

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK n-HEKSANA
DAN IDENTIFIKASI SENYAWA STEROID AKAR RUMPUT BAMBU
(*Lophatherum gracile* Brongn)**

SKRIPSI

**Oleh:
KHUMAIROH AL-QUAIS
NIM. 11630067**

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

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2015**

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK n-HEKSANA
DAN IDENTIFIKASI SENYAWA STEROID AKAR RUMPUT BAMBU
(*Lophatherum gracile* Brongn)

SKRIPSI

Oleh:
KHUMAIROH AL-QUAIS
NIM. 11630067

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 22 Desember 2015

Pembimbing I

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

Pembimbing II

Umaiatus Syarifah, M.A
NIP. 19820925 200901 2 005

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia

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

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK n-HEKSANA
DAN IDENTIFIKASI SENYAWA STEROID AKAR RUMPUT BAMBU
(*Lophatherum gracile* Brongn)

SKRIPSI

Oleh :
KHUMAIROH AL-QUAIS
NIM. 11630067

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 22 Desember 2015

Penguji Utama	: Diana Candra Dewi, M.Si NIP. 19770720 200312 2 001	(.....)
Ketua Penguji	: Ahmad Hanapi, M.Sc NIPT. 20140201 1 422	(.....)
Sekretaris Penguji	: Elok Kamilah Hayati, M.Si NIP. 19790620 200604 2 002	(.....)
Anggota Penguji	: Umaiyatus Syarifah, M.A NIP. 19820925 200901 2 005	(.....)

Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia

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

**SURAT PERNYATAAN
ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Khumairoh Al-Quais
NIM : 11630067
Fakultas / Jurusan : Sains dan Teknologi / Kimia
Judul Penelitian : Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak n-Heksana dan
Identifikasi Senyawa Steroid Akar Rumput Bambu
(*Lophatherum Gracile* Brongn)

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri.

Apabila di kemudian hari terbukti terdapat unsur-unsur jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggungjawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 22 Desember 2015

Khumairoh Al-Quais
NIM. 11630067

KATA PENGANTAR



Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah SWT yang Maha Rahman dan Rahim yang selalu melimpahkan rahmat, taufik, hidayah serta inayahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir (skripsi) dengan judul **Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak n-Heksana dan Identifikasi Senyawa Steroid Akar Rumpun Bambu (*Lophatherum Gracile* Brongn)** ini semaksimal mungkin.

Shalawat serta salam selalu kami haturkan kepada junjungan kita semua, nabi akhiru zaman Muhammad SAW yang telah membimbing kita semua dari zaman jahiliyah menuju zaman islamiyah sehingga kita bisa berada dalam jalan yang diridhoiNya bukan berada di jalan yang dimurkaiNya. Semoga Allah melimpahkan rahmat atas beliau, sesuai dengan keutamaan amal atas perbuatan beliau, serta kepada semua keluarga, sahabat dan para pengikutnya sampai akhir zaman.

Penulis menyadari kekurangan serta keterbatasan yang dimiliki, oleh karena itu tanpa adanya dukungan, bimbingan serta arahan dari berbagai pihak terkait, sulit bagi kami selaku penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Maka dengan kerendahan hati, patutlah kami selaku penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Ibu dan Bapak penulis sebagai orang tua kami serta keluarga besar kami yang senantiasa mendukung kami baik secara moril, materi maupun doa.
2. Prof. Dr. H. Mudjia Rahardjo, M.Si, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, juga selaku pembimbing yang telah membimbing penulis dalam menyelesaikan skripsi.

5. Ahmad Hanapi, M.Sc selaku konsultan yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
6. Seluruh dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu pengetahuan, wawasan sebagai pedoman serta bekal bagi penulis.
7. Teman-teman khususnya angkatan 2011 Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan motivasi, informasi dan masukannya pada penulis.
8. Teman-teman CSSMoRA Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang angkatan 2011 dan seluruh anggota CSSMoRA yang telah memberikan bantuan serta motivasi kepada penulis.
9. Kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah ikut memberikan bantuan dan motivasi selama pengerjaan skripsi sampai dengan laporan ini selesai disusun, yang tidak bisa kami sebutkan satu persatu.

Teriring doa serta harapan melalui salam *ta'dzim* penulis kepada mereka semua, semoga apa yang telah mereka berikan kepada penulis mendapatkan balasan yang lebih baik dari Allah SWT, *Aamiin yaa rabbal aalamiin*.

Akhirnya atas segala kekurangan dari skripsi kami ini, sangat diharapkan saran dan kritik yang bersifat konstruktif dari semua pembaca demi lebih baiknya laporan ini.

Malang, 22 Desember 2015

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR PERSAMAAN	xi
ABSTRAK	xii
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Batasan Masalah	7
1.5 Manfaat Penelitian	7
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Rumput Bambu (<i>Lophatherum gracile</i> Brongn)	8
2.2 Kandungan Kimia Rumput Bambu (<i>Lophatherum gracile</i> Brongn)	11
2.3 Antioksidan dan Radikal Bebas	12
2.4 Mekanisme Antioksidatif	14
2.5 Uji Aktivitas Antioksidan menggunakan DPPH	16
2.6 Senyawa Steroid Sebagai Antioksidan	18
2.7 Ekstraksi Maserasi	20
2.8 Uji Fitokimia Senyawa Steroid	22
2.9 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis	23
2.9.1 Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi	28
2.10 Identifikasi Senyawa Steroid	30
2.10.1 Identifikasi Senyawa Steroid dengan UV-Vis	30
2.10.2 Identifikasi Senyawa Steroid dengan FTIR	31
 BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	34
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	34
3.2.1 Alat	34
3.2.2 Bahan	34
3.3 Tahapan Penelitian	35
3.4 Pelaksanaan Penelitian	35
3.4.1 Preparasi Sampel	35
3.4.2 Ekstraksi Maserasi dengan Pelarut n-Heksana	35
3.4.3 Uji Aktivitas Antioksidan menggunakan Metode DPPH	36
3.4.3.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	36
3.4.3.2 Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan	36

3.4.3.3 Pengukuran Potensi Antioksidan pada Sampel	37
3.4.4 Uji Fitokimia Senyawa Steroid menggunakan Reagen Pereaksi	38
3.4.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis	38
3.4.5.1 KLT Analitik	38
3.4.5.2 KLT Preparatif	39
3.4.5.3 Kromatografi Dua Dimensi	40
3.4.6 Identifikasi Senyawa Steroid	40
3.4.6.1 Identifikasi Senyawa Steroid dengan UV-Vis	40
3.4.6.2 Identifikasi Senyawa Steroid dengan FTIR	40
3.4.7 Analisis Data	41
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Preparasi Sampel	42
4.2 Ekstraksi Maserasi dengan Pelarut n-Heksana	43
4.3 Uji Aktivitas Antioksidan menggunakan Metode DPPH	45
4.3.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	45
4.3.2 Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan	45
4.3.3 Pengukuran Potensi Antioksidan pada Sampel	46
4.4 Uji Fitokimia Senyawa Steroid menggunakan Reagen Pereaksi	49
4.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis	50
4.5.1 KLT Analitik	50
4.5.2 KLT Preparatif	54
4.5.3 Kromatografi Dua Dimensi	56
4.6 Identifikasi Senyawa Steroid	58
4.6.1 Identifikasi Senyawa Steroid dengan UV-Vis	58
4.6.2 Identifikasi Senyawa Steroid dengan FTIR	59
4.7 Pemanfaatan Rumput Bambu dalam Perspektif Islam	61
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	64
5.2 Saran.....	64
DAFTAR PUSTAKA	65
LAMPIRAN	66

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Deret eluotropik berdasarkan efek elusinya	25
Tabel 2.2 Warna dan warna komplementer	31
Tabel 2.3 Frekuensi inframerah	32
Tabel 4.1 Penentuan waktu kestabilan	46
Tabel 4.2 Persen (%) aktivitas antioksidan	48
Tabel 4.3 Hasil uji KLTA ekstrak n-heksana	52
Tabel 4.4 Hasil KLTA eluen terbaik n-heksana : etil asetat (8 : 2)	53
Tabel 4.5 Hasil KLTP ekstrak n-heksana	56
Tabel 4.6 Hasil KLT dua dimensi isolat steroid	58
Tabel 4.7 Interpretasi hasil spektra FTIR	60



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Rumput bambu (<i>Lophatherum gracile</i> Brongn)	10
Gambar 2.2	<i>Butylated hydroxytoluene</i> (BHT)	13
Gambar 2.3	Vitamin C	14
Gambar 2.4	Reaksi inisiasi dan propagasi asam lemak	15
Gambar 2.5	Reaksi terminasi oksidasi lemak	15
Gambar 2.6	Reaksi DPPH dengan senyawa peredam radikal bebas	17
Gambar 2.7	Struktur dasar golongan senyawa steroid	18
Gambar 2.8	(a) Steroid anabolik testosterone (b) Progesteron	19
Gambar 2.9	(a) Struktur umum sterol (b) β -sitosterol, contoh fitosterol (c) Struktur kompleks asam kolat	19
Gambar 2.10	Reaksi dugaan senyawa steroid (contoh senyawa kolesterol) dengan reagen <i>Lieberman Burchard</i>	22
Gambar 2.11	Pemisahan menggunakan KLT dua dimensi	29
Gambar 4.1	Spektra UV-Vis larutan DPPH 0,2 mM	45
Gambar 4.2	Grafik persen (%) aktivitas antioksidan	48
Gambar 4.3	Reaksi dugaan senyawa steroid dengan reagen LB	50
Gambar 4.4	Hasil uji fitokimia steroid	50
Gambar 4.5	Hasil KLTA eluen terbaik n-heksana : etil asetat (8 : 2)	53
Gambar 4.6	Hasil KLTP ekstrak n-heksana	55
Gambar 4.7	Hasil KLT dua dimensi	57
Gambar 4.8	Hasil serapan UV-Vis isolat KLTP	59
Gambar 4.9	Hasil spektra FTIR	60

DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 2.1 % Aktivitas antioksidan	17
Persamaan 2.2 Harga Rf	26
Persamaan 3.1 % Rendemen	36
Persamaan 3.2 % Aktivitas antioksidan	37



ABSTRAK

Al-Quais, K. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak n-Heksana dan Identifikasi Senyawa Steroid Akar Rumpun Bambu (*Lophatherum gracile* Brongn). Skripsi. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Pembimbing II: Umayyatus Syarifah, M.A; Konsultan: Ahmad Hanapi, M.Sc.

Kata kunci: akar rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn), uji antioksidan, uji fitokimia

Rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.) merupakan tanaman gulma yang memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana akar rumput bambu dan untuk mengetahui eluen terbaik yang dapat digunakan untuk memisahkan senyawa steroid dalam ekstrak n-heksana akar rumput bambu dengan menggunakan KLT. Akar rumput bambu diekstraksi maserasi dengan pelarut n-heksana p.a. Ekstraknya diuji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dan diidentifikasi golongan senyawa aktif dengan uji reagen. Senyawa steroid dalam ekstrak n-heksana dipisahkan dengan KLT analitik, KLT preparatif dan KLT dua dimensi, serta diidentifikasi gugus fungsinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. Aktivitas antioksidan tertinggi pada ekstrak n-heksana sebesar 47,58 % pada konsentrasi 400 ppm. Uji fitokimia menunjukkan ekstrak n-heksana positif mengandung senyawa steroid dan triterpenoid. Hasil pemisahan senyawa steroid menggunakan KLT analitik diperoleh eluen terbaik yaitu n-heksana : etil asetat (8 : 2) menghasilkan 7 noda dengan Rf 0,22; 0,56; 0,69; 0,74; 0,81; 0,86 dan 0,94. Pemisahan dengan KLT preparatif menghasilkan 11 noda. Isolat ke-11 yang berwarna hijau terang diduga merupakan senyawa steroid, kemudian dipisahkan dengan KLT dua dimensi menghasilkan dua noda. Identifikasi menggunakan UV-Vis dan FTIR menunjukkan bahwa isolat ke-11 memiliki panjang gelombang maksimum 249 dan 255 nm, dengan serapan-serapan spesifik senyawa steroid seperti regangan asimetri OH pada bilangan gelombang 3435 cm^{-1} dan rentang --CH alifatik pada 2922 cm^{-1} dan 2852 cm^{-1} .

ABSTRACT

Al-Quais, K. 2015. Antioxidant Activity Assay of n-Hexane Extract and Identify of Steroid Compound of Bamboo Grass Roots (*Lophatherum gracile* Brongn). Thesis. Chemistry Department, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang. Supervisor I: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Supervisor II: Umaiatus Syarifah, M.A; Consultant: Ahmad Hanapi, M.Sc.

Keyword: bamboo grass roots (*Lophatherum gracile* brongn), antioxidant test, phytochemical test

Bamboo grass (*Lophatherum gracile* B.) is a weed plant which contains secondary metabolites. The purpose of this research is to know antioxidant activity of bamboo grass roots extract and to know which can used to separate steroid compound that contain in bamboo grass roots of n-hexane extract by using TLC. The roots grass bamboo become macerate extract by n-hexane p.a. The extract will be test an antioxidant with DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method and identified the class of active compound by reagen test. Steroid compound in n-hexane extract separated by analytic of TLC, preparation of TLC and two dimension of TLC, with identified the group function using spektrofotometer UV-Vis and FTIR. The highest proportion of antioxidant activity in extract of n-hexane is about 47,58 % (400 ppm). Photochemical test show that n-heksana extract contains steroid and triterpenoid compounds. The result of separation steroid compound using analytic of TLC that gets of n-hexane : ethyl acetat (8 : 2) as the best eluent which has the result of 7 stain with Rf value 0,22; 0,56; 0,69; 0,74; 0,81; 0,86 and 0,94. The result of separation with preparation TLC is 11 stains. Isolate 11 which has light green color guess as steroid compound, then separated with two dimensions of TLC that has two stains as the result. Identify using by UV-Vis and FTIR show that Isolates 11 have a length at a wavelength of 249 and 255 nm, which is specific reinforced of steroid compound as asymmetry strain OH at wave numeral 3435 cm^{-1} and -CH aliphatic in 2922 cm^{-1} and 2852 cm^{-1} .

مستخلص البحث

القويس، خ. 2015. اختبار فعالية مضاد للأوكسدة وتحديد مركبات ستيرويد في خلاصة n-هكسانا على جذور العشب الخيزران. البحث الجامعي. قسم كيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية بمالانج. المشرفة الأولى: ايلوك كاملة حياتي الماجستير، والمشرفة الثانية: عمية الشريفة الماجستير، مستشار: احمد حنفي الماجستير.

الكلمات الأساسية: جذور العشب الخيزران، اختبار فعالية مضاد للأوكسدة، اختبار فيتوكيمياء

أن جذور العشب الخيزران هو نبات الإعتشاب التي تحتوي مركبات الثانوية. وأما الأهداف المرجوة في هذا البحث وهي لمعرفة فعالية مضاد للأوكسدة في خلاصة n-هكسانا على جذور العشب الخيزران ولمعرفة عنصرا جيد المستخدمة ليفرق مركبات ستيرويد الواردة في خلاصة n-هكسانا على جذور العشب الخيزران باستخدام KLT. وأما نفع المستخرج على جذور العشب الخيزران من لمذيب n-هكسانا p.a وتختبار خلاصته بطريقة 1DPPH-1 ديفونيل-2-فكراهدرازيل وتحديد مركب عملي مع اختبار كاشف و مركبات ستيرويد في خلاصة n-هكسانا تفرق باستخدام KLT انلتيك، KLT استعداد و KLT من ثنائي الأبعاد وتحديد مجموعة الوظيفية باستخدام سفكترومتر UV-VIS و FTIR. وأما في المائة في مضاد للأوكسدة العالية على خلاصة n-هكسانا حوالي 47,58 % (400ppm). وهذا الإختبار (فيتوكيمياء) يدل على أن في خلاصة n-هكسانا ايجابي يتضمن مركبات ستيرويد وتريترفنويد. ونتائج من تفريق مركبات ستيرويد باستخدام KLT انلتيك وهي عنصر جيد وهي n-هكسانا: اتيل استت (2:8) يحصل سبع وصمات ب RF 0,22، 0,56، 0,69، 0,74، 0,81، 0,86 و 0,94. و باستخدام KLT استعداد وهي احدي عشر من وصمات. وأما العزلات الحادية عشر لونه أخضر يزعم من مركبات ستيرويد ثم تفرق باستخدام KLT من ثنائي الأبعاد حي يحصل من ثنائي الأبعاد وصمتين. وتحديد باستخدام UV-VIS و FTIR يدل على أن العزلات الحادية عشر لديها طولاً موجياً حوالي 249 و nm225 بامتصاصات محددة من مركبات ستيرويد على سبيل المثال اسيمتري OH في الأرقام الموجهة حوالي 3435 جنتي مترا وشب مركبات ستيرويد CH- اليفتيك على 2922 جنتي مترا¹ و 2852 جنتي مترا¹.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia sangat kaya akan beragam flora dan fauna yang bermacam-macam, baik di lautan maupun di daratan. Kekayaan alam ini diciptakan oleh 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 kekuasaan-Nya, sebagaimana firman Allah SWT dalam surat Qaaf (50); 7,

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا وَأَلْقَيْنَا فِيهَا رَوَاسِيَ وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ بَهِيجٍ ﴿٧﴾

“Dan Kami hamparkan bumi itu dan Kami letakkan padanya gunung-gunung yang kokoh dan Kami tumbuhkan padanya segala macam tanaman yang indah dipandang mata” (QS. Qaaf (50); 7).

Menurut al Mahali dan as Suyuthi (2011) kata *“Zaujin Bahij”* menggambarkan mengenai beraneka macam tumbuh-tumbuhan yang indah dipandang mata, dan dengan keindahan itu memiliki sifat kebaikan. Sebaik-baiknya tumbuhan adalah yang bermanfaat bagi makhluk lainnya. Semua jenis tumbuhan dapat dimanfaatkan oleh manusia, mulai dari tumbuhan tingkat rendah hingga tumbuhan tingkat tinggi. Keberadaannya sebagai makhluk hidup sudah banyak dikaji dalam beberapa penelitian, misalnya tumbuhan rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn).

Rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) merupakan rumput menahun, tinggi 40 - 100 cm, tumbuh liar di tempat rindang yang tidak terlalu kering atau basah dari 200 - 1.500 m di atas permukaan laut. Batang kecil,

panjang, berongga, berambut, berwarna kuning dan beralur memanjang. Daun bentuk runcing dan pertulangan sejajar. Akar berbentuk serabut dan menyebar dengan penebalan seperti umbi kecil-kecil berbentuk kerucut serta mempunyai rimpang yang menyerupai kayu.

Masyarakat luas khususnya di pulau Jawa, tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) tidak begitu dikenal sebagai tanaman yang memiliki potensi untuk dimanfaatkan sebagai obat herbal. Hal ini dikarenakan pertumbuhannya dianggap sebagai tanaman rumput-rumputan yang tumbuh liar di berbagai tempat seperti semak-semak yang tidak memiliki manfaat.

Berawal dari asumsi untuk membiarkan tumbuhan ini tetap hidup, maka untuk penelitian dipilih akar sebagai sampel yang diteliti. Akar rumput bambu ini memiliki sifat dan khasiat tersendiri yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan pengobatan dan pencegahan penyakit-penyakit yang mengerikan. Hal ini karena pada bagian akar rumput bambu merupakan bagian tumbuhan yang berfungsi sebagai penyerap sari-sari makanan dan berperan sebagai sistem pertahanan tubuh tumbuhan, sehingga dimungkinkan senyawa metabolit sekunder banyak terdapat pada bagian ini.

Senyawa metabolit sekunder dalam tumbuhan yang berkaitan dengan aktivitas antikanker maupun antioksidan antara lain adalah golongan alkaloid, terpenoid, polifenol, flavonoid, senyawa resin dan steroid. Senyawa steroid merupakan salah satu kandungan metabolit sekunder yang banyak digunakan sebagai obat antara lain untuk mengobati gangguan kulit, diabetes, gangguan menstruasi, malaria dan antiinflamasi. Sedangkan senyawa steroid saponin banyak digunakan sebagai bahan baku untuk pembuatan hormon steroid, dan sampai

sekarang usaha pencarian tumbuhan penghasil sapogenin semakin banyak dilakukan (Robinson, 1995).

Penelitian Sinulingga (2011) menyatakan bahwa ekstrak n-heksana akar tanaman ekor naga mengandung senyawa triterpenoid/ steroid. Hasil penelitian lainnya yang telah dilakukan oleh Hilda (2014) menyatakan bahwa akar tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) banyak mengandung senyawa steroid dengan hasil LC_{50} pada pelarut etanol 80 % sebesar 88,42 ppm, pelarut kloroform 57,31 ppm dan pada pelarut n-heksana sebesar 81,61 ppm. Ekstrak etanol 80 %, kloroform dan n-heksana bersifat toksik karena memiliki nilai LC_{50} di bawah 100 ppm, sehingga ketiga ekstrak tersebut berpotensi digunakan sebagai bahan aktif antikanker (Risky, 2014).

Salah satu penyebab kanker adalah radikal bebas yang menyerang sel tubuh manusia. Radikal bebas dapat dihambat dengan adanya senyawa antioksidan. Berdasarkan nilai LC_{50} yang diperoleh pada penelitian Hilda (2014) dapat diduga bahwa ekstrak akar rumput bambu dengan ketiga pelarut n-heksana, kloroform dan etanol memiliki aktivitas antioksidan.

Tubuh manusia memiliki antioksidan endogen yang mampu meredam radikal bebas, tetapi jumlahnya terbatas sehingga dibutuhkan antioksidan eksogen yang dapat membantu memperkecil dampak dari radikal bebas. Antioksidan sintetis seperti BHA (*Butylated Hydroxyanisole*), BHT (*Butylated Hydroxytoluen*) dan TBHQ (*Terbutylhydroxyquinone*) mempunyai aktifitas biologis meredam radikal bebas. Namun, beberapa studi menyatakan bahwa BHA bersifat karsinogenik pada lambung tikus dan hamster sehingga menyebabkan kanker (Masui, dkk., 1986). BHT dapat mengubah stabilitas genomik dari sel

(Tran, 2013). Oleh karena itu, pengembangan serta pemanfaatan antioksidan yang lebih aman dan efektif yang berasal dari alam sangat penting untuk dilakukan.

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode peredaman DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) dengan mengukur daya optimal reaksi peredaman terhadap radikal bebas DPPH. Pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometri dengan mengukur serapan dari masing-masing sampel yang sudah direaksikan dengan DPPH (Yuhernita, 2011). Metode DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel.

