

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) FRAKSI n-HEKSANA ALGA
MERAH (*Eucheuma cottonii*) DARI PERAIRAN WONGSOREJO
BANYUWANGI**

SKRIPSI

**Oleh :
DEVI RAHMAWATI
NIM. 17630039**



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) FRAKSI n-HEKSANA ALGA
MERAH (*Eucheuma cottonii*) DARI PERAIRAN WONGSOREJO
BANYUWANGI**

SKRIPSI

**Oleh :
DEVI RAHMAWATI
NIM. 17630039**

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

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2021**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) FRAKSI n-HEKSANA ALGA
MERAH (*Eucheuma cottonii*) DARI PERAIRAN WONGSOREJO
BANYUWANGI**

SKRIPSI

Oleh :
DEVI RAHMAWATI
NIM. 17630039

Telah Diperiksa dan Disetujui
Tanggal: 12 Desember 2021

Pembimbing I



Suci Amalia, M.Sc
NIP. 19821104 200901 2 007

Pembimbing II



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

Mengetahui,
Ketua Program Studi
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim



Rachmawati Ningsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 2 010

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) FRAKSI n-HEKSANA ALGA
MERAH (*Eucheuma cottonii*) DARI PERAIRAN WONGSOREJO
BANYUWANGI**

SKRIPSI

Oleh :
DEVI RAHMAWATI
NIM. 17630039

**Telah Diperiksa di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 12 Desember 2021**

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

Ketua Penguji : Susi Nurul Khalifah, M.Si
NIP. 19851020 20180201 2 240

Sekretaris Penguji : Suci Amalia, M.Sc
NIP. 19821104 200901 2 007

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

(.....)
.....
.....
.....
.....

Mengetahui,
**Ketua Program Studi Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim**


Rachmawati Nirngsih, M.Si
NIP. 19810811 200801 2 010

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Devi Rahmawati

NIM : 17630039

Program Studi : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Fraksi n-Heksana Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi

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

Malang, 6 September 2021
Yang membuat pernyataan,



Devi Rahmawati
NIM. 17630039

PERSEMBAHAN

Assalamualaikum wr. wb.

Saya persembahkan tugas akhir ini untuk:

1. Kedua orang tua saya, alm. Bapak Ahmad Saudi dan Ibu Huzaimah TS yang telah membesarkan, membimbing, mendampingi, mengarahkan dan menerima baik kekurangan maupun kelebihan saya, mencurahkan segala restu, kasih sayang, doa, perhatian dan segalanya yang tidak pernah terputus untuk saya hingga akhirnya dapat menyelesaikan studi di program studi kimia ini dengan baik dan tanpa kekurangan satu apapun.
2. Bapak Ibu Dosen Program Studi Kimia dari semester 1 hingga semester akhir yang telah membimbing, mengarahkan, memberikan ilmu dan pengalamannya tanpa pamrih selama perkuliahan.
3. Semua laboran yang telah banyak membantu, meluangkan waktunya serta ilmunya dalam proses penelitian di laboratorium.
4. Keluarga besar saya yang tidak pernah lelah mendoakan, mendampingi, menemani, memberikan semangat dan dukungan yang tidak pernah terputus untuk saya hingga selesainya tugas akhir ini.
5. Tante Rina, Abang Johanes dan Dede Zaky yang tidak pernah lelah memberikan doa, dukungan, semangat dan sudah dengan setia menemani ibunda saya disamping saya sedang menyelesaikan penelitian dan tugas akhir ini.
6. Orang terdekat saya, Nova Alfian Hariyanto yang tidak pernah lelah menyemangati, memantau dan membantu dalam penyelesaian tugas akhir ini.
7. Sahabat saya, Aulia Hainung Savitri dan Ganda Yudha Pamungkas yang tidak pernah lelah membantu dan memberikan saran, masukan, kritik serta motivasi dalam kelancaran tugas akhir ini.
8. Sahabat saya di Kimia, Afifah Ayuditya, Safira Makhrusah dan Sakinatul Aulia yang selalu setia membantu dan menemani saya selama berada di Malang.
9. Sahabat saya, Fitrotun Azizah yang tidak pernah lelah memberikan semangat, dukungan, doa, energi positif dan selalu ada untuk saya di saat hari-hari buruk saya sedang datang.

10. Sahabat kecil saya, Maysyifa Aulia yang tidak pernah bosan menyemangati dan mendoakan saya demi kelancaran tugas akhir ini.
11. Teman seperbimbingan saya, Ria Febriyanti yang sudah sangat membantu saya dalam menyelesaikan tugas akhir ini.
12. Teman-teman unit bidang ilmu Kimia Organik Bahan Alam yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu karena kalian semua telah banyak membantu saya dalam kelancaran penelitian dan penulisan tugas akhir ini.
13. Semua teman-teman Kimia Angkatan 2017 dan teman-teman Kimia A 2017 yang telah banyak memberikan pengalaman selama masa perkuliahan dari semester 1 hingga semester akhir.
14. *Last but not least, I wanna thank me, I wanna thank me for believing in me, I wanna thank me for doing all this hard work, I wanna thank me for having no days off, I wanna thank me for never quitting, for just being me at all times. And ya, I wanna thank for Devi Rahmawati because she is been through a lot.*

Semoga kebaikan, kesehatan, keselamatan serta keberkahan hidup selalu berpihak kepada kita semua, amin.

Wassalamualaikum wr. wb.

MOTTO

Henry Ford said, *“Whether you think that you can or that you can’t, you are usually right.”*

“Stop comparing yourself with others. Always keep in mind that everybody is different and unique in their own way. Make a conscious effort to think about your own good qualities and your own uniqueness. Be accepting of yourself.” – (Kerr, 2012).

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum wr. wb.

Puji syukur yang tidak terhingga atas kehadiran Allah SWT karena telah memberikan kesempatan dan kelancaran kepada penulis untuk menyelesaikan tugas akhir ini. Shalawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada junjungan kita Nabi Agung Nabi Besar Muhammad SAW yang telah menuntun umat Islam agar senantiasa berpegang teguh pada al-Quran dan al-Hadits. Atas rahmat dan hidayah-Nya lah penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dengan judul **“Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Fraksi n-Heksana Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi”** ini, ternyata banyak sekali rintangan dalam proses penyusunan tugas akhir ini dan tidak semudah yang dibayangkan. Namun, berkat banyaknya dukungan dan doa terutama dari ibunda Huzaimah TS yang sudah sangat kuat mendampingi penulis dalam penyelesaian studi di program studi kimia ini. Serta kepada alm. ayahanda Ahmad Saudi yang sudah sangat berjuang melawan tumor ganasnya semenjak penulis diterima kuliah di program studi kimia ini walaupun belum sempat mendampingi penulis dalam penyusunan tugas akhir tetapi penulis yakin bahwa doa beliau selalu menyertai. Beliau semua adalah inspirator dan penguat bagi penulis untuk tetap berjalan dan tidak berhenti dalam melanjutkan cita-cita yang diharapkan.

Serta tidak lupa ucapan terimakasih yang tak terhingga kepada:

1. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si selaku Ketua Program Studi Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Suci Amalia, M.Sc selaku dosen pembimbing penelitian yang selalu sabar dan ikhlas dalam membimbing penulis, Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si selaku pembimbing agama yang juga sangat berperan penting dalam berjalannya penelitian hingga selesainya tugas akhir ini. Ibu Himmatul Barroroh, M.Si dan Ibu Susi Nurul Khalifah, M.Si selaku penguji yang telah berkenan meluangkan waktunya untuk memberikan ilmu, kritik, saran serta nasehat hingga selesainya tugas akhir ini.

3. Seluruh dosen serta staff program studi kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah banyak memberikan ilmu pengetahuan, wawasan dan pengalamannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
4. Teman-teman Kimia Angkatan 2017, teman-teman kelas Kimia A 2017 serta teman-teman unit bidang ilmu Kimia Organik yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, namun tidak mengurangi rasa syukur dan arti keberadaan mereka selama penyelesaian studi di program studi kimia ini.

Sebagai seorang manusia yang tidak pernah luput dari salah dan dosa serta keterbatasan ilmu pengetahuan yang dikuasai, penulis menyadari bahwa tugas akhir ini masih sangat jauh dari kata sempurna sehingga membutuhkan masukan dan kritikan yang sifatnya membangun. Oleh karena itu, penulis membuka kesempatan luas bagi yang ingin menyumbangkan masukan dan kritikan demi kesempurnaan tugas akhir ini. Akhir kata penulis berharap semoga tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi penulis sendiri maupun pembaca. Terima kasih.

Wassalamualaikum wr. wb.

Malang, 6 September 2021

Penulis

DAFTAR ISI

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

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan	6
1.4 Batasan Masalah	6
1.5 Manfaat Penelitian	7

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga (Rumput Laut) Merah	8
2.2 Senyawa Steroid.....	12
2.3 Ekstraksi Senyawa Steroid.....	14
2.4 Hidrolisis Glikosida	16
2.5 Partisi	18
2.6 Uji Fitokimia Senyawa Steroid.....	19
2.7 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	21
2.7.1 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLT Preparatif).....	22
2.7.2 Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi (KLT Dua Dimensi).....	23
2.8 Antioksidan	25
2.8.1 Mekanisme Kerja Antioksidan	26
2.8.2 Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH	27
2.9 Identifikasi Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis.....	29
2.10 Identifikasi Steroid dengan FTIR.....	32

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	35
3.2 Alat dan Bahan.....	35
3.2.1 Alat	35
3.2.2 Bahan.....	35
3.3 Rancangan Penelitian.....	35
3.4 Tahapan Penelitian.....	37
3.5 Cara Kerja	37

3.5.1 Ekstraksi Ultrasonik	37
3.5.2 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Etanol.....	38
3.5.3 Uji Fitokimia Senyawa Steroid	38
3.5.4 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT Preparatif	39
3.5.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Dua Dimensi.....	39
3.5.6 Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan DPPH	40
3.5.7 Identifikasi Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis.....	41
3.5.8 Identifikasi Steroid dengan FTIR.....	41
3.6 Analisis Data.....	42
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Rendemen Ekstrak Hasil Ultrasonik	43
4.2 Hidrolisis dan Rendemen Ekstrak Hasil Partisi	45
4.3 Fitokimia Hasil Partisi n-Heksana	47
4.4 Isolat Steroid Hasil KLT Preparatif	50
4.5 Isolat Steroid Hasil Uji Kemurnian KLT Dua Dimensi.....	53
4.6 Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLT Preparatif Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.....	55
4.7 Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLT Preparatif Menggunakan FTIR	57
4.8 Panjang Gelombang Maksimum DPPH.....	59
4.9 Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid.....	60
4.10 Pemanfaatan Alga Merah (<i>Eucheuma cottonii</i>) dalam Perspektif Islam	63
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	68
5.2 Saran	68
DAFTAR PUSTAKA	70
LAMPIRAN.....	84

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan <i>Eucheuma cottonii</i>	10
Tabel 2.2 Penelitian terdahulu tentang alga merah	11
Tabel 2.3 Tingkat kelarutan dan konstanta dielektrikum.....	15
Tabel 2.4 Ketentuan kekuatan antioksidan	28
Tabel 4.1 Hasil uji fitokimia pada fraksi n-heksana	48
Tabel 4.2 Hasil pemisahan KLT preparatif fraksi n-heksana eluen n-heksana:etil asetat perbandingan 17:3	50
Tabel 4.3 Hasil pemisahan steroid menggunakan KLT dua dimensi.....	54
Tabel 4.4 Interpretasi spektrum FTIR isolat 1, 3 dan 12 alga merah (<i>Eucheuma cottonii</i>).....	57
Tabel 4.5 Nilai EC ₅₀ isolat KLT preparatif alga merah (<i>Eucheuma cottonii</i>)	61

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Alga merah (<i>Eucheuma cottonii</i>)	8
Gambar 2.2 Struktur dasar steroid	12
Gambar 2.3 Struktur fitosterol senyawa steroid.....	13
Gambar 2.4 Dugaan reaksi hidrolisis geranyl- β -D-glucopyranoside.....	17
Gambar 2.5 Reaksi antara HCl dan natrium bikarbonat (NaHCO ₃)	17
Gambar 2.6 Jalur reaksi penambahan reagen <i>Liebermann-Burchard</i> pada kolesterol.....	20
Gambar 2.7 Produk hasil penambahan reagen <i>Liebermann-Burchard</i> pada kolesterol.....	21
Gambar 2.8 Pemisahan senyawa menggunakan KLT dua dimensi	24
Gambar 2.9 L-Asam askorbat (Vitamin C).....	25
Gambar 2.10 Spektrum UV-Vis steroid.....	30
Gambar 2.11 Spektrum UV-Vis tumbuhan paku <i>Christella arida</i> isolat fraksi etil asetat	30
Gambar 2.12 Spektrum UV-Vis <i>Eucheuma alvarevii doty</i> hasil uji kemurnian KLT dua dimensi	31
Gambar 2.13 Spektrum UV-Vis <i>Eucheuma cottonii</i>	31
Gambar 2.14 Spektrum FTIR steroid.....	32
Gambar 2.15 Spektrum FTIR steroid.....	33
Gambar 4.1 Hasil uji fitokimia alga merah (<i>Eucheuma cottonii</i>)	47
Gambar 4.2 Mekanisme reaksi reagen <i>Liebermann-Burchard</i> dengan senyawa steroid	49
Gambar 4.3 Hasil KLTP fraksi n-heksana dengan eluen n-heksana:etil asetat perbandingan 17:3.....	51
Gambar 4.4 (a) Isolat 1, (b) isolat 3 dan (c) isolat 12 setelah diamati dibawah lampu UV 366 nm setelah dielusi menggunakan variasi eluen (1) benzene:etil asetat dan variasi eluen (2) n-heksana:etil asetat.....	53
Gambar 4.5 Hasil spektra UV-Vis isolat 1, 3 dan 12 alga merah (<i>Eucheuma cottonii</i>).....	55
Gambar 4.6 Hasil spektra FTIR isolat 1, 3 dan 12 alga merah (<i>Eucheuma cottonii</i>)	58
Gambar 4.7 Panjang gelombang maksimum DPPH 0,2 mM.....	60
Gambar 4.8 Mekanisme reaksi dugaan steroid jenis fukosterol dengan DPPH.....	63
Gambar L.4.1 Hasil KLTP menggunakan eluen n-heksana:etil asetat (17:3).....	94
Gambar L.4.2 Hasil KLT dua dimensi (a) setelah disinari lampu UV (b) sebelum disinari lampu UV.....	95
Gambar L.4.4.1 Grafik % efektivitas antioksidan isolat 1	96
Gambar L.4.4.2 Grafik % efektivitas antioksidan isolat 3.....	97
Gambar L.4.4.3 Grafik % efektivitas antioksidan isolat 12.....	98
Gambar L.5.1.1 Spektra hasil UV-Vis isolat 1	99
Gambar L.5.1.2 Spektra hasil UV-Vis isolat 3	100
Gambar L.5.1.3 Spektra hasil UV-Vis isolat 12	101
Gambar L.5.2.1 Spektra hasil FTIR isolat 1	102
Gambar L.5.2.2 Spektra hasil FTIR isolat 3	102
Gambar L.5.2.3 Spektra hasil FTIR isolat 12	103
Gambar L.5.1.1 Spektra hasil FTIR overlay isolat 1, 3 dan 12.....	103

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir.....	84
Lampiran 2. Skema Kerja	85
Lampiran 3. Pembuatan Larutan	89
Lampiran 4. Data dan Hasil Pembahasan	93
Lampiran 5. Hasil Identifikasi.....	99
Lampiran 6. Dokumentasi.....	104

ABSTRAK

Rahmawati, Devi. 2021. **Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Fraksi n-Heksana Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi**. *Skripsi*. Program Studi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing: Suci Amalia, M.Sc.

Kata kunci: *Eucheuma cottonii*, antioksidan, ultrasonik, kromatografi lapis tipis, steroid

Alga merah *Eucheuma cottonii* merupakan tanaman laut salah satu jenis makro alga yang memiliki manfaat beragam. Senyawa steroid tergolong dalam senyawa lemak yang tersusun atas rantai karbon dengan 4 cincin, 3 cincin utama sikloheksana dan 1 cincin siklopentana. Tujuan penelitian dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan isolat steroid hasil kromatografi lapis tipis fraksi n-heksana.

Ekstraksi ultrasonik isolat *Eucheuma cottonii* dilakukan menggunakan pelarut etanol dengan rasio bahan : pelarut 1:10, waktu ekstraksi 42 menit pada suhu 25°C. Ekstrak kasar etanol yang didapat dihidrolisis menggunakan HCl 2 N dan di partisi menggunakan pelarut n-heksana. Hasil fraksi n-heksana kemudian diuji fitokimia menggunakan reagen *Liebermann-Burchard* yang akan menghasilkan cincin hijau apabila hasil fraksi tersebut mengandung steroid. Hasil pemisahan menggunakan kromatografi lapis tipis digunakan untuk uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

Uji fitokimia pada fraksi n-heksana menghasilkan cincin hijau yang menandakan bahwa positif mengandung steroid. Isolat hasil pemisahan KLT preparatif memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai EC_{50} isolat 1 adalah 80,11 ppm ($R^2 = 0,6809$), isolat 3 adalah 93,31 ppm ($R^2 = 0,5973$) dan isolat 12 adalah 160,85 ppm ($R^2 = 0,9401$). Hasil identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis memberikan serapan pada panjang gelombang 202 nm pada isolat 1, 204,1 nm pada isolat 3 dan 205,9 nm pada isolat 12. Hasil identifikasi FTIR menunjukkan adanya serapan pada gugus fungsi $-C_{sp^3}H$ alkana *stretching*, $-CH_2-$ simetri, $C-H$ *bending* asimetri, $-C-H=$ ikatan vinil hidrokarbon, serta $-(CH_2)_2-$ *rocking* serta $-CH_3$ simetri untuk gugus geminal dimetil yang merupakan gugus yang sering muncul pada senyawa steroid.

ABSTRACT

Rahmawati, Devi. 2021. **Antioxidant Activity Test of Steroid Isolates Result Thin Layer Chromatography (TLC) n-Hexane Fraction of Red Algae (*Eucheuma cottonii*) from Wongsorejo Aquatic Area of Banyuwangi.** *Thesis.* Chemistry Study Program, Science and Technology Faculty, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor: Suci Amalia, M.Sc.

Keywords: *Eucheuma cottonii*, antioxidant, ultrasonic, thin layer chromatography, steroid

The red algae (*Eucheuma cottonii*) is a marine plant, a type of macroalgae that has various benefits. Steroid compounds are classified as fatty compounds composed of carbon chains with 4 rings, 3 cyclohexane main rings and 1 cyclopentane ring. The aim of this study was to determine the antioxidant activity of steroid isolates from thin layer chromatography of n-hexane fraction.

Ultrasonic extraction of *Eucheuma cottonii* isolates was carried out using ethanol solvent with an ingredient: solvent ratio of 1:10, extraction time 42 minutes, temperature 25°C. The crude ethanol extract obtained was hydrolyzed using HCl 2 N and partitioned using n-hexane as solvent. The results of the n-hexane fraction were then tested for phytochemistry using a *Liebermann-Burchard* reagent which would produce a green ring if the fraction contained steroids. The separation results using thin layer chromatography were used to test antioxidant activity using the DPPH method and identified by UV-Vis spectrophotometer and FTIR.

Phytochemical test on the n-hexane fraction produced a green ring which indicated that it was positive for steroids. The isolates from the preparative TLC separation had antioxidant activity with EC₅₀ values of isolate 1 was 80,11 ppm ($R^2 = 0,6809$), isolate 3 was 93,31 ppm ($R^2 = 0,5973$) and isolate 12 was 160,85 ppm ($R^2 = 0,9401$). The result of identification using a UV-Vis spectrophotometer gave absorption at wavelength of 202 nm in isolate, 204,1 nm in isolate 3 and 205,9 nm in isolate 12. The result of FTIR identification showed the there was absorption of the functional $-C_{sp^3}H$ of alkanes stretching, $-CH_2-$ symmetry, C-H bending asymmetry, $-C-H=$ vinyl hydrocarbon bonds, and $-(CH_2)_2-$ rocking and $-CH_3$ symmetry for the geminal dimethyl group which is a group that often occurs in steroid compounds.

مستخلص البحث

رحموتي، ديفي. ٢٠٢١. إختبار نشيطة المضادة للأوكسدة عزل المنشطات حصيلة كروماتوغرافي الإطار الرقيق (KLT) فئة ن- الهكسان طحلب الأحمر (*Eucheuma cottonii*) من مياه وونجسورجو بانجوانجي. البحث العلمي. قسم، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرفة: سوجي أماليا الماجستير.

الكلمات المفتاح: (*Eucheuma cottonii*)، المضادة للأوكسدة، فوق الصوتية، كروماتوغرافي الإطار الرقيق (KLT)، المنشطات.

طحلب الأحمر (*Eucheuma cottonii*) هو زريعة البحر واحدة من أجناس ماكرو الطحلب التي تملك المنافع الأنواع. يتضمن مستحضر المنشطات إلى مستحضر الشحم الذي يشكل على جزيير الكاربون ب ٤ الخواتم، ٣ الخواتم الرئيسية سيكلو هكسان و ١ الخاتم سيكلو بنتان. يفعل هدف البحث لمعرفة نشيطة المضادة للأوكسدة عزل المنشطات حصيلة كروماتوغرافي الإطار الرقيق (KLT) فئة ن- الهكسان.

يفعل انسحاب فوق الصوتية عزل (*Eucheuma cottonii*) ان يستخدم مذيب الإيثانول بنسبة المادة: مذيب ١:١٠، وقت الإنسحاب ٤٢ دقائق في الدرجة الحرارة ٢. انسحاب الأجل الإيثانول الذي ينال الهدروليكي يستخدم (HCl ٢ N) ويقسم ان يستخدم مذيب ن-الهكسان. وبالتالي، تختبر حصيلة فئة ن-الهكسان كيميائيا نباتيا يستخدم الكاشف (*Liebermann-Burchard*) الذي سيحصل الخاتم الأخضر إذا تلك حصيلة الفئة تحمل المنشطات. تستخدم حصيلة الإنفصال كروماتوغرافي الإطار الرقيق ويستخدم لإختبار نشيطة المضادة للأوكسدة بطريقة (DPPH) وتعرف بمقياس الطيف الضوئي (UV-Vis) و (FTIR).

يحصل إختبار الكيميائي النباتي في فئة ن-الهكسان خاتما أزرقا الذي يرمز أن الواثق يحتوي المنشطات. العزل حاصل إنفصال (KLT) الإعدادي الذي يملك نشيطة المضادة للأوكسدة بقيمة (EC50) عزل ١ هو ٨٠،١١ ف ف م (ر² = ٠،٩٤٠١)، عزل ٣ هو ٩٣،٣١ ف ف م (ر² = ٠،٥٩٧٣)، وعزل ١٢ هو ١٦٠،٨٥ ف ف م (ر² = ٠،٩٤٠١). تستخدم حصيلة التعرف مقياس الطيف الضوء (UV-Vis) ويستخدم النفس في طول موج ٢٠٢ ن م في عزل ١، ٢٠٤،١ ن م. في عزل ٣ و ٢٠٥،٩ ن م في عزل ١٢. تدل حصيلة التعرف (FTIR) كون النفس في قوة الوظيفة (C_{sp}³H-) تمتد الألكان، (CH₂-) التناسق، (C-H) الأثناء غير المتماثل، (C-H=) إرتباط الفينيل الهدروكربوني، و (CH₂)₂-) التهز، و (CH₃-) التناسق لقوة ثنائي ميثيل الجوزاء التي هي القوة كثير الظهر في مستحضر المنشطات.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang memiliki potensi hasil laut besar meliputi sumber daya hayati, energi dan mineral karena sebagian luas dari kawasan Indonesia adalah perairan. Potensi laut tersebut yang dapat kita manfaatkan salah satunya adalah alga. Alga merupakan jenis tumbuhan yang tidak dapat terbedakan antara batang, daun dan akar. Oleh karena itu, sering disebut sebagai tumbuhan *thallus* yang memiliki tingkat keanekaragaman tinggi. Salah satu jenis alga yang sering dibudidayakan adalah alga merah karena dapat dimanfaatkan dan dapat bernilai ekonomi tinggi dalam industri makanan, farmasi dan kosmetik (Muawanah dkk., 2016).

Allah SWT berfirman dalam surat al An'am ayat 99:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرِجُ مِنْهُ
حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا
وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ ۗ انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ۗ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ﴿٩٩﴾

Artinya: “Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman.” (QS. al An'am : 99).

Surat al An'am ayat 99 menjelaskan bagaimana Allah SWT telah menurunkan air hujan dari langit untuk menumbuhkan segala sesuatu yang ada di bumi dan menghidupkan tanaman-tanaman yang bermanfaat. Atas kemurahan dan kekuasaan-Nya, Allah SWT telah menciptakan, menumbuhkan bahkan menghidupkan berbagai tumbuhan yang sangat berguna bagi para makhluk-Nya. Semua itu mengandung tanda-tanda yang jelas bagi orang-orang yang beriman.

Alga merah (*Eucheuma cottonii*) merupakan salah satu tumbuhan bersel banyak (multiseluler) karena mengandung senyawa-senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid, steroid, glikosida (Arsianti dkk., 2018), alkaloid, triterpenoid (Khurniasari, 2004), saponin (Malathi dkk., 2017) dan sifat antiproliferatif polifenol sebagai quercetin, catechin dan rutin (Shamsabadi dkk., 2013). Penelitian Sharo dkk., (2013) tentang identifikasi senyawa dan uji toksisitas ekstrak *Eucheuma cottonii* menyatakan bahwa salah satu senyawa yang dominan terdapat dalam alga jenis alga merah (*Rhodophyceae*) yaitu senyawa steroid dibandingkan dengan metabolit sekunder yang lain. Hasil penelitian Siregar dkk., (2012) yang mengidentifikasi 12 ekstrak rumput laut menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan metanol menunjukkan bahwa senyawa metabolit sekunder yang dominan adalah golongan steroid.

Alga merah (*Eucheuma cottonii*) dapat diekstraksi menggunakan metode ultrasonik dengan pelarut etanol. Proses ekstraksi ultrasonik dilakukan menggunakan perbandingan bahan dan pelarut sebesar 1:10 pada suhu ruang selama 42 menit yang merupakan waktu ekstraksi terbaik menurut Hadiyanto & Sutrisnorhadi (2016). Penelitian Handayani dkk., (2016) pada daun sirsak menggunakan variasi rasio bahan dan pelarut (1:5, 1:10 dan 1:15) dengan ekstraksi

ultrasonik menunjukkan hasil terbaik terdapat pada rasio 1:10. Penelitian Ardianti & Kusnadi (2013) pada daun berenuk menggunakan metode ekstraksi ultrasonik dengan variasi rasio bahan dan pelarut juga menghasilkan perlakuan terbaik terdapat pada variasi 1:10.

Penelitian yang dilakukan Sari dkk., (2018) pada kandungan total fenolik pada rumput laut *Eucheuma cottonii* menggunakan metode ultrasonik dan pelarut etanol menghasilkan *total phenolic content* (TPC) yang lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan metode konvensional yaitu sebesar 934,054 mg GAE/g. Ekstrak kasar kemudian dihidrolisis menggunakan HCl 2 N bertujuan untuk memisahkan gula (glikon) dari hasil ekstraksi dengan senyawa metabolit sekunder (aglikon) (Asih, 2009). Partisi pada ekstrak dilakukan menggunakan pelarut non polar yaitu n-heksana yang diharapkan senyawa steroid dapat terpisah dengan senyawa polar dan akan lebih terdistribusi pada fase non polar (Pramana & Saleh, 2013). Selanjutnya dilakukan uji fitokimia menggunakan reagen *Liebermann-Burchard* (Kristanti, 2008). Penelitian yang dilakukan Pramitania (2019) pada *Eucheuma cottonii* pada fraksi n-heksana positif mengandung steroid ketika diuji fitokimia menggunakan reagen *Liebermann-Burchard*.

Fraksi non polar hasil partisi pelarut n-heksana ekstrak etanol alga merah perlu dilakukan isolasi lebih lanjut karena masih berupa senyawa campuran. Untuk pemisahan senyawa tersebut, ekstrak di elusi menggunakan KLT preparatif dengan menggunakan variasi eluen n-heksana : etil asetat dengan perbandingan tertentu. Hasil isolat KLT preparatif yang mengandung senyawa steroid kemudian dilakukan pengerokan dan diuji aktivitas antioksidan. Sinulingga (2011) melakukan penelitian terhadap karakterisasi dan isolasi akar tanaman ekor naga dan diperoleh bahwa

senyawa steroid dapat dipisahkan dengan baik menggunakan perbandingan n-heksana dan etil asetat. Penelitian Al-Quais (2015) pada ekstrak akar rumput bambu (*Lophaterum gracile* B.) menggunakan eluen n-heksana dan etil asetat pada KLT preparatif untuk memisahkan isolat steroid, hasil terbaik terdapat pada perbandingan 8:2 dengan menghasilkan 11 noda. Ningsih dkk., (2015) menggunakan eluen n-heksana dan etil asetat dengan berbagai macam perbandingan pada pemisahan dan identifikasi senyawa steroid pada alga merah hasil fraksi n-heksana dan menghasilkan eluen n-heksana dan etil asetat (17:3) yang memiliki pemisahan terbaik.

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat memperlambat, menunda bahkan mencegah proses terjadinya oksidasi dan sangat bermanfaat bagi kesehatan (Tamat dkk., 2007). Penggunaan antioksidan sintetis pada bahan pangan seperti *buthylatedhydroxytoluena* (BHT) dan *buthylatedhydroxyanisole* (BHA) yang tidak terkontrol dengan baik dan terlalu berlebihan menyebabkan racun bagi tubuh. Oleh karena itu, dibutuhkan antioksidan alami sebagai penambah asupan antioksidan dengan memanfaatkan alga laut yang merupakan salah satu tanaman yang dapat menjadi sumber antioksidan alami (Sari dkk., 2018). Penelitian yang dilakukan Suryaningrum dkk., (2006) terhadap rumput laut *Eucheuma cottonii* dan *Halymenia harveyana*, bahwa dalam ekstrak *Eucheuma cottonii* banyak terkandung antioksidan dengan aktivitas toksisitas yang tinggi terhadap *Artemia salina*. Begitu pula terdapat senyawa-senyawa antioksidan mirip BHT (butil hidroksi toluene), hidrokarbon aromatis dan ester pada ekstrak *Halymenia harveyana*. Sambodo (2019) melakukan penelitian terhadap aktivitas antioksidan pada alga merah

(*Eucheuma cottonii*) dengan kombinasi *Citrus limon* dan diperoleh aktivitas antioksidan ekstrak metanol *Eucheuma cottonii* yaitu sebesar 345,514 ppm.

Metode DPPH dapat digunakan sebagai pengujian aktivitas antioksidan. Metode ini dinilai sangat mudah, sederhana, stabil, cepat, akurat dan dapat dilakukan dengan sampel yang sedikit (Kedare & Singh, 2011). Hal ini sesuai untuk komponen antioksidan yang bersifat polar karena kristal DPPH hanya dapat memberikan absorbansi maksimum dan larut pada pelarut metanol dan etanol. Parameter konsentrasi inhibisi (IC_{50}) atau efisiensi (EC_{50}) (konsentrasi substrat untuk menghasilkan 50% reduksi dari DPPH) digunakan untuk menunjukkan aktivitas antioksidan (Molyneux, 2004). Apabila nilai EC_{50} semakin rendah, hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan semakin besar (Matuszewska dkk., 2018). Damongilala dkk., (2013) mengekstrak rumput laut *Eucheuma cottonii* dan *Eucheuma spinosum* dalam bentuk segar dan kering yang diambil dari perairan Sulawesi Utara dengan pelarut metanol kemudian menguji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH dan didapatkan hasil bahwa kedua ekstrak rumput laut tersebut memiliki aktivitas antioksidan.

