

**PEMISAHAN dan UJI TOKSISITAS SENYAWA STEROID FRAKSI  
PETROLEUM ETER dan ETIL ASETAT *Hydrilla verticillata* HASIL  
KROMATOGRAFI KOLOM GRADIEN ELUEN**

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**HAPPY DWI RAHMANI  
NIM. 17630045**



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

**PEMISAHAN dan UJI TOKSISITAS SENYAWA STEROID FRAKSI  
PETROLEUM ETER dan ETIL ASETAT *Hydrilla verticillata* HASIL  
KROMATOGRAFI KOLOM GRADIEN ELUEN**

**SKRIPSI**

**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)**

**Oleh :  
HAPPY DWI RAHMANI  
NIM. 17630045**

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

**PEMISAHAN dan UJI TOKSISITAS SENYAWA STEROID FRAKSI  
PETROLEUM ETER dan ETIL ASETAT *Hydrilla verticillata* HASIL  
KROMATOGRAFI KOLOM GRADIEN ELUEN**

**SKRIPSI**

Oleh :  
**HAPPY DWI RAHMANI**  
NIM. 17630045

**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji**  
**Tanggal : 6 Desember 2021**

**Pembimbing I**

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

**Pembimbing II**

**A. Ghulam Fasya, M.Si**  
NIP. 19820616 200604 1 002

**Mengetahui,**  
**Ketua Program Studi,**



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

**PEMISAHAN dan UJI TOKSISITAS SENYAWA STEROID FRAKSI  
PETROLEUM ETER dan ETIL ASETAT *Hydrilla verticillata* HASIL  
KROMATOGRAFI KOLOM GRADIENT ELUEN**

**SKRIPSI**

Oleh :  
**HAPPY DWI RAHMANI**  
NIM. 17630045

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

20 Desember 2021

<b>Penguji Utama</b>	: Dr. Anton Prasetyo, M.Si NIP. 19970925 200604 1 003	
<b>Ketua Penguji</b>	: Susi Nurul Khalifah, M.Si NIP. 19851020 201903 2 012	
<b>Sekretaris Penguji</b>	: Suci Amalia, M.Sc NIP. 19821104 200901 2 007	
<b>Anggota Penguji</b>	: Ahmad Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	

Mengesahkan,  
Ketua Program Studi,  
  
Rachmawati Ningsih, M.Si  
NIP. 19810811 200801 2 010

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Happy Dwi Rahmani  
NIM : 17630045  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : Pemisahan dan Uji Toksisitas Senyawa Steroid Fraksi  
Petroleum Eter dan Etil Asetat *Hydrilla verticillata* Hasil  
Kromatografi Kolom Gradien Eluen

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

Malang, 20 Desember 2021  
Yang membuat pernyataan,

  
Happy Dwi Rahmani  
NIM. 17630045

## PERSEMBAHAN

Bismillah wal hamdulillah saya ucapkan rasa syukur atas segala kenikmatan yang telah diberikan Allah Swt., skripsi ini akan saya persembahkan untuk:

Ayah dan ibu tersayang, Mohamad Nursalim dan Ummul Umamah,  
Yang telah memberikan seluruh kasih sayang, cinta dan perhatian yang tiada kurangnya, serta mendidik dan merawat saya dengan baik sampai saat ini. Terimakasih untuk ayah yang telah mengajarkan banyak hal dan menjadikan saya benar-benar seorang putri raja dalam hidupnya. Terimakasih untuk Ibu yang telah menanamkan nilai-nilai agama, moral dan akhlak yang baik kepada saya. ayah dan ibu selalu mendukung dan mendoakan akan keberhasilan saya sehingga saya dapat menyelesaikan kewajiban dalam menempuh pendidikan S1 di jurusan kimia ini.

Kakak tersayang, Mohammad Hisyam Urfani,  
Yang memberikan dukungan penuh kepada saya, serta memberikan banyak motivasi atas kerja keras dan pencapaian yang diterima. Terimakasih selalu mengarahkan yang terbaik untuk saya dan selalu memberikan perhatian dan kasih sayangnya dengan cara yang unik.

Keluarga besar Bani H. Abdurrahman,  
Atas kekompakan dan kerukunannya sehingga memberikan motivasi dan semangat untuk saya sehingga dapat menempuh pendidikan S1 ini.

Dosen-dosen yang saya hormati,  
Yang telah sabar membimbing saya selama masa perkuliahan, khususnya Ibu Suci Amalia, M.Sc dan Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si selaku dosen pembimbing saya, dan Bapak Dr. Anton Prasetyo, M.Si selaku dosen wali sekaligus penguji utama, dan Ibu Susi Nurul Khalifah, M.Si selaku ketua penguji yang telah sabar dan telaten membimbing saya dalam proses revisi serta memberikan motivasi dan kepercayaan diri kepada saya saat mengalami kesulitan.

Teman-teman yang saya sayangi,  
Yang telah memberikan semangat, motivasi dan dorongan untuk saya dalam mengerjakan skripsi, khususnya untuk Bahan Alam 2017, Hydrilla Squad, anggota kost 26, Kimia B, Neon'17 dan sahabat-sahabat saya di SMA yang senantiasa membangkitkan saya dari kemalasan dan senantiasa memberikan dukungan yang baik untuk saya.

## **MOTTO**

**“Hidup yang tidak pernah dipertaruhkan maka tidak akan pernah  
dimenangkan”**

## KATA PENGANTAR

Segala puji syukur dipanjatkan kepada Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang, yang telah melimpahkan rahmat serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “**PEMISAHAN dan UJI TOKSISITAS SENYAWA STEROID FRAKSI PETROLEUM ETER dan ETIL ASETAT *Hydrilla verticillata* HASIL KROMATOGRAFI KOLOM GRADIEN ELUEN**” dengan sebaik mungkin. Tak lupa shalawat serta salam tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah membimbing menuju jalan kebenaran yaitu jalan yang diridhai oleh Allah SWT. Penulisan skripsi dikerjakan dalam keadaan pandemi covid-19 di Indonesia maupun di negara-negara lainnya. Untuk itu banyak halangan serta rintangan yang harus dilalui. Berkat dorongan, dukungan serta semangat dari berbagai pihak penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada:

1. Orang tua penulis, Mohammad Nursalim dan Ummul Umamah, serta anggota keluarga penulis yang telah memberikan kasih sayang, doa serta dukungannya dalam bentuk moril maupun materiil yang tidak dapat tergantikan.
2. Bapak Prof. Dr. H. M. Zainuddin, MA, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si, selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si, selaku ketua jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Ibu Suci Amalia, M.Sc, selaku dosen pembimbing I yang selalu memberikan bimbingan, arahan, semangat serta motivasi kepada penulis.
6. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si, selaku dosen pembimbing II yang selalu memberikan bimbingan, arahan, nasehat serta semangat kepada penulis.
7. Bapak Dr. Anton Prasetyo, M.Si, selaku penguji utama yang telah memberikan bimbingan dan arahan dalam penulisan laporan hasil penelitian ini.

8. Ibu Susi Nurul Khalifah, M.Si, selaku penguji yang telah memberikan bimbingan dan arahan dalam penulisan laporan hasil penelitian ini.
9. Seluruh dosen dan laboran jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu pengetahuan, ilmu agama, pengalaman serta wawasan luas kepada penulis.
10. Erlina Novita Sari yang telah menjadi partner yang cocok dan baik hati pada penulis saat di laboratorium, dan tempat cerita suka dan duka selama di laboratorium.
11. Nining Ratna Rahayu yang telah mengajarkan kepercayaan diri dan menemani, memasak makanan di kost selama ngeLab.
12. Seluruh anggota kost 26 yaitu Puspa, Raniqul, Alip, Imroatul yang telah memberikan semangat dan dukungan sampai akhir.
13. Seluruh teman-teman organik 2017, Kimia B (Bachem) 2017, serta kimia angkatan 2017 “Neon” yang telah memberikan semangat, menemani berjuang dan memotivasi untuk menjadi yang lebih baik.
14. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah menunjang kelancaran bagi penulis.

Semoga semua perbuatan baik Bapak/Ibu serta semua pihak yang terlibat dalam proses penyelesaian skripsi ini menjadikan amalan untuk kelancaran dalam segala urusan dunia maupun akhirat. Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini adanya banyak kekurangan dan keterbatasan yang masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, dengan kerendahan hati berharap kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua, baik penulis maupun pembaca.

Malang, 20 Desember 2021



Penulis

## DAFTAR ISI

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

### BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	7
1.3 Tujuan.....	7
1.4 Batasan Masalah.....	7
1.5 Manfaat Penelitian.....	8

### BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 <i>Hydrilla verticillata</i> .....	9
2.2 Senyawa Steroid .....	12
2.3 Ekstraksi Senyawa Steroid Metode Maserasi .....	15
2.4 Hidrolisis dan Partisi .....	16
2.5 Uji Fitokimia .....	19
2.6 Kromatografi Kolom .....	21
2.7 Monitoring KLTA .....	23
2.8 Uji Toksisitas Senyawa Steroid dengan Metode BSLT .....	24
2.9 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan FT-IR .....	27

### BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	28
3.2 Alat dan Bahan .....	28
3.2.1 Alat .....	28
3.2.2 Bahan.....	28
3.3 Rancangan Penelitian .....	29
3.4 Tahap Penelitian .....	30
3.5 Pelaksanaan Penelitian .....	30
3.5.1 Preparasi Sampel .....	30
3.5.2 Kadar Air Secara Thermogravimetri .....	30

3.5.3 Ekstraksi Sampel Metode Maserasi.....	31
3.5.4 Hidrolisis dan Partisi .....	32
3.5.5 Uji Fitokimia.....	33
3.5.6 Kromatografi Kolom .....	33
3.5.7 Monitoring KLTA .....	34
3.5.8 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan FT-IR .....	34
3.5.9 Penetasan Larva Udang .....	35
3.5.10 Uji Toksisitas Senyawa Steroid .....	35
3.8 Analisis Data .....	36

#### **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

4.1 Rendemen Preparasi Sampel .....	37
4.3 Rendemen Ekstrak Hasil Maserasi.....	38
4.4 Hidrolisis dan Rendemen Hasil Partisi.....	39
4.5 Fitokimia Hasil Fraksi Petroleum eter dan Etil asetat.....	42
4.6 Isolat Hasil Kromatografi Kolom.....	43
4.7 Isolat Hasil Monitoring KLTA.....	44
4.8 Identifikasi Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom dengan FT-IR .....	49
4.9 Larva Udang Hasil Penetasan untuk Uji Toksisitas .....	56
4.10 Toksisitas Hasil Isolat Steroid.....	57
4.11 Pemanfaatan <i>Hydrilla verticillata</i> dalam Islam.....	60

#### **BAB V PENUTUP**

5.1 Kesimpulan.....	62
5.2 Saran .....	62

<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>63</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>72</b>

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir.....	72
Lampiran 2. Perhitungan dan Pembuatan Larutan.....	77
Lampiran 3. Data Pengamatan dan Hasil Perhitungan.....	80
Lampiran 4. Hasil Monitoring KLTA.....	83
Lampiran 5. Hasil Uji Toksisitas .....	85
Lampiran 6. Dokumentasi.....	89