Hasil penelitian Wulandari (2013) menyatakan bahwa ekstrak n-heksana mengandung senyawa steroid serta memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai EC_{50} sebesar 162,16 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Satria (2013) menyatakan ekstrak n-heksana buah lakum mengandung senyawa triterpenoid serta memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 3.158,928 $\mu\text{g/mL}$.

Pemisahan senyawa steroid dari akar rumput bambu pada penelitian ini menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut n-heksana, dimana metode ini digunakan karena memiliki kelebihan yaitu praktis, efektif, aman dalam penggunaannya dan bertujuan untuk menghindari rusaknya senyawa aktif pada sampel yang tidak tahan terhadap suhu panas (Ditjen POM, 1986). Pemilihan n-heksana sebagai pelarut didasarkan pada sifat nonpolar dengan ketetapan dielektrik 1,89 sehingga mempunyai kemampuan untuk menarik senyawa steroid yang bersifat nonpolar dalam sampel. Selain itu, didasarkan pada tingkat keamanan dan kemudahan saat penguapan (Zahro, 2011).

Penelitian Zahro (2011), melakukan ekstraksi maserasi tanaman anting-anting (*Acalypha indica* Linn.) menggunakan pelarut n-heksana yang

menghasilkan warna ekstrak kuning kecoklatan. Ekstrak pekat yang telah dipekatkan dengan *rotary evaporator* menghasilkan randemen sebesar 2,51 %. Hasil uji kandungan senyawa aktif menunjukkan positif adanya senyawa triterpenoid/ steroid. Penelitian lain yang dilakukan oleh Sinulingga (2011), ekstraksi perkolasi akar tanaman ekor naga (*Rhaphidophora pinnata* Schott) dengan menggunakan pelarut n-heksana menghasilkan berat ekstrak sebesar 1,543 g. Hasil uji kandungan senyawa aktif menunjukkan positif adanya senyawa triterpenoid/ steroid.

Uji fitokimia dilakukan dengan uji reagen dan dilanjutkan dengan pemisahan senyawa steroid menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) (Mohammad, *et, al.*, 2010). Halimah (2010) menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (7 : 3) pada ekstrak kloroform tanaman anting-anting menghasilkan 4 noda berwarna hijau terang, hijau terang, hijau kekuningan, dan hijau kecoklatan yang setelah disemprot reagen *Liebermann-Burchard* mendapatkan nilai Rf 0,57; 0,76; 0,94; dan 0,96. Sriwahyuni (2010) menyatakan bahwa identifikasi golongan steroid dari ekstrak petroleum eter tanaman anting-anting menggunakan eluen sikloheksana : etil asetat (1 : 1) menunjukkan 7 noda di bawah sinar UV 366 nm. Noda yang menunjukkan adanya steroid adalah noda ke- 3 dan 7 berwarna oranye kecoklatan dengan nilai Rf 0,47 dan 0,84.

Penelitian Sinulingga (2011) menyatakan bahwa pada fase gerak n-heksana : etil asetat (8 : 2) diperoleh 10 noda, 8 noda merupakan senyawa steroid/ triterpenoid. Sedangkan pada KLT dua dimensi dengan menggunakan fase gerak n-heksana : etil asetat (8 : 2) dan benzena : etil asetat (6 : 4), isolat memberikan satu bercak warna ungu dengan harga Rf 0,44.

Pada penelitian ini akan dilakukan pengujian aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana dari akar rumput bambu (*L. gracile* B.) dengan metode DPPH dan mengidentifikasi senyawa steroid dalam ekstrak n-heksana dengan menggunakan UV-Vis dan FTIR. Hasil dari penelitian ini nantinya diaplikasikan sebagai sumber senyawa antioksidan alami.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana akar rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn)?
2. Apa eluen terbaik yang dapat memisahkan senyawa steroid yang terdapat dalam ekstrak n-heksana akar tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) dengan menggunakan KLT?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana dari akar rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn).
2. Untuk mengetahui eluen terbaik yang dapat memisahkan senyawa steroid dalam ekstrak n-heksana akar tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) dengan menggunakan KLT.

1.4 Batasan Masalah

Adapun batasan masalah dalam penelitian ini yaitu:

1. Sampel yang digunakan adalah akar rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) yang diperoleh dari Kota Malang dan Kota Batu, Jawa Timur.
2. Ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut n-heksana.
3. Uji aktivitas antioksidan pada ekstrak steroid menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil).
4. Pemisahan senyawa steroid dalam ekstrak n-heksana akar tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT).
5. Instrumentasi yang digunakan untuk identifikasi yaitu spektrofotometer UV-Vis dan spektrotometer FTIR.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat mengenai pemanfaatan akar rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) yang dikenal sebagai rumput liar yang dapat digunakan untuk alternatif tanaman obat dalam rangka pemberdayaan atau usaha dalam bidang farmakologi. Hal ini mempermudah pengkajian lebih lanjut tentang aktivitas dan pemanfaatan senyawa steroid dalam bidang industri terutama bidang kesehatan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rumpu**t** Bambu (*Lophatherum gracile* Brongn)

Allah berfirman dalam surat as Syu'ara' (26); 7 – 9,

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً وَمَا كَانَ أَكْثَرُهُمْ مُؤْمِنِينَ ﴿٨﴾ وَإِنَّ رَبَّكَ لَهُوَ الْعَزِيزُ الرَّحِيمُ ﴿٩﴾

Artinya: “Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik? Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat suatu tanda kekuasaan Allah dan kebanyakan mereka tidak beriman. Dan sesungguhnya Tuhanmu benar-benar Dialah yang Maha Perkasa lagi Maha Penyayang (QS. as Syu'ara' (26); 7 – 9).

Kata “*Zaujin Karim*” pada ayat ini menjelaskan tentang segala macam tumbuh-tumbuhan yang bersifat baik. Tumbuhan yang paling baik adalah tumbuhan yang subur dan bermanfaat. Allah SWT memerintahkan kepada manusia untuk memperhatikan, merenungi dan berfikir sesuai batas kemampuan atas segala ciptaanNya dengan melakukan penelitian mengenai alam (al Maraghi, 1992). Tumbuhan yang bermanfaat salah satunya rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.). Rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.) merupakan salah satu tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai obat karena banyak mengandung senyawa aktif.

Firman Allah SWT surat an Nahl (16); 13,

وَمَا ذَرَأَّا لَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَذْكُرُونَ ﴿١٣﴾

Artinya: “Dan Dia (menundukkan pula) apa yang Dia ciptakan untuk kamu bumi ini dengan berlain-lainan macamnya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran” (QS. an Nahl (16); 13).

Kata “*Mukhtalifan Alwanuhu*” menunjukkan bahwa Allah SWT menciptakan segala macam makhluk yang beranekaragam di seluruh penjuru bumi (al Mahali dan as Suyuthi, 2011), misalnya rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.). Allah SWT menciptakan rumput bambu agar manusia berfikir dan mengambil pelajaran pada tanda-tanda kekuasaanNya.

Rumput bambu merupakan rumput menahun yang memiliki tinggi 0,5 sampai 1,2 m, bertangkai banyak dengan rimpang pendek bercabang-cabang, berakar serabut yang tumbuh menjadi umbi-umbi. Tumbuhan ini berada pada ketinggian 1500 m di atas permukaan laut di tempat yang senantiasa rindang, khususnya berada dalam hutan alam. Batang-batangnya tegak, mampat tidak berbulu. Daun-daunnya bertangkai jelas, berbangun lanset garis, berurat melintang diantara lidinya yang membujur, lembut, bewarna hijau tua dengan panjang 10 - 30 cm dan lebarnya 10 - 55 mm. Bunga majemuknya berupa sebuah malai bertangkai panjang dan terdiri atas bulir-bulir yang panjangnya 1 – 15 cm (Kusumawati, 2003).

Tanaman rumput bambu (*Lopatherum gracile* Brongn) tidak hanya terdapat di satu daerah saja, tetapi tersebar di beberapa daerah di Indonesia seperti di Sunda yang dikenal dengan nama Jukut awi. Selain itu di luar negeri rumput ini telah dikenal terutama di Inggris dan Tionghoa, di Inggris dengan nama *sasagrass*

dan di Tionghoa dengan nama *dan zhu ye* (Wijayakusuma, 2008). Rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) dikenal dengan nama daerah rumput rayung (bahasa Jawa), rumput bulu, rumput jarang, rumput kelurut (bahasa Melayu) dan tangkur gunung (bahasa Sunda) (Wikipedia, 2013).



Gambar 2.1 Rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn)

Klasifikasi tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn)

menurut Cronquist (1981), sebagai berikut:

- Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
- Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
- Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
- Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
- Ordo : Poales
- Famili : Poaceae (suku rumput-rumputan)
- Genus : *Lophatherum*
- Spesies : *Lophatherum gracile* Brongn

Tanaman rumput bambu masih banyak tumbuh di hutan tropis di Indonesia. Salah satunya adalah hutan tropis gunung Arjuno yang masih berpotensi sebagai habitat tumbuhnya tanaman rumput bambu, tanaman ini tumbuh liar di semak-semak yang rindang. Dari hasil penelitian eksplorasi keanekaragaman dan kandungan kimia tumbuhan obat di hutan tropis gunung Arjuno menyatakan bahwa tanaman *Lophatherum gracile* Brongn merupakan salah satu dari tiga belas jenis tanaman yang sangat berpotensi untuk digunakan sebagai obat herbal penyembuhan penyakit tertentu, seperti anti-inflamasi maupun antikanker (Kusumawati, 2003).

Tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) dapat digunakan untuk menurunkan panas, meluruhkan kemih, dan antiradang. Selain itu dapat juga digunakan untuk mengatasi mimisan, sakit tenggorokan, sariawan, gusi bengkak, infeksi saluran kemih, air kemih sedikit dan berwarna kuning, air kemih berdarah, gelisah, dan haus (Wijayakusuma, 2008).

2.2 Kandungan Kimia Rumput Bambu (*Lophatherum gracile* Brongn)

Kandungan pada seluruh bagian tanaman rumput bambu ini antara lain akar, batang, dan daun mengandung triterpenoid dan steroid arundoin, cylindrin, friedelin, beta-sitosterol, stigmasterol, campesterol, taraxerol, asam amino, dan asam lemak (Wijayakusuma, 2008).

Menurut analisis dengan menggunakan HPLC memberikan informasi bahwa ekstrak metanol rumput bambu jenis *Pogonatherum Crinitum* mengandung senyawa flavonoid, diantaranya yaitu 0,07 % (b/b) senyawa 6-C- β boivinopyranoside; 0,04 (b/b) senyawa 6-trans-(2''-O- α -rhamnopyranosyl) ethenyl

-5,7,3',4'-tetrahydroxylflavone; 0,78 % (b/b) senyawa luteolin dan 0,06 % (b/b) yang dapat dimanfaatkan sebagai obat herbal anti-inflamasi (Wang, 2008).

Penelitian farmakologi China menyatakan bahwa ekstrak daun *Lophatherum gracile* Brongn mengandung senyawa aktif flavonoid dan triterpen yang dapat dimanfaatkan sebagai antipiretik, diuretik, antibakteri, anti-tumor dan efek hiperglikemia (Jing, 2009).

Hasil penelitian Kusumawati (2003), eksplorasi keanekaragaman dan kandungan kimia tanaman obat di hutan tropis gunung Arjuno menyatakan bahwa tanaman *Lophatherum gracile* Brongn memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder golongan steroid atau terpenoid yang terdapat pada akar dengan nilai Rf 0,04; 0,12; 0,17; 0,3. Selain itu tanaman ini juga mengandung senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid yang terdapat pada bagian daun dengan nilai Rf sebesar 0,68.

Hasil penelitian Hilda (2014), menyatakan bahwa akar tanaman *Lophatherum gracile* Brongn memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder golongan steroid dengan nilai LC₅₀ pada pelarut etanol 80 % sebesar 88,42 ppm, pelarut kloroform 57,31 ppm dan pada pelarut n-heksana sebesar 81,61 ppm.

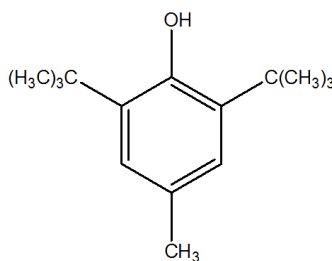
2.3 Antioksidan dan Radikal Bebas

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron. Senyawa antioksidan memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Winarsi, 2007).

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih atom tidak berpasangan. Suatu radikal bebas ditemukan sebagai zat antara yang tidak dapat diisolasi segera karena sangat reaktif dan berenergi tinggi (Fessenden dan Fessenden, 1997). Atom atau molekul akan mencapai kestabilan apabila radikal bebas bereaksi dengan molekul disekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini akan berlangsung terus-menerus dalam tubuh dan apabila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini dan penyakit degeneratif lainnya.

Penggunaan senyawa antioksidan saat ini semakin luas seiring dengan meningkatnya pemahaman masyarakat tentang peranannya dalam menghambat penyakit degeneratif. Hal ini berkaitan dengan kemampuan antioksidan yang bekerja sebagai penghambat reaksi oksidasi oleh radikal bebas yang menjadi salah satu penyebab penyakit-penyakit tersebut (Tahir, dkk., 2003).

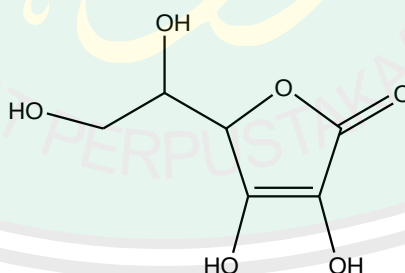
Berdasarkan sumbernya antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan sintetis dan antioksidan alami. Antioksidan sintetis adalah antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesis reaksi kimia. Contoh antioksidan jenis ini seperti Butil Hidroksi Toluena (BHT), PG, TBHQ dan tokoferol. Adapun struktur molekul dari BHT dapat dilihat pada Gambar 2.2 (Cahyadi, 2006).



Gambar 2.2 Butylated hydroxytoluene (BHT) (Cahyadi, 2006)

Antioksidan alami adalah hasil ekstraksi bahan alam tumbuhan yang memiliki kandungan antioksidan. Kandungan antioksidan tersebut berhubungan erat dengan komposisi senyawa kimia yang terdapat di dalamnya (Kulisic, 2006). Antioksidan alami secara toksikologi lebih aman untuk dikonsumsi dan lebih mudah diserap oleh tubuh daripada antioksidan sintesis (Madhavi, dkk., 1996). Penelitian menunjukkan bahwa antioksidan alami memiliki aktivitas antioksidatif lebih tinggi daripada antioksidan sintetik, oleh karena itu antioksidan alami mulai meningkat penggunaannya dan menggantikan antioksidan sintetis (Paiva, dkk., 1999).

Vitamin C merupakan salah satu jenis antioksidan alami yang larut dalam air. Vitamin C secara efektif menangkap radikal-radikal $O_2^\bullet$, $OH^\bullet$, $ROO^\bullet$. Vitamin C dapat melindungi membran biologis dan LDL (*Low Density Lipid*) dari kerusakan prooksidatif dengan cara mengikat radikal peroksil dalam fase berair dari plasma atau sitosol (Silalahi, 2006).



Gambar 2.3 Vitamin C

2.4 Mekanisme Antioksidatif

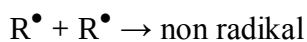
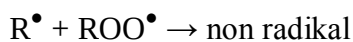
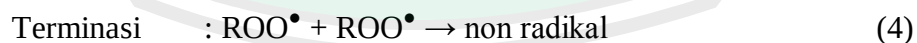
Mekanisme kerja antioksidan secara umum adalah menghambat oksidasi lemak. Oksidasi lemak terdiri dari tiga tahap utama yaitu inisiasi, propagasi, dan terminasi. Pada tahap inisiasi terjadi pembentukan radikal asam lemak yaitu suatu

senyawa turunan asam lemak ($R^\bullet$) yang bersifat tidak stabil dan sangat reaktif akibat hilangnya satu atom hidrogen ($H^\bullet$). Pada tahap selanjutnya, yaitu propagasi, radikal asam lemak akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi ($ROO^\bullet$). Radikal peroksi lebih lanjut akan menyerang asam lemak menghasilkan hidroperoksida ($ROOH$) dan radikal asam lemak baru ($R^\bullet$) (Nugroho, 2009).



Gambar 2.4 Reaksi inisiasi dan propagasi asam lemak (Nugroho, 2009).

Hidroperoksida yang terbentuk bersifat tidak stabil dan akan terdegradasi lebih lanjut menghasilkan senyawa-senyawa karbonil rantai pendek seperti aldehida dan keton yang bertanggung jawab atas rasa makanan berlemak. Tanpa adanya antioksidan, reaksi oksidasi lemak akan mengalami terminasi melalui reaksi antara radikal bebas membentuk kompleks bukan radikal (reaksi 4) (Nugroho, 2009).



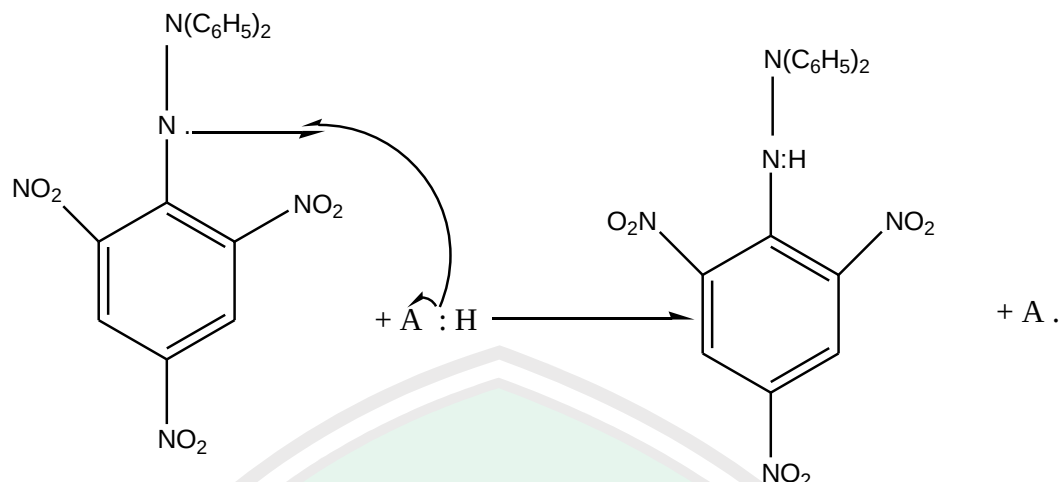
Gambar 2.5 Reaksi terminasi oksidasi lemak (Nugroho, 2009).

2.5 Uji Aktivitas Antioksidan menggunakan DPPH

Metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) digunakan secara luas untuk menguji kemampuan senyawa yang berperan sebagai pendonor elektron atau hidrogen. Metode DPPH merupakan metode yang dapat mengukur aktivitas total antioksidan baik dalam pelarut polar maupun nonpolar. Beberapa metode lain terbatas mengukur komponen yang larut dalam pelarut yang digunakan dalam analisa. Metode DPPH mengukur semua komponen antioksidan, baik yang larut dalam lemak ataupun dalam air (Prakash, dkk., 2001).

Metode DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel. Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan menyebabkan terjadinya perubahan warna DPPH dari ungu ke kuning yang diukur pada panjang gelombang 517 nm (Hanani, 2005). Pengurangan intensitas warna yang terjadi berhubungan dengan jumlah elektron DPPH yang menangkap atom hidrogen yang mengindikasikan peningkatan kemampuan antioksidan untuk menangkap radikal bebas. Aktivitas antioksidan diperoleh dengan menghitung jumlah pengurangan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan pengurangan konsentrasi larutan DPPH melalui pengukuran absorbansi larutan uji (Prakash, dkk., 2001).

DPPH yang bereaksi dengan antioksidan akan menghasilkan bentuk tereduksi DPPH dan radikal antioksidan (Prakash, dkk., 2001). Reaksi antara DPPH dengan senyawa peredam radikal bebas dapat dilihat pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Reaksi DPPH dengan senyawa peredam radikal bebas (Noviana, dkk., 2007)

Aktivitas penangkapan radikal bebas dapat dinyatakan dengan satuan persen (%) aktivitas antioksidan. Nilai ini diperoleh dengan Persamaan 2.1 (Molyneux, 2003).

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% \dots (2.1)$$

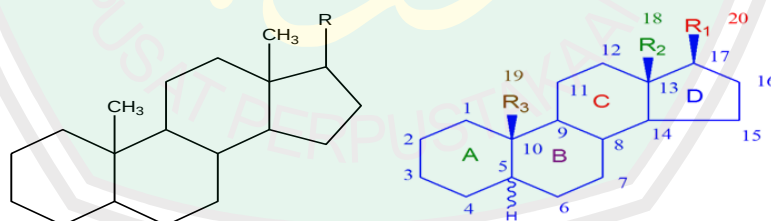
Nilai 0 % berarti sampel tidak mempunyai aktivitas antioksidan, sedangkan nilai 100 % berarti pengujian aktivitas antioksidan perlu dilanjutkan dengan pengenceran sampel untuk mengetahui batas konsentrasi aktivitasnya. Suatu bahan dapat dikatakan aktif sebagai antioksidan apabila presentase aktivitas antioksidan lebih atau sama dengan 50 % (Parwata, dkk., 2009). Absorbansi kontrol yang digunakan dalam prosedur DPPH ini adalah absorbansi DPPH sebelum ditambahkan sampel. Kontrol digunakan untuk mengkonfirmasi kestabilan sistem pengukuran. Nilai absorbansi kontrol dapat berkurang dari hari ke hari dikarenakan kehilangan aktivitasnya saat dalam stok larutan DPPH, tetapi nilai absorbansi kontrol tetap dapat memberikan batasan untuk pengukuran saat

itu. Kontrol juga berfungsi menjaga kekonstanan total konsentrasi DPPH dalam serangkaian pengukuran (Molyneux, 2003).

2.6 Senyawa Steroid Sebagai Antioksidan

Senyawa steroid terdapat dalam setiap makhluk hidup. Steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan disebut fitosterol, sedangkan yang ditemukan dalam jaringan hewan disebut kolesterol. Beberapa senyawa ini jika terdapat dalam tumbuhan akan dapat berperan menjadi pelindung. Senyawa ini tidak hanya bekerja menolak beberapa serangga tetapi juga menarik beberapa serangga lain (Robinson, 1995).