Penelitian sebelumnya telah melakukan uji aktivitas antioksidan isolat steroid dari alga merah (*Eucheuma cottonii*) menggunakan metode konvensional. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan ekstraksi senyawa steroid menggunakan metode ultrasonik dengan partisi menggunakan pelarut n-heksana dan dilakukan pemisahan menggunakan kromatografi lapis tipis. Hasil uji aktivitas antioksidan yang terbaik akan ditunjukkan dengan nilai EC_{50} terendah yang kemudian dilakukan proses identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis

yang berfungsi untuk mengetahui panjang gelombang maksimum dan FTIR untuk mengetahui gugus fungsi.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas antioksidan alga merah (*Eucheuma cottonii*) isolat steroid hasil KLT preparatif menggunakan metode DPPH?
2. Bagaimana hasil identifikasi alga merah (*Eucheuma cottonii*) isolat steroid hasil KLT preparatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR?

1.3 Tujuan

1. Untuk mengetahui aktivitas antioksidan alga merah (*Eucheuma cottonii*) isolat steroid hasil KLT preparatif menggunakan metode DPPH.
2. Untuk mengetahui hasil identifikasi alga merah (*Eucheuma cottonii*) isolat steroid hasil KLT preparatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR?

1.4 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah alga merah (*Eucheuma cottonii*) dari perairan Wongsorejo Banyuwangi.
2. Metode ekstraksi menggunakan metode ultrasonik dengan pelarut etanol rasio bahan : pelarut 1:10.
3. Hidrolisis menggunakan HCl 2 N serta partisi menggunakan n-heksana.
4. Pemisahan isolat steroid fraksi n-heksana alga merah (*Eucheuma cottonii*) dengan kromatografi lapis tipis preparatif.

5. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil).
6. Instrumen yang digunakan untuk identifikasi steroid yaitu spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan dan informasi ilmiah tentang potensi alga merah (*Eucheuma cottonii*) sebagai salah satu tanaman laut yang memiliki khasiat sebagai antioksidan alami.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga (Rumput Laut) Merah

Rumput laut merupakan salah satu makro alga yang bermanfaat bagi kehidupan. Alga (jamak *Algae*) merupakan biota laut yang disebut *thallus* karena tidak memiliki daun, batang dan daun sejati tetapi hanya menyerupai batang yang umumnya tumbuh dan melekat pada substrat tertentu. Alga tumbuh dan melekatkan diri secara spesifik pada pasir, batu karang lumpur dan tumbuhan lain (Anggadiredja dkk., 2006). Umumnya alga sering membentuk filament (benang), memiliki susunan tubuh bersel banyak (*multiseluler*), bahkan ada yang bersel tunggal (*uniseluler*) (Hidayat, 1990).



Gambar 2.1 Alga merah (*Eucheuma cottonii*) (Arsianti dkk, 2020)

Menurut Doty (1985), *Eucheuma cottonii* merupakan salah satu jenis rumput laut merah (*Rhodophyceae*) dan berubah nama menjadi *Kappaphycus alvarezii* karena keraginan yang dihasilkan termasuk fraksi kappa-keraginan. Maka jenis ini secara taksonomi disebut *Kappaphycus alvarezii*.

Kingdom : Plantae
 Divisi : Rhodophyta
 Kelas : Rhodophyceae
 Ordo : Gigartinales
 Famili : Solieracea
 Genus : Eucheuma
 Species : *Eucheuma alvarezii* (*Eucheuma cottonii*)

Afif dkk., (2015) melakukan uji taksonomi pada alga merah dan menunjukkan bahwa ciri-ciri tersebut mirip dengan jenis alga merah *Eucheuma cottonii* menurut Aslan (1998) yaitu berwarna merah, permukaan licin, *thallus* silindris yang berbentuk kompleks dan duri runcing tajam, *cartilogeneus* (menyerupai tulang rawan/muda), dan percabangan ke berbagai arah dengan batang utama keluar saling berdekatan ke arah pangkal (basal).

Allah SWT berfirman dalam surat az Zumar ayat 21:

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَسَلَكَهُ يَنَابِيعَ فِي الْأَرْضِ ثُمَّ يُخْرِجُ بِهِ زَرْعًا مُخْتَلِفًا
 أَلْوَانُهُ ثُمَّ يَهَيِّجُ فَتَرَاهُ مُصْفَرًّا ثُمَّ يَجْعَلُهُ حُطَامًا إِنَّ فِي ذَلِكَ لَذِكْرًا لِأُولِي الْأَلْبَابِ (الزمر : ٢١)

Artinya: “Apakah kamu tidak memperhatikan, bahwa sesungguhnya Allah menurunkan air dari langit, Maha diaturnya menjadi sumber-sumber air di bumi kemudian ditumbuhkan-Nya dengan air itu tanam-tanaman yang bermacam-macam warnanya, lalu menjadi kering lalu kamu melihatnya kekuning-kuningan, kemudian dijadikan-Nya hancur berderai-derai. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat pelajaran bagi orang-orang yang mempunyai akal.” (QS. az Zumar : 21).

Lafadz زَرْعًا مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ diartikan sebagai tanaman yang memiliki warna bermacam-macam. Lafadz tersebut menunjukkan kepada jenis tumbuhan yang memiliki berbagai macam warna seperti putih, hijau, kuning, biru dan merah (Qurthubi, 2009). Alga merah jenis *Eucheuma cottonii* merupakan salah satu tanaman laut yang memiliki warna merah.

Alga merah (*Eucheuma cottonii*) mengandung mineral, lemak, α -tokoferol, karbohidrat dan vitamin C (Wandansari, 2013) yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber minuman, makanan serta obat-obatan (Elena dkk., 2018; Madjid dkk., 2020). Selain itu dapat juga digunakan sebagai antioksidan (Nurjanah dkk., 2017; Yanuarti dkk., 2017; Sambodo, 2019), radioaktif alami (Khandaker dkk., 2019), antibakteri (Selim, 2012; Chairunisa & Indradi, 2019), antivirus (Manilal dkk., 2009), antijamur (Khanzada dkk., 2007), antiinflamasi (Prasasty dkk., 2019) dan antitumor (Zandi dkk., 2010). Penelitian Matanjun dkk., (2009) tentang kandungan nutrisi pada rumput laut jenis *Eucheuma cottonii* yang tumbuh di daerah tropis didapati bahwa rumput laut tersebut dapat dikonsumsi dan bermanfaat bagi kesehatan ditunjukkan pada Tabel 2.1 sebagai berikut:

Tabel 2.1 Kandungan *Eucheuma cottonii*

Kandungan	Jumlah (%)
Kadar air	10,55
Protein	9,76
Lipid	1,10
Karbohidrat	26,49
Serat kasar	5,91
Abu	46,19

Hasil penelitian Afif dkk., (2015) pada ekstrak *Eucheuma cottonii* menunjukkan bahwa terdapat metabolit sekunder antara lain alkaloid, steroid dan flavonoid. Mardaneni (2017) mengidentifikasi ekstrak *Eucheuma cottonii* dan ternyata menghasilkan cincin warna hijau pada ekstrak metanol. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak *Eucheuma cottonii* mengandung senyawa metabolit sekunder golongan steroid.

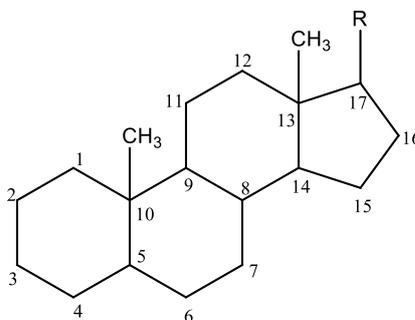
Tabel 2.2 Penelitian terdahulu tentang alga merah

Nama Peneliti	Tahun	Metabolit Sekunder	Hasil Penelitian
Anam, Khoirul	2015	Triterpenoid	Isolat hasil pemisahan dengan KLT preparatif memiliki serapan panjang gelombang 238,50 dan 253,50 nm ketika diuji dengan spektrofotometer UV-Vis, yang memungkinkan isolat tersebut mengandung senyawa golongan triterpenoid.
Sholikah, Arieska Nurul Lailaitus	2016	Steroid	Isolasi steroid dari <i>Eucheuma spinosum</i> menghasilkan kelompok fraksi yang lebih banyak ketika menggunakan pengisian adsorben cara basah dibandingkan pengisian adsorben cara kering pada kromatografi kolom.
Huda, Mochammad Sahrul	2019	Steroid	Pengujian antioksidan menggunakan metode DPPH pada sampel dengan variasi pengeringan hanya menghasilkan perubahan warna dari ungu tua menjadi ungu muda dan tidak menghasilkan perubahan warna dari ungu menjadi kuning.
Mardaneni, Isma	2017	Steroid	Hasil KLT preparatif fraksi etil asetat <i>Eucheuma cottonii</i> ekstrak metanol menghasilkan 5 noda yang diduga sebagai senyawa steroid ketika di elusi menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (17:3)
Sari, Denni Kartika	2018	Flavonoid	<i>Eucheuma cottonii</i> diekstrak menggunakan metode maserasi, ultrasonik dan microwave. Hasil penelitian didapatkan bahwa metode ekstraksi ultrasonik dengan pelarut etanol pada konsentrasi 50% memiliki Total Phenolic Compound (TPC) terbaik yaitu sebesar 961,081 mgGAE/g ekstrak.
Lantah, Puji L	2017	-	Aktivitas antioksidan alga merah (<i>Kappaphycus alvarezii</i>) ekstrak metanol memberikan hasil yang sangat lemah sebesar 163.819,99 ppm dimana nilai $IC_{50} > 200$ ppm saat diuji menggunakan DPPH.

2.2 Senyawa Steroid

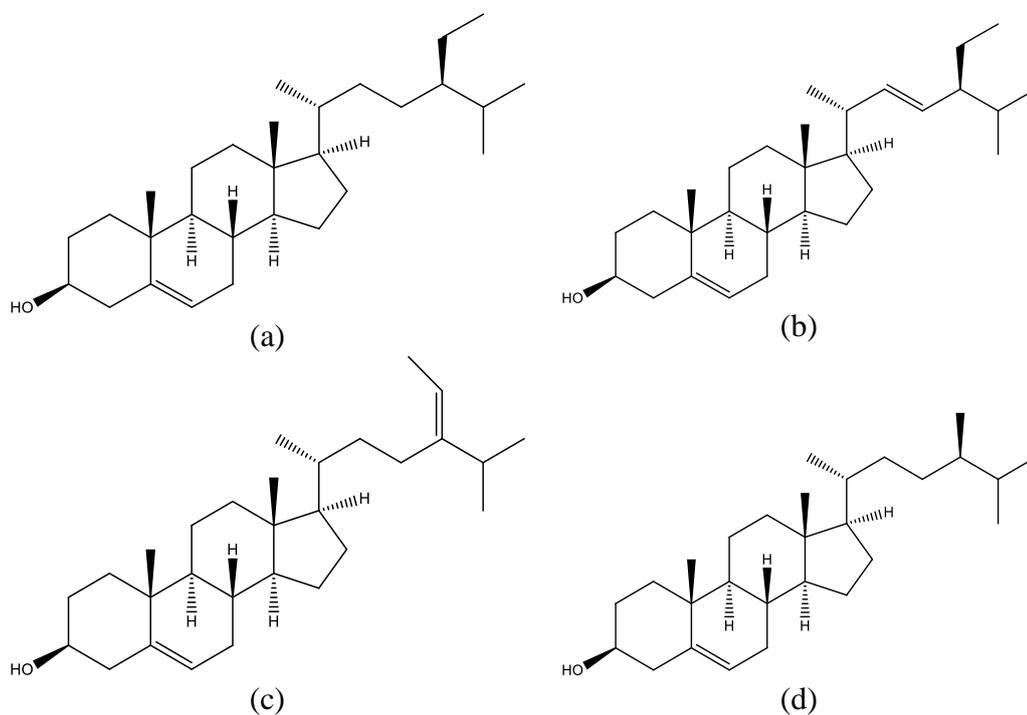
Steroid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada alga merah (*Eucheuma cottonii*) (Miftahurrahmah dkk., 2013). Sterol merupakan turunan senyawa steroid yang paling banyak keberadaannya (Poedjiadi, 1994). Senyawa steroid yang dimiliki oleh tumbuhan disebut dengan fitosterol, pada hewan disebut dengan zoosterol serta pada fungi (jamur) disebut dengan mikosterol. Fungsi lain steroid yaitu sebagai hormon disamping digunakan sebagai alat perlindungan diri dari hama dan penyakit. Hormon turunan dari senyawa steroid diantaranya progesteron, ergosterol, kolesterol dan estrogen (Poedjiadi, 1994).

Senyawa steroid dapat beraktivitas sebagai antioksidan yang tinggi. Penelitian Krisna dkk., (2014) pada isolat steroid ekstrak daun gayam (*Inocarpus fagiferus Fosb*) memiliki nilai IC_{50} sebesar 4 ppm terhadap DPPH. Hal ini menunjukkan bahwa isolat steroid ekstrak daun gayam (*Inocarpus fagiferus Fosb*) memiliki aktivitas antioksidan. Selain itu, steroid dapat memberikan aktivitas toksisitas yang tinggi. Hal ini dibuktikan oleh Millati (2016) yang melakukan penelitian pada isolat steroid fraksi petroleum eter *Chlorella sp* memiliki sifat toksik terhadap larva udang dengan nilai LC_{50} sebesar 19,68 ppm yang dihasilkan dari KLT preparatif.



Gambar 2.2 Struktur dasar steroid (Moss, 1989)

Menurut Lopes dkk., (2011) beberapa alga memiliki jenis steroid yang bermacam-macam diantaranya stigmasterol, kampesterol, β -sitosterol, fukosterol, desmosterol dan kolesterol. Hasil penelitian Huda (2019) didapatkan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak alga merah *Eucheuma cottonii* merupakan senyawa steroid yang dibuktikan dengan terbentuknya warna hijau/biru dan senyawa triterpenoid yang dibuktikan dengan cincin coklat di perbatasan dua pelarut. Penelitian yang dilakukan Luki (2018) menyatakan bahwa *Eucheuma cottonii* mengandung senyawa steroid diantaranya demosterol, fukosterol, β -sitosterol, kampesterol dan stigmasterol. Luthfiyah (2017) dalam penelitiannya menggunakan LC-MS pada *Eucheuma cottonii* ditemukan senyawa steroid jenis demosterol, fukosterol dan β -sitosterol yang berurutan kepolarannya. Struktur fitosterol senyawa steroid ditampilkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Struktur fitosterol senyawa steroid, (a) β -sitosterol, (b) stigmasterol, (c) fukosterol dan (d) kampesterol (Luo dkk., 2015)

2.3 Ekstraksi Senyawa Steroid

Ekstraksi ultrasonik atau biasa dikenal sebagai *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE) memiliki prinsip kerja yaitu gelombang ultrasonik yang merambat secara longitudinal dalam medium pelarut dari sumber getaran sonikator dengan frekuensi lebih besar dari 16-20 kHz (Suslick, 1989). Apabila gelombang tersebut merambat melalui medium cair akan menyebabkan pembentukan gelembung mikro dan peregangan pada molekul air yang akan pecah dan melepaskan energi yang besar jika terus menerima energi dari gelombang ultrasonik, inilah yang disebut dengan kavitasi. Kavitasi dengan energi yang besar dapat menumbuk dinding sel dan memperbesar diameter pori-pori bahan yang akan diekstrak. Sehingga pori-pori bahan akan membesar, kemudian pelarut akan dengan mudah menembus bahan dan melarutkan senyawa yang terkandung pada bahan dengan proses difusi. Efek lain yang ditimbulkan dari gelombang ultrasonik yaitu terjadinya proses pemanasan pada bahan dan pelarut akibat dari gelombang ultrasonik yang dihasilkan (Alupului dkk., 2009).

Kelebihan metode ekstraksi ultrasonik dibandingkan dengan metode konvensional yaitu lebih aman (Zou dkk., 2014), lebih cepat (García & Castro, 2004), dapat mengeluarkan ekstrak dari bahan yang diuji tanpa merusak strukturnya (Babaei dkk., 2006), dapat mencegah menguapnya dan hilangnya senyawa yang memiliki titik didih rendah (Handaratri & Yuniati, 2019), meningkatkan rendemen (Supardan dkk., 2012), perusakan sel, transfer massa serta peningkatan penetrasi pelarut dan efek kapiler sehingga senyawa aktif pada sampel dapat terekstrak secara maksimal (Asbahani dkk., 2015). Faktor yang dapat mempengaruhi kinerja ekstraksi yaitu suhu, jenis pelarut, lama ekstraksi, pH, jumlah ekstraksi, media

ekstraksi, ukuran partikel dan degradasi senyawa selama ekstraksi (Savova dkk., 2007).

Penentuan dan pemilihan pelarut organik yang akan digunakan dalam ekstraksi senyawa aktif merupakan faktor penting dalam tercapainya sasaran dan tujuan ekstraksi pada senyawa aktif tersebut. Pelarut akan semakin memiliki sifat polar apabila nilai konstanta dielektrik, kelarutan dalam air dan titik didih semakin tinggi (Sax, 1998). Sifat fisik dari beberapa jenis pelarut organik yang dapat digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Tingkat kelarutan dan konstanta dielektrikum beberapa pelarut organik

Jenis Pelarut	Konstanta Dielektrikum	Tingkat Kelarutan dalam Air	Titik Didih (°C)
Petroleum eter	2,28	TL	60
Kloroform	4,81	S	61,3
Etil asetat	6,02	S	77,1
Butanol	15,80	S	117,2
Etanol	24,30	L	78,5
Metanol	33,60	L	64
Air	78,4	L	100

Keterangan: TL = tidak larut; S = sedikit larut; L = larut dalam berbagai proporsi

Pemilihan etanol sebagai pelarut dikarenakan etanol memiliki polaritas yang tinggi sehingga dapat mengekstrak lebih banyak senyawa aktif pada sampel dibandingkan jenis pelarut organik yang lain. Selain itu, etanol tidak terlalu berbahaya dan beracun sehingga dinilai lebih aman untuk ukuran pelarut (Sudarmadji dkk., 1989). Penelitian Sharo dkk., (2013) pada *Eucheuma cottonii* menghasilkan rendemen ekstrak etanol 96% sebesar 1,13%. Mufadal (2015) mengekstrak alga merah *Eucheuma cottonii* menggunakan pelarut etanol 95% menghasilkan rendemen ekstrak pekat sebesar 3,60%.

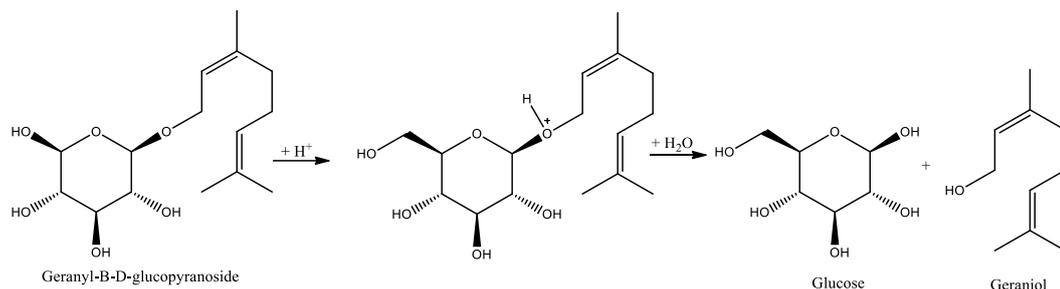
2.4 Hidrolisis Glikosida

Hidrolisis merupakan proses dekomposisi kimia untuk membentuk bagian-bagian yang lebih sederhana dengan memutus ikatan glikosida yang menjadi penghubung antar monomer melalui reaksi menggunakan air (H_2O) (Adhiatama dkk., 2012). Reaksi hidrolisis dilakukan pada senyawa organik untuk memutus ikatan glikosida menjadi senyawa glikon dan aglikon. Glikosida merupakan senyawa yang terdiri dari gabungan bagian bukan gula (aglikon) yang dapat bersifat non polar, semipolar maupun polar (senyawa metabolit sekunder) dan bagian gula (glikon) yang bersifat polar. Adapun fungsi glikosida pada tanaman adalah sebagai petunjuk sistemik, menjaga diri dari adanya gangguan dari luar dan cadangan gula temporer (Gunawan, 2004).

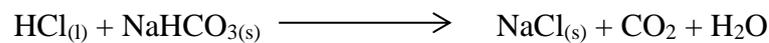
Adanya perubahan struktur yang dialami suatu senyawa ke bentuk glikosidanya akan menyebabkan senyawa tersebut mengalami perubahan sifat kimia, fisika dan aktivitas biologi. Suatu senyawa akan cenderung bersifat polar apabila terdapat banyak ikatan glikosidanya, sehingga pada saat proses ekstraksi senyawa tersebut lebih terekstrak pada pelarut-pelarut yang bersifat polar. Disamping itu senyawa yang terikat dengan ikatan glikosidanya akan cenderung tertahan pada fase diamnya sehingga lebih sulit untuk dipisahkan menggunakan KLT (Saifudin dkk., 2006).

Proses hidrolisis antara air dengan selulosa berjalan sangat lambat sehingga dibutuhkan beberapa pilihan katalis. Salah satu katalis asam yang digunakan yaitu HCl. HCl dipilih karena sifatnya yang lebih reaktif dibandingkan H_2SO_4 , mudah menguap sehingga mudah diuapkan dari produknya, mudah didapatkan, murah dan memiliki efektivitas mempercepat reaksi yang sedang berlangsung (Wahyudi dkk.,

2011). Menurut Tasic dkk., (2009) penggunaan HCl 2 N pada hidrolisis asam akan menghasilkan laju konsentrasi yang lebih baik dibandingkan menggunakan HCl 1 M. Penambahan natrium bikarbonat (NaHCO_3) yang bersifat basa pada reaksi hidrolisis asam perlu dilakukan karena reaksi tersebut berjalan secara *reversible*, sehingga perlu untuk dihentikan agar tidak terbentuk kembali ikatan glikon dan aglikonnya (Handoko, 2006).



Gambar 2.4 Dugaan reaksi hidrolisis geranyl-β-D-glucopyranoside (Ferreira & Lopez, 2019)



Gambar 2.5 Reaksi antara HCl dan natrium bikarbonat (NaHCO_3) (Mardiyah dkk, 2014)

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Artati (2012) pada pelepah pisang yang di hidrolisis menggunakan H_2SO_4 dan HCl didapatkan kadar gula yang tinggi apabila menggunakan HCl dengan konsentrasi 2 N. Konsentrasi asam yang semakin tinggi maka akan semakin banyak hasil yang diperoleh. Konsentrasi 2 N merupakan konsentrasi optimum untuk melakukan hidrolisis. Hidrolisis asam menggunakan H_2SO_4 menghasilkan gula sebesar 8,2 gram dengan kecepatan reaksi hidrolisis sebesar 0,0043/menit dan ketika di hidrolisis menggunakan HCl menghasilkan gula 9 gram dengan kecepatan reaksi hidrolisis sebesar 0,0066/menit.

2.5 Partisi

Partisi atau sering dikenal dengan istilah ekstraksi cair-cair merupakan salah satu jenis ekstraksi dengan menggunakan prinsip adanya kelarutan suatu zat diantara dua pelarut yang tidak saling bercampur satu sama lain, sebagian komponen akan larut pada fase pertama dan sebagiannya lagi akan larut pada fase kedua. Adapun pelarut yang digunakan harus memiliki sifat yang sama atau kepolaran yang sama dengan sampel yang akan diekstraksi dan harus dapat terpisah secara pengocokan yang ditandai dengan terbentuknya dua lapisan yang tidak saling bercampur (Khopkar, 1990). Menurut Dewi dkk., (2010) kelebihan metode partisi atau ekstraksi cair-cair ini adalah waktu uji yang akan relatif cepat dan dapat memperoleh komponen bioaktif yang lebih spesifik.

Partisi dilakukan untuk memisahkan senyawa gula (glikon) yang bersifat polar dan senyawa non gula (aglikon) bersifat non polar yang mengandung steroid (Handoko, 2006). Senyawa gula (glikon) akan terekstrak pada fase air, sedangkan senyawa non gula (aglikon) akan terekstrak pada fase organik. Senyawa steroid termasuk dalam golongan senyawa yang bersifat non polar sehingga n-heksana biasanya digunakan untuk proses ekstraksi karena memiliki sifat kepolaran yang sama (Kristanti, 2008). Menurut Pramana & Saleh (2013) penggunaan n-heksana pada saat partisi sebagai pelarut non polar akan dengan mudah mengekstraksi steroid karena memiliki sifat yang sama sehingga akan lebih mudah untuk melanjutkan ke tahap selanjutnya.

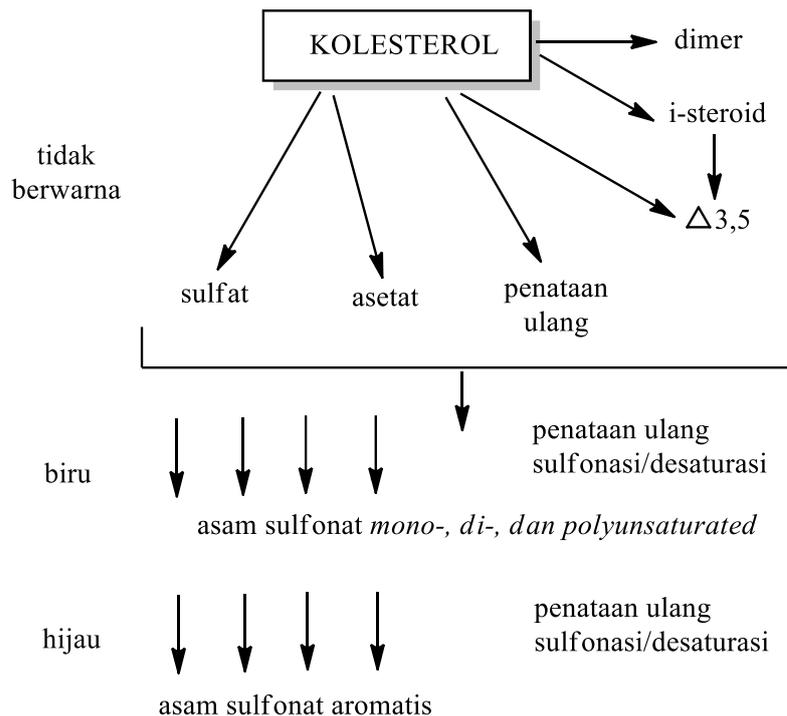
Berdasarkan penelitian yang dilakukan Lailah (2014) menghasilkan nilai rendemen ekstrak pekat fraksi n-heksana pada *Sargassum cristaeifolium* sebesar 4,43%. Nilai tersebut lebih besar dibandingkan dengan nilai rendemen ekstrak

pekat pada fraksi kloroform dan etil asetat. Sedangkan penelitian Pramitania (2019) pada ekstrak metanol *Eucheuma cottonii* yang di partisi menggunakan pelarut n-heksana didapatkan rendemen ekstrak sebesar 11,52%. Hal ini menandakan bahwa banyak senyawa non polar dalam senyawa yang ikut terekstrak karena sifat n-heksana yang merupakan pelarut non polar.

2.6 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

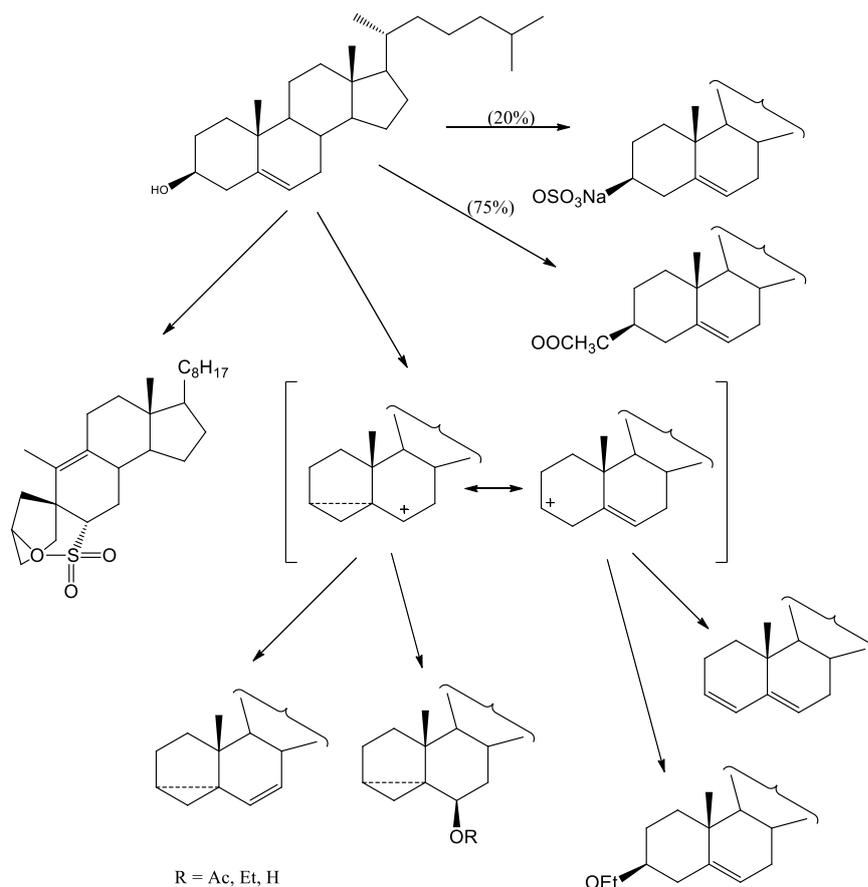
Uji fitokimia digunakan pada tahapan awal untuk menentukan suatu golongan senyawa yang terdapat pada suatu hewan atau tumbuhan. Pengujian metode fitokimia secara umum yaitu reaksi pengujian warna (*spot test*) dengan suatu pereaksi atau reagen warna dan pemisahannya. Adapun prinsip dari pengujian fitokimia yaitu terjadinya reaksi yang menghasilkan warna atau perubahan warna ketika diberikan suatu reagen. Reagen *Liebermann-Burchard* biasanya digunakan pada uji senyawa steroid yang ditandai dengan terbentuknya warna biru (Kristanti, 2008).

Penelitian yang dilakukan Sharo dkk., (2013) pada ekstrak n-heksana dari alga merah (*Eucheuma cottonii*) menunjukkan positif steroid yang ditandai dengan warna hijau kebiruan ketika diuji fitokimianya menggunakan reagen *Liebermann-Burchard*. Begitupun pada penelitian yang dilakukan Mardaneni (2017) menghasilkan identifikasi steroid pada alga merah (*Eucheuma cottonii*) menggunakan reagen *Liebermann-Burchard* yang memberikan hasil positif yaitu terbentuknya cincin warna hijau.



