditunjukkan dengan perubahan warna biru dan hijau (Nohong, 2009). Uji fitokimia senyawa steroid menggunakan pereaksi *Lieberman-Burchard* dilakukan dengan

penambahan kloroform, asam asetat anhidrat dan  $H_2SO_4$  pada dinding tabung reaksi (Hanapi, dkk 2013). Hasil penelitian Sriwahyuni (2010) dalam pemisahan senyawa steroid dari ekstrak etil asetat pada tanaman antong-anting menggunakan pereaksi LB menghasilkan noda dengan warna hijau kebiruan, hijau kehitaman, dan warna ungu yang tengahnya warna hijau kebiruan saat dideteksi di bawah sinar UV  $\lambda$  366 nm. Menurut Sari (2017) yang telah menguji fitokimia ekstrak n-butanol dari *E. cottonii* menunjukkan hasil positif yang terkandung steroid ditandai dengan warna hijau.

#### 2.3.4 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom

Isolasi senyawa steroid dapat dilakukan dengan metode kromatografi kolom. Kromatografi kolom merupakan metode pemisahan yang didasarkan pada pemisahan daya adsorpsi suatu adsorben terhadap suatu senyawa (Sastrohamidjojo, 2004). Prinsip dasar dari kromatografi kolom adalah suatu pemisahan yang didasarkan pada prinsip adsorpsi. Pemisahan dapat dilakukan dengan meletakkan sampel pada ujung atas kolom dan pelarut yang digunakan dialirkan secara terus menerus. Eluen atau pelarut akan melewati kolom dengan adanya gravitasi bumi atau karena bantuan tekanan (Kristanti, dkk., 2008).

Pemakaian kolom konvensional perlu diperhatikan sesuai dengan teori pelat dan teori laju. Efisiensi kolom pada teori pelat berhubungan pada nilai HETP (height equivalent to a theoretical plate) yang dinyatakan sebagai harga  $H$ . Untuk memperoleh harga  $H$  yang kecil maka harus meningkatkan jumlah piring teoritis disetiap bertambah panjangnya suatu kolom sehingga akan mengoptimalkan efisiensi suatu kolom. Semakin kecil nilai  $H$  dari suatu kolom menunjukkan bahwa

kolom tersebut semakin baik. Nilai  $H$  sering dihubungkan dengan persamaan *Van Deemter* pada **Gambar 2.4** Teori kelajuan menjelaskan tentang tiga faktor yang mempengaruhi efisiensi kolom yang berhubungan pada harga  $H$ . Faktor A yaitu difusi eddy yang menyatakan ukuran dan keseragaman butiran fase diam. Faktor B yaitu difusi longitudinal yang berhubungan pada sepanjang kolom. Dan faktor C berupa ketidak seimbangan transfer masa (Wonorahardjo, 2013).

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

Gambar 2.4 Persamaan *Van Deemter*

Pemilihan fasa gerak juga merupakan langkah yang penting untuk keberhasilan isolasi senyawa. Sifat-sifat pelarut juga sangat berpengaruh terhadap penentuan mobilitas komponen-komponen campuran. Kemampuan pelarut untuk menggerakkan suatu senyawa berhubungan dengan kekuatan elusi pelarut. Urutan kekuatan elusi beberapa pelarut air > metanol > etanol > aseton > etil asetat > kloroform > dietil eter > metilen diklorida > benzena > toluena > karbon tetraklorida > heksana > petroleum eter (atun, 2014).

Campuran eluen yang digunakan untuk isolasi senyawa steroid pada penelitian ini terdiri dari senyawa *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, dan 70:30 yang digunakan dengan menggunakan metode elusi gradient artinya kepolaran eluen yang digunakan untuk mengelusi sampel dinaikkan secara bertahap (Yuhendri, dkk., 2012). Larutan *n*-heksana merupakan larutan yang bersifat non polar sedangkan larutan etil asetat merupakan larutan yang bersifat semi polar, sehingga campuran *n*-heksana dan etil asetat memiliki sifat cenderung non polar, karena *n*-heksana memberikan kontribusi yang

lebih besar dibandingkan etil asetat. Variasi eluen yang cenderung bersifat non polar dikarenakan senyawa steroid yang akan diisolasi cenderung bersifat non polar. Senyawa yang bersifat non polar akan ikut bersama dengan laju eluen sedangkan senyawa yang bersifat polar akan tertahan dalam kolom, karena silika yang digunakan bersifat polar.

Kromatografi kolom dilakukan dengan membuat bubur antara eluen dengan fase diam (Kristanti, dkk., 2008). Fase diam yang digunakan pada proses pemisahan kromatografi kolom adalah silika gel G-60 (0,063–0,200 mm). Silika gel memberikan luas permukaan yang besar dikarenakan ukuran partikel silika gel yang kecil. Silika gel yang merupakan fase diam (adsorben) yang paling sering digunakan dalam pemisahan produk alam (Cannel, 1998). Pemilihan silika gel disebabkan karena permukaan silika gel mengandung gugus hidroksil pada silanol dimana gugus hidroksil pada silanol ini berpotensi kuat dalam membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa yang akan dipisahkan, terutama dengan donor H seperti alkohol, amida, amina dan asam karboksilat (Noviyanti, dkk., 2010). Semakin kuat ikatan hidrogen antara silika dan senyawa yang akan dipisahkan maka semakin tertahan pada silika gel, sehingga senyawa non polar berupa steroid dapat terpisah dengan bergerak bersama fasa geraknya (Rahmawati, 2017).

Jumlah adsorben yang digunakan bergantung pada tingkat kesulitan pemisahan dari suatu senyawa dan jumlah sampel yang akan dipisahkan, secara umum, tiap gram sampe yang dipisahkan membutuhkan adsorben 30 sampai 50 gram. Jika pemisahan yang dilakukan cukup sulit, jumlah adsorben yang dibutuhkan dapat mencapai 200 gram. Jumlah adsorben yang dibutuhkan akan lebih sedikit untuk pemisahan senyawa-senyawa yang perbedaan kepolarannya cukup

besar (Kristanti, dkk., 2008). Pembuatan fase diam cara kering berbeda dengan cara basah. Jika pada cara basah silika gel dibuat bubuk silika terlebih dahulu sebelum dimasukkan kedalam kolom. Saat proses aktivasi silika melepas air yang terikat dan bersifat polar. Silika bertambah keasamannya pada pembuatan bubuk silika dengan eluen (Priyatno, 2013). Pada pembuatan fase diam cara kering ini silika yang telah diaktivasi langsung dimasukkan dalam kolom dan dibantu dengan vakum agar kerapatan fase diam terjaga.

Penelitian yang dilakukan ini menggunakan kromatografi kolom basah. Hal ini sesuai dengan penelitian Handoko (2016), Sholikhah (2016) dan Safitri (2016) yang menyatakan bahwa metode kromatografi kolom dengan pengisian cara basah lebih baik dari pada cara kering. Pada pemisahan steroid mikroalga *Chorella sp.* yang dilakukan Safitri (2016) cara basah lebih menghasilkan 2 kelompok fraksi steroid sedangkan pada fase cara kering diperoleh satu kelompok fraksi steroid. Sholikhah (2016) pada pemisahan steroid *E. spinosum* dengan cara basah lebih menghasilkan 9 kelompok fraksi dengan 5 kelompok fraksi senyawa steroid dan 4 kelompok fraksi senyawa triterpenoid, sedangkan pada cara kering diperoleh 5 kelompok fraksi dengan 2 kelompok steroid dan 3 kelompok triterpenoid.

### 2.3.5 Kromatografi Lapis Tipis pada Monitoring Senyawa Aktif

Pada penelitian ini, pengujian KLTA dilakukan untuk memonitoring hasil pemisahan kromatografi kolom dan identifikasi senyawa steroid dengan bantuan reagen Lieberman Burchard. Kromatografi lapis tipis adalah salah satu metode pemisahan yang berdasarkan pada perbedaan distribusi molekul-molekul komponen diantara dua fase yang memiliki kepolaran yang berbeda (Hendayana,

2006). Suatu senyawa polar akan lebih terdistribusi pada fase diamnya (polar) dibandingkan pada fase geraknya. Hal ini menyebabkan nilai  $R_f$  yang dihasilkan kecil dan sebaliknya (Effendy, 2010). Harga  $R_f$  suatu komponen dapat ditentukan sebagai berikut :

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

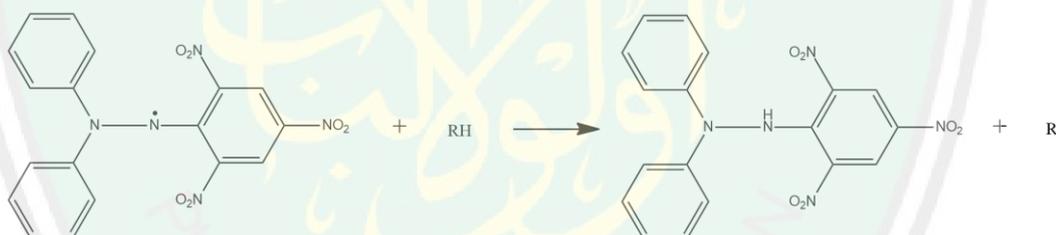
Gambar 2.5 Rumus Penentuan Waktu Retensi ( $R_f$ )

Pemilihan fase gerak yang tepat dapat mendukung keberhasilan dalam pemisahan steroid dari komponen lainnya. Berdasarkan penelitian sebelumnya eluen terbaik pemisahan senyawa triterpenoid dan steroid dari alga merah *E. cottonii* dari hasil kromatografi Lapis Tipis Anallitik adalah n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17 : 3 (Baderos, 2017; Mardaneni, 2017 dan Ratnasari, 2017). Eluat semprot menggunakan pereaksi *Lieberman-Burchard*, lalu dilihat dibawah lampu UV pada Panjang gelombang 366 nm. Warna hijau menandakan isolate mengandung senyawa steroid (Aprelia dan Suyanto, 2013).

#### 2.4 Uji Antioksidan dengan Metode DPPH

Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrasil) merupakan metode yang dapat mengukur aktivitas antioksidan baik dalam pelarut polar maupun non polar. Metode DPPH mengukur semua komponen antioksidan baik yang larut dalam lemak maupun dalam air. Selain itu, metode DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel untuk evaluasi aktivitas antioksidan dari senyawa bahan alam (Molyneux, 2004). Maesaroh, dkk (2018) dalam penelitian tentang perbandingan metode uji aktivitas antioksidan

menggunakan DPPH, FRAP dan FIC terhadap asam askorbat, asam galat dan kuersetin melaporkan bahwa metode DPPH lebih efektif dan efisien dibanding kan dengan FRAP dan FIC dengan nilai IC<sub>50</sub> secara berturut-turut yaitu 1,27; 2,44 dan 2,77 mg/L. Radikal DPPH adalah suatu senyawa organik yang mengandung nitrogen tidak stabil dengan absorbansi kuat pada Panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{max}$ ) 515-520 nm dan berwarna ungu gelap. Setelah bereaksi dengan senyawa antioksidan pada sampel, DPPH tersebut akan tereduksi sehingga berubah sifat menjadi DPPH-H non-radikal. Peningkatan jumlah spesi DPPH non-radikal ini ditandai dengan berubahnya warna dari ungu tua menjadi kuning pucat ( Sayuti, 2015). Reaksi antara antioksidan dengan molekul DPPH yaitu sebagai berikut (Praksh, 2001) :



Gambar 2.6 Reaksi antara DDPH dengan Antioksidan

Kapasitas penangkapan radikal bebas dapat dinyatakan dengan satuan persen (%) kapasitas antioksidan. Nilai ini diperoleh dengan rumus (Molyneux, 2004) :

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{(\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% \dots \dots \dots (2.2)$$

Metode DPPH terdapat parameter EC<sub>50</sub>. Parameter EC<sub>50</sub> merupakan parameter yang menunjukkan konsentrasi ekstrak uji yang mampu menangkap

radikal bebas sebanyak 50% yang diperoleh melalui persamaan regresi. Semakin kecil  $EC_{50}$  suatu senyawa uji maka senyawa tersebut semakin efektif sebagai penangkap radikal bebas (Rohman dan Riyanto, 2005). Secara spesifik, suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai  $EC_{50}$  bernilai 50-100 ppm, sedang jika  $EC_{50}$  bernilai 100-150 ppm dan lemah jika  $EC_{50}$  bernilai adalah 150-200 ppm. Secara spesifik kekuatan antioksidan ditunjukkan pada Tabel 2.3 sebagai berikut (Hidajat,2005) :

Tabel 2.3 Penentuan Kekuatan Antioksidan

Nilai $EC_{50}$	Kekuatan
<50 ppm	Sangat kuat
50-100 ppm	Kuat
100-150 ppm	Sedang
150-200 ppm	Lemah
>200 ppm	Sangat lemah

Luki (2018) meneliti tentang aktivitas antioksidan senyawa aktif alga merah *E. cottonii* menggunakan metode DPPH dan menghasilkan aktivitas antioksidan pada isolate 5 dengan nilai  $EC_{50}$  5,146 ppm dimana pada isolate 5 memiliki kemampuan aktivitas antioksidan lebih besar dari pada isolat 2 yaitu  $EC_{50}$  20,92 ppm. Nilai  $EC_{50}$  paling kecil menandakan aktivitas antioksidan paling tinggi. Rudiyanto (2013) telah melakukan pengujian aktivitas antioksidan alga merah *E. cottonii* terhadap DPPH menggunakan berbagai fraksi yaitu fraksi n-heksana, Kloroform, n-butanol, etil asetat dan petroleum eter didapatkan hasil bahwa fraksi n-butanol memiliki kapasitas antioksidan terbaik yaitu sebesar 95,69% dengan nilai  $EC_{50}$  sebesar 3,71 ppm.

Lee, *et al.* (2003) melakukan uji antioksidan fraksi n-heksana fukosterol dari alga coklat *Pelvitia siliquosa* secara in vitro pada tikus yang telah diinjeksikan  $\text{CCl}_4$  menunjukkan hasil bahwa fukosterol mampu meningkatkan aktivitas SOD, Katalase dan GSH-px dengan presentase berturut-turut yaitu 33,89%, 21,56% dan 39,24%. Peningkatan aktivitas katalase berhubungan dengan penanganan  $\text{CCl}_4$  menyatakan bahwa fukosterol dapat bertindak sebagai antioksidan. Nurcahyanti, dkk., (2015) juga menyatakan bahwa steroid stigmast-5-en- $3\beta$ -ol dan stigmasterol dari kulit batang *Dysoxylum malliceum* yang dapat digunakan sebagai antikanker pada kanker payudara MCF-7.

### 2.5 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis merupakan metode analisis kimia berdasarkan serapan radiasi senyawa pada Panjang gelombang tertentu. Prinsip dari spektrofotometer UV\_Vis adalah adanya transisi elektronik suatu molekul yang disebabkan peristiwa absorbs energi berupa radiasi elektromagnetik pada frekuensi yang sesuai oleh molekul tersebut (Rohman dan Ganjar, 2007). Untuk senyawa berwarna akan memiliki satu atau lebih penyerapan spektrum yang tertinggi di daerah spektrum tampak (400-700 nm). Spektrum yang terserap pada ultraviolet (200-400 nm) dan daerah tampak terjadi karena adanya perubahan energi electron terluar dari molekul yang disebabkan adanya ikatan atau bukan ikatan. Umumnya electron berpindah tempat ini disebabkan adanya ikatan rangkap karbon-karbon atau pasangan nitrogen dengan oksigen (Sudarmadji, 1997).

Penerapan spektrofotometer UV-Vis kebanyakan diterapkan pada senyawa organic yang didasarkan pada transisi  $n-\pi^*$  ataupun  $\pi-\pi^*$  dan karenanya memerlukan kehadiran gugus kromofor dalam molekul itu. Transisi ini terjadi

dalam daerah spektrum (sekitar 200 hingga 700 nm) yang praktis digunakan dalam eksperimen (Day and Underwood, 1999), sedangkan transisi  $n-\sigma^*$  jarang terjadi (Fessenden, 1999). Molekul-molekul yang memerlukan lebih banyak energi untuk terjadinya transisi elektron akan menyerap pada Panjang gelombang yang lebih pendek begitupun sebaliknya, sesuai asas planck yang menyatakan bahwa energi berbanding terbalik dengan Panjang gelombang ( $E=h.c/\lambda$ ) (Rohman dan Gandjar, 2011).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Prabakaran, *et al.* (2017) mengisolasi  $\beta$ -sitosterol dari sekam padi dan menghasilkan spektrum UV-Vis dengan pita absorpsi pada 212 nm dan 240 nm yang menunjukkan adanya transisi dari  $\pi-\pi^*$ . Lee, *et al.* (2015) mengisolasi steroid dari *Artemisia apiacea* dan menunjukkan hasil spectrum UV-Vis pada Panjang gelombang 254 nm untuk kampasterol dan stigmasterol. Ratnasari (2017) yang mengisolasi senyawa steroid dari alga merah *E. cottonii* dan mengidentifikasinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan serapan pada Panjang gelombang 203,9 nm dan 273 nm dimana pada Panjang gelombang 203,9 nm memberikan dugaan bahwa adanya transisi  $\pi-\pi^*$  yang menyatakan terdapat ikatan rangkap yang C=C tidak terkonjugasi, sedangkan pada Panjang gelombang 273 nm nm memberikan dugaan adanya gugus fungsi C=C dengan transisi dugaan  $n-\pi^*$  dan  $\pi-\pi^*$ .

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Lokasi dan Waktu**

Penelitian Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan 10 Februari 2020 – 6 September 2020.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan antara lain seperangkat alat gelas, corong buchner, oven, rotary evaporator vacuum, ayakan 90 mesh, hotplate, aluminium foil, incubator shaker, kolom kromatografi Panjang 50 cm diameter 1 cm, statif, botol vial, lampu UV, neraca analitik, lemari asap, penyaring vakum dan UV-Vis Varian Carry Hyperchem.

##### **3.2.2 Bahan**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah alga merah jenis *E. Cottoni* dari pantai Wongsorejo Banyuwangi. Bahan kimia yang digunakan meliputi metanol 99,9%, aquades, n-butanol 96%, HCl 2N, Nabikarbonat jenuh, etil asetat p.a, anhidrida asetat p.a, etanol p.a, kertas saring, aluminium foil, larutan DPPH 0,2 mM, reagen Lieberman-Burchard (asamasetatanhidrat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, etanol absolut) dimeti lsulfoksida, reagen dragendrof, reagen mayer, logam Mg, plat silika gel F<sub>254</sub> dan silika gel 60 (0,063-0,200 mm).

#### **3.3 Tahapan Penelitian**

Tahapan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Preparasi sampel
2. Analisis kadar air secara Termogravimetri
3. Ekstraksi maserasi
4. Hidrolisis dengan HCl dan partisi dengan n-butanol
5. Uji Fitokimia ekstrak n-butanol dan fraksi n-butanol *Eucheuma cottonii*
6. Isolasi dengan metode Kromatografi Kolom
7. Monitoring dengan KLTA
8. Uji antioksidan senyawa steroid menggunakan metode DPPH
9. Identifikasi dengan instrument UV-Vis.
10. Analisa data

### **3.4 Cara Kerja**

#### **3.4.1 Preparasi Sampel**

*E. Cottonii* diambil dari permukaan air pantai Wongsorejo Banyuwangi awalnya dicuci hingga bersih. Diambil sampel, kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dalam ruangan selama 7 hari. Sampel kering dihaluskan dengan menggunakan mesin penggiling serbuk di Materia Medika Kota Batu dan diayak dengan ukuran 90 mesh dan ditimbang.

#### **3.4.2 Analisis Kadar Air secara Termogravimetri (AOAC, 1984)**

Dipanaskan cawan porselen dalam oven pada suhu 100-105°C selama 15 menit. Cawan disimpan dalam desikator selama 10 menit lalu cawan ditimbang diukur beratnya. Perlakuan tersebut diulangi 3X hingga diperoleh berat konstan. *E. cottonii* kering ditimbang 1 gram serbuk *E. Cottonii* ke dalam cawan dan dipanaskan

pada suhu 100-105°C selama 1 jam, kemudian didinginkan dalam desikator selama 15 menit. Perlakuan ini diulangi 3X sampai beratnya konstan. Kadar air dalam *E. Cottoni* dapat dihitung dengan Persamaan 3.1

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

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

### 3.4.3 Ekstraksi Maserasi *Eucheuma cottonii* (Anam, 2015)

Sampel *E. cottonii* kering yang telah ditimbang 10 gram diekstraksi secara maserasi atau perendaman sampel dengan pelarut methanol 99,9% sebanyak 500 mL, kemudian diaduk selama 24 jam dengan kecepatan 150 rpm. Ekstrak sampel disaring menggunakan corong buchner, kemudian diambil filtrat. Sedangkan residu diekstraksi kembali menggunakan pelarut sebanyak tiga kali pengulangan. Setelah itu filtrat digabung dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dengan estimasi waktu 120 menit. Ekstrak pekat metanol yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemennya menggunakan Persamaan 3.2

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

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

Ekstrak pekat metanol diambil sebanyak 5 gram dan dimasukkan ke dalam gelas kimia, kemudian ditambahkan 10 mL HCl 2N untuk dihidrolisis. Proses hidrolisis dilakukan selama 1 jam menggunakan *magnetic stirrer hot plate* pada suhu ruang, Kemudian ditambah natrium bikarbonat jenuh sampai pH 7 (netral) menggunakan pH universal. Hasil hidrolisis dipartisi dengan n-butanol sebanyak 25

mL dalam corong pisah dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan organik dan air. Proses partisi dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. Setelah itu filtrat digabung dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 112°C dengan estimasi waktu 40 menit dan dialiri dengan gas nitrogen (N<sub>2</sub>). Ekstrak pekat yang didapat ditimbang dan dihitung menggunakan persamaan 3.2.