Steroid merupakan salah satu kelompok senyawa lipid yang dapat dianggap sebagai derivat dari senyawa perhidrosiklopentano fenantrena, yang terdiri dari tiga cincin sikloheksana dan sebuah cincin siklopentana yang terikat pada ujung salah satu cincin sikloheksana tersebut (Poedjiadi, 1994).

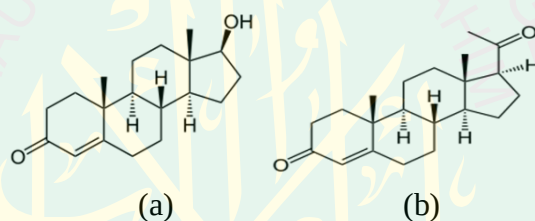


Gambar 2.7 Struktur dasar golongan senyawa steroid

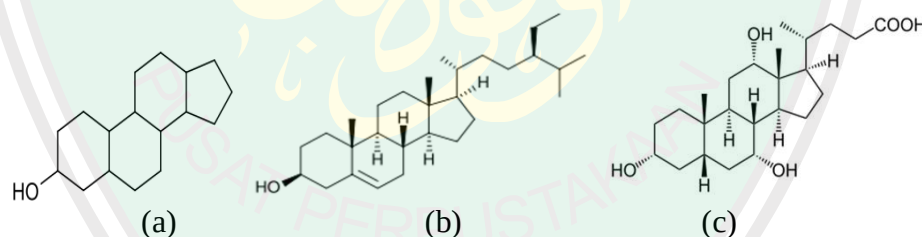
Pada umumnya steroid berfungsi sebagai hormon. Perbedaan jenis steroid yang satu dengan steroid yang lain terletak pada gugus fungsional yang diikat oleh keempat cincin ini dan tahap oksidasi tiap-tiap cincin. Lemak sterol adalah bentuk khusus dari steroid dengan rumus bangun diturunkan dari kolestana dilengkapi gugus hidroksil pada atom C-3, banyak ditemukan pada tanaman, hewan dan

fungi. Semua steroid dibuat di dalam sel dengan bahan baku berupa lemak sterol, baik berupa lanosterol pada hewan atau fungi, maupun berupa sikloartenol pada tumbuhan. Kedua jenis lemak sterol di atas terbuat dari siklisasi squalena dari triterpena (Poedjiadi, 1994).

Umumnya, steroid memiliki kelompok metil pada karbon C-10 dan C-13 dan rantai samping alkil pada karbon C-17. Selanjutnya, mereka berbeda-beda berdasarkan konfigurasi dari rantai samping, jumlah kelompok metil tambahan, dan kelompok-kelompok fungsional yang melekat pada cincin. Beberapa contoh steroid antara lain (Poedjiadi, 1994):



Gambar 2.8 (a) Steroid anabolik testosterone (b) Progesteron



Gambar 2.9 (a) Struktur umum sterol (b) β -sitosterol, contoh fitosterol (c) Struktur kompleks asam kolat

Penelitian Sinulingga (2011) menyatakan bahwa ekstrak n-heksana akar tanaman ekor naga mengandung senyawa triterpenoid/ steroid. Hasil penelitian lainnya yang telah dilakukan oleh Hilda (2014) menyatakan bahwa akar tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) banyak mengandung senyawa steroid dengan hasil LC_{50} pada pelarut etanol 80 % sebesar 88,42 ppm, pelarut kloroform 57,31 ppm dan pada pelarut n-heksana sebesar 81,61 ppm. Ekstrak

etanol 80 %, kloroform dan n-heksana bersifat toksik karena memiliki nilai LC_{50} di bawah 100 ppm, sehingga ketiga ekstrak tersebut berpotensi digunakan sebagai bahan aktif antikanker (Risky, 2014). Berdasarkan nilai LC_{50} yang diperoleh pada penelitian Hilda (2014) dapat diduga bahwa ekstrak akar rumput bambu dengan ketiga pelarut n-heksana, kloroform dan etanol memiliki aktivitas antioksidan.

Hasil penelitian Wulandari (2013) menyatakan bahwa ekstrak n-heksana mengandung senyawa steroid serta memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai EC_{50} sebesar 162,16 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Satria (2013) menyatakan ekstrak n-heksana buah lakum mengandung senyawa triterpenoid serta memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 3.158,928 $\mu\text{g/mL}$.

2.7 Ekstraksi Maserasi

Harborne (1987) menyatakan ekstraksi adalah proses yang secara selektif mengambil zat terlarut dari suatu campuran dengan bantuan pelarut. Metode ekstraksi bergantung pada polaritas senyawa yang akan diekstrak. Berdasarkan fase yang terlibat, terdapat dua jenis ekstraksi, yaitu ekstraksi cair-cair dan ekstraksi padat-cair. Pemindahan komponen dari padatan ke pelarut pada ekstraksi padat-cair melalui tiga tahapan, yaitu difusi pelarut ke pori-pori padatan atau ke dinding sel, di dalam dinding sel terjadi pelarutan padatan oleh pelarut, dan tahapan terakhir adalah pemindahan larutan dari pori menjadi larutan ekstrak. Ekstraksi padat-cair dipengaruhi oleh waktu ekstraksi, suhu yang digunakan, pengadukan, dan banyaknya pelarut yang digunakan (Harborne, 1987).

Prinsip kelarutan adalah “*like dissolve like*”, yaitu pelarut polar akan melarutkan senyawa polar, sebaliknya pelarut nonpolar akan melarutkan senyawa

nonpolar. Pada penelitian ini digunakan pelarut n-heksana. Penggunaan n-heksana sebagai pelarut organik pengekstrak awal akar rumput bambu ini didasarkan pada sifat kepolarannya yang bersifat nonpolar dengan tetapan dielektrik 1,890. Sehingga dengan penggunaan pelarut ini diharapkan dapat melarutkan senyawa steroid yang cenderung bersifat nonpolar yang terdapat pada ekstrak akar rumput bambu untuk memperoleh hasil yang optimum, baik jumlah ekstrak maupun senyawa aktif yang terkandung dalam sampel.

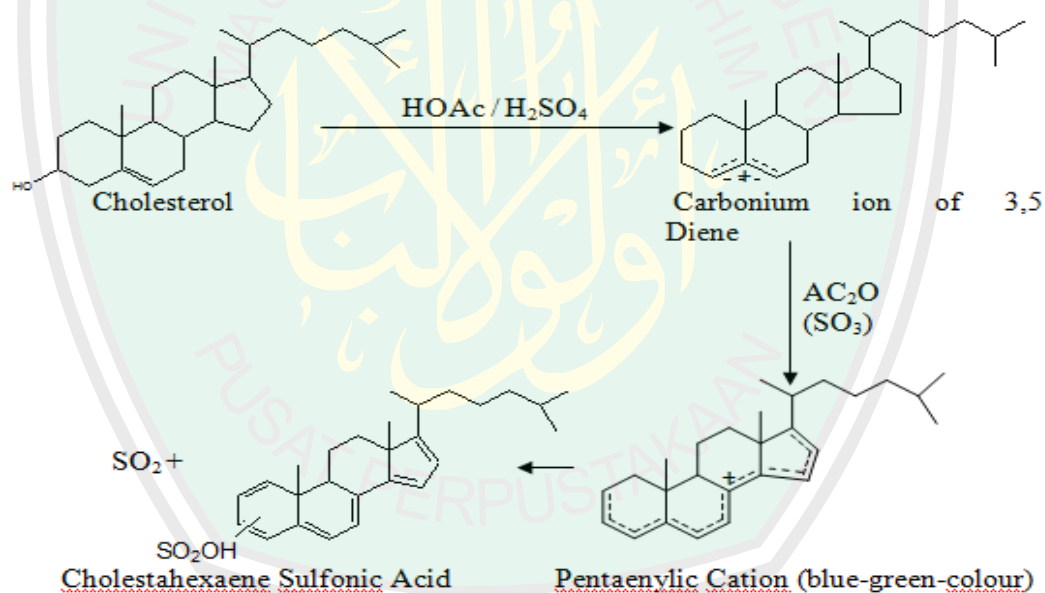
Metode maserasi biasanya digunakan untuk mengekstrak jaringan tanaman yang belum diketahui kandungan senyawanya yang kemungkinan bersifat tidak tahan panas sehingga kerusakan komponen tersebut dapat dihindari. Kekurangan dari metode ini adalah diperlukan waktu yang relatif lama dan membutuhkan banyak pelarut (Harborne, 1987).

Penelitian Zahro (2011), melakukan ekstraksi maserasi tanaman anting-anting (*Acalypha indica* Linn.) menggunakan pelarut n-heksana yang menghasilkan warna ekstrak kuning kecoklatan. Ekstrak pekat yang telah dipekatkan dengan rotary evaporator menghasilkan randemen sebesar 2,51 %. Hasil uji kandungan senyawa aktif menunjukkan positif adanya senyawa triterpenoid/ steroid. Penelitian lain yang dilakukan oleh Sinulingga (2011), ekstraksi perkolasi akar tanaman ekor naga (*Rhaphidophora pinnata* Schott) dengan menggunakan pelarut n-heksana menghasilkan berat ekstrak sebesar 1,543 g. Hasil uji kandungan senyawa aktif menunjukkan positif adanya senyawa triterpenoid/ steroid.

2.8 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Kandungan senyawa steroid dapat diuji dengan metode *Lieberman-Burchard* yaitu menggunakan asam asetat anhidrat dan asam sulfat. Hasil positif ditunjukkan oleh steroid apabila dalam larutan terjadi perubahan warna hijau biru (Harbone, 1987).

Reaksi warna yang digunakan untuk uji warna pada steroid adalah dengan reaksi *Lieberman-Burchard* yang menghasilkan warna hijau biru. Reaksi warna yang lain pada steroid dilakukan dengan Brieskorn dan Briner (asam klorosulfonat dan Sesolvan NK) menghasilkan warna coklat (Robinson, 1995).



Gambar 2.10 Reaksi dugaan senyawa steroid (contoh senyawa kolesterol) dengan reagen Lieberman Burchard (Burke, 1974)

Halimah (2010) melakukan uji fitokimia golongan senyawa steroid dari ekstrak kloroform tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.). Ekstrak tanaman dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya, campuran ini ditambahkan

dengan 1 - 2 mL H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh warna hijau kebiruan maka ekstrak menunjukkan adanya golongan senyawa steroid. Hasil dari uji ini menunjukkan bahwa ekstrak kloroform dari tanaman anting-anting (*Acalypha indica* L.) positif mengandung senyawa steroid.

2.9 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan yang pada dasarnya semua menggunakan dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Pemisahan-pemisahan ini bergantung pada gerakan relatif dari dua fase ini (Sastrohamidjojo, 2007). Prinsip dari pemisahan adalah adanya perbedaan sifat fisik dan kimia dari senyawa yaitu kecenderungan dari molekul untuk melarut dalam cairan (kelarutan), kecenderungan molekul untuk menguap (keatsirian), kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan (adsorpsi, penyerapan).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan salah satu kromatografi yang berdasarkan proses adsorpsi. Pada hakikatnya KLT melibatkan dua peubah yakni fase diam atau sifat lapisan dan fase gerak atau campuran pelarut pengembang. Fase diam dapat berupa serbuk halus yang berfungsi sebagai permukaan penyerap (kromatografi cair-padat). Hampir segala macam serbuk dapat digunakan sebagai penyerap pada KLT seperti penyerap yang paling umum dipakai yaitu silika gel (asam silikat), alumina (aluminium oksida), kiselgur (tanah diatome) dan selulosa. Sedangkan fase gerak dapat berupa hampir segala macam pelarut organik atau bisa juga campuran pelarut organik-anorganik (Gritter, 1991).

Kromatografi lapis tipis dalam pelaksanaanya lebih mudah dan lebih murah dibandingkan dengan kromatografi kolom, peralatan yang digunakan lebih sederhana. Beberapa keuntungan lain dari KLT adalah (Rohman, 2007):

1. Kromatografi lapis tipis banyak digunakan dengan tujuan analisis.
2. Identifikasi pemisahan komponen dapat dilakukan dengan pereaksi warna, fluoresensi, atau dengan radiasi menggunakan sinar ultraviolet.
3. Dapat dilakukan elusi secara mekanik (*ascending*), menurun (*descending*), atau dengan cara elusi 2 dimensi.
4. Ketepatan penentuan kadar akan lebih baik karena komponen yang akan ditentukan merupakan bercak yang tidak bergerak.

Lapisan tipis seperti pada plat silika gel GF₂₅₄ yang digunakan dalam penelitian ini mengandung indikator fluoresensi yang ditambahkan untuk membantu penampakan bercak tanpa warna pada lapisan yang telah dikembangkan. Indikator fluoresensi adalah senyawa yang memancarkan sinar, seperti dengan lampu UV. Jika senyawa pada bercak yang akan ditampakan mengandung ikatan rangkap terkonjugasi atau cincin aromatik berbagai jenis, sinar UV yang mengeksitasi tidak dapat mencapai indikator fluoresensi dan tidak ada cahaya yang dipancarkan. Hasilnya ialah bercak gelap dengan latar belakang yang bersinar. Cara ini sangat peka dan tidak merusak senyawa yang ditampakan (Gritter *et al*, 1991).

Fase gerak merupakan medium angkut yang terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Ia bergerak di dalam fase diam, yaitu suatu lapisan berpori karena ada gaya kapiler. Digunakan pelarut bertingkat mutu analitik, sistem pelarut multikomponen ini harus berupa suatu campuran sesederhana mungkin yang

terdiri atas maksimal tiga komponen. Pada kromatografi jerat, pelarut dapat dikelompokkan dalam deret eluotropik berdasarkan efek elusinya seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2.2 berikut:

Tabel 2.1 Deret eluotropik berdasarkan efek elusinya

N O	Pelarut pengembang	Td °C/750 torr	Tetapan dielektrik ε pada 20 °C	Viskositas C _p pada 20 °C
1	n-Heksana	68,7	1,890	0,326
2	Heptana	98,4	1,924	0,409
3	Sikloheksana	81,4	2,023	1,02
4	Karbontetraklorida	76,8	2,238	0,969
5	Benzena	80,1	2,284	0,652
6	Kloroform	61,3	4,806	0,580
7	Eter (dietil eter)	34,6	4,34	0,233
8	Etil asetat	77,1	6,02 ⁺	0,455
9	Piridina	115,1	12,3 ⁺	0,974
10	Aseton	56,5	20,7 ⁺	0,316 ⁺
11	Etanol	78,5	24,30 ⁺	1,2
12	Metanol	64,6	33,62	0,597
13	Air	100,0	80,37	1,005

*Untuk pelarut pengembang tambahan dan berbagai sifatnya, lihat *Biochemistry Handbook* (Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer Verlag, 1964) dan *Handbook of Chemistry and Physics* (40th ed., Cleveland Rubber Co., 1959).

+ Pada 25 °C.

Sumber (Stahl, 1985)

Efek elusidasi akan naik dengan naiknya tingkat kepolaran pelarut. Misalnya, n-heksana nonpolar memiliki efek elusidasi lemah, kloroform cukup kuat dan metanol yang polar memiliki efek elusidasi yang kuat. Tetapan dielektrik memberikan informasi tentang tingkat kepolaran suatu senyawa. Laju rambat tergantung pada viskositas pelarut dan tentu saja kapda stuktur lapisan (Stahl, 1985).

Bercak pemisahan pada plat KLT umumnya merupakan bercak yang tidak bewarna. Untuk menentukannya dapat dilakukan secara kimia, fisika, maupun biologi. Cara kimia yang biasa digunakan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas.

Mengamati lempeng dibawah lampu ultraviolet yang dipasang pada panjang gelombang emisi 254 nm atau 366 nm untuk menampakkan solut sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluoresensi terang pada dasar yang berfluoresensi berfluoresensi seragam (Rohman, 2007).

Penggunaan KLT ini adalah untuk menentukan banyaknya komponen dalam campuran, identifikasi senyawa, memantau berjalannya suatu reaksi, dan menentukan efektifitas pemurnian. Analisis secara kualitatif KLT digunakan untuk uji identifikasi senyawa baku. Parameter yang digunakan untuk uji identifikasi adalah nilai R_f (Rohman, 2007).

Identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah dari lapisan tipis menggunakan harga R_f . Harga R_f didefinisikan sebagai berikut (Sastrohamidjojo, 2007):

$$\text{Harga } R_f = \frac{\text{Jarak yang digerakkan senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}} \dots (2.2)$$

Harga-harga R_f untuk senyawa-senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga-harga standart. Harga-harga R_f yang diperoleh hanya berlaku untuk campuran tertentu dari pelarut dan penyerap yang digunakan (Sastrohamidjojo, 2007).

Masroh (2010) menyatakan bahwa hasil pemonitoran dengan metode KLT pada isolat daun pecut kuda memperlihatkan pemisahan noda yang baik menggunakan fase gerak n-heksana : etil asetat (7 : 3) dengan lampu UV 366 menunjukkan R_f antara 0,27 - 0,82 dengan 6 noda. Isolat diduga termasuk golongan steroid karena hasil uji dengan pereaksi *Lieberman Burchard* berwarna hijau kebiruan.

Gunawan, dkk (2008) menyatakan bahwa identifikasi golongan steroid menggunakan campuran eluen kloroform : metanol (3 : 7) pada ekstrak herbal meniran dengan menghasilkan 1 noda berwarna ungu muda dengan nilai Rf 0,58. (Halimah 2010) menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (7 : 3) pada ekstrak kloroform tanaman anting-anting menghasilkan 4 noda berwarna hijau terang, hijau terang, hijau kekuningan, dan hijau kecoklatan yang setelah disemprot reagen Liebermann-Burchard mendapatkan nilai Rf 0,57; 0,76; 0,94; dan 0,96.

Sriwahyuni (2010) menyatakan bahwa identifikasi golongan steroid dari ekstrak petroleum eter tanaman anting-anting menggunakan eluen sikloheksana : etil asetat (1 : 1) menunjukkan 7 noda di bawah sinar UV 366 nm. Noda yang menunjukkan adanya steroid adalah noda ke- 3 dan 7 berwarna oranye kecoklatan dengan nilai Rf 0,47 dan 0,84.

Penelitian Hayati (2012) menyatakan bahwa identifikasi senyawa steroid pada tanaman anting-antig dapat menggunakan KLT dengan eluen heksana : etil asetat (7 : 3) dan disemprot dengan pereaksi *Lieberman-Burchard* menunjukkan terbentuknya noda bewarna hijau, biru ungu sampai coklat. Pada sinar UV 366 nm ekstrak etil asetat anting-anting terdapat 9 noda dengan nilai Rf berturut-turut adalah 0,66; 0,11; 0,38; 0,47; 0,56; 0,68; 0,77; 0,8; dan 0,83 dengan warna noda berturut-turut hijau kebiruan, hijau kebiruan, merah muda, hijau, merah muda, ungu tengah biru kehijauan, orange, hijau kebiruan, dan hijau kebiruan muda.

Penelitian Restasari (2002) menunjukkan bahwa identifikasi senyawa steroid pada ekstrak kloroform daun ketapang dapat dilakukan dengan menggunakan KLT dengan campuran fasa gerak n-heksana : etil asetat : kloroform (5 : 3 : 1) memiliki daya pisah terbaik.

2.9.1 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Dua Dimensi

Adanya variasi prosedur pengembangan KLT dilakukan untuk meningkatkan resolusi, sensitifitas, kecepatan, reproduktibilitas dan selektifitas. Beberapa pengembangan ini meliputi KLT 2 dimensi, pengembangan kontinyu dan pengembangan gradien (Gandjar, 2007).

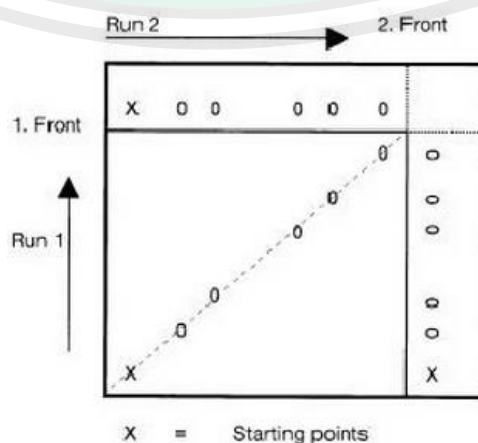
KLT dua arah biasa disebut juga dengan KLT dua dimensi. Merupakan salah satu metode yang dapat memungkinkan pemakaian fase diam yang lebih luas untuk memisahkan campuran yang mengandung banyak komponen. Selain itu, dua sistem pelarut yang sangat berbeda dapat dipakai secara berurutan pada campuran tertentu, jadi memungkinkan pemisahan campuran yang mengandung komponen yang kepolarannya sangat berbeda (Gandjar, 2007).

Multi eluen adalah penggunaan eluen atau fase gerak yang berbeda yang mungkin pemisahan analit dengan berdasarkan tingkat polaritas yang berbeda (Wall, 2005). Dalam multi eluen, setelah pengembangan tunggal menaik, kromatografi diangkat dari *chamber* dan dikeringkan, biasanya selama 5 – 10 menit. Kromatografi tersebut kemudian dielusi lagi dalam eluen baru dari pelarut yang sama dalam arah yang sama untuk jarak yang sama. Proses ini dapat diulangi berkali-kali, untuk meningkatkan resolusi komponen dengan nilai R_f di bawah 0,5. Beberapa pengembangan dilakukan dengan pelarut yang berbeda dalam arah yang sama, masing-masing yang menjalankan jarak yang sama atau berbeda, disebut elusi bertahap. Sebuah fase kurang polar dapat digunakan pertama, diikuti oleh fase yang lebih polar, atau sebaliknya. Pemindahan material nonpolar ke bagian atas lapisan dapat meninggalkan zat terlarut polar. Setelah kering, zat terlarut polar dipisahkan oleh pengembangan dengan eluen (Fried, 1999).

KLT dua arah atau dua dimensi ini bertujuan untuk meningkatkan resolusi sampel ketika komponen-komponen solut mempunyai karakteristik kimia yang hampir sama, karenanya nilai R_f juga hampir sama sebagaimana dalam asam-asam amino. Selain itu, dua sistem fase gerak yang sangat berbeda dapat digunakan secara berurutan sehingga memungkinkan untuk melakukan pemisahan analit yang mempunyai tingkat polaritas yang berbeda (Gandjar, 2007).

Secara singkat pengerjaan KLT dua dimensi ialah sebagai berikut: sampel ditotolkan pada lempeng lalu dikembangkan dengan satu sistem fase gerak sehingga campuran terpisah menurut jalur yang sejajar dengan salah satu sisi. Lempeng diangkat, dikeringkan dan diputar 90° , kemudian diletakkan dalam bejana kromatografi yang berisi fase gerak kedua, sehingga bercak yang terpisah pada pengembang pertama terletak dibagian bawah sepanjang lempeng, lalu dikromatografi lagi (Gandjar, 2007).