Gambar 2.6 Jalur reaksi penambahan reagen *Liebermann-Burchard* pada kolesterol (Xiong dkk., 2007)

Xiong dkk., (2007) mereaksikan senyawa steroid golongan kolesterol dengan reagen *Liebermann-Burchard* yang terdiri dari asam asetat anhidrida dan asam sulfat dalam pelarut kloroform menghasilkan produk mayor berupa kolesteril sulfat dan kolesteril asetat serta produk minor berupa hasil penataan ulang dan 3,5-kolestadiena, dimer dan i38 steroid yang selanjutnya secara perlahan akan mengalami reaksi sulfonasi dan desaturasi membentuk asam sulfonate polienu. Selanjutnya asam sulfonat polienu mengalami sulfonasi dan desaturasi kembali untuk membentuk senyawa asam sulfonat aromatis. Adapun jalur reaksi serta produk yang dihasilkan saat penambahan reagen *Liebermann-Burchard* pada kolesterol ditampilkan pada Gambar 2.6 dan 2.7.



Gambar 2.7 Produk hasil penambahan reagen *Liebermann-Burchard* pada kolesterol (Xiong dkk., 2007)

2.7 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pemisahan senyawa steroid dari hasil fraksi n-heksana dapat dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis. Metode ini merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan senyawa dalam sampel berdasarkan adanya perbedaan partisi atau adsorpsi oleh fase diam yang melibatkan fase gerak (pelarut atau campuran pelarut) dan molekul sampel (Mulya & Suharman, 1995; Namir dkk., 2019). Kromatografi lapis tipis biasanya digunakan untuk pemisahan campuran yang tidak mudah menguap (Harwood & Moody, 1989), dapat digunakan untuk memantau kemajuan suatu reaksi, mengidentifikasi senyawa yang ada dalam suatu campuran dan menentukan kemurnian suatu zat (Reich & Schibli, 2007).

2.7.1 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLT Preparatif)

KLT preparatif dilakukan untuk memisahkan senyawa campuran dari sampel berdasarkan fraksinya dalam jumlah besar dan selanjutnya fraksi tersebut dikumpulkan menjadi satu untuk digunakan pada analisis berikutnya (Sastrohamidjojo, 1991). Waktu pengembangan perlu diperhatikan agar senyawa yang berkontak dengan penyerap tidak terlalu lama berinteraksi, karena akan menyebabkan senyawa tersebut dapat mengurai kembali. Bercak yang mengandung analit yang diinginkan selanjutnya di kerok untuk dilakukan analisis lebih lanjut (Gandjar & Rohman, 2007).

Lempeng plat silika gel yang telah di elusi menggunakan fase gerak kemudian akan diamati di bawah sinar UV 366 nm. Noda yang dikenai sinar UV 366 nm akan berfluoresensi dan lempeng silika gel akan berwarna gelap. Terbentuknya warna pada noda disebabkan karena adanya interaksi sinar UV 366 nm dengan gugus kromofor yang terikat oleh aoksokrom pada noda yang terbentuk. Fluoresensi cahaya yang nampak merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron yang tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi kemudian kembali ke keadaan semula dibarengi dengan pelepasan energi. Sehingga noda yang tampak pada sinar UV 366 nm pada terlihat terang karena silika gel yang terdapat pada lempeng plat tidak berfluoresensi dengan sinar UV 366 nm (Sudjadi, 1988).

Senyawa-senyawa yang terpisah dari lapisan tipis identifikasi menggunakan R_f . Harga R_f untuk senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga R_f standar. Harga R_f dapat dihitung dengan rumus berikut (Sastrohamidjojo, 1991):

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

Harga R_f murni untuk senyawa-senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga R_f standar. Faktor yang mempengaruhi gerakan noda dan harga R_f diantaranya yaitu sifat dari penyerap, jenis eluennya, struktur kimia dari senyawa yang sedang dipisahkan, derajat aktivitasnya, serta jumlah cuplikan yang digunakan tidak terlalu berlebihan (Sastrohamidjojo, 1991). Pemisahan yang terbaik antara noda 1 dengan noda lainnya akan memiliki harga R_f antara 0,15-0,2 cm (Gandjar & Rohman, 2007). Laili (2016) dalam penelitiannya pada KLT analitik dan KLT preparatif menghasilkan 8 noda, akan tetapi hanya 3 noda yang menunjukkan senyawa steroid yaitu pada noda 5, 6 dan 7 yang ditandai dengan warna noda biru/hijau. Dinasti (2016) dan Wahdaniyah (2019) dalam penelitiannya pada sampel mikroalga *Chlorella sp.* membuktikan bahwa steroid hasil pemisahan KLT preparatif memiliki warna hijau/biru ketika dipanaskan, sebelum dan sesudah disemprot menggunakan reagen *Liebermann-Burchard*.

2.7.2 Kromatografi Lapis Tipis Dua Dimensi (KLT 2 Dimensi)

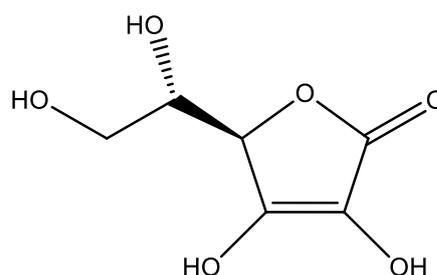
KLT dua dimensi atau sering disebut dengan KLT dua arah merupakan metode yang biasa digunakan untuk meningkatkan resolusi sampel ketika ingin mengetahui kemurnian suatu senyawa hasil isolasi karena komponen-komponen senyawa yang dihasilkan pada KLT preparatif memiliki karakteristik kimia dan R_f yang hampir sama yang disebabkan karena penggunaan fase diam yang lebih luas dalam memisahkan campuran yang mengandung banyak komponen (Gandjar & Rohman, 2007). Selain itu, pemisahan campuran yang mengandung komponen

2.8 Antioksidan

Antioksidan merupakan zat atau bahan yang dapat menghambat atau menunda proses oksidasi molekul dengan mengikat radikal bebas (Velioglu dkk., 1998). Antioksidan berfungsi sebagai pelindung komponen-komponen makanan yang bersifat tidak jenuh (mempunyai ikatan rangkap) seperti lemak dan minyak. Meskipun demikian dapat pula digunakan untuk melindungi komponen-komponen lain seperti vitamin dan pigmen. Antioksidan dibagi menjadi dua jenis berdasarkan sumbernya yaitu antioksidan alami (bersumber dari bahan alam) dan antioksidan sintetik (diperoleh dari sintesis reaksi kimia) (Cahyadi, 2008).

1. Antioksidan Alami

Secara toksikologi antioksidan alami akan lebih mudah diserap dan lebih aman di konsumsi oleh tubuh (Madhavi dkk., 1996). Salah satu contoh antioksidan alami yaitu vitamin C (L-asam askorbat) yang berfungsi untuk mengikat oksigen sehingga tidak terjadi reaksi oksidasi. Vitamin C merupakan kristal putih, padat, mudah larut dalam air, gliserol dan etil alkohol, tidak berbau dan memiliki titik leleh pada suhu 190-192°C (Cahyadi, 2008).



Gambar 2.9 L-Asam askorbat (Vitamin C) (Chandra, 2013)

2. Antioksidan Sintetik

Terdapat beberapa jenis antioksidan sintetik untuk makanan yang diizinkan dalam penggunaannya yaitu PG, TBHQ, BHT dan tokoferol. (Cahyadi, 2008).

Antioksidan sintetik biasanya diperoleh melalui sintesis reaksi kimia dan sering digunakan untuk mengontrol oksidasi. Namun, hal ini tidak menutup kemungkinan antioksidan sintetik tersebut dapat menyebabkan efek karsinogenik bagi tubuh. Oleh karena itu, penelitian dan pengembangan antioksidan yang berasal dari bahan alami sebagai alternatif pengganti antioksidan sintetik sangat digiatkan (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

2.8.1 Mekanisme Kerja Antioksidan

Mekanisme kerja dari antioksidan secara umum untuk menghambat oksidasi lemak. Berdasarkan mekanisme kerjanya antioksidan memiliki dua fungsi yaitu sebagai antioksidan primer dan antioksidan sekunder. Fungsi antioksidan primer menempatkan antioksidan (AH) sebagai pemberi atom hidrogen secara cepat ke radikal lipid (R^\bullet , ROO^\bullet) atau mengubahnya ke bentuk yang lebih stabil dan hasil reaksi radikal antioksidan (A^\bullet) memiliki keadaan lebih stabil dibandingkan dengan radikal lipid. Sedangkan antioksidan sekunder berfungsi sebagai penghambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme di luar mekanisme pemutusan autooksidasi dengan mengubah radikal lipid ke bentuk yang lebih stabil (Gordon, 1990).

Mekanisme yang terjadi antara DPPH dengan senyawa antioksidan akan membentuk 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil yang memiliki sifat non radikal karena telah terdonor oleh radikal hidrogen dari senyawa antioksidan. Radikal DPPH akan terus terinduksi membentuk DPPH-H ketika senyawa antioksidan mendonorkan radikal hidrogennya dan akan terjadi perubahan warna dari ungu menjadi kuning. Perubahan warna ini menunjukkan adanya penurunan serapan dari DPPH pada

panjang gelombang maksimum yang diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515-517 nm (Pokorni, 2001).

2.8.2 Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

DPPH sering digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan pada beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam dan merupakan senyawa radikal bebas yang stabil pada suhu kamar (Molyneux, 2004). Metode DPPH memiliki prinsip yaitu elektron ganjil pada molekul DPPH akan memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 515 nm yang berwarna ungu. Apabila elektron ganjil tersebut berpasangan dengan atom hidrogen yang disumbangkan oleh senyawa antioksidan maka akan terjadi perubahan warna dari ungu menjadi kuning lemah (Ikhlas, 2013).

Aktivitas antioksidan dapat diamati dengan adanya perubahan warna pada DPPH. Elektron tidak berpasangan pada radikal bebas DPPH akan memberikan warna ungu dan akan berubah menjadi ungu muda atau kuning ketika DPPH bercampur dengan senyawa aktif pada sampel yang dapat mendonorkan atom hidrogen (Blois, 1958). Pengurangan intensitas warna mengindikasikan peningkatan kemampuan antioksidan untuk menangkap radikal bebas (Prakash dkk., 2001).

DPPH dapat digunakan secara luas untuk mengukur semua komponen antioksidan, baik yang larut dalam air maupun dalam lemak dan menguji kemampuan senyawa yang berperan sebagai hidrogen atau pendonor elektron. DPPH dipilih dan banyak digunakan dalam uji aktivitas antioksidan karena metodenya yang mudah, cepat, sederhana, sangat peka dan hanya memerlukan

sampel yang sedikit. Aktivitas antioksidan dapat dinyatakan dengan satuan % aktivitas. Nilai ini diperoleh dengan rumus (Molyneux, 2004):

$$\% \text{ Efektivitas antioksidan} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \dots\dots\dots (2.1)$$

Dengan A_0 adalah absorbansi kontrol dan A_1 adalah Absorbansi DPPH sisa yang tidak bereaksi dengan sampel.

Persen (%) aktivitas antioksidan yaitu parameter yang digunakan dalam pengukuran aktivitas antioksidan yang mampu menunjukkan kemampuan suatu senyawa antioksidan dalam menghambat radikal bebas dalam bentuk persen (Brand-Williams dkk., 1995). Parameter konsentrasi lain yang digunakan pada metode DPPH adalah EC_{50} . Nilai EC_{50} yaitu konsentrasi ekstrak uji yang dapat menangkap 50% radikal bebas DPPH melalui persamaan regresi diikuti dengan adanya perubahan warna (Brand-Williams dkk., 1995; Bondet dkk., 1997). Kemampuan antioksidan suatu senyawa yang terkandung dalam bahan uji akan berbanding terbalik dengan nilai EC_{50} . Aktivitas antioksidan suatu senyawa uji akan semakin aktif untuk menangkal radikal bebas apabila nilai EC_{50} semakin kecil (Kedare dkk., 2011).

Tabel 2.4 Ketentuan kekuatan antioksidan (Molyneux, 2004)

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

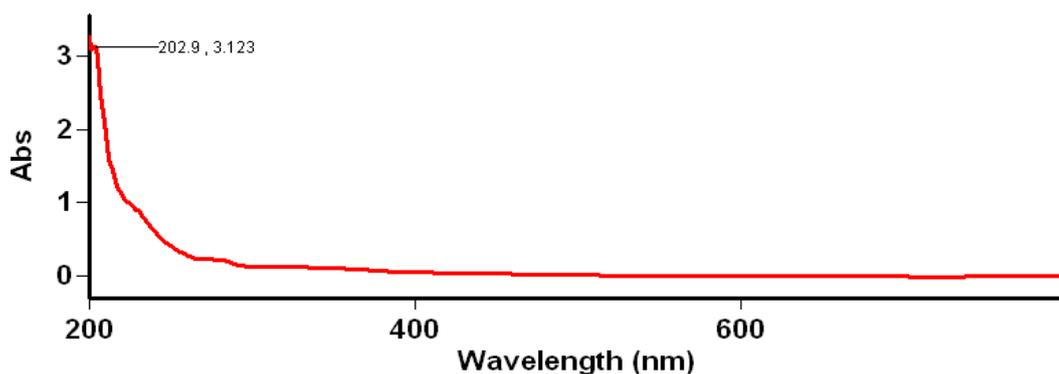
Penelitian Miftahurrahmah dkk., (2013) pada ekstrak metanol alga merah (*Eucheuma cottonii*) yang diuji aktivitas antioksidannya menggunakan DPPH menghasilkan nilai EC_{50} sebesar 22,13 ppm. Nilai EC_{50} yang dihasilkan kurang dari

50 ppm. Hal ini berarti aktivitas antioksidan dari alga merah (*Eucheuma cottonii*) ekstrak metanol tergolong sangat kuat. (Elalla & Shalaby, 2009). melakukan uji aktivitas antioksidan pada ekstrak alga merah (*Gracilaria verucosa*) menggunakan metode DPPH didapatkan hasil bahwa ekstrak kasar etanol, petroleum eter, etil asetat, air, dan n-butanol secara berturut-turut memiliki nilai IC₅₀ sebesar 85 mg/L, 130 mg/L, 135 mg/L, 180 mg/L dan 190 mg/L.

2.9 Identifikasi Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis

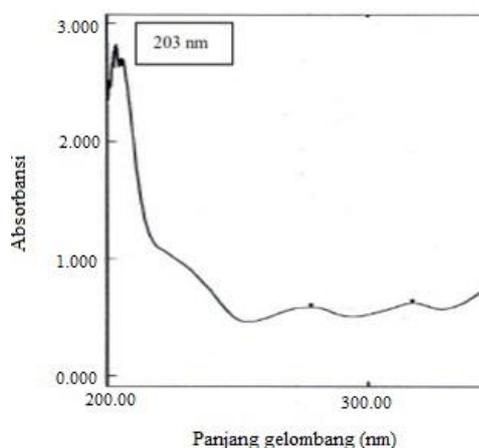
Spektrofotometer merupakan alat pengukuran absorbansi menggunakan panjang gelombang tertentu yang biasanya digunakan dengan cara melewatkan cahaya pada suatu objek kaca (kuvet), kemudian berkas cahaya tersebut sebagian akan di serap dan sisanya akan dilewatkan. Nilai absorbansi dari cahaya yang di serap sebanding dengan konsentrasi larutan di dalam kuvet (Sastrohamidjojo, 1991). Spektrofotometer UV-Vis memiliki prinsip yaitu adanya transisi elektronik suatu molekul yang disebabkan oleh peristiwa absorbansi energi berupa radiasi elektromagnetik pada frekuensi yang sesuai oleh molekul tersebut (Rohman & Riyanto, 2017). Banyak senyawa organik yang menerapkan spektrofotometer UV-Vis yang didasarkan pada transisi $n-\pi^*$ ataupun $\pi-\pi^*$ yang terjadi di daerah spektrum antara 200-700 nm dan oleh karenanya diperlukan kehadiran gugus kromofor dalam molekul itu (Da, 1999).

Penelitian yang dilakukan Anggraini (2018) pada *Eucheuma cottonii* isolat fraksi etil asetat memberikan serapan pada panjang gelombang maksimum 202,9 nm.



Gambar 2.10 Spektrum UV-Vis steroid (Anggraini, 2018)

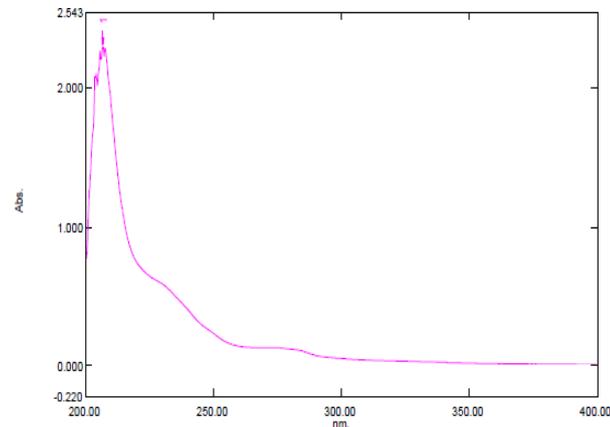
Aprelia & Suyatno (2013) melakukan penelitian pada ekstrak etil asetat tumbuhan paku *Christella arida* tentang senyawa metabolit sekundernya. Didapatkan hasil bahwa senyawa steroid yang ditunjukkan pada panjang gelombang 203 nm yang menunjukkan bahwa terdapat ikatan C=C tidak terkonjugasi karena transisi elektron $\pi-\pi^*$.



Gambar 2.11 Spektrum UV-Vis tumbuhan paku *Christella arida* isolat fraksi etil asetat (Aprelia & Suyatno, 2013)

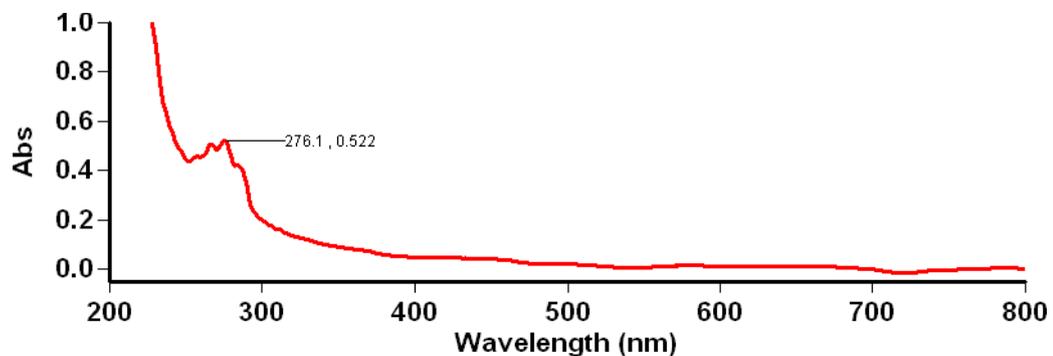
Penelitian Nasution (2020) pada skrining fitokimia dan mengisolasi senyawa steroid/triterpenoid rumput laut *Eucheuma alvarezii doty* ketika diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis didapatkan panjang gelombang pada 206,80 nm yang menunjukkan adanya gugus kromofor. Pita

serapan tersebut lebih rendah daripada pita serapan diena terkonjugasi pada transisi $\pi\text{-}\pi^*$ di daerah lebih dari 270 nm (Makin & Gower, 2010).



Gambar 2.12 Spektrum UV-Vis *Eucheuma alvarezii doty* hasil uji kemurnian KLT dua dimensi (Nasution, 2020)

Laili (2016) pada uji antioksidan ekstrak metanol alga merah (*Eucheuma cottonii*) ketika diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis menghasilkan panjang gelombang 276,1 nm akibat adanya transisi elektronik $\pi\text{-}\pi^*$ yang menunjukkan adanya senyawa diena terkonjugasi. Hal tersebut sejalan dengan penelitian yang dilakukan Das & Srinivas (1992) pada alga merah *Gracilaria edulis* menghasilkan panjang gelombang 278 nm ketika diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan menunjukkan senyawa tersebut adalah senyawa poriferasta-3,5-dien-7-one.

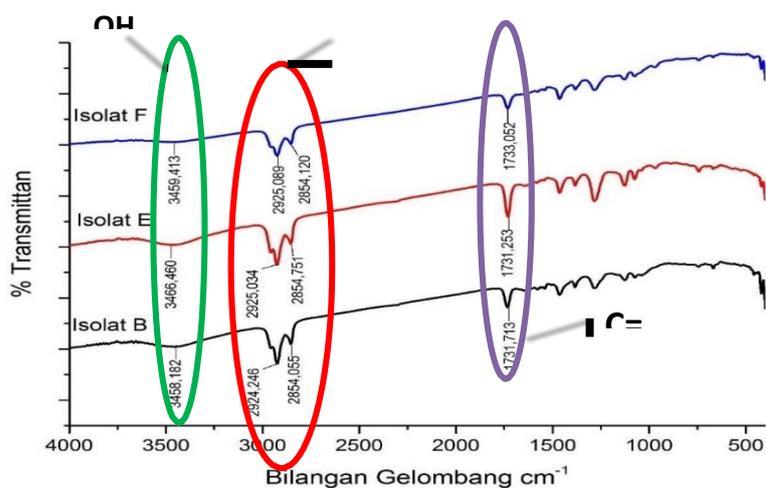


Gambar 2.13 Spektrum UV-Vis *Eucheuma cottonii* (Laili, 2016)

2.10 Identifikasi Steroid dengan FTIR

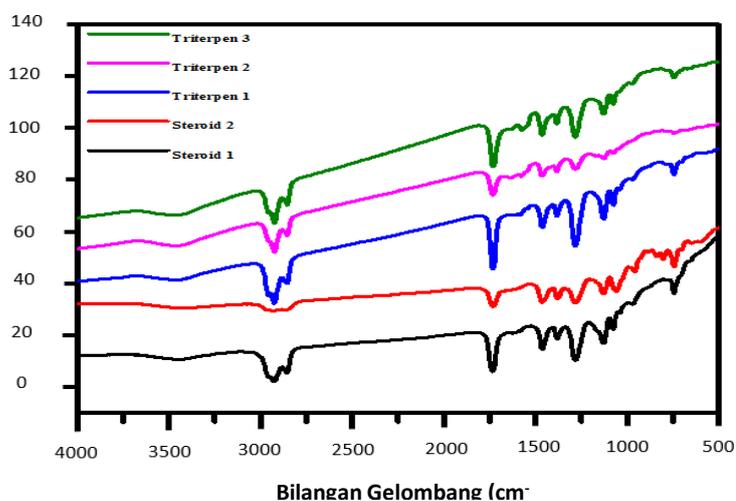
Fourier Transform Infra Red (FTIR) merupakan teknik yang biasanya digunakan pada sampel padat, cair, dan gas untuk mendapatkan spektrum inframerah dari absorbansi, emisi, fotokonduktivitas atau Raman Scattering. Tujuan karakterisasi menggunakan FTIR adalah untuk mengetahui jenis-jenis vibrasi antar atom. Analisa kualitatif dan analisa kuantitatif senyawa organik dan anorganik dapat di karakterisasi menggunakan FTIR dengan melihat kekuatan absorpsi senyawa pada bilangan gelombang tertentu (Hindrayawati, 2010).

FTIR memiliki prinsip kerja yaitu ketika sinar infrared yang melewati celah ke sampel, dimana celah tersebut berfungsi untuk mengontrol jumlah energi yang disampaikan kepada sampel. Kemudian beberapa infrared diserap oleh sampel dan yang lainnya ditransmisikan melalui permukaan sampel sehingga sinar infrared lolos ke detektor dan sinyal yang terukur kemudian dikirim ke computer (Thermo, 2001). Anggraini (2018) melakukan identifikasi steroid pada *Eucheuma cottonii* dan didapatkan spektrum memberikan hasil serapan khas gugus C_{sp^3} -H stretching, O-H stretching dan C=O.



Gambar 2.14 Spektrum FTIR steroid (Anggraini, 2018)

Penelitian Ningsih dkk., (2015) pada *Eucheuma spinosum* yang mengidentifikasi senyawa steroid menunjukkan adanya gugus O-H pada bilangan serapan gelombang 3417 cm^{-1} , gugus $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ pada serapan bilangan gelombang 2932 cm^{-1} dan gugus $\text{C}=\text{C}$ 2853 cm^{-1} pada serapan bilangan gelombang 1647 cm^{-1} dan gugus C-O alkohol berada pada serapan bilangan gelombang 1099 cm^{-1} . Madjid dkk., (2020) mengidentifikasi senyawa steroid *Eucheuma cottonii* hasil kromatografi kolom basah kemudian diidentifikasi menggunakan FTIR didapatkan lima isolat steroid memiliki serapan O-H stretching pada bilangan gelombang 3550-3200 cm^{-1} , serapan $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ pada bilangan gelombang 3000-2800 cm^{-1} , serapan $\text{C}=\text{C}$ pada bilangan gelombang 1690-1620 cm^{-1} , serapan C-O alkohol pada bilangan gelombang 1205-1030 cm^{-1} dan $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ pada bilangan gelombang 1396-1365 cm^{-1} .



Gambar 2.15 Spektrum FTIR steroid (Madjid dkk., 2020)

Penelitian Saleh (2007) pada identifikasi steroid menggunakan FTIR memberikan serapan khas uluran gugus O-H pada bilangan gelombang 3417,36 cm^{-1} dengan bentuk serapan yang melebar. Adanya serapan khas tekukan dari gugus O-H pada bilangan gelombang 1328,67 cm^{-1} dan adanya uluran C-OH siklik pada

serapan bilangan gelombang $1051,74 \text{ cm}^{-1}$ memperkuat dugaan bahwa senyawa tersebut mengandung steroid. Terdapat uluran C-H dan CH_3 pada bilangan gelombang $2936,87 \text{ cm}^{-1}$ dan uluran dari C-H pada CH_2 bilangan gelombang 2868 cm^{-1} yang merupakan serapan dengan identitas yang kuat. Serapan tersebut diperkuat dengan adanya tekukan C-H dari CH_3 pada bilangan gelombang $1376,22 \text{ cm}^{-1}$ dan C-H dari C-H_2 yang terbentuk pada bilangan gelombang $1464,54 \text{ cm}^{-1}$. Pita serapan juga menghasilkan uluran dari C=C non konjugasi pada bilangan gelombang $1661,53 \text{ cm}^{-1}$. Pita serapan lain yang juga memperkuat hasil tersebut adalah C=C pada bilangan gelombang $954,64 \text{ cm}^{-1}$. Hasil interpretasi inilah yang menunjukkan steroid akan memberikan serapan yang khas untuk gugus O-H, hidroksi, siklik, alkil dan ean enon konjugasi.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Organik Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan April-Juli 2021.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu seperangkat alat gelas, desikator, gelas arloji, neraca analitik, lemari asap, bola hisap, kertas saring, corong *buchner*, inkubator, *rotary vacuum evaporator*, corong pisah, *hot plate*, botol vial, plat KLT silika gel F₂₅₄, lampu UV, *Ultrasonic Processor Qsonica*, spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah alga merah (*Eucheuma cottonii*), etanol p.a, akuades, gas N₂, n-heksana, etil asetat, benzena, kloroform, asam asetat anhidrida, H₂SO₄, HCl 2 N, NaHCO₃, *DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)*, KLT gel 60 F₂₅₄.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian eksperimental di laboratorium organik. Sampel yang digunakan adalah sampel alga merah (*Eucheuma cottonii*)

hasil preparasi penelitian sebelumnya yang didapat dari perairan Wongsorejo Banyuwangi. Sampel kemudian dilarutkan menggunakan pelarut etanol dengan rasio bahan : pelarut yaitu 1:10 dan dikenai gelombang ultrasonik dengan waktu ekstraksi selama 42 menit pada suhu ruang. Penggunaan etanol sebagai pelarut dikarenakan etanol lebih aman, murah, mudah didapat dan memiliki titik didih yang rendah sehingga mudah untuk diuapkan. Filtrat yang didapat dari ekstraksi ultrasonik akan diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian dihidrolisis menggunakan HCl 2 N untuk memutus ikatan glikosida dan di partisi menggunakan pelarut n-heksana agar senyawa steroid dapat terpisah dengan baik karena memiliki sifat kepolaran yang sama. Pemisahan senyawa steroid dilakukan menggunakan KLT preparatif dengan variasi eluen n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 17:3. Pemilihan variasi eluen ini didasarkan pada penelitian Mardaneni (2017) dan Baderos (2017) yang menghasilkan pemisahan terbaik pada KLT analitik dengan spot noda yang terbentuk jelas dan tidak berekor. Isolat hasil KLT preparatif yang berwarna hijau dan biru tanpa disemprot menggunakan reagen *Liebermann-Burchard* kemudian diuji menggunakan KLT dua dimensi untuk meningkatkan resolusi agar kemurnian suatu senyawa hasil isolasi dapat diketahui yang ditandai dengan terbentuknya spot tunggal. Isolat hasil KLT preparatif diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH dengan berbagai variasi konsentrasi yaitu 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm untuk mengetahui tingkat potensi antioksidan melalui nilai EC_{50} . Identifikasi isolat hasil KLT preparatif dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR untuk memastikan senyawa metabolit sekunder

apa yang terbentuk berdasarkan serapan panjang gelombang dan bilangan gelombang yang diperoleh.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Preparasi sampel alga merah (*Eucheuma cottonii*).
2. Analisis kadar air.
3. Ekstraksi alga merah *Eucheuma cottonii* menggunakan metode ultrasonik dan pelarut etanol dengan rasio bahan : pelarut yaitu 1:10 selama 42 menit pada suhu ruang.
4. Hidrolisis dan partisi ekstrak etanol menggunakan pelarut n-heksana.
5. Uji fitokimia dengan reagen *Liebermann-Burchard*.
6. Pemisahan senyawa steroid dengan KLT preparatif dan KLT dua dimensi.
7. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.
8. Identifikasi senyawa dengan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.
9. Analisis data.

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Ekstraksi Ultrasonik

Ekstraksi senyawa steroid pada sampel dilakukan dengan cara ekstraksi ultrasonik menggunakan pelarut etanol. Sampel bubuk alga merah dimasukkan ke dalam gelas beaker dan di tambahkan pelarut etanol dengan rasio bahan : pelarut 1:10 (Sari dkk., 2016; Hadiyanto & Suttrisorhadi, 2016). Selanjutnya ditutup dengan aluminium foil dan diekstraksi menggunakan ultrasonik dengan waktu ekstraksi 42 menit (Hadiyanto & Suttrisorhadi, 2016) pada suhu 25°C. Larutan

hasil ekstraksi disaring menggunakan corong *buchner vacuum* dan filtratnya ditampung. Filtrat ekstrak alga merah (*Eucheuma cottonii*) yang diperoleh kemudian dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* kemudian ditimbang dan dihitung rendemennya dengan persamaan 3.3 :

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

3.5.2 Hidrolisis dan Partisis Ekstrak Pekat Etanol (Imamah dkk., 2015)

Ekstrak pekat etanol sebanyak 5 gram dihidrolisis menggunakan HCl 2 N sebanyak 10 mL selama 1 jam dalam suhu ruang menggunakan *magnetic stirrer hot plate* dan dijenuhkan dengan NaHCO₃ hingga pH netral. Ekstrak pekat kemudian dipartisi menggunakan 25 mL pelarut n-heksana dalam corong pisah sebanyak tiga kali untuk mendapatkan ekstrak yang baik. Filtrat pada fase organik digabung dan dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dengan suhu 112°C dan dialiri dengan gas nitrogen (N₂). Kemudian ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemennya kembali menggunakan persamaan 3.3.