### **3.4.5 Uji Fitokimia Senyawa Steroid**

#### **3.4.5.1 Uji Fitokimia Senyawa Steroid dan Triterpenoid (Kristanti, 2008)**

Ekstrak hasil partisi n-butanol diambil sebanyak 1 mg dan dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambah dengan 0,5 mL kloroform lalu ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya, campuran tersebut ditambah dengan 1-2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung. Adanya senyawa steroid ditandai dengan munculnya warna hijau kebiruan. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan 2 pelarut menunjukkan adanya triterpenoid.

#### **3.4.5.2 Uji Fitokimia Senyawa Flavonoid (Kristanti, 2008)**

Ekstrak hasil partisi n-butanol dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam 1-2 ml methanol panas 50%. Setelah itu ditambah logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid.

#### **3.4.5.2 Uji Fitokimia Senyawa Alkaloid (Kristanti, 2008)**

Ekstrak hasil partisi n-butanol dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambah 0,5 mL HCl 2% dan larutan dibagi dalam dua tabung. Tabung I ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendroff, tabung II ditambahkan 2-3 reagen

Mayer. Jika tabung I terbentuk endapan jingga dan pada tabung II terbentuk endapan kekuning-kuningan menunjukkan adanya senyawa alkaloid.

### **3.4.6 Pemisahan Metode Kromatografi Kolom**

#### **3.4.6.1 Pembuatan Bubur Silika (Fasa Diam pada Kromatografi Kolom)**

Bubur silika dibuat dengan bahan silika gel 60 sebanyak 10 gram yang sudah diaktivasi dalam oven selama 1 jam pada suhu 110°C. Silika gel didinginkan dan dimasukkan dalam desikator selama 15 menit. Pembuatan bubur silika dilakukan dengan cara silika gel dicampur dalam 20 mL pelarut n-heksana : etil asetat (95:5) dan dihomogenkan selama  $\pm$  1 jam. Tahap persiapan, kolom mula-mula diisi glasswool pada bagian bawah kolom, kemudian bubur silika dimasukkan dalam kolom secara perlahan dan tanpa jeda. Bubur silika dalam kolom dipastikan mampat dengan didiamkan selama  $\pm$  24 jam.

#### **3.4.6.2 Pemisahan Fraksi n-butanol E. Cottoni dengan Kromatografi Kolom**

Fraksi n-butanol *E. Cottoni* 0,067 gram dilarutkan dalam 1 mL pelarut n-heksana : etil asetat (95:5), fraksi n-butanol yang telah larut dimasukkan ke dalam kolom. Perbandingan dengan silika gel (1:150) (Tyas, 2017). Pemisahan senyawa fraksi n-butanol menggunakan kromatografi kolom dengan fasa diam berupa silika gel 60, diameter kolom 1 cm, dan panjang kolom 50 cm. Proses elusi dilakukan secara gradien dengan perbandingan fase gerak n-heksana : etil asetat (95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25 dan 70:30) dengan volume 100mL. kecepatan alir kran diatur selama 2 mL/menit. Hasil berupa eluat dari kromatografi kolom ditampung ke dalam vial setiap 2 mL (Kusmiyati, dkk., 2011 dan Rahmawati, 2017).

### **3.4.7 Monitoring Hasil Isolat Steroid dengan KLTA**

Hasil pemisahan kromatografi kolom dimonitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA). identifikasi atau monitoring dengan cara diambil tiap vial genap yaitu vial ke 2, 4, 6, 8, 10 sampai vial terakhir. Eluen yang digunakan sebagai fasa gerak adalah pelarut campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17 : 3 dan digunakan silika Gel F<sub>254</sub> dengan ukuran 10x10 cm. Eluen dijenuhkan terlebih dahulu selama 1 jam dalam bejana pengembang. Plat silika gel diberi batas 1 cm pada batas atas dan bawah, kemudian dioven pada suhu 110°C selama 30 menit. isolate ditotolkan sebanyak 10 kali pada plat silika gel menggunakan pipa kapiler dengan jarak ± 1 cm dari bagian bawah plat yang sudah ditandai. Setelah selesai penotolan, plat dimasukkan ke dalam bejana pengembang dan dielusi sampai tanda batas atas. Selanjutnya noda yang terbentuk diamati menggunakan lampu UV pada Panjang gelombang 254 nm dan 366 nm dan dihitung nilai *R<sub>f</sub>* nya (Sholikah, dkk., 2016).kemudian dianalisis terbentuknya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya senyawa steroid (Indrayani, dkk., 2016). Eluat yang mempunyai nilai *R<sub>f</sub>* dan noda yang sama dikumpulkan menjadi satu sebagai fraksi yang sama. Fraksi yang menunjukkan hasil positif steroid digabungkan dan dipekatkan dengan rotary evaporator dengan suhu 58,7°C dan dialiri dengan gas N<sub>2</sub>. Kemudian hasil isolat diuji aktivitas antioksidannya.

### **3.4.8 Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH**

#### **3.4.8.1 Penentuan Panjang GelombangMaksimum DPPH**

Etanol *p.a* dipipet 3 mL kemudian ditambahkan larutan DPPH 0,2 mM 1 mL, dimasukkan dalam tabung reaksi lalu didiamkan selama 10 menit. Kemudian

dimasukkan kedalam kuvet dan dicari  $\lambda_{max}$  DPPH dan dicatat hasil pengukuran  $\lambda_{max}$  untuk tahap selanjutnya (Luki, 2018).

#### 3.4.8.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel

- a. Absorbansi kontrol: Larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 mL dimasukkan dalam tabung reaksi. Ditambahkan 3 mL pelarut yang digunakan pada ekstrak, tabung ditutup dengan alumunium foil dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah itu larutan dimasukkan ke dalam kuvet hingga penuh dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang yang telah diperoleh.
- b. Sampel dilarutkan dalam etanol dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm. Masing-masing dimasukkan dalam tabung reaksi berbeda dan tiap tabung diisi 3 mL ekstrak serta ditambahkan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 mL. Perlakuan tersebut diulangi sebanyak 3 kali, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Kemudian dimasukkan ke dalam kuvet untuk mengukur absorbansinya pada masing-masing konsentrasi dengan panjang gelombang yang telah diperoleh. Data adsorbansi pada tiap konsentrasi masing-masing ekstrak dihitung nilai % aktivitas antioksidannya (Arindah, dkk. 2010):

$$\text{Aktivitas antioksidan} = \left( \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi DPPH sisa}}{\text{absorbansi kontrol}} \right) \times 100 \% \dots\dots\dots(3.5)$$

Selanjutnya dihitung nilai EC50 dengan persamaan regresi menggunakan program “GraphPad prism5 software, Regression for analyzing doseresponse data. Konsentrasi yang berbeda digunakan untuk mendapatkan kurva antiradical dan menghitung nilai EC<sub>50</sub>.

- c. Perbandingan asam askorbat (vitamin C) dan BHT : diperlakukan seperti sampel akan tetapi sampel diganti dengan larutan asam askorbat (vitamin C) dan BHT.

#### **3.4.9 Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Laili, 2016)**

Isolat hasil kromatografi kolom fraksi n-butanol dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Untuk membuat blanko dibuat dengan memasukkan 2 mL n-heksana ke dalam kuvet. Setelah itu, sebanyak 2 mL sampel dimasukkan ke dalam kuvet dan dianalisis Panjang gelombang 200-800 nm untuk mendapatkan spektra dan Panjang gelombang maksimum.

#### **3.5 Analisis Data**

Isolasi senyawa steroid dengan kromatografi kolom dianalisa secara kualitatif menggunakan KLTA. Identifikasi senyawa steroid dapat diketahui dengan melakukan analisa deskriptif dengan menganalisa hasil pola yang didapatkan dari eluen yang digunakan. Isolat yang teridentifikasi steroid dilakukan uji aktivitas antioksidan untuk didapat nilai aktivitas antioksidan yang diperoleh berupa data angka yang dinyatakan dalam  $EC_{50}$ . Nilai  $EC_{50}$  dihitung dengan persamaan regresi menggunakan program "GraphPad prism5 software, Regression for analyzing doseresponse data. Identifikasi senyawa steroid yang memiliki kapasitas antioksidan yang tinggi diidentifikasi menggunakan UV-Vis.

## **BAB IV**

### **PEMBAHASAN**

#### **4.1 Preparasi Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah alga merah jenis *Eucheuma cottonii* yang berasal dari perairan Wongsorejo Kabupaten Banyuwangi Provinsi Jawa Timur. Preparasi sampel dilakukan dengan mencuci semua bagian sampel dengan air bersih untuk menghilangkan kotoran seperti pasir selanjutnya dipotong kecil-kecil untuk mempercepat proses pengeringan. Sampel *E. cottonii* yang telah dipotong kecil-kecil dikeringkan dengan cara dikeringanginkan tanpa terkena sinar matahari untuk menghindari terjadinya kerusakan senyawa. Pengeringan sampel bertujuan untuk menghilangkan kadar air dalam sampel.

Sampel basah setelah dikeringkan kemudian dihaluskan dengan alat penggiling dan diayak dengan ayakan 90 mesh untuk menyeragamkan ukuran. Proses penghalusan sampel ini dimaksudkan untuk memperluas permukaan sampel sehingga proses ekstraksi akan menjadi maksimal dan pelarut dapat terserap langsung ke dalam dinding sampel. Voight (1995) menyatakan semakin kecil ukuran sampel maka semakin besar luas permukaan, sehingga dapat memaksimalkan kontak sampel dengan pelarut dan proses ekstraksi optimal. Hasil yang didapat dari proses ini menunjukkan bahwa dari 20 Kg sampel basah didapatkan serbuk *Eucheuma cottonii* 0,945 Kg.

#### **4.2 Analisa Kadar Air**

Analisis kadar air *E. cottonii* menggunakan metode thermogravimetri dengan prinsip pemanasan menggunakan oven pada suhu 100-105°C dan

penimbangan. Analisis kadar air dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kadar air dalam sampel kering makro alga *E. cottonii*. Kadar air yang tinggi dapat mengakibatkan sampel lembab sehingga akan mudah terdegradasi oleh mikroorganisme, dan tumbuh jamur (Setiyawan, dkk., 2015). Selain itu menurut Khoiriyah, dkk., (2014) menyatakan bahwa kadar air yang rendah dapat mempermudah proses penarikan zat aktif dalam sampel karena pelarut mudah menembus dinding sel sampel. Kadar air yang tinggi dapat mengganggu proses ekstraksi, dikarenakan ia dapat mengubah konsentrasi pelarut yang digunakan dalam proses maserasi.

Analisis kadar air dihentikan ketika berat yang diperoleh sudah konstan. Hasil penentuan kadar air sampel pada penelitian ini sebesar 5,66 %. Perumbuhan mikroba dalam sampel dapat dikurangi jika suatu sampel memiliki kadar air dibawah 10% (Cahyono, 2011) dan nilai kadar air yang disyaratkan agar proses ekstraksi berjalan lancar adalah maksimal 10% (Puspita, 2011). Berdasarkan hasil penentuan kadar air tersebut tidak melebihi batas maksimum kadar air yang ditentukan sehingga tidak mengganggu proses ekstraksi.

#### 4.3 Ekstraksi Sampel

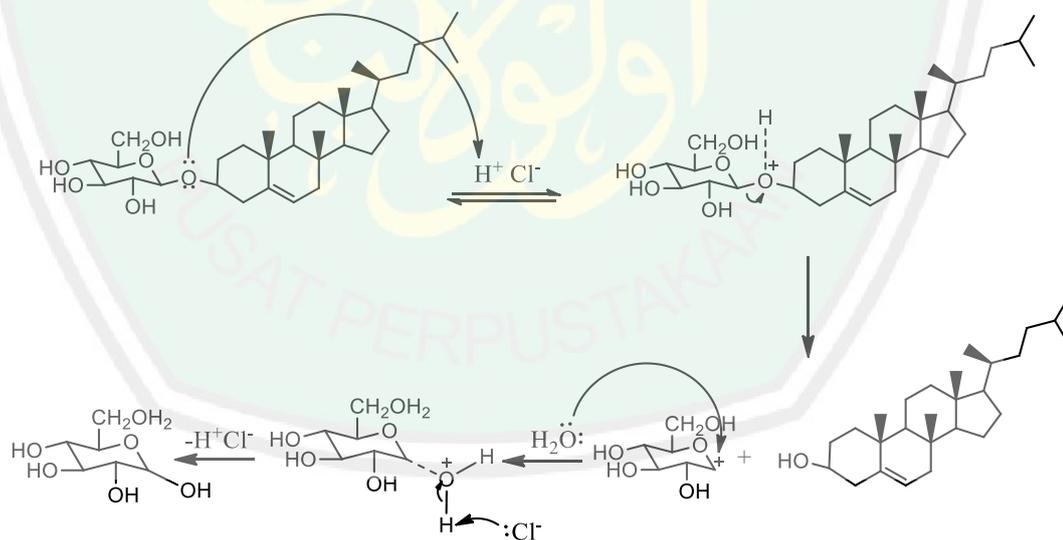
Ekstraksi maserasi ini bertujuan untuk mengekstrak senyawa aktif yang terdapat pada *E. cottonii* dengan menggunakan pelarut metanol. Penelitian ini menggunakan pelarut metanol p.a yang bersifat polar karena senyawa steroid pada tanaman memiliki sifat polar karena dalam bentuk ikatan glikosida. Keunggulan dari metode ini adalah mudah dilakukan, alat yang digunakan sederhana, murah dan senyawa yang terkandung didalamnya tidak rusak karena pemanasan sehingga

cocok digunakan untuk ekstraksi bahan alam. Metode ini didasarkan pada perendaman sampel di dalam pelarut metanol sehingga pelarut metanol yang memiliki konsentrasi tinggi akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung senyawa aktif, sehingga isi sel akan larut dalam pelarut metanol sehingga larutan didalam sel lebih tinggi konsentrasinya dari larutan diluar sel dan terjadi difusi kembali (Saifuddin, 2014).

Maserasi menggunakan pelarut metanol didasarkan pada prinsip like dissolved like sehingga senyawa steroid didalam *E. cottonii* terekstrak sesuai dengan sifat polar dari metanol. Metanol digunakan karena pada umumnya senyawa metabolit sekunder di alam berada dalam bentuk glikosidanya. Selain itu, metanol mempunyai titik didih yang lebih rendah (T.d  $74^{\circ}\text{C}$ ) dari etanol ( $78^{\circ}\text{C}$ ) sehingga pelarut metanol akan lebih mudah untuk diuapkan (Atun, 2014). Proses ekstraksi maserasi alga merah *E. cottonii* dilakukan sampai pengulangan 3 kali. Pada tiap kali pengulangan terjadi penurunan warna filtrat yang diasumsikan bahwa ekstrak telah maksimum terekstrak dalam pelarut metanol. Filtrat yang dihasilkan ditampung dan dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* dengan tujuan untuk menghilangkan pelarutnya melalui penguapan sehingga didapatkan hasil ekstrak pekat metanol. Rendemen yang diperoleh dari ekstrak pekat metanol alga merah *E. cottonii* adalah sebesar 10,62 %. Hasil ini berbeda dengan penelitian sebelumnya yang didapatkan rendemen sebesar 13,79 % (Pramitania, 2019). Perbedaan tersebut disebabkan karena perbedaan kadar air, perbedaan waktu pengambilan, waktu/umur panen, lingkungan tempat tumbuh, iklim dan penanganan pasca panen dapat mempengaruhi kandungan rumput laut (Marseno, dkk., 2010).

#### 4.4 Hidrolisis dan Partisi

Ekstrak pekat metanol dihidrolisis menggunakan HCl 2N (Artati, dkk., 2012). Penambahan HCl berfungsi untuk memutus ikatan glikosida sehingga diperoleh senyawa metabolit sekunder dalam keadaan bebas. Reaksi hidrolisis merupakan reaksi *reversible* (dapat balik), sehingga apabila tidak dihentikan maka akan terbentuk kembali ikatan glikosida (Fessenden dan Fessenden, 1986). Untuk menghentikan reaksi reversible tersebut, larutan selanjutnya dinetralkan menggunakan basa natrium bikarbonat sampai pH netral agar reaksi dapat berhenti dan hasil penetralkan berupa garam dapur tak beracun (Judaningsih dan Yulianningsih, 2003). Reaksi penetralkan tersebut menghasilkan gas CO<sub>2</sub> hasil reaksi HCl dan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Dugaan terjadinya reaksi hidrolisis, maka senyawa steroid menjadi bersifat semi polar cenderung non polar ditunjukkan pada gambar 4.1 sebagai berikut :



Gambar 4.1 Dugaan Reaksi Hidrolisis Pada Ikatan Glikosida

Steroid yang telah terputus dengan glikonnya dipisahkan selanjutnya dengan partisi menggunakan pelarut n-butanol. Berdasarkan penelitian sebelumnya Rudiyanto (2013) pelarut yang paling baik untuk memisahkan senyawa steroid pada alga merah *E. cottonii* adalah n-butanol. Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai  $EC_{50}$  sebesar 3,71 ppm. Pelarut ini digunakan karena senyawa steroid yang akan diisolasi memiliki sifat kepolaran yang mirip dengan pelarut n-butanol. Suatu senyawa dapat saling bercampur ketika memiliki kepolaran yang sama yang dikenal dengan *Like dissolved like* (Khopkar, 2008).

Proses partisi menghasilkan dua lapisan yaitu lapisan air dan lapisan organik. Lapisan air berada di bawah dan lapisan organik berada diatas dikarenakan berat jenis air lebih besar (1 g/L) dari pada berat jenis n-butanol (0,81 g/L). Komponen gula (glikon) akan terekstrak dalam pelarut yang bersifat polar (fase air) sedangkan aglikon akan terekstrak pada fase n-butanol. Fasa organik yang didapat berwarna coklat. Proses partisi dilakukan sampai fasa air terlihat bening yang dapat diasumsikan telah banyak senyawa yang terdistribusi ke dalam fasa organik. Lapisan organik yang mengandung aglikon diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat. Selain itu, sisa pelarut yang masih ada dihilangkan dengan dialiri gas  $N_2$  dan dihitung rendemen hasil ekstrak. Dari 5 gram ekstrak kasar yang dihidrolisis, didapatkan rendemen fraksi pekat n-butanol 27,05 %. Nilai Rendemen tersebut mengindikasikan bahwa proses hidrolisis terjadi sehingga senyawa semi polar cenderung nonpolar termasuk steroid terdistribusi kedalam pelarut n-butanol.

#### 4.5 Uji Fitokimia

Uji fitokimia merupakan pemeriksaan kimia secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam suatu sampel. Uji fitokimia dilakukan terhadap ekstrak alga merah *E. cottonii* dengan cara mereaksikan ekstrak dengan suatu reagen tertentu dalam tabung reaksi dan diamati secara kualitatif. Pemeriksaan terhadap fraksi n-butanol alga merah *E. cottonii* meliputi golongan alkaloid, flavonoid, steroid dan triterpenoid. Hasil skrining fitokimia pada tabel :

Tabel 4.1 Hasil Uji Fitokimia Fraksi *Eucheuma cottonii*

Golongan Senyawa Aktif	Fraksi <i>Eucheuma cottonii</i>
	Fraksi n-butanol
1. Triterpenoid	++++
2. Steroid	++++
3. Flavonoid	+
4. Alkaloid	
a. Meyer	+
b. Dragendrof	+
Keterangan : +++++ = sangat kuat	
+ = sangat lemah	

Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan menggunakan larutan pereaksi Dragendorf dan Mayer. Sampel di tambahkan HCl encer dalam tabung reaksi lalu diteteskan larutan pereaksi. Hasil uji fitokimia pada tabel bahwa ekstrak n-butanol mengandung senyawa alkaloid dengan terbentuknya endapan kekuning-kuningan ketika direaksikan dengan reagen mayer dan pada uji Dragendrof ditandai dengan terbentuknya endapan warna jingga. Penelitian yang telah melaporkan adanya alkaloid pada alga merah *E.cottonii* adalah Rudiyanto, (2015); Luthfiyah, (2017); Ranganayaki *et al.*, (2014).