Keberhasilan pemisahan akan tergantung pada kemampuan untuk memodifikasi selektivitas eluen kedua dibandingkan dengan selektivitas dari eluen pertama (Wall, 2005). isolat dikatakan murni apabila noda yang dinampakkan adalah tunggal.



Gambar 2.11 Pemisahan menggunakan KLT dua dimensi

Keuntungan dari KLT dua dimensi adalah untuk mendapatkan resolusi yang baik dari hasil KLT dan memfokuskan zona pemisahan. KLT dua dimensi memiliki potensi pemisahan 150 - 300 komponen senyawa kimia (Gandjar, 2007).

Penelitian Sinulingga (2011) menyatakan bahwa pada fase gerak n-heksana : etil asetat (8 : 2) diperoleh 10 noda, 8 noda merupakan senyawa steroid/ triterpenoid. Sedangkan pada KLT dua dimensi dengan menggunakan fase gerak n-heksana : etil asetat (8 : 2) dan benzena : etil asetat (6 : 4), isolat memberikan satu bercak warna ungu dengan harga R_f 0,44.

2.10 Identifikasi Senyawa Steroid

2.10.1 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis merupakan salah satu jenis spektroskopi yang sering digunakan dalam analisis kimia dan biologi. Spektrofotometer ini didasarkan pada interaksi antara materi dengan radiasi elektromagnetik. Apabila seberkas radiasi (cahaya) dikenakan pada cuplikan (larutan sampel), maka sebagian dari cahaya diserap molekul tersebut. Setiap senyawa dalam sampel memiliki tingkatan energi yang spesifik. Cahaya mempunyai perbedaan energi antara tingkatan dasar dan tingkatan tereksitasi dan sebagian energi cahaya yang sesuai diserap dengan panjang gelombang ini. Elektron yang tereksitasikan melepaskan energi melalui proses radiasi panas dan akan kembali pada tingkatan dasar lagi. Perbedaan energi antara tingkat dasar dengan tingkat tereksitasi yang spesifik untuk tiap-tiap bahan/ senyawa menyebabkan frekuensi yang diserap juga berbeda-beda (Sastrohamidjojo, 2007).

Sinar ultraviolet mempunyai panjang gelombang antara 200 - 400 nm, sementara sinar tampak mempunyai panjang gelombang 400 - 750 (Gandjar, 2007). Cahaya yang dapat dilihat oleh manusia disebut cahaya tampak/visibel, yang ditunjukkan pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Tabel warna dan warna komplementer (Sastrohamidjojo, 2007)

Panjang Gelombang (nm)	Warna	Warna Komplementer
400 – 435	Violet (ungu)	Hijau kekuningan
450 – 480	Biru	Kuning
480 – 490	Biru kehijauan	Jingga
490 – 500	Hijau kebiruan	Merah
500 – 560	Hijau	Ungu kemerahan
560 – 580	Hijau kekuningan	Ungu
580 – 595	Jingga	Biru kehijauan
595 – 610	Merah	Hijau kebiruan
610 – 750	Ungu kemerahan	Hijau

Penelitian Sinulingga (2011) menyatakan bahwa pada isolat akar tanaman ekor naga memberikan panjang gelombang maksimum pada 224 nm yang menunjukkan adanya gugus kromofor (Sastrohamidjojo, 2007).

2.10.2 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan Spektrofotometer FTIR

Spektroskopi inframerah adalah sebuah metode analisis instrumentasi pada senyawa kimia yang menggunakan radiasi sinar infra merah. Spektrofotometri inframerah digunakan untuk mendeteksi gugus fungsi, mengidentifikasi senyawa dan menganalisa campuran (Underwood, 1986).

Penerapan spektrofotometer inframerah sangat luas, biasanya untuk analisis kualitatif. Sinar inframerah dilewatkan melalui suatu cuplikan senyawa organik, sehingga sejumlah frekuensi diserap sedang frekuensi yang lain diteruskan atau ditransmisikan tanpa diserap. Kegunaan utama dari

spektrofotometer IR yaitu untuk mengidentifikasi keberadaan suatu gugus fungsi dalam suatu senyawa organik berdasarkan spektrum yang khas pada daerah inframerah.

Radiasi inframerah menyebabkan terjadinya vibrasi dari gugus fungsi suatu molekul. Vibrasi terjadi pada panjang gelombang 2,5 - 15 μm (4000 cm^{-1} – 650 cm^{-1}) yang merupakan panjang gelombang umum dalam alat spektrofotometer inframerah. Ikatan-ikatan yang berbeda (C-C, C=C, C $\equiv$ C, C-O, C=O, O-H, N-H, dst.) mempunyai frekuensi vibrasi yang berbeda dan kita dapat mendeteksi adanya ikatan-ikatan tersebut dalam molekul organik menyebabkan senyawa-senyawa organik dapat diidentifikasi melalui frekuensi yang karakteristik sebagai pita serapan dalam spektrum inframerah (Sastrohamidjojo, 2007).

Tabel 2.3 Tabel frekuensi inframerah (Underwood,1986)

No		Gugus	Frekuensi (cm^{-1})	Panjang Gelombang (μm)
1.	OH	Alkohol	3.580-3.650	2,74-2,79
		Berikatan H	3.210-3.550	2,82-3,12
		Asam	2.500-2.700	3,70-4,00
2.	NH	Amina	3300-3700	2,70-3,03
3.	CH	Alkana	2.850-2.960	3,37-3,50
		Alkena	3.010-3.095	3,23-3,32
		Alkuna	3.300	3,03
		Aromatik	~ 3.030	$\sim 3,30$
4.	C $\equiv$ C	Alkuna	2.140-2.260	4,42-4,76
5.	C=C	Alkena	1.620-1.680	5,95-5,81
		Aromatik	~ 1.600	$\sim 6,25$
6.	C=O	Aldehida	1.720-1.740	5,75-5,81
		Keton	1.675-1.725	5,79-5,97
		Asam	1.700-1.725	5,79-5,87
		Ester	1.720-1.750	5,71-5,86
7.	C $\equiv$ N	Nitril	2.000-2.300	4,35-5,00
8.	NO ₂	Nitro	1.500-1.650	6,06-6,67

Penelitian Sinulingga (2011) menyatakan bahwa terdapat serapan kuat pada bilangan gelombang $1712,79\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus C=O, serapan

kuat pada bilangan gelombang $1458,18\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus C=C aromatik, bilangan gelombang $1242,16\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus C-O, bilangan gelombang $2924,06\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus C-H alifatis, bilangan gelombang $3425,58\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya OH, dan bilangan gelombang $1373,32\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus C-H metil. Data yang diperoleh dari spektrofotometer FTIR diduga terdapat senyawa steroid/triterpenoid pada akar tanaman ekor naga.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dengan judul “Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak n-Heksana dan Identifikasi Senyawa Steroid Akar Rumpun Bambu (*Lophatherum gracile* Brongn)” dilaksanakan pada bulan April sampai bulan Juli 2015 dan bertempat di Laboratorium Bioteknologi, Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Kimia Analitik Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan diantaranya neraca analitik, kaca arloji, spatula, erlenmeyer, *aluminium foil*, *shaker*, gelas ukur, *beaker glass*, pipet ukur, pipet volume, bola hisap, kertas saring, penyaring *buchner*, *rotary evaporator*, botol vial, tabung reaksi, rak tabung reaksi, penjepit kayu, vortex, plat silika gel GF₂₅₄, bejana pengembang, lampu UV, spektronik 20⁺, spektrofotometer UV-Vis dan spektrofotometer FTIR.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan diantaranya akar rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn), n-heksana, etanol, DPPH, vitamin C, asam asetat anhidrat, H₂SO₄ pekat, kloroform, reagen *Liebermann-Burchard*, metanol, etil asetat, sikloheksana, benzena dan pelet KBr.

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Preparasi sampel
2. Ekstraksi maserasi dengan pelarut n-heksana
3. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH
4. Uji fitokimia senyawa steroid menggunakan reagen pereaksi
5. Pemisahan senyawa steroid dengan KLT analitik, KLT preparatif dan KLT dua dimensi
6. Identifikasi senyawa steroid dengan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR
7. Analisis data

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Preparasi Sampel

Sampel tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* B.) diambil bagian akarnya, kemudian dicuci bersih dan dikeringkan dengan angin-angin. Selanjutnya sampel dihaluskan sampai berbentuk serbuk dengan ukuran 90 mesh. Selanjutnya hasil serbuk akar rumput bambu yang diperoleh ini digunakan sebagai sampel proses ekstraksi senyawa steroid dengan metode maserasi.

3.4.2 Ekstraksi Maserasi dengan Pelarut n-Heksana

Ekstraksi dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi atau perendaman dengan pelarut n-heksana (Zahro, 2011). Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan karena dimungkinkan bahwa kandungan senyawa pada tanaman sudah cukup banyak yang terekstrak pada masing-masing tahapnya. Serbuk akar tanaman rumput bambu ditimbang sebanyak 60 gr dan diekstraksi secara maserasi

menggunakan 400 mL pelarut n-heksana selama 24 jam dan perendaman dibantu *shaker* selama 3 jam dengan kecepatan 150 rpm, kemudian disaring dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut dan perlakuan yang sama. Selanjutnya filtrat yang diperoleh digabung menjadi satu.

Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak pekat n-heksana. Ekstrak pekat n-heksana yang dihasilkan ditimbang lalu dihitung rendemennya dengan Persamaan 3.1.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.1)$$

Selanjutnya ekstrak yang diperoleh dilakukan uji aktivitas antioksidan, uji fitokimia senyawa steroid menggunakan reagen pereaksi, pemisahan senyawa steroid dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) analitik dan preparatif.

3.4.3 Uji Aktivitas Antioksidan menggunakan Metode DPPH

3.4.3.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1,5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah etanol 4,5 mL dan didiamkan selama ± 10 menit. Kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan diamati λ_{maks} larutan untuk digunakan pada tahap selanjutnya (Rahayu, dkk., 2010).

3.4.3.2 Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan

Larutan ekstrak 100 ppm sebanyak 25 mL dibuat, kemudian diambil sebanyak 4,5 mL. larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1,5 mL ditambahkan, lalu diinkubasi pada suhu 37°C. Larutan yang diperoleh dipipet ke dalam kuvet,

kemudian dicari waktu kestabilan pada rentangan waktu 5 - 120 menit dengan interval 5 menit. Sampel diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} yang telah diketahui pada tahap sebelumnya (Rahayu, dkk., 2010).

3.4.3.3 Pengukuran Potensi Antioksidan pada Sampel

- a) Absorbansi kontrol: 1,5 mL larutan DPPH 0,2 mM dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan pelarut etanol sebanyak 4,5 mL, kemudian ditutup tabung reaksi dengan tisu agar tidak terkontaminasi dengan udara luar, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama waktu kestabilan yang telah didapatkan pada tahap sebelumnya, setelah itu diukur absorbansinya.
- b) Sampel dilarutkan dalam n-heksana dengan konsentrasi 10, 25, 50, 100, 200, 400 dan 800 ppm. Tabung reaksi disiapkan untuk masing-masing konsentrasi, kemudian tiap-tiap tabung reaksi diisi dengan 4,5 mL ekstrak dan ditambahkan DPPH sebanyak 1,5 mL (perbandingan larutan DPPH-ekstrak yang dilarutkan dengan konsentrasi tertentu 1:3). Perlakuan tersebut diulangi sebanyak tiga kali. Setelah itu diinkubasi dengan suhu 37 °C pada waktu kestabilan yang didapatkan pada tahap sebelumnya, kemudian diukur absorbansinya pada λ_{maks} . Data absorbansi yang diperoleh dari tiap konsentrasi masing-masing ekstrak dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya. Nilai tersebut diperoleh dengan persamaan 3.2 (Arindah, 2010).

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% \dots (3.2)$$

- c) Pembanding Vitamin C: diperlakukan seperti sampel akan tetapi sampel diganti dengan larutan vitamin C.

3.4.4 Uji Fitokimia Senyawa Steroid menggunakan Reagen Pereaksi

Ekstrak akar rumput bambu diambil 1 mg, dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform dan ditambah dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Campuran ini selanjutnya ditambah dengan 1 - 2 mL H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh terbentuk warna hijau kebiruan maka ekstrak tersebut menunjukkan adanya steroid (Auterhoff, 1987).

3.4.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

3.4.5.1 KLT Analitik

Pemisahan senyawa steroid dengan KLT analitik menggunakan Metode modifikasi Sriwahyuni (2010). Identifikasi dengan KLT digunakan plat silika gel GF₂₅₄ yang diaktivasi terlebih dahulu di dalam oven pada suhu 100 °C selama 30 menit untuk menghilangkan air yang terdapat pada plat. Selanjutnya masing-masing plat diberi ukuran 1 x 10 cm.

Ekstrak akar rumput bambu diperoleh dengan melarutkan ekstrak kasar akar sebanyak 10 mg akar rumput bambu dengan 1 mL pelarut n-heksana. Ekstrak akar rumput bambu ini kemudian ditotolkan pada jarak ± 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler dan dalam 1 plat KLT diberi 1 totolan, dan dalam 1 tempat totolan diberikan 3 – 5 kali penotolan. Plat yang sudah berisi totolan tersebut, kemudian dikeringkan dan dielusi dengan masing-masing fase gerak (eluen). Eluen untuk pengembangan ini dilakukan penjenuhan terlebih dahulu dalam suatu bejana tertutup selama 20 - 30 menit. Penjenuhan ini dilakukan untuk menyamakan tekanan uap pada seluruh bagian bejana. Setelah gerakan fase gerak sampai pada garis batas, elusi dihentikan. Noda-noda pada permukaan plat

diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, kemudian diamati pada masing-masing hasil nodanya.

Pengembang dan reagen penguji pada penentuan senyawa steroid digunakan eluen campuran kloroform : metanol (3 : 7) dengan disemprot reagen *Liebermann-Burchard* (Gunawan dkk, 2008), campuran fasa gerak n-heksana : etil asetat : kloroform (5 : 3 : 1) dengan disemprot reagen *Liebermann-Burchard* (Restasari, 2002), eluen heksana : etil asetat (7 : 3) dengan disemprot dengan pereaksi *Lieberman-Burchard* (Hayati, 2012), eluen sikloheksana : etil asetat (1 : 1) dengan disemprot reagen *Liebermann-Burchard* (Sriwahyuni, 2010) dan campuran eluen n-heksana : etil asetat (8 : 2) dengan disemprot reagen *Liebermann-Burchard* (Sinulingga, 2011).

3.4.5.2 KLT Preparatif

Pemisahan dengan KLT preparatif digunakan plat silika gel GF₂₅₄ dengan ukuran 10 x 20 cm. Ekstrak pekat hasil ekstraksi ditotolkan sepanjang plat pada jarak 1 cm dari garis bawah dan 1 cm dari garis tepi. Selanjutnya dielusi dengan menggunakan eluen yang memberikan pemisahan terbaik pada KLT analitik. Noda-noda pada permukaan plat diperiksa dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm, kemudian diamati pada masing-masing hasil nodanya.

Noda yang diduga merupakan senyawa steroid dikerok kemudian dilarutkan dalam pelarut n-heksana 5 mL, selanjutnya disentrifuge untuk mengendapkan silikanya.

3.4.5.3 Kromatografi Dua Dimensi

Isolat yang diperoleh dari hasil KLT preparatif yang diduga senyawa steroid dipisahkan dengan KLT dua dimensi. Isolat ditotolkan pada plat silika gel GF₂₅₄ ukuran 10 × 10 lalu dielusi menggunakan fase gerak yang memberikan pemisahan terbaik pada KLT analitik hingga mencapai batas pengembang, kemudian plat dikeluarkan dari dalam chamber dan dikeringkan. Setelah plat kering dielusi kembali dengan arah yang berbeda 90° memakai fase gerak benzena : etil asetat (6 : 4), kemudian disemprot dengan *Liebermann-Burchard* dan dipanaskan pada suhu 110 °C selama 10 menit lalu diamati warna yang terbentuk (Sinulingga, 2011).

3.4.6 Identifikasi Senyawa Steroid

3.4.6.1 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis

Isolat yang diperoleh dari hasil KLT preparatif yang diduga senyawa steroid dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Isolat dimasukkan dalam kuvet hingga sepertiganya. Kemudian dianalisis pada rentang panjang gelombang 200 - 800 nm. Pada blanko, pelarut n-heksana dimasukkan dalam kuvet setengahnya dan dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 200 - 800 nm, data disimpan. Spektra yang terbentuk diamati dan dicatat panjang gelombang serta absorbansi pada puncak yang terbentuk.

3.4.6.2 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer FTIR

Isolat hasil KLT preparatif yang diduga senyawa steroid kemudian diidentifikasi dengan spektrofotometer FTIR. 0,2 gr pelet KBr ditambahkan

dengan 1 tetes isolat yang diduga senyawa steroid, dikeringkan kemudian diidentifikasi dengan spektrofotometer FTIR merk IR Buck M500 Scientific dengan panjang gelombang $4000-400\text{ cm}^{-1}$ dengan spesifikasi kondisi alat sebagai berikut :

- Scan : 32 det/scan
- Resolusi : 4
- Tekanan : 80 Torr

3.4.7 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan menghitung persen (%) aktivitas antioksidan yang diperoleh dari data absorbansi ekstrak n-heksana dan pembanding asam askorbat pada konsentrasi 10, 25, 50, 100, 200, 400 dan 800 ppm. Uji senyawa steroid ekstrak akar rumput bambu (*L. gracile B.*) dilakukan secara kualitatif melalui uji reagen, pemisahan senyawa aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA), kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) serta kromatografi dua dimensi dan Identifikasi senyawa steroid dilakukan dengan UV-Vis dan FTIR.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian “Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak n-Heksana dan Identifikasi Senyawa Steroid Akar Rumpun Bambu (*Lophatherum gracile* Brongn)” dilakukan dalam tujuh tahap, meliputi preparasi sampel, ekstraksi maserasi dengan pelarut n-heksana, uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH, uji fitokimia senyawa steroid menggunakan reagen pereaksi, pemisahan senyawa steroid dengan KLT analitik, KLT preparatif dan KLT dua dimensi, identifikasi senyawa steroid dengan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR serta analisis data.

4.1 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah akar tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) segar semua ukuran yang di peroleh dari Kota Malang dan Kota Batu. Tahap pertama sampel dipisahkan dari bagian batang dan daun, kemudian dicuci untuk menghilangkan kotoran berupa tanah yang menempel, kemudian dikering anginkan sampai kering.

Pengeringan dimaksudkan untuk mengurangi kadar air, menghentikan aktivitas mikroba dan mencegah timbulnya jamur. Sampel yang telah kering dihaluskan di Materia Medica Kota Batu dan diperoleh serbuk sampel yang berwarna coklat dengan ukuran ≤ 90 mesh. Semakin kecil ukuran serbuk semakin besar luas permukaan sampel yang terkena pelarut, sehingga ekstraksi lebih efektif. Proses penyerbukan sampel bertujuan untuk memperkecil dan menyeragamkan ukuran sampel. Ukuran yang kecil dan seragam juga dapat

menyebabkan pemecahan dinding sel oleh pelarut semakin cepat dan serentak, sehingga dapat mengoptimalkan proses ekstraksi.

4.2 Ekstraksi Maserasi dengan Pelarut n-Heksana

Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa campuran dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Proses ekstraksi didasarkan pada kelarutan komponen tergantung pada derajat kepolarannya. Hukum *“like dissolved like”* menyatakan bahwa senyawa yang bersifat polar hanya dapat larut dalam pelarut polar dan semipolar, dan sebaliknya. Senyawa yang bersifat nonpolar hanya dapat larut dalam pelarut nonpolar dan semi polar (Khopkar, 2003).

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstraksi maserasi menggunakan pelarut n-heksana p.a. Maserasi dipilih karena prosesnya mudah, sederhana, dan tidak menggunakan suhu tinggi yang dimungkinkan dapat merusak senyawa aktif. Pemilihan pelarut yang tepat untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut (Lenny, 2006).

N-heksana memiliki kecenderungan bersifat nonpolar dengan tetapan dielektrik 1,89. Pemilihan n-heksana sebagai pelarut didasarkan pada tingkat kemudahan saat penguapan. Selain itu, n-heksana juga mempunyai kemampuan untuk menarik metabolit sekunder dalam sampel, sehingga digunakan untuk mengestrak senyawa steroid yang bersifat nonpolar dalam sampel.

Serbuk akar tanaman rumput bambu sebanyak 60 gr direndam selama 24 jam. Proses pengadukannya dibantu *shaker* selama 3 jam dengan kecepatan 150 rpm (*rotation per minutes*). Proses pengadukan ini bertujuan untuk meratakan

konsentrasi larutan di luar serbuk sampel (Braja, 2008). Penggunaan *shaker* bertujuan untuk mempercepat proses ekstraksi karena kecepatan pengadukannya dapat dilakukan secara konstan (Bernasconi, 1995). Selama proses perendaman sampel, terjadi proses pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam n-heksana dan senyawanya akan terekstrak sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan (Lenny, 2006). Filtrat dipisahkan dengan cara disaring menggunakan *corong butchner* untuk memisahkan filtrat dan residu. Residu yang diperoleh dilakukan penggantian pelarut pada setiap harinya sampai 3 kali proses ekstraksi. Perubahan warna filtrat yang terjadi yaitu mulai berwarna hijau kecoklatan hingga menjadi lebih pucat.

Filtrat yang diperoleh ditampung dan diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator vaccum* untuk mendapatkan ekstrak pekat dari akar tumbuhan rumput bambu. Prinsip utama alat ini terletak pada penurunan tekanan pada labu alas bulat dan pemutaran labu alas bulat sehingga pelarut dapat menguap lebih cepat di bawah titik didihnya. Proses penguapan pelarut diatur pada suhu 65 °C yaitu dibawah titik didih pelarut n-heksana.