3.5.3 Uji Fitokimia Ekstrak n-Heksana (Arsianti dkk., 2016)

Hasil partisi n-heksana dilanjutkan uji fitokimia dengan mengambil sebanyak 0,5 gram ekstrak ke dalam tabung reaksi, ditambah dengan 0,5 mL kloroform, 0,5 mL asam asetat anhidrida, dan 2 mL H₂SO₄ melalui dinding tabung. Perlakuan diulangi sebanyak 3 kali. Jika terbentuk warna hijau kebiruan maka menunjukkan adanya golongan senyawa steroid.

3.5.4 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT Preparatif (Bawa, 2009)

Pemisahan senyawa steroid dilakukan pada ekstrak hasil partisi menggunakan KLT preparatif dan plat silika gel GF₂₅₄ berukuran 10x20 cm. Pemisahan senyawa steroid dilakukan dengan cara alga merah (*Eucheuma cottonii*) yang sudah dilarutkan menggunakan n-heksana ditotolkan pada plat dengan jarak ± 1 cm dari tepi bawah menggunakan pipa kapiler yang diselingi dengan pengeringan menggunakan *hair dryer*. Kemudian dielusi menggunakan eluen terbaik hasil KLT analitik pada penelitian Mardaneni (2017) dan Baderos (2017). Elusi dihentikan ketika fase gerak hampir sampai pada garis batas atas dan kemudian dikeringkan. Noda yang terbentuk kemudian diperiksa dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm tanpa disemprot menggunakan reagen *Liebermann-Burchard*. Noda yang diduga merupakan senyawa golongan steroid di kerok lalu dilarutkan dalam n-heksana dan disentrifuge untuk mengendapkan silikanya (perlakuan ini dilakukan sampai silikanya berwarna putih).

3.5.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT Dua Dimensi (Susetyo, 2015)

Pemisahan KLT dua dimensi dilakukan untuk mengetahui kemurnian senyawa pada KLT yang ditunjukkan dengan adanya satu noda tunggal. Plat yang digunakan adalah plat silika gel GF₂₄ dengan ukuran 10 x 10 cm. Isolat hasil KLT preparatif di totolkan pada plat dengan jarak 1 cm dari batas bawah dengan eluen pertama menggunakan benzena : etil asetat (3:2). Setelah mencapai batas atas elusi, plat diangkat kemudian dikeringkan selama 10-15 menit dan selanjutnya amati noda yang terbentuk dibawah UV-366. Plat diputar 90° dan diletakkan dalam bejana

yang berisi eluen kedua yaitu n-heksana : etil asetat (4:1). Diamati noda yang terbentuk dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm.

3.5.6 Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan DPPH (Mardiyah dkk, 2014)

Tahap pertama dalam uji aktivitas antioksidan adalah menentukan panjang gelombang maksimum DPPH dengan cara larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu didiamkan ± 10 menit. Kemudian dimasukkan dalam kuvet dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang maksimum yang didapatkan. Dicatat hasil pengukuran dan panjang gelombang digunakan untuk tahap selanjutnya. Kemudian dilakukan uji aktivitas antioksidan pada sampel dengan cara yaitu:

- a) Absorbansi kontrol: Larutan DPPH dengan konsentrasi 0,2 mM sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 3 mL etanol kemudian ditutup tabung reaksi dengan tissue, lalu di inkubasi pada suhu 37°C selama waktu kestabilan yang telah didapatkan pada tahap sebelumnya. Setelah itu larutan dimasukkan ke dalam kuvet hingga penuh dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan.
- b) Sampel dilarutkan dalam pelarutnya dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm (Kholidah, 2020). Disiapkan tabung reaksi untuk masing-masing konsentrasi, kemudian tiap-tiap tabung reaksi diisi dengan 3 mL ekstrak dan ditambahkan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 mL (perbandingan ekstrak yang dilarutkan dengan konsentrasi tertentu : larutan DPPH yaitu 3:1). Perlakuan tersebut diulang sebanyak tiga kali. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit (Gangwar dkk., 2014). Kemudian diukur absorbansinya

menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan. Data absorbansinya yang diperoleh dari tiap konsentrasi masing-masing ekstrak dihitung nilai persen (%) efektivitas antioksidannya. Nilai tersebut diperoleh dari persamaan 3.4.

$$\% \text{ Efektivitas Antioksidan} = \frac{A_o - A_1}{A_o} \times 100\% \dots\dots\dots(3.4)$$

Dengan A_o adalah absorbansi kontrol dan A_1 adalah absorbansi sampel.

Setelah didapatkan persen (%) efektivitas antioksidan, selanjutnya masing-masing ekstrak dihitung nilai EC_{50} dengan memperoleh persamaan regresi linear menggunakan program Excel.

3.5.7 Identifikasi Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis

Sampel yang telah murni yang diperoleh dari pemisahan dan pemurnian secara kromatografi kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Sebanyak 2 mL sampel dimasukkan ke dalam kuvet dan dianalisis pada panjang gelombang 200-800 nm sehingga akan diperoleh spektrum dan panjang gelombang maksimum.

3.5.8 Identifikasi Steroid dengan FTIR

Sampel yang diperoleh dari pemisahan dan pemurnian secara kromatografi selanjutnya dianalisis menggunakan FTIR, sehingga akan diperoleh spektrum dan bilangan gelombang. Isolat yang menunjukkan positif mengandung steroid dilarutkan dengan pelarutnya dengan konsentrasi tertentu. Kemudian diidentifikasi dengan spektrofotometer FTIR dengan panjang gelombang $4000-600 \text{ cm}^{-1}$ dan diamati spektrum yang terbentuk.

3.6 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan menghitung persen (%) efektivitas antioksidan yang diperoleh dari data absorbansi dari masing-masing konsentrasi. Setelah didapatkan data persen (%) efektivitas antioksidan pada masing-masing absorbansi sampel dan pembanding, kemudian dilakukan perhitungan nilai EC_{50} dengan menggunakan persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi sampel dengan persen (%) efektivitas antioksidan. Kemudian dibandingkan nilai EC_{50} yang diperoleh, yang memiliki nilai EC_{50} paling rendah menunjukkan kemampuan aktivitas antioksidan paling baik. Data yang diperoleh pada identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR berupa spektrum, panjang gelombang maksimum dan bilangan gelombang.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Rendemen Ekstrak Hasil Ultrasonik

Sampel alga merah (*Eucheuma cottonii*) yang akan diekstraksi merupakan hasil preparasi penelitian sebelumnya dari Perairan Wongsorejo, Banyuwangi dengan nilai kadar air yang diperoleh sebesar 5,59% (Fatimah, 2020). Ekstraksi dilakukan menggunakan metode ultrasonik dengan 3 kali pengulangan dan setiap pengulangannya menggunakan pelarut yang baru. Ekstraksi akan dihentikan ketika warna filtrat sampel alga merah (*Eucheuma cottonii*) mengalami perubahan warna menjadi lebih bening dari sebelumnya. Hal ini dimaksudkan agar senyawa aktif pada sampel dapat terekstrak dalam jumlah yang banyak.

Gelombang ultrasonik akan memecah dinding sel dan memberikan pemanasan pada cairan. Difusi ekstrak pada dinding dan permukaan akan meningkat disebabkan oleh adanya gelembung kavitasi yang ditimbulkan oleh energi kinetik pada saat dilewatkan ke seluruh bagian cairan. Efek mekanik yang ditimbulkan dari adanya ledakan gelembung kavitasi inilah yang akan meningkatkan penetrasi dari cairan menuju dinding membran sel sehingga mendukung pelepasan komponen sel dan pelarut dapat mengambil senyawa target (Feng dkk., 2015).

Ekstraksi senyawa steroid dilakukan selama 42 menit. Hal ini merujuk pada penelitian Hadiyanto & Sutrisnforhadi (2016) yang telah mengekstrak *Spirulina platensis* dengan variasi waktu dan diperoleh hasil rendemen serta aktivitas antioksidan terbaik terdapat pada lama waktu ekstraksi 42 menit. Purba dkk., (2019)

menyatakan bahwa semakin lama waktu ekstraksi yang digunakan dapat meningkatkan rendemen hasil ekstraksi, karena semakin lama kontak sampel dengan pelarut sehingga senyawa yang dapat terekstrak akan semakin banyak. Hal ini diperkuat dengan penelitian Pasanda dkk., (2020) yang mengekstraksi *Sargassum* sp menggunakan ultrasonik dengan variasi waktu 15, 30 dan 45 menit dan menghasilkan rendemen tertinggi pada waktu 45 menit sebesar 71,20%. Sari dkk., (2012) juga melaporkan bahwa total fenol pada ekstrak *Kappaphycus alvarezzi* akan meningkat diikuti dengan meningkatnya waktu ekstraksi hingga mencapai batas optimum.

Ekstrak hasil ultrasonik dipekatan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40-45°C karena etanol memiliki kemampuan untuk menguap pada kondisi di bawah titik didihnya dan juga untuk menjaga agar senyawa aktif yang terdapat pada sampel tidak rusak karena suhu yang terlalu tinggi (Soelama dkk., 2015). Temperatur akan berbanding lurus dengan tekanan, semakin rendah temperatur semakin rendah pula tekanan yang dibutuhkan untuk menguapkan pelarut (Sholikah, 2016). Proses pemekatan ekstrak dihentikan ketika sudah tidak ada pelarut yang menetes pada labu alas bulat.

Hasil pemekatan ekstrak kasar selanjutnya dialiri menggunakan gas N₂ untuk menghilangkan sisa pelarut hingga didapatkan rendemen ekstrak kasar etanol alga merah (*Eucheuma cottonii*) sebesar 18,73%. Nilai rendemen ketika menggunakan metode ultrasonik selama 42 menit dengan 3 kali pengulangan (total ± 2 jam) lebih besar dibandingkan menggunakan metode maserasi selama 24 jam dengan 3 kali pengulangan (total 72 jam) pada sampel yang sama yaitu alga merah (*Eucheuma cottonii*) pada penelitian Mardaneni (2017), Pramitania (2019), Fatimah

(2020) dan 24 jam pada penelitian Madjid dkk., (2020) dengan rendemen berturut-turut sebesar 13,93%, 13,79%, 10,62%, dan 11,86%. Hal ini membuktikan bahwa metode ekstraksi ultrasonik dapat menghasilkan rendemen yang lebih besar dibandingkan metode maserasi akibat adanya kavitas yang menyebabkan meningkatnya efek penetrasi pelarut dan efek kapiler sehingga senyawa aktif dapat terekstrak secara maksimal.

4.2 Hidrolisis dan Rendemen Ekstrak Hasil Partisi

Senyawa steroid pada tumbuhan yang ada di alam biasanya masih berikatan dengan ikatan glikosida (gugus gula) sehingga akan bersifat polar. Hidrolisis yang dilakukan selama 1 jam bertujuan untuk memutus ikatan glikosida yang bersifat polar tersebut. Pada proses ini dilakukan penambahan HCl 2 N sebagai katalis karena hidrolisis dengan air akan berlangsung lambat (Nihlati dkk., 2008). Pemilihan HCl 2 N sebagai katalis karena asam kuat akan lebih mudah melepas proton (H^+) secara sempurna dalam air dibandingkan dengan asam lemah yang cenderung akan terionisasi sebagian dalam pelepasan ion H^+ . Semakin banyak proton yang terionisasi dalam air, maka akan semakin kuat perannya dalam pemutusan ikatan glikosida (Handoko, 2006). Dugaan reaksi pemutusan ikatan glikosida ditampilkan pada Gambar 2.4.

Proses hidrolisis akan berjalan secara *reversible* (bolak-balik) sehingga proses reaksi tersebut perlu dihentikan agar tidak terbentuk lagi ikatan glikon dan aglikon dengan cara penetralan menggunakan natrium bikarbonat ($NaHCO_3$) jenuh hingga glikosida bersifat stabil pada kondisi pH 7 (netral) (Fessenden, 1986). Reaksi hidrolisis akan ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung gas

CO₂ hasil reaksi HCl dan NaHCO₃. Reaksi antara HCl dan NaHCO₃ ditampilkan pada Gambar 2.5.

Ekstrak pekat etanol yang telah dihidrolisis selanjutnya dilakukan partisi menggunakan pelarut n-heksana. Penggunaan pelarut n-heksana yang bersifat non polar diharapkan dapat memisahkan senyawa steroid yang bersifat non polar secara maksimal, sehingga senyawa steroid dapat terdistribusi pada fase organik (non polar) sedangkan senyawa glikonnya akan terdistribusi dalam fase air (polar) pada saat proses partisi. Hal ini sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa steroid umumnya akan larut dalam senyawa non polar (Harborne, 1987). Terbentuknya dua lapisan pada saat partisi disebabkan karena adanya perbedaan sifat kepolaran dan juga perbedaan densitas diantara kedua larutan tersebut. Partisi dilakukan sebanyak 3 kali untuk memaksimalkan proses terdistribusinya senyawa aktif pada fase organik dengan menggunakan pelarut yang baru pada setiap pengulangannya.

Rendemen hasil partisi pelarut n-heksana diperoleh sebesar 3,704%. Hasil tersebut lebih rendah dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Pramitania (2019) menggunakan pelarut n-heksana sebesar 11,52%, n-butanol sebesar 27,058% (Fatimah, 2020) dan 33,89% (Ratnasari, 2017), petroleum eter sebesar 8,03% (Madjid dkk., 2020) dan etil asetat sebesar 17,19% (Anggraini, 2018). Hal ini disebabkan karena penggunaan *rotary vacuum evaporator* untuk menguapkan pelarut sehingga ekstrak hasil partisi yang dihasilkan masih banyak yang menempel pada dinding labu alas bulat sehingga rendemen yang dihasilkan rendah dan kurang maksimalnya dalam pengocokan pada saat partisi sehingga dimungkinkan senyawa metabolit sekunder tidak terekstrak secara maksimal dalam fase organik dan masih tertinggal dalam fase air.

4.3 Fitokimia Hasil Partisi n-Heksana

Skrining fitokimia merupakan uji kualitatif menggunakan reagen *Liebermann-Burchard* yang dilakukan untuk memastikan adanya senyawa metabolit sekunder terutama steroid pada hasil fraksinasi pelarut n-heksana yang ditandai dengan warna biru kehijauan (Nath dkk., 1946). Reagen *Liebermann-Burchard* terdiri dari kloroform, asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (Kenny, 1952). Kloroform digunakan untuk melarutkan fraksi dan tidak mengandung air sehingga tidak akan mengubah asam asetat anhidrat menjadi asam asetat sebelum terjadinya reaksi dan turunan asetil tidak akan terbentuk. Penggunaan asam asetat anhidrat berfungsi dalam proses asetilasi gugus hidroksil yang akan membentuk turunan asetil. Hal ini disebabkan karena gugus asetil merupakan gugus pergi yang baik sehingga terbentuk ikatan rangkap. Sedangkan asam kuat yaitu H_2SO_4 pekat digunakan untuk membuat senyawa steroid terdehidrasi membentuk garam *cholestadiene* yang mengalami konjugasi dengan menghasilkan warna hijau kebiruan dan violet (Robinson, 1995). Mekanisme reaksi dugaan yang terjadi antara reagen *Liebermann-Burchard* dengan senyawa steroid ditampilkan pada Gambar 2.6.



Gambar 4.1 Hasil uji fitokimia alga merah (*Eucheuma cottonii*)

Tabel 4.1 Hasil uji fitokimia pada fraksi n-heksana

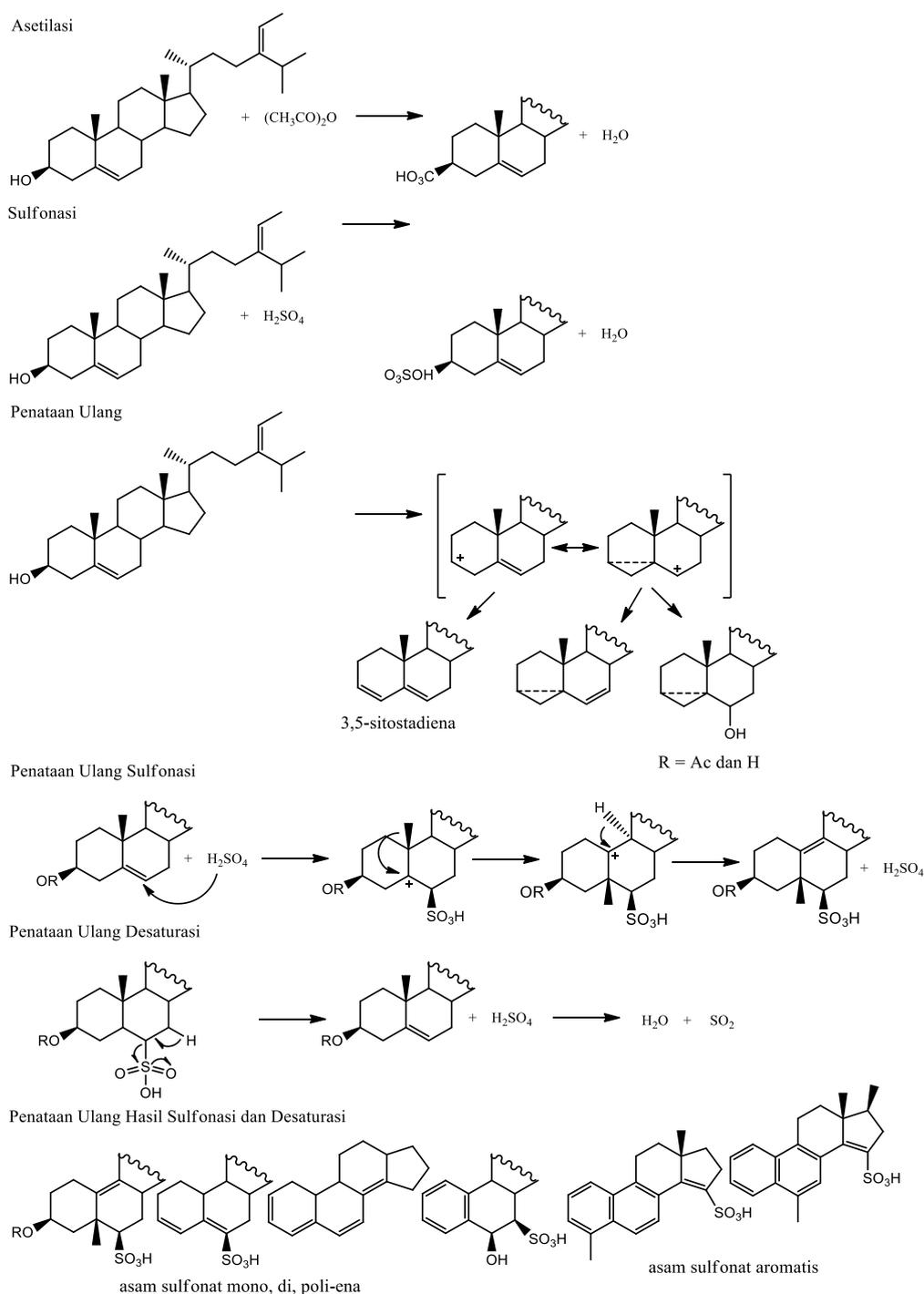
Golongan Senyawa	Hasil Fraksi n-Heksana
Steroid	+++
Triterpenoid	+++
Flavonoid	-
Alkaloid:	
Mayer	-
Dragondroff	-

Keterangan: +++ = warna pekat
 - = tidak terdeteksi

Berdasarkan hasil uji fitokimia pada hasil fraksinasi pelarut n-heksana positif mengandung steroid yang ditandai dengan munculnya cincin warna biru kehijauan dan positif triterpenoid yang ditandai dengan terbentuknya cincin warna merah kecoklatan pada bagian bawah seperti yang ditampilkan pada Gambar 4.1. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Ningsih dkk., (2015), Baderos (2017) dan Fatimah (2020) pada ekstrak alga merah fraksi n-heksana, petroleum eter dan n-butanol menunjukkan adanya senyawa steroid menggunakan reagen *Liebermann-Burchard*. Mekanisme reaksi reagen *Liebermann-Burchard* dengan senyawa steroid ditampilkan pada Gambar 4.2.

Mekanisme reaksi uji fitokimia senyawa steroid menggunakan reagen *Liebermann-Burchard* pada Gambar 4.2 yang merujuk pada penelitian Xiong dkk., (2007) yaitu diawali dengan proses asetilasi dan sulfonasi yang akan mengubah senyawa steroid dugaan yaitu fukosterol menjadi turunan asetat dan sulfatnya sebagai produk mayor. Selain itu, dihasilkan pula produk minor berupa i-steroid, *sitosta-3,5-diene* dan senyawa tak jenuh lainnya hasil penataan ulang. Produk-produk yang dihasilkan kemudian mengalami penataan ulang sulfonasi dan desaturasi membentuk senyawa *mono-, di-, dan polyunsaturated sulfonic acids*. Karena adanya kinetika yang berbeda pada jalur inilah yang dapat menghasilkan

respons warna bahwa ketika senyawa steroid bereaksi dengan reagen *Liebermann-Burchard* akan menghasilkan warna biru-hijau. Selanjutnya, senyawa poliena tersebut akan mengalami penataan ulang kembali melalui sulfonasi dan desaturasi membentuk senyawa aromatik.



Gambar 4.2 Mekanisme reaksi reagen *Liebermann-Burchard* dengan senyawa steroid (Xiong dkk., 2007)

4.4 Isolat Steroid Hasil KLT Preparatif

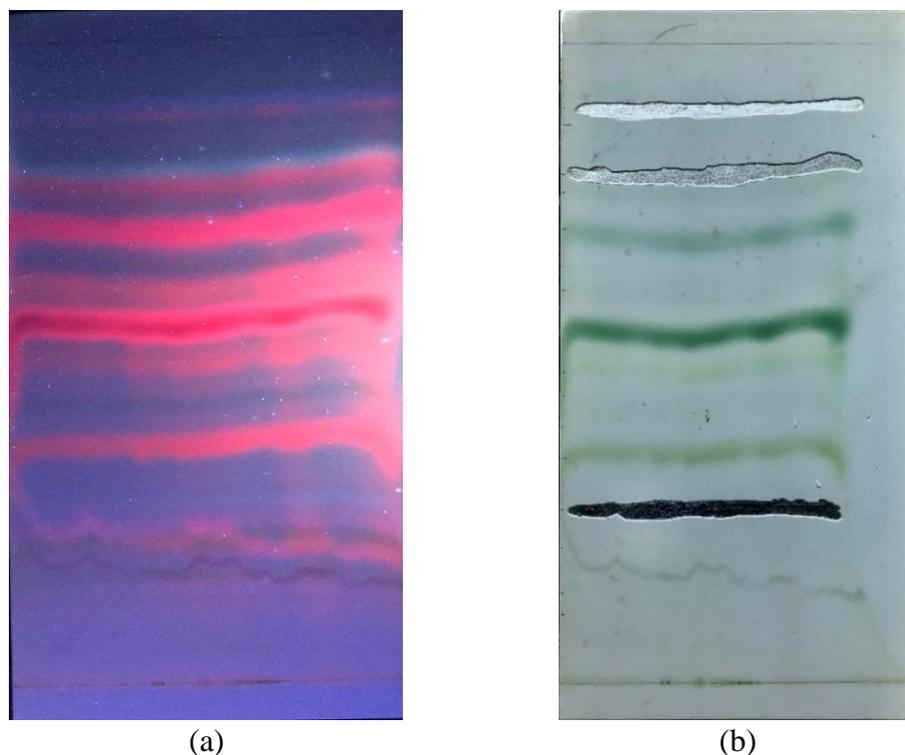
Pemisahan senyawa steroid dilakukan menggunakan KLT preparatif pada plat berukuran 10 x 20 cm untuk mendapatkan isolat dengan jumlah banyak, sehingga dapat digunakan dalam uji aktivitas antioksidan dan identifikasi menggunakan KLT dua dimensi, spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. Eluen yang digunakan pada saat pemisahan yaitu perbandingan eluen terbaik hasil KLT analitik penelitian Mardaneni (2017) dan Baderos (2017). Terbentuk 15 spot hasil pemisahan senyawa steroid pada KLT preparatif menggunakan eluen n-heksana : etil asetat perbandingan (17:3) yang dirangkum dalam Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil pemisahan KLT preparatif fraksi n-heksana eluen n-heksana:etil asetat perbandingan 17:3

Spot ke-	R _f (cm)	Warna Noda		Dugaan Senyawa
		Visual	UV 366 nm	
1	0,9	Putih	Biru	Steroid
2	0,872	Putih	Merah	Triterpenoid
3	0,794	Putih	Hijau	Steroid
4	0,766	Putih	Merah	Triterpenoid
5	0,683	Hijau	Merah	Triterpenoid
6	0,611	Putih	Merah	Triterpenoid
7	0,555	Hijau	Merah	Triterpenoid
8	0,483	Kuning	Merah	Triterpenoid
9	0,45	Putih	Merah	Triterpenoid
10	0,4	Putih	Merah	Triterpenoid
11	0,355	Cokelat	Merah	Triterpenoid
12	0,272	Putih	Hijau	Steroid
13	0,211	Putih	Merah	Triterpenoid
14	0,138	Putih	Merah	Triterpenoid
15	0,111	Putih	Merah	Triterpenoid

Berdasarkan Tabel 4.2 dapat diketahui bahwa dari 15 spot noda yang terpisahkan terdapat 3 noda yang diduga sebagai senyawa steroid ditandai dengan dihasilkannya warna hijau dan biru serta 12 noda yang diduga senyawa triterpenoid dengan menghasilkan warna merah. Noda yang terbentuk akan memiliki sifat kepolaran yang berbeda-beda. Noda yang memiliki nilai R_f kecil akan memiliki sifat

lebih polar karena lebih tertahan pada fase diamnya (plat silika) sedangkan noda dengan nilai R_f besar akan cenderung memiliki sifat non polar karena ikut terbawa oleh fase gerak yang memiliki sifat non polar. Pada umumnya senyawa steroid akan menghasilkan nilai R_f besar karena memiliki sifat non polar (Fasya dkk., 2013). Hal ini disebabkan adanya perbedaan distribusi senyawa dan struktur pada fase gerak dan fase diam yang digunakan. Hasil KLT preparatif fraksi n-heksana dengan eluen n-heksana : etil asetat perbandingan 17:3 ditampilkan pada Gambar 4.3.



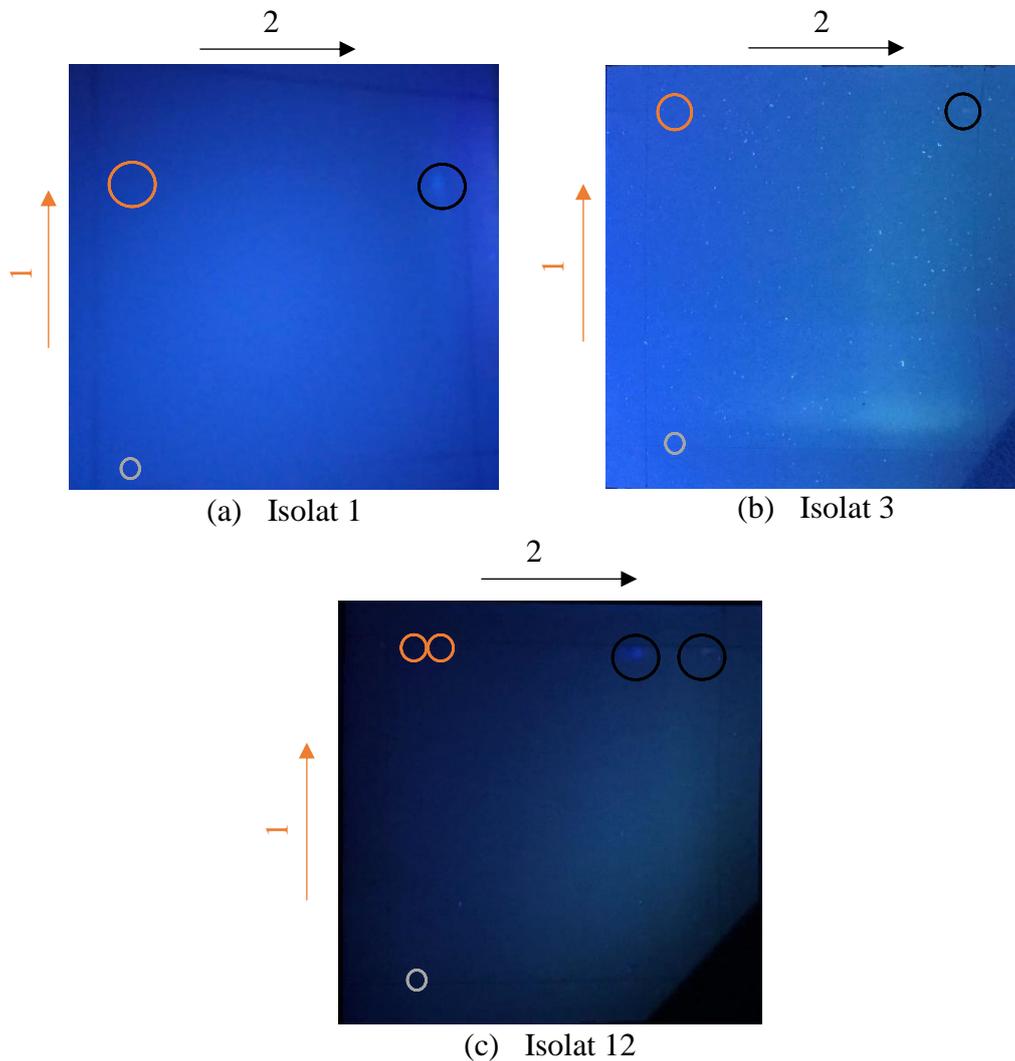
Gambar 4.3 Hasil KLTP fraksi n-heksana dengan eluen n-heksana:etil asetat perbandingan 17:3, (a) setelah diamati dibawah sinar UV tanpa disemprot reagen *Liebermann-Burchard* dan (b) diamati secara visual dan setelah dilakukan pengerokan pada spot noda steroid

Isolat 1, 3 dan 12 merupakan 3 noda hasil pemisahan KLT preparatif yang diduga sebagai senyawa steroid tanpa disemprot menggunakan reagen *Liebermann-Burchard*. Azah (2019) pada *Hydrilla verticillata* membuktikan bahwa tidak adanya perbedaan spot noda sebelum dan sesudah disemprot dengan reagen

Liebermann-Burchard. Isolat dengan R_f 0,95; 0,93 dan 0,7 cm positif senyawa steroid dengan menghasilkan spot noda berwarna hijau. Hal ini diperkuat oleh penelitian yang dilakukan Al-Quais (2015) yang juga memisahkan senyawa steroid menggunakan KLT preparatif dan dihasilkan bahwa steroid akan memiliki warna hijau atau biru ketika sebelum dan sesudah disemprot menggunakan reagen *Liebermann-Burchard*.

Penelitian Mardaneni (2017) pada alga merah (*Eucheuma cottonii*) menghasilkan 5 spot noda ketika dilakukan pemisahan menggunakan KLT preparatif dengan eluen yang sama. Terdapat 2 isolat yang memiliki nilai R_f sama dengan penelitian tersebut yaitu pada isolat 3 dan 12. Senyawa steroid yang terdeteksi tersebut kemudian diidentifikasi menggunakan LC-MS dan menyatakan bahwa alga merah jenis *Eucheuma cottonii* mengandung beberapa jenis steroid yaitu diantaranya β -sitosterol, stigmasterol, fukosterol, kampesterol dan demosterol. Baderos (2017) dalam penelitiannya juga memisahkan senyawa steroid menggunakan KLT preparatif dan ketika diidentifikasi menggunakan LC-MS didapatkan steroid jenis β -sitosterol yang paling dominan diikuti dengan stigmasterol, kampesterol dan kolesterol. Sedangkan Kazlowska dkk., (2013) melakukan penelitian pada alga merah jenis *Porphyra dentata* dan senyawa steroid yang terdeteksi ketika diidentifikasi menggunakan LC-MS yaitu steroid jenis kolesterol, kampesterol dan β -sitosterol dengan kelimpahan sebesar 15, 55 dan 30%.