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi tumbuhan <i>Hydrilla verticillata</i> .....	9
Gambar 2.2 Struktur dasar senyawa steroid.....	12
Gambar 2.3 Struktur jenis-jenis senyawa steroid.....	13
Gambar 2.4 Reaksi hidrolisis .....	17
Gambar 2.5 Dugaan mekanisme reaksi pembentukan warna uji steroid .....	20
Gambar 2.6 Struktur silika gel .....	22
Gambar 2.7 Hasil spektrum FT-IR senyawa steroid.....	27
Gambar 4.1 Pembentukan gas CO <sub>2</sub> reaksi hidrolisis .....	40
Gambar 4.2 Hasil partisi .....	41
Gambar 4.3 Reaksi senyawa steroid dan reagen <i>Limberman burchard</i> .....	42
Gambar 4.4 Hasil uji fitokimia steroid.....	43
Gambar 4.5 Hasil monitoring KLTA isolat petroleum eter .....	46
Gambar 4.6 Hasil monitoring KLTA isolat petroleum eter disinari UV .....	46
Gambar 4.7 Hasil monitoring KLTA isolat etil asetat .....	48
Gambar 4.8 Hasil monitoring KLTA isolat etil asetat disinari UV .....	48
Gambar 4.9 Spektrum hasil FT-IR isolat petroleum eter .....	49
Gambar 4.10 Struktur $\beta$ -sitosterol.....	51
Gambar 4.11 Spektrum hasil FT-IR isolat etil asetat.....	52
Gambar 4.12 Struktur anteridiol .....	56

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan nutrisi <i>Hydrilla verticillata</i> .....	11
Tabel 2.2 Nilai LC <sub>50</sub> berpotensi sebagai bioaktivitas.....	26
Tabel 2.3 Hasil uji toksisitas senyawa steroid .....	26
Tabel 2.4 Hasil LC-MS/MS senyawa steroid .....	31
Tabel 4.1 Hasil partisi pelarut petroleum eter dan etil asetat secara bertingkat.....	41
Tabel 4.2 Hasil monitoring KLTA isolat petroleum eter .....	45
Tabel 4.3 Hasil monitoring KLTA isolat etil asetat .....	47
Tabel 4.4 Interpretasi spektra FT-IR isolat petroleum eter .....	50
Tabel 4.5 Interpretasi spektra FT-IR isolat etil asetat .....	52
Tabel 4.6 Hasil uji toksisitas isolat petroleum eter dan etil asetat .....	57
Tabel 4.7 Nilai LC <sub>50</sub> isolat petroleum eter dan etil asetat .....	58

## ABSTRAK

Rahmani, Happy Dwi. 2021. **Pemisahan dan Uji Toksisitas Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter dan Etil Asetat *Hydrilla verticillata* Hasil Kromatografi Kolom Gradien Eluen.** *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.  
Pembimbing I: Suci Amalia, M.Sc, Pembimbing II: A. Ghanaim Fasya, M.Si

---

**Kata kunci:** *Hydrilla verticillata*, Meserasi, Metanol, Kromatografi Kolom, Steroid, Toksisitas

Salah satu metabolit sekunder yang terkandung dalam *Hydrilla verticillata* adalah senyawa steroid. Senyawa tersebut memiliki manfaat sebagai antitumor, antimikroba, dan agen analgesik. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengetahui toksisitas senyawa steroid fraksi petroleum eter dan etil asetat dalam metode partisi bertingkat hasil kromatografi kolom gradien eluen terhadap udang *Artemmia salina Leach*. Isolasi senyawa steroid dilakukan dengan ekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol. Maserat dihidrolisis dan dipartisi bertingkat dengan 2 pelarut yang berbeda. Kedua fraksi diuji fitokimia dengan reagen *Lieberman burchard* dan dipisahkan menggunakan metode kromatografi kolom gradien eluen *n*-heksana: etil asetat dengan perbandingan (19:1, 18:2, 17:3) v/v. Hasil isolat tersebut diidentifikasi dengan instrumen FT-IR dan diuji toksisitas menggunakan metode BLST. Keberadaan steroid ditunjukkan dengan munculnya cincin hijau pada uji fitokimia dan munculnya gugus-gugus fungsi pada hasil FT-IR. Uji toksisitas isolat menghasilkan nilai LC<sub>50</sub> 14,288 ppm untuk isolat petroleum eter dan 11,729 ppm untuk isolat etil asetat. Nilai LC<sub>50</sub> tergolong sangat toksik dan berpotensi sebagai antikanker dan antitumor.

## ABSTRACT

Rahmani, Happy Dwi. 2021. **Separation and Toxicity Test of Steroid Compounds Fraction of Petroleum Ether and Ethyl Acetate *Hydrilla verticillata* Result of Eluent Gradient Column Chromatography.** *Essay.* Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang.  
Supervisor I: Suci Amalia, M.Sc, Supervisor II: A. Ghanaim Fasya, M.Si

---

**Keywords:** *Hydrilla verticillata*, *Meceration*, *Methanol*, *Column Chromatography*, *Steroids*, *Toxicity*

One of the secondary metabolites contained in *Hydrilla verticillata* is a steroid compound. These compounds have benefits as antitumor, antimicrobial, and analgesic agents. This study aims to identify and determine the toxicity of steroid compounds from petroleum ether and ethyl acetate fractions in the stratified partition method as a result of eluent gradient column chromatography on *Artemmia salina* *Leach shrimp*. Isolation of steroid compounds was carried out by maceration extraction using methanol as a solvent. Maserate was hydrolyzed and stratified partitioned with 2 different solvents. Both fractions were tested phytochemically with *Lieberman Burchard's* reagent and separated using gradient column chromatography method of *n*-hexane: ethyl acetate eluent with a ratio of (19:1, 18:2, 17:3) v/v. The isolates were identified with the FT-IR instrument and tested for toxicity using the BLST method. The presence of steroids was indicated by the appearance of a green ring in the phytochemical test and the appearance of functional groups in the FT-IR results. Toxicity test of isolates resulted in LC<sub>50</sub> values of 14,288 ppm for petroleum ether isolates and 11,729 ppm for ethyl acetate isolates. The LC<sub>50</sub> value is classified as very toxic and has the potential as anticancer and antitumor.

## مستخلص البحث

رحمن، حفي دوي. ٢٠٢١. إنفصال واختبار السموم المستحضر المنشطات فئة أثير البترول وأثيلي الخلات (*Hydrilla verticillata*) حصيلة كروماتوغرافي خانة التدرج الإلويين. البحث العلمي. قسم الكيمياء كلية العلوم والتكنولوجية جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرفة ١ : سوجي أماليا الماجستير، المشرف ٢ : غنائم فشي الماجستير.

---

الكلمات المفاتيح : (*Hydrilla verticillata*)، النقع، الميثانول، كروماتوغرافي الخانة، المنشطات، السموم.

يحمل (*Hydrilla verticillata*) إحدبها التي تتضمن هي المستحضر المنشطات. يملك ذلك المستحضر المنافع هي عرقلة السرطان البروستات، المضادات المكروبات، المضادات التهابي، والعامل المسكن. يهدف هذا البحث لتعرف ومعرفة سموم المستحضر المنشطات فئة أثير البترول وأثيلي الخلات في طريقة إنقسام المرحلة من حصيلة كروماتوغرافي خانة التدرج الإلويين لإريبان (*Artemmia Salina Leach*).  
يفعل عزل المستحضر المنشطات باستخراج النقع يستخدم مذيب الميثانول. خلاصة الأجرش التي تنال تحليل الماء ن وانقسام مرحلة بمذيبين المختلفين هما أثير البترول وأثيلي الخلات. يختبر ففتان الكيمياء النباتي بكاشف (*Lieberman burchard*). ثم ينفصل باستخدام طريقة كروماتوغرافي خانة التدرج الإلويين ن-الهكسان : أثيلي الخلات بالمقارنة (١٩:١، ١٨:٢، ١٧:٣) ( $v/v$ ). تتعرف تلك حصيلة العزل بآلة (FT-IR) ويختبر السموم باستخدام طريقة (BSLT). يحصل إختبار السموم العزل قيمة ( $LC_{50}$ ) ١٤ و٢٨٨ (ppm) لعزل أثير البترول و ١١ و٧٢٩ (ppm) لعزل أثيلي الخلات. تدخل قيمة ( $LC_{50}$ ) بالطريقة السامة شديدا وتحتمل المضادة للسرطان والمضادة للورم.

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Allah SWT berfirman dalam surah Thaha ayah 53 :

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِنْ  
نَبَاتٍ شَتَّى

Artinya :

“(tuhan) yang telah menjadikan bumi sebagai hamparan bagimu, dan menjadikan jalan-jalan di atasnya bagimu, dan yang menurunkan air (hujan) dari langit. Kemudian kami tumbuhkan dengannya (air hujan itu) berbagai jenis-jenis aneka macam tumbuh-tumbuhan”

Surah Thaha ayat 53 menjelaskan tentang ke Esa-an Allah SWT dengan menumbuhkan berbagai jenis tumbuhan dengan diturunkannya air hujan. Shihab (2003) Ayat di atas menyatakan “(tuhan) yang telah menjadikan bumi sebagai hamparan bagimu” hai fir’aun dan seluruh manusia sebagian besar bumi sebagai hamparan dan menjadikan sebagian kecil lainnya gunung-gunung untuk menjaga kestabilan bumi dan Dia yakni Tuhan itu juga “yang telah menjadikan jalan-jalan” yang mudah kamu tempuh, “dan menurunkan dari langit air” yakni hujan sehingga terciptanya sungai-sungai dan danau, “maka kami tumbuhkan dengannya” yakni dengan perantara hujan itu “berjenis-jenis tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam” jenis, bentuk, rasa, warna.

Salah satu contoh tumbuhan yang ditumbuhkan diperairan adalah *Hydrilla verticillata* yang banyak dimanfaatkan di beberapa negara karena mengandung metabolit sekunder seperti senyawa steroid. Senyawa tersebut memiliki banyak manfaat yaitu sebagai penghambat kanker prostat (Dhingra, dkk., 2010), antioksidan (Sulistiyani, 2018), antitumor (Ramesh, dkk., 2014), antimikroba

(Karan, dkk., 2012), antiinflamasi (Karan, dkk., 2012), antioksidan (Djeridane, dkk., 2010), insektisida pada nyamuk *Culex quinquefasciatus* (Annie, dkk., 2016), antirematik (Neelamagum, dkk., 2016) dan agen analgesik (Pal dan Nisme, dkk., 2006). Selain itu, tumbuhan *Hydrilla verticillata* juga memiliki manfaat sebagai biosorben logam berat seperti Cr dan Cd (Phukan, dkk., 2015).