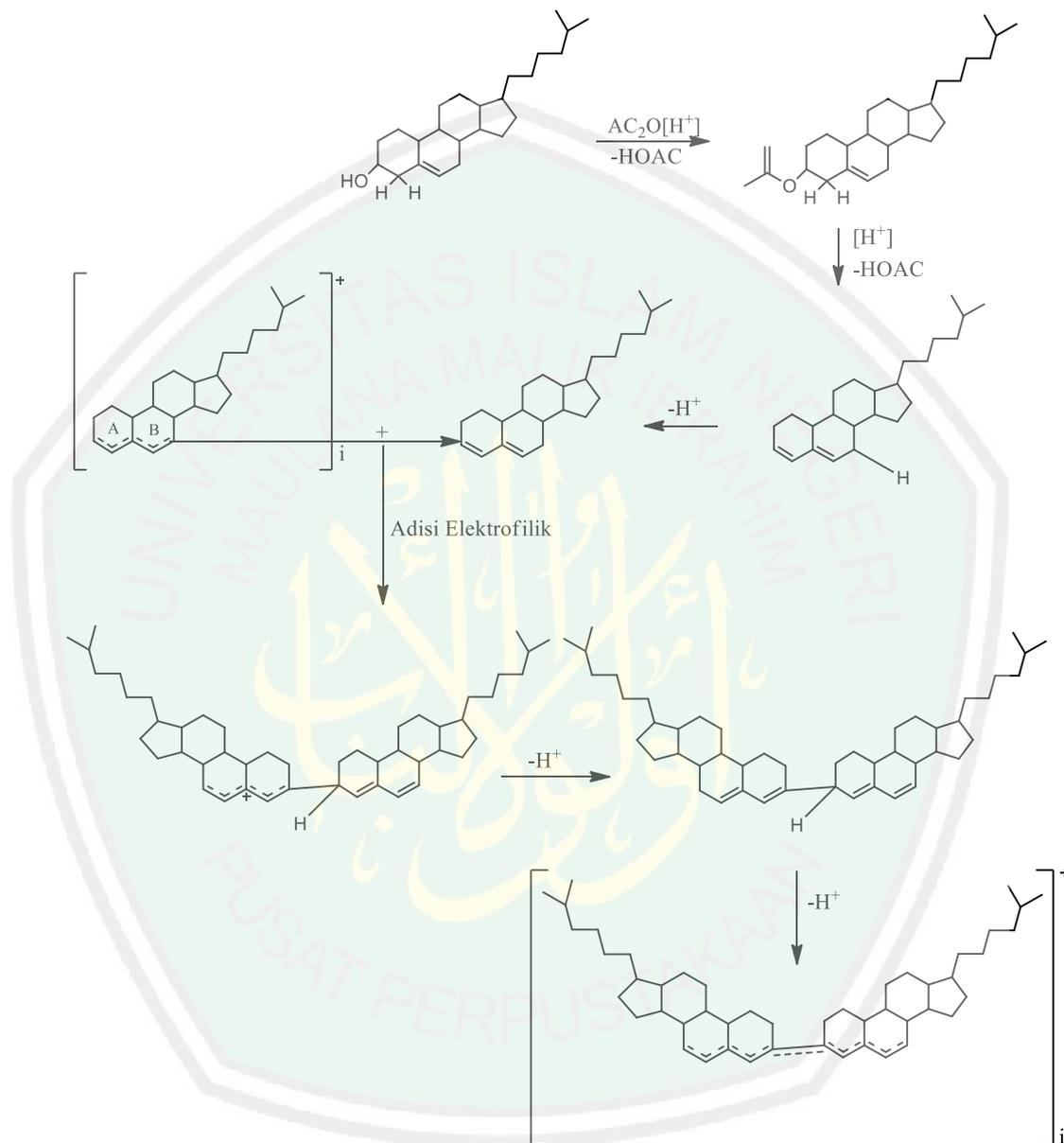
Flavonoid dalam ekstrak ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga (Marliana, dkk, 2006). Hasil uji fitokimia pada Tabel 4.1

menjelaskan bahwa ekstrak n-butanol mengandung senyawa flavonoid yang ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning. Menurut Robinson (1995), flavonoid akan menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah, kuning atau jingga ketika direduksi dengan logam Mg dan HCl pekat. Penelitian yang telah melaporkan adanya flavonoid pada alga merah (*E. cottonii*) adalah Rudiyanto, (2015); Nagarani dan Kumaraguru, (2013); Ranganayaki *et al.*, (2014).

Langkah awal untuk identifikasi adanya kandungan senyawa triterpenoid dan steroid dilakukan uji fitokimia menggunakan reagen Lieburman-Burchard. Hasil pengujian menunjukkan bahwa alga merah *E. cottonii* mengandung senyawa steroid dan triterpenoid. Menurut astarina (2013) uji fitokimia senyawa steroid pada suatu ekstrak kasar dengan menggunakan reagen Liebermann buchard akan membentuk warna cincin biru kehijauan bila terdapat senyawa steroid. Penelitian yang telah melaporkan adanya senyawa steroid dan triterpenoid pada alga merah *E. cottonii* adalah Ranganayaki *et al.*, (2014); Rudiyanto, (2015); Luthfiah, (2017); Pramitania, (2019).

Reagen Liebermann-Burchard yang digunakan merupakan campuran dari anhidrida asetat dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Reaksi ini berawal dari proses asetilasi gugus hidroksil menggunakan asetat anhidrat. Selanjutnya gugus asetil (gugus pergi yang baik) akan lepas atau mengalami eliminasi sehingga membentuk ikatan rangkap terkonjugasi. Kemudian terjadi pelepasan gugus hidrogen dengan elektronnya yang menyebabkan ikatan rangkap mengalami perpindahan. Senyawa akan mengalami resonansi yang bertindak sebagai elektrofil atau karbokation. Serangan karbokation mengakibatkan adisi elektrofilik diikuti dengan pelepasan hydrogen. Eliminasi hydrogen ini mengakibatkan terjadinya penggabungan cincin segi enam tak jenuh

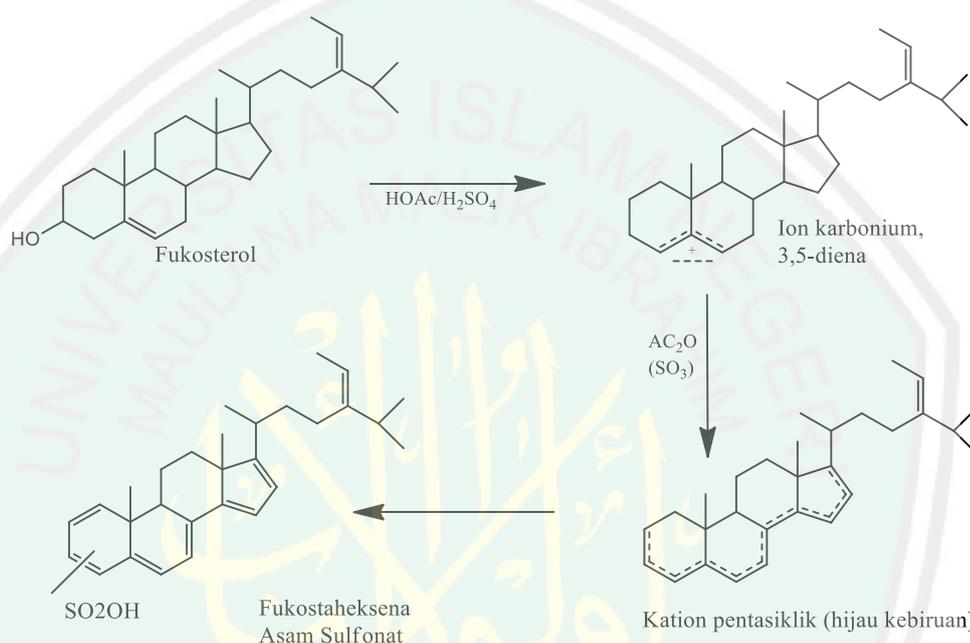
sehingga ikatan rangkap terkonjugasi akan diperpanjang, lalu menghasilkan warna coklat pada triterpenoid yang mengabsorpsi spektrum dengan Panjang gelombang tertentu (Siadi, 2012). Berikut persamaan reaksinya ditunjukkan pada Gambar 4.2 :



Gambar 4.2 Reaksi Dugaan Uji Triterpenoid (Siadi, 2012)

Hasil positif steroid ditandai dengan adanya perubahan warna larutan fraksi menjadi hijau atau biru. Menurut Halimah (2010) senyawa steroid akan mengalami dehidrasi dengan adanya penambahan asam kuat dan membentuk garam yang

memberikan sejumlah reaksi warna. Perubahan warn ini disebabkan oleh reaksi oksidasi golongan steroid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi (Sriwahyuni, 2010). Dugaan reaksi steroid dengan pereaksi Lieberman-Burchard ditunjukkan pada Gambar 4.3:



Gambar 4.3 Dugaan Reaksi Steroid dengan Lieberman-Burchard (Burke, dkk., 1974)

#### 4.6 Pemisahan Steroid dengan Kromatografi kolom dan Monitoring KLTA

Ekstrak pekat n-butanol *Eucheuma cottonii* yang positif mengandung steroid dipisahkan dengan metode kromatografi kolom basah. Prinsip kromatografi kolom adalah pemisahan berdasarkan proses adsorpsi antara fase diam dan fase gerak. Sampel yang masuk dalam kolom akan dibawa oleh fasa gerak, sehingga terjadi interaksi senyawa sampel dengan fase diam (Sastrohamidjojo, 2004). Fase diam yang banyak digunakan pada kromatografi kolom adalah silika gel 60 dengan ukuran 0,063-0,200 mm (Sholikah, 2016). Sebelum digunakan, silika gel terlebih

dahulu diaktivasi untuk menghilangkan kandungan air pada silika. Kolom yang digunakan pada penelitian ini berdiameter 1 cm (Mubarokah, 2017) dengan laju alir 2 mL/menit (Fitri, 2017).

Proses pemisahan dimulai dengan mengambil sebanyak 0,067 gram dengan perbandingan 1:150 antara sampel dengan fase diam yang dilarutkan kedalam 1 ml pelarut dengan perbandingan n-heksana dan etil asetat (95:5) dimasukkan kedalam kolom. Menurut Tyas (2017) bahwa dengan perbandingan 1:150 menghasilkan pemisahan senyawa terbaik pada isolasi steroid *E. cottonii* dengan kromatografi kolom. Penggunaan n-heksana dan etil asetat sebagai fase gerak merupakan eluen terbaik untuk memisahkan steroid pada alga merah (Anam, 2015); (Anggraini, 2018); dan (Pramitania, 2019). Proses elusi dengan penambahan campuran fasa gerak n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25 dan 70:30 yang dilakukan dengan metode elusi gradien yaitu selama proses elusi menggunakan fase gerak yang berubah-ubah polaritasnya. Penambahan eluen dengan berbagai komposisi bertujuan agar dapat memisahkan senyawa dengan polaritas yang berbeda-beda. Eluat yang keluar ditampung sebanyak 2 mL/menit ke dalam botol vial dengan jumlah eluat yang dihasilkan pada penelitian ini sebanyak 271 vial, selanjutnya dilakukan KLT fraksi-fraksi hasil kolom untuk mengelompokkan pola noda yang sama.

Eluat hasil dari pemisahan kromatografi kolom kemudian dimonitoring lebih lanjut menggunakan KLT Analitik. Teknik pemisahannya hampir sama dengan kromatografi kolom yaitu berdasarkan distribusi senyawa pada fase diam yang berupa silika gel F<sub>254</sub> yang terdapat pada plat KLT dan fase gerak yang berupa campuran n-hesana dan etil asetat dengan perbandingan 17:3 (Ratnasari, 2017).

Vial hasil isolasi yang dimonitoring yaitu setiap kelipatan 2 vial. Senyawa steroid pada plat KLT akan menghasilkan warna hijau (Saleh, 2007) dan biru (Astuti, 2014). Tabel hasil monitong menggunakan komposisi eluen n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17:3 ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil Monitoring dengan KLTA

Fraksi	Vial	$\Sigma$ -spot	Warna UV <sub>254nm</sub> / UV <sub>366nm</sub>	Dugaan Senyawa	R <sub>f</sub>	Berat (mg)	Rendemen (%)
A1	1-71	-	-	-	-	-	-
A2	62-72	1	Hijau	Steroid	0,45	5,9	<b>8,8060</b>
A3	73-79	2	Hijau	Steroid	0,45	2,7	4,0298
			Biru		0,3625		
A4	80-91	1	Biru	Steroid	0,3625	6,6	<b>9,8507</b>
A5	92-98	1	Merah	Triterpenoid	0,3125	4,3	6,4179
A6	99-108	2	Merah	Triterpenoid	0,3125	2,6	3,8806
					0,225		
A7	109-124	3	Merah	Triterpenoid	0,3125	5,6	8,3582
					0,225		
					0,175		
A8	125-156	2	Merah	Triterpenoid	0,225	7,1	10,5970
					0,175		
A9	157-189	2	Merah	Triterpenoid	0,175	6,6	9,8507
					0,125		
A10	190-234	1	Merah	Triterpenoid	0,05	4,9	7,3134

Hasil monitoring KLTA dari tiap-tiap vial yang dihasilkan dari kromatografi kolom, didapatkan 10 fraksi dari penggabungan berdasarkan noda yang terbentuk dengan warna dan R<sub>f</sub> yang sama, sehingga diperoleh 10 kelompok fraksi besar (A1,A2,A3,A4,A5,A6,A7,A8,A9,A10) dengan empat noda tunggal yakni dua noda tunggal fraksi A2 dan A4 diduga merupakan senyawa steroid dimana noda tersebut menghasilkan warna hijau (Saleh, 2007), biru (Astuti, 2014) dan dua noda tunggal fraksi A5 dan A10 diduga merupakan senyawa triterpenoid dimana noda tersebut menghasilkan warna merah (Septiandari, 2016) ketika dideteksi dibawah lampu UV 366 nm. Pada UV 366 nm noda akan berfluoresensi

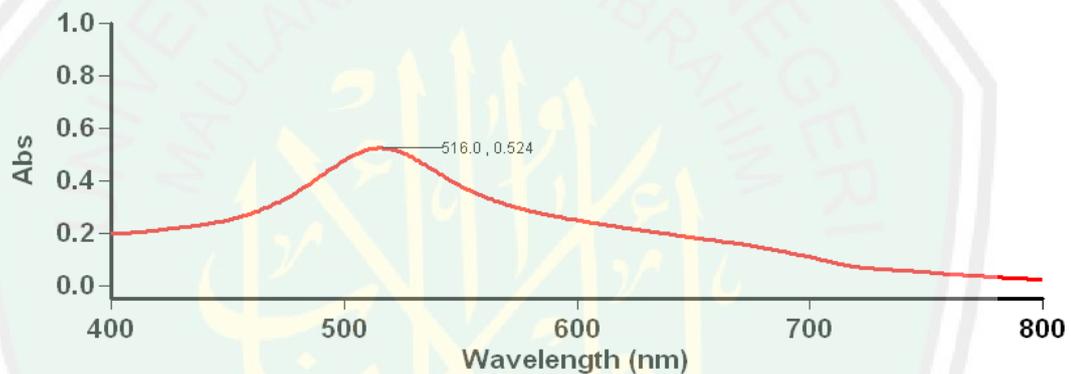
dan lempeng akan berwarna gelap. Penampakan noda hijau, biru dan merah pada sinar uv 366 nm disebabkan karena adanya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh auksokrom yang terdapat pada noda tersebut sehingga noda akan berfluoresensi. Fluoresensi warna yang tampak tersebut merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron yang tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi tinggi. Perbedaan energi emisi yang dipancarkan pada saat kembali ke energi dasar inilah yang menyebabkan perbedaan fluoresensi warna yang dihasilkan oleh tiap noda (Rohman dan Gandjar, 2007). Perbedaan nilai  $R_f$  menunjukkan tingkat kepolaran senyawa yang dipisahkan bersifat berbeda. Penelitian Fitri (2017) melaporkan hasil pemisahan *E. cottonii* dengan kromatografi kolom sistem elusi isokratik hanya menghasilkan 1 noda tunggal senyawa steroid. Hal ini menunjukkan bahwa sistem elusi gradien senyawa pada sampel akan lebih banyak terisolasi dari pada sistem elusi isokratik.

#### **4.7 Uji Aktivitas Antioksidan**

##### **4.7.1 Penentuan Panjang gelombang maksimum**

Aktivitas antioksidan sampel diukur melalui pengukuran intensitas serapan dari setiap sampel setelah ditambahkan DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang tertentu. Berdasarkan hal tersebut, sebelum dilakukan pengukuran aktivitas antioksidan, dilakukan terlebih dahulu penentuan Panjang gelombang maksimum larutan DPPH. Pengukuran panjang gelombang maksimum digunakan sebagai acuan panjang gelombang ketika pengukuran aktivitas antioksidan. Pengukuran sampel harus dilakukan pada panjang gelombang maksimum agar kepekaannya lebih maksimal dan meminimalkan kesalahan

(Rohman dan Gandjar, 2007). Menurut Prakash, dkk., (2001) yang menyebutkan bahwa DPPH memiliki absorbansi maksimum pada panjang gelombang 515-520 nm. Hasil percobaan menunjukkan serapan maksimum DPPH terletak pada panjang gelombang 516 nm. Hal ini berarti bahwa pengukuran serapan atas peredaman seluruh isolat steroid terhadap radikal bebas DPPH dilakukan pada panjang gelombang 516 nm. Hasil spektra UV-Vis dari pengukuran yang telah dilakukan dapat dilihat pada Gambar 4.4 :



Gambar 4.4 Panjang Gelombang Maksimum DPPH

#### 4.7.2 Pengukuran Potensi Antioksidan pada Sampel

Uji aktivitas antioksidan isolat steroid alga merah *Eucheuma cottonii* dilakukan dengan menggunakan metode DPPH. Pemilihan menggunakan metode ini karena merupakan metode yang sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel untuk evaluasi aktivitas antioksidan dari senyawa bahan alam. Prinsip metode ini adalah pengurangan intensitas warna DPPH akibat berkurangnya jumlah DPPH yang bereaksi dengan sampel menjadi DPPH-H (Molyneux, 2004). Pengujian aktivitas antioksidan pada isolat senyawa steroid hasil kromatografi kolom dilakukan dengan variasi konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm

dan diukur serapannya pada panjang gelombang 516 nm. Pengukuran aktivitas antioksidan ini menggunakan kontrol larutan DPPH 0,2 mM. Larutan kontrol berfungsi untuk menentukan absorbansi radikal DPPH sebelum direduksi oleh sampel. Selisih absorbansi kontrol dengan absorbansi sampel yang telah direduksi DPPH merupakan sisa radikal DPPH yang terbaca pada spektrofotometer UV-Vis (Arindah, 2010). Absorbansi kontrol dan absorbansi isolat yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menentukan persen aktivitas antioksidan. Pengujian aktivitas antioksidan diinkubasi pada suhu 37°C karena pada suhu ini reaksi antara radikal DPPH dengan senyawa metabolit sekunder berlangsung lebih optimal (Rohmaniyah, 2016).

Aktivitas antioksidan secara fisik dapat diamati dengan adanya perubahan fisik pada warna DPPH. Radikal bebas DPPH yang memiliki elektron tidak berpasangan yang menunjukkan warna ungu (Rizkayanti *et al.*, 2017). Warna ungu akan berubah menjadi ungu muda atau kuning Ketika DPPH dicampur dengan senyawa bahan alam yang dapat mendonorkan atom hidrogen (Syaifuddin, 2015). Menurut Prakash (2001) pengurangan intensitas warna berhubungan dengan jumlah elektron DPPH yang menangkap elektron hidrogen dari senyawa antioksidan. Pengurangan intensitas warna mengindikasikan peningkatan kemampuan antioksidan untuk menangkap radikal bebas.