4.5 Isolat Steroid Hasil Uji Kemurnian KLT Dua Dimensi



Keterangan: lingkaran abu-abu = titik awal penotolan sampel
 lingkaran orange = hasil elusi eluen pertama
 lingkaran hitam = hasil elusi eluen kedua
 panah orange = arah elusi eluen pertama
 panah hitam = arah elusi eluen kedua

Gambar 4.4 (a) Isolat 1, (b) isolat 3 dan (c) isolat 12 setelah diamati dibawah lampu UV 366 nm setelah dielusi menggunakan variasi eluen (1) benzena:etil asetat dan variasi eluen (2) n-heksana:etil asetat

Senyawa steroid yang berhasil dipisahkan oleh KLT preparatif selanjutnya diuji kemurnian menggunakan KLT dua dimensi. Steroid yang telah dipisahkan kemudian ditotolkan pada plat berukuran 10 x 10 cm menggunakan pelarut pertama

yaitu benzene : etil asetat dengan perbandingan 3:2. Setelah itu, plat diputar 90°C dan di elusi kembali menggunakan eluen kedua yaitu n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 4:1. Penggunaan variasi dua eluen yang berbeda dalam perbandingan tertentu dengan tingkat kepolaran yang berbeda secara berurutan diharapkan dapat memisahkan analit dengan tingkat kepolaran yang berbeda pula (Gandjar & Rohman, 2007). Hasil pemisahan steroid menggunakan KLT dua dimensi ditampilkan pada Gambar 4.4 dan dirangkum dalam Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil pemisahan steroid menggunakan KLT dua dimensi

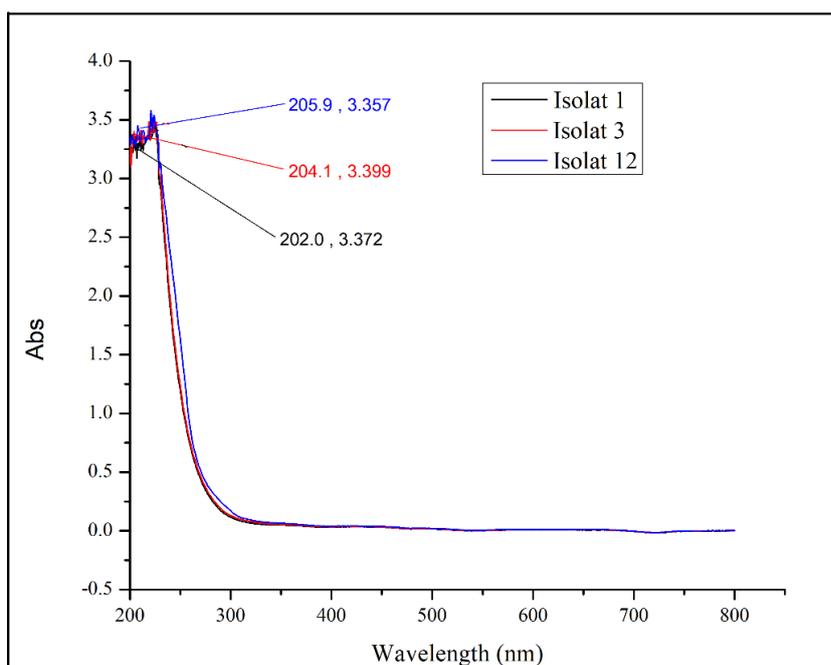
Isolat Steroid	Eluen 1		Eluen 2	
	Jumlah Spot	Warna	Jumlah Spot	Warna
1	1	Hijau	1	Hijau
3	1	Hijau	1	Hijau
12	2	Biru Hijau	2	Hijau

Keterangan: Eluen 1 = benzena:etil asetat (3:2)
Eluen 2 = n-heksana:etil asetat (4:1)

Berdasarkan Tabel 4.3 dapat diketahui bahwa steroid yang memiliki pemisahan terbaik dengan hanya menghasilkan spot tunggal dan berwarna hijau pada eluen pertama dan kedua yaitu isolat 1 dan 3. Hal ini mengindikasikan bahwa isolat 1 dan 3 benar-benar senyawa steroid karena memiliki pola pemisahan yang baik. Sedangkan isolat 12 menghasilkan dua spot steroid pada hasil pemisahan. Hal ini sejalan dengan pendapat Manjang (1985) yang menyatakan bahwa senyawa hasil isolasi dapat dikatakan murni apabila sudah terbentuk noda tunggal pada pemisahan. Namun, menurut Hahn-Deinstrop (2007) pada umumnya ekstrak yang dielusi pertama kemungkinan besar akan sama dengan proses pengelusan selanjutnya. Sehingga adanya identifikasi lanjut menggunakan instrumen seperti GC-MS diperlukan untuk memastikan bahwa spot tunggal yang terbentuk apakah sudah murni steroid atau belum.

4.6 Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLT Preparatif Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Hasil pemisahan steroid menggunakan KLT preparatif dan yang telah diuji kemurnian menggunakan KLT dua dimensi selanjutnya diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-800 nm. Adapun tujuannya adalah untuk memperkuat dugaan hasil fitokimia dan untuk mengetahui panjang gelombang maksimum akibat adanya transisi elektron. Hasil pengukuran panjang gelombang pada isolat 1, 3 dan 12 ditampilkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Hasil spektra UV-Vis isolat 1, 3 dan 12 alga merah (*Eucheuma cottonii*)

Berdasarkan hasil pengukuran panjang gelombang, isolat 1 memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang 202 nm. Isolat 3 memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang 204,1 nm. Sedangkan isolat 12 memiliki

serapan maksimum pada panjang gelombang 205,9 nm. Menurut Nes (1989) puncak serapan pada rentang panjang gelombang 190-210 nm terjadi akibat adanya transisi elektron dari kromofor yang mengandung ikatan π yaitu gugus C=C tak terkonjugasi sehingga akan memberikan transisi elektron dari $\pi-\pi^*$. Baderos (2017) menambahkan bahwa akan terjadi posisi heteroanular pada panjang gelombang lebih dari 214 nm dan posisi homoanular pada panjang gelombang 253 nm apabila ikatan rangkap terkonjugasi dengan kromofor diena. Aturan Woodward-Fieser menyatakan bahwa panjang gelombang maksimum yang dihasilkan dipengaruhi oleh jenis kromofor dan substituen yang terikat pada kromofor tersebut. Kromofor dan substituen yang berbeda akan memberikan transisi elektron yang berbeda sehingga panjang gelombang maksimum yang dihasilkan akan berbeda pula. Sejalan dengan teori tersebut, dari ketiga isolat steroid menghasilkan panjang gelombang maksimum yang berbeda. Hal ini diduga bahwa kromofor dan substituen yang terikat berbeda pula.

Pramitania (2019) melakukan identifikasi pada alga merah (*Eucheuma cottonii*) dari ekstrak metanol dan difraksinasi menggunakan pelarut n-heksana diperoleh serapan maksimum pada panjang gelombang 201 nm dan 203 nm serta senyawa steroid golongan β -sitosterol, fukosterol, kolesterol dan desmosterol dengan fukosterol sebagai senyawa dominan karena memiliki luas area paling tinggi ketika diidentifikasi menggunakan LC-MS. Serapan tersebut lebih rendah dibandingkan dengan serapan diena terkonjugasi pada transisi $n-\pi^*$ di daerah lebih dari 270 nm. Hal ini menunjukkan bahwa ikatan rangkap steroid tidak terkonjugasi (Makin & Gower, 2010). Hal ini diperkuat oleh penelitian Luki (2018) pada sampel alga merah (*Eucheuma cottonii*) yang difraksinasi menggunakan etil asetat dan

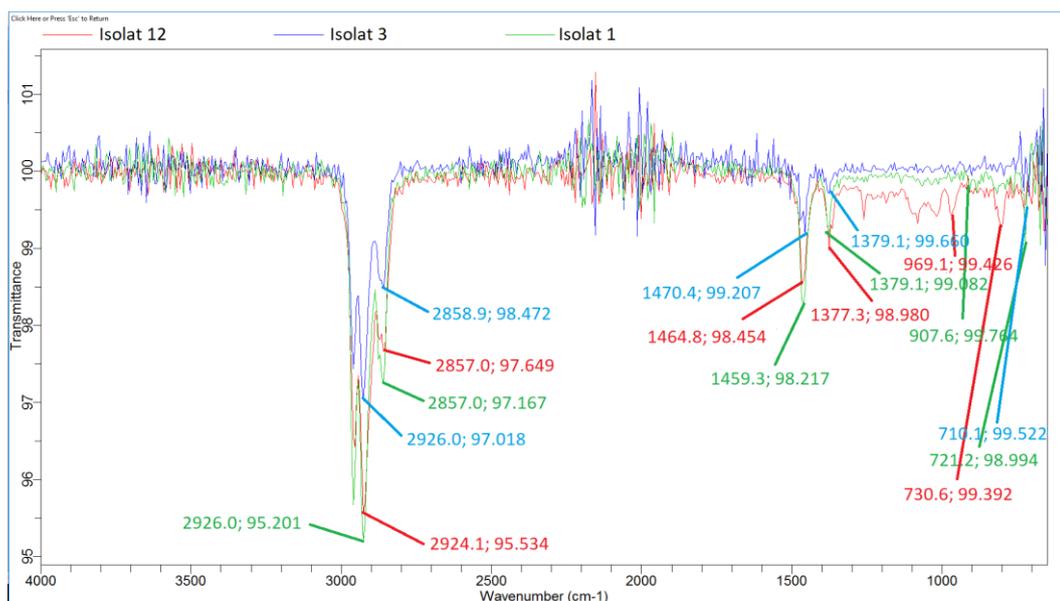
dipisahkan menggunakan kromatografi kolom menghasilkan steroid jenis fukosterol yang paling dominan berdasarkan *automatic area* diikuti dengan desmosterol, kampesterol, β -sitosterol dan stigmasterol. Fasya dkk., (2019) yang mengisolasi senyawa steroid dari alga merah (*Eucheuma cottonii*) dan diperoleh panjang gelombang 203 nm dari identifikasi spektrofotometer UV-Vis serta identifikasi LC-MS yang membuktikan bahwa senyawa steroid golongan β -sitosterol paling dominan diikuti dengan senyawa jenis lain seperti stigmasterol, kampesterol dan kolesterol. Sedangkan menurut teori, pada panjang gelombang 204 nm dimiliki oleh senyawa steroid jenis stigmasterol (Kristanti, 2008).

4.7 Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLT Preparatif Menggunakan FTIR

Hasil isolat alga merah KLT preparatif yang telah diuji kemurnian menggunakan KLT dua dimensi diidentifikasi menggunakan instrumen FTIR. Setiap gugus fungsi yang muncul akan mempunyai tipe ikatan yang berbeda karena telah terjadi interaksi antara energi dengan molekul yang dapat menyebabkan terjadinya transisi akibat adanya vibrasi molekul. Hasil spektra dan interpretasi FTIR pada isolat 1, 3 dan 12 ditampilkan pada Gambar 4.6 dan dirangkum dalam Tabel 4.4.

Berdasarkan Gambar 4.6 dan Tabel 4.4 menunjukkan spektra hasil FTIR berupa data transmittan dari bilangan gelombang 4000-600 cm^{-1} yang diidentifikasi menggunakan FTIR *Agilent Technologies Cary 630* dimana serapan dari gugus fungsi $-\text{OH}$ *stretching* yang dihasilkan oleh isolat 1, 3 dan 12 tidak nampak. Hal ini dimungkinkan karena konsentrasi sampel yang digunakan pada saat identifikasi terlalu rendah sehingga terdapat banyak *noise* dan transmittan yang muncul tidak

terlalu tajam. Serapan $\text{-C}_{\text{sp}^3}\text{H}$ alkana *stretching* pada 2926 cm^{-1} (isolat 1 dan 3) dan $2924,1\text{ cm}^{-1}$ (isolat 12) didukung dengan adanya serapan pada $\text{-(CH}_2\text{)}_2\text{-}$ *rocking* isolat 1, 3 dan 12 pada bilangan gelombang berturut-turut yaitu $721,2\text{ cm}^{-1}$, $710,1\text{ cm}^{-1}$ dan $730,6\text{ cm}^{-1}$ serta diperkuat dengan adanya serapan $\text{-CH}_2\text{-}$ simetri pada 2857 cm^{-1} (isolat 1), $2858,9\text{ cm}^{-1}$ (isolat 3) dan $2873,8\text{ cm}^{-1}$ (isolat 12). Serapan -C-H pada $907,6$ (isolat 1) dan $969,1$ (isolat 12). Vibrasi C-H *bending* asimetri pada bilangan gelombang $1459,3\text{ cm}^{-1}$ (isolat 1), $1470,4\text{ cm}^{-1}$ (isolat 3) dan $1464,8\text{ cm}^{-1}$ (isolat 12) dan CH_3 simetri isolat 1, 3 dan 12 berturut-turut terdapat pada bilangan gelombang $1379,1\text{ cm}^{-1}$, $1379,1\text{ cm}^{-1}$ dan $1377,3\text{ cm}^{-1}$ mengindikasikan adanya gugus geminal dimetil $[\text{CH}(\text{CH}_3)_2]$ yang sering muncul pada kebanyakan senyawa steroid.



Gambar 4.6 Hasil spektra FTIR isolat 1, 3 dan 12 alga merah (*Eucheuma cottonii*)

Dari uraian spektra hasil FTIR, dapat ditarik kesimpulan bahwa spektra hasil FTIR pada ketiga isolat sesuai dengan fakta penelitian, dibuktikan dengan munculnya gugus geminal dimetil walaupun tidak memiliki gugus -OH . Geminal dimetil bukan merupakan ciri khas senyawa steroid karena terdapat jenis senyawa

steroid yang tidak memiliki gugus tersebut tetapi gugus tersebut sering muncul pada kebanyakan senyawa steroid. Hal ini kemudian didukung dengan hasil uji fitokimia yang menunjukkan positif senyawa steroid. Kemudian kemiripan pola spektra yang dihasilkan dari ketiga isolat menunjukkan bahwa adanya kemungkinan senyawa-senyawa yang terkandung dalam ketiga isolat memiliki gugus-gugus yang sama walaupun belum bisa dipastikan jenis steroid tersebut adalah stigmasterol, β -sitosterol maupun fukosterol.

Tabel 4.4 Interpretasi spektrum FTIR isolat steroid 1, 3 dan 12

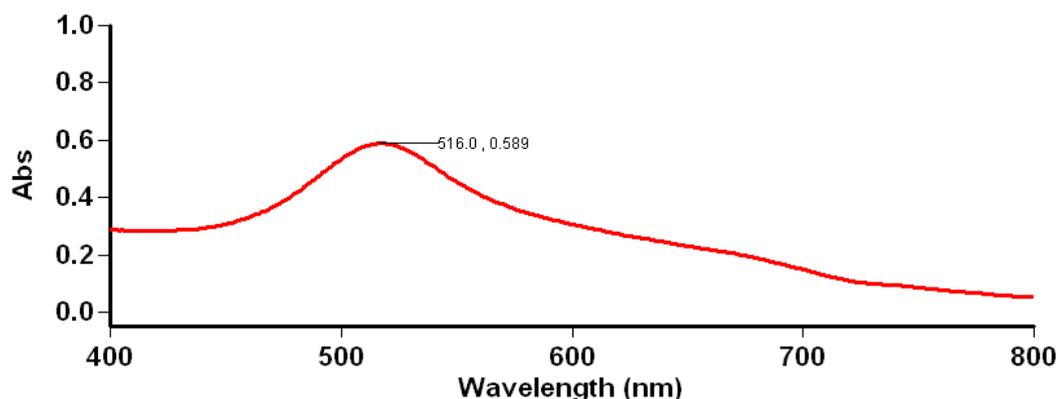
Bilangan Gelombang (cm^{-1})			(Socrates, 1994)		Jenis Vibrasi
Isolat 1	Isolat 3	Isolat 12	Range Pustaka (cm^{-1})	Intensitas	
2926	2926	2924,1	3000-2800	Kuat	$-\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H stretching}$ (alkana)
2857	2858,9	2857	2870-2840	Kuat	$-\text{CH}_2-$ stretching (alkil) simetri
1459,3	1470,4	1464,8	1485-1445	Sedang	$-\text{CH}$ pada CH_2 bending asimetri
1379,1	1379,1	1377,3	1395-1365	Lemah	CH_3 simetri untuk geminal dimetil
907,6	-	969,1	995-650	Lemah	$-\text{C-H=}$ ikatan vinil hidrokarbon
721,2	710,1	730,6	745-735	Lemah	$-(\text{CH}_2)_2-$ rocking

4.8 Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Pengukuran aktivitas antioksidan hasil pemisahan KLT preparatif diawali dengan mengukur panjang gelombang maksimum DPPH 0,2 mM menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran sampel harus dilakukan pada panjang gelombang maksimum untuk meminimalkan kesalahan dan memaksimalkan kepekaan ketika sampel dianalisis (Winahyu dkk., 2019).

Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH sebesar 516 nm yang merupakan hasil serapan tertinggi. Hal ini menunjukkan bahwa pengukuran

serapan pada isolat steroid yang mampu meredam radikal bebas DPPH dilakukan pada panjang gelombang 516 nm. Sejalan dengan pendapat Prakash dkk., (2001) yang menyatakan bahwa DPPH memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang 515-520 nm. Hasil spektra UV-Vis DPPH 0,2 mM ditampilkan pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Panjang gelombang maksimum DPPH 0,2 mM

4.9 Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid

Pengukuran aktivitas antioksidan pada sampel hasil KLT preparatif alga merah dilakukan menggunakan metode DPPH dengan variasi konsentrasi yaitu 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm yang kemudian akan diukur serapannya pada panjang gelombang 516 nm (Kholidah, 2020). Larutan DPPH 0,2 mM digunakan sebagai larutan kontrol dalam pengukuran aktivitas antioksidan yang pembuatannya harus dalam keadaan baru agar terhindar dari perubahan nilai yang signifikan. Larutan kontrol berfungsi untuk menentukan absorbansi radikal DPPH sebelum direduksi oleh sampel. Sisa radikal DPPH hasil selisih antara absorbansi kontrol dan absorbansi sampel yang telah tereduksi DPPH akan terbaca oleh spektrofotometer UV-Vis (Garcia dkk., 2012). Penginkubasian yang dilakukan pada suhu 37°C selama 30 menit bertujuan untuk mengoptimalkan reaksi antara radikal bebas

DPPH dengan senyawa metabolit sekunder. Reaksi utama antara DPPH dan antioksidan ditampilkan pada Gambar 2.9 dan 2.11.

Nilai konsentrasi sampel dan persen (%) efektivitas antioksidan diplotkan masing-masing pada sumbu X dan Y pada persamaan regresi linear. Persamaan regresi linear yang diperoleh dalam bentuk persamaan $y = a + bx$, digunakan untuk mencari nilai EC_{50} dari masing-masing sampel dengan menyatakan y sebesar 50 dan nilai EC_{50} yang akan diperoleh dari x (Rahmayani dkk., 2013). Semakin kecil nilai EC_{50} yang diperoleh maka aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh suatu senyawa akan semakin kuat. Dapat diketahui bahwa dengan semakin meningkatnya konsentrasi isolat steroid menyebabkan nilai persen (%) efektivitas antioksidan yang dihasilkan juga semakin meningkat. Hal ini ditunjukkan dengan semakin besarnya konsentrasi sampel yang digunakan maka akan semakin banyak senyawa aktif pada sampel yang dapat menghambat radikal bebas DPPH. Nilai EC_{50} dirangkum dalam Tabel 4.5 dan nilai persen (%) efektivitas antioksidan dirangkum pada Lampiran 4.4.

Tabel 4.5 Nilai EC_{50} isolat KLT preparatif alga merah (*Eucheuma cottonii*)

Isolat Steroid	EC_{50} (ppm)
1	80,11
3	93,31
12	160,85

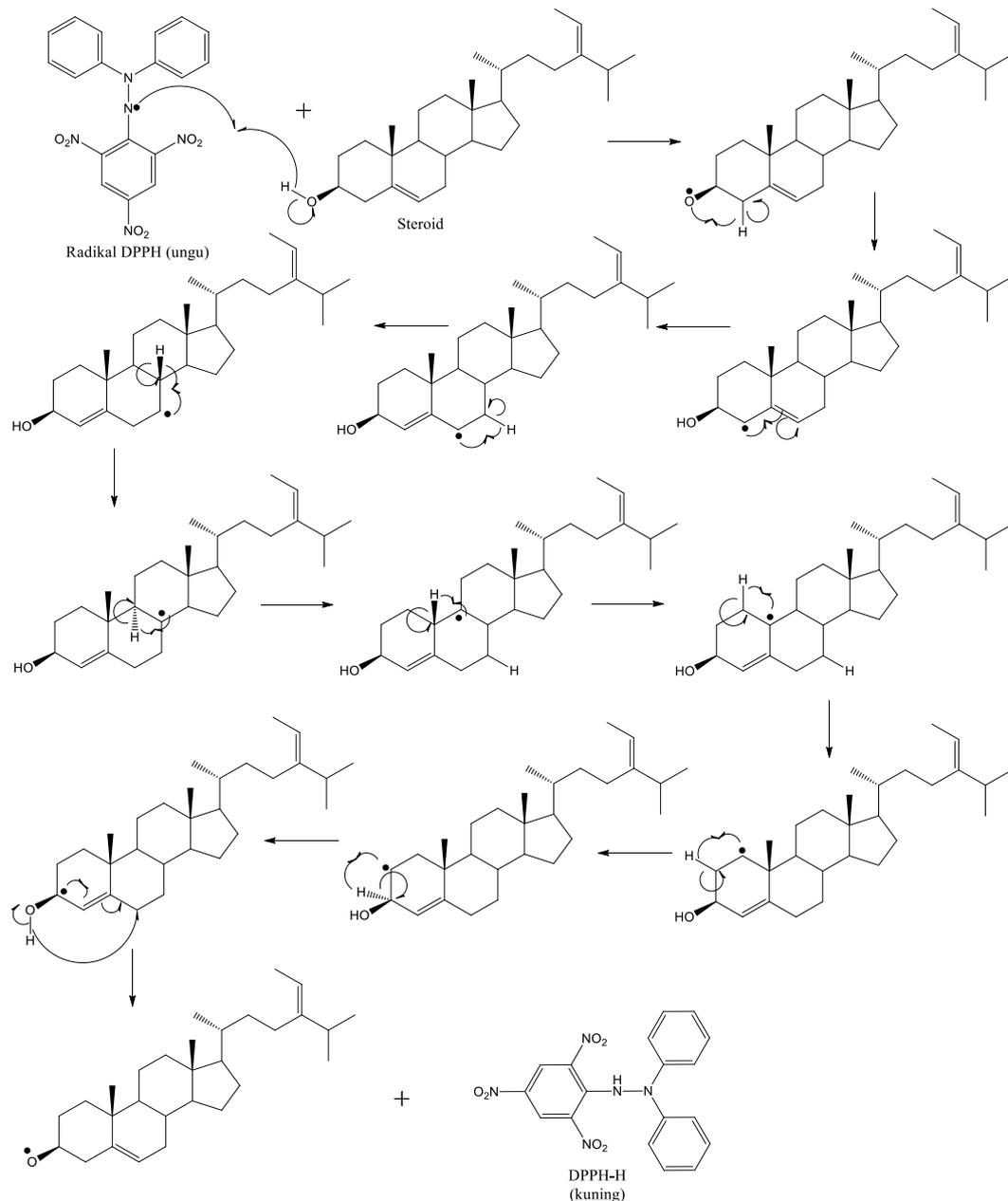
Berdasarkan Tabel 4.5 isolat 1 dan 3 memiliki aktivitas antioksidan kuat dengan nilai EC_{50} berturut-turut sebesar 80,11 ppm ($R^2 = 0,6809$) dan 93,31 ppm ($R^2 = 0,5973$). Sedangkan isolat 12 memiliki aktivitas antioksidan lemah dengan nilai EC_{50} sebesar 160,85 ppm ($R^2 = 0,9401$). Perbedaan nilai EC_{50} pada ketiga isolat tersebut dapat diduga karena adanya efek sinergis dan antagonis yang dapat mempengaruhi hasil aktivitas antioksidan. Campuran senyawa yang memiliki efek

sinergis dapat meningkatkan aktivitas antioksidan, sedangkan senyawa yang memiliki efek antagonis dapat menurunkan aktivitas antioksidan (Sonam & Guleria, 2017). Hal lain yang dapat diduga sebagai indikasi berbedanya nilai EC_{50} pada ketiga isolat yaitu adanya pengukuran aktivitas antioksidan yang dilakukan melebihi batas waktu kestabilan DPPH yaitu 30 menit.

Nilai EC_{50} pada isolat 1 dan 3 memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik dibandingkan dengan penelitian Laili (2016) yang juga melakukan uji aktivitas antioksidan pada alga merah (*Eucheuma spinosum*) pada isolat 5 sebesar 123,5 ppm, dan isolat 6 sebesar 94,98 ppm. Lemahnya aktivitas antioksidan yang dimiliki isolat 12 dimungkinkan karena adanya efek antagonis dari isolat tersebut. Hal ini sejalan dengan hasil uji kemurnian isolat 12 menggunakan KLT dua dimensi yang masih menghasilkan dua spot noda. Sesuai dengan prinsipnya menurut Molyneux (2004), adanya aktivitas antioksidan pada ketiga isolat tersebut dapat diamati dengan adanya perubahan warna larutan DPPH akibat bereaksi ketika bercampur dengan senyawa aktif dalam sampel yang semula berwarna ungu pekat berubah menjadi ungu cerah hingga kuning dengan menghasilkan DPPH-H. Reaksi dugaan senyawa steroid sebagai antioksidan dengan metode DPPH ditampilkan pada Gambar 4.8.

Gambar 4.8 menjelaskan mekanisme reaksi yang terjadi antara senyawa fukosterol yang bertindak sebagai antioksidan dan senyawa radikal bebas DPPH. Senyawa radikal DPPH akan bebas bereaksi dengan senyawa antioksidan dengan mengambil atom hidrogen dari senyawa antioksidan untuk mendapatkan elektron pasangan dan akan terstabilkan oleh adanya donor tersebut (Daud dkk., 2011). Senyawa antioksidan akan kehilangan satu atom hidrogen dan menjadi senyawa

radikal baru tidak berbahaya dan akan tetap terstabilkan dengan adanya resonansi (Molyneux, 2004).



Gambar 4.8 Mekanisme reaksi dugaan steroid jenis fukosterol dengan DPPH

4.10 Pemanfaatan Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) dalam Perspektif Islam

Penelitian tentang alga merah (*Eucheuma cottonii*) yang berpotensi sebagai antioksidan merupakan salah satu bentuk cara beribadah kepada Allah SWT dan kepatuhan kita sebagai manusia dalam menjalankan perintah-Nya. Oleh karena itu,

Allah SWT menciptakan manusia dengan dibekali akal dan pikiran dimaksudkan agar kita sebagai umatnya senantiasa untuk mengamati dan sekaligus mempelajari fenomena-fenomena alam yang terjadi.

Allah SWT berfirman dalam surat Ali Imran ayat 190-191:

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

Artinya: “*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal, (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): ‘Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Masa suci Engkau, maka periharalah kami dari siksa neraka.’*” (QS. Ali Imran: 190-191).

Menurut Qurthubi (2009), dalam surat Ali Imran ayat 190-191 diatas, Allah SWT memerintahkan manusia untuk senantiasa melihat, merenungkan, mencari tahu serta mengambil kesimpulan terhadap tanda-tanda ke-Tuhanan. Pada ayat *لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ* Allah SWT menyebutkan bahwa “*Terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal*”. Inilah fungsi akal yang diberikan oleh Allah SWT kepada manusia, yaitu agar manusia dapat menggunakan akal tersebut untuk menyadari dan memahami tanda-tanda kekuasaan Allah SWT. Ayat tersebut juga menjelaskan bahwa semua ciptaan Allah SWT tidak ada yang sia-sia, semua memiliki manfaat dan tujuan jika manusia mampu menggali ilmu pengetahuan itu sendiri. Salah satu tumbuhan laut ciptaan Allah SWT yang memiliki banyak manfaat adalah alga merah.

Allah SWT berfirman dalam surat an Nahl ayat 14:

وَهُوَ الَّذِي سَخَّرَ الْبَحْرَ لِتَأْكُلُوا مِنْهُ لَحْمًا طَرِيًّا وَتَسْتَخْرِجُوا مِنْهُ حِلْيَةً تَلْبَسُونَهَا وَتَرَى الْفُلْكَ
مَوَاجِرَ فِيهِ وَلِتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ وَلِعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ

Artinya: “dan Dia-lah, Allah yang menundukkan lautan (untukmu), agar kamu dapat memakan daipadanya daging yang segar (ikan), dan kamu mengeluarkan dari lautan itu perhiasan yang kamu pakai; dan kamu melihat bahtera berlayar padanya dan supaya kamu mencari (keuntungan) dari karunia-Nya, dan supaya kamu bersyukur.” (QS. an Nahl: 14).

Berdasarkan surat an Nahl ayat 14 Allah SWT dalam lafadz *سَخَّرَ الْبَحْرَ* menjelaskan bahwa Dia menciptakan laut, menundukkannya serta menumbuhkannya dengan berbagai jenis tumbuhan yang tidak ternilai harganya hanya untuk dapat dimanfaatkan oleh manusia (Asy-Syinqithi, 2008). Selain itu, manusia juga dianjurkan untuk memanfaatkan hasil laut agar mendapatkan keuntungan dari kekayaan laut dan dikembangkan untuk kemaslahatan manusia (Qurthubi, 2009). Banyak penafsiran oleh para ulama tentang lafadz “*Taskhir*” dalam ayat diatas. Menurut Thahir bin Asyur (1998), “*Taskhir*” yaitu membuat laut menjadi lentur, mudah diarungi dan dapat dieksploitasi. Menurut Ar-Razi (2000) “*Taskhir*” yaitu menjadikan laut sebagai tempat yang dapat diambil manfaatnya oleh manusia, baik dengan mengambil ikan, mutiara atau yang lainnya. Sedangkan menurut Tantawi (1998), “*Taskhir*” yaitu Allah SWT mempersiapkan segala hal yang dapat dimanfaatkan di laut.