Selain senyawa steroid yang terkandung dalam *Hydrilla verticillata* ada beberapa kandungan senyawa kimia yang terdapat didalamnya seperti  $\beta$ -karoten, saponin, vitamin, mineral, mikro dan makronutrien (Pal dan Nisme, 2006). Penelitian Ikfi (2017) menyatakan bahwa ekstrak metanol *Hydrilla verticillata* positif terhadap uji senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid dan steroid. Pada ekstrak klorofom dan *n*-heksana *Hydrilla verticillata* mengandung senyawa aktif triterpenoid dan steroid. Keberadaan senyawa steroid dalam tumbuhan *Hydrilla verticillata* juga dinyatakan dalam penelitian Praba dan Rajkumar (2015) bahwa senyawa metabolit sekunder yang ada dalam tumbuhan tersebut berupa alkaloid, flavonoid, steroid, saponin dan triterpenoid. Penelitian Neelamagum, dkk. (2016) juga menyatakan bahwa dalam tumbuhan *Hydrilla verticillata* yang diperoleh dari perairan tidak tercemar dan tercemar mengandung senyawa metabolit sekunder masing-masing jumlahnya 5 jenis senyawa, dari 10 senyawa tersebut diantaranya terdapat senyawa seskuiterpen (*Coryan-17-ol*, *18,19-didehydro-10-methoxy-acetate*), Senyawa steroid (*Ergost -5-en-ol*, *22, 23-dimethyl acetate*), senyawa *plasticizer* (*1,2 Benzene dicarboxylic acid butyl octylester*), Senyawa linoleat (10- Asam oktadekenoat, metil ester), Asam stearat (asam Pentadekanoat, 14-metil, metil ester) dan Fitol (senyawa Diterpene).

Isolasi senyawa steroid yang terdapat pada tumbuhan *Hydrilla verticillata* dapat dilakukan dengan metode maserasi. Metode ini digunakan karena aman dan dapat mengantisipasi senyawa yang tidak tahan panas. Pelarut yang digunakan dalam metode ini adalah pelarut metanol karena senyawa metabolit sekunder di alam berada dalam bentuk glikosida yang bersifat polar (Dinan, dkk., 2001). Pemilihan pelarut metanol ini juga dilakukan pada penelitian Djeridane, dkk. (2010) yang mengisolasi turunan senyawa steroid baru sebagai antioksidan pada *Cleome arabica*. Perbandingan antara sampel dengan pelarut metanol yang digunakan dalam penelitian Fasya, dkk. (2020) adalah 1:5, diperoleh hasil rendemen sebesar 5,14% (Fasya, dkk., 2020). Nilai rendemen yang dihasilkan cukup besar dibandingkan dengan nilai rendemen yang menggunakan pelarut etanol dengan nilai 4,54% (Purwantoro, dkk., 2019). Apabila menggunakan pelarut *n*-heksana hanya memperoleh rendemen 0,88% (Azizah, 2016). Adapun penggunaan pelarut kloroform yang dilakukan dalam penelitian Karan, dkk. (2012) hanya mendapatkan rendemen sebesar 1,47%. Rendemen tersebut dianggap sangat kecil sehingga tidak memungkinkan untuk menggunakan pelarut yang sifatnya cenderung nonpolar.

Hasil ekstrak kasar yang telah diperoleh dilakukan hidrolisis menggunakan asam klorida (HCl). HCl digunakan karena memiliki sifat asam kuat sehingga mudah untuk melepaskan H<sup>+</sup> yang mengakibatkan ikatan glikosida akan semakin mudah dilepas (Kristanti, dkk., 2008). Pemisahan senyawa aktif yang didapatkan dari proses hidrolisis dilakukan partisi dengan prinsip metode ekstraksi cair-cair yang berdasarkan pada kepolaran dari senyawa tersebut. Partisi dapat dilakukan menggunakan dua pelarut yang berbeda, Hal ini dimaksudkan agar senyawa aktif yang memiliki kepolaran berbeda akan terekstrak kedalam pelarut yang sesuai

(Fasya, dkk., 2016). Jenis pelarut yang digunakan adalah petroleum eter dan etil asetat. Petroleum eter memiliki sifat cenderung lebih nonplar dibandingkan dengan etil asetat (Sholikhah, 2016). Penelitian Amalia, dkk. (2018) hasil rendemen yang diperoleh pada faksi petroleum eter dan etil asetat masing-masing 30,27 dan 38,80%. Selain memilih pelarut yang sesuai, proses partisi yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan proses partisi bertingkat. Hal ini dikarenakan agar menghasilkan suatu fraksi dengan senyawa tertentu yang terekstrak secara spesifik pada tiap pelarut yang digunakan. (Fasya, dkk., 2014)

Hasil fraksi dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui keberadaan senyawa steroid dengan menggunakan reagen *Lieberman burchard*. Perlakuan tersebut telah dilakukan Amalia, dkk. (2018) dalam menguji senyawa steroid pada *Hydrilla verticillata* yang menyatakan bahwa senyawa steroid pada fraksi petroleum eter dan etil asetat dalam uji fitokimia menunjukkan adanya cincin warna hijau kebiruan pada larutan. Selain penelitian Amalia, dkk. (2018) penelitian terkait pengujian fitokimia pada senyawa steroid juga dilakukan oleh Karan, dkk. (2012) menyatakan bahwa keberadaan senyawa steroid dalam suatu ekstrak ditandai dengan adanya perubahan warna hijau kebiruan pada larutan setelah ditambahkan reagen *Lieberman burchard*.

Pemisahan senyawa steroid dari senyawa yang lain dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom dengan gradien eluen berupa *n*-heksana : etil asetat dengan perbandingan (19:1, 18:2, 17:3) *v/v*. Hasil perbandingan tersebut dipilih karena dalam penelitian Purwanto, dkk. (2019) menghasilkan noda tunggal senyawa steroid dengan nilai *Retention factor* ( $R_f$ ) yang cukup baik dipantau dengan kromatografi lapis tipis analitik (KLTA). Nilai  $R_f$  yang didapatkan

dalam penelitian tersebut adalah 19:1 v/v memperoleh  $R_f$  0,80 (hitam), 18:2 v/v memperoleh 0,77 (hitam) dan 17:3 v/v memperoleh 0,75 (hijau). Kromatografi kolom ini merupakan metode pemisahan preparatif yang didasarkan pada peristiwa adsorpsi suatu senyawa adsorben yang digunakan. Hal yang paling berperan pada pemisahan dengan kromatografi kolom adalah pemilihan pelarut, pemilihan adsorben, dan pegemasan kolom (Sholikhah, 2016). Metode ini digunakan karena hasil isolat yang didapatkan banyak dan tingkat kemurniannya tinggi.

Identifikasi hasil isolat kromatografi kolom dilakukan dengan KLTA dengan fase gerak berupa pelarut campuran *n*-heksana dan etil asetat (Ningsih, dkk., 2018). Perbandingan pelarut *n*-heksana dan etil asetat yang digunakan adalah 17:3. Perbandingan tersebut dipilih karena pada penelitian Baderos (2017) menyatakan memperoleh hasil terbaik dengan didapatkan hasil noda 11 dengan 6 noda diantaranya adalah noda steroid pada fraksi petroleum eter.

Senyawa steroid dikatakan memiliki beberapa bioaktivitas seperti antikanker, antibakteri, antioksidan maupun antitumor. Hal ini dibuktikan dengan penelitian Idiawati, dkk. (2016) yang menyatakan bahwa senyawa steroid dari akar mentawa berpotensi sebagai antikanker berdasarkan nilai *Lethal Concentration-50* ( $LC_{50}$ ) dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), apabila nilai  $LC_{50}$  suatu senyawa hasil isolasi ataupun ekstrak tumbuhan kurang dari 1000 ppm maka senyawa tersebut memiliki efek sitotoksik yang dapat digunakan sebagai antikanker, dalam penelitian ini didapatkan nilai  $LC_{50}$  sebesar 32,8 ppm pada fraksi etil asetat. Penelitian Pramitania (2019) juga menyatakan bahwa uji toksisitas senyawa steroid yang terkandung dalam *Eucheuma cottoni* fraksi *n*-heksana metode BSLT, dihasilkan nilai  $LC_{50}$  sebesar 11,074 ppm yang dinyatakan suatu ekstrak

bersifat toksik karena kurang dari 1000 ppm. Senyawa steroid yang dijumpai pada *Hydrilla verticillata* diuji toksisitasnya dengan metode BSLT oleh Wati (2020) menghasilkan nilai  $LC_{50}$  sebesar 6,348 ppm pada isolat petroleum eter. Nilai tersebut merupakan kategori sangat toksik sehingga berpotensi besar sebagai antikanker.

Pengujian toksisitas menggunakan metode BSLT dikarenakan metode tersebut sering digunakan karena lebih murah, praktis, sederhana dan cepat. Penggunaan hewan ujinya berupa *Artemia salina* Leach karena memiliki kesamaan tanggapan dengan mamalia (Mayer, dkk., 1982) selain itu jenis hewan uji tersebut mudah dibudidayakan serta harganya murah. Hasil ujinya berupa Nilai  $LC_{50}$  yang didefinisikan sebagai konsentrasi zat yang menyebabkan terjadinya kematian pada 50% larva *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji.

Berdasarkan uraian diatas, hasil isolat tersebut perlu dilakukan identifikasi senyawa aktif menggunakan instrumen *Fourier transform infrared* (FT-IR). Penelitian Fasya, dkk. (2020) hasil identifikasi senyawa steroid pada *Hydrilla verticillata* menggunakan instrumen FT-IR ditunjukkan dengan munculnya gugus khas steroid berupa gugus geminal dimetil pada serapan 1460 dan 1383,5  $cm^{-1}$ . Namun, tidak hanya gugus dimetil geminal melainkan harus didukung serapan gugus-gugus lain, dalam penelitian tersebut juga menyatakan bahwa pengujian menggunakan instrumen *Liquid chromatography-mass spectrometry* (LC-MS/MS) didapatkan senyawa steroid berupa  $\beta$ -sitosterol. Penelitian Mawaddah (2019) menyatakan senyawa steroid hasil kromatografi kolom dalam *Hydrilla verticillata* yang diidentifikasi menggunakan instrumen LC-MS/MS diperoleh jenis senyawa steroid berupa  $\beta$ -sitosterol dan stigmasterol. Hasil penelitian yang diperoleh

diharapkan dapat memberikan pengetahuan dan wawasan yang baru mengenai pemanfaatan *Hydrilla verticillata* dalam bidang farmakologi.

## 1.2 Rumusan Masalah

- a). Bagaimana hasil uji fitokimia senyawa steroid pada tumbuhan *Hydrilla verticillata*?
- b). Bagaimana toksisitas senyawa steroid *Hydrilla verticillata* fraksi etil asetat dan fraksi petroleum eter dalam metode partisi bertingkat hasil kromatografi kolom gradien eluen terhadap udang *Artemmia salina Leach*?