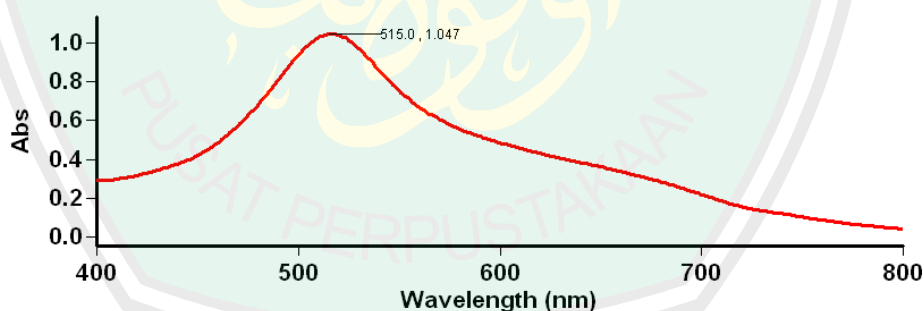
Penguapan dapat terjadi karena adanya pemanasan labu alas bulat pada temperatur tertentu di atas *waterbath* yang dipercepat oleh putaran dari labu alas bulat dibantu dengan penurunan tekanan. Uap pelarut dari sampel akan naik ke kondensor dan mengalami kondensasi menjadi molekul-molekul cairan pelarut murni yang ditampung di dalam labu alas bulat penampung pelarut (Vogel, 1978). Penguapan pelarut dihentikan setelah diperoleh ekstrak pekat berwarna hijau dengan randemen sebesar 0,511 %.

Ekstrak pekat n-heksana yang diperoleh digunakan untuk pengujian selanjutnya. Uji yang dilakukan adalah uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH, uji fitokimia senyawa steroid, pemisahan senyawa steroid dengan KLT analitik dan KLT preparatif.

4.3 Uji Aktivitas Antioksidan menggunakan Metode DPPH

4.3.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk mengetahui λ yang memiliki serapan paling tinggi (Lailah, 2014). Radikal DPPH memiliki warna komplementer ungu dan memberikan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 515 - 520 nm (Prakash, 2001). Hasil penentuan panjang gelombang DPPH 0,2 mM diperoleh λ maks sebesar 515,0 nm. Hasil spektra UV-Vis larutan DPPH 0,2 mM ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Spektra UV-Vis larutan DPPH 0,2 mM

4.3.2 Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan

Penentuan waktu kestabilan dilakukan untuk mengetahui waktu dimana sampel sudah tidak bisa meredam atau tidak bisa bereaksi dengan DPPH lagi. Reaksi ini ditandai dengan tidak adanya lagi penurunan absorbansi (Lu, dkk.,

2000). Pengukuran waktu kestabilan dilakukan dengan menggunakan inkubasi dengan suhu 37 °C. Hasil penentuan waktu kestabilan ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Penentuan waktu kestabilan

Sampel	Waktu kestabilan (menit) Inkubasi 37 °C
Ekstrak n-heksana	70 – 95
Vitamin C	25 – 50

Pengujian antioksidan sangat baik jika diinkubasi pada suhu 37 °C karena suhu ini merupakan suhu optimum sehingga reaksi antara radikal DPPH dengan senyawa metabolit sekunder akan berlangsung lebih cepat dan optimal. Hal ini ditunjukkan dengan nilai absorbansi yang diperoleh stabil. Selain itu, senyawa radikal DPPH akan tereduksi menjadi DPPH-H yang ditandai dengan penurunan intensitas warna dari warna ungu menjadi jingga sampai kuning.

4.3.3 Pengukuran Potensi Antioksidan pada Sampel

Pengukuran potensi antioksidan dilakukan pada ekstrak n-heksana dan vitamin C sebagai pembandingan dengan variasi konsentrasi 10, 25, 50, 100, 200, 400 dan 800 ppm. Potensi antioksidan diukur dengan metode DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada serapan panjang gelombang 515,0 nm dengan waktu kestabilan yang telah didapatkan pada tahap sebelumnya.

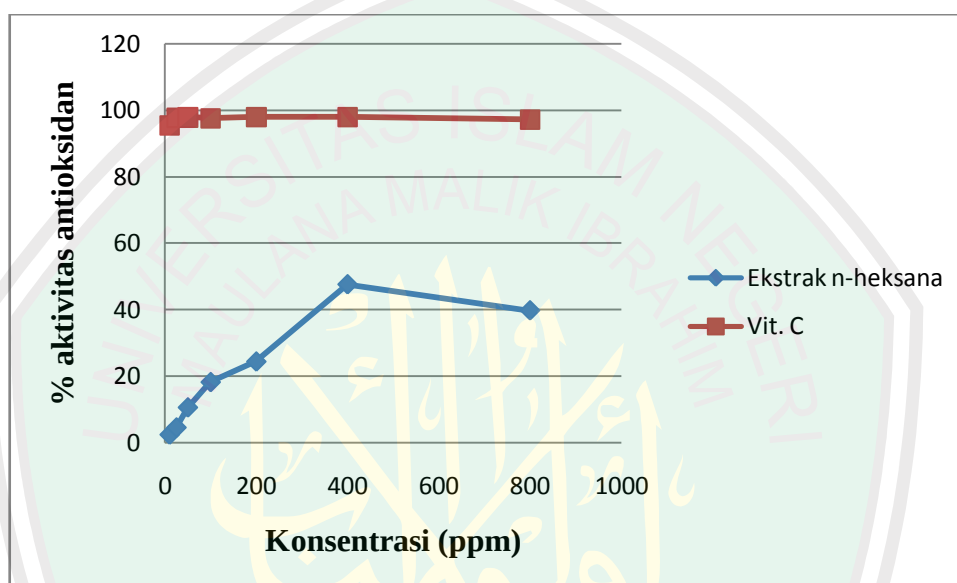
Aktivitas antioksidan diuji dengan metode penangkapan radikal bebas DPPH. DPPH berperan sebagai radikal bebas akan bereaksi dengan antioksidan membentuk DPPH-H dan radikal antioksidan. Sedangkan antioksidan akan mendonorkan atom hidrogennya kepada radikal DPPH untuk melengkapi kekurangan elektron dan membentuk radikal antioksidan yang lebih stabil.

Warna sampel akan berubah menjadi kuning ketika ditambahkan dengan DPPH. Hal ini terjadi karena berpasangannya elektron radikal bebas dengan senyawa antioksidan. Alasan lain juga disebabkan oleh atom N yang memiliki elektron tidak berpasangan menyebabkan terjadinya transisi $n \rightarrow \sigma^*$. Keadaan dasar pada transisi ini lebih bersifat polar dibandingkan keadaan tereksitasi. DPPH yang direaksikan dengan senyawa antioksidan akan membentuk ikatan hidrogen antara atom N dan atom H dari antioksidan. Ikatan hidrogen pada transisi $n \rightarrow \sigma^*$ akan mempunyai energi yang lebih besar sehingga menyebabkan pergeseran ke arah panjang gelombang yang lebih pendek (pergeseran hipsokromik). Pengurangan intensitas warna yang terjadi berhubungan dengan jumlah elektron DPPH yang menangkap atom hidrogen (Fasya, 2010).

Penggunaan kontrol 0,2 mM pada pengukuran potensi antioksidan sangat diperlukan karena larutan kontrol berguna sebagai pembanding dalam menentukan potensi antioksidan (Arindah, 2010). Selisih antara absorbansi DPPH yang telah direduksi sampel dengan absorbansi kontrol merupakan sisa radikal DPPH yang terbaca pada spektrofotometer UV-Vis. Persen (%) aktivitas antioksidan merupakan parameter yang menunjukkan kemampuan dari antioksidan dalam menghambat radikal bebas. Rahayu, dkk (2010) menyatakan bahwa semakin tinggi persen (%) aktivitas antioksidan menunjukkan semakin banyak atom hidrogen yang diberikan oleh senyawa aktif kepada radikal DPPH. Data persen (%) aktivitas antioksidan dari sampel dan pembanding diunjukkan pada Tabel dan Gambar 4.2.

Tabel 4.2 Persen (%) aktivitas antioksidan

Konsentrasi (ppm)	% Aktivitas Antioksidan	
	Ekstrak n-heksana	Vitamin C
10	2,48	95,45
25	4,61	97,85
50	10,63	97,86
100	18,23	97,62
200	24,40	97,89
400	47,58	97,95
800	39,76	97,18

**Gambar 4.2** Grafik persen (%) aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana dan pembanding vitamin C

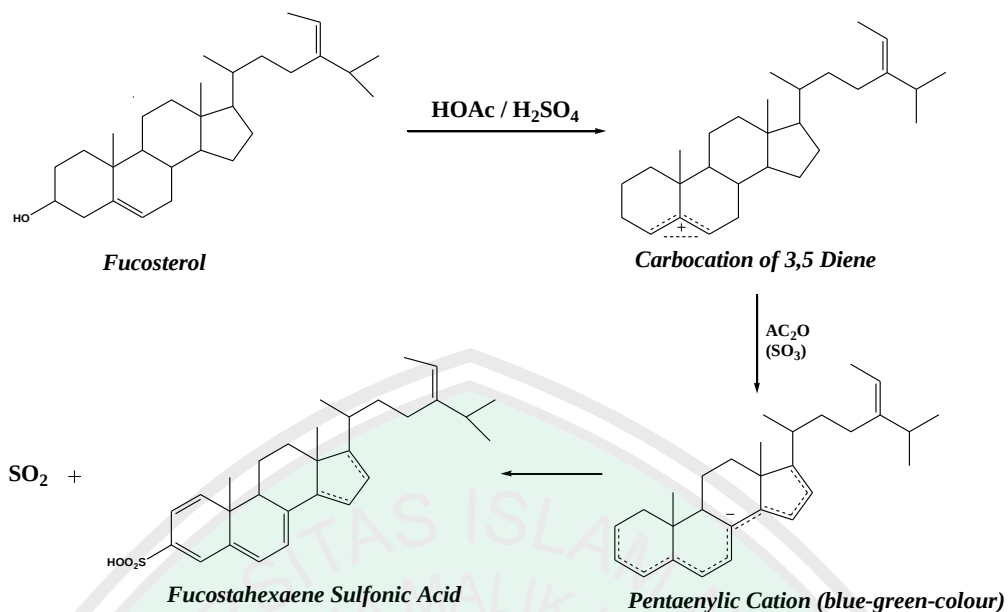
Berdasarkan Tabel dan Gambar 4.2 diketahui bahwa persen (%) aktivitas antioksidan tertinggi pada ekstrak n-heksana sebesar 47,58 % (400 ppm). Aktivitas antioksidan pada ekstrak n-heksana mengalami kenaikan seiring dengan bertambahnya konsentrasi yang menandakan ekstrak tersebut semakin besar kemampuan aktivitasnya dalam menangkal radikal bebas DPPH. Ekstrak n-heksana pun mengalami penurunan pada konsentrasi 800 ppm. Pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan sering lenyap bahkan menjadi senyawa prooksidan (Gordon,1990).

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana akar rumput bambu (*Lophaterum gracile* B.) perlu dibandingkan dengan antioksidan sintesis yaitu vitamin C. Perbandingan ini bertujuan untuk mengetahui seberapa kuat potensi antioksidan yang ada pada ekstrak n-heksana akar rumput bambu. Persen (%) aktivitas antioksidan vitamin C yaitu 97,95 %, sedangkan pada ekstrak n-heksana sebesar 47,58 %. Persen (%) aktivitas tersebut menunjukkan bahwa sampel mempunyai aktivitas antioksidan yang lemah, namun masih berpotensi sebagai antioksidan.

4.4 Uji Fitokimia Senyawa Steroid menggunakan Reagen Piereux

Uji fitokimia merupakan uji kualitatif kandungan senyawa aktif pada sampel. Uji fitokimia senyawa steroid dilakukan dengan penambahan kloroform, asam asetat anhidrat dan H_2SO_4 pada dinding tabung reaksi. Penambahan kloroform digunakan untuk melarutkan senyawa steroid pada sampel. Senyawa steroid akan mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat H_2SO_4 dan membentuk ion yang memberikan sejumlah reaksi warna. Perubahan warna ini disebabkan terjadinya reaksi oksidasi pada golongan steroid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi (senyawa pentaenilik) (Zamroni, 2011).

Hasil uji fitokimia menunjukan senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak n-heksana adalah steroid dan triterpenoid. Senyawa steroid ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan, sedangkan senyawa triterpenoid ditandai dengan cincin kecoklatan.



Gambar 4.3 Reaksi dugaan senyawa steroid (contoh senyawa fukosterol) dengan reagen *Lieberman-Burchard* (Burke, 1974)



Gambar 4.4 Hasil uji fitokimia steroid

4.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Analitik, Preparatif dan Dua Dimensi

4.5.1 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT Analitik

Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) digunakan untuk menentukan eluen terbaik dari beberapa eluen yang baik dalam pemisahan senyawa steroid. Plat yang digunakan pada KLTA berukuran 1 x 10 cm. Mula-mula plat diaktivasi terlebih dahulu dengan cara dioven pada suhu 100 °C selama 30 menit. Aktivasi plat bertujuan untuk menghilangkan air agar tidak mengganggu pada proses elusi (Sastrohamidjojo, 2007). Sampel ditotolkan pada jarak 1 cm dari batas bawah

plat. Ukuran bercak penotolan dibuat sekecil dan sesempit mungkin agar pemisahan optimal.

Pemisahan senyawa steroid dengan KLTA dilakukan menggunakan beberapa variasi eluen yaitu kloroform : metanol (3 : 7); n-heksana : etil asetat : kloroform (5: 3 : 1); n-heksana : etil asetat (7 : 3); sikloheksana : etil asetat (1 : 1) dan n-heksana : etil asetat (8 : 2). Campuran 2 pelarut organik lebih banyak dipilih karena daya elusi campuran kedua pelarut ini dapat mudah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal (Gandjar dan Rohman, 2007). Pemisahan yang baik ditandai dengan banyaknya noda yang dihasilkan, noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak antara noda satu dengan yang lainnya jelas (Harbone, 1987).

Noda yang dihasilkan dideteksi di bawah sinar UV dan disemprot dengan reagen *Lieberman-Burchard*. Reagen *Lieberman-Burchard* ini digunakan untuk menambah kepekaan deteksi dan menghasilkan perubahan warna yang ada kaitannya dengan struktur senyawa steroid (Markham, 1988). Noda dideteksi di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm dengan tujuan untuk menampakkan komponen senyawanya sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluorosensi terang pada dasar yang berfluorosensi seragam (Gritter, 1991). Pengamatan lampu UV dengan λ 254 nm tidak terdapat noda yang dapat diamati, hal tersebut disebabkan noda yang tampak pada lampu UV λ 254 nm merupakan golongan khas dari aromatik, α dan β karbonil tak jenuh dan juga sistem konjugasi (Kvangarsnes, 2009), sedangkan senyawa steroid bukan merupakan hidrokarbon aromatik dan juga bukan sistem yang terkonjugasi. Pada λ 366 nm terlihat beberapa pemisahan komponen senyawa aktif sebagai bercak yang berfluorosensi

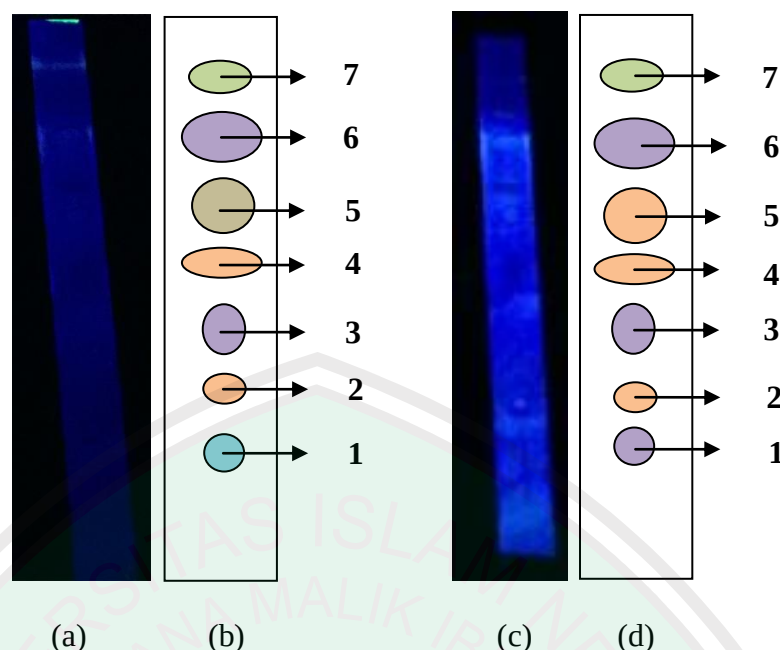
terang dengan warna spot berbeda di atas *background* gelap yang dapat diamati. Hal ini dikarenakan terdapat interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh ausokrom yang terdapat pada noda tersebut (Gandjar dan Rohman, 2007). Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa steroid berwarna hijau dibawah sinar UV 366 nm, hal ini sesuai dengan penelitian Hayati (2012), noda steroid pada plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ditunjukkan dengan warna hijau dibawah sinar UV 366 nm.

Hasil uji KLTA ekstrak n-heksana pada panjang gelombang 366 nm dengan reagen penyemprot *Lieberman Burchard* ditunjukkan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil uji KLTA ekstrak n-heksana dibawah sinar UV 366 dengan reagen penyemprot *Lieberman Burchard*

No	Eluen	Banyaknya noda	Warna	Nilai Rf	Dugaan senyawa
1	Kloroform : metanol (3 : 7)	2	Hijau Jingga	0,84 0,9	Steroid -
2	N-heksana : etil asetat : kloroform (5 : 3 : 1)	-	-	-	-
3	N-heksana : etil asetat (7 : 3)	-	-	-	-
4	Sikloheksana : etil asetat (1 : 1)	-	-	-	-
5	n-heksana : etil asetat (8 : 2)	7	Ungu	0,22	-
			Jingga	0,56	-
			Ungu	0,69	-
			Jingga	0,74	-
			Jingga	0,81	-
			Ungu	0,86	-
			Hijau	0,94	Steroid

Hasil pemisahan terbaik terdapat pada eluen n-heksana : etil asetat (8 : 2) yang ditunjukkan dengan jumlah noda yang dihasilkan paling banyak yaitu 7 noda, noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak antara satu noda dengan noda yang lainnya jelas. Hasil KLTA ditunjukkan pada Gambar 4.5 dan Tabel 4.4.



Gambar 4.5 Hasil KLTA eluen terbaik n-heksana : etil asetat (8 : 2)

- (a) Hasil pengamatan dibawah sinar UV pada λ 366 nm sebelum disemprot reagen LB
 (b) Ilustrasi hasil pengamatan dibawah sinar UV pada λ 366 nm sebelum disemprot reagen LB
 (c) Hasil pengamatan dibawah sinar UV pada λ 366 nm setelah disemprot reagen LB
 (d) Ilustrasi hasil pengamatan dibawah sinar UV pada λ 366 nm setelah disemprot reagen LB

Tabel 4.4 Hasil KLTA eluen terbaik n-heksana : etil asetat (8 : 2)

Nilai Rf	Warna sebelum disemprot reagen LB	Warna setelah disemprot reagen LB	Dugaan senyawa
0,22	Biru	Ungu	-
0,56	Jingga	Jingga	-
0,69	Ungu	Ungu	-
0,74	Jingga	Jingga	-
0,81	Coklat	Jingga	-
0,86	Ungu	Ungu	-
0,94	Hijau	Hijau	Steroid

Berdasarkan Gambar 4.5 dan Tabel 4.4 diketahui bahwa eluen n-heksana : etil asetat (8 : 2) dapat memisahkan senyawa steroid dalam ekstrak n-heksana. Sifat eluen yang digunakan pada pemisahan senyawa steroid ini bersifat nonpolar sedangkan fase diamnya bersifat polar. Senyawa dengan nilai Rf > 0,60 cenderung mempunyai sifat yang sama dengan fase geraknya (nonpolar),

sedangkan senyawa dengan R_f 0,31 - 0,59 memiliki sifat semi polar karena berada diantara fase diam dan fase geraknya dan senyawa dengan nilai $R_f < 0,30$ lebih tertahan pada fase diamnya sehingga bersifat lebih polar (Auwalayah, 2015). Pada proses elusi ini dihasilkan 7 noda dengan nilai R_f berkisar antara 0,22 – 0,94. Senyawa steroid diduga terdapat pada noda ketujuh dengan R_f 0,94 yang berifat nonpolar.

Senyawa yang dipisahkan akan terpisah berdasarkan distribusi senyawa tersebut terhadap fase diam atau fase geraknya yang ditunjukkan dengan nilai koefisien distribusi (D) yang merupakan perbandingan konsentrasi solut dalam fase diam (C_s) dan dalam fase gerak (C_m). $D = C_s / C_m$, sehingga ketika nilai koefisien distribusi besar maka noda akan lebih terdistribusi pada fase diam dan ketika koefisien distribusinya kecil menunjukkan noda tersebut lebih terdistribusi pada fase geraknya. Noda ketujuh memiliki nilai koefisien distribusi (D) kecil. Hal ini sesuai dengan persamaan koefisien distribusi (D) bahwa nilai D berbanding terbalik dengan konsentrasi senyawa pada fase gerak.

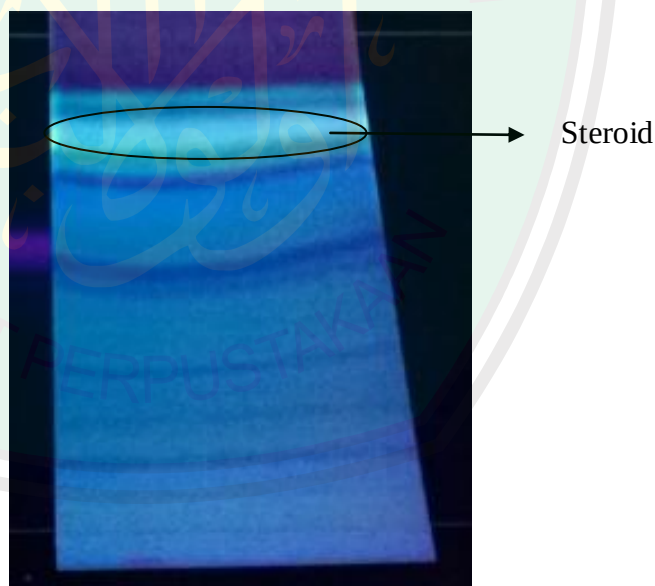
Berdasarkan Gambar 4.5 dan Tabel 4.4 senyawa steroid terdapat pada noda ketujuh dengan R_f 0,94. Hasil uji fitokimia ekstrak n-heksana mengandung senyawa steroid dan senyawa triterpenoid sehingga noda yang lainnya diduga merupakan senyawa triterpenoid.