Parameter untuk mengetahui kemampuan antioksidan dalam sampel selain dari perubahan warna yaitu persen (%) aktivitas antioksidan nilai  $EC_{50}$ . Persen aktivitas antioksidan merupakan parameter yang digunakan untuk menunjukkan kemampuan antioksidan dalam menghambat radikal bebas. Persen aktivitas antioksidan menunjukkan banyaknya atom hidrogen dari senyawa antioksidan yang

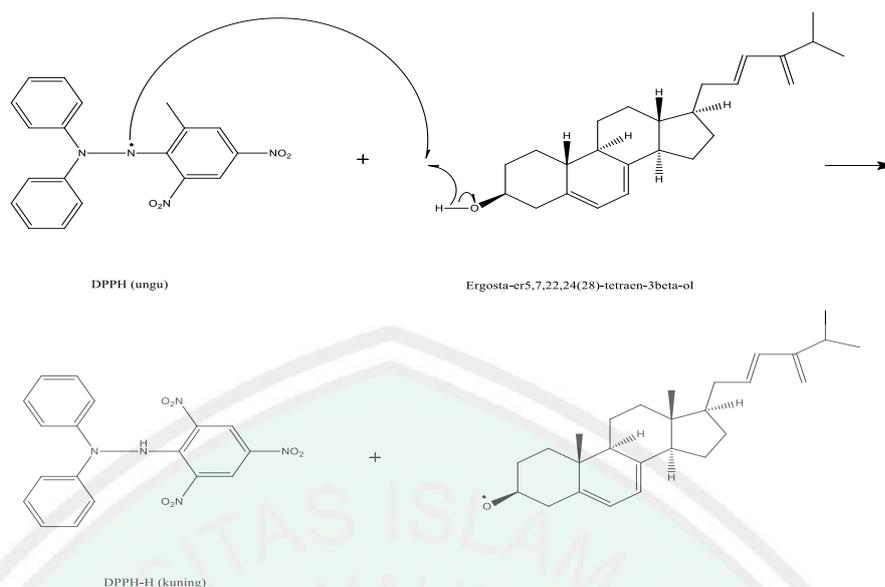
menangkap radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (Rahayu dkk., 2010). Sedangkan nilai  $EC_{50}$  (*efficiency concentration*) ini diperoleh dengan mengolah nilai persen aktivitas antioksidan.  $EC_{50}$  didefinisikan sebagai besarnya konsentrasi sampel atau substrat yang menyebabkan pengurangan absorbansi (atau pengurangan warna) DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai  $EC_{50}$  berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan suatu sampel. Secara spesifik, suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat jika nilai  $EC_{50}$  bernilai kurang dari 50 ppm, kuat jika bernilai 50 – 100 ppm, sedang jika bernilai 100 – 150 ppm, dan lemah jika bernilai 150 – 200 ppm (Mardawati, dkk., 2008). Nilai % aktivitas antioksidan dan nilai  $EC_{50}$  masing-masing sampel :

Tabel 4.3 Nilai % aktivitas antioksidan sampel dan nilai  $EC_{50}$  masing-masing sampel :

Konsentrasi (ppm)	% aktivitas antioksidan Sampel			
	Isolate A2	Isolat A4	Vitamin C	BHT
5	9,25 %	3,73 %	92,18 %	27,97 %
10	12,01 %	5,19 %	94,53 %	44,37 %
15	19,70 %	12,14 %	95,07 %	53,97 %
20	31,96 %	18,79 %	95,09 %	61,38 %
25	38,20 %	29,74 %	95,53 %	64,02 %
$EC_{50}$	35,03 ppm	38,10 ppm	0,006 ppm	12,91 ppm

Berdasarkan Tabel 4.3 diketahui bahwa bertambahnya konsentrasi isolat steroid menyebabkan persen aktivitas antioksidan meningkat hal ini menunjukkan semakin banyak konsentrasi yang digunakan, maka semakin banyak senyawa pada sampel yang menghambat radikal bebas DPPH (Pramessti, 2013). Data yang telah didapat dari perhitungan % aktivitas antioksidan digunakan untuk menghitung  $EC_{50}$

yang merupakan parameter utama pada pengukuran aktivitas antioksidan. Nilai EC50 dapat diperoleh dari persamaan regresi non linier dengan *GraphPad prism software, Regression for analyzing doseresponse data* yang menyatakan hubungan antara log konsentrasi larutan ppm (x) dengan % aktivitas antioksidan (y). Berdasarkan Tabel 4.3 menunjukkan bahwa isolate steroid A2 dan A4 fraksi n-butanol alga merah *E. cottonii* pada kedua isolate memiliki kemampuan aktivitas antioksidan untuk menghambat radikal bebas dengan nilai EC50 masing-masing yaitu sebesar 35,03 ppm, dan 38,10 ppm, sehingga kedua isolate ini dikategorikan sebagai antioksidan sangat kuat, karena memiliki nilai  $EC_{50} < 50$  ppm. Steroid sebagai antioksidan bereaksi dengan radikal DPPH menggunakan mekanisme HAT (Hydrogen Atom Transfer). Radikal DPPH mengalami oksidasi dengan menangkap satu atom hidrogen dari steroid sehingga steroid yang mulanya non radikal berubah menjadi radikal. Reaksi ini dapat ditandai dengan perubahan warna pada larutan DPPH. Larutan DPPH yang mulanya berwarna ungu ketika ditambahkan dengan sampel yang berpotensi antioksidan maka dapat menghasilkan warna kuning (apabila aktivitas antioksidan yang diberikan cukup kuat), akan tetapi apabila antioksidan yang diberikan memiliki aktivitas yang kecil maka biasanya perubahan warna yang terjadi tidak terlalu signifikan yaitu dari ungu tua menjadi ungu cerah. Dugaan reaksi steroid sebagai antioksidan secara metode DPPH dapat dilihat pada Gambar 4.5 :



Gambar 4.5 Dugaan reaksi steroid (Ergosta-er5,7,22,24(28)-tetraen-3beta-ol) dengan DPPH (Liang dan D. Kitts, 2014 & Yu, et al., 2016)

Pengujian aktivitas antioksidan pada sampel dibandingkan dengan aktivitas

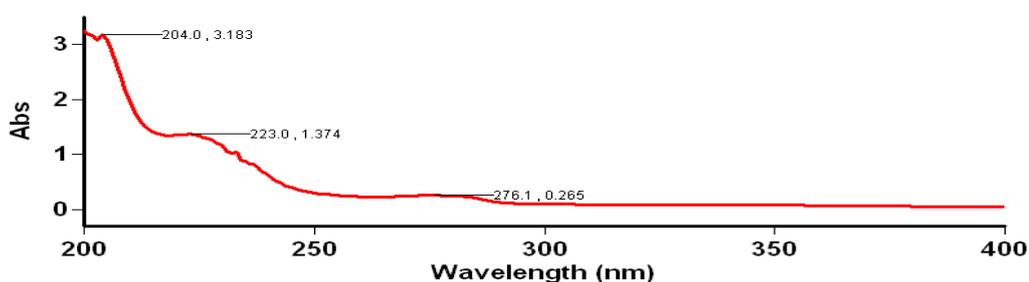
antioksidan vit c dan BHT dimana masing-masing mewakili antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Vitamin C dan BHT digunakan sebagai pembanding karena berfungsi untuk mengetahui seberapa kuat potensi antioksidan dalam sampel jika dibandingkan dengan antioksidan yang sering dipakai yaitu asam askorbat (vitamin C) dan BHT. Pembanding vit C dan BHT memiliki potensi antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan isolate steroid fraksi n-butanol yaitu dengan nilai  $EC_{50}$  masing-masing sebesar 0,006 ppm dan 12,91 ppm. Semakin kecil nilai  $EC_{50}$  maka aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh suatu bahan semakin kuat. Berdasarkan hasil penelitian isolat ke 1 memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik dari pada isolate steroid kedua yang ditunjukkan dengan nilai  $EC_{50}$  yang lebih kecil yaitu 35,03 ppm.

Luki (2018) juga meneliti mengenai efek antioksidan senyawa steroid fraksi etil asetat hasil kromatografi kolom dan dihasilkan nilai  $EC_{50}$  sebesar 5,146 ppm dimana isolat tersebut telah dikonfirmasi menggunakan LC-MS/MS merupakan

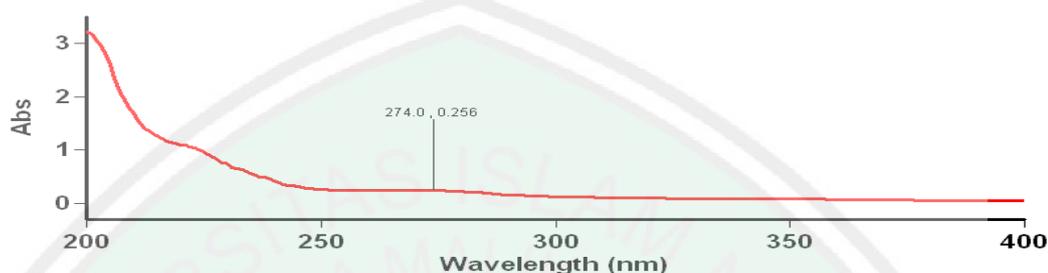
senyawa fukosterol, desmosterol, kampasterol,  $\beta$ -sitosterol dan stigmasterol dimana senyawa-senyawa tersebut termasuk dalam jenis senyawa golongan fitosterol. Fitosterol merupakan golongan senyawa dalam kelompok steroid. Secara struktur fitosterol terdiri dari triterpene yang bentuknya mirip dengan kolesterol. Perbedaan antara keduanya terletak pada sisi samping kerangkanya. Akibat struktur yang mirip, ketika dikonsumsi, keduanya akan berkompetisi dalam penyerapan oleh sistem pencernaan dalam tubuh sehingga keberadaan fitosterol selain dapat menurunkan kadar kolesterol dalam tubuh manusia (Jati, dkk., 2019) juga mampu sebagai antioksidan (Ahmed, *et al.*, 2015). Fitosterol di pasar telah digunakan sebagai bahan aditif dalam berbagai makanan seperti margarin, yoghurt, dan susu selama pemrosesan (Carmona, *et al.*, 2010) dalam industri kosmetik misalnya pada krim dan lipstik (Fernandes, *et al.*, 2007) dan juga pada farmasi digunakan dalam pengembangan produk Cytellin yang digunakan sebagai pengobatan yang dipasarkan oleh Eli Lilly (Ahmed, *et al.*, 2015).

#### 4.8 Identifikasi Steroid menggunakan UV-Vis

Isolat hasil kromatografi kolom dapat dilakukan uji identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil pengukuran pada isolat A2 dan A4 menghasilkan serapan pada Panjang gelombang yang ditampilkan pada Gambar 4.6 dan 4.7.



Gambar 4.2 Hasil Pengukuran Serapan Maksimum Isolat A2



Gambar 4.3 Hasil Pengukuran Serapan Maksimum Isolat A4

Hasil identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis pada gambar 4.6 dan 4.7 menunjukkan seapan panjang gelombang maksimum 204 pada isolat A2 yang memberikan dugaan senyawa memiliki transisi  $\pi - \pi^*$ . Menurut Johnson (1985) puncak serapan pada daerah 190-210 nm serapan ini terjadi karena akibat transisi elektronik dari kromofor yang mengandung ikatan  $\pi$  yaitu gugus C=C tak terkonjugasi dan memberikan transisi elektronik dari  $\pi - \pi^*$ . Selain itu, terdapat pula serapan yang terdeteksi pada isolat A2 pada panjang gelombang maksimum 223 nm menunjukkan terjadinya transisi  $\pi - \pi^*$  disebabkan oleh adanya ikatan C=C terkonjugasi. Menurut Etika (2014) menjelaskan bahwa senyawa steroid pada analisis UV-Vis terdapat serapan diena terkonjugasi pada transisi  $\pi - \pi^*$  pada daerah 215-230 nm. Isolat pada gambar 4.2 dan 4.3 memiliki transisi elektronik dari  $\pi - \pi^*$  yang mengindikasikan ikatan C=C terkonjugasi karena muncul serapan pada panjang gelombang maksimum 276 dan 274 nm. Amalyah (2015) melakukan isolasi metabolit sekunder ekstrak n-heksana kulit batang tumbuhan nyiri batu yang

memiliki dua pita serapan UV-Vis pada panjang gelombang 206,8 dan 275,2 nm. Isolat tersebut setelah dikonfirmasi dengan Instrumen FTIR dan GC-MS dihasilkan senyawa Ergost-5-en-3-ol yang merupakan golongan steroid.

#### 4.9 Pemanfaatan Alga Merah *Eucheuma cottonii* Dalam Perspektif Islam

Hasil beberapa penelitian menunjukkan bahwa alga merah *Eucheuma cottonii* mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder, sehingga alga merah *Eucheuma cottonii* berpotensi sebagai antioksidan, antikanker dan antibakteri. Hal ini membuktikan bahwa tumbuhan yang diciptakan Allah memiliki kandungan senyawa kimia yang bermanfaat dan berpotensi sebagai tanaman obat. Allah Swt. menciptakan segala sesuatu yang ada dimuka bumi ini tidak ada yang sia-sia, diantaranya sebagai salah satu sumber yang dapat diambil hasilnya untuk kemaslahatan umat manusia. Allah Swt. berfirman dalam AL Qur'an surat Ali Imron ayat 190-191 yaitu :

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاجْتِلاَفِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لآيَاتٍ لِأُولِي الْأَبْصَارِ .  
الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا  
مَا خَلَقْتَهُذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

“*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal, (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi*” (Qs. Ali Imron : 190-191).

Tafsir Ibnu Kasir bahwa lafadz *fi kholqissamawati wal alrdhi* menjelaskan kekuasaan dan kebesaran Allah Swt. yang telah menciptakan alam semesta beserta isinya seperti tumbuhan dan hewan. Allah Swt. menciptakan segala sesuatu tidak

ada yang sia-sia, melainkan terdapat hikmah dan manfaatnya. Allah Swt. menciptakan makroalga *Eucheuma cottonii* mempunyai berbagai manfaat salah satunya dalam bidang kesehatan yaitu sebagai obat. Obat merupakan salah satu alternative untuk menyembuhkan penyakit. Segala macam penyakit yang telah diberikan oleh Allah Swt. pasti ada obat atau penawarnya yang diberikan olehNya bahkan manusia tidak menyadarinya. Suatu penyakit akan sembuh sesuai dengan kehendak Allah Swt. (Fath, 2010). Seperti halnya pada sabda Rasulullah Saw dalam HR. Ibnu Majah :3430 berikut:

عَنْ أَبِي هُرَيْرَةَ قَالَ قَالَ رَسُولُ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

*“ Abu Hurairah dia berkata, Rasulullah SAW bersabda: “Allah tidak menurunkan suatu penyakit kecuali menurunkan obat baginya” “(HR. Ibnu Majah: 3430).*

Hadist tersebut menjelaskan bahwa Allah Swt. adalah maha adil yang mana dengan beberapa penyakit yang diberikan, Allah Swt. senantiasa selalu menunjukkan penawarnya yaitu obat bagi mereka yang berfikir dengan keimanannya (Farooqi, 2005). Penelitian merupakan salah satu cara untuk berfikir, memperhatikan dan merenungkan ciptaan dan kekuasaan Allah Swt. terlebih bagi manusia yang berakal agar dapat menggali berbagai potensi dari ciptaan Allah untuk dibuktikan kebenarannya melalui ilmu pengetahuan atau penelitian. Manusia diperuntukan untuk mempelajari banyak ilmu pengetahuan yang akan menuntunnya mendapatkan obat yang diperlukan baik itu yang alami ataupun sintetik. Manusia akan memperoleh pemanfaatan tumbuhan sebagai obat dengan usaha mengembangkan ilmu pengetahuan.

Penelitian ini menunjukkan bahwa steroid pada alga merah *Eucheuma cottonii* mempunyai manfaat sebagai obat (antioksidan) salah satu bukti usaha untuk mendapatkan bukti atas apa yang diberikan oleh Allah Swt. Kandungan antioksidan ini dapat dijadikan sebagai pencegah oksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas, yang dapat menyebabkan berbagai penyakit karsinogenik dan penuaan (Yan, dkk, 1998). Potensi tersebut dibuktikan dengan kuatnya aktivitas antioksidan senyawa steroid fraksi n-butanol hasil kromatografi kolom Alga Merah *Eucheuma cottonii* menunjukkan nilai EC<sub>50</sub> untuk masing-masing isolat sebesar 35,03ppm untuk isolate A4 dan 38,10 untuk isolate A2 ppm.

Manusia hendaklah menyadari bahwa setiap yang diciptakan oleh Allah adalah anugerah yang sangat besar. Allah Swt. telah menciptakan berbagai macam tumbuhan dimuka bumi ini. Oleh karena itu, manusia harus melestarikan dan menjaga ciptaan Allah Swt. karena Ketika manusia menjaga dan mensyukuri apa yang telah diberikan, maka manusia akan dilebihkan nikmat dari hidupnya. Sebagaimana dijelaskan dalam Q.S Ibrahim (14) : 7

وَإِذْ تَأَذَّنَ رَبُّكُمْ لَئِن شَكَرْتُمْ لَأَزِيدَنَّكُمْ ۖ وَلَئِن كَفَرْتُمْ إِنَّ عَذَابِي لَشَدِيدٌ

“ Dan (ingatlah juga), tatkala Tuhanmu memaklumkan; Sesungguhnya jika kamu bersyukur, pasti kami akan menambah (nikmat) kepadamu, dan jika kamu mengingkari (nikmat-Ku), maka sesungguhnya azab-Ku sangat pedih”

Setiap apa yang diciptakan oleh-Nya kemuidan diperuntukkan kepada manusia sebagai khalifah di muka bumi ini. Ini bukan berarti bahwa manusia boleh dengan seenaknya atau semaunya menggunakan apa yang telah diciptakan-Nya itu melainkan untuk dimanfaatkan sebaik-baiknya.

## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

1. Hasil pemisahan senyawa steroid fraksi n-butanol menggunakan kromatografi kolom cara basah dengan sistem elusi gradien menghasilkan dua noda tunggal berwarna hijau dan biru pada UV 366 nm dengan Rf 0,45 dan 0,36 yang diduga senyawa steroid.
2. Isolat steroid *E.cottonii* dengan kromatografi kolom fraksi n-butanol memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan nilai EC<sub>50</sub> sebesar 35,03 dan 38,10 ppm.
3. Hasil identifikasi isolat senyawa steroid *Eucheuma cottonii* dengan UV-Vis, menunjukkan adanya serapan pada Panjang gelombang 204 nm yang mengindikasikan adanya ikatan C=C tidak terkonjugasi, 223 nm yang mengindikasikan diena terkonjugasi dan pada panjang gelombang 274 dan 276 nm mengindikasikan ikatan C=C terkonjugasi.

#### 5.2 Saran

Saran dari penelitian selanjutnya yaitu dapat dilakukan :

1. Dapat dilakukan uji aktivitas senyawa bioaktif lain terhadap isolat alga merah *Eucehuma cottonii* mengingat begitu banyak manfaat dari senyawa steroid ini dalam kehidupan sehari-hari.
2. Dapat dilakukan metode pemisahan senyawa steroid yang lain seperti dengan kromatografi cair vakum untuk pemisahan lebih maksimal dan dilanjutkan pemurnian dengan metode rekristalisasi.

3. Sampel yang digunakan harus diperbanyak agar bisa digunakan identifikasi lebih lanjut dengan instrumentasi LC-MS/MS untuk mengetahui jenis steroid pada alga merah *Euclima cottonii* dan juga dengan H-NMR atau C-NMR untuk mengetahui elusidasi struktur dari senyawa yang diketahui.



## DAFTAR PUSTAKA

- Ad-Dimasyqi, A.A.F.I.I.K. 2001. Tafsir Ibnu Kasir Juz 7. Bandung: Sinar Baru Algesindo.
- Adhiatama, I., Zainuddin, M., dan Rokhati, N. 2012. Hidrolisis Kitosan menggunakan Katalis Asam Klorida. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*, 1(1): 245-251.
- Afif. S. 2013. Ekstraksi, Uji Toksisitas dengan Metode BLT dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Alga Merah *Euclima spinosam* dari Sumenep Madura. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ahmed, F., Zhou, W., Schenk, P. M. 2015. Pavlova Lutheri Is a High-Level Producer Of Phytosterols. *Alga Reserch*. (10) : 210-217.
- Al-Mahali, Iman Jalaluddin dan As-Suyuti, Imam Jalaluddin. 2008. *Tafsir Jalalain*. Bandung :Sinar Baru Algensindo.
- Amalyah, R dan Hidajati, N. 2015. Isolasi Metabolit Sekunder dan Uji Aktivitas Insektisida Ekstrak n-Heksana Kulit Batang Tumbuhan Nyiri Batu (*Xylocarpus moluccenciss*). *UNESA Journal of Chemistry* 4(1):25-30.
- Amaranggana, Larasati dan W., Nasrul. 2017. Manfa atlga Merah (*Rhodopyta*) Sebagai Sumber Obat dari Bahan Alam. *Majalah Farmasetika*2(1).
- Amora, S.D., dan Sukesu. 2013. Ekstraksi Senyawa Antioksidan Pada Nugget Rumput Laut Merah, *Euclima cottonii*. *Jurnal Sainst dan Seni Pomits*, 2(2): C23-C25.
- Anam, K. 2015. Isolasi Senyawa Triterpena dari Alga Merah (*Euclima cottonii*) menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Analisisnya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Andersen Oyvin M, Kenneth R Markham. Flavonoid: Chemistry, Biochemistry and Application. CRC Press. London. 2006.
- Andriani Z., Fasya, A.G., Syarifah, U., Hanapi, A. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Alga Merah *Euclima cottonii* dari Pantai Tanjung Sumenep Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escheriacolli*. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Andriani, Z., Fasya, A. G., Hanapi, A.. 2015. Antibacterial Activity of the Red Algae *Euclima cottonii* Extract from Tanjung Coast, Sumenep Madura. *Alchemy: Journal of Chemistry*. Vol. 4. No. 2: hal 93-100.