## 1.3 Tujuan

- a). Untuk mengetahui adanya senyawa steroid menggunakan uji fitokimia pada tumbuhan *Hydrilla verticillata*.
- b). Untuk mengetahui toksisitas senyawa steroid *Hydrilla verticillata* fraksi etil asetat dan fraksi petroleum eter dalam metode partisi bertingkat hasil kromatografi kolom gradien eluen terhadap udang *Artemmia salina Leach*

## 1.4 Batasan Masalah

- a). Ekstraksi sampel dengan menggunakan metode maserasi dan pelarut metanol.
- b). Fraksi petroleum eter dan etil asetat dengan metode partisi bertingkat.
- c). Teknik pemisahan menggunakan metode kromatografi kolom.
- d). Perbandingan gradien eluen *n*-heksana : etil asetat.
- e). Uji toksisitas menggunakan metode BSLT.
- f). Identifikasi senyawa steroid dengan instrumen FT-IR.

### **1.5 Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi kepada para peneliti atau lembaga akademis terkait toksisitas isolat steroid *Hydrilla verticillata* hasil kromatografi kolom dari fraksi petroleum eter dan etil asetat metode partisi bertingkat, dan dapat dikembangkan lebih luas di bidang farmakologi yang diharapkan dapat memberikan manfaat untuk masyarakat.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Hydrilla verticillata*

*Hydrilla verticillata* merupakan tanaman yang hidupnya terendam di dalam air, memiliki kemampuan tumbuh yang cepat, dapat hidup pada berbagai kondisi pH, sedikit cahaya matahari, dan nutrisi (Paramitasari, 2014). Tanaman ini juga disebut makrofit yang umumnya hidup terendam dalam air dan berakar di jaringan makanan akuatik tropis (Byu, dkk., 2013). Tanaman *Hydrilla* (*Hydrilla verticillata*) menurut Urifah (2017) tumbuh di perairan dangkal dengan kedalaman 0,5 meter sampai kedalaman lebih dari 10 meter. Tanaman ini dianggap sebagai salah satu gulma air yang berbahaya dikarenakan memiliki mekanisme reproduksi vegetatif yang dimungkinkan dapat tumbuh menyebar dengan cepat sehingga dapat mengubah lingkungan dengan mengganti vegetasi air asli dan mempengaruhi populasi ikan (Byu, dkk., 2013). Namun, tanaman ini memiliki beberapa manfaat dalam bidang medis maupun lingkungan (Urifah, 2017). Morfologi *Hydrilla verticillata* dapat ditampilkan pada Gambar 2.1



Gambar 2.1 Morfologi tumbuhan *Hydrilla verticillata* (Khasanah, 2018)

Morfologi dari *Hydrilla verticillata* adalah memiliki akar serabut dan berwarna hijau karena adanya klorofil ketika terpapar sinar matahari (Langeland, 1996). Selain itu, ciri-ciri lainnya adalah berwarna hijau, tegak, ramping, bercabang dan dapat tumbuh sepanjang 7 meter merupakan ciri morfologi dari batang *Hydrilla verticillata*. Pemanfaatan tumbuhan *Hydrilla verticillata* terhadap lingkungan banyak dilakukan di Indonesia sebagai biabsorpsi logam berat seperti logam  $Zn^{2+}$  (Putri, 2014), logam  $Pb^{2+}$  (Hala, dkk., 2012), dan logam Cu (Fuad, 2013). Biabsorpsi logam tersebut dapat terjadi dikarenakan pada tumbuhan *Hydrilla verticillata* memiliki gugus fungsi yang mempunyai elektron bebas. Apabila suatu gugus fungsi tersebut dikontakkan dengan suatu larutan yang mengandung logam berat contohnya pada perairan tercemar maka akan membentuk ikatan dalam interaksi ionik, interaksi polar, interaksi gabungan, dan mineralisasi antara logam dengan biopolimer (makromolekul) sebagai sumber gugus fungsional, yang berperan penting dalam mengikat ion logam (Putri, 2014). Selain itu, tumbuhan ini juga dimanfaatkan sebagai biofiltrasi. Penelitian Mulya, dkk. (2020) menyatakan bahwa limbah industri tahu yang menimbulkan pencemaran air yang cukup berat dikarenakan mengandung polutan organik yang tinggi dapat diatasi dengan metode biofiltrasi dengan tumbuhan *Hydrilla verticillata* yang dapat mengakibatkan menurunnya konsentrasi limbah cair tahu yang dibuktikan dengan parameter *biological oxygen demand* (BOD), *chemical oxygen demand* (COD) dan pH. Nilai BOD dan COD yang didapatkan rendah, dan nilai pH yang netral.

Selain pemanfaatannya sebagai biabsorpsi dan biofiltrasi pada limbah cair, tumbuhan *Hydrilla verticillata* telah banyak dimanfaatkan untuk berbagai produk di beberapa negara. Di India dan Amerika, memanfaatkan metabolit primer yang

terkandung dalam *Hydrilla verticillata* sebagai suplemen, pupuk organik, fitoremediasi pada pengolahan limbah, makanan ikan, dan bahan kemasan kepiting (Pennington, 1985).

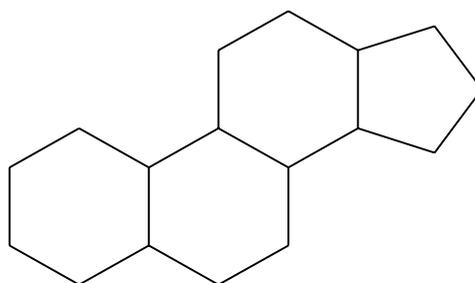
Kandungan senyawa metabolit sekunder juga terkandung dalam *Hydrilla verticillata* berupa alkaloid, flavonoid, saponin, triterpenoid, dan steroid (Langeland, 1996). Putri (2014) juga menyatakan bahwa *Hydrilla verticillata* memiliki kandungan kimia berupa alkaloid, karoten, asam nikotinat, vitamin B1, B2, C. Salah satu senyawa yang terdapat tumbuhan *Hydrilla verticillata* adalah Senyawa steroid dapat menghambat pertumbuhan kanker prostat dan dapat digunakan sebagai antikanker pada kanker payudara (Dhingra, dkk., 2010). Selain itu, *Hydrilla verticillata* juga mempunyai aktivitas antioksidan, antimikroba, antikanker, antiinflamasi dan anti bakteri. Hal ini dikarenakan dalam tumbuhan tersebut terdapat senyawa metabolit sekunder di dalamnya (Prabha dan Rajkumar, 2015). Selain itu, mengandung beberapa nutrisi di dalamnya yang dapat dirangkum dalam Tabel 2.1.

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

<b>Nutrisi atau mineral</b>	<b>Jumlah (mg/10,5 gram)</b>	<b>Nutrisi atau mineral</b>	<b>Jumlah (mg/10,5 gram)</b>
Vitamin B-1	26,25	Kalium	244,65
Vitamin B-2	0,084	Fosfor	29,74
Vitamin B-3	5,25	Besi	35,8
Vitamin B-5	11,36	Timah	6,3
Vitamin B-6	35,91	Tembaga	0,22
Vitamin B-12	1,05	Kobalt	0,43
Kalsium	1460,7	Molibdenum	14,7
Magnesium	76,13	Beta karoten	29593 IU

## 2.2 Senyawa Steroid

Senyawa steroid merupakan suatu senyawa turunan lemak dengan struktur dasar yang terdiri atas rantai karbon dengan 4 cincin, 3 cincin utama sikloheksana dan 1 cincin siklopentana. Pengelompokan senyawanya berdasarkan atas gugus yang terikat pada kerangka dasar rantai karbon tersebut (Kristanti, 2008). Sedangkan turunan senyawa steroid yang banyak ditemukan keberadaannya di alam adalah jenis sterol (Poedjiadi, dkk., 1994). Adapun struktur dasar senyawa steroid dapat ditampilkan pada Gambar 2.2.

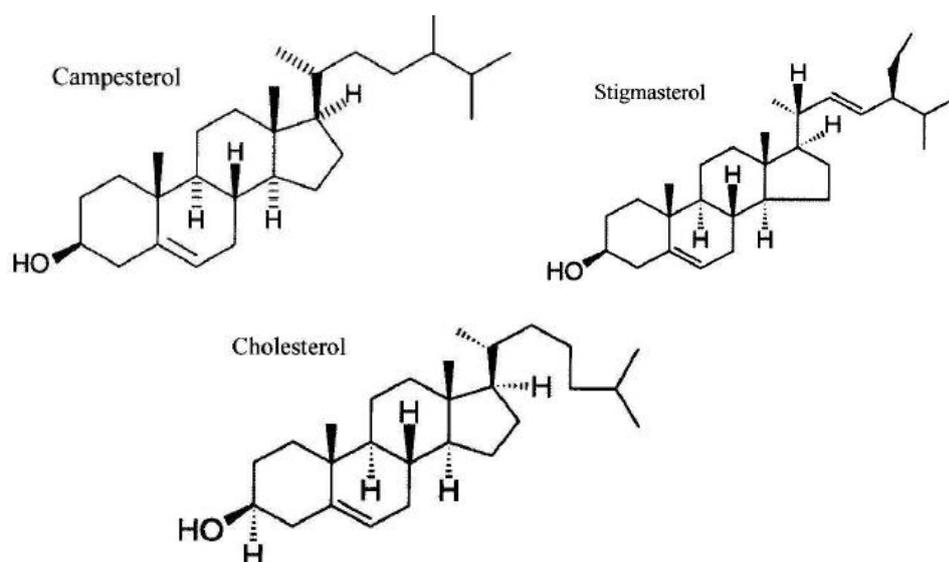


Gambar 2.2 Struktur dasar senyawa steroid (Mawaddah, 2018)

Senyawa kimia yang tergolong dalam senyawa steroid dalam bahan alam sebagian besar strukturnya terdiri dari 17 atom karbon dan mempunyai struktur dasar 1,2-Siklopentenoperhidrofenantren yang dapat dilihat pada Gambar 2.2. Pengelompokan senyawa steroid berdasarkan atas efek fisiologis dengan berdasarkan perbedaan antar kelompok yang ditentukan substituenya yang terikat pada kerangka dasar, panjang ikatan, jumlah dan posisi gugus fungsi oksigen, ikatan rangkap pada kerangka dasar serta konfigurasi asimetris pada kerangka dasar (Kristanti, 2008).