4.5.2 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT Preparatif

Kromatografi lapis tipis preparatif merupakan suatu metode pemisahan senyawa dalam jumlah besar (Townshend, 1995). Teknik pemisahan dengan KLT preparatif hampir sama dengan KLT analitik hanya saja berbeda pada jumlah ekstrak yang ditotolkan pada plat dan ukuran plat KLT yang digunakan. Plat yang

digunakan pada KLT preparatif adalah plat KLT silika gel G₆₀ F₂₅₄ dengan ukuran yang lebih besar yaitu 10 x 20 cm. Ekstrak n-heksana ditotolkan sepanjang plat pada jarak 1 cm dari batas bawah. Ekstrak yang ditotolkan dielusi dengan menggunakan eluen terbaik hasil pemisahan pada KLT analitik yaitu n-heksana : etil asetat dengan perbandingan (8 : 2).

Sebanyak 30 mL eluen dijenuhkan dalam *chamber* KLTP selama $\pm$ 1 jam. Tepi bagian bawah yang telah ditotoli ekstrak dicelupkan dalam eluen kurang lebih 0,5 – 1 cm. Tinggi eluen dalam *chamber* tidak boleh mengenai plat yang telah ditotoli ekstrak (Gandjar dan Rohman, 2007). Proses elusi dihentikan ketika elusi sudah mencapai batas atas yakni 1 cm dari tepi plat. Hasil pemisahan dengan KLTP diperoleh 11 noda sebagaimana Gambar 4.6 dan Tabel 4.5.



Gambar 4.6 Hasil KLTP ekstrak n-heksana dengan eluen n-heksana : etil asetat (8 : 2)

Tabel 4.5 Hasil KLTP ekstrak n-heksana dengan eluen n-heksana : etil asetat (8 : 2)

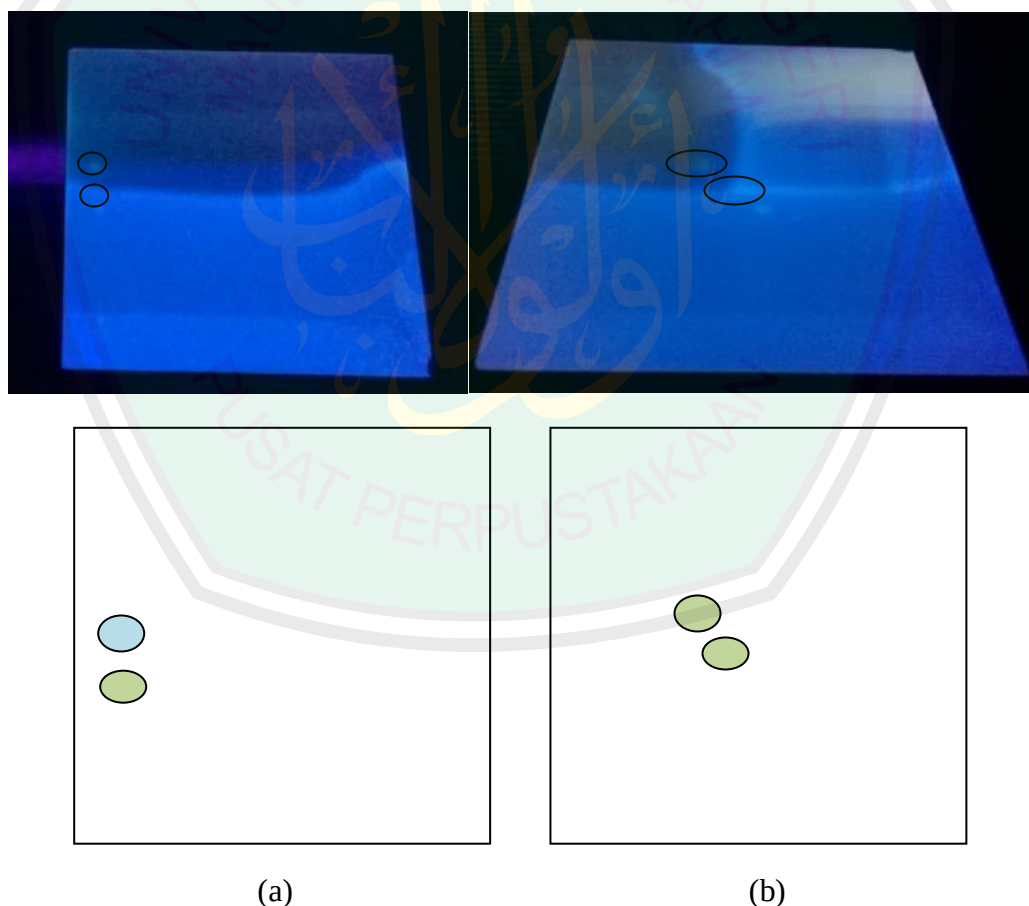
Noda	Warna dibawah sinar UV 366 nm	Dugaan senyawa
1	Ungu	-
2	Merah muda	-
3	Ungu	-
4	Ungu	-
5	Ungu	-
6	Merah	-
7	Coklat	-
8	Ungu	-
9	Merah muda	-
10	Ungu	-
11	Hijau	Steroid

Berdasarkan Tabel 4.5 senyawa steroid diduga terdapat pada noda kesebelas. Noda yang diduga senyawa steroid selanjutnya dikerok dan dilarutkan dalam pelarut n-heksana untuk memisahkan silika gel. Isolat yang diperoleh selanjutnya ditampung dalam gelas vial, kemudian dilanjutkan dengan pemisahan menggunakan KLT dua dimensi dan diidentifikasi menggunakan UV-Vis dan FTIR.

4.5.3 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT Dua Dimensi

Pemisahan senyawa steroid ketiga dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dua dimensi. Plat yang digunakan dalam KLT dua dimensi yaitu plat silika gel G₆₀ F₂₅₄ berukuran 10 x 10 cm. Isolat hasil KLTP ditotolkan pada plat berjarak 1 cm dari batas bawah. Sampel dielusi dengan fase gerak pertama sehingga senyawa terpisah pada satu jalur saja. Plat diangkat, dikeringkan dan diamati noda dengan sinar UV 366. Plat diputar 90 °C dan dielusi dengan fase gerak kedua, noda yang dihasilkan pada saat elusi pertama diletakkan dibagian bawah. Noda diamati kembali pada lampu UV 366.

Pada KLT dua dimensi digunakan 2 eluen yang berbeda kepolarannya. Dua eluen yang berbeda kepolaran tersebut digunakan secara berurutan sehingga dapat memisahkan analit yang mempunyai tingkat polaritas yang berbeda (Gandjar dan Rohman, 2007). Sinulingga (2011) telah melakukan penelitian KLT dua dimensi senyawa steroid/ triterpenoid pada akar tanaman ekor naga (*Rhaphidophora pinnata* Schoot) dengan eluen pertama yaitu n-heksana : etil asetat (8 : 2) dan eluen kedua yaitu benzena : etil asetat (6 : 4). Mengacu pada penelitian tersebut, maka penelitian ini juga digunakan eluen yang sama. Hasil KLT dua dimensi ditunjukkan pada Gambar 4.7 dan Tabel 4.6.



Gambar 4.7 Hasil KLT dua dimensi (a) Eluen n-heksana : etil asetat (8 : 2)
(b) Eluen benzena : etil asetat (6 : 4)

Tabel 4.6 Hasil KLT dua dimensi isolat steroid dengan eluen pertama yaitu n-heksana : etil asetat (8 : 2) dan eluen kedua yaitu benzena : etil asetat (6 : 4)

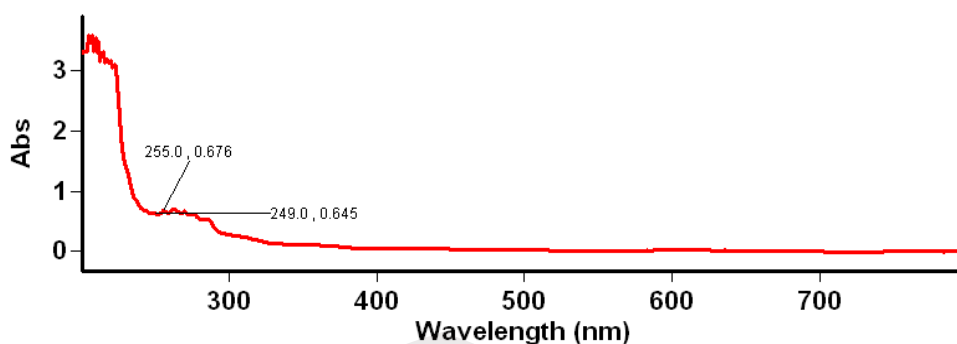
Eluen pertama			Eluen kedua		
Jumlah noda	Warna	Rf	Jumlah noda	Warna	Rf
2	Hijau	0,36	2	Hijau	0,33
	Biru	0,50		Hijau	0,52

Hasil pemisahan isolat steroid dengan KLT dua dimensi menunjukkan bahwa pada elusi pertama menghasilkan dua noda yang berwarna hijau dan biru dengan nilai Rf 0,36 dan 0,50. Elusi kedua juga menghasilkan dua noda berwarna hijau dengan Rf 0,33 dan 0,52. Spot berubah warna dari warna biru menjadi warna hijau setelah disemprot reagen *Lieberman-Burchard*. Hal tersebut menunjukkan bahwa Reagen *Lieberman-Burchard* berfungsi untuk menambah kepekaan deteksi dan menghasilkan perubahan warna yang ada kaitannya dengan struktur senyawa steroid (Markham, 1988).

4.6 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR

4.6.1 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis

Data yang diperoleh dari spektra UV-Vis tidak menunjukkan adanya serapan maksimum dari suatu cincin aromatik, dimana serapan pada cincin aromatik biasanya muncul pada λ 270 – 300 nm (Dian, 2011). Serapan maksimum pada λ 249 dan 255 nm menunjukkan adanya gugus kromofor yang khas untuk sistem ikatan rangkap dari cincin alifatik. Berdasarkan data UV-Vis, maka senyawa hasil isolasi tersebut berasal dari golongan non aromatik yaitu terpenoid atau steroid yang memiliki ikatan rangkap pada cincin alifatiknya. Hasil serapan UV-Vis yang dihasilkan dari isolat KLT preparatif eluen n-heksana : etil asetat (8 : 2) ditunjukkan pada gambar 4.8.

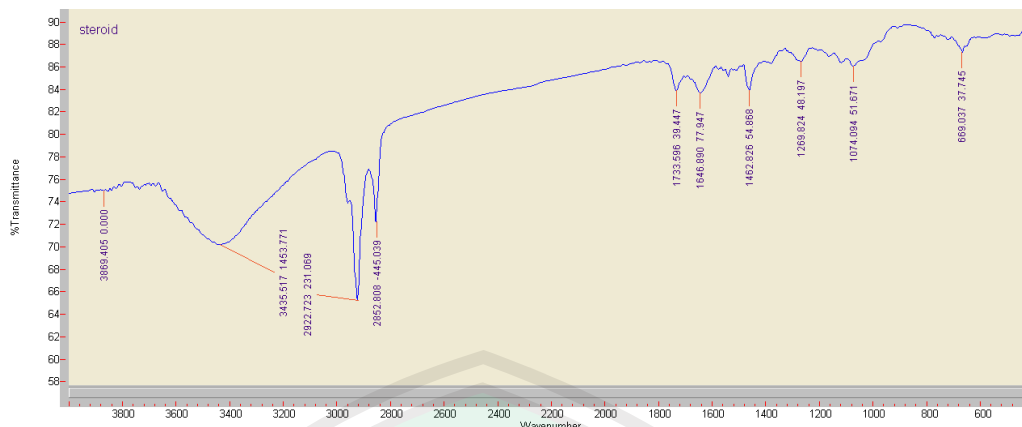


Gambar 4.8 Hasil serapan UV-Vis isolat KLTP eluen n-heksana : etil asetat (8 : 2)

Menurut Roman dan Gandjar (2007) menyatakan jenis transisi pada panjang gelombang 200 – 700 nm yang sesuai adalah transisi dari $n - \pi^*$ dan $\pi - \pi^*$. Adanya serapan maksimum pada panjang gelombang 249 nm dan 255 nm diduga diakibatkan oleh adanya transisi elektron dari $\pi \rightarrow \pi^*$ yang disebabkan oleh adanya suatu kromofor C=C.

4.6.2 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer FTIR

Prinsip kerja dari FTIR yaitu interaksi senyawa dengan radiasi elektromagnetik berdasarkan vibrasi atom terhadap molekul pada bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} . Pelet yang digunakan yaitu pelet KBr. KBr digunakan sebagai pelarut karena memiliki ikatan ionik serta tidak teramati pada FTIR. Hasil FTIR isolat steroid ditunjukkan dalam Gambar 4.9 dan interpretasinya disajikan pada Tabel 4.7.



Gambar 4.9 Hasil spektra FTIR

Tabel 4.7 Interpretasi hasil spektra FTIR

Bilangan gelombang (cm^{-1})	Range pustaka (Socrates, 1994)	Jenis vibrasi	Intensitas referensi
3435,517	3550-3230	Rentang O-H dari ikatan hidrogen intermolekuler	m-s
2922,723 dan 2852,808	2950-2850	Rentang $-\text{CH}$ alifatik	m
1733,596	1780-1730	Rentangan ekso siklik $\text{C}=\text{C}$	m
1646,890	1690-1620	Rentangan $\text{C}=\text{C}$	m
1462,826	1480-1440	Bengkokan $-\text{CH}_2$	w
1074,094	1125-1000	Rentang C-O alkohol sekunder	s-w
669,037	995 – 650	Bengkokan $=\text{C}-\text{H}$ siklik	w

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

Hasil spektra FTIR isolat 11 menunjukkan adanya rentang O-H dari ikatan hidrogen intermolekuler dengan intensitas sedang pada bilangan gelombang $3435,517 \text{ cm}^{-1}$. Adanya gugus OH ini didukung dengan munculnya serapan lemah pada bilangan gelombang $1074,094 \text{ cm}^{-1}$ dari rentangan C-O alkohol sekunder (Socrates, 1994). Keberadaan rentang $-\text{CH}$ alifatik ditunjukkan dengan adanya serapan pada bilangan gelombang $2922,723 \text{ cm}^{-1}$ dan $2852,808 \text{ cm}^{-1}$. Adanya rentangan $-\text{CH}$ Sp^3 alifatik ini, maka dimungkinkan adanya gugus metil (CH_3) dan metilena (CH_2) (Socrates, 1994). Dugaan ini diperkuat oleh adanya serapan

pada panjang gelombang $1462,826\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan adanya bengkokan $-\text{CH}_2$ dan serapan pada bilangan gelombang $1733,596\text{ cm}^{-1}$ dan $1646,890\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya rentang $\text{C}=\text{C}$. Adanya vibrasi $\text{C}-\text{H}$ tekuk pada spektra inframerah mengindikasikan adanya gugus dimetil yang lazim ditemukan pada senyawa terpenoid dan steroid (Astuti, dkk., 2014). Serapan ini diperkuat oleh adanya gugus tekukan $=\text{C}-\text{H}$ siklik pada panjang gelombang $669,037\text{ cm}^{-1}$ dengan intensitas lemah. Pita serapan ini dimungkinkan bahwa isolat merupakan senyawa siklik (senyawa steroid).

4.7 Pemanfaatan Rumput Bambu dalam Perspektif Islam

Allah SWT menciptakan berbagai jenis tumbuhan, mulai dari tumbuhan tingkat tinggi sampai tingkat rendah dan semua yang diciptakanNya memiliki banyak manfaat bagi kelangsungan hidup manusia. Sebagaimana yang telah dijelaskan pada ayat al Quran dalam surat Luqman (31); 10,

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۚ وَأَلْقَىٰ فِي الْأَرْضِ رَوْسًا أَنْ تَمِيدَ بِكُمْ ۖ وَبَثَّ فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ ۚ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿١٠﴾

“ Dia menciptakan langit dan bumi tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang, dan kami turunkan air hujan dari langit, lalu kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik ” (QS. Luqman (31); 10).

Dari ayat tersebut, Qarni (2007) menafsirkan bahwa Allah SWT menciptakan langit dan meninggikannya dari bumi tanpa tiang, seperti yang dilihat oleh manusia, lalu menciptakan gunung-gunung agar bumi seimbang tidak mudah terguncang. Allah SWT menurunkan air hujan dari awan yang rasanya tawar untuk menyuburkan tanah. Ash Shiddieqy (2000) menafsirkan bahwa dari

tanah yang subur itulah tumbuh beraneka tumbuhan yang memiliki banyak manfaat. Tanaman yang mudah menyesuaikan diri pada kondisi ini adalah rumput pakan ternak, salah satunya adalah rumput bambu.

Berbagai jenis tumbuhan yang diciptakan Allah SWT semuanya untuk kemaslahatan manusia. Sebagaimana Firman Allah SWT dalam surat Abasa (80); 27 - 32,

فَأَنْبَتْنَا فِيهَا حَبًّا ۖ وَعِنَبًا وَقَضْبًا ۖ وَزَيْتُونًا وَنَخْلًا ۖ وَحَدَاقٍ غُلْبًا ۖ وَفِكَهَةً ۖ وَأَبًّا ۖ مَتَّعَا لَكُمْ وَلَئِنْ نَعِمَ كَرَّمَ

“Lalu Kami tumbuhkan biji-bijian di bumi itu (27), Anggur dan sayur-sayuran (28), zaitun dan kurma (29), kebun-kebun (yang) lebat (30), dan buah-buahan serta rumput-rumputan (31), (semua itu) untuk kesenanganmu dan untuk hewan-hewan ternakmu(32)” (Qs. Abasa (80); 27 - 32).

Jazairi (2009) menafsirkan kalimat *Wa Faakihatan Wa Abban* sebagai segala bentuk buah-buahan dan rumput-rumputan yang dimakan binatang, sementara Muhammad (2010) menafsirkan rumput tersebut sebagai rumput yang dimakan binatang ternak dan Qarni (2007) menafsirkan *Abbaa* sebagai rumput pakan ternak yang indah warnanya dan menyenangkan bagi setiap orang yang melihatnya, seperti halnya rumput hijau yang segar. Rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) yang menjadi objek kajian dalam penelitian ini merupakan tumbuhan hijau segar, perdu, dan merupakan rumput pakan ternak.

Ayat *Mataa'al lakum wa li an'aamikum* menurut ash Shiddieqy (2000) dalam *Tafsir Al Quranul Majid An-Nuur* adalah kebesaran kekuasaan Allah SWT yang telah menumbuhkan rumput-rumputan supaya manusia dapat menikmati keindahan dan manfaatnya. Dari tafsir tersebut menjelaskan bahwa manusia diperintahkan Allah SWT untuk memanfaatkan rumput-rumputan, salah satunya

sebagai bahan obat alami. Maka dalam penelitian ini mencoba untuk mengetahui dan mengkaji kandungan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun rumput bambu (*L. gracile* B.), untuk mencari potensi pemanfaatannya sebagai sumber antioksidan alami.

Firman Allah SWT dalam Qs. al Furqon (25); 2,

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

“Yang kepunyaanNya-lah kerajaan langit dan bumi, dan Dia tidak mempunyai anak, dan tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan (Nya), dan Dia telah menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya” (Qs. al Furqon (25); 2).

Berdasarkan ayat tersebut dapat diketahui bahwa segala sesuatu yang diciptakan Allah memiliki kapasitas/ ukuran masing-masing begitu pula dengan aktivitas yang dihasilnya dari ekstrak daun rumput bambu. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana akar rumput bambu memiliki % aktivitas antioksidan dengan nilai 47,58 % pada konsentrasi 400 ppm.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana akar rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) terhadap DPPH sebesar 47,58 % pada konsentrasi 400 ppm.
2. Eluen terbaik untuk pemisahan senyawa steroid dalam ekstrak n-heksana akar tanaman rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) dengan menggunakan KLT yaitu n-heksana : etil asetat (8 : 2), identifikasi menggunakan UV-Vis dan FTIR isolat 11 yang diduga senyawa steroid memiliki panjang gelombang maksimum 249 dan 255 nm, dengan serapan-serapan spesifik senyawa steroid seperti regangan asimetri OH pada bilangan gelombang 3435 cm^{-1} dan rentang --CH alifatik pada 2922 cm^{-1} dan 2852 cm^{-1} .

1.2 Saran

1. Perlu dilakukan ekstraksi dengan menggunakan pelarut dan metode lain misalnya menggunakan metode ekstraksi sokhlet.
2. Perlu dilakukan pemisahan senyawa aktif dengan metode kromatografi kolom untuk mendapatkan fraksi dan isolat yang spesifik dan identifikasi dengan menggunakan C dan H-NMR dan GC-MS.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Maraghi, A. M. 1992. *Terjemah Tafsir Al-Maraghi*. Semarang: CV. Toha Putra Semarang.
- Arindah, D. 2010. *Fraksinasi dan Identifikasi Golongan Senyawa Antioksidan pada Daging Buah Pepino (Solonum Muricatum aiton) yang Berpotensi Sebagai Antioksidan*. Skripsi Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ash-Shiddieqy, M. Hasbi dan Teungku. 2000. *Tafsir Al Quranul Majid An-Nuur*. Semarang: Pustaka Rizki Putra.
- Astuti, M. D., Maulana, A., dan Kuntowati, E. M. 2014. *Isolasi Steroid Fraksi n-Heksana Batang Bajakah Tampala (Spatholobus littoralis Hassk.)*. *Prosiding Seminar Nasional*, ISBN: 978-602-0951-00-3.
- Auwaliyah, F. 2015. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Rumput Bambu (Lophatherum gracile Brongn) dengan Metode DPPH Dan Identifikasi Senyawa Aktifnya*. Skripsi Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Bernasconi, G. 1995. *Teknologi Kimia 2*. Penerjemah: Handojo L. Jakarta: PT. Prandya Paramitha.
- Burke, R.W. Diamondstone, B.A. Velapoidi. R.A. Menis O. 1974. *Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reaction for Cholesterol*. *Clinical Chemistry Journal*. Washington D.C: Analytical Chemistry Division, Institute for Materials Research, National Bureau of Standards. Vol.20. No.7.
- Cahyadi, W. 2006. *Kedelai Khasiat dan Teknologi*. Bandung: Bumi Aksara.
- Cronquist, A. 1981. *An Integrated System of Clasification of Flowering Plants*. New York: Columbia University Press.
- Dian, I. 2011. *Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Turunan Terpenoid dari Kulit Batang Slati (Calophyllum soulatri Burun F.)*. Skripsi. Surakarta: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret.
- Fasya, G. A. 2010. *Sintesis Metil 10,12, 14-Oktadekatrienoat dari asam 9, 12, 15-Oktadekatrienoat (Asam α -Linoleat) Biji Selasih (Ocimum Basilum) dan uji bioaktifnya*. Tesis. Malang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya.