Tumbuhan laut alga merah dalam penelitian ini terbukti memiliki kemampuan sebagai tanaman obat yaitu dapat bertindak sebagai antioksidan. Kandungan antioksidan ini dapat dimanfaatkan sebagai pencegah oksidasi di dalam sel tubuh manusia yang dapat disebabkan oleh adanya radikal bebas yang dapat menyebabkan berbagai penyakit seperti penuaan dan karsinogenik. Oleh karena itu,

dengan adanya penelitian ini dapat diketahui bahwa tumbuhan laut jenis alga merah (*Eucheuma cottonii*) dapat bermanfaat bagi manusia khususnya sebagai obat antioksidan. Terdapat hadist yang menggambarkan fenomena ini yaitu diriwayatkan oleh Imam Ahmad:

كُنْتُ عِنْدَ النَّبِيِّ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ، وَجَاءَتِ الْأَعْرَابُ، فَقَالَ: يَا رَسُولَ اللَّهِ، أُنْتَدَاوِي؟ فَقَالَ:
نَعَمْ يَا عِبَادَ اللَّهِ، تَدَاوُوا، فَإِنَّ اللَّهَ عَزَّ وَجَلَّ لَمْ يَضَعْ دَاءً إِلَّا وَضَعَ لَهُ شِفَاءً غَيْرَ دَاءٍ وَاحِدٍ. قَالُوا:
مَا هُوَ؟ قَالَ: الْهَرَمُ

Artinya: “Aku pernah berada di samping Rasulullah, Lalu datanglah serombongan Arab Badui. Mereka bertanya, “Wahai Rasulullah, bolehkah kami berobat?”, Beliau menjawab, “Iya, wahai para hamba Allah, berobatlah. Sebab, Allah tidaklah meletakkan sebuah penyakit melainkan meletakkan pula obatnya, kecuali satu penyakit.” Mereka bertanya, “Penyakit apa itu?”, Beliau menjawab, “Penyakit tua.” (Hadits riwayat Imam Ahmad).

Dalam hadits tersebut menjelaskan bahwa jika manusia mau bersungguh-sungguh dalam mencari jalan kesembuhan maka niscaya akan diberi kesembuhan oleh Allah SWT karena Dia telah berjanji bahwa datangnya suatu penyakit maka sekaligus dengan obatnya. Dari dilakukannya penelitian ini membuktikan bahwa alga merah (*Eucheuma cottonii*) mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu steroid yang mampu berperan sebagai antioksidan yang dapat dimanfaatkan oleh manusia. Karena semua yang di bumi telah diciptakan oleh Allah SWT hakikatnya adalah untuk manusia itu sendiri. Allah SWT menciptakan binatang, tumbuhan, laut, gunung dan sebagainya adalah hanya untuk disiapkan dan diperuntukkan untuk umat manusia agar semua dapat dimanfaatkan dengan baik dan semaksimal mungkin bagi agama dan dunianya (Al-Khozin, 2001). Hal ini sesuai dengan firman Allah SWT dalam surat al Baqarah ayat 29:

هُوَ الَّذِي خَلَقَ لَكُمْ مَا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا ثُمَّ اسْتَوَىٰ إِلَى السَّمَاءِ فَسَوَّاهُنَّ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ ۗ وَهُوَ

بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ ۝

Artinya: “Dialah (Allah SWT) yang menciptakan segala yang ada di bumi untukmu kemudian Dia menuju ke langit, lalu Dia menyempurnakannya menjadi tujuh langit. Dan Dia Maha Mengetahui segala sesuatu. (QS. al Baqarah: 29).

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian uji aktivitas antioksidan isolat steroid dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolat steroid alga merah (*Eucheuma cottonii*) hasil pemisahan KLT preparatif menggunakan variasi eluen n-heksana : etil asetat dari ekstraksi menggunakan ultrasonik memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai EC_{50} isolat 1 sebesar 80,11 ppm ($R^2 = 0,6809$), isolat 3 sebesar 93,31 ppm ($R^2 = 0,5973$) dan isolat 12 sebesar 160,85 ppm ($R^2 = 0,9401$).
2. Hasil identifikasi isolat steroid alga merah (*Eucheuma cottonii*) menggunakan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan adanya serapan pada panjang gelombang 202 nm untuk isolat 1, 204 nm untuk isolat 3 dan 205,9 nm untuk isolat 12 yang mengindikasikan adanya ikatan C=C tidak terkonjugasi yang akan memberikan transisi elektron dari $\pi-\pi^*$. Sedangkan hasil identifikasi menggunakan FTIR menunjukkan adanya serapan pada gugus fungsi $-C_{sp^3}H$ alkana *stretching*, $-CH_2-$ simetri, C-H *bending* asimetri, $-C-H=$ ikatan vinil hidrokarbon, serta $-(CH_2)_2-$ *rocking* serta $-CH_3$ simetri untuk gugus geminal dimetil yang merupakan gugus yang sering muncul pada senyawa steroid.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan saran untuk menunjang penelitian selanjutnya yaitu:

1. Adanya penggunaan reagen warna yang disemprotkan pada saat pemisahan menggunakan KLT preparatif dan dua dimensi agar spot noda yang terbentuk dapat terlihat jelas dan dapat memperkuat dugaan bahwa senyawa yang terpisah benar-benar senyawa steroid.
2. Adanya penggunaan instrumen seperti GC-MS untuk mengetahui apakah hasil pemisahan pada KLT dua dimensi benar-benar menghasilkan senyawa steroid atau tidak serta LC-MS untuk mengetahui jenis steroid apa yang dihasilkan dari penelitian ini.
3. Adanya kerja sama yang baik antara analis dan laboran pada saat di laboratorium agar hal-hal yang tidak diinginkan seperti tidak sesuainya langkah kerja saat di laboratorium tidak berdampak pada hasil dan data yang diperoleh.

DAFTAR PUSTAKA

- Adhiatama, I., Zainudin, M., & Rokhati, N. (2012). Hidrolisis Kitosan Menggunakan Katalis Asam Klorida (HCl). *Jurnal Teknologi Kimia Dan Industri*, 1(1), 245–251.
- Afif, S., Fasya, A. G., & Ningsih, R. (2015). Extraction, Toxicity Assay and Identification of Active Compounds of Red Algae (*Eucheuma cottonii*) from Sumenep Madura. *ALCHEMY*, 4(2), 101–106.
- Al-Khozin, A. (2001). *Tafsir Al Maraghi 14 Juz 14*. Semarang: CV. Toha Putra.
- Al-Quais, K. (2015). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak n-Heksana dan Identifikasi Senyawa Steroid Akar Rumput Bambu (*Lophaterum gracile brongn*). [Skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Alupului, A., Calinescu, I., & Lavric, V. (2009). Ultrasonic VS Microwave Extraction Intensification of Active Principles from Medicinal Plants. *Chemical Engineering Transactions*, 17, 1023–1028.
- Amalyah, R. (2015). Isolasi Metabolit Sekunder dan Uji Aktivitas Insentisida Ekstrak n-Heksana Kulit Batang Tumbuhan Nyiri Batu (*Xylocarpus moluccenciss*). *UNESA Journal of Chemistry*, 4(1), 25–30.
- Anggadiredja, J. T., Zatrika, A., & Purwoto, H. (2006). *Rumput Laut: Pembudidayaan, Pengolahan, & Pemasaran Komoditas Perikanan Potensial*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Anggraini, V. (2018). Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Dengan Variasi Gradien Eluen Fraksi Etil Asetat Makroalga (*Eucheuma cottonii*). [Skripsi]. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Aprelia, F., & Suyatno, S. (2013). Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Etil Asetat Tumbuhan Paku *Christella arida* dan Uji Pendahuluan Sebagai Antikanker. *UNESA Journal of Chemistry*, 2(3), 94–99.
- Ardianti, A., & Kusnadi, J. (2013). Ekstraksi Antibakteri dari Daun Berenuk (*Crescentia cujete* Linn.) Menggunakan Metode Ultrasonik. *Jurnal Pangan Dan Agroindustri*, 2(2), 28–35.
- Arsianti, A. A., Fadilah, F., Suid, K., Yazid, F., Wibisono, L. K., Azizah, N. N., Putrianingsih, R., Murniasih, T., Rasyid, A., & Pangestuti, R. (2016). Phytochemical Composition and Anticancer Activity of Seaweeds *Ulva Lactuca* and *Eucheuma cottonii* Against Breast MCF-7 and Colon HCT-116 Cells. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(6), 115–119.

- Arsianti, A., Nugrahayning Aziza, Y., Kurniasari, K. D., Mandasari, B. K. D., Masita, R., Zulfa, F. R., Dewi, M. K., Zagloel, C. R. Z., Azizah, N. N., & Putrianingsih, R. (2018). Phytochemical Test and Cytotoxic Activity of Macroalgae *Eucheuma cottonii* against Cervical HeLa Cells. *Pharmacognosy Journal*, 10(5), 1012–1017.
- Arsianti, A., Kurniawan, G., Tejaputri, N., Qorina, F., Fithrotunnisa, Q., Azizah, N., & Fajrin, A. (2020). Phytochemical Profile, Antioxidant Activity and Cell Line Study of Marine Red Macroalgae *Eucheuma cottonii* on Lung A-549 Cancer Cells. *Pharmacognosy Journal*, 12(2), 276-281.
- Artati, E. K., (2012). Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Asam Terhadap Kinetika Reaksi Hidrolisis Pelepah Pisang (*Musa Paradisiaca* L). *Ekuilibrium*, 11(2), 73–77.
- Ar-Razi, F. (2000). *Mafatihul Ghaib juz 20*. Beirut: Dar Ihya' Turats Al-Arabi.
- Asbahani, A. E., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H., Mousadik, A. E., Hartmann, D., Jilale, A., Renaud, F. N. R., & Elaissari, A. (2015). Essential Oils: From Extraction to Encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 483(1), 220–243.
- Asih, I. A. R. A. (2009). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Isoflavon dari Kacang Kedelai (*Glycine max*). *Jurnal Kimia (Journal of Chemistry)*, 3(1), 33–40.
- Aslan, L. M. (1998). *Budidaya Rumput Laut*. Yogyakarta: Kanisius.
- Asy-Syinqithi. (2008). *Adhwa'ul Bayan*. Semarang: Toha Putra.
- Azah, S. N. (2019) Uji Toksisitas dan Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLTP Ekstrak n-Heksana dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata* Menggunakan UV-Vis dan LC-MS/MS. [Skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Babaei, M. R., Jabbari, A., & Yamini, Y. (2006). Solid-Liquid Extraction of Fatty Acids of Some Variety of Iranian Rice in Closed Vessel in The Absence and Presence of Ultrasonic Waves. *Asian Journal of Chemistry*, 18(1), 57–64.
- Baderos, A. (2017). Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan Identifikasi Menggunakan LC-MS. [Skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Baur, F. F., & Ensminger, L. G. (1977). The Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). *Journal of The American Oil Chemists' Society*, 5(4), 171-171.

- Bawa, I. G. A. G. (2009). Isolasi dan Identifikasi Golongan Senyawa Toksik Dari Daging Buah Pare (*Momordica charantia* L.). *Jurnal Kimia (Journal of Chemistry)*, 3(2), 117–124.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity Using The DPPH Free Radical Method. *LWT-Food Science and Technology*, 30(6), 609-615.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Blois, M. S. (1958) Antiozidant Determinations by The Use of a Stable free Radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Cahyadi, W. (2008). *Analisis dan Aspek Kesehatan Bahan Tambahan*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Chairunisa, I., & Indradi, R. B. (2019). Aktivitas Antibakteri dan Kandungan Fitokimia Ekstrak Etanol Alga Merah (*Eucheuma cottonii*). *Farmaka*, 17(1), 105–110.
- Chandra, R., Kumar, S., Singh, S., Sharma, K., Alam, N., Verma, D. (2013). Quantitative Assay Evaluation of Vitamin 'C' from Formulated Tablets: Application on Rp-HPLC and UV-Spectrophotometry. *International Journal of Analytical, Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2(3), 19-23.
- Da, R. A. (1999). *Analisis Kimia Kuantitatif*. Jakarta: Erlangga.
- Damongilala, L. J., Widjanarko, S. B., Zubaidah, E., & Runtuwene, M. R. J. (2013). Antioxidant Activity Against Methanol Extraction of *Eucheuma cottonii* and *E. spinosum* Collected From North Sulawesi Waters, Indonesia. *Food Science and Quality Management*, 17, 7–13.
- Das, B., & Srinivas, K. V. N. S. (1992). Minor C29-Steroids from The Marine Red Alga, *Gracilaria edulis*. *Phytochemistry*, 31(7), 2427–2429.
- Daud, M. F., Sadiyah, E. R., & Rismawati, E. (2011). Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) Berdaging Buah Putih. *Prosiding SNaPP: Sains, Teknologi*, 2(1), 55–62.
- Depkes RI., 1994. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor: 661/MENKES/SK/VII/1994 tentang Persyaratan Obat Tradisional. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.

- Dewi, S. M., W, F. R., Handayani, N., & Rahmawati, R. (2010). Penentuan Kandungan Kimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Buah Merah (*Pandanus conoideus Lam*). Solo: Universitas Sebelas Maret, 1–2.
- Dinasti, A. R. (2016). Isolasi Dengan KLTP dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.* [Skripsi]. Malang: Universtas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Doty, M. S. (1985). *Eucheuma alvarezii sp.nov* (Gigartinales, Rhodophyta) from Malaysia. Di dalam: Abbot IA, Norris JN (editors). *Taxonomy of Economic Seaweeds*. California Sea Grant College Program. 37-45 pp.
- Elalla, F. M. A., & Shalaby, E. A. (2009). Antioxidant Activity of Extract and Semi-Purified Fractions of Marine Red Macroalga, *Gracilaria verrucosa*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4), 3179–3185.
- Elena, S., Bugaev, S., Sokolov, M., & Glinushkin, A. (2018). Antimicrobial Bio-Components from Red Algae Species: A Review of Application and Health Benefits—Entomology and Applied Science Letters. *Entomology and Applied Science Letters*, 5(3), 85–90.
- Fatimah, F. (2020). Uji Toksisitas Senyawa Steroid Hasil Kromatografi Kolom Basah Fraksi n-Butanol Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma cottonii* dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi. [Skripsi]. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Fasya, A. G., Khamidah, U., Amaliyah, S., Romaidi. (2013). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi Dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) Pada Tiap Fase Pertumbuha. [Skripsi]. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Fasya, A. G., Baderos, A., Madjid, A. D. R., Amalia, S., & Megawati. (2014). Isolation, Identification and Bioactivity of Steroids Compounds from Red Algae *Eucheuma cottonii* Petroleum Ether Fraction. *AIP Conference Proceeding*. 2120(1), 030025.
- Feng, S., Luo, Z., Tao, B., & Chen, C. (2015). Ultrasonic-Assisted Extraction and Purification of Phenolic Compounds from Sugarcane (*Saccharum officinarum L.*) Rinds. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 970-976.
- Ferreira, V & Lopez, R. (2019). The Actual and Potential Aroma of Winemaking Grapes. *Biomolecules*, 9(12), 818.
- Fessenden, R. J. (1986). *Kimia Organik*. Jakarta: Erlangga.
- Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

- Gangwar, M., Gautam, M. K., Sharma, A. K., Tripathi, Y. B., Goel, R. K., & Nath, G. (2014). Antioxidant Capacity and Radical Scavenging Effect of Polyphenol Rich *Mallotus philippinensis* Fruit Extract on Human Erythrocytes: An In Vitro Study. *The Scientific World Journal*, 2014, e279451.
- García, J. L., & Castro, M. D. (2004). Ultrasound-Assisted Soxhlet Extraction: An Expeditive Approach for Solid Sample Treatment. Application to the Extraction of Total Fat from Oleaginous seeds. *Journal of Chromatography. A*, 1034(1–2), 237–242.
- Garcia, E. J., Oldoni, T, L, C., Alencar, S, M., Reis, A., Loguercio, A, D., & Grande, R, H, M. (2012). Antioxidant Activity by DPPH Assay of Potential Solutions to be Applied on Bleached teeth. *Brazilian Dental Journal*, 23, 22-27.
- Gordon, M. H. (1990). The Mechanism of Antioxidants Action in Vitro. *Food Antioxidants*, 1–18.
- Gunawan. (2004). *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi) Jilid 1*. (Cet.1). Jakarta: Penebar Swadaya.
- Hadiyanto., & Sutrisnorhadi. (2016). Response Surface Optimization of Ultrasound Assisted Extraction (UAE) of Phycocyanin from Microalgae *Spirulina platensis*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(94), 227–234.
- Hahn-Deinstrop, E. (2007). *Applied Thin-Layer Chromatography, Best Practice and Avoidance of Mistakes*. Second, Revised and Enlarge Edition. Jerman: Willer_VCH.
- Hamburger, M. O., & Cordell, G. A. (1987). A Direct Bioautographic TLC Assay for Compounds Possessing Antibacterial Activity. *Journal of Natural Products*, 50(1), 19–22.
- Handaratri, A., & Yuniati, Y. (2019). Kajian Ekstraksi Antosianin dari Buah Murbei dengan Metode Sonikasi dan Microwave. *Reka Buana : Jurnal Ilmiah Teknik Sipil dan Teknik Kimia*, 4(1), 63.
- Handayani, D., N. Sayuti., & Dachriyanus. (2008). Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri Epioksi Sterol dari Spon Laut *Petrosianigrans*, Asal Sumatera Barat. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi II 2008*. Lampung: Universitas Lampung.
- Handayani, H., Sriherfyna, F. H., & Yunianta. (2016). Ekstraksi Antioksidan Daun Sirsak Metode Ultrasonic Bath (Kajian Bahan: Pelarut dan Lama Ekstraksi). *Jurnal Pangan Dan Agroindustri*, 4(1), 262–272.

- Handoko, D. S. P. (2006). Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam Sebagai Katalis. *SIGMA Jurnal Sains dan Teknologi*, 9(1), 9–17.
- Harborne, J. B. (1987). *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Harwood, L. M., & Moody, C. J. (1989). *Experimental Organic Chemistry: Principles and Practice*. Oxford England: Blackwell Scientific Publications.
- Hidayat, A. (2006). *Budidaya Rumput Laut*. Surabaya: Usaha Nasional.
- Huda, M. S. (2019). Ekstraksi dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Aktif Dengan Variasi Pengeringan Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Pantai Wongsorejo Banyuwangi. [Skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Ikhlas, N. (2015). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Herba Kemangi (*Ocimum americanum* Linn) dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil). [Skripsi]. Jakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Program Study Farmasi.
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412-422.
- Kenny, A. P. (1952). The Determination of Cholesterol by Liebermann-Burchard Reaction. *Biochemical Journal*, 52(4), 611-619.
- Khandaker, M. U., Heffny, N. 'Adillah B., Amin, Y. M., & Bradley, D. A. (2019). Elevated Concentration of Radioactive Potassium in Edible Algae Cultivated in Malaysian Seas and Estimation of Ingestion Dose to Humans. *Algal Research*, 38.
- Khanzada, A. K., Shaikh, W., Kazi, T. G., Kabir, S., & Soofia, S. (2007). Antifungal, Activity, Elemental Analysis and Determination of Total Protein of Seaweed, *Solieria robusta* (Greville) Kylin from The Coast of Karachi. *Pak. J. Bot*, 39(3), 931–937.
- Kholidah, I. (2020). Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi n-Butanol Alga Merah *Eucheuma cottonii*. [Skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Khurniasari, D. W. (2004). Potensi Antikanker Senyawa Bioaktif Ekstrak Kloroform dan Metanol Makroalgae *Sargassum duplicatum* J. Agardh. [Skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada.
- Khopkar, S. M. (1990). *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI-Press.

- Kazłowska, K., Lin, H. T. V., Chang, S. H., Tsai, G. J. (2013). In Vitro an In vivo Anticancer Effect of Sterol Fraction from Red Algae *Porphyra dentata*. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1(1): 1-10.
- Krisna, I. A. G. P., Santi, S. R., & Rustini, N. L. (2014). Senyawa Steroid Pada Daun Gayam (*Inocarpus fagiferus Fosb*) dan Aktivitasnya Sebagai Antioksidan Terhadap Difenilpikrilhidrazil (DPPH). *Jurnal Kimia (Journal of Chemistry)*, 8(2), 251–256.
- Kristanti, A. N. (2008). *Buku Ajar Fitokimia*. (Cet.1). Surabaya: Airlangga Universitas Press.
- Lailah, N. (2014). Uji Aktivitas Antioksidan dan Fitokimia Fraksi Etil Asetat, Kloroform, dan n-Heksana Ekstrak Metanol Alga Coklat *Sargassum cristaefolium*. [Skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Laili, R. (2016). Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*). [Skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Liang, Ningjian and Kitts, David D. 2014. Antioxidant Property of Coffe Components: Assessment of Method that Define Mechanisms of Action. *Molecules*, 19(11): 19180-19208.
- Lopes, G., Sousa, C., Bernardo, J., Andrade, P., Valentão, P., Ferreres, F., & Mouga, T. (2011). Sterol Profiles in 18 Macroalgae of The Portuguese Coast. *Journal of Phycology*, 47(5), 1210–1218.
- Luki, C. E. (2018). Pemisahan Steroid Fraksi Etil Asetat Makroalga *Eucheuma cottonii* Menggunakan Kromatografi Kolom Gradien Eluen Secara Eksperimen dan Studi In Silico Serta Uji Antioksidannya. [Skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Luo, X., Su, P., & Zhang, W. (2015). Advances in Microalgae-Derived Phytosterols for Functional Food and Pharmaceutical Applications. *Marine Drugs*, 13(7): 4231-4254.
- Luthfiyah, E. N. 2017. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid Hasil Hidrolisis ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Perairan Wongsorejo Banyuwangi Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dan LC-MS. [Skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Madjid, A. D. R., Rahmawati, D. A., & Fasya, A. G. (2020). Variasi Komposisi Eluen pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* dengan Kromatografi Kolom Basah. *ALCHEMY*, 8(1), 35–40.

- Maghfiroh, N. (2019). Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi n-Heksana Mikroalga *Chlorella sp.* [Skripsi Tidak Diterbitkan]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Makin, H. L. J., & Gower, D. B. (Ed.). (2010). *Steroid Analysis*. (2 ed.). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Malathi, K., An, Anbarasu, & Ramaiah, S. (2017). Ethyl Iso-allocholate from a Medicinal Rice Karungkavuni Inhibits Dihydropteroate Synthase in *Escherichia coli*: A Molecular Docking and Dynamics Study. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78(6), 780–788.
- Manilal, A., Sujith, S., Selvin, J., Kiran, G. S., & Shakir, C. (2009). In vivo Antiviral Activity of Polysaccharide from the Indian Green Alga, *Acrosiphonia orientalis* (J. Agardh): Potential Implication in Shrimp Disease Management. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 1(4), 278–282.
- Manjang, Y. (1985). *Kimia Analisis Organik*. Padang: Proyek Peningkatan Perguruan Tinggi.
- Mardaneni, I. (2017). Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid Alga Merah (*Euclidean cottonii*) Fraksi Etil Asetat Perairan Wongsorejo-Banyuwangi dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan LC-MS/MS. [Skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Mardiyah, U., Fasya., A. G., & Amalia., S. (2014). Ekstraksi Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Euclidean cottonii* dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *ALCHEMY*, 3(1), 39-46.
- Matanjun, P., Mohamed, S., Noordin, M. M., & Muhammad, K. (2009). Nutrient Content of Tropical Edible Seaweeds, *Euclidean cottomi*, *Cauler palentillifera* and *Sargassum polycystum*. *Journal of Applied Phycology*, 21(1), 75–80.
- Matuszewska, A., Jaszek, M., Stefaniuk, D., Ciszewski, T., & Matuszewski, L. (2018). Anticancer, Antioxidant, and Antibacterial Activities of Low Molecular Weight Bioactive Subfractions Isolated from Cultures of Wood Degrading Fungus *Cerrena unicolor*. *PLOS ONE*, 13(6), e0197044.
- Miftahurrahmah, M., Fasya, A., Mardiyah, U., & Hanapi, A. (2013). Uji Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Metanol Alga Merah *Euclidean cottonii* dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *ALCHEMY*, 2(2), 126–137.
- Millati, N. (2016). Uji Toksisitas Dengan Metode BSLT Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella sp.* [Skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.

- Molyneux, P. (2004). The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol*, 26(2), 9.
- Moss, G. P. (1989). Nomenclature of Steroids (Recommendations 1989). *Pure and Applied Chemistry*, 61(10), 1783-1822.
- Muawanah, M., Ahmad, A., & Natsir, H. (2016). Antioxidant Activity and Toxicity Polysaccharide Extract from Red Algae *Euचेuma cottonii* and *Euचेuma spinosum*. *Marina Chimica Acta*, 17(2), 15–23.
- Mufadal. (2015). Isolasi Senyawa Alkaloid Dari Alga Merah (*Euचेuma cottonii*) Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Serta Analisa Dengan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. [Skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Mulya & Suharman. (1995). *Analisis Instrumental*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Namir, H., Hadzic, R., Malesevic, I., Jurcevi, M., & Starcevic, D. (2019). Application of Thin Layer Chromatography for Qualitative Analysis of Gunpowder in Purpose of Life Prediction of Ammunition. *International Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 5(1), 4-12.
- Nasution, H. M. (2020). Skrining Fitokimia dan Isolasi Senyawa Steroid/Triterpenoid dari Ekstrak n-Heksana Rumput Laut *Euचेuma alvarezii* Doty. *Jurnal Dunia Farmasi*, 4(3), 108–115.
- Nath, M. C., Chakravorty, M. K., & Chowdhury, S. R. (1946). Liebermann-Burchard Reaction for Steroids. *Nature*, 157(3978), 103–104.
- Nes, W. D. (1989). *Analysis of Sterols and Other Biologically Significant Steroids*. (E. J. Parish, Ed.). Academic Pr.
- Nihlati, I., Abdul, R., & Triana, H. (2008). Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Temu Kunci [*Boesenbergia pandurata* (roxb.) Schleth] dengan Metode Penangkapan Radikal DPPH (1, 1-difenil-2-pikrilhidrazil). [Skripsi]. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada
- Ningsih, E., Fasya, A. G., Adi, T. K., & Hanapi, A. (2015). Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid pada Fraksi n-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Euचेuma spinosum*). [Skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Nurjanah, Nurilmala, M., Anwar, E., Luthfiyana, N., & Hidayat, T. (2017). Identification of Bioactive Compounds of Seaweed *Sargassum sp.* And *Euचेuma cottonii* Doty as a Raw Sunscreen Cream. *Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences*, 54(4), 311–318.

- Pasanda, O. S. R., Azis, A., & Sulistiawati., (2020). Ekstraksi Rumput Laut (*Sargassum sp*) Dengan Ultrasonik Menghasilkan Natrium Alginat. [Prosiding 4th Seminar Nasional Penelitian & Pengabdian Kepada Masyarakat 2020]. Makassar: Politeknik Negeri Ujung Pandang.
- Poedjiadi, A. (1994). *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Pokorni. (2001). *Antioxidant in Food: Practical Applications*. New York: Crs Press.
- Prakash, A., Rigelhof, F., & Miller, E. (2001). Antioxidant Activity. *Medallion Laboratories Analytical Progress*, 10(1). p. 2.
- Pramana, M. R. A., & Saleh, C. (2013). Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Steroid Pada Fraksi n-Heksana dari Daun Kukang (*Lepisanthes amoena* (HASSK.) LEENH.). *Jurnal Kimia Mulawarman*, 10(2), 1–7.
- Pramitania, V. A. (2019). Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi n-Heksana Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi. [Skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Prasasty, V. D., Haryani, B., Hutagalung, R. A., Mulyono, N., Yazid, F., Rosmalena, R., & Sinaga, E. (2019). Evaluation of Antioxidant and Antidiabetic Activities from Red Seaweed (*Eucheuma cottonii*). *Systematic Reviews in Pharmacy*, 10(1), 276–288.
- Purba, N. E., Suhendra, L., & Wartini, N. M. (2019). Pengaruh Suhu dan Lama Ekstraksi dengan Cara Maserasi Terhadap Karakterisasi Pewarna dari ekstrak Alga Merah (*Gracilaria sp.*). *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, 7(4), 488.
- Qurthubi, S. I. A. (2009). *Terjemah Tafsir Al Qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Rahmayani, U., Pringgenies, D., & Djunaedi, A. (2013). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Keong Bakau (*Telescopium telescopium*) dengan Pelarut Yang Berbeda Terhadap Metode DPPH (*Diphenyl Picril Hidrazil*). *Journal of Marine Research*, 2(4), 36-45.
- Ratnasari, I. (2017). Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis dan Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan LC-MS pada Fraksi n-Butanol Alga Merah *Eucheuma cottonii* Perairan Wongsorejo Banyuwangi. [Skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Reich, E., & Schibli, A. (2007). *High-Performance Thin-Layer Chromatography for The Analysis of Medicinal Plants*.
- Robinson, T. (1995). *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi Ed.6*. Bandung: ITB.

- Rohman, A., & Riyanto, S. (2017). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*, L). *AgriTECH*, 25(3), 131–136.
- Saifudin, A., Fuad, A., & Da'i, M. (2006). Biotransformasi Kurkumin Melalui Kultur Suspensi Sel Daun *Catharanthus roseus* [L] G. Don Berbunga Merah. *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*, 7(2), 92–102.
- Saleh, C. (2007). Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Steroid dari Akar Tumbuhan Cendana (*Santalum album* Linn). [Disertasi]. Sumatera: Program Doktor ilmu Kimia Sekolah Pascasarjana Univesitas Sumatera Utara.
- Sambodo, D. K. (2019). Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Rumput Laut Merah (*Eucheuma cottonii*) Sumbawa dan Ekstrak Kulit Buah Lemon (*Citrus limon* L). *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 15(2), 86–91.
- Sari, K. A. I., Gunawan, I, W, G., & Putra, K. G. D. (2015). Kapasitas Antioksidan Senyawa Golongan Triterpenoid pada Daun Pranajiwa (*Euchresta horsfieldii* lesch benn.). *Jurnal Kimia*. 9(1), 61-66.
- Sari, D. K., Wardhani, D. H., & Prasetyaningrum, A. (2012). Pengujian Kandungan Total Fenol *Kappaphycus alvarezzi* dengan Metode Ekstraksi Ultrasonik dengan Variasi Suhu dan Waktu. [Prosiding SNST Fakultas Teknik]. Semarang: Universitas Wahid Hasyim.
- Sari, D. K., Lestari, R. S. D., & Rahmat, A. (2016). Biosintesis Nano/Mikro Partikel Perak Dari Rumput Laut (*Eucheuma cottonii*) Berbantu Gelombang Ultrasonik. *Prosiding Semnastek*, 0, Article 0.
- Sari, D. K., Deza, A., Ilma, I. A., & Lestari, R. S. D. (2018). Perbandingan Metode Uji Kandungan Total Fenolik Dari Ekstrak Rumput Laut *Eucheuma cottonii* Lontar Banten. *Teknika: Jurnal Sains dan Teknologi*, 14(1), 39–46.
- Sastrohamidjojo, H. (1991). *Kromatografi*. Yogyakarta: Liberty.
- Savova, M., Kolusheva, T., Stourza, A., & Seikova, I. (2007). The Use of Group Contribution Method for Predicting The Solubility of Seed Polyphenols of *Vitis Vinifera* L. Withiin a Wide Polarity Range in Solvent Mixtures. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 43(2), 295–300.
- Sax, D., & Lewis, R. (1998). *Dictionary Chemistry*. Canada: Galler International.
- Selim, S. A. (2012). Antimicrobial, Antiplasmid and Cytotoxicity Potentials of Marine Algae *Halimeda opuntia* and *Sarconema filiforme* Collected from Red Sea Coast. *International Journal of Marine and Environmental Sciences*, 6(1), 24–29.