Senyawa steroid terkandung dalam tumbuhan maupun hewan. Pada tumbuhan tingkat tinggi maupun tingkat rendah banyak senyawa steroid di

dalamnya, umumnya pada tumbuhan senyawa steroid dalam bentuk sterol. Tumbuhan tingkat tinggi biasanya mengandung senyawa steroid berupa fitosterol seperti sitosterol,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol dan kamposterol (Suryelita, dkk., 2017). Kandungan senyawa steroid dalam tumbuhan digunakan sebagai penghambat penebaran daun sehingga daun tidak mudah gugur. Kandungan senyawa steroid pada tumbuhan tingkat tinggi telah banyak diteliti oleh para ilmuwan. Dalam penelitian Suryelita (2000) jenis senyawa steroid pada daun pepaya (*Carica papaya L.*) berupa senyawa *ergost-5en-3 $\beta$ -ol*, pada tanaman sidawayah (*Woodfordia floribunda salisb*) mengandung jenis senyawa steroid jenis stigmasterol-7,22- dien-3 ol (Saleh, 2009). Daun tumbuhan gedih (*Abelmoschus manihot L. Mendik*) pada penelitian Mamahit (2009) dan tumbuhan *Hydrilla verticillata* pada penelitian Fasya, dkk. (2020) mengandung senyawa steroid jenis  $\beta$ -sitosterol. Senyawa steroid merupakan salah satu golongan senyawa yang besar dan cukup penting dalam bidang medis, lebih dari 150 jenis senyawa steroid telah terdaftar sebagai obat. Beberapa contoh jenis senyawa steroid ditampilkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Struktur jenis-jenis senyawa steroid (Wang, 2008)

Penelitian Renai dari *institute of integratif medicine* menyatakan bahwa senyawa  $\beta$ -sitosterol merupakan suatu senyawa yang mempunyai efek farmakologis terhadap penghambatan kerja enzim yang dapat menyebabkan terjadinya kanker prostat. Cara kerja senyawa tersebut adalah dengan enzim yang mengkonversi testosteron menjadi dehidrotosteron. Penelitian Fachriyah, dkk. (2016) juga menyatakan steroid merupakan salah satu golongan senyawa metabolit sekunder, golongan senyawa tersebut diketahui mempunyai aktivitas anti kanker yang dibuktikan dalam gambaran uji awal dengan nilai  $LC_{50}$ .

Senyawa steroid memiliki struktur yang beragam, namun sebagian besar senyawa tersebut bersifat nonpolar, sehingga mengisolasinya dapat menggunakan pelarut organik yang bersifat nonpolar agar lebih maksimal. Proses isolasi suatu senyawa adalah suatu proses pemisahan komponen-komponen kimia zat target dan zat lain yang terdapat dalam suatu sampel bahan alam atau lainnya. Proses isolasi meliputi empat tahapan penting yaitu maserasi, pemisahan, pemurnian dan identifikasi (Kurniawati, dkk., 2010).

Metabolit sekunder jenis steroid dapat diidentifikasi keberadaannya dalam suatu ekstrak dengan menggunakan pereaksi warna. Pereaksi yang digunakan untuk analisa senyawa tersebut adalah reagen *Liebermann buchard*. Ekstrak yang mengandung senyawa steroid akan menghasilkan visualisasi warna yang berbeda dengan ekstrak yang tidak mengandung senyawa steroid. Ekstrak yang mengandung senyawa steroid akan menghasilkan warna hijau kebiruan (Masroh, 2010).

### **2.3 Ekstraksi Senyawa Steroid Metode Maserasi**

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kelarutannya terhadap dua cairan tidak saling larut. Prinsip ekstraksi adalah melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non polar dalam senyawa non polar (Khopkar, 2008). Senyawa polar dapat larut dalam pelarut polar dikarenakan pelarut polar dapat mensolvasi molekul dan ion dengan adanya gaya interaksi dipol, selain itu pembentukan ikatan hidrogen antara senyawa dengan pelarut yang dapat menyebabkan kelarutan senyawa tersebut. Sedangkan kelarutan senyawa nonpolar terhadap pelarut nonpolar diakibatkan adanya interaksi dipol induksi.

Senyawa metabolit sekunder pada bahan alam dapat diekstraksi menggunakan beberapa macam teknik ekstraksi. Teknik tersebut dapat berupa maserasi, perkolasi, dan sokhletasi (Atun, 2014). Ekstraksi maserasi merupakan ekstraksi padat-cair yang menggunakan metode perendaman dengan suatu pelarut tertentu. Tujuan proses perendaman tersebut adalah untuk mengekstrak suatu senyawa target dari bahan alam. Proses maserasi juga dapat dilakukan dengan tanpa pemanasan, dengan pemanasan atau dipanaskan pada suhu didihnya. Memaksimalkan hasil maserasi biasanya dilakukan proses remaserasi sampai filtrat yang dihasilkan berwarna pudar. Hal tersebut menandakan senyawa metabolit sekunder yang berada pada bahan alam telah terdistribusi dalam pelarut (Kristanti, 2008).

Metode maserasi merupakan suatu metode pemisahan senyawa target menggunakan pelarut organik yang sesuai yang dilakukan pada suhu ruang dengan

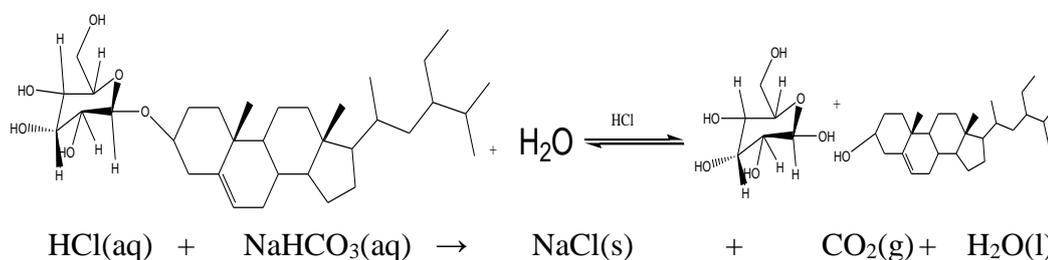
proses perendaman. Penggunaan metode maserasi pada isolasi senyawa steroid dikarenakan metode tersebut sangat cocok untuk mengatasi masalah-masalah senyawa yang tidak tahan panas. Selain itu karena murah dan mudah dalam proses pelaksanaannya (Misfadhila, dkk., 2020). Penggunaan metode lain juga dapat dilakukan untuk mengekstraksi metabolit sekunder pada tumbuhan *Hydrilla verticillata*. Penelitian Annie, dkk. (2016) meneliti metabolit sekunder yang berada di tumbuhan *Hydrilla verticillata* dengan metode sokhletasi menggunakan berbagai macam pelarut.

Metabolit sekunder yang di alam berada dalam bentuk glikosida yang terikat dengan gugus gula yang bersifat polar, sehingga untuk mengambil senyawa perlu menggunakan pelarut yang bersifat polar. Metabolit sekunder yang memiliki sifat sama dengan pelarut akan dapat berpindah dalam pelarut tersebut. Selain itu, penggunaan pelarut yang bersifat polar dalam proses ekstraksi maserasi juga dapat menghasilkan rendemen yang cukup tinggi. Hal ini dapat dibuktikan dengan nilai rendemen hasil penelitian Hafiz (2017) sebesar 12,72%. Pada penelitian tersebut mengatakan bahwa hasil maserasi yang disebut dengan maserat dengan pelarut metanol menghasilkan warna hijau yang kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vacuum* sehingga warna ekstrak berubah menjadi hijau kehitaman.

#### **2.4 Hidrolisis dan Partisi**

Ekstrak hasil maserasi dilakukan proses hidrolisis menggunakan asam kuat berupa HCl. Proses ini bertujuan untuk memisahkan antara senyawa glikon (senyawa gula yang bersifat polar) dan aglikon (bukan senyawa gula yang bersifat nonpolar, semipolar dan polar) pada senyawa glikosida (Ningsih, dkk., 2018).

Hidrolisis merupakan suatu proses senyawa yang terurai atau terpecah dengan adanya air (Groggins, dkk., 1958). Proses hidrolisis juga dapat dikatakan sebagai proses dekomposisi kimia yang terjadi dengan adanya pemutusan ikatan glikosida yang menjadi penghubung antar senyawa glikon dan aglikon melalui reaksi menggunakan air ( $H_2O$ ) dan membentuk bagian-bagian yang lebih sederhana (Adhiatama, dkk., 2012). Reaksi hidrolisis yang terjadi berlangsung sangat lambat sehingga untuk mempercepat reaksi membutuhkan bantuan katalisator berupa asam (Nihlati, dkk., 2008). Penambahan asam kuat pada sistem reaksi hidrolisis berpengaruh terhadap kekuatan pelepasan proton dari asam tersebut, sehingga proton akan membantu pemutusan ikatan glikosida. Asam yang digunakan dalam proses hidrolisis dalam dunia industri biasanya berupa asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) dan HCl. Namun, HCl lebih menguntungkan daripada  $H_2SO_4$  karena sifatnya yang lebih reaktif. Penambahan asam tersebut mengakibatkan terbentuknya suasana asam pada larutan sehingga perlu dilakukan penetralan dengan larutan natrium bikarbonat ( $NaHCO_3$ ) (Wahyudi, dkk., 2011). Penetralan pada larutan dilakukan untuk menghentikan reaksi hidrolisis yang bersifat *reversible* (Fasya, dkk., 2016). Adapun reaksi yang terjadi pada proses hidrolisis dapat ditampilkan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Reaksi hidrolisis (Pramitania, 2019)

Hidrolisat dilakukan ekstraksi kembali dengan partisi menggunakan teknik partisi cair-cair. Partisi dilakukan untuk memisahkan suatu komponen-komponen aktif yang berada dalam ekstrak sesuai dengan pelarut yang digunakan. Pemisahan secara partisi harus memiliki perbedaan kelarutan antara pelarut dan zat terlarut yang akan dipisahkan, serta kedua pelarut yang digunakan tidak saling campur (Babayi, dkk., 2004). Proses partisi dapat dilakukan dengan metode bertingkat dan tidak bertingkat, menggunakan satu pelarut maupun lebih dari satu pelarut. Ekstraksi bertingkat menggunakan dua pelarut atau lebih. Sedangkan ekstraksi tidak bertingkat dapat dilakukan dengan minimal satu pelarut. Partisi secara bertingkat dapat menghasilkan senyawa tertentu yang terekstrak secara spesifik pada setiap pelarut yang digunakan (Aisyah, dkk., 2012). Hal tersebut juga dinyatakan dalam penelitian Anggraeni, dkk. (2014) bahwa hasil pemisahan senyawa dalam metode partisi dapat dilakukan dengan dua variasi pelarut yang memiliki kepolaran yang berbeda sehingga diharapkan mampu mengekstrak jenis senyawa yang memiliki kepolaran berbeda pula. Contoh beberapa pelarut yang berbeda digunakan pada proses partisi dengan metode bertingkat dilakukan oleh Anggraeni, dkk. (2014) dalam menguji *Chlorella sp.* yang menghasilkan rendemen berbeda-beda pula. Pelarut yang digunakan dalam proses partisi ini berupa metanol, *n*-heksan, petroleum eter, kloroform, etil asetat dan air. Dalam uji fitokimia pada masing-masing pelarut menandakan positif semua terhadap senyawa steroid dan asam askorbat. Hal ini dimungkinkan jenis senyawa steroid yang terkandung dalam setiap pelarut berbeda karena setiap pelarut memiliki tingkat kepolaran yang berbeda. Proses partisi menggunakan beberapa pelarut yang berbeda telah banyak dilakukan, untuk penggunaan pelarut petroleum eter dan etil asetat menghasilkan

rendemen yang cukup tinggi dalam penelitian Fasya, dkk. (2016) dibandingkan pelarut *n*-heksana dengan rendemen 45,6132% dan kloroform 7,55 % (Anggraeni, dkk., 2014).