- Anggadiredja, J. T., Zatmika A., Purwoto H, dan Istini, S. 2006. *Rumput Laut*. Jakarta: PenebarSwadaya.
- Anggraini, Vivin. 2018. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Dengan Variasi Gradien Eluen Fraksi Etil Asetat Makro alga *Eucheuma cottonii*. Skripsi. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- AOAC, 1984. *Official methods of analysis.11th edition*. Association of Official Analytical Chemists Inc., Washington D.C.
- Aprelia, F. dan Suyatno. 2013. Senyawa Metabolit Sekunder dan Ekstrak Etil Asetat Tumbuhan Paku *Christellaarida* dan Uji Pendahuluan Sebagai Antikanker. *Journal of Chemistry*. 2(3): 94-99.
- Ardji, Ari., W., dan Lia., D. 2018. Karakterisasi Senyawa Steroid Dari Fraksi Diklorometana Batang Tanaman Andong (*Cordyline fruticosa*) dan Aktivitas Sitotoksiknya Terhadap Sel HeLa. *JKK*. Vol 7 (1) : 48-52.
- Ash Shiddieqy, T.M.H. 2000. Tafsir Al-Qur'anul Majid An-Nuur. Semarang: PustakaRizki Putra.
- Ash-Shiddieqy, Teungku Muhammad Hasbi. 2000. *Tafsir Al-Qur'an Majid An-nuur*. Semarang :PustakaRizki Putra.
- Astuti, M. D, Maulana, A, dan Kuntowati, E. M. 2014. Isolasi Steroid dari Fraksi n-Heksana Batang Bajakah Tampala (*Spatholobus Littoralis Hassk*). Di dalam: Prosiding Seminar Nasional Kimia; Surabaya, 20 September 2014. Surabaya: Universitas Negeri Surabaya. Halaman 9-13.
- Atmadja, w., Kadi., A., Sulistijo dan Rachmaniar. 1996. PengenalanJenis-jenis Rumput Laut Indonesia. Jakarta :PusLitBang Oseanologi – LIPI
- Atun S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Kimia*. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta. Vol. 8 No.2, Hal 53-61.
- Auterhoof, H., dan Kovar, K. A.. 1987. *Identifikasi Obat*. Bandung: ITB.
- Azizah, Laili Nur. 2016. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma spinosum*.Skripsi. Malang:Universitas Islam Negeri Maulana Mailik Ibrahim Malang.
- Az-Zuhaili, Wahbah. 2013. *Tafsir Al-WasithI*. Jakarta :GemaInsani.
- Baderos, Ahmad. 2017. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis Dan Identifikasi Menggunakan LC-MS. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Cahyono, B., Muhammad, D.K.H., & Leenawaty, L. (2011). Pengaruh Proses Pengeringan Rimpang Temulawak (*Curcuma Xanthorriza Roxb*) Terhadap Kandungan dan Komposisi Kurkuminoid. *Reaktor*. 3: 165-171.

- Cannell, Richard J.P. 1998. *Natural Products Isolation Methods in Biotechnology* 4. Totowa : Humana Press.
- Carmona, M.A., Jiménez, C., Jiménez-Sanchidrián, C., Peña, F., Ruiz, JR. 2010. Isolation of sterols from sunflower oil deodorizer distillate. *J. Food Eng.* 101 (2) : 210–213.
- Damongilala, L. J., Widjanarko, S. B., Zubaidah, E., & Runtuwene, M. R. J. 2013. Antioxidan Activity Collected From Methanol Extraction of *Eucheuma cottonii* and *E. spinosum* Collected From North Sulawesi Waters, Indonesia. *Food Science and Quality Management*. 17: 7-14
- Day, R.A. A.L. Underwood. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Jakarta :Erlangga
- Depkes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Cetakan Pertama. Jakarta. Direktorat Pengawasan Obat dan Makanan.
- Diaz, B.C., Carretero, A.S., Guierrez, A.F., Vega, B.A., Frenich, A.G., Vidal, J.L.M., & Martos, J.D. (2006). Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food Chemistry*. 102 (2007): 593-598.
- Dinasti, A.R. 2016. Isolasi dengan KLTP dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella Sp.* Skripsi. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Etika, B. S., dan Suryelita. 2014. Isolasi Steroid dari Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) EKSAKTA. Vol 1 Tahun XV.
- Effendy. 2010. *Teori VSPER, Kepolaran dan Gaya antar Molekul Edisi 3*. Malang : Banyu Media Publishing.
- Etika, S.B. dan Suryelita. 2014. Isolasi Steroid dari Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia L.*). *Jurnal Eksakta*, 1: 60-65.
- Farooqi, M. I. H. 2005. *Terapi Herbal Cara Islam; Manfaat Tumbuhan menurut Al-QUR'an dan Sunah Nabi*. Penj. Ahmad Y. Samantho. Jakarta: Penerbit Hikmah (PT Mizan Publika)
- Fattah, A.B.A.B.A. 2010. *Shahih Thibbun Nabawi Panduan dan Metode Pengobatan Nabi SAW. Buku*. Jakarta: Pustaka Imam Ahmad.
- Fayaz, M., Namitha, K.K., Murthy, K.N.C., Swamy, M.M., Sarada, R., Khanam, S., Ravishankar, G.A. 2005. Chemical composition, iron bioavailability, and antioxidant activity of *Kappaphycusalvarezzi* (Doty). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (3): 792-797
- Fernandes, P., Cabral, J.M.S. 2007. Phytosterols: applications and recovery methods, *Bioresour. Technol.* 98 (12) : 2335–2350.
- Fessenden, R, J dan Fessenden J.S. 1999. *Kimia Organik*. Trjemahan oleh A. Hadyana P. Jilid II, Edisi Ketiga. Jakarta: Penerbit Erlangga.

- Fitri, Khumairo Nur. 2017. Variasi Laju Alir pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* Metode Kromatografi Kolom. Skripsi. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Guenther, E. 1987. Minyak Atsiri. Jilid I. terjemahan Ketaren S. Jakarta: Universitas Jakarta.
- Halimah, N. 2010. Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. Skripsi Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hanapi, A. A., Fasya, G., Mardiyah, U., Miftahurrahmah. 2013. Uji Aktivitas Antioksi dan Antibakteri Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheum spinosum* dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *Jurnal Alchemy*. 2 (2): 126 – 137.
- Handoko, D. S. P. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis. *Jurnal*. 9(1).
- Handoko, S. 2016. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter (PE) Mikroalga *Chlorella* sp. Dengan Metode Kromatografi Kolom Pembuatan Fasa Diam Cara Basah dan Kering. Skripsi. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Harborne, J. B. (1987). Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan a.b. Padmawinata, K. dan Soediro, I. ITB Bandung
- Hendayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung: PT Remaja Rosdakarya.
- Hidajat, B. 2005. Penggunaan Antioksidan Pada Anak. *Artikel Kimia*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Hidayah, Wihda Wihdatul, Kusri, D., Fachriyah, Enny. 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
- Ikalinus, R., Widyastuti, S. K., Setiasih, N. L. E. 2015. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor (*Moringa oleifera*). *Jurnal Indonesia Medicus Veterinus*, 4(1): 71-79.
- Indrayani, L., Hartati, S. dan Lydia, S. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Berk Penel Hayati*, 12: 57-61.
- Johnson, P.A dan Oehlschlager, A.C.1989. Analysis of Sterols And Other Biologically Significant Steroids. Academic Press.
- Kandukuri, V., Vina, Y. J. G., Suryam, A., dan Charya, M. A. S. 2009. Phytochemicals Test of Waterhyacinth. *African Journal Microbiology Research*, 3(8): 418-421.

- Kasal, A., Budesinsky, M., Griffiths, W.J. 2010. Spectroscopic Methods of Steroid Analysis. Springer Science and Business Media. DOI 10.1023/b13591\_2.
- Khazanda, K.A., Wazir, S.T.G., Samina, K., Shahzadi, S. 2007. Antifungal Activity, Elemental Analysis and Determination of Total Protein of Seaweed, *Solieria Robusta* (Greville) Kylin From The Coast of Karachi, *J. Bot.*, 39(3): 931-937, 2007. National Center of Excellence for Analytical Chemistry. Pakistan: University of Sindh.
- Khoiriyah, S. Hanapi, A., dan Fasya, A.G. 2014. Uji fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat, Kloroform dan Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga Coklat *Sargassum Vulgare* dari Pantai Kapong Pamekasan Madura. *ALCHEMY*. Vol. 3 No. 2. Hal 133-134.
- Khopkar, S.M. (2008). *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta : UI Press.
- Kristanti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M., Kurniadi, B. 2008 *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: UNAIR Press.
- Kusmiyati, Aznam, N. dan Handayani, S. 2011. Isolasi dan Identifikasi Zat Aktif Ekstrak Metanol Rimpang KunyitPutih (*Curcuma manga Val*) Fraksi Etil Asetat. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian* 1(2):1-10
- Laili, Rumzil. 2016. Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*). *Skripsi*. Malang :Universitas Islam Negeri Maulana Mailik Ibrahim Malang.
- Lee, Jiwoo; Weon, J.B; Yun, B; Eoni, M.R. dan Ma, C.J. 2015. Simultaneous Determination Three Phytosterol Compounds, Campesterol, Stigmasterol and Daucosterol In *Artemisia Apiacea* By High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Ultraviolet / Visible Detector. *Pharmacognosy Magazine* 11(42).
- Lee, Sanghyun; Lee, Yeon S; Jung, S.H; Kang S.S. dan Shin. K.H. 2003. Anti-Oxidant Activities of Fucosterol From The Marine Algae *Pelvetia siliquosa*. *Arch Pharm Res*, 26(9): 719-722.
- Lenny, S. 2006. *Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida dan Alkaloida*. Medan: MIPA Universitas Sumatera Utara.
- Liang, N. dan Kitts, D.D. 2014. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules* 19: 19180-19208
- Liang, Ningjian and Kitts, David D. 2014. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Method that Define Mechanisms of Action. *Molecules*, 19: 19180-19208.
- Lisiyana, N., Hayati, E.K., Dewi, D.C. 2016. Isolasi Senyawa Alkaloid Pada Tanaman Anting-Anting (*Acalypha Indica* L) Dengan Variasi Kecepatan

- Laju Alir Menggunakan Kromatografi Kolom. *Alchemy Journal Of chemistry*. Malang: Universitas Islam Negeri Malang
- Luki, Citra Eri. 2018. Pemisahan Steroid Fraksi Etil Asetat Makroalga *Eucheuma cottonii* Menggunakan Kromatografi Kolom Gradien Eluen Secara Eksperimen dan Studi In Silico Serta Uji Antioksidannya. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Machado, S., Hernandez, Lopez., Losada, Paseiro dan Cervantez, Lopez. 2004. An HPLC Method for the Quantification of Sterol in Edible Seaweeds. *Biomedical Chromatography*. Universidad de Santiago de Compostela. 18(1): 183-190.
- Maesaroh, K., Kurnia, D., dan Anshori, J.A. 2018. Perbandingan Uji Antioksidan DPPH, FRAP dan FIC Terhadap Asam Askorbat, Asam Galat dan Kuersetin. *Jurnal Chimica et Natura Acta*. 6(2): 93-100.
- Maharani, Fevita; Nurjanah; Suwandi, R.; Anwar, E; dan Hidayat, T. 2017. Kandungan senyawa Bioaktif Rumput laut *Padina australis* dan *Eucheuma cottonii* sebagai Bahan Baku Krim Tabir Surya. *JPHPI 2017*, 20(1)
- Manilal. A., Sujith, S., Selvin, J., Kiran, G.S., Shakir, C. 2009. *In vivo* Antiviral Activity of Polysaccharide from the Indian Green Alga, *Acrosiphonia orientalis* (J. Agardh): Potential Implication in Shrimp Disease Management, *Journal of Fish and Marine Sciences*. Department of Microbiology. India: Bharathidasan University. 1 (4): 278-282.
- Mardaneni, Isma. 2017. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid Alga Merah *Eucheuma cottonii* Fraksi Etil Asetat Perairan Wongsorejo Banyuwangi Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan LC-MS. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim
- Mardiyah, U., Fasya, A.G., Fauziyah, B., Amalia, S. 2012. Ekstraksi, Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Michael, V. and Cristhoph Seger. 2008. *A Decade of HPLC-MS in the Routine Clinical Laboratory-Goal for Futher Development*. *Clinical biochemistry*.
- Miftahurrahmah. 2012. Ekstraksi, Uji aktivitas Antibakteri dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Pesisir Laut Banyuwangi. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Molyneux, P., 2004. *The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH), For Estimating Atioxidant Ativity*. *Songklanakarinn.J.Sci.Technol*. 26 (2): 211-219.
- Mulyono. 2006. *Kamus Kimia*. Jakarta : PT Bumi Aksara

- Nagarani, N., & Kumaraguru, A.K. 2013. Evaluation of anti-inflammatory, antidiabetic, cytotoxic activity of *Kappaphycus alvarezii*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 4(1): 921-929
- Nihlati, I., Abdul, R., Triana, H. 2008. Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata (roxb) Schlecth*) dengan Metode Penangkal Radikal Bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrihidrazil). *Skripsi* diterbitkan. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Ningsih, E. M. 2015. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid pada Fraksi heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah *Euclima spinosum*. Skripsi, Malang: Universitas Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Nohong. 2009. Skrining Fitokimia Tumbuhan *Ophiopogon jaburan Lodd* dari Kabupaten Kolaka Provinsi Sulawesi Tenggara. FMIPA, Universitas Haluoleo Kendari. *Jurnal Pembelajaran Sains*, 5 (2) : 172-178.
- Noviyanti, L., 2010. Modifikasi Teknik Kromatografi Kolom Untuk Pemisahan Trigliserida dari Ekstrak Buah Merah (*Pandanus conoideus Lamk*). *Skripsi*. Medan: USU.
- Nurchayanti, O., Julaha, E., dan Mayanti, T. 2015. Senyawa Steroid dari Kulit Batang *Dysoxylum maliceum* 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 *Euclima Alvarezii* terhadap *Artemia Salina* sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker. *Akta Kimindo*. 2(1), 41 - 46.
- Panji, Tri. 2012. *Teknik Spektroskopi untuk Elusidasi Struktur Molekul*. Yogyakarta: Graha Ilmu
- Parenrengi, Andi dan Sulaeman, 2007. Mengenal Rumput Laut, *Kappaphycus alvarezii*. *Media Akuakultur*. 2(1): 142-146.
- Patel Snehal S. dan, Jignasha K. Savjani. 2015. Systematic review of plant steroids as potential anti-inflammatory agents: Current status and future perspectives. *The Journal of Phytopharmacology*. 2015; 4 (2): 121-125.
- Pereira, C. M. P., Nunes, C. F. P., Villeila, L. Z., Streit, N. M., Dias, D., Gomes, C. B., dan Colepicolo, P. 2016. Extractoin of Sterols Brown Macroalga from Antartica and Their Identification by Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry. *Artikel: Journal Applied Phycology*, <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0905-5>.
- Prabakaran, M; Kim, S; Sasireka, A dan Venkatesan, H. 2017.  $\beta$ -Sitosterol Isolated From Rice Hulls As An Efficient Corrosion Inhibitor For Mild Steel In Acidic Environments. *New J. Chem*. DOI:10.1039/ C6NJ03760G.
- Prakash, A. Rieglhof, F., dan Miller E. 2007. *Medallion Laboratories: Analytical Progress*. *Antioxidant Activity*. [www.terranostrachocolate.com/file/Compar](http://www.terranostrachocolate.com/file/Compar)

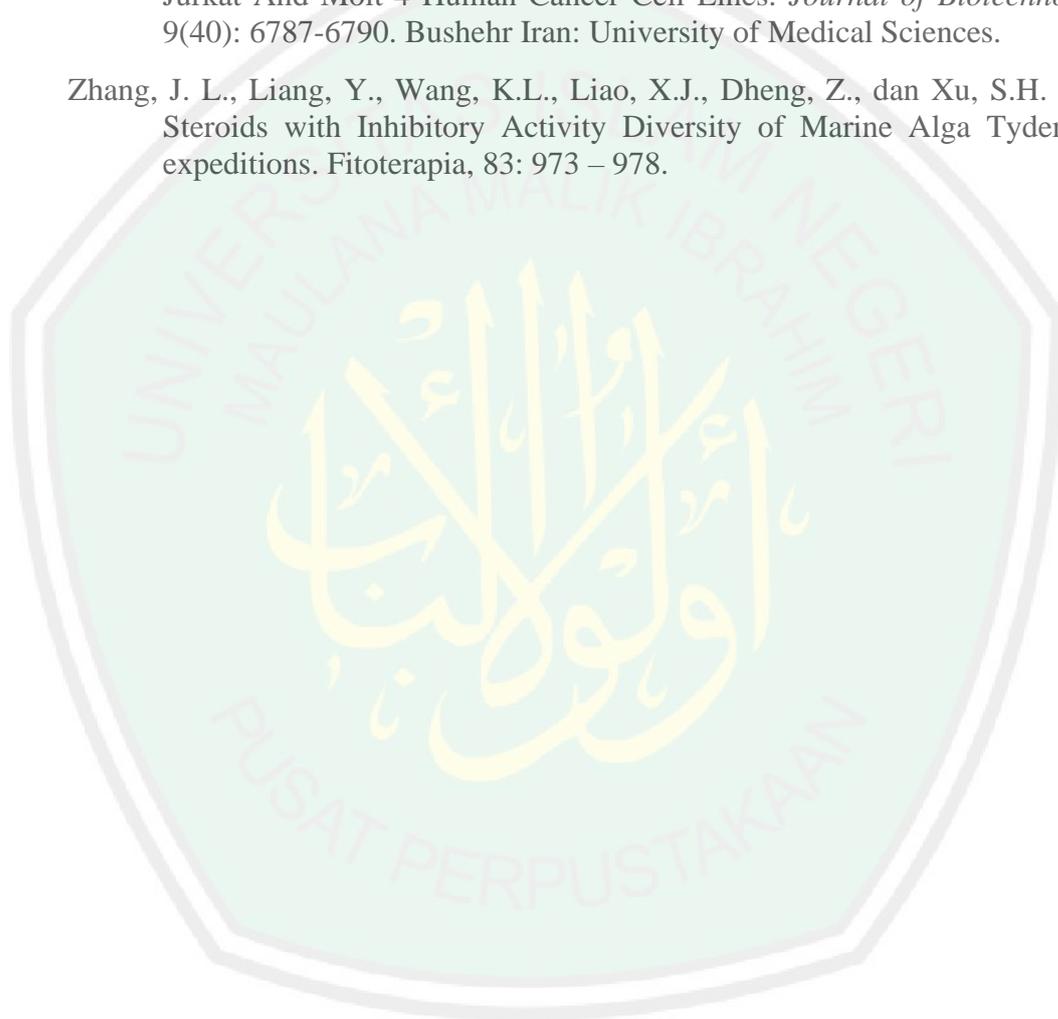
ative\_and\_General\_Antioxidant\_information. Pdf. Diakses pada 29 September 2011.

- Primer, A. 2001. Agilent Technology the HPLC/MSD System has been Design and Manufactured under a quality system that has been registered to ISO 9001. *Hewlett Packard Published*.
- Priyatno Agung 2013. Isolasi Senyawa Aktif Antioksidan Fraksi Etil Asetat tumbuhan paku *Neprolepis falcata* (Cav.) C. Chr. *Skripsi* Diterbitkan. Uin Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Puspita, M.D.A. (2011). Pengoptimum Fase Gerak KLT menggunakan Desain Campuran Untuk Pemisahan Komponen Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri*). *Skripsi*. Bogor. Fakultas MIPA IPB.
- Quthb, Sayyid. 2008. *Tafsir Fi Zhilalil Qur'an*. Jakarta :GemaInsani Press.
- Rahmawati, Dwi Anik. 2017. Variasi Komposisi Eluen pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Makroalga (*Eucheuma cottonii*) dengan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Rahmawati, Yunita D. 2017. Variasi Eluen pada Pemisahan Senyawa Triterpenoid dan Steroid Alga Merah *Eucheuma spinosum* Menggunakan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Mailik Ibrahim Malang.
- Ratnasari, Ira. 2017. Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis dan Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan LC-MS Pada Fraksi n-Butanol Alga Merah *Eucheuma cottonii* Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Rochmat, Agus. 2015. Karakterisasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Sambiloto (*Andrographis paniculata*) Yang Mempunyai Aktivitas Enzim Siklooksigenase-2 Secara In Vitro. *Jurnal Integrasi Proses*. 5(2): 81-87.
- Rohman, A. dan Gandjar, I. G. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: PustakaPelajar.
- Rudiyanto. 2013. Kajian Kapasitas Antioksidan Terhadap DPPH Kandungan Fenolik Total Ekstrak Alga Merah Jenis *Eucheuma cottonii* dari Perairan Sumenep. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim
- Safitri, Dany Aulia. 2016. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chorella sp.* Menggunakan Kromatografi Kolom Cara Basah Dan Kering. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Saifudin, Aziz. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder Teori, Konsep, dan*

- Saleh, C. 2007. Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Steroid dari Akar Tumbuhan Cendana (*Santalum album* Linn). Tesis. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Sastrohamidjojo, H. 2007. Kromatografi. Yogyakarta: UGM Press.
- Sastrohamidjojo. 1985 *Kromatografi*. Edisi ke-1. Yogyakarta: Liberty
- Sayuti, Kesuma dan Rina Yenrina. 2015. *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Padang: Andalas University Press.
- Setiyawan, M. I., Ningsih, R., Syarifah, U., Adi, T. K.. 2015. Isolasi Senyawa Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol dan Identifikasi menggunakan FT-IR. *Skripsi* tidak diterbitkan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Sharo, N. M., Ningsih, R., Nasichudin, A., Hanapi, A. 2013. Uji Toksisitas Dan Identifikasi Senyawa Ekstrak Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, Vol. 2 , 170 – 177
- Sholikah, A.N. L. 2016. Isolasi Senyawa Steroid dari Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma Spinosum*) Menggunakan Metode Kromatografi Kolom. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Siadi, K. 2012. Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) sebagai Biopestisida yang Efektif dengan Penambahan Larutan NaCl. *Jurnal MIPA*. 35(2): 77-83
- Siregar, A. F., Agus, S., Delianis, P. 2012. Potensi Antibakteri Ekstrak Rumput Laut terhadap Bakteri Penyakit Kulit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus Epidermidis*, dan *Micrococcus luteus*. *Jurnal Of Marine Research* Volume 1 Nomor 2 Halaman 152-160
- Socrates, G. 2001. Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts 3rd ed. England: John Wiley & Sons Ltd.
- Sriwahyuni, I. 2010. Uji Fitokimia Ekstrak Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* Linn) dengan Variasi Pelarut dan Uji Toksisitas Menggunakan Brine Shrimp (*Artemia salina* Leach). *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang : Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malng.
- Sriwahyunu, I. 2010. Uji Fitoia Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn) dengan Variasi Pelarut dan Uji Toksisitas Menggunakan Brine Shrimp (*Artemia salina* Leach). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang : Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Stevens, N.P. 2001. Kimia Polimer. Jakarta: PT. Pradnya Paramita.