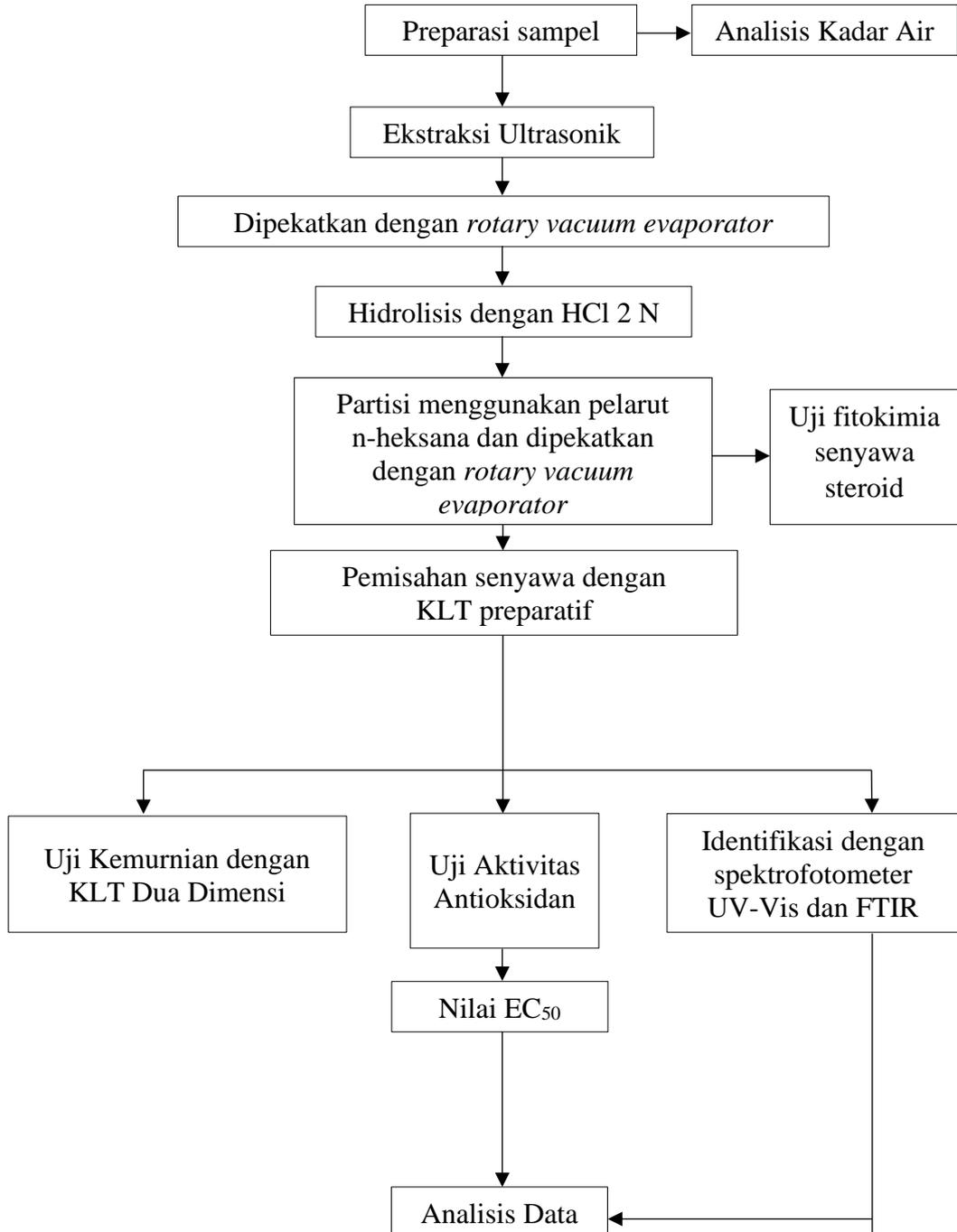
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and Polyphenolics in Foods, Beverages and Spices: Antioxidant Activity and Health Effects – A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897.
- Shamsabadi, F. T., Khoddami, A., Fard, S. G., Abdullah, R., Othman, H. H., & Mohamed, S. (2013). Comparison of Tamoxifen with Edible Seaweed (*Eucheuma cottonii* L.) Extract in Suppressing Breast Tumor. *Nutrition and Cancer*, 65(2), 255–262.
- Sharo, N. M., Ningsih, R., Hanapi, A., & Nasichuddin, A. (2013). Uji Toksisitas dan Identifikasi Senyawa Ekstrak Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *ALCHEMY*, 2(3), 170–177.
- Sholikah, A. N. L. (2016). Isolasi Senyawa Steroid Dari Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) Menggunakan Metode Kromatografi Kolom. [Skripsi]. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Siadi, K. (2012). Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) Sebagai Biopestisida yang Efektif dengan Penambahan Larutan NaCl. *Jurnal MIPA*, 35(1): 78-82.
- Sinulingga, S. E. (2011). Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Steroid/Triterpenoid dari Akar Tanaman Ekor Naga (*Rhaphidophora pinnata* Schott). [Skripsi]. Sumatra Utara: Fakultas Farmasi Universitas Sumatra Utara.
- Siregar, A. F., Sabdono, A., & Pringgenies, D. (2012). Potensi Antibakteri Ekstrak Rumput Laut Terhadap Bakteri Penyakit Kulit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Micrococcus luteus*. *Journal of Marine Research*, 1(2), 152–160.
- Soelama, H. J. J., Kepel, B. J., & Siagian, K. V. (2015). Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Ekstrak Rumput Laut (*Eucheuma cottonii*) Sebagai Antibakteri Terhadap *Streptococcus mutan*. *E-GiGi*, 3(2), Article 2.
- Sonam, K. S., & Guleria, S. (2017). Synergistic Antioxidant Activity of Natural Product. *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics*, 2(8), 1-6.
- Sudarmadji, S., Suhardi, & Haryono, B. (1989). *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Sudjadi. (1988). *Metode Pemisahan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Supardan, M. D., Fuadi, A., Alam, P. N., & Arpi, N. (2012). Solvent Extraction of *Ginger oleoresin* Using Ultrasound. *Makara Journal of Science*, 15(2), 163–167.

- Suryaningrum, T. D., Wikanta, T., & Kristiana, H. (2006). Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan dari Rumput Laut *Halymenia harveyana* dan *Euचेuma cottonii*. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 1(1), 51–56.
- Suslick, K. S. 1989. *Ultrasounds: Its Chemical, Physical and Biological Effects*. New York: VHC Publisher.
- Tamat, S. R., Wikanta, T., & Maulina, L. S. (2007). Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Rumput Laut Hijau *Ulva reticulata* Forsskal. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, , 5(1), 31–36.
- Tantawi, M. S. (1998). *Tafsir Wasith Juz 8*. Kairo: Dar Nadhloh Mesir.
- Tasic, M. B., Konstantinovic, B. V., Lazic, M. L., & Veljkovic, V. B. (2009). The Acid Hydrolysis of Potato Tuber Mash in Bioethanol Production. *Biochemical Engineering Journal*, 43(2), 208–211.
- Thahir, B. A. (1998). *Tahrir Wa Tanwir Juz 14*. Tunisia: Tanusi Linnasyr.
- Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113–4117.
- Wahdaniyah, N. A. (2019). Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Fraksi n-Heksana Mikroalga *Chlorella sp.* [Skripsi]. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Wahyudi, J., Wibowo, W. A., Rais, Y. A., & Kusumawardani, A. (2011). Pengaruh Suhu Terhadap Kadar Glukosa Terbentuk dan Konstanta Kecepatan Reaksi pada Hidrolisa Kulit Pisang. *Seminar Nasional Teknik Kimia*, B09-1-B09-5.
- Wall, P. E. (2005). *Thin-Layer Chromatography*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Wandansari, B. D. (2013). Fermentasi Rumput Laut *Euचेuma cottonii* Oleh *Lactobacillus plantarum*. *Chem Info*, 1(1), 64–69.
- Winahyu, D. A., Retnaningsih, A., & Aprillia, M. (2019). Penetapan Kadar Flavonoid pada Kulit Batang Kayu Raru dengan Metode Spektrofotometer UV-Vis. *Jurnal Analis Farmasi*, 4(1): 29-36.
- Xiong, Q., Wilson, W. K., Pang, J. (2007). The Liebermann–Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangment of Cholesterol in Acid. *Lipids*, 42(1), 87-96.

- Yanuarti, R., Nurjanah, N., Anwar, F., & Hidayat, T. (2017). Profil Fenolik dan Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Rumput Laut *Turbinaria conoides* dan *Eucheuma cottonii*. *JPHPI (Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia)*, 20(2), 230–237.
- Yu, Y. Y. S., Kassim, N. K., Musa, K. H., & Abdullah, A. (2016). Measurement of Antioxidant Activity and Structural Elucidation of Chemical Constituents from *Aglaia oligophylla* Miq. *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering*, 95, 1-7.
- Zandi, K., Tajbakhsh, S., Nabipour, I., Rastian, Z., Yousefi, F., Sharafian, S., & Sartavi, K. (2010). In Vitro Antitumor Activity of *Gracilaria corticata* (A Red Algae) Against Jurkat and Molt-4 Human Cancer Cell Lines. *African Journal of Biotechnology*, 9(40), 6787–6790.
- Zou, T.-B., Xia, E.-Q., He, T.-P., Huang, M.-Y., Jia, Q., & Li, H.-W. (2014). Ultrasound-Assisted Extraction of Mangiferin from Mango (*Mangifera indica* L.) Leaves Using Response Surface Methodology. *Molecules*, 19(2), 1411–1421.

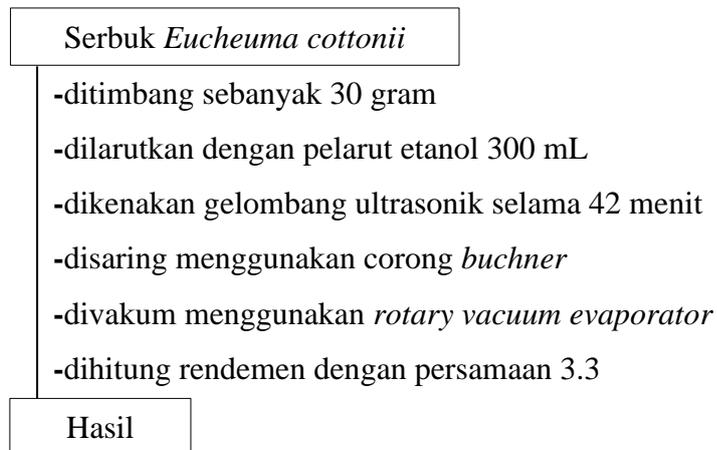
LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir L.1.1 Rancangan Penelitian

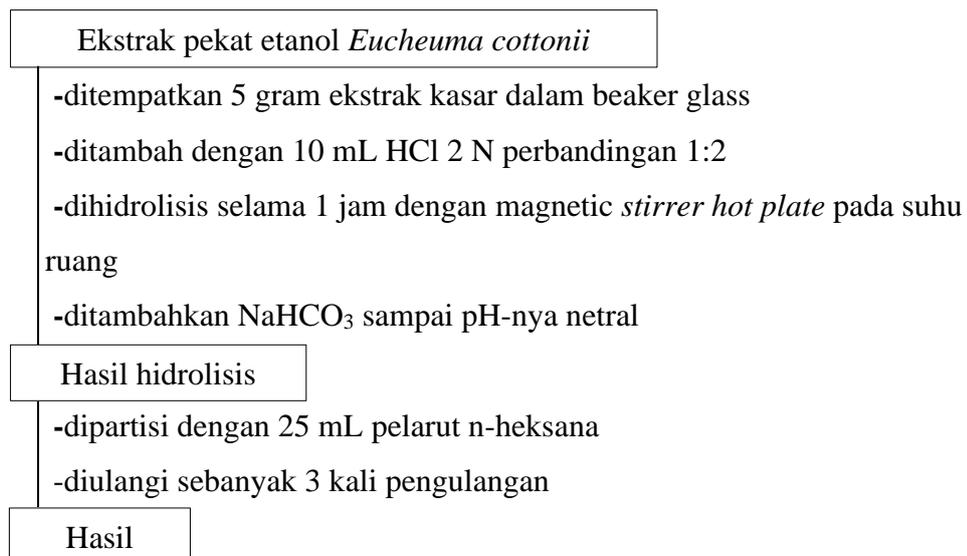


Lampiran 2. Skema Kerja

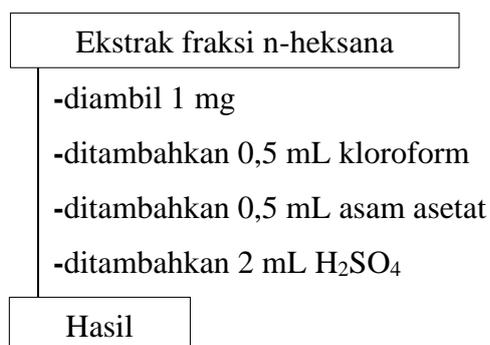
L.2.1 Ekstraksi Ultrasonik



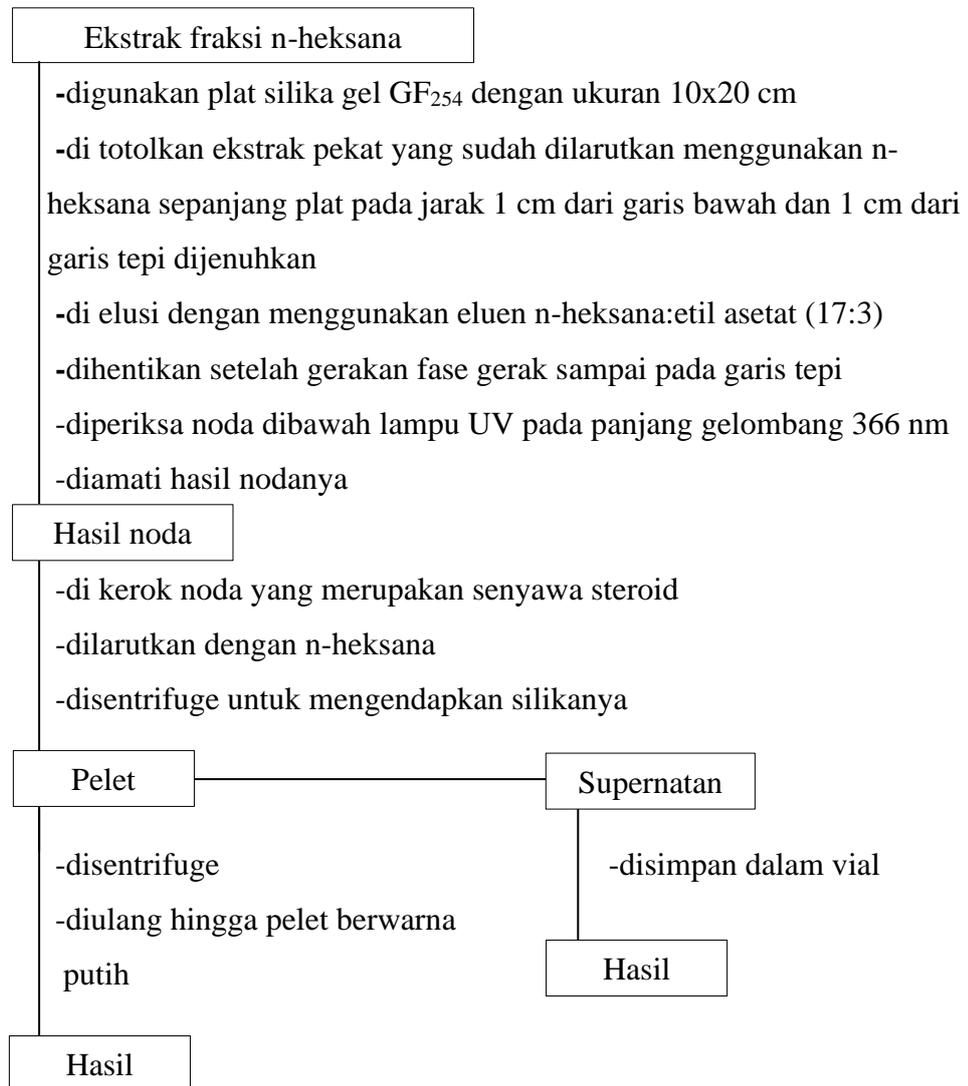
L.2.2 Hidrolisis dengan HCl dan Partisi dengan n-Heksana



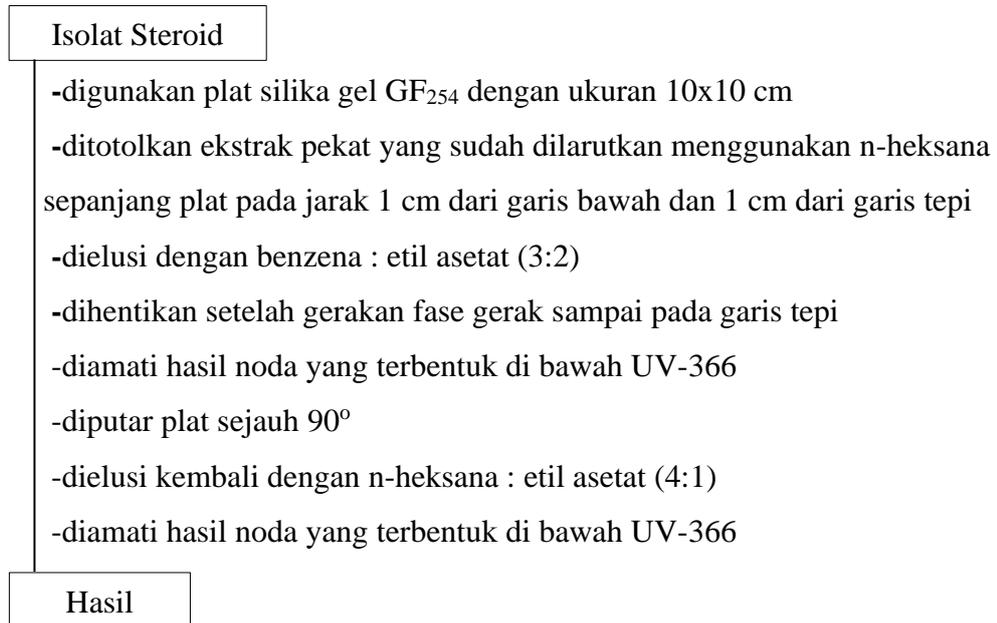
L.2.3 Uji Fitokimia



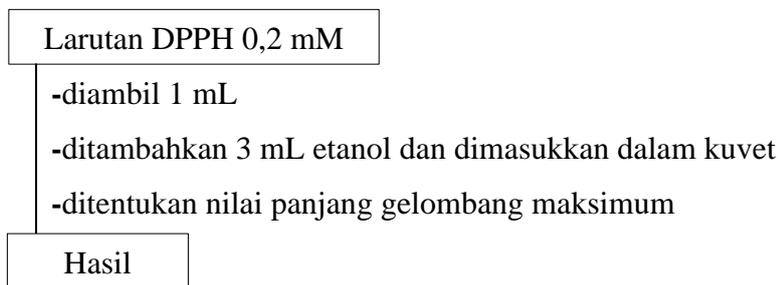
L.2.4 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT Preparatif



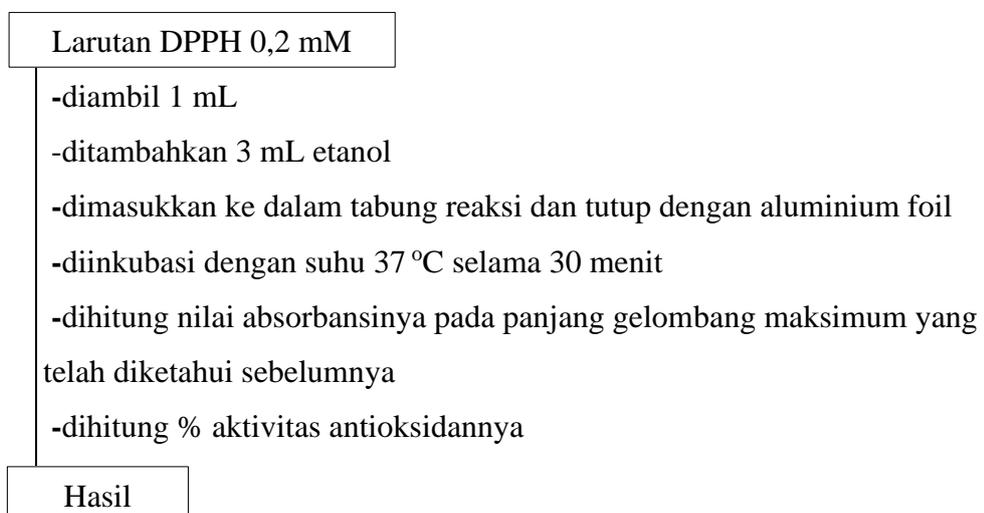
L.2.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT Dua Dimensi



L.2.6 Uji Antioksidan Menggunakan DPPH



(a) Absorbansi Kontrol



(b) Pengukuran Sampel

Sampel konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm

- diambil masing-masing sebanyak 3 mL
- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- ditambahkan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 mL
- diulang sebanyak 3 kali
- di inkubasi dengan suhu 37 °C selama 30 menit
- dihitung nilai absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diketahui sebelumnya
- dihitung % aktivitas antioksidannya
- dihitung nilai EC₅₀

Hasil

L.2.7 Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Isolat Hasil KLT Preparatif

- diambil isolat dan dilarutkan dengan pelarut etanol sebanyak 3 mL
- dimasukkan dalam kuvet
- dianalisis pada panjang gelombang 200-800 nm
- diamati
- dicatat panjang gelombang serta absorbansinya pada puncak yang terbentuk

Hasil

L.2.8 Identifikasi Menggunakan FTIR

Isolat Hasil KLT Preparatif

- diencerkan hingga mencapai konsentrasi tertentu
- dianalisis dengan FTIR

Hasil

Lampiran 3. Pembuatan Larutan dan Reagen

L.3.1 Pembuatan Larutan HCl 2 N

$$\begin{aligned}
 \text{BJ HCl pekat} &= 1,267 \text{ g/mol} \\
 \text{Konsentrasi} &= 37 \% = \frac{37 \text{ g HCl}}{100 \text{ g larutan}} \\
 \text{BM HCl} &= 36,5 \text{ g/mol} \\
 n &= 1 \text{ (jumlah mol ion H}^+) \\
 \text{mol} &= \frac{\text{g HCl}}{\text{Mr HCl}} = \frac{37 \text{ g HCl}}{36,5 \text{ g/mol}} = 1,014 \text{ mol} \\
 100 \text{ gram larutan} &= \frac{100 \text{ g}}{1,267 \text{ g/mol}} = 78,9 \text{ mL} = 0,07889 \text{ L} \\
 \text{Molaritas} &= \frac{\text{mol}}{\text{L}} = \frac{1,014 \text{ mol}}{0,0789 \text{ L}} = 12,85 \text{ M} \\
 \text{Normalitas} &= n \times \text{molaritas} \\
 &= 1 \times 12,85 \text{ M} = 12,85 \text{ N} \\
 N_1 \cdot V_1 &= N_2 \cdot V_2 \\
 12,85 \text{ N} \cdot V_1 &= 2 \text{ N} \cdot 100 \text{ mL} \\
 V_1 &= 15,6 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

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

L.3.2 Pembuatan Larutan NaHCO₃ Jenuh

Kelarutan NaHCO₃ sebesar 9,99 gram dalam 100 mL akuades. Sehingga untuk membuat larutan NaHCO₃ jenuh ditimbang NaHCO₃ dengan berat > 9,99 gram (sampai terdapat endapan padatan yang tidak larut). Lalu disaring larutan tersebut untuk memisahkan residu dan filtrate sehingga didapatkan larutan NaHCO₃ jenuh.

L.3.3 Pembuatan Reagen Liebermann-Burchard

Kloroform <i>p.a</i>	0,5 mL
Anhidrida asetat	0,5 mL
Asam sulfat pekat <i>p.a</i>	0,5 mL

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

L.3.4 Pembuatan Eluen KLT Preparatif

Eluen yang digunakan pada KLT preparatif adalah perbandingan eluen yang terbaik dari hasil KLT analitik.

17:3

$$\text{n-heksana} = \frac{17}{20} \times 10 \text{ mL} = 8,5 \text{ mL}$$

$$\text{etil asetat} = \frac{3}{20} \times 10 \text{ mL} = 1,5 \text{ mL}$$

L.3.5 Pembuatan Eluen KLT Dua Dimensi

Digunakan dua variasi eluen dalam KLT dua dimensi yaitu benzena : etil asetat (3:2) dan n-heksana : etil asetat (4:1).

a) Benzena : etil asetat

$$\text{benzena} = \frac{3}{5} \times 10 \text{ mL} = 6 \text{ mL}$$

$$\text{etil asetat} = \frac{2}{5} \times 10 \text{ mL} = 4 \text{ mL}$$

b) n-Heksana : etil asetat

$$\text{n-heksana} = \frac{4}{5} \times 10 \text{ mL} = 8 \text{ mL}$$

$$\text{etil asetat} = \frac{1}{5} \times 10 \text{ mL} = 2 \text{ mL}$$

L.3.6 Pembuatan Larutan DPPH 0,2 mM

DPPH 0,2 mM dalam 20 mL etanol p.a

$$\text{Volume} = 20 \text{ mL} = 0,02 \text{ L}$$

$$\text{BM DPPH} = 394,33 \text{ g/mol}$$

$$= 394,33 \text{ mg/mmol}$$

$$\text{n DPPH} = 20 \text{ mL} \times 0,2 \text{ mM}$$

$$= 20 \text{ mL} \times \frac{0,2}{1000} \text{ M}$$

$$= 0,004 \text{ mmol}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa DPPH} &= 0,004 \text{ mmol} \times \text{Mr DPPH} \\ &= 0,004 \text{ mmol} \times 394,33 \text{ mg/mmol} \\ &= 1,5773 \text{ mg} \end{aligned}$$

Cara pembuatannya adalah ditimbang serbuk DPPH sebanyak 1,5773 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol p.a dan dimasukkan dalam labu ukur 20 mL. Selanjutnya ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.7 Pembuatan Konsentrasi Sampel

L.3.7.1 Pembuatan Larutan Stok 100 ppm sebanyak 20 mL

$$\begin{aligned} 100 \text{ ppm} &= \frac{\text{mg}}{\text{L}} \\ \text{mg} &= 100 \text{ ppm} \times 0,02 \text{ L} \\ &= 2 \text{ mg} \end{aligned}$$

Cara membuat 20 mL larutan stok 100 ppm diperlukan ekstrak sebanyak 2 mg. Ekstrak kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 20 mL dan ditandabatkan.

(a) Pembuatan Larutan Sampel 5 ppm

$$\begin{aligned} M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\ 100 \text{ ppm} \cdot V_1 &= 5 \text{ ppm} \cdot 20 \text{ mL} \\ V_1 &= \frac{5 \text{ ppm} \cdot 20 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}} \\ &= 1 \text{ mL} \end{aligned}$$

(b) Pembuatan Larutan Sampel 10 ppm

$$\begin{aligned} M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\ 100 \text{ ppm} \cdot V_1 &= 10 \text{ ppm} \cdot 20 \text{ mL} \\ V_1 &= \frac{10 \text{ ppm} \cdot 20 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}} \\ &= 2 \text{ mL} \end{aligned}$$

(c) Pembuatan Larutan Sampel 15 ppm

$$\begin{aligned} M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\ 100 \text{ ppm} \cdot V_1 &= 15 \text{ ppm} \cdot 20 \text{ mL} \\ V_1 &= \frac{15 \text{ ppm} \cdot 20 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}} \\ &= 3 \text{ mL} \end{aligned}$$

(d) Pembuatan Larutan Sampel 20 ppm

$$\begin{aligned}M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\100 \text{ ppm} \cdot V_1 &= 20 \text{ ppm} \cdot 20 \text{ mL} \\V_1 &= \frac{20 \text{ ppm} \cdot 20 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}} \\&= 4 \text{ mL}\end{aligned}$$

(e) Pembuatan Larutan Sampel 25 ppm

$$\begin{aligned}M_1 \cdot V_1 &= M_2 \cdot V_2 \\100 \text{ ppm} \cdot V_1 &= 25 \text{ ppm} \cdot 20 \text{ mL} \\V_1 &= \frac{25 \text{ ppm} \cdot 20 \text{ mL}}{100 \text{ ppm}} \\&= 5 \text{ mL}\end{aligned}$$

Lampiran 4. Data dan Hasil Perhitungan

L.4.1 Data Perhitungan Rendemen Hasil Ekstraksi Ultrasonik

Berat Sampel (g)	Berat Gelas (g)	Berat Gelas + Ekstrak Pekat (g)	Berat Ekstrak Pekat (g)	Rendemen (%)
30	95,1959	100,8163	5,6204	18,73

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\
 &= \frac{(100,8163 - 95,1959) \text{ g}}{30 \text{ g}} \times 100\% \\
 &= 18,73 \%
 \end{aligned}$$

L.4.2 Data Perhitungan Rendemen Hasil Partisi

Berat Sampel (g)	Berat Gelas (g)	Berat Gelas + Ekstrak Pekat (g)	Berat Ekstrak Pekat (g)	Rendemen (%)
5	35,3806	35,5658	0,1852	3,704

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\
 &= \frac{(35,5658 - 35,3806) \text{ g}}{5 \text{ g}} \times 100\% \\
 &= 3,704 \%
 \end{aligned}$$

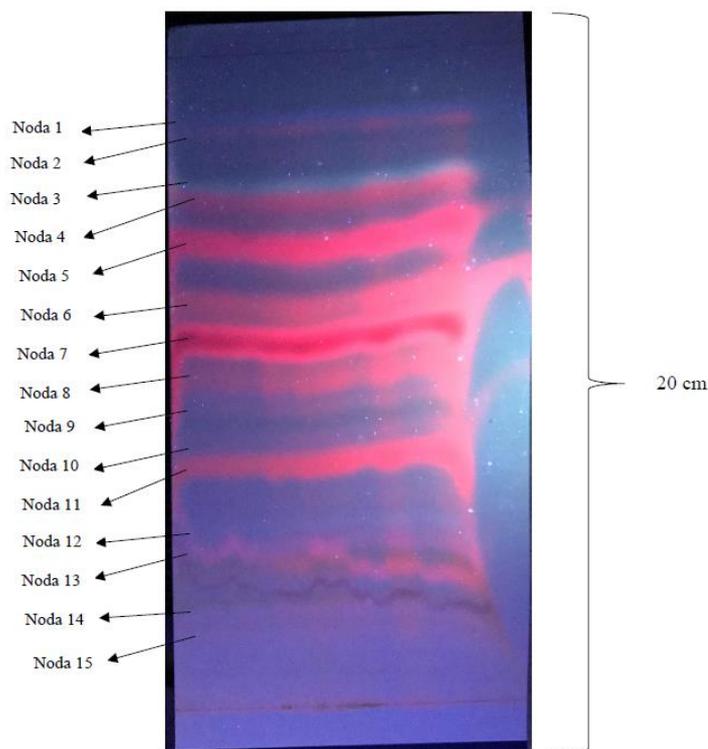
L.4.3 Nilai R_f

L.4.3.1 Hasil KLT Preparatif

Spot ke-	R _f (cm)	Warna Noda		Dugaan Senyawa
		Visual	UV 366 nm	
1	0.9	Putih	Biru	Steroid
2	0.872	Putih	Merah	Triterpenoid
3	0.794	Putih	Hijau	Steroid
4	0.766	Putih	Merah	Triterpenoid
5	0.683	Hijau	Merah	Triterpenoid
6	0.611	Putih	Merah	Triterpenoid
7	0.555	Hijau	Merah	Triterpenoid
8	0.483	Kuning	Merah	Triterpenoid
9	0.45	Putih	Merah	Triterpenoid
10	0.4	Putih	Merah	Triterpenoid
11	0.355	Cokelat	Merah	Triterpenoid
12	0.272	Putih	Hijau	Steroid
13	0.211	Putih	Merah	Triterpenoid
14	0.138	Putih	Merah	Triterpenoid
15	0.111	Putih	Merah	Triterpenoid