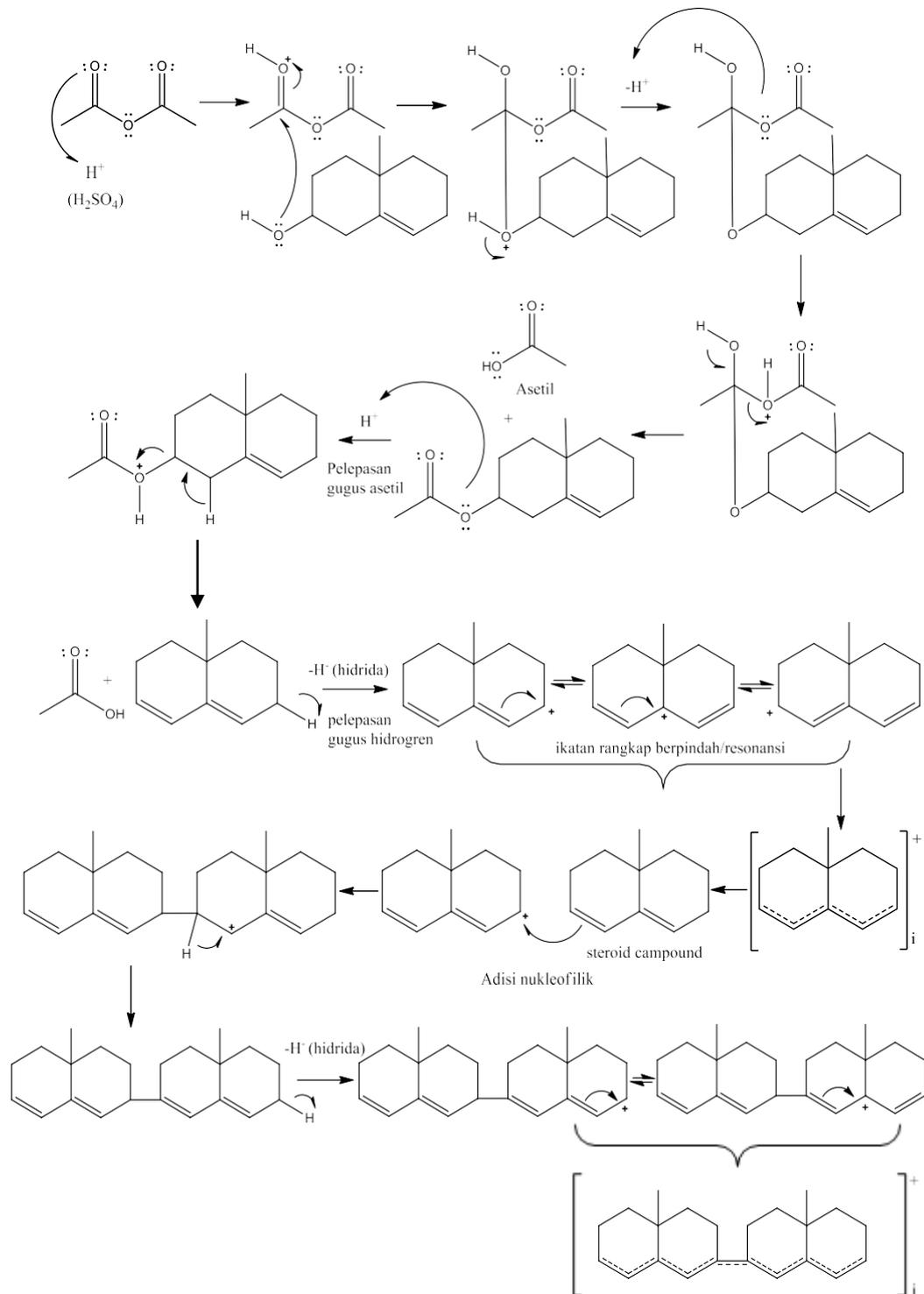
## 2.5 Uji Fitokimia

Uji fitokimia digunakan untuk menguji suatu kandungan senyawa di dalam tumbuh-tumbuhan. Dalam tumbuhan terdapat senyawa-senyawa aktif yang berupa senyawa metabolit sekunder. Salah satu senyawa yang terkandung dalam *Hydrilla verticillata* adalah senyawa steroid. Senyawa tersebut dapat diidentifikasi dengan menggunakan pereaksi warna berupa reagen *Lieberman burchard* (Lenny, 2006). Jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya golongan senyawa steroid (Rudiyansyah, 2013).

Pengujian senyawa steroid pada suatu ekstrak menggunakan metode *Lieberman burchard* dipercaya sangat spesifik, salah satu contoh pegujian senyawa steroid pada penelitian Anggraini, dkk. (2018) adalah kolesterol. Dalam penelitian Anggraini, dkk. (2018) menyatakan bahwa reaksi yang dilakukan pada metode ini harus bebas dari air karena reaksi bersifat sensitif dan tidak stabil terhadap air. Reaksi pembentukan warna hijau kebiruan dalam metode *Lieberman burchard* menggunakan pereaksi yang biasanya disebut dengan reagen *Lieberman burchard*. Reagen tersebut adalah kloroform, asam asetat anhidrat, dan asam sulfat pekat, pembentukan warna hijau kebiruan pada senyawa steroid diakibatkan karena adanya ikatan rangkap yang berpindah atau beresonansi yang menyebabkan terjadinya perpanjangan konjugasi. Dugaan mekanisme reaksi pembentukan warna

hijau kebiruan yang menandakan adanya senyawa steroid dapat ditampilkan pada

Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Dugaan mekanisme reaksi pembentukan warna steroid (Safitri, 2016)

## 2.6 Kromatografi Kolom

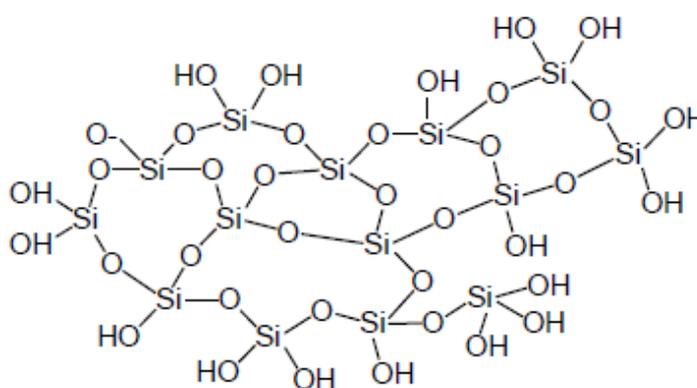
Kromatografi kolom merupakan suatu teknik pemisahan yang didasarkan pada pendistribusian analit diantara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Bentuk fase gerak dapat berupa cairan atau gas yang melewati fase diam berupa zat padat yang ada dikolom yang mengharuskan memiliki ukuran yang sama agar senyawa-senyawa yang diinginkan dapat terpisah dengan baik (Wonorahardjo, 2013). Kromatografi kolom juga dikategorikan sebagai kromatografi serapan karena memakai zat padat sebagai fase diamnya (Sastrohamidjojo, 2007).

Fase diam yang berada didalam kolom akan berperan sebagai adsorben, biasanya fase diam yang digunakan adalah silika gel F<sub>254</sub>. Pemilihan silika gel sebagai adsorben dikarenakan memiliki sifat sangat *inert*, hidrofilik, mempunyai kestabilan termal dan memiliki mekanik yang tinggi serta relatif tidak mengembang dalam pelarut organik jika dibandingkan dengan padatan resin polimer organik (Sulastri, dkk., 2010).

Silika gel merupakan suatu silika yang memiliki bentuk amorf yang terdiri atas globula-globula SiO<sub>2</sub> dengan bentuk tetrahedral yang tersusun secara tidak teratur dan beragregasi membentuk kerangka tiga dimensi yang lebih besar, kemampuan mengadsorpsi pada silika gel tergantung pada pendistribusian gugus OH per unit area adsorben (Oscik, 1982). Silika gel memiliki gugus silanol dan siloksan yang terdapat pada permukaan silika gel. Gugus siloksan pada silika gel terdapat dua macam, yaitu Si-O-Si rantai lurus dan Si-O-Si rantai melingkar dengan empat anggota. Pada gugus siloksan rantai lurus pada umumnya tidak reaktif terhadap pereaksi lain, namun reaktif apabila dengan senyawa alkali. Sedangkan siloksan rantai melingkar memiliki reaktivitas tinggi dengan membentuk kemisorpsi

dengan air, ammonia dan metanol. Reaksi dengan air akan membentuk dua gugus Si-OH. Selain gugus siloksan pada silika gel juga terdapat gugus silanol. Ada beberapa macam gugus silanol, namun gugus silanol yang dapat berinteraksi kuat membentuk ikatan hidrogen adalah jenis gugus silanol *vicinol*. Hal ini dikarenakan pada gugus tersebut jarak antar dua gugus silanol kurang dari 2,8 Å. berdasarkan data kristalografi jika jarak antara dua gugus silanol tersebut lebih dari 3,1 Å, maka tidak akan terjadi ikatan hidrogen (Sulastri, dkk., 2010).

Hal ini menyebabkan dipilihnya silika gel sebagai fase diam disebabkan karena adanya gugus hidroksi pada silanol yang akan membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa polar yang akan dipisahkan. Semakin kuat ikatan hidrogen antara fase diam dan senyawa polar yang akan dipisahkan maka semakin tertahan senyawa tersebut pada silika gel, sehingga senyawa target yang bersifat nonpolar akan terpisah dengan bergerak bersama fase gerak menuju keluar kolom (Rahmawati, 2017). Adapun struktur silika gel dapat ditampilkan pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Struktur silika gel (Sulastri, dkk., 2010)

Pemilihan fase gerak yang sesuai menjadi salah satu faktor keberhasilan suatu proses pemisahan senyawa target. Hal ini dikarenakan sifat fase gerak menentukan

kekuatan elusi untuk menggerakkan senyawa agar dapat terpisah dengan baik. Urutan pelarut dengan kekuatan elusinya menurut Atun (2014) adalah air > metanol > etanol > aseton > etil asetat > kloroform > dietil eter > metilen diklorida > benzene > toluene > karbon tetraklorida > heksana > petroleum eter. Eluen yang digunakan dalam pemisahan senyawa steroid pada kromatografi kolom menurut Purwantoro, dkk., (2019) berupa *n*-heksana : etil asetat menghasilkan pemisahan terbaik yang ditandai dengan noda tunggal.