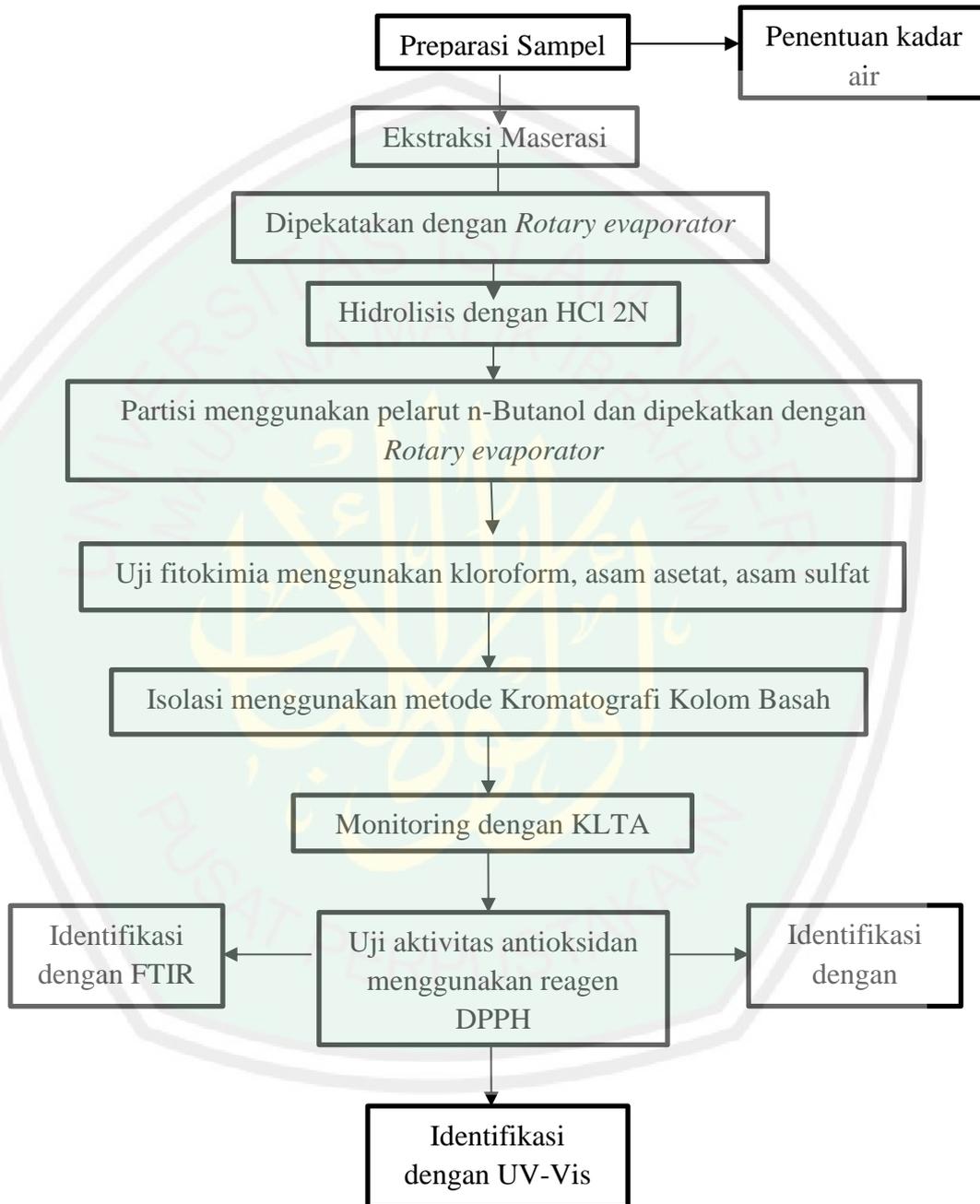
- Sudrmadji, Slamet. 1997. *Prosedur Analisis Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Penerbit Liberty.
- Sukadana, I.M., Santi, S.R., dan Monikayani, N.W. 2018. Aktivitas Antimakan Daun Tenggulum (*Protitium javanicum* Burm. F.) terhadap Ulat Kubis *Plutella xylostella*. *Journal Media Sains*, 2(2): 90-95.
- Sultan, Aeysha dan Abdul Rauf Raza. 2015. Steroids: A Diverse Class Of Secondary Metabotes. *Review Article Medicinal Chemistry* 5(7): 310-317
- Supriadi, H.; Salam, S.; Abdullah, F.F.; Subarnas, A.; Sidik, R.; Supratman, U. dan Shiono, Y. 2019. Steroids From The Super Red Dragon Fruit (*Hylocereus costaricensis*). *Jurnal kimia (journal of chemistry)* 13(12): 229-233.
- Suryanto, Edi dan Momuat, Lidya Irma. 2017. Isolasi dan Aktivitas Antioksi dan Fraksi dari Ekstrak Tongkol Jagung (*Zea mays*). *Agritech*. 37(2) : 139-147
- Swantara, I. M. D dan Parwata I. M. O. A. 2011. Kajian Senyawa Antioksidan pada Rumput Laut dari Pantai Sekitar Bali. *Jurnal Kimia Unud*, 2(1): 89-96.
- Tasic, B.M., Budimir, V.K., Miodrag, L.L., dan Vlada, B.V. 2009. The Acid Hydrolysis of Potato Tuber in Bioethanol Production. *Biochemical Engineering Journal* 43 (209): 208-211.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur G. and Kaur, H., 2011. *Phytochemical screening and Extraction: A Review*. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, vol 1(1):98-106.
- Vembriarto, Jeffry. 2013. *Kimia Steroid*. Malang: Universitas Negeri Malang.
- Voight, R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Formal*. Diterjemahkan oleh Soedani Noerono, Apt. Yogyakarta: UGM
- Wahidah, N., Ratman., dan Ningsih P. 2017. Analisis Senyawa Metabolit Primer Pada Jamur Merang (*Volvariellavolvaceae*) Di Daerah Perkebunan Kelapa Sawit Lalundu. *Jurnal Akademika Kimia*. Vol. 6. No. 1: hal 43-47.
- Wahyudi, J., Wibowo, W. A., Rais , Y. A., Kusumawardani, A.. 2011. Pengaruh Suhu Terhadap Kadar Glukosa Terbentuk dan Konstanta Kecepatan Reaksi pada Hidrolisis Kulit Pisang. *Jurnal Pengembangan Teknologi Kimia Untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia*. ISSN 1693-4393
- Yan, X., Nagata, T., & Xiao, F. 1998. Antioxidative Activities in Some Common Seaweeds. *Journal of Plant Foods for Human Nutrition Institute of Oceanologi*, LII.
- Yoshida, Yasukazu dan Etsuo Niki. 2003. Antioxidant Effects of Phytosterol and Its Components. *Journal Nutrient Science Vitaminol* 49:277-280.
- Yu, Yunie Y.S; Kassim, N.K; Musa, K.H. dan Abdullah, A. 2016. Measurement of Antioxidant Activity and Structural Elucidation of Chemical Constituents from *Aglalia oligophylla* Miq. *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering* 95:1-7.

- Yu, Yunie Y.S; Kassim, N.K; Musa, K.H. dan Abdullah, A. 2016. Measurement of Antioksidant Activity and Structural Elucidation of Chemical Constituent from *Aglalia oligophylla* Miq. *International Proceedings of Chemical Biological and Environmental Engineering*. 95: 1-7.
- Yuhendri, dkk. 2012. Isolasi dan Uji Toksisitas Metabolit Sekunder Ekstrak n-Heksana Kulit Batang Tumbuhan *Polyanthiapulchavar. angustifolia* King. *Jurnal Kimia Kampus Binawidya Pekanbaru*.
- Zandi, K., Saeed, T. iraj, N., Zahra, R., Forough, Y., Samin, S., Kohzad, S. 2010. In Vitro Antitumor Activity og *Gracilaria corticate* (A red Alga) Against Jurkat And Molt-4 Human Cancer Cell Lines. *Journal of Biotechnology*. 9(40): 6787-6790. Bushehr Iran: University of Medical Sciences.
- Zhang, J. L., Liang, Y., Wang, K.L., Liao, X.J., Dheng, Z., dan Xu, S.H. 2012. Steroids with Inhibitory Activity Diversity of Marine Alga *Tydemania* expeditions. *Fitoterapia*, 83: 973 – 978.



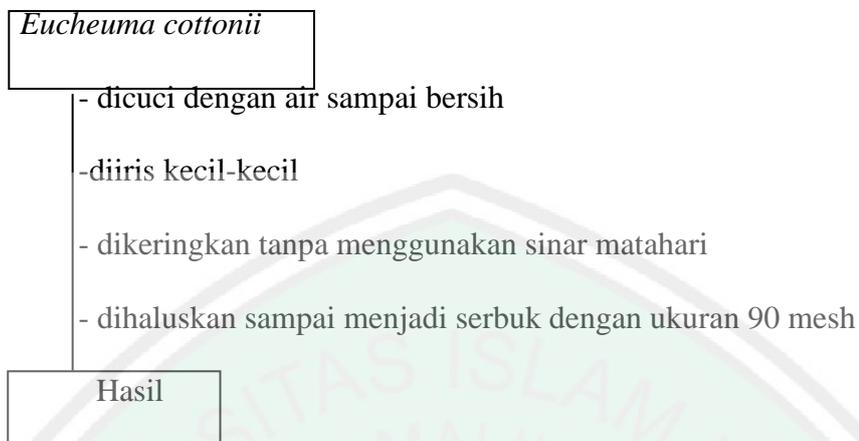
## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Rancangan penelitian

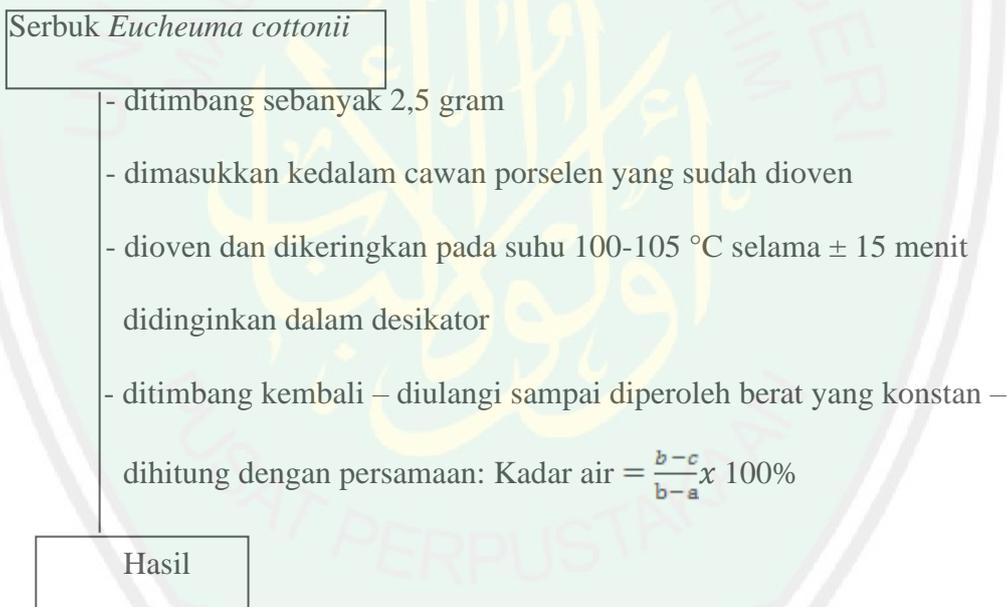


## Lampiran 2. Diagram Alir

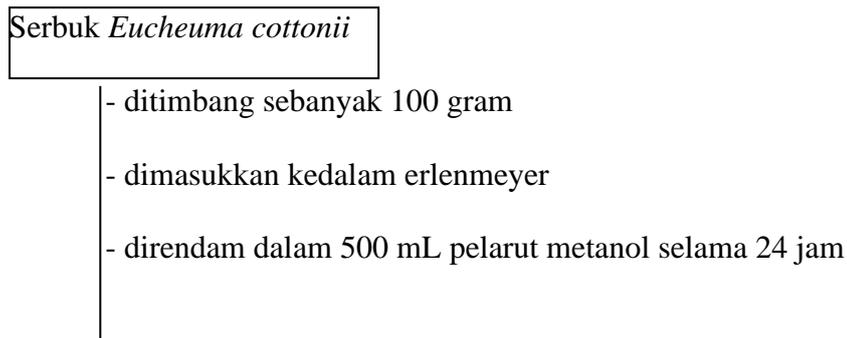
### L2.1. Preparasi *Eucheumacottonii*



### L2.2. Penentuan Kadar Air



### L2.3. Ekstraksi *Eucheuma cottonii*



- dishaker selama 3 jam dengan kecepatan 120 rpm
- disaring menggunakan corong buchner
- diambil filtratnya
- dimaserasi kembali ampas yang diperoleh sampai diperoleh filtrat yang agak bening
- digabung ketiga filtrat

Filtrat seluruhnya

Ampas

- Dipekatkan menggunakan rotary evaporator vacuum

Ekstrak metanol

- ditimbang ekstrak pekat
- dihitung rendemen ekstrak

Hasil

#### L2.4. Hidrolisis dan partisi

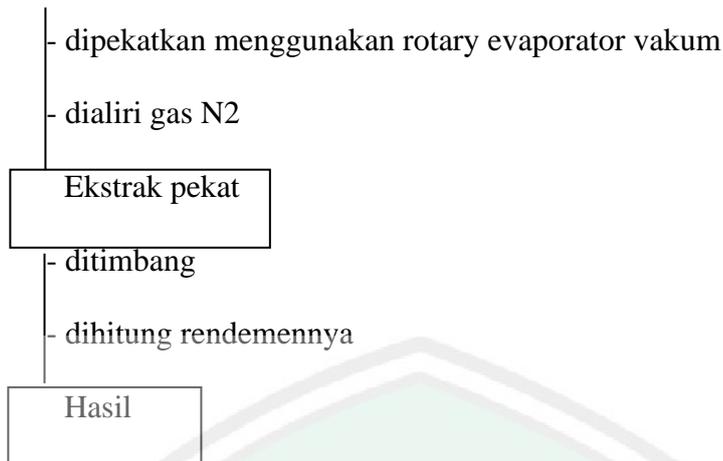
Ekstrak pekat metanol

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

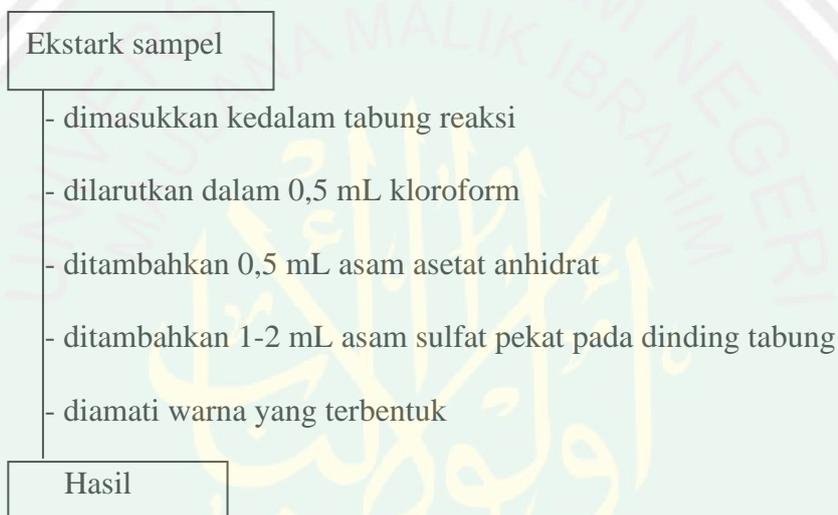
Hidrolisat

- ditambahkan natrium bikarbonat sampai pHnya netral
- dipartisi menggunakan 25 mL n-heksana dengan dua kali pengulangan

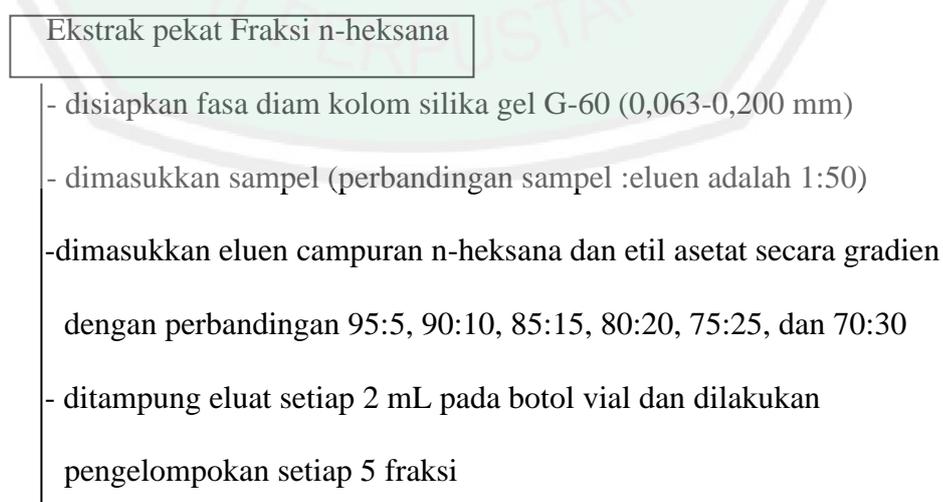
Ekstrak



### L2.5. Uji Fitokimia Senyawa Steroid



### L2.6. Pemisahan dengan metode Kromatografi Kolom



- dihentikan proses elusi setelah semua senyawa steroid diperkirakan telah keluar dari kolom

Hasil

### L2.7. Monitoring dengan KLTA

Fraksi hasil isolasi

- disiapkan eluen campuran n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 17:3 dalam bejana pengembang
- dijenuhkan selama 1 jam
- dioven plat KLT pada suhu 100°C selama 30 menit
- ditotolkan masing-masing kelompok fraksi sebanyak 5 kali totalan
- dimasukkan dalam bejana pengembang berisi eluen yang telah dijenuhkan
- diamati nodula yang terbentuk

Hasil

### L2.8. Penggabungan vial dan pemekatan

Spot hasil monitoring

- digunting spot dengan Rf yang sama
- disemprotkan pereaksi Liberman-Burchard
- ditandai fraksi yang mempunyai warna hijau
- digabungkan fraksi dan dipekatkan dengan rotary evaporator - dialiri gas

N<sub>2</sub>

Hasil

## L2.9. Uji aktivitas antioksidan terhadap DPPH

### L2.9.1 Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Larutan DPPH 0,2 mM

- dipipet sebanyak 1 mL
- ditambah etanol *p.a* sebanyak 3 mL
- didiamkan selama kurang lebih 10 menit
- dimasukkan kedalam kuvet
- dicari Panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{\max}$ )
- dicatat untuk digunakan pada tahap selanjutnya

Hasil

### L2.9.2 Pengukuran Potensi Antioksidan Sampel

Isolat steroid

- dilarutkan kedalam etanol *p.a* dengan konsentrasi berturut-turut 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm
- dipipet masing-masing ekstrak sebanyak 3 mL
- ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,2 mM
- diinkubasi suhu 37°C selama 30 menit
- diukur absorbansi yang menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda_{\max}$
- dihitung data absorbansi yang didapat tiap konsentrasi ekstrak nilai (%) aktivitas antioksidannya :

$$\text{Aktivitas antioksidan} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

- dihitung nilai EC<sub>50</sub> menggunakan program “*GraphPad prism7 software, Regression for analyzing dose response data*”

Hasil

### L2.10. Identifikasi Golongan Senyawa Steroid dengan UV-Vis

Isolat Steroid

- diambil sebanyak 2 mL
- dimasukkan kedalam kuvet hingga sepertiganya
- dianalisis pada Panjang gelombang 200-800 nm

Hasil

### L2.11. Identifikasi Golongan Senyawa Steroid dengan FTIR

Isolat steroid

- dimasukkan 0,2 gram pellet KBr kedalam vial yang berisi isolate
- dibuat pellet
- diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR

Hasil

### Lampiran 3. Pembuatan Reagen dan Larutan

#### L3.1. Pembuatan larutan HCl 2 N

BJ HCl pekat = 1,267 g/mL

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

BM HCl = 36,5 g/mol

n = 1 (jumlah mol ion H<sup>+</sup>)

$$\text{mol} = \frac{g \text{ HCl}}{Mr \text{ HCl}} = \frac{100 \text{ g}}{36,5 \text{ HCl}} = 1,014 \text{ mol}$$

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

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

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

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

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

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

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

#### L3.2. Pembuatan reagen Liberman-Burchard

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

Dimasukkan ekstrak sampel kedalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform lalu ditambahkan dengan 0,5 mL anhidrida asetat. Campuran ini selajutnya ditambah dengan 1-2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung reaksi. Cincin kecolkatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan keberhasilan terbentuknya reagen Liberman-Burchard.