- Fessenden, R. J. dan Fessenden, J.S. 1997. *Kimia Organik Edisi Ketiga*. Diterjemahkan oleh Alyosius Hadyana Pudjaatmaka. Jakarta: Erlangga.
- Fried, B. dan Sherma, J. 1999. *Thin Layer Chromatography. 4th Edition, Revised and Expanded*. New York: Marcel Dekker. Inc.
- Gandjar, I. G dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gordon, M. H. 1990. *The Mechanism of Antioxidants Action In vitro*. Di dalam B.J.F. Hudson. Editor: Food Antioxidants. Elsevier Applied Science, London.
- Gritter, R. J., J. M. Robbit dan S. E. Schwarting. 1991. *Pengantar Kromatografi Edisi Kedua*. Terjemahan Kokasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Guenther, E. 2006. *Minyak Atsiri*. Jakarta: Universitas Jakarta.
- Gunawan, I. W. G., Bawa, I. G. G., dan Sutrisnayanti, N. L. 2008. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpenoid yang Akif Antibakteri pada Herba Meniran (Phyllanthus niruri Linn.)*. *Jurnal Kimia*. Vol. 2 No. 1, hal: 31 – 39.
- Halimah, N. 2010. *Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-Anting (Acalypha indica Linn.) terhadap Larva Udang Artemia salina Leach*. Skripsi Diterbitkan. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hanani, E., Abdul, M., dan Ryany, S. 2005. *Identifikasi Senyawa Antioksidan Dalam Spons Callyspongia sp Dari Kepulauan Seribu*. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. II (3) :127-133. ISSN: 1693-9883.
- Harborne, JB. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerjemah, Padmawinata K, Soedira I. Bandung: Penerbit Institut Teknologi Bandung. Terjemahan dari: Phytochemical methods.
- Hayati, E. K., Jannah, A., dan Ningsih, R. 2012. *Identifikasi Senyawa Dan Aktivitas Antimalaria In Vivo Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting-Anting (Acalypha Indica L.)*. *molekul*, Vol. 7. N0. 1. hal: 20-32.
- Hilda, A. 2014. *Uji Sitotoksik Akar Rumput Bambu (Lophatherum Gracile B.) Dengan Variasi Pelarut Melalui Metode BSLT dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktifnya*. Skripsi Diterbitkan. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Jazairi, S.A.B.J. 2009. *Tafsir Al-Qur'an Jilid 2*. Jakarta Timur: Darus Sunnah Press.

- Jing, Z., Ying, W., Xiao-Qi, Z., Qing-Wen, Z., dan Wen-Cai, Y. 2009. *Chemical Constituents from the Leaves of Lophatherium gracile*. China. *Chinesse Journal of Natural Medicines*, 7(6): 428-431.
- Khopkar, S. M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V dan Milos, M. 2004. *Use of Different Methods for Testing Antioxidative Activity of Oregano Essential Oil*. *Food Chemistry*. 85: 633-640.
- Kusumawati, I., Djatmiko, W., dan Rahman, A. 2003. *Eksplorasi Keanekaragaman dan Kandungan Kimia Tumbuhan Obat di Hutan Tropis Gunung Arjuno*. *Jurnal Bahan Alam Indonesian* ISSN 1412-2855 Vol.2, No.3.
- Kvangarsnes, S. K. 2009. *Phytochemical Observations on European Mistletoe (Viscum album L.)*. thesis for the Master Degree in Pharmacy. Norway: university of Bergen.
- Lailah, N. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan dan Fitokimia Fraksi Etil Asetat, Kloroform, dan n-Heksana Ekstrak Metanol Alga Coklat *Sargassum cristaeifolium*. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maliki Malang.
- Lenny, S. 2006. *Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida dan Alkaloida*. *Karya Ilmiah Tidak Diterbitkan*. Medan: MIPA Universitas Sumatera Utara.
- Lu Y., dan Foo F. Y. 2000. Antioxidant and Radical Scavenging Activities of Polyphenols from Apple. *Journal of Food Chemistry*. Vol. 68 : 81–85.
- Madhavi, D. L., Dhespande, S. S., dan Salunke, D. K. 1996. *Food Antioxidant Technological, Toxicological and Healt Perpectures*. New york: Marcel dekker inc.
- Mahali, J.M dan as Suyuthi J.A. 2011. *Tafsir al Jalalain*. Surabaya: Pustaka Elba.
- Markham, R. K. 1998. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: ITB.
- Masui, T; Hirose, M; Imaida, K; Fukushima, S; Tamano, S; Ito, N. 1986. *Sequential Changes of The Forestomach of F344 Rats, Syrian Golden Hamster, And B6C3F₁ Mice Treated with Butylated Hidroxyanisole*. *Jurnal Jpn, J. Cancer Res. (Gann)*, No.77, Hal. 1083-1090. Departement of Pathology-University Medical School.
- Mohammad, A., Bhawani, S. A., dan Sharma, S. 2010. *Analysis of Herbal Product by Thin-layer Chromatography*. India: Aligarh Muslim University. *International Journal of Pharma and Bio Science*, 2(1): 1-50.

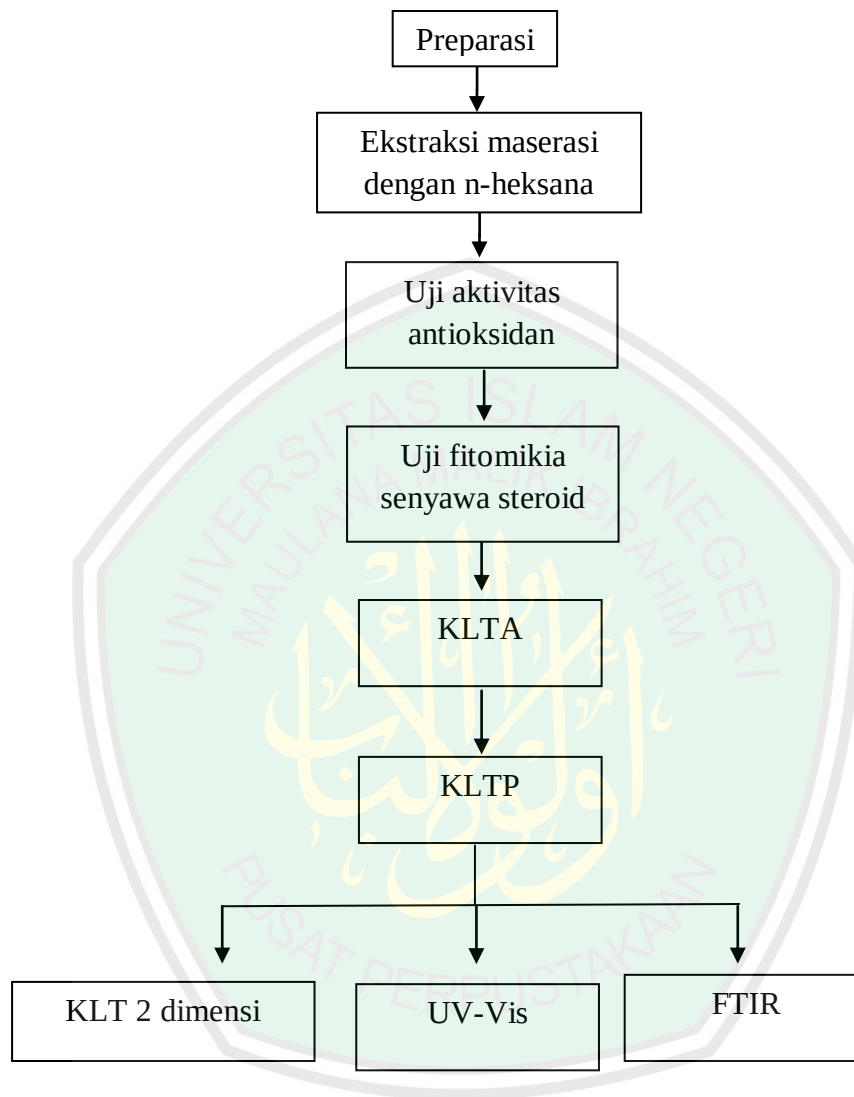
- Molyneux, P. 2003. *The Use of The Stable Free Radical Diphenyl Picrylhydrazil (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity*. Songklanakarin j. SCI. Technol., 26 (2), 211-219.
- Muhammad, I. J. 2010. *Tafsir Jalalain*. Surabaya: Elba Fithrah Mandiri Sejahtera.
- Paiva, S.A., and Russell, M.R. 1999. *β -Carotene and Carotenoids As Antioxidants*. Journal of the American College of Nutrition. Brazil: Estadual Paulista University. 18(5): 426-433.
- Parwata, I.M.O.A., Wiwik, S.R., dan Raditya, Y. 2009. *Isolasi dan Uji Antiradikal Bebas Minyak Atsiri Pada Daun Sirih (Piper betle, Linn) Secara Spektroskopi Ultra Violet-Tampak*. Jurnal Kimia. Vol. 3 (1): 7-13. ISSN: 1907-9850.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-dasar Biokimia Edisi Revisi*. Jakarta: UI PRESS.
- Prakash, A. 2001. *Antioxidant Activity*. Journal of Analytical Chemistry. Medallion Laboratories: Analytical Progress. Vol 10, No. 2.
- Qarni, 'A. 2007. *Tafsir Muyassar*. Jakarta: Qisthi Press.
- Rahayu, D dan Hastuti, S.D. 2010. *Stabilitas Saponin sebagai Antibiotik Alami Hasil Isolasi Gel Daun Aloe barbandis miller pada Variasi Suhu dan Lama Simpan*. Jurnal. Malang: Jurusan Peternakan Fakultas Peternakan-Perikanan Universitas Muhammadiyah Malang.
- Restasari, A., Kusri, K., dan Fachriyah, E. 2002. *Isolasi dan Identifikasi Fraksi Teraktif dari Ekstrak Kloroform Daun Ketapang (Terminalia Catappa Linn)*. Skripsi Diterbitkan. Jurusan Kimia FMIPA UNDIP Semarang.
- Risky, T. 2014. *Aktivitas Antioksidan dan Antikanker Ekstrak Metanol Tumbuhan Paku (Adiantum philippensis L)*. Journal of Chemistry. Vol 3. No 1.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata, Bandung: ITB.
- Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Sastrohamidjojo, H. 2007. *Kromatografi*. Yogyakarta: UGM Press.
- Satria, M. 2013. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak N-Heksan Buah Lakum (Cayratia Trifolia) Dengan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)*. Skripsi Tidak diterbitkan. Pontianak: Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura.
- Silalahi, J. 2006. *Makanan Fungsional*. Yogyakarta: Kanisius.

- Sinulingga, S. 2011. *Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Steroid/Triterpenoid Dari Akar Tanaman Ekor Naga (Raphidophora Pinnata Schott)*. Skripsi Diterbitkan. Medan: Program Ekstensi Sarjana Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara.
- Socrates, G. 1994. *Infrared Characteristic grup Frequencies Tables and Charts*. Newyork: John Wiley and Sons.
- Sriwahyuni, I. 2010. *Uji Fitokimia Ektrak Tanaman Anting-Anting (Acalypha Indica Linn) dengan Variasi Pelarut dan Uji Toksisitas Menggunakan Brine Shrimp (Artemia salina Leach)*. Skripsi Diterbitkan. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Stahl, E. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopis*. Bandung: Penerbit ITB.
- Tahir, I., Wijaya, K., dan Widianingsih, D. 2003. *Terapan Analisis Hansch Untuk Aktivitas Antioksidan Senyawa Turunan Flavon/Flavonol*. Artikel Seminar Chemometrics- Chemistry. Yogyakarta: Dept Gadjah Mada University.
- Townshend, A. 1995. *Encyclopedia of Analytical Science*. Vol. 2. London: Academic Press Inc.
- Tran, A.V. 2013. *Do BHA and BHT Induce Morphological Changes and DNA Double-Strand Breaks in Shizosaccharomyces Pombe*. Scripps Senoir Theses. Claremont. Science Departement.
- Vogel, 1978. *Vogel's Textbook of Quantitative Inorganic Analysis Including Elementary Instrumental Analysis*. Fourth edition. London: The English language Book Society and Longman.
- Wall, P.E. 2005. *Thin-Layer Chromatography, A Modern Practical Approach*. New York: Cambridge University Press.
- Wang, G, Chen, Y, Wang, T, Lee, C, Chen, K, dan Lee, T. 2008. *Flavonoids with iNOS inhibitory activity from Pogonatherum crinitum*. Journal of Ethnopharmacology. 118 (2008) 71-78.
- Wijayakusuma, H. 2008. *Atasi Kanker dengan Tanaman Obat*. Jakarta: Puspa Swara.
- Wikipedia. 2013. *Rumput Bambu*. http://id.wikipedia.org/wiki/Rumput_bambu. Diakses pada 12 September 2013.
- Winarsi, H. 2007. *Isoflavon Berbagai Sumber, Sifat dan Manfaatnya pada Penyakit Degeneratif*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

- Wulandari, M. 2013. *Aktivitas Antioksidan Ekstrak N-Heksana, Etil Asetat Dan Metanol Kulit Buah Jeruk Sambal (Citrus Microcarpa Bunge)*. JKK, Tahun 2013, Volume 2 (2), Halaman 90-94. Pontianak: Program Studi Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura.
- Yuhernita. 2011. *Analisis Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Metanol Daun Surian yang Berpotensi Sebagai Antioksidan*. Makara Sains. Vol 15. No 1: 48-52.
- Yuliani, D. 2010. *Kajian Aktivitas Antioksidan Fraksi Etanol Jintan Hitam (Nigella sativa, L.)*. Skripsi. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Zahro, I. 2011. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Triterpenoid Ekstrak N-Heksana Tanaman Anting-Anting (Acalypha Indica Linn.) Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis dan FTIR*. Skripsi Tidak Diterbitkan. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Zamroni, M. 2011. *Uji fitokimia dan uji Aktivitas antibakteri Senyawa Aktif Tanaman Anting-anting (Acalipha Indica L.)*. Skripsi. UIN Malang.

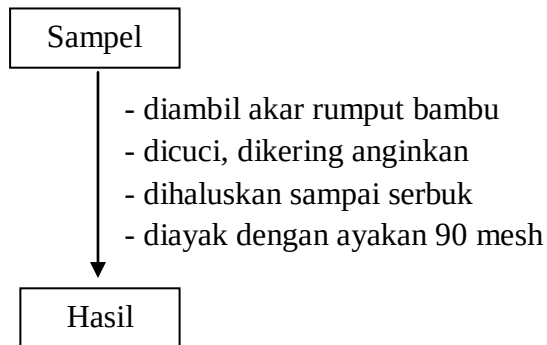
LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian

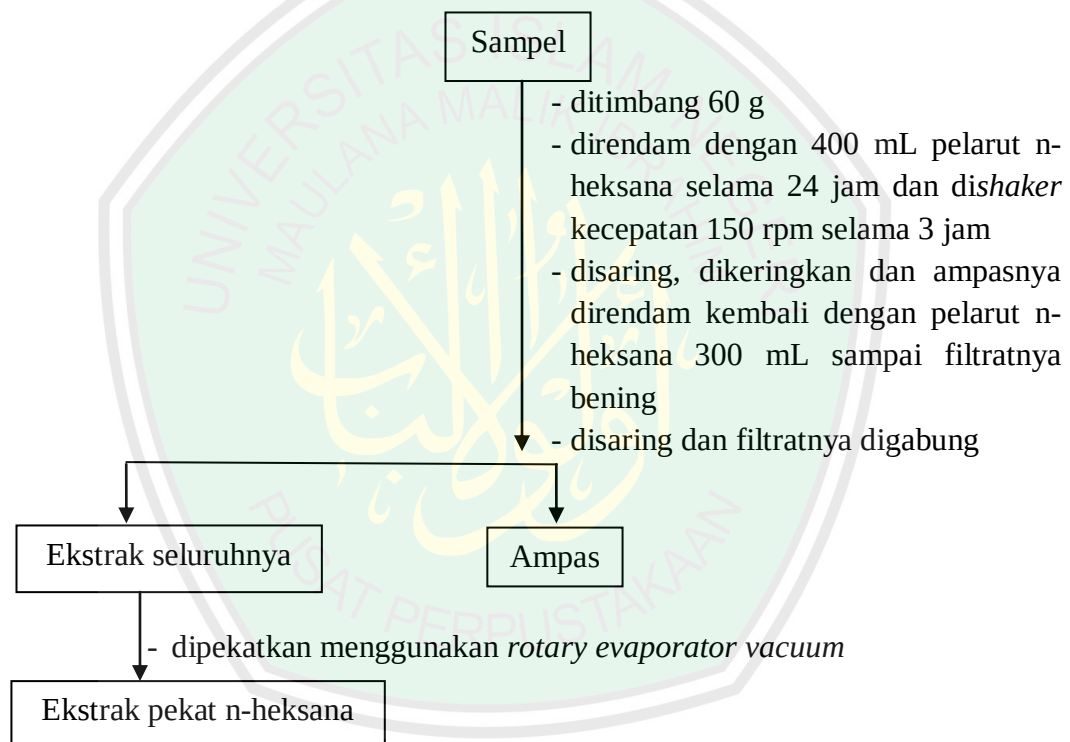


Lampiran 2. Skema Kerja

L.2.1 Preparasi Sampel

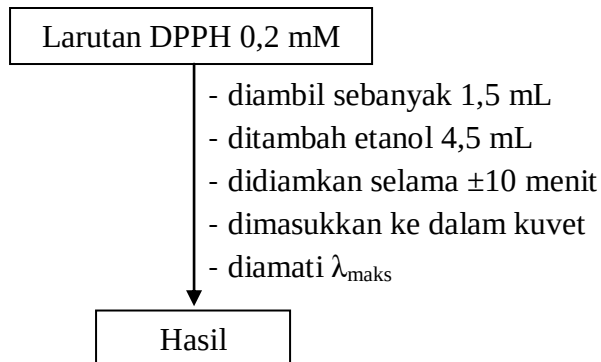


L.2.2 Ekstraksi Senyawa Steroid

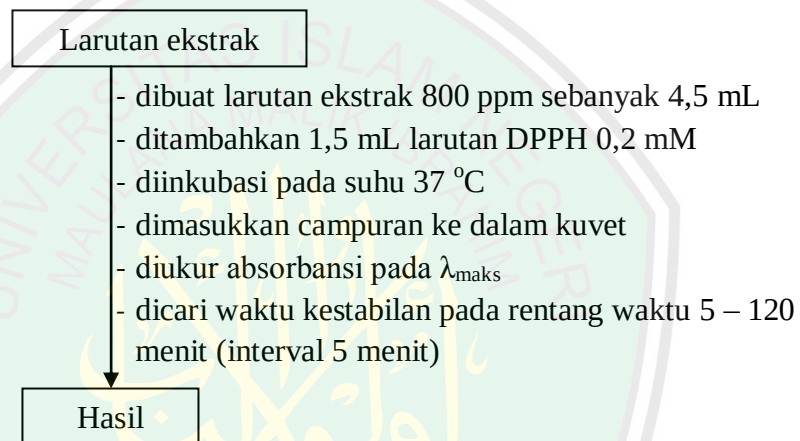


L.2.3 Uji Antioksidan dengan DPPH

➤ Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

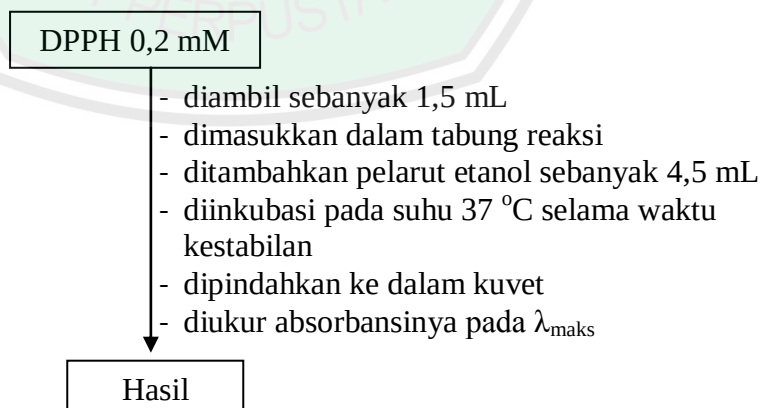


➤ Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan

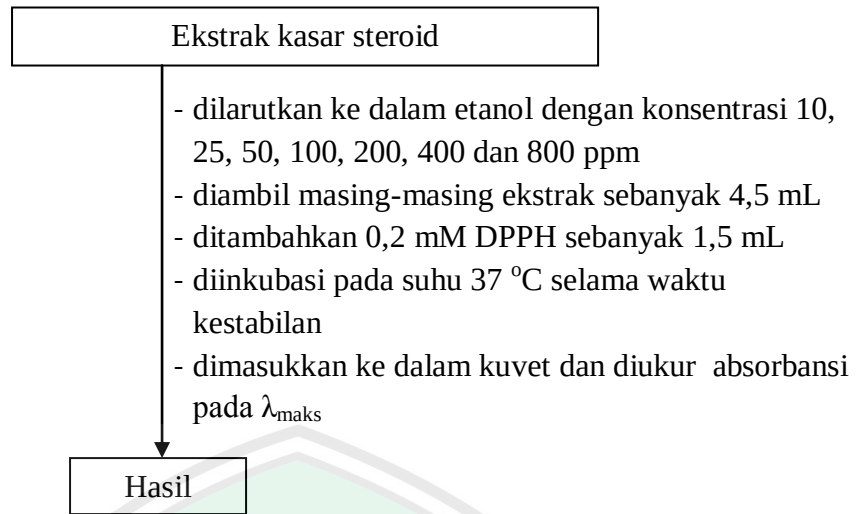


➤ Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Konsentrasi 10, 25, 50, 100, 200, 400 dan 800 ppm

a. Absorbansi Kontrol

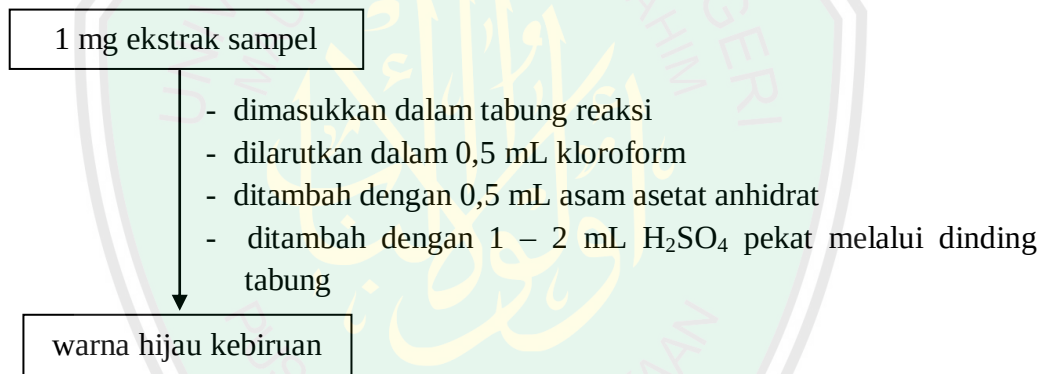


b. Absorbansi Sampel Variasi Konsentrasi



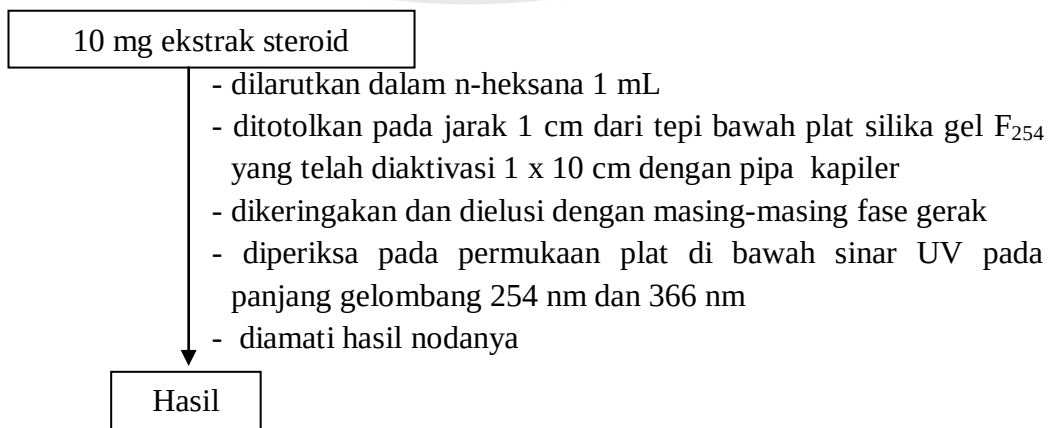
*Pembanding Vitamin C diperlakukan seperti sampel tetapi sampel diganti dengan larutan Vitamin C.