## 2.7 Monitoring KLTA

Identifikasi fraksi hasil isolasi kromatografi kolom dilakukan dengan KLTA. Fase diam yang digunakan berupa plat silika gel F<sub>254</sub> dan eluen sebagai fase gerak berupa pelarut campuran *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17:3 (Fasya, dkk., 2016). Kromatografi lapis tipis ini merupakan suatu pemisahan yang didasarkan pada pendistribusian senyawa diantara dua fase yang berbeda yaitu fase diam dan fase gerak. Hal ini serupa dengan kromatografi kolom, namun senyawa yang telah terpisah dari hasil kromatografi lapis tipis ini akan menghasilkan noda pada plat KLT yang dapat diidentifikasi. Noda tersebut dapat dihitung nilai  $R_f$  dengan persamaan 2.1.

$$R_f = \frac{\text{Jarak tempuh senyawa}}{\text{Jarak tempuh pelarut}} \dots \dots \dots (2.1)$$

Pemisahan yang baik dipengaruhi oleh pemakaian fase gerak yang baik, yang ditandai dengan nilai  $R_f$  sebesar 0,2- 0,8. Kekuatan elusi menjadi hal penting dalam pemilihan fase gerak yang dapat dengan baik mengelusi senyawa analit yang

hendak dipisahkan. Hal ini berkaitan erat dengan tingkat kepolaran suatu pelarut (Wonorahardjo, 2013). Pada penelitian ini digunakan fase gerak *n*-heksana dan etil asetat untuk mengidentifikasi senyawa steroid yang bersifat non polar sehingga lebih terdistribusi pada fase gerak.

## 2.8 Uji Toksisitas Senyawa Steroid dengan Metode BSLT

Toksisitas dalam penelitian Soemirat (2005) menyatakan suatu ukuran relatif derajat racun antara suatu senyawa kimia terhadap senyawa kimia lainnya yang berpengaruh pada suatu organisme yang sama. Kemampuan racun yang berada dalam senyawa kimia dapat menimbulkan kerusakan apabila masuk dalam tubuh dan organ yang rentang terhadapnya. Pengujian toksisitas dapat dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* atau biasanya disebut dengan metode BSLT yang dilakukan pada udang *Artemia Salina Leach*. Metode ini sering digunakan untuk skrining awal pencarian senyawa antikanker karena dianggap berpotensi sebagai daya toksisitas senyawa-senyawa antikanker. Kelebihan dalam metode BSLT untuk pengujian bioaktivitas dengan menggunakan udang *Artemia Salina Leach* adalah dapat mengefisiensi waktu karena dalam pengujian ini memiliki proses yang cukup cepat, sederhana (tanpa memerlukan teknik aseptik atau alatnya sederhana), murah (tidak memerlukan serum hewan, hanya memerlukan larva udangnya saja), jumlah organisme melimpah, memenuhi kebutuhan validasi statistik dengan sedikit sampel (Mayer, dkk., 1982).

*Artemia salina Leach* adalah jenis udang-udangan primitif yang hidup di perairan yang mengandung kadar garam tinggi antara 15-300 per mil dengan suhu sekitar 26-31°C dengan pH 7,3-8,4. Keistimewaan dari jenis udang ini adalah

mampu beradaptasi dan mempertahankan diri pada kisaran garam yang sangat luas. *Artemia salina Leach* diperdagangkan dalam bentuk telur istirahat dengan bentuk bulat-bulatan kecil berwarna kelabu kecoklatan dengan diameter sekitar 300 mikron yang disebut kista. Tahapan proses penetasan udang *Artemia salina Leach* adalah tahap hidrasi, pecah cangkang, dan tahap pengeluaran. Tahap hidrasi terjadi proses penyerapan air sehingga kista yang diawetkan dalam bentuk kering tersebut akan menjadi bulat dan metabolisme akan aktif. Tahap selanjutnya adalah tahap pecah cangkang dan kemudian tahap pengeluaran udang dari cangkangnya (Fariyah, 2008). Telur *Artemia salina Leach* akan menetas apabila ditambahkan air laut dan diletakkan pada suhu ruang selama 1-2 hari dan kemudian dapat langsung digunakan dalam pengujian toksisitas senyawa bioaktif (Kristanti, 2008). Hewan uji *Artemia salina Leach* yang siap digunakan uji toksisitas dalam bentuk nauplii aktif yang sudah lengkap bagian organ-organnya sehingga dapat meminum air laut yang berisi sampel uji.

Suatu senyawa dapat diukur daya toksisitasnya dengan menghitung angka jumlah kematian udang *Artemia salina Leach* dengan menggunakan parameter LC<sub>50</sub>. LC<sub>50</sub> merupakan suatu konsentrasi atau kadar zat yang menyatakan dalam miligram bahan kimia per meter kubik media uji atau ppm yang dapat menyebabkan 50% kematian pada binatang coba yang terpapar dalam waktu tertentu (Cahyono, 2004). Suatu senyawa yang terkandung dalam ekstrak dikatakan mempunyai sifat toksik terhadap suatu organisme berupa larva udang *Artemia salina Leach* apabila memiliki nilai LC<sub>50</sub> < 1000 µg/mL dan apabila dikatakan tidak mengandung zat toksik memiliki nilai LC<sub>50</sub> > 1000 µg/ mL (Meyer, dkk., 1982). Adapun kategori tingkat toksisitas dapat dirangkum pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Nilai LC<sub>50</sub> berpotensi sebagai bioaktivitas

LC <sub>50</sub> (ppm)	Potensi
< 30	Antitumor dan antikanker
30-200	Antimikroba
200>x<1000	Pestisida

Sumber : McLaughlin, 1991 (dikutip dalam skripsi Mawaddah (2019))

Pengujian hasil toksisitas senyawa steroid dalam bentuk ekstrak kasar, fraksi, dan isolat memiliki nilai yang berbeda. Hal tersebut dikarenakan memiliki tingkat kemurnian yang berbeda-beda (Wati, 2020). Nilai hasil uji toksisitas senyawa steroid tersebut yang dilakukan oleh beberapa peneliti dirangkum pada Tabel 2.3.

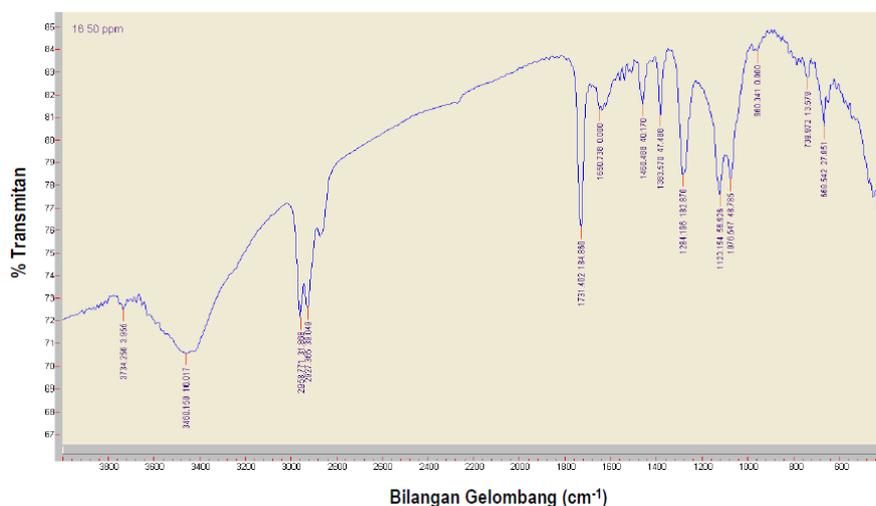
Tabel 2.3 Hasil uji toksisitas senyawa steroid

Nama peneliti	Jenis yang diuji	Nilai LC <sub>50</sub>
Desianti (2014)	Fraksi petroleum eter	32, 6710 ppm
	Fraksi etil asetat	43,3044 ppm
Afif, dkk. (2015)	Fraksi 1- butanol	70,32 ppm
Purwantoro (2019)	Isolat ekstrak n-heksana	0,28 ppm
	Isolat ekstrak petroleum eter	2,20 ppm
Mawaddah (2019)	Isolat hasil kolom	14,7948 ppm
	Fraksi n-heksana	24,585 ppm
Khasanah (2019)	Fraksi n-heksana	30,8615 ppm
	Fraksi kloroform	34,6766 ppm
	Fraksi n-butanol	39,1573 ppm
Wati (2020)	Fraksi etil asetat	15,0155 ppm
	Isolat hasil etil asetat	14,7943 ppm
	Fraksi petroleum eter	7,06102 ppm
	Isolat hasil petroleum eter	6,34832 ppm

Hasil uji toksisitas menunjukkan kategori tosik senyawa steroid pada *Hydrilla verticillata* terbaik adalah pada jenis isolat yang merupakan hasil pemisahan kromatografi kolom pada penelitian Purwantoro, dkk. (2019), Wati (2020) dan Mawaddah (2019).

## 2.9 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan FT-IR

Instrumen FT-IR hanya digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan gugus fungsi pada suatu senyawa target berdasarkan bilangan gelombang, bentuk pita serta intensitasnya. Penelitian Fasya, dkk., (2020) menunjukkan analisis pola serapan FTIR yang diduga sebagai senyawa steroid dapat ditampilkan pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Hasil spektrum FT-IR senyawa steroid (Fasya, dkk., 2020)

Hasil dari isolat *Hydrilla verticillata* yang diduga sebagai senyawa steroid menunjukkan adanya pita serapan pada daerah  $3460,150\text{ cm}^{-1}$  yang melebar menunjukkan adanya gugus O-H pada isolat. Pita serapan  $2958,771\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan CH<sub>3</sub> stretching, -CH<sub>2-</sub> asiklik ( $2927$  dan  $2840\text{ cm}^{-1}$ ) dan ikatan C=C ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ). Gugus fungsi penting lainnya yaitu gugus karbonil C=O untuk ester ( $1731\text{ cm}^{-1}$ ) yang didukung dengan serapan C-O ester ( $1286\text{ cm}^{-1}$ ) dan serapan C-O-C ( $1076\text{ cm}^{-1}$ ). Serapan C-O untuk alkohol sekunder muncul  $1123,154\text{ cm}^{-1}$ . Gugus geminal dimetil pada bilangan gelombang  $1383,5\text{ cm}^{-1}$ . Serapan gugus geminal dimetil ini adalah serapan khas dari senyawa steroid dan triterpenoid.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada Bulan Juni-Agustus 2021 di Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Instrumentasi UV-Vis Jurusan Kimia, Laboratorium Instrumentasi FT-IR Jurusan Farmasi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

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

##### **3.2.1 Alat**

Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlenmeyer 500 mL, batang pengaduk, gelas arloji, erlenmeyer vakum, corong *Buchner*, gelas ukur 250 mL, *beaker glass*, botol vial, pipet tetes, pipet ukur 1 mL, pipet ukur 5 mL, pipet ukur 10 mL, pipa kapiler, bejana pengembang, kertas saring, corong gelas, labu ukur 10 mL, labu ukur 5 mL, bola hisap, spatula, *micropipet*, neraca analitik, desikator, *shaker*, *rotary evaporator vacuum*, lampu UV, *centrifuge*, dan instrumen UV-vis.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tumbuhan *Hydrilla verticillata* dari Ranu Grati Pasuruan, metanol, telur *Artemia salina Leach*, *n*-heksana *p.a*, petroleum eter *p.a*, HCl 2N, asam asetat anhidrida, kloroform, etil asetat, asam sulfat, dimetil sulfoksida, aquades, plat silika F<sub>254</sub>.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif laboratorik yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh senyawa steroid hasil pemisahan bertingkat fraksi petroleum eter dan etil asetat pada kromatografi kolom gradien eluen terhadap uji toksisitas menggunakan metode BSLT. Percobaan ini dilakukan tiga kali pengulangan dengan larutan uji masing-masing ekstrak dibuat dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5 dan 0 ppm.