### L3.3. Pembuatan eluen n-heksana :etilasetat

Dibuat eluen untuk elusi pada pemisahan dengan kromatogra fokolom dan untuk monitoring KLTA dengan perbandingan n-heksana :etilasetat (4:1) dengan volume total 100 mL.

#### L.3.3.1 Eluen Kromatografi kolom

➤ 95:5

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

$$\text{etilasetat} = \frac{5}{100} \times 100 = 5 \text{ mL}$$

➤ 90:10

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

$$\text{etilasetat} = \frac{10}{100} \times 100 = 10 \text{ mL}$$

➤ 85:15

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

$$\text{etilasetat} = \frac{15}{100} \times 100 = 15 \text{ mL}$$

➤ 80:10

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

$$\text{etilasetat} = \frac{10}{100} \times 100 = 10 \text{ mL}$$

➤ 75:25

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

$$\text{etilasetat} = \frac{25}{100} \times 100 = 25 \text{ mL}$$

➤ 70:30

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

$$\text{etilasetat} = \frac{30}{100} \times 100 = 30 \text{ mL}$$

### L3.3.2 Eluen monitoring KLTA

➤ Volume n-heksana (18 dalam 20 mL)

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

➤ Volume etilasetat (3 dalam 20 mL)

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

### L3.4. Pembuatan larutan DPPH 0,2 mM 20 mL

➤ DPPH 0,2 mM dalam 10 mL etanol

➤ Mr DPPH = 394,33 g/mol

➤ mmol DPPH = Volume DPPH x Mol DPPH

$$= 10 \text{ mL} \times \frac{0,2 \text{ M}}{1000} \text{ mol/L}$$

$$= 0,002 \text{ mmol}$$

➤ Berat DPPH = mmol x Mr DPPH

$$= 0,002 \text{ mmol} \times 394,32 \text{ g/mol}$$

$$= 0,78864 \text{ mg}$$

$$= 0,0007864 \text{ g}$$

Cara pembuatannya adalah ditimbang serbuk DPPH 0,78864 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol 10 mL dan dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL. Selanjutnya ditambahkan etanol sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

### L.3.5 Pembuatan larutan Stok untuk Vitamin C

#### Pembuatan larutan stok 100 ppm untuk Vitamin C

$$\begin{aligned} \text{ppm} &= \text{mg/L} \\ \text{mg} &= \text{ppm} \times \text{L} \\ &= 100 \text{ ppm} \times 0,01 \text{ L} \\ &= 1 \text{ mg} \end{aligned}$$

Jadi cara pembuatannya ditimbang serbuk vitamin c 1 mg lalu dilarutkan dengan etanol dan dimasukkan kedalam labu takar 10 mL, kemudian ditandabatkan dan divortex.

#### Pembuatan larutan vitamin C aktivitas antioksidan 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm

a. 5 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm}_1 \times V_1 &= \text{ppm}_2 \times V_2 \\ 100 \text{ ppm} \times V_1 &= 5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,25 \text{ mL} = 250 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Maka cara pembuatan larutan vitamin C 5 ppm yaitu diambil 250  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

b. 10 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm}_1 \times V_1 &= \text{ppm}_2 \times V_2 \\ 100 \text{ ppm} \times V_1 &= 10 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL} = 500 \mu\text{L}$$

Maka cara pembuatan larutan vitamin C 10 ppm yaitu diambil 500  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

c. 15 ppm

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

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 15 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,75 \text{ mL} = 750 \mu\text{L}$$

Maka cara pembuatan larutan vitamin C 15 ppm yaitu diambil 750  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

d. 20 ppm

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

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 20 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1 \text{ mL} = 1000 \mu\text{L}$$

Maka cara pembuatan larutan vitamin C 20 ppm yaitu diambil 1000  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

e. 25 ppm

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

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 25 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1,25 \text{ mL} = 1.250 \mu\text{L}$$

Maka cara pembuatan larutan vitamin C 25 ppm yaitu diambil 1.250  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

### L.3.6 Pembuatan larutan Stok untuk BHT

#### Pembuatan larutan stok 100 ppm untuk BHT

$$\begin{aligned} \text{ppm} &= \text{mg/L} \\ \text{mg} &= \text{ppm} \times \text{L} \\ &= 100 \text{ ppm} \times 0,01 \text{ L} \\ &= 1 \text{ mg} \end{aligned}$$

Jadi cara pembuatannya ditimbang serbuk BHT 1 mg lalu dilarutkan dengan etanol dan dimasukkan kedalam labu takar 10 mL, kemudian ditandabatkan dan divortex.

#### Pembuatan larutan BHT aktivitas antioksidan 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm

a. 5 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm}_1 \times V_1 &= \text{ppm}_2 \times V_2 \\ 100 \text{ ppm} \times V_1 &= 5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,25 \text{ mL} = 250 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Maka cara pembuatan larutan BHT 5 ppm yaitu diambil 250  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

b. 10 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm}_1 \times V_1 &= \text{ppm}_2 \times V_2 \\ 100 \text{ ppm} \times V_1 &= 10 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,5 \text{ mL} = 500 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Maka cara pembuatan larutan BHT 10 ppm yaitu diambil 500  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

c. 15 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm}_1 \times V_1 &= \text{ppm}_2 \times V_2 \\ 100 \text{ ppm} \times V_1 &= 15 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,75 \text{ mL} = 750 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Maka cara pembuatan larutan BHT 15 ppm yaitu diambil 750  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

d. 20 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm}_1 \times V_1 &= \text{ppm}_2 \times V_2 \\ 100 \text{ ppm} \times V_1 &= 20 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 1 \text{ mL} = 1000 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Maka cara pembuatan larutan BHT 20 ppm yaitu diambil 1000  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

e. 25 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm}_1 \times V_1 &= \text{ppm}_2 \times V_2 \\ 100 \text{ ppm} \times V_1 &= 25 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 1,25 \text{ mL} = 1.250 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Maka cara pembuatan larutan BHT 25 ppm yaitu diambil 1.250  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

### L.3.7 Pembuatan Larutan Stok Sampel untu A2

$$\text{Konsentrasi} = \frac{\text{berat (mg)}}{\text{volume (L)}}$$

Semisal larutan stok dibuat sebesar 10 mL.

$$X \text{ ppm} = \frac{5,9 \text{ mg}}{0,01 \text{ L}} = 590 \text{ ppm}$$

Jadi cara pembuatannya isolate steroid sebanyak 5,9 mg dilarutkan dengan etanol sedikit demi sedikit ke dalam labu takar 10 mL, kemudian ditandabatkan dan divortex.

#### Pembuatan larutan stok 100 ppm untuk A2,

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

$$590 \text{ ppm} \times V_1 = 100 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{1000 \text{ ppm.mL}}{590} = 1,69 \text{ mL}$$

Jadi cara pembuatan stok 100 ppm yaitu diambil 1,69 mL dari larutan 590 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL dan ditandabatkan dengan n-heksana.

#### Pembuatan larutan sampel uji aktivitas antioksidan 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm

f. 5 ppm

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

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,25 \text{ mL} = 250 \mu\text{L}$$

Maka cara pembuatan larutan sampel isolate 5 ppm yaitu diambil 250  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

g. 10 ppm

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

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 10 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL} = 500 \mu\text{L}$$

Maka cara pembuatan larutan sampel isolate 10 ppm yaitu diambil 500  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

h. 15 ppm

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

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 15 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,75 \text{ mL} = 750 \mu\text{L}$$

Maka cara pembuatan larutan sampel isolate 15 ppm yaitu diambil 750  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

i. 20 ppm

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

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 20 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1 \text{ mL} = 1000 \mu\text{L}$$

Maka cara pembuatan larutan sampel isolate 20 ppm yaitu diambil 1000  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

j. 25 ppm

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

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 25 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1,25 \text{ mL} = 1.250 \mu\text{L}$$

Maka cara pembuatan larutan sampel isolate 25 ppm yaitu diambil 1.250  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

### L.3.7 Pembuatan Larutan Stok Sampel untu A4

$$\text{Konsentrasi} = \frac{\text{berat (mg)}}{\text{volum e (L)}}$$

Semisal larutan stok dibuat sebesar 10 mL.

$$X \text{ ppm} = \frac{6,6 \text{ mg}}{0,01 \text{ L}} = 660 \text{ ppm}$$

Jadi cara pembuatannya isolate steroid sebanyak 6,6 mg dilarutkan dengan etanol sedikit demi sedikit ke dalam labu takar 10 mL, kemudian ditandabatkan dan divortex.

#### Pembuatan larutan stok 100 ppm untuk A2,

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

$$660 \text{ ppm} \times V_1 = 100 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{1000 \text{ ppm.mL}}{660} = 1,51 \text{ mL}$$

Jadi cara pembuatan stok 100 ppm yaitu diambil 1,51 mL dari larutan 660 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL dan ditandabatkan dengan n-heksana.

#### Pembuatan larutan sampel uji aktivitas antioksidan 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm

a. 5 ppm

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

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,25 \text{ mL} = 250 \mu\text{L}$$

Maka cara pembuatan larutan sampel isolate 5 ppm yaitu diambil 250  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

b. 10 ppm

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

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 10 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL} = 500 \mu\text{L}$$

Maka cara pembuatan larutan sampel isolate 10 ppm yaitu diambil 500  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

c. 15 ppm

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

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 15 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,75 \text{ mL} = 750 \mu\text{L}$$

Maka cara pembuatan larutan sampel isolate 15 ppm yaitu diambil 750  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

d. 20 ppm

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

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 20 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1 \text{ mL} = 1000 \mu\text{L}$$

Maka cara pembuatan larutan sampel isolate 20 ppm yaitu diambil 1000  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

e. 25 ppm

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

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 25 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1,25 \text{ mL} = 1.250 \mu\text{L}$$

Maka cara pembuatan larutan sampel isolate 25 ppm yaitu diambil 1.250  $\mu\text{L}$  dari larutan stok 100 ppm kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml dan ditandabatkan dengan etanol.

#### Lampiran 4. Data Pengamatan dan Perhitungan

##### L.4.1 Data Pengukuran Kadar Air

Ulangan Cawan	Ulangan Cawan			Berat Konstan (g)
	Sebelum Dioven	U1	U2	
C1	55,8077	55,8046	55,8045	55,8046
C2	55,3549	55,2986	55,2988	55,2989
C3	54,2349	54,2222	54,2220	54,2221

Keterangan: C=Cawan, U=Ulangan

Berat cawan kosong yang telah konstan kemudian ditambah 1 gram serbuk *Eucheuma cottonii* dan ditimbang Kembali sampai berat konstan pada data cawan+sampel.

Ulangan Cawan	Ulangan Cawan			Berat Konstan (g)
	Sebelum Dioven	U1	U2	
C1	56,8046	56,7479	56,7482	56,7480
C2	56,2988	56,2434	56,2436	56,2434
C3	55,2221	55,1656	55,1659	55,1657

Keterangan: C=Cawan, U=Ulangan

Data berat konstan yang didapatkan adalah data berat cawan+sampel konstan yang akan dihitung nilai kadar airnya.

### 1. Kadar air cawan ke-1

$$\begin{aligned}\text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\ &= \frac{(56,8046-56,7480)g}{(56,8046-55,8046)g} \times 100\% \\ &= 5,66\%\end{aligned}$$

### 2. Kadar air cawan ke-2

$$\begin{aligned}\text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\ &= \frac{(56,2988-56,2435)}{(56,2988-55,2988)} \times 100\% \\ &= 5,53\%\end{aligned}$$

### 3. Kadar air cawan ke-3

$$\begin{aligned}\text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\ &= \frac{(55,2221-55,1657)}{(55,2221-54,2221)} \times 100\% \\ &= 5,64\%\end{aligned}$$

Kadar air kering rata-rata pada sampel *Eucheuma cottonii* adalah 5,61%

## L.4.2 Perhitungan Rendemen dan Data

### L.4.2.1 Ekstrak Metanol

Berat sampel (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + ekstrak pekat (g)	Berat ekstrak pekat (g)	Rendemen (%)
100	125,6213	136,2414	10,6201	10,6201

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

$$= 10,6201 \%$$

#### L.4.2.2 Hasil Partisi

Berat sampel (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + ekstrak pekat (g)	Berat ekstrak pekat (g)	Rendemen (%)
5	126,2044	143,5604	1,3529	27,058

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{1,3529}{5} \times 100\% \\ &= 27,058 \% \end{aligned}$$



### Lampiran 5 Hasil Monitoring KLTA

No	Vial	Warna UV <sub>254nm</sub> / UV <sub>366nm</sub>	Dugaan Senyawa	Jarak Senyawa (cm)	Jarak elusi (cm)	R <sub>f</sub>	Berat (mg)	Rendemen (%)
1.	1-61	-	-	A1	1-61	-	-	-
2.	62-72	Hijau	Steroid	3,6	8	0,45	5,9	8,8060
3.	73-79	Hijau, Biru	Steroid	3,6 2,9	8 8	0,45 0,3625	2,7	4,0298
4.	80-91	Biru	Steroid	2,9	8	0,3625	6,6	9,8507
5.	92-98	Merah	Triterpenoid	2,5	8	0,3125	4,3	6,4179
6.	99-108	Merah	Triterpenoid	2,5 1,8	8 8	0,3125 0,225	2,6	3,8806
7.	109-124	Merah	Triterpenoid	2,5 1,8 1,4	8 8 8	0,3125 0,225 0,175	5,6	8,3582
8.	125-156	Merah	Triterpenoid	1,8 1,4	8 8	0,225 0,175	7,1	10,5970
9.	157-189	Merah	Triterpenoid	1,4 1,0	8 8	0,175 0,125	6,6	9,8507
10	190-234	Merah	Triterpenoid	0,4	8	0,05	4,9	7,3134

#### L.5.1 Perhitungan Nilai R<sub>f</sub> Hasil Monitoring dan Randemen Isolat tunggal dan Campuran

##### L.5.1.1 Perhitungan Nilai R<sub>f</sub> Hasil Monitoring

Nilai R<sub>f</sub> isolate steroid dapat dihitung menggunakan rumus dibawah ini :

$$R_f = \frac{\text{jarak senyawa yang terelusi}}{\text{jarak pelarut yang mengelusi}}$$

$$R_f = \frac{3,6}{8} = 5,9$$

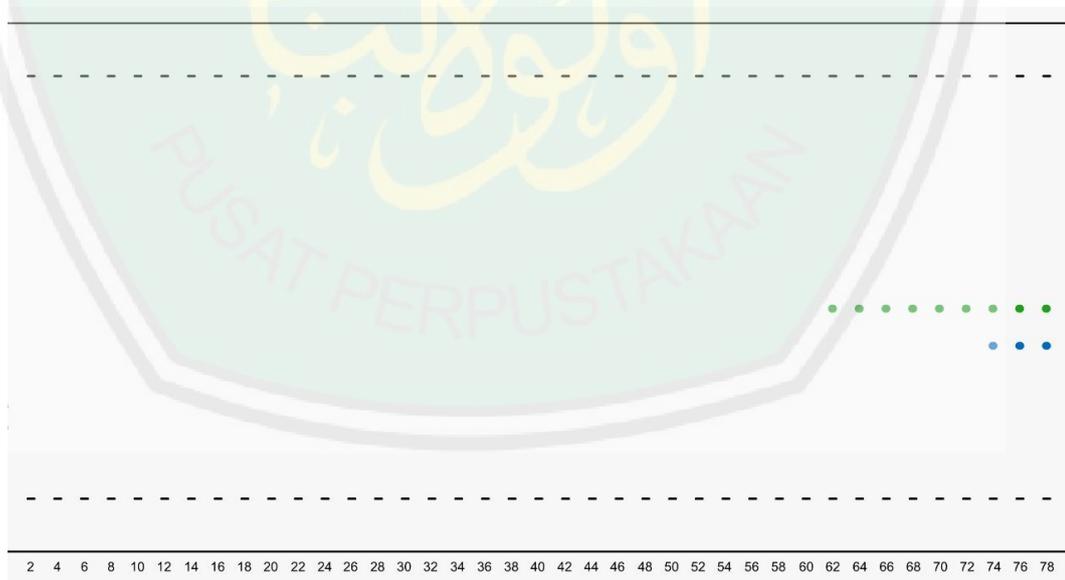
### L.5.2 Perhitungan Randemen Isolat Tunggal dan Campura

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

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



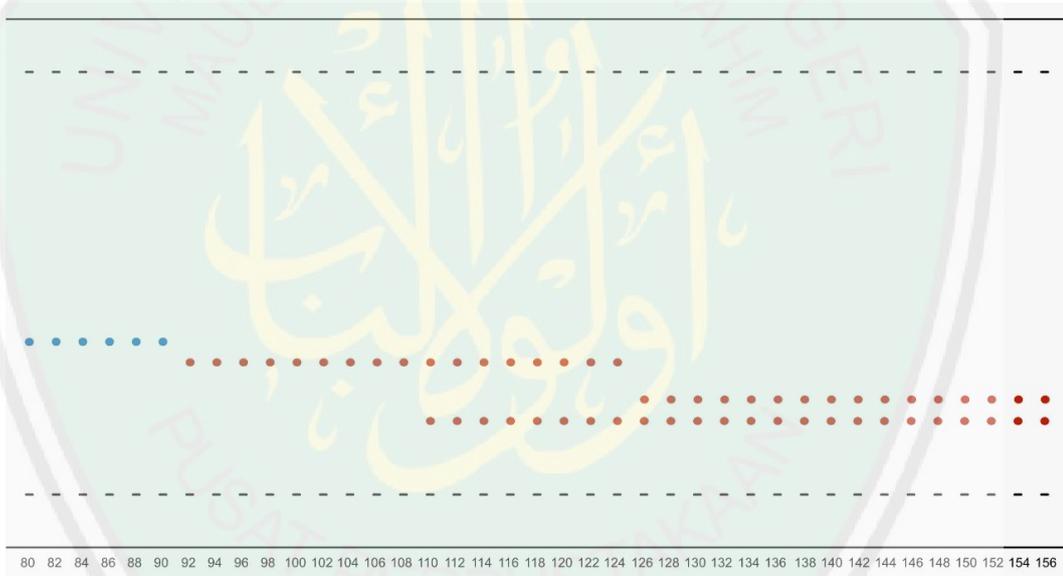
Gambar Plat KLT Vial vial 1-78 panjang gelombang 366 nm