L.2.4 Uji Fitokimia Senyawa Steroid dengan Reagen Perekasi

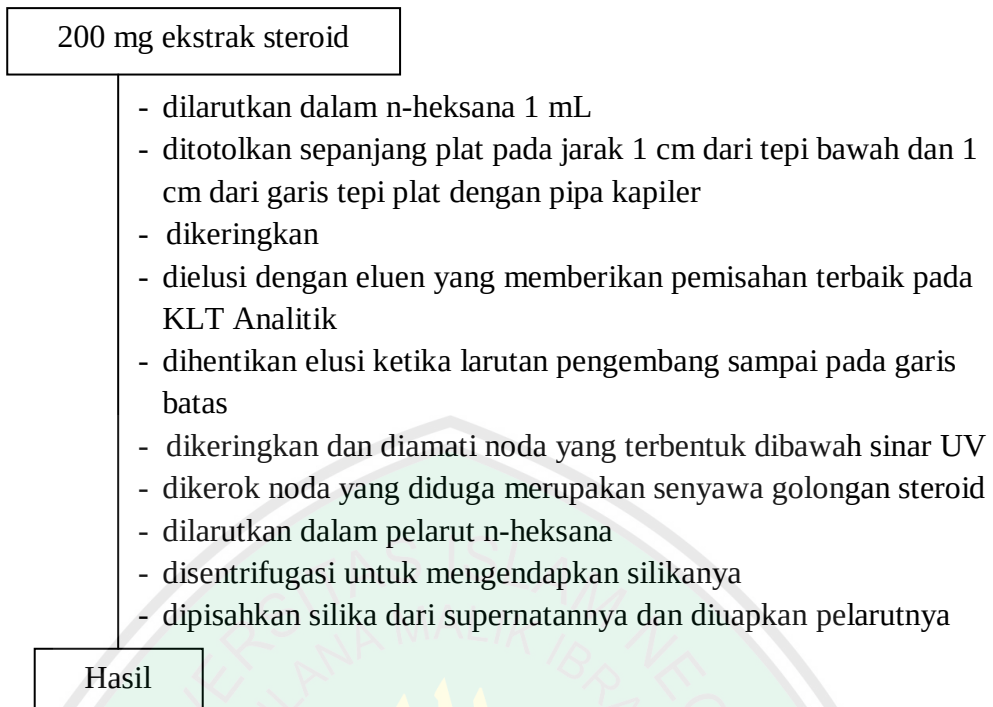


L.2.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT

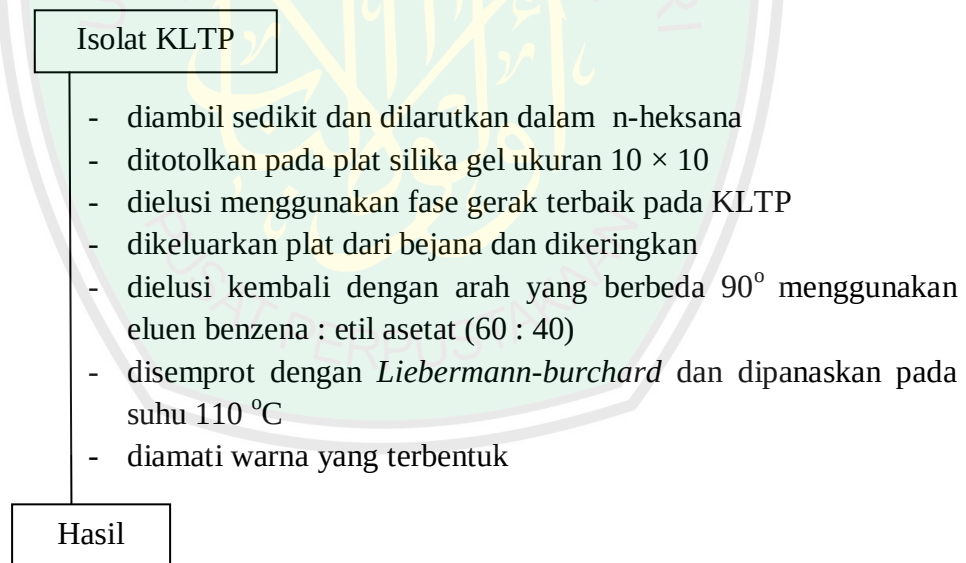
1. KLT Analitik



2. KLT Preparatif

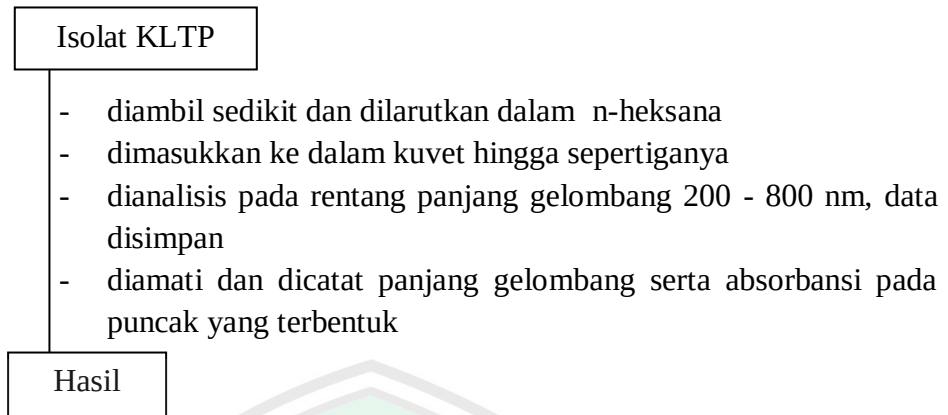


3. KLT Dua Dimensi

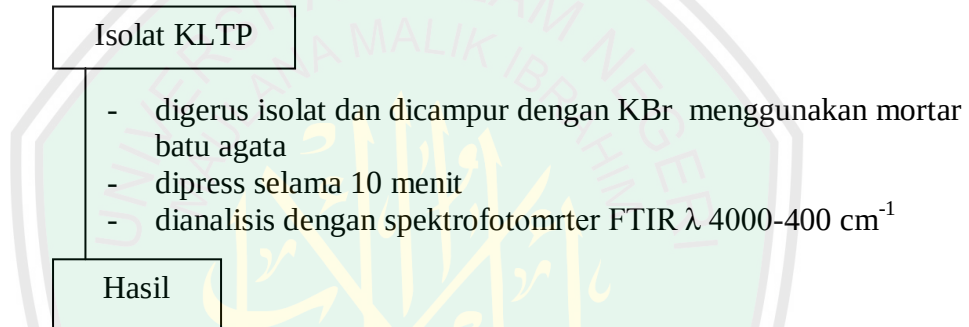


L.2.6 Analisis Spektroskopi

1. Spektrofotometer UV-Vis



2. Spektroskopi inframerah



Lampiran 3. Perhitungan, Pembuatan Reagen dan Larutan

L.3.1 Pembuatan Reagen Lieberman-Burchard

Asam sulfat pekat = 5 mL

Anhidrida asetat = 5 mL

Etanol absolut = 50 mL

Cara pembuatannya adalah asam sulfat pekat diambil sebanyak 5 mL dengan pipet volume 5 mL dan pengambilannya dilakukan di dalam lemari asam. Setelah itu larutan asam sulfat tersebut dimasukkan ke dalam *beaker glass* 100 mL. Kemudian diambil larutan anhidrida asetat sebanyak 5 mL di dalam lemari asam dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* yang telah berisi asam sulfat. Selanjutnya diambil larutan etanol absolut 50 mL di dalam lemari asam dan dicampurkan ke dalam asam sulfat dan anhidrida. Kemudian ketiga campuran larutan tersebut dipindahkan ke dalam botol kaca dan didinginkan di dalam lemari pendingin. Penggunaan reagen ini digunakan langsung setelah pembuatan (Wagner, dkk., 2001).

L.3.2 Pembuatan Larutan DPPH 0,2 mM

DPPH 0,2 mM dalam 50 mL etanol

Mr DPPH = 394,33 g/mol

$$\begin{aligned}\text{Mol DPPH} &= 50 \text{ mL} \times 0,2 \text{ mM} = 50 \text{ mL} \times \frac{0,2 \text{ M}}{1000} \\ &= 0,01 \text{ mmol}\end{aligned}$$

Mg DPPH = 0,01 mmol x Mr DPPH

$$= 0,01 \text{ mmol} \times 394,33 \text{ g/mol} = 3,9433 \text{ mg}$$

L.3.3 Perhitungan Konsentrasi Larutan Ekstrak Untuk Antioksidan

a. Pembuatan Larutan Stok 800 ppm Ekstrak Akar Rumput Bambu

$$800 \text{ ppm ekstrak kasar atau pembanding} = \frac{40 \text{ mg}}{0,05 \text{ L}} = 800 \text{ ppm}$$

Jadi, larutan stok 800 ppm dibuat dengan melarutkan 40 mg ekstrak ke dalam 50 mL n-heksana.

b. Pembuatan Larutan Ekstrak 25 ppm

$$V_1 = \frac{5 \text{ mL} \times 25 \text{ ppm}}{800 \text{ ppm}} = 0,15625 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 5 mL larutan ekstrak 25 ppm diperlukan larutan stok 800 ppm sebanyak 0,15625 mL.

c. Pembuatan Larutan Ekstrak 50 ppm

$$V_1 = \frac{5 \text{ mL} \times 50 \text{ ppm}}{800 \text{ ppm}} = 0,3125 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 5 mL larutan ekstrak 50 ppm diperlukan larutan stok 800 ppm sebanyak 0,3125 mL.

d. Pembuatan Larutan Ekstrak 100 ppm

$$V_1 = \frac{5 \text{ mL} \times 100 \text{ ppm}}{800 \text{ ppm}} = 0,625 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 5 mL larutan ekstrak 100 ppm diperlukan larutan stok 800 ppm sebanyak 0,625 mL.

e. Pembuatan Larutan Ekstrak 200 ppm

$$V_1 = \frac{5 \text{ mL} \times 200 \text{ ppm}}{800 \text{ ppm}} = 1,25 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 5 mL larutan ekstrak 200 ppm diperlukan larutan stok 800 ppm sebanyak 1,25 mL.

f. Pembuatan Larutan Ekstrak 400 ppm

$$V_1 = \frac{5 \text{ mL} \times 400 \text{ ppm}}{800 \text{ ppm}} = 2,5 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 5 mL larutan ekstrak 400 ppm diperlukan larutan stok 800 ppm sebanyak 2,5 mL.

g. Pembuatan Larutan Ekstrak 800 ppm

$$V_1 = \frac{5 \text{ mL} \times 800 \text{ ppm}}{800 \text{ ppm}} = 5 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 5 mL larutan ekstrak 800 ppm diperlukan larutan stok 800 ppm sebanyak 5 mL.



Lampiran 4. Data Perhitungan Randemen

$$\begin{aligned}\text{Randemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,307}{60} \times 100 \% \\ &= 0,511 \%\end{aligned}$$



Lampiran 5. Uji Aktivitas Antioksidan

L.5.1 Penentuan Waktu Kestabilan Antioksidan Sampel dan Pembanding Inkubasi 37 °C

Waktu kestabilan (menit)	Ekstrak n-heksana	Vitamin C
5	0,60	0,012
10	0,60	0,01
15	0,58	0,012
20	0,54	0,013
25	0,77	0,01
30	0,54	0,01
35	0,49	0,01
40	0,52	0,01
45	0,49	0,01
50	0,48	0,01
55	0,47	0,011
60	0,47	0,011
65	0,47	0,011
70	0,45	0,11
75	0,45	0,01
80	0,45	0,01
85	0,45	0,01
90	0,45	0,01
95	0,45	0,01
100	0,44	0,01
105	0,43	0,011
110	0,43	0,011
115	0,43	0,011
120	0,42	0,011

L.5.2 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan

➤ Ekstrak n-heksana

Konsentrasi (ppm)	A Kontrol	A Pertama	A Kedua	A Ketiga	A Rata-rata	% Antioksidan
10	0,6523	0,6371	0,6363	0,6349	0,6361	2,48
25	0,6501	0,6200	0,6195	0,6209	0,6201	4,61
50	0,6642	0,5936	0,5929	0,5943	0,5936	10,63
100	0,6478	0,5288	0,5300	0,5302	0,5297	18,23
200	0,6491	0,4914	0,4912	0,4896	0,4907	24,40
400	0,6486	0,3394	0,3396	0,3410	0,3400	47,58
800	0,6486	0,3928	0,3865	0,3928	0,3907	39,76

➤ Vitamin C

Konsentrasi (ppm)	A Kontrol	A Pertama	A Kedua	A Ketiga	A Rata-rata	% Antioksidan
10	0,6589	0,0315	0,0287	0,0298	0,0300	95,45
25	0,6569	0,0145	0,0141	0,0138	0,0141	97,85
50	0,6597	0,0143	0,0140	0,0139	0,0141	97,86
100	0,6569	0,0156	0,0155	0,0156	0,0156	97,62
200	0,6558	0,0138	0,0138	0,0138	0,0138	97,89
400	0,6599	0,0142	0,0133	0,0129	0,0135	97,95
800	0,6551	0,0180	0,0189	0,0187	0,0185	97,18



Lampiran 6. Perhitungan Nilai Rf (*Retardation Factor*) Hasil KLT Ekstrak Akar Rumput Bambu (*Lophatherum gracile* Brongn)

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{jarak yang ditempu h noda}}{\text{jarak yang ditempu h eluen}}$$

L.6.1 Nilai Rf KLTA Ekstrak N-heksana

- Eluen 1 → kloroform : metanol (3: 7)

$$\text{Rf noda 1} = \frac{6,7 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,84 \text{ cm}$$

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

- Eluen 5 → n-heksana : etil asetat (8 : 2)

$$\text{Rf noda 1} = \frac{1,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,22 \text{ cm}$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{4,5 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,56 \text{ cm}$$

$$\text{Rf noda 3} = \frac{5,5 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,69 \text{ cm}$$

$$\text{Rf noda 4} = \frac{5,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,74 \text{ cm}$$

$$\text{Rf noda 5} = \frac{6,5 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,81 \text{ cm}$$

$$\text{Rf noda 6} = \frac{6,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,86 \text{ cm}$$

$$\text{Rf noda 7} = \frac{7,5 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,94 \text{ cm}$$

L.6.2 Nilai Rf KLT 2 dimensi

- Eluen 1 → n-heksana : etil asetat (8 : 2)

$$\text{Rf noda 1} = \frac{2,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,36 \text{ cm}$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{4 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,5 \text{ cm}$$

- Eluen 2 → benzena : etil asetat (6 : 4)

$$\text{Rf noda 1} = \frac{2,64 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,33 \text{ cm}$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{4,16 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,52 \text{ cm}$$

Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian

L.7.1 Preparasi Sampel



Sampel basah

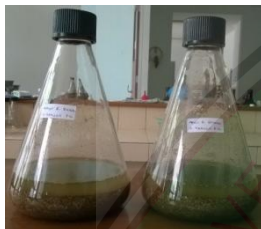


Sampel kering



Sampel serbuk

L.7.2 Ekstraksi Maserasi



Perendaman sampel



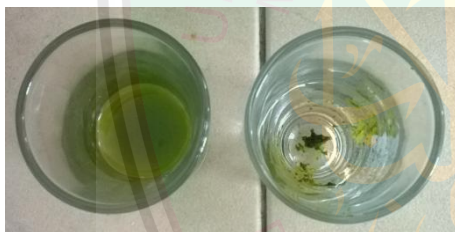
Proses *shaker*



Penyaringan



Pemekatan sampel



Hasil pemekatan

L.7.3 Uji Aktivitas Antioksidan



Uji aktivitas antioksidan
ekstrak sebelum inkubasi

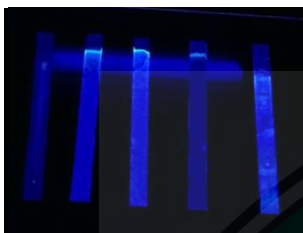


Uji aktivitas antioksidan
ekstrak setelah inkubasi



Uji aktivitas antioksidan vitamin C

L.7.4 KLT Analitik, KLT Preparatif dan KLT Dua Dimensi



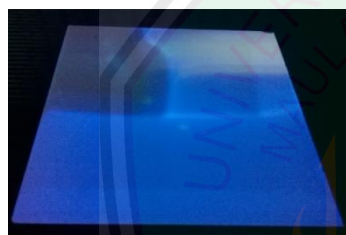
KLT Analitik



KLT Preparatif



KLT 2 dimensi eluen 1



KLT 2 dimensi eluen 2

Absorbansi Ekstrak Steroid

Tanggal Analisa : 30 Juni 2015

Advanced Reads Report

Report time 6/30/2015 1:12:09 PM
Method
Batch name D:\Khumairoh A\Absorbansi Ekstrak Steroid
(30-06-2015).BAB
Application Advanced Reads 3.00(339)
Operator Rika

Instrument Settings

Instrument Cary 50
Instrument version no. 3.00
Wavelength (nm) 515.0
Ordinate Mode Abs
Ave Time (sec) 0.1000
Replicates 3
Sample averaging OFF

Comments:

Zero Report

Read	Abs	nm
Zero	(0.1090)	515.0

Analysis

Collection time 6/30/2015 1:12:09 PM

Sample	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Kontrol					0.6532 0.6532 0.6506
10 ppm		0.6523	0.0015	0.23	0.6371 0.6363 0.6349
Kontrol		0.6501	0.0001	0.02	0.6500 0.6502 0.6500
25 ppm		0.6201	0.0007	0.11	0.6200 0.6195 0.6209
Kontrol		0.6642	0.0021	0.31	0.6664 0.6638 0.6624
50 ppm		0.5936	0.0007	0.12	0.5936 0.5929 0.5943
Kontrol		0.6478	0.0002	0.03	0.6476 0.6480 0.6479
100 ppm		0.5297	0.0007	0.14	0.5288 0.5300 0.5302
Kontrol					0.6486 0.6489

	0.6491	0.0006	0.09	0.6497
200 ppm				0.4914
				0.4912
	0.4907	0.0010	0.20	0.4896
Kontrol				0.6487
				0.6483
	0.6486	0.0003	0.04	0.6488
400 ppm				0.3394
				0.3396
	0.3400	0.0009	0.26	0.3410
Kontrol				0.6484
				0.6486
	0.6486	0.0003	0.04	0.6489
800 ppm				0.3928
				0.3865
	0.3907	0.0036	0.92	0.3928

Results Flags Legend

R = Repeat reading



Absorbansi Vitamin C

Tanggal Analisa : 22 Juni 2015

Advanced Reads Report

Report time 6/22/2015 12:46:52 PM
Method
Batch name D:\Asasu I\Absorbansi Vitamin C (22-06-2015).BAB
Application Advanced Reads 3.00 (339)
Operator Rika

Instrument Settings

Instrument Cary 50
Instrument version no. 3.00
Wavelength (nm) 515.0
Ordinate Mode Abs
Ave Time (sec) 0.1000
Replicates 3
Sample averaging OFF

Comments:

Zero Report

Read	Abs	nm
Zero	(0.0993)	515.0

Analysis

Collection time 6/22/2015 12:46:52 PM

Sample	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Kontrol					0.6609 0.6576 0.6582
		0.6589	0.0017	0.26	
10 ppm					0.0315 0.0287 0.0298
		0.0300	0.0014	4.59	
Kontrol					0.6573 0.6568 0.6564
		0.6569	0.0005	0.07	
25 ppm					0.0145 0.0141 0.0138
		0.0141	0.0004	2.48	
Kontrol					0.6586 0.6597 0.6607
		0.6597	0.0010	0.16	
50 ppm					0.0143 0.0140 0.0139
		0.0141	0.0002	1.37	
Kontrol					0.6571 0.6569 0.6566
		0.6569	0.0002	0.04	
100 ppm					0.0156 0.0155 0.0156
		0.0156	0.0000	0.32	
Kontrol					0.6553 0.6560 0.6560
		0.6558	0.0004	0.06	

200 ppm				0.0138 0.0138 0.0138
	0.0138	0.0000	0.22	
Kontrol				0.6598 0.6601 0.6598
	0.6599	0.0002	0.03	
400 ppm				0.0142 0.0133 0.0129
	0.0135	0.0006	4.77	
Kontrol				0.6544 0.6553 0.6557
	0.6551	0.0006	0.10	
800 ppm				0.0180 0.0189 0.0185
	0.0185	0.0005	2.47	

Results Flags Legend

R = Repeat reading