Nilai R_f pada hasil KLT preparatif menggunakan eluen n-heksana:etil asetat (17:3) dihitung menggunakan rumus berikut:

$$R_f = \frac{\text{jarak spot (cm)}}{\text{jarak pelarut yang mengelusi (cm)}}$$



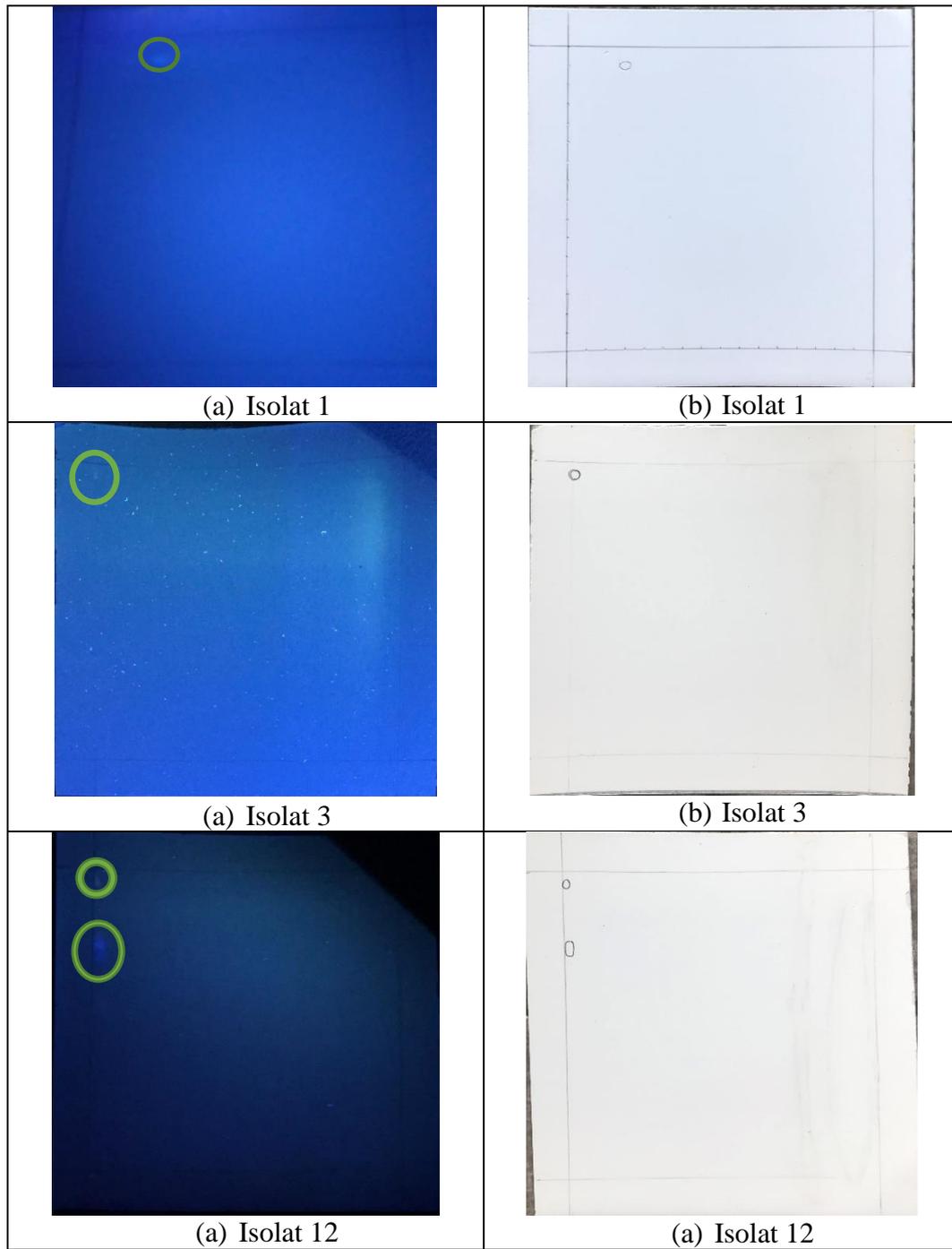
Gambar L.4.1 Hasil KLTP menggunakan eluen n-heksana:etil asetat (17:3)

L.4.3.2 Hasil KLT Dua Dimensi

Isolat Steroid	Eluen 1		Eluen 2	
	Jumlah Spot	Warna	Jumlah Spot	Warna
1	1	Hijau	1	Hijau
3	1	Hijau	1	Hijau
12	2	Biru Hijau	2	Hijau

Nilai R_f pada hasil KLT dua dimensi hasil KLT preparatif dihitung menggunakan rumus berikut:

$$R_f = \frac{\text{jarak spot (cm)}}{\text{jarak pelarut yang mengelusi (cm)}}$$



Gambar L.4.2 Hasil KLT dua dimensi, (a) setelah disinari lampu UV (b) sebelum disinari lampu UV

L.4.4 Nilai Aktivitas Antioksidan

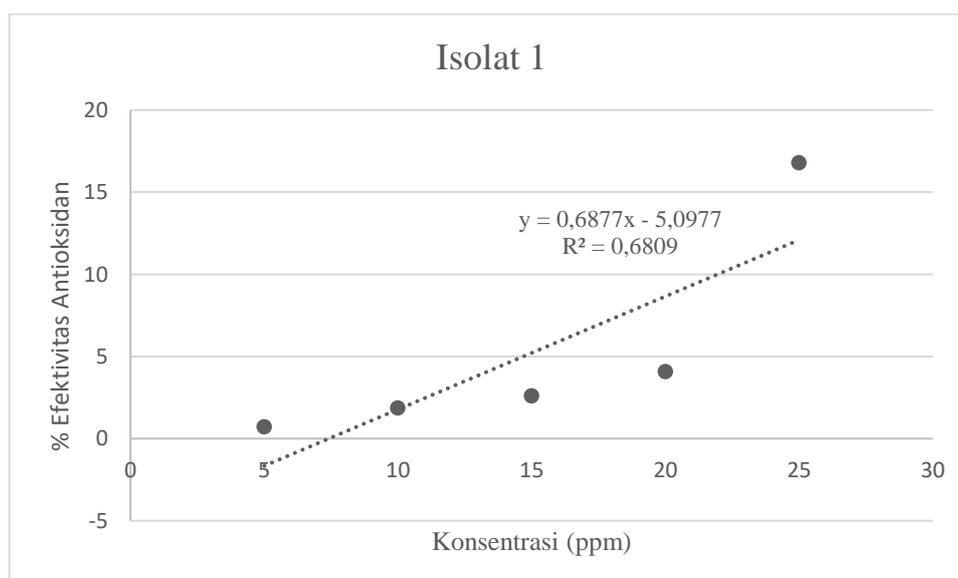
L.4.4.1 Nilai Aktivitas Antioksidan Isolat 1

$$\begin{aligned} \text{\% Efektivitas Antioksidan} &= \frac{\text{Abs. kontrol} - \text{Abs. sampel}}{\text{Abs. kontrol}} \times 100\% \\ &= \frac{0,3744 - 0,3598}{0,3744} \times 100\% \\ &= 3,8996 \end{aligned}$$

Kons (ppm)	Ulangan 1			Ulangan 2			Mean % E. Antioksidan
	Abs. Kontrol	Abs. Sampel	% E. Antioksidan	Abs. Kontrol	Abs. Sampel	% E. Antioksidan	
5	0,5655	0,5794	-2,4580	0,3744	0,3598	3,8996	0,720785
10	0,4191	0,4121	1,6702	0,3744	0,3667	2,0566	1,863435
15	0,4165	0,4106	1,4166	0,3754	0,3611	3,8093	2,612918
20	0,3755	0,3641	3,0359	0,3749	0,3556	5,1480	4,091996
25	0,3761	0,2696	28,3169	0,3750	0,3552	5,28	16,79847

X (konsentrasi)	Y (% efektivitas antioksidan)
5	0,720785
10	1,863435
15	2,612918
20	4,091996
25	16,79847

$$\begin{aligned} \text{Menghitung nilai EC}_{50} \text{ isolat 1} &= \frac{y - b}{a} \times 100\% \\ &= \frac{50 - (-5,0977)}{0,6877} \times 100\% \\ &= 80,11 \text{ ppm} \end{aligned}$$



Gambar L.4.4.1 Grafik % efektivitas antioksidan isolat 1

L.4.4.2 Nilai Aktivitas Antioksidan Isolat 3

Kons (ppm)	Ulangan 1			Ulangan 2			Mean % E. Antioksidan
	Abs. Kontrol	Abs. Sampel	% E. Antioksidan	Abs. Kontrol	Abs. Sampel	% E. Antioksidan	
5	0,5682	0,5730	-0,8447	0,3753	0,3713	1,0658	0,110521
10	0,4141	0,4034	2,5839	0,3713	0,3784	-1,9122	0,335858
15	0,5721	0,5817	-1,6780	0,3718	0,3597	3,2544	0,788205
20	0,4195	0,4056	3,3134	0,5656	0,5637	0,3359	1,824697
25	0,4172	0,4084	2,1093	0,3749	0,2710	27,7141	14,91168

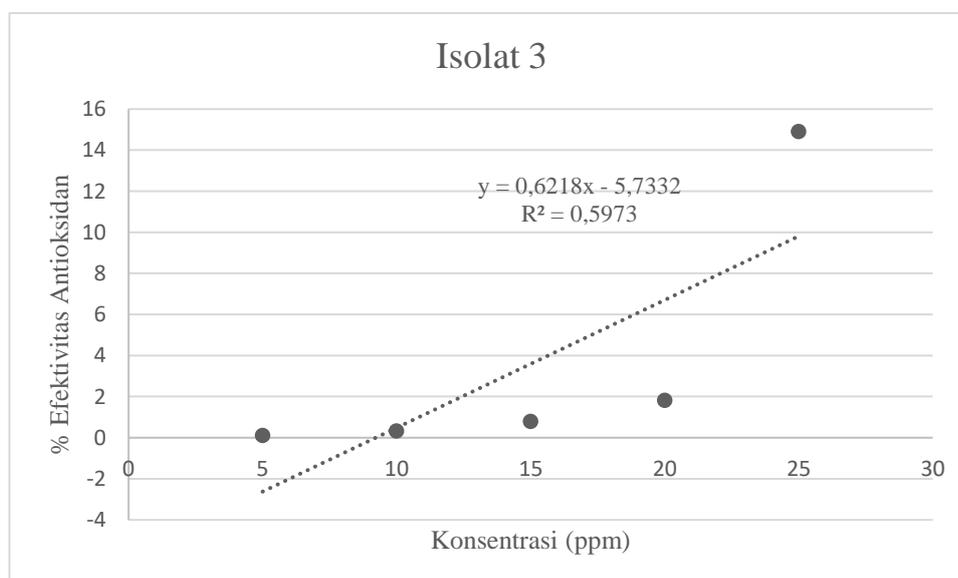
X (konsentrasi)	Y (% efektivitas antioksidan)
5	0,110521
10	0,335858
15	0,788205
20	1,824697
25	14,91168

Menghitung nilai EC₅₀ isolat 3

$$= \frac{y - b}{a} \times 100\%$$

$$= \frac{50 - (-5,7332)}{0,6218} \times 100\%$$

$$= 93,31 \text{ ppm}$$



Gambar L.4.4.2 Grafik % efektivitas antioksidan isolat 3

L.4.4.3 Nilai Aktivitas Antioksidan Isolat 12

Kons (ppm)	Ulangan 1			Ulangan 2			Mean % E. Antioksidan
	Abs. Kontrol	Abs. Sampel	% E. Antioksidan	Abs. Kontrol	Abs. Sampel	% E. Antioksidan	
5	0,4355	0,4225	2,9851	0,4516	0,4225	6,4438	4,714415
10	0,4192	0,3931	6,2261	0,3772	0,3608	4,3478	5,286986
15	0,4516	0,4252	5,8459	0,3778	0,3450	8,6818	7,263862
20	0,5663	0,4911	13,2792	0,3790	0,3561	6,0422	9,660699
25	0,5675	0,5509	2,9251	0,5594	0,4657	16,7501	9,8376

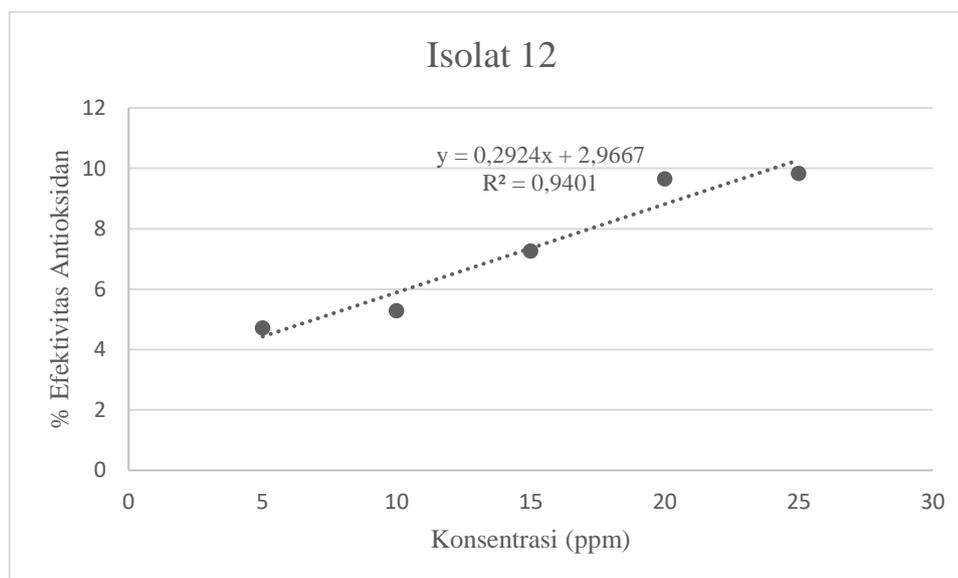
X (konsentrasi)	Y (% efektivitas antioksidan)
5	4,714415
10	5,286986
15	7,263862
20	9,660699
25	9,8376

Menghitung nilai EC₅₀ isolat 12

$$= \frac{y - b}{a} \times 100\%$$

$$= \frac{50 - 2,9667}{0,2924} \times 100\%$$

$$= 160,85 \text{ ppm}$$

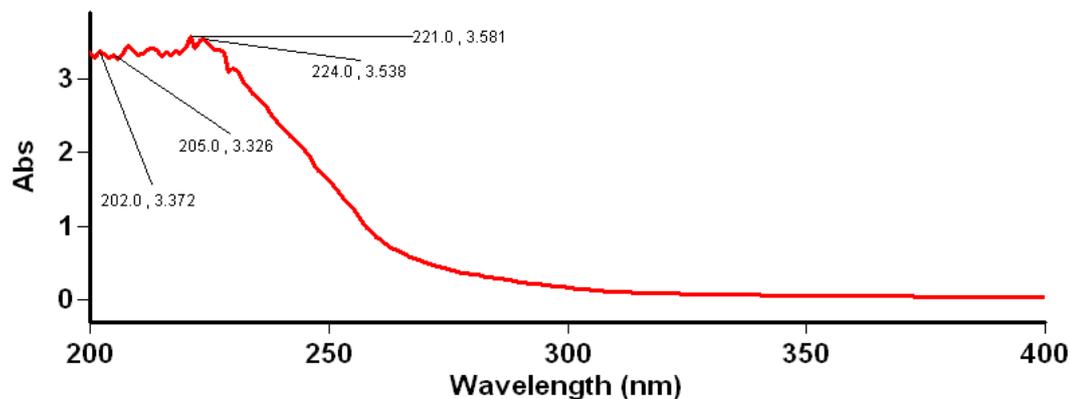


Gambar L.4.4.3 Grafik % efektivitas antioksidan isolat 12

Lampiran 5. Hasil Identifikasi

L.5.1 Hasil Identifikasi Spektrofotometer UV-Vis

L.5.1.1 Hasil Identifikasi Spektrofotometer UV-Vis Isolat 1



Gambar L.5.1.1 Spektra hasil UV-Vis isolat 1

Scan Analysis Report

Report Time : Fri 02 Jul 02:28:54 PM 2021

Method:

Batch: D:\Devi\Lamdha Maks Alga Merah Spot 1 (02-07-2021).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: Alga Merah Spot 1

Collection Time 7/2/2021 2:28:56 PM

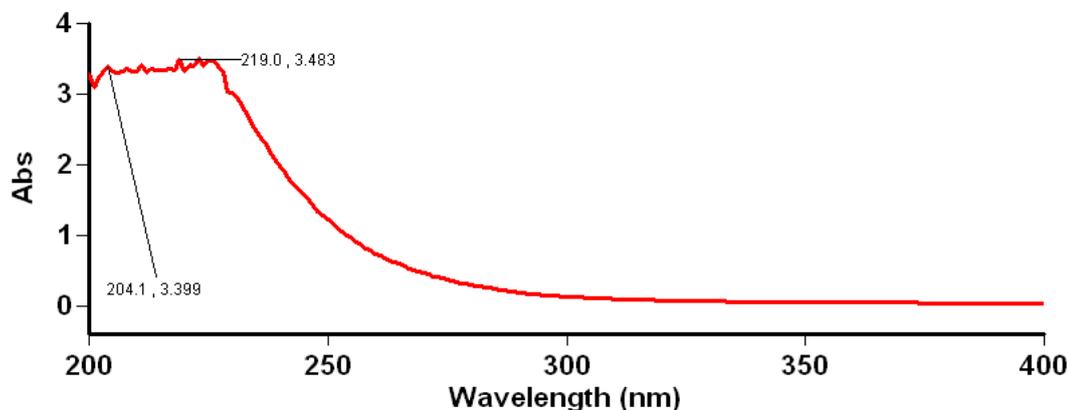
Peak Table

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

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

229.9	3.141
224.0	3.538
221.0	3.581
218.0	3.369
216.0	3.352
213.0	3.408
208.0	3.448
205.0	3.326
202.0	3.372

L.5.1.2 Hasil Identifikasi Spektrofotometer UV-Vis Isolat 3



Gambar L.5.1.2 Spektra hasil UV-Vis isolat 3

Scan Analysis Report

Report Time : Fri 02 Jul 02:25:40 PM 2021

Method:

Batch: D:\Devi\Lamdha Maks Alga Merah Spot 3 (02-07-2021).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: Alga Merah Spot 3

Collection Time 7/2/2021 2:25:41 PM

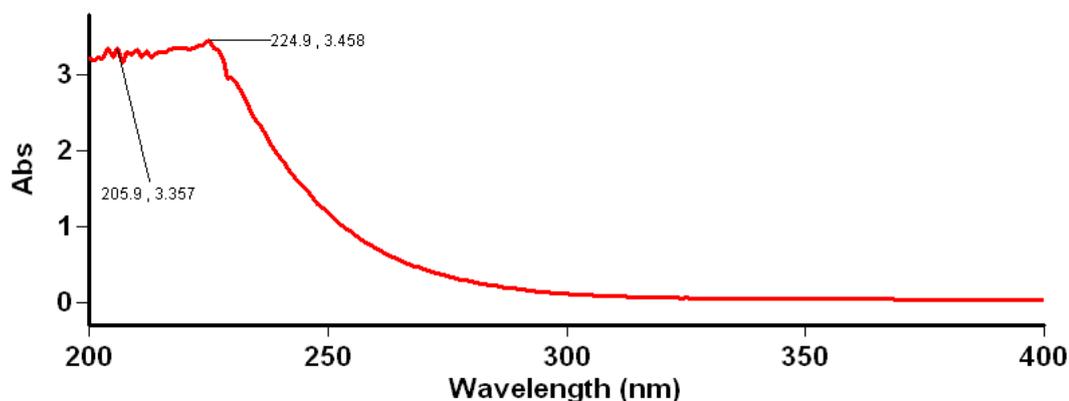
Peak Table

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

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

595.9	0.011
226.0	3.478
223.0	3.506
221.0	3.420
219.0	3.483
216.9	3.364
213.0	3.351
211.0	3.408
208.0	3.357
204.1	3.399

L.5.1.3 Hasil Identifikasi Spektrofotometer UV-Vis Isolat 12



Gambar L.5.1.3 Spektra hasil UV-Vis isolat 12

Scan Analysis Report

Report Time : Fri 02 Jul 02:21:58 PM 2021

Method:

Batch: D:\Devi\Lamdha Maks Alga Merah Spot 1 (02-07-2021).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: Alga Merah Spot 1

Collection Time 7/2/2021 2:22:23 PM

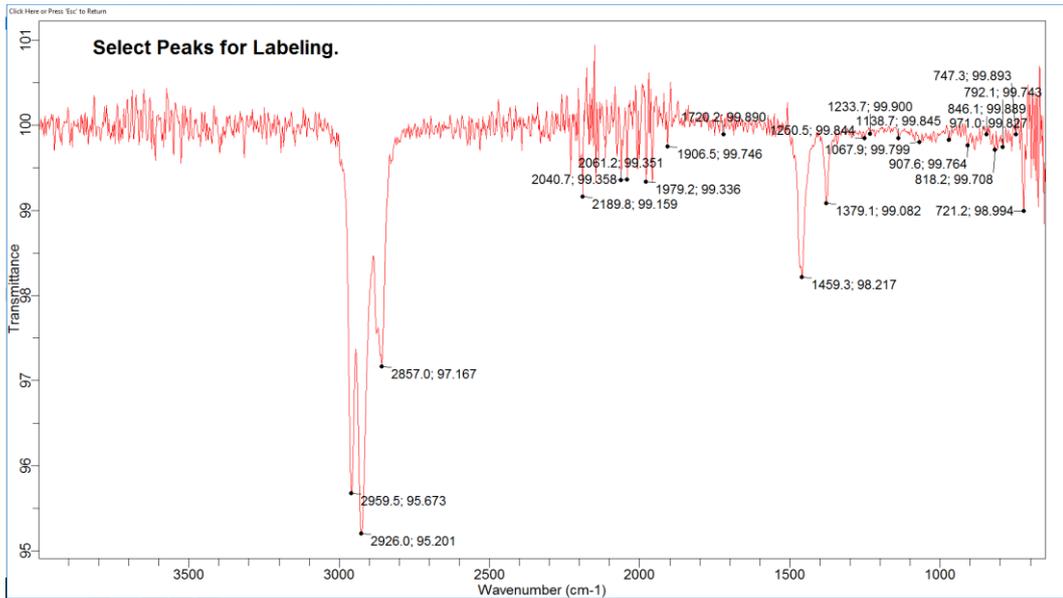
Peak Table

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

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

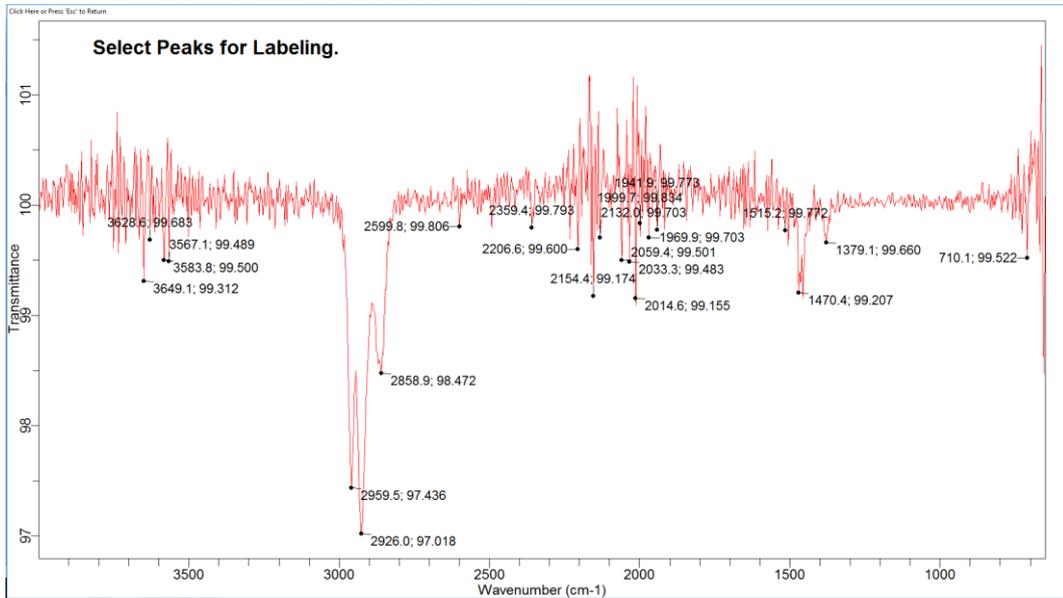
603.0	0.010
229.9	2.967
224.9	3.458
218.0	3.364
212.1	3.318
210.0	3.351
208.0	3.299
205.9	3.357
204.1	3.355
202.0	3.238

L.5.2 Hasil Identifikasi FTIR
L.5.2.1 Hasil Identifikasi FTIR Isolat 1



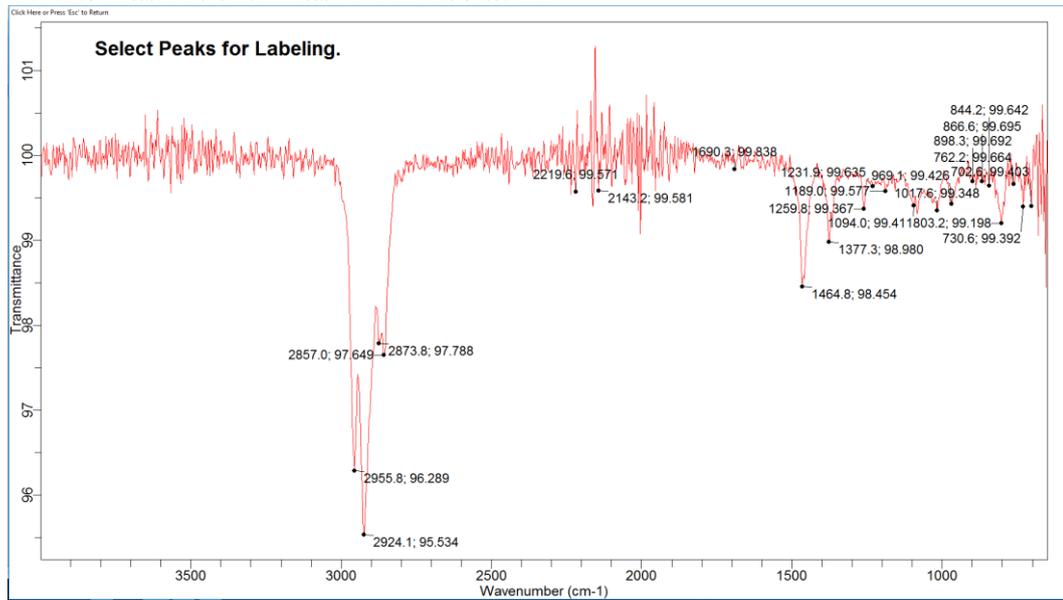
Gambar L.5.2.1 Spektra hasil FTIR isolat 1

L.5.2.2 Hasil Identifikasi FTIR Isolat 3



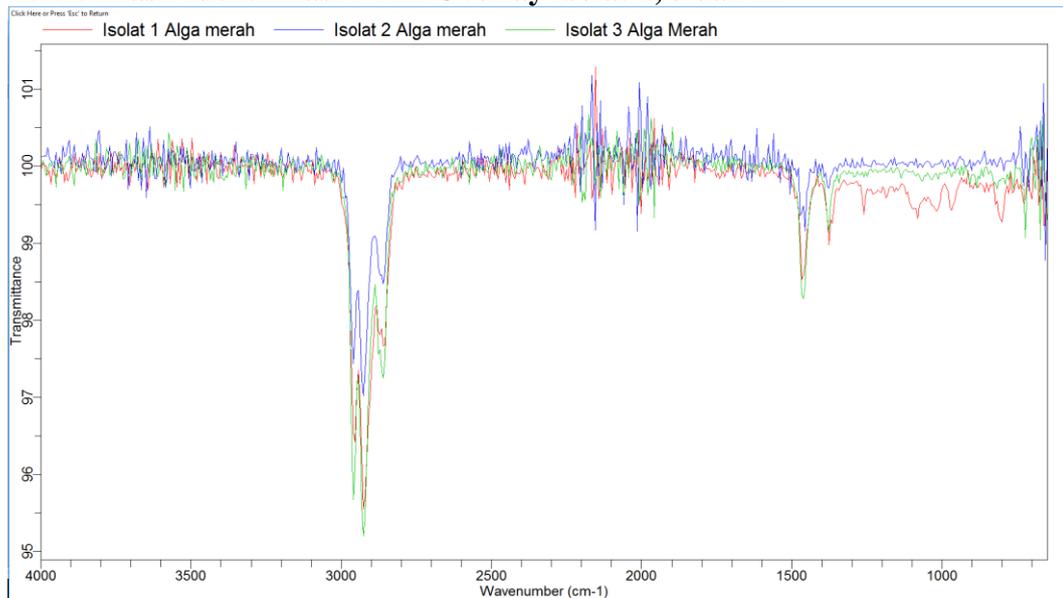
Gambar L.5.2.2 Spektra hasil FTIR isolat 3

L.5.2.3 Hasil Identifikasi FTIR Isolat 12



Gambar L.5.2.3 Spektra hasil FTIR isolat 12

L.5.2.4 Hasil Identifikasi FTIR Overlay Isolat 1, 3 dan 12



Gambar L.5.2.4 Spektra hasil FTIR overlay isolat 1, 3 dan 12

Lampiran 6. Dokumentasi

L.6.1 Ekstraksi Ultrasonik



Proses ekstraksi ultrasonik



Proses penyaringan ekstrak



Ekstrak etanol 1



Ekstrak etanol 2



Ekstrak etanol 3



Ekstrak kasar hasil ultrasonik

L.6.2 Hidrolisis dan Partisis Ekstrak Pekat Etanol



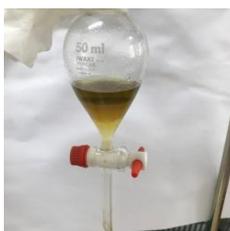
Proses hidrolisis



Penetrulan menggunakan NaHCO_3



Partisi ke-1



Partisis ke-2

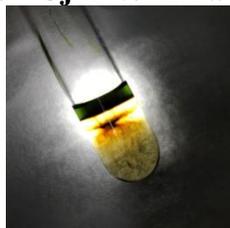


Partisi ke-3

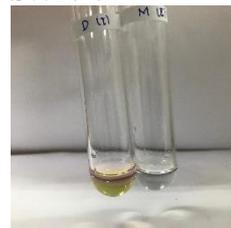


Ekstrak hasil partisi

L.6.3 Uji Fitokimia Senyawa Steroid



(+) steroid



(-) alkaloid

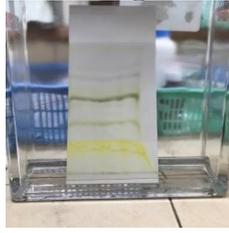


(-) flavonoid

L.6.4 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT Preparatif



Larutan stok



Proses elusi



Spot KLTP setelah dikerok



Proses vortex



Proses sentrifuge

L.6.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT Dua Dimensi



Larutan stok



Proses elusi 1



Proses elusi 2

L.6.7 Uji Antioksidan Menggunakan DPPH



Persiapan larutan stok



Larutan hasil KLTP



Sampel di inkubasi



Setelah ditambahkan DPPH