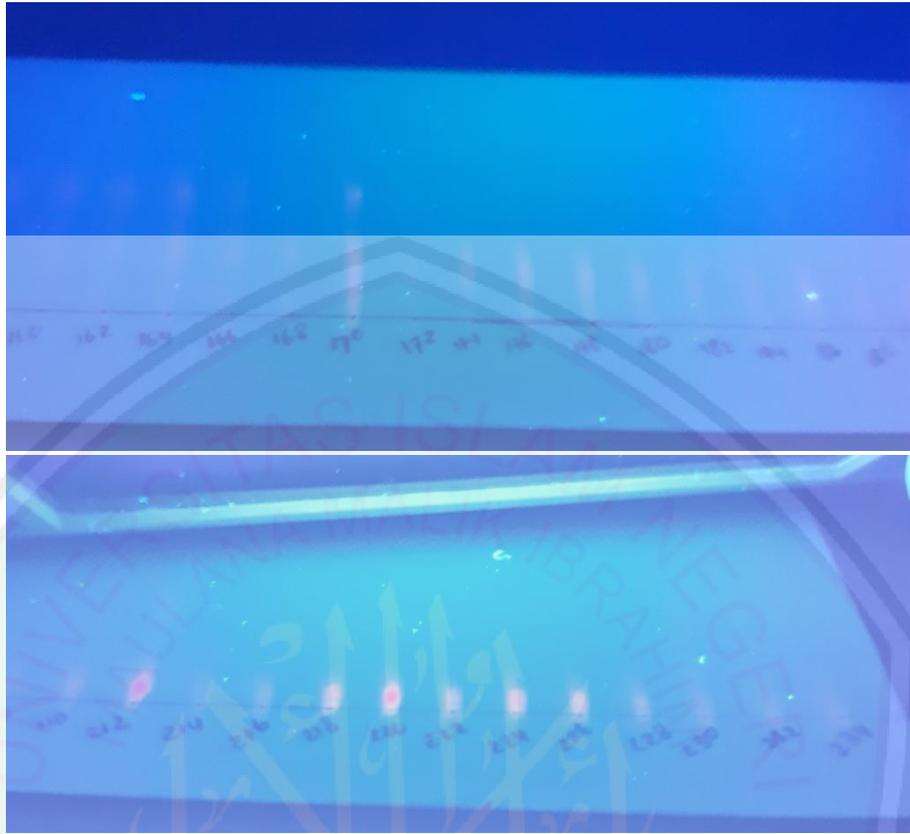
Gambar ilustrasi plat KLT vial 1- 78 panjang gelombang 366 nm



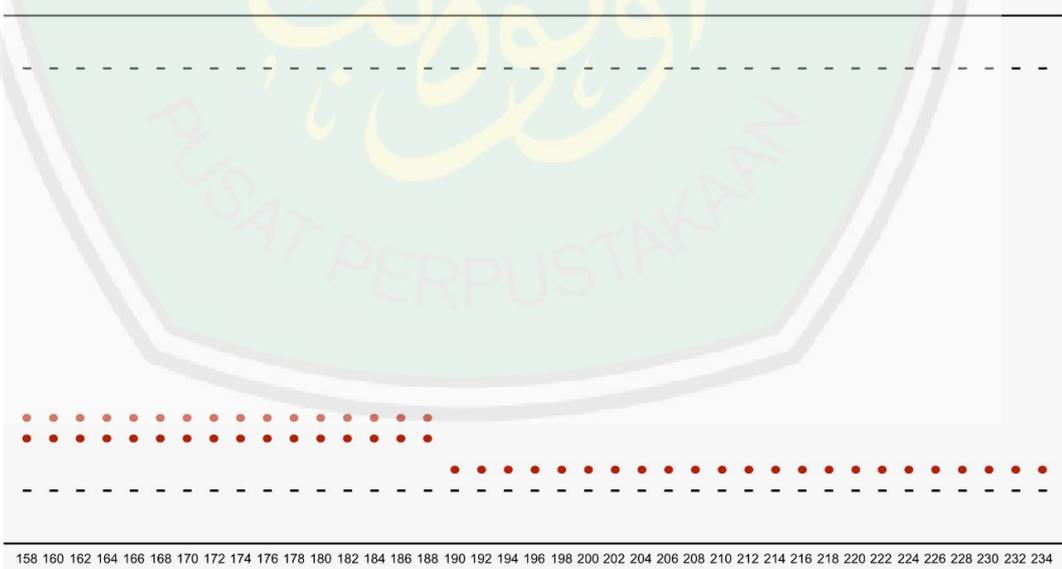
Gambar Plat KLT vial 80-156 panjang gelombang 366 nm



Gambar ilustrasi plat KLT vial 80-156 panjang gelombang 366 nm



Gambar plat KLT vial 158-234 panjang gelombang 366 nm



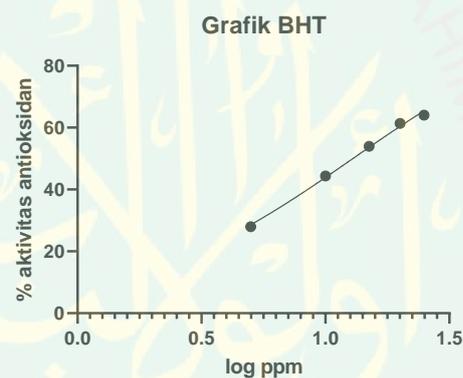
Gambar ilustrasi plat KLT vial 158-234 panjang gelombang 366 nm

## Lampiran 6 Pengujian Aktivitas Antioksidan

### L.6.1 Pengujian Antioksidan BHT

Konsentrasi Isolat	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	%Aktivitas Antioksidan
5 ppm	0,4305	0,3101	27,97 %
10 ppm	0,4314	0,2400	44,37 %
15 ppm	0,4330	0,1993	53,97 %
20 ppm	0,4301	0,1661	61,38 %
25 ppm	0,4275	0,1538	64,02 %

Hasil perhitungan  $EC_{50}$  berdasarkan GraphPad Prism 7



Global (shared)

Comparison of Fits

Null hypothesis

Alternative hypothesis

P value

Conclusion (alpha = 0.05)

Preferred model

F (DFn, DFd)

Different curve for each data set

Best-fit values

Bottom = 0,000

Top = 100,0

LogEC50 = 1,111

HillSlope = 0,9642

EC50 = 12,91

Span = 100,0

95% CI (profile likelihood)

LogEC50 = 1,080 to 1,141

HillSlope = 0,8384 to 1,095

Can't calculate  
Different curve for each data set  
One curve for all data sets

Models have the same DF  
Different curve for each data set

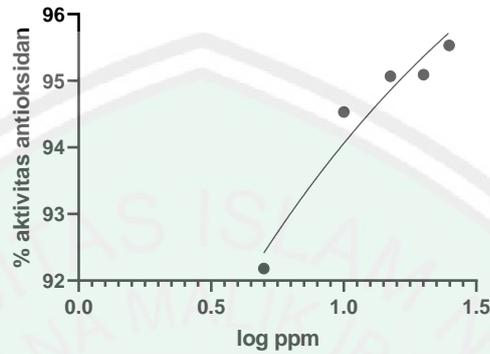
EC50	12,02 to 13,85	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	
R squared	0,9957	
Sum of Squares	3,683	
Sy.x	1,108	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
One curve for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0,000	
Top	= 100,0	
LogEC50	1,111	1,111
HillSlope	0,9642	0,9642
EC50	12,91	12,91
Span	= 100,0	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	1,080 to 1,141	1,080 to 1,141
HillSlope	0,8384 to 1,095	0,8384 to 1,095
EC50	12,02 to 13,85	12,02 to 13,85
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R squared	0,9957	0,9957
Sum of Squares	3,683	3,683
Sy.x		1,108
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
# of X values	5	
# Y values analyzed	5	

### L.6.2 Pengujian Antioksidan Vitamin C

Konsentrasi Isolat	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	%Aktivitas Antioksidan
5 ppm	0,5181	0,0425	92,18 %
10 ppm	0,5158	0,0282	94,53 %
15 ppm	0,5134	0,0253	95,07 %
20 ppm	0,5138	0,0252	95,09 %
25 ppm	0,5120	0,0229	95,53 %

Hasil perhitungan EC<sub>50</sub> berdasarkan GraphPad Prism 7

Grafik Vitamin C



Comparison of Fits  
 Null hypothesis  
 Alternative hypothesis  
 P value  
 Conclusion (alpha = 0.05)  
 Preferred model  
 F (DFn, DFd)

Global (shared)

Can't calculate  
 Different curve for each data set  
 One curve for all data sets

Models have the same DF  
 Different curve for each data set

Different curve for each data set

Best-fit values  
 Bottom = 0,000  
 Top = 100,0  
 LogEC50 = -2,176  
 HillSlope = 0,3777  
 EC50 = 0,006669  
 Span = 100,0  
 95% CI (profile likelihood)  
 LogEC50 ??? to -1,177  
 HillSlope 0,2043 to 0,5517  
 EC50 ??? to 0,06660

Goodness of Fit  
 Degrees of Freedom = 3  
 R squared = 0,9390  
 Sum of Squares = 0,4341  
 Sy.x = 0,3804  
 Constraints  
 Bottom = Bottom = 0  
 Top = Top = 100

One curve for all data sets

Best-fit values  
 Bottom = 0,000  
 Top = 100,0

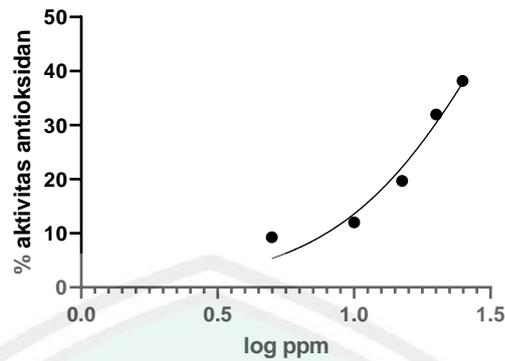
LogEC50	-2,176	-2,176
HillSlope	0,3777	0,3777
EC50	0,006669	0,006669
Span	= 100,0	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	??? to -1,177	??? to -1,177
HillSlope	0,2043 to 0,5517	0,2043 to 0,5517
EC50	??? to 0,06660	??? to 0,06660
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R squared	0,9390	0,9390
Sum of Squares	0,4341	0,4341
Sy.x		0,3804
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
# of X values	5	
# Y values analyzed	5	

### L.6.3 Pengujian Antioksidan Sampel A2

Konsentrasi Isolat	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	%Aktivitas Antioksidan
5 ppm	0,6049	0,5489	9,25 %
10 ppm	0,6050	0,5323	12,01 %
15 ppm	0,6055	0,4862	19,70 %
20 ppm	0,6060	0,4123	31,96 %
25 ppm	0,6057	0,3743	38,20 %

Hasil perhitungan EC<sub>50</sub> berdasarkan GraphPad Prism 7

Grafik isolat A2



Global (shared)

Can't calculate

Different curve for each data set  
One curve for all data sets

Models have the same DF  
Different curve for each data set

Comparison of Fits

Null hypothesis

Alternative hypothesis

P value

Conclusion (alpha = 0.05)

Preferred model

F (DFn, DFd)

Different curve for each data set

Best-fit values

Bottom = 0,000

Top = 100,0

LogEC50 1,544

HillSlope 1,477

EC50 35,03

Span = 100,0

95% CI (profile likelihood)

LogEC50 1,431 to 1,823

HillSlope 0,7961 to 2,487

EC50 26,98 to 66,56

Goodness of Fit

Degrees of Freedom 3

R squared 0,9576

Sum of Squares 26,66

Sy.x 2,981

Constraints

Bottom Bottom = 0

Top Top = 100

One curve for all data sets

Best-fit values

Bottom = 0,000

Top = 100,0

LogEC50 1,544 1,544

HillSlope 1,477 1,477

EC50 35,03 35,03

Span = 100,0

95% CI (profile likelihood)

LogEC50 1,431 to 1,823 1,431 to 1,823

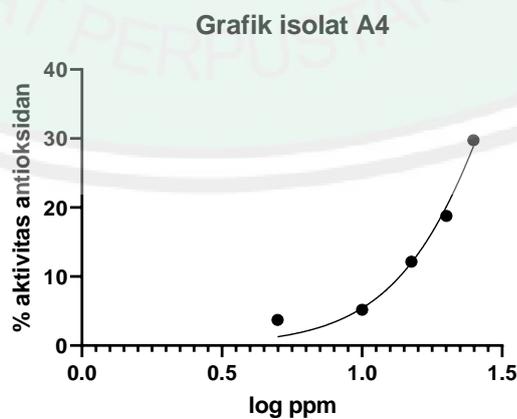
HillSlope 0,7961 to 2,487 0,7961 to 2,487

EC50	26,98 to 66,56	26,98 to 66,56
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R squared	0,9576	0,9576
Sum of Squares	26,66	26,66
Sy.x		2,981
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
# of X values	5	
# Y values analyzed	5	

#### L.6.4 Pengujian Antioksidan Sampel A4

Konsentrasi Isolat	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	%Aktivitas Antioksidan
5 ppm	0,4047	0,3896	3,73 %
10 ppm	0,4048	0,3838	5,19 %
15 ppm	0,3752	0,3295	12,14 %
20 ppm	0,3740	0,3037	18,79 %
25 ppm	0,3736	0,2625	29,74 %

Hasil perhitungan EC<sub>50</sub> berdasarkan GraphPad Prism 7



Comparison of Fits  
Null hypothesis

Global (shared)  
Can't calculate  
Different curve for each data set

Alternative hypothesis  
 P value  
 Conclusion (alpha = 0.05)  
 Preferred model  
 F (DFn, DFd)  
 Different curve for each data set

One curve for all data sets  
 Models have the same DF  
 Different curve for each data set

**Best-fit values**

Bottom = 0,000  
 Top = 100,0  
 LogEC50 1,581  
 HillSlope 2,139  
 EC50 38,10  
 Span = 100,0

**95% CI (profile likelihood)**

LogEC50 1,497 to 1,740  
 HillSlope 1,388 to 3,186  
 EC50 31,40 to 54,91

**Goodness of Fit**

Degrees of Freedom 3  
 R squared 0,9812  
 Sum of Squares 8,603  
 Sy.x 1,693

**Constraints**

Bottom Bottom = 0  
 Top Top = 100

**One curve for all data sets**

**Best-fit values**

Bottom = 0,000  
 Top = 100,0  
 LogEC50 1,581  
 HillSlope 2,139  
 EC50 38,10  
 Span = 100,0

**95% CI (profile likelihood)**

LogEC50	1,497 to 1,740	1,581
HillSlope	1,388 to 3,186	2,139
EC50	31,40 to 54,91	38,10

**Goodness of Fit**

Degrees of Freedom		3
R squared	0,9812	0,9812
Sum of Squares	8,603	8,603
Sy.x		1,693

**Constraints**

Bottom Bottom = 0  
 Top Top = 100

LogEC50 is shared

HillSlope HillSlope is shared

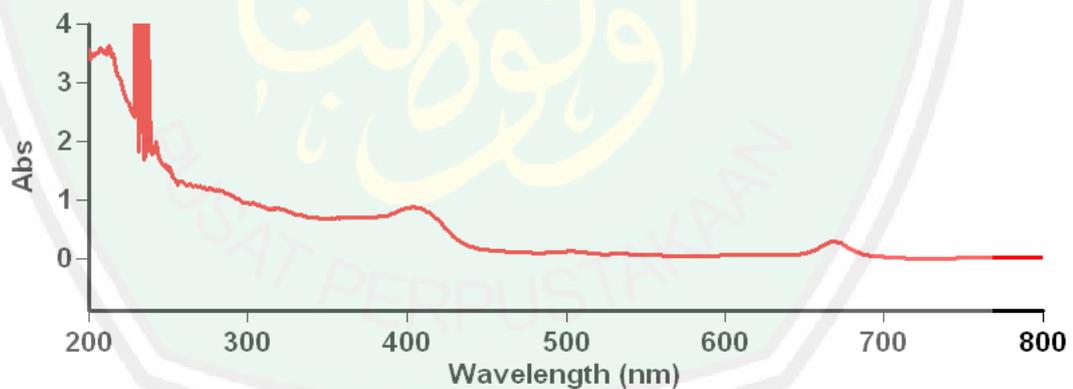
**Number of points**

# of X values 5  
 # Y values analyzed 5

## Lampiran 7 Hasil Identifikasi menggunakan UV-Vis

### L.7.1 Hasil Identifikasi menggunakan UV-Vis

#### L.7.1.1 Hasil UV-Vis Fraksi n-Butanol



## Scan Analysis Report

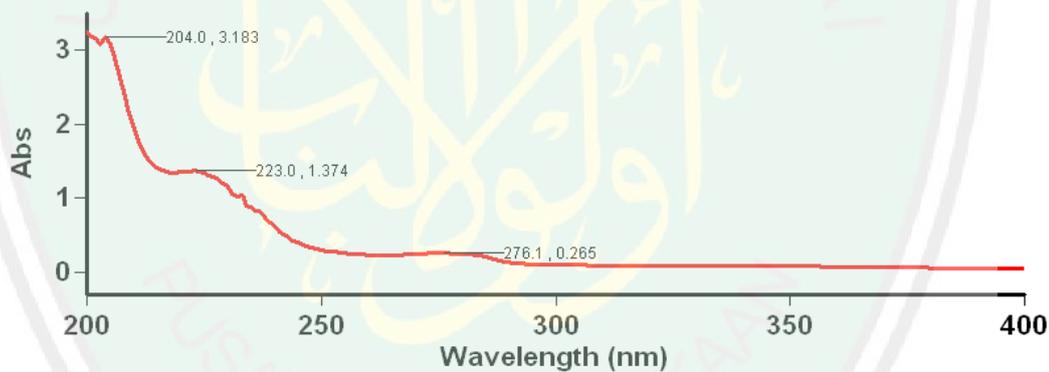
Sample Name: Fraksi

Peak Table	Peaks
Peak Style	0.0100
Peak Threshold	800.0nm to 200.0nm
Range	

Wavelength (nm)	Abs
668.9	0.279
611.0	0.065
502.9	0.115
404.0	0.869

318.0	0.850
307.0	0.921
281.9	1.163
276.0	1.199
270.0	1.237
267.0	1.250
264.0	1.270
259.0	1.320
251.0	1.556
248.0	1.599
242.1	1.991
237.0	10.000
234.1	10.000
230.0	10.000
214.9	3.502
213.0	3.645
210.1	3.550
207.1	3.591
205.0	3.528
202.0	3.504

**L.7.1.2 Hasil UV-Vis Isolat A2**



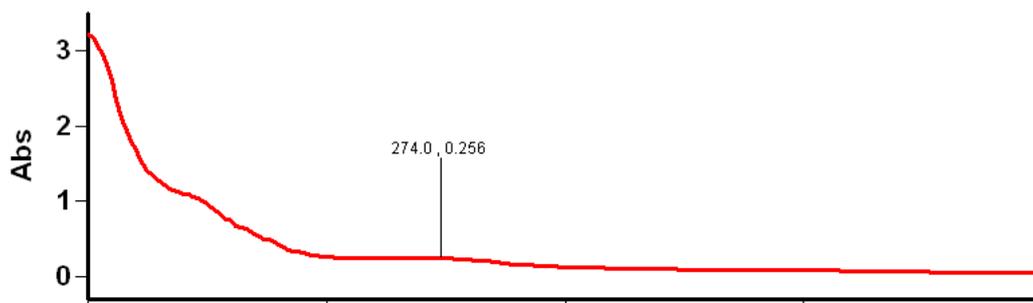
**Scan Analysis Report**

Sample Name: Isolat A2

Peak Table  
 Peak Style  
 Peak Threshold 0.0100  
 Range 800.0nm to 200.0nm

Wavelength (nm)	Abs
276.1	0.265
223.0	1.374
204.0	3.183

**L.7.1.3 Hasil UV-Vis Isolat A4**



## Scan Analysis Report

Sample Name: Isolat A4

Peak Table  
Peak Style Peaks  
Peak Threshold 0.0100  
Range 800.0nm to 200.0nm

Wavelength (nm)	Abs
274.0	0.256

### Lampiran 8 Dokumentasi Penelitian



Pengeringan *Eucheuma cottonii*



Serbuk *Eucheuma cottonii*



Pengovenan cawan kosong+sampel



Desikator cawan+sampel



Filtrat hasil maserasi ke-1



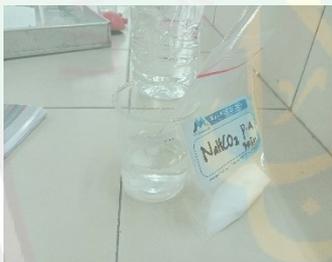
Filtrat hasil maserasi ke-2



Filtrat hasil maserasi ke-3



Hasil maserasi methanol



Pembuatan larutan  $\text{NaHCO}_3$



Proses hidrolisis



Partisi ke-1



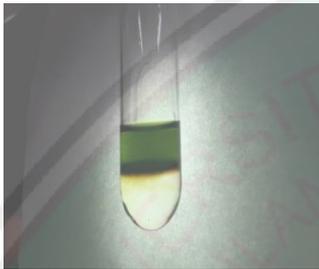
Partisi ke-2



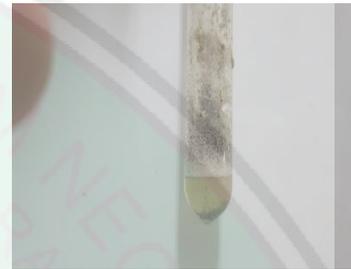
Partisi ke-3



Hasil partisi n-butanol



Fitokimia steroid dan triterpenoid



Fitokimia Flavonoid



Fitokimia alkaloid



Pembuatan bubuk silika



Proses elusi



Proses penggabungan vial



Isolate steroid akan diinkubasi



Proses inkubasi



Isolate steroid setelah diinkubasi