Penelitian ini diawali dengan proses preparasi sampel dengan membersihkan tanaman *Hydrilla verticillata* dari kotoran, tanah dan kontaminasi lainnya. Kemudian dikering anginkan untuk menghilangkan kadar airnya dan dihaluskan hingga membentuk bubuk. Proses maserasi dilakukan dengan menambahkan pelarut metanol pada sampel dengan perbandingan 5:1, kemudian hasil maserasi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vacum* dan dipartisi secara bertingkat dengan pelarut petroleum eter dan etil asetat dengan perbandingan 1:1. Skrining awal pengujian senyawa steroid dilakukan dengan uji fitokimia dengan reagen *Liebermen burchard*. Pemisahan senyawa steroid dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom dengan gradien eluen *n*-heksana: etil asetat, setiap perbandingan memiliki total volume 100 mL. Hasil yang diperoleh akan dimonitoring menggunakan KLTA yang proses pengamatannya dilakukan pada lampu *UV*. Isolat hasil kromatografi kolom dilakukan identifikasi menggunakan instrumen FT-IR. Selanjutnya diuji toksisitas menggunakan metode BSLT dengan parameter uji berupa nilai  $LC_{50}$ .

### 3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui tahapan-tahapan sebagai berikut :

- a). Preparasi sampel;
- b). Penentuan kadar air;
- c). Ekstraksi sampel;
- d). Uji fitokimia;
- e). Pemisahan menggunakan kromatografi kolom;
- f). Monitoring KLTA;
- g). Identifikasi senyawa menggunakan FT-IR;
- h). Uji toksisitas menggunakan metode BSLT;
- i). Analisis Data.

### 3.5 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.5.1 Preparasi Sampel

*Hydrilla verticillata* diambil sebanyak 8 Kg, kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan tanpa terkena sinar matahari selama 7 hari. Selanjutnya, apabila sudah sampel kering dihaluskan dan diayak dengan ukuran  $\pm 90$  mesh di Materia Medika Batu kabupaten Malang.

#### 3.5.2 Kadar Air Secara Thermogravimetri

Dilakukan pemanasan pada gelas porselen dengan dimasukkan dalam oven pada suhu 100-105 °C selama 15 menit. Kemudian untuk proses pendinginan gelas porselen dimasukkan dalam desikator selama 10 menit dan dilakukan penimbangan pada gelas porselen. Proses ini diulangi sampai mencapai berat yang konstan. Kemudian ditimbang 5 gram bubuk *Hydrilla verticillata* dalam gelas porselen dan

dilakukan pemanasan dalam oven pada suhu 100-105 °C selama 15 menit. Setelah itu, disimpan dalam desikator selama 10 menit dan ditimbang. Perlakuan ini juga dilakukan hingga tercapai berat konstan (Fasya, dkk., 2020). Kadar air dalam *Hydrilla verticillata* dihitung menggunakan persamaan 3.1.

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

dengan a adalah berat cawan kosong, b adalah berat sampel dan cawan sebelum dilakukan pengeringan, dan c adalah berat sampel dan cawan setelah dilakukan pengeringan menggunakan oven.

### 3.5.3 Ekstraksi Sampel Metode Maserasi

Proses maserasi dilakukan setelah penentuan kadar air pada sampel. Proses maserasi diawali dengan penimbang sampel sebanyak 50 gram kemudian diekstraksi menggunakan pelarut metanol sebanyak 250 mL selama 24 jam disertai pengocokan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm. Kemudian dilakukan penyaringan menggunakan corong *Buchner* supaya tersaring secara maksimal. Residu yang diperoleh dilakukan maserasi kembali menggunakan pelarut yang sama sampai filtrat yang dihasilkan warnanya memudar, perlakuan tersebut dilakukan sampai 3 kali pengulangan. Filtrat yang diperoleh pada hasil maserasi dilakukan pemekatan menggunakan *rotary evaporator vacum*. Kemudian dihitung berat yang didapatkan dan ditentukan nilai randemennya. Perhitungan randemen dapat menggunakan persamaan 3.2 (Fasya, dkk., 2020).

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

### 3.5.4 Hidrolisis dan Partisi

Ekstrak pekat metanol dari hasil maserasi dilakukan hidrolisis dengan ditambahkan 10 mL HCl 2N dan dilakukan pengadukan menggunakan *stirrer* pada *hot plate* selama 1 jam dan pada suhu ruang. Hidrolisat yang diperoleh dinetralkan dengan ditambahkan NaHCO<sub>3</sub> sampai pH 7. Proses pengecekan pH dilakukan dengan kertas universal. Kemudian hidrolisat dipartisi secara bertingkat dengan pelarut petroleum eter dan etil asetat. Proses partisi dilakukan dengan menambahkan pelarut petroleum eter terlebih dahulu. Hidrolisat ditambahkan pelarut petroleum eter 25 mL dalam corong pisah, kemudian dikocok dan didiamkan beberapa menit. Proses ini akan menghasilkan dua fase yang berbeda yaitu fase organik (berada diatas) dan fase air (berada dibawah). Fase organik akan diambil dan disimpan sedangkan fase air yang didapatkan ditambahkan petroleum eter dan dipartisi kembali sampai 3 kali pengulangan. Fase air yang terakhir ditambahkan pelarut etil asetat 25 mL dan dilakukan partisi kembali dengan 3 kali pengulangan. Hasil partisi pada proses ini akan menghasilkan 2 fraksi yaitu fraksi petroleum eter dan fraksi etil asetat. Kedua fraksi tersebut digunakan untuk mengidentifikasi golongan senyawa aktif yang terdapat pada *Hydrilla verticillata* (Anggraeni, dkk., 2014). Kemudian dihitung beratnya dan ditentukan randemennya dengan persamaan 3.3.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Fraksi yang diperoleh}}{\text{berat sampel yang dihidrolisis}} \times 100\% \dots \dots \dots (3.3)$$

### 3.5.5 Uji Fitokimia

Fraksi hasil hidrolisis dan partisi diambil 1 mg kemudian ditambahkan reagen *Lieberman burchard* (0,5 mL kloroform, 0,5 mL asam asetat anhidrat dan 1-2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat). Apabila larutan berubah warna menjadi hijau kebiruan, maka fraksi tersebut mengandung senyawa steroid. Hal ini menandakan proses pemisahan senyawa dapat dilanjutkan ke tahap selanjutnya.

### 3.5.6 Kromatografi Kolom

Proses isolasi senyawa steroid menggunakan kromatografi kolom basah dengan fase diam silika gel dan fase gerak berupa *n*-heksana : etil asetat. Bubur silika dibuat dengan cara merendam silika sebanyak 10 gram yang sudah diaktivasi dalam oven selama 2 jam pada suhu 110°C dan didinginkan dalam desikator selama 15 menit dengan pelarut *n*-heksana : etil asetat (19:1 v/v) dan dihomogenkan selama 1 jam. Kolom disiapkan dan diisi *glasswool* pada bagian bawah kolom, kemudian bubuk silika dimasukkan ke dalam kolom secara perlahan dan tanpa jeda. Didiamkan selama 24 jam (Mawaddah, 2019). Setelah itu, 0,067 gram sampel dilarutkan dengan 1 mL pelarut *n*-heksana : etil asetat (19/1 v/v) dan dimasukkan dalam kolom berdiameter 1 cm, dengan panjang kolom 50 cm (Purwantoro, dkk., 2019). Dilakukan Proses elusi dalam variasi perbandingan fase gerak *n*-heksana: etil asetat (19:1, 18:2, 17:3) v/v dengan volume masing-masing 100 mL (Madjid, dkk., 2020). Hasil dalam bentuk eluat dari kromatografi kolom akan ditampung ke dalam 1 botol vial setiap 2 mL/menit.

### 3.5.7 Monitoring KLTA

Identifikasi fraksi hasil isolasi kromatografi kolom dilakukan dengan KLTA. Fase diam yang digunakan plat silika gel F<sub>254</sub> ukuran 10x10 cm yang telah diaktivasi pada suhu 110°C selama 30 menit dan eluen sebagai fase gerak berupa pelarut campuran *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17:3. Isolat ditotolkan pada plat silika gel yang sudah ditandai jarak 1 cm dari tepi bawah dan tepi atas. Penotolan isolat dilakukan dengan pipa kapiler sebanyak 10 kali secara berkala dengan peneringan (Mawaddah, 2019). Kemudian proses elusi dilakukan dengan dimasukkan ke dalam bejana pengembang yang berisikan eluen yang sudah dijenuhkan, apabila fase gerak sudah sampai pada batas atas maka proses elusi dihentikan. Noda/spot hasil pemisahan dideteksi dengan menyemprotkan reagen *Lieberman burchard* dan diamati di bawah sinar UV (366 nm) dan dihitung  $R_f$  (Ningsih, dkk., 2018) menggunakan Persamaan 2.1. Spot pada plat yang memiliki nilai  $R_f$  sama dan bercak yang sama digabungkan. Kemudian hasil isolat dilakukan identifikasi menggunakan instrumen FT-IR dan diuji toksisitasnya pada udang *Artemia salina Lech*.

### 3.6 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan FT-IR

Senyawa hasil isolasi diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer FTIR. Isolat yang diperoleh dijadikan pelet KBr dan dipress dengan tekanan 80 Torr. Sampel cair kemudian dioleskan pada KBr dan dimasukkan ke dalam spektrofotometer FTIR untuk dianalisis gugus fungsi pada spektra yang dihasilkan (Purwantoro, dkk., 2018).

### 3.7 Penetasan Larva Udang untuk Uji Toksisitas Senyawa Steroid

Sebanyak 250 mL air laut dimasukkan dalam botol penetasan, kemudian dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina Leach* dan 1 mg radi roti dalam 5 mL aquades (Fatimah, 2020). Selanjutnya diaerasi dan diberi sinar lampu pijar/neon pada suhu ruang. Telur akan menetas dalam waktu  $\pm$  48 jam dan siap digunakan sebagai target uji toksisitas (Wati, 2020).

### 3.8 Uji Toksisitas Senyawa Steroid

Uji toksisitas dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan pada setiap sampel (isolat hasil kromatografi kolom fraksi etil asetat dan petroleum eter). Masing-masing sampel uji diambil 1 mg dan dilarutkan pada masing-masing pelarutnya sebanyak 10 mL agar mendapat larutan stok dengan konsentrasi 100 ppm. Kemudian masing-masing larutan stok dibuat dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5 dan 0 ppm dengan dipipet larutan stok sebesar 50, 100, 150, 200, 250 dan 0  $\mu$ L. Selanjutnya masing-masing larutan uji tersebut dimasukkan ke dalam botol vial dan pelarutnya diuapkan hingga kering. Setelah itu, dimasukkan 100  $\mu$ L dimetil sulfoksida (DMSO), ditambahkan 2 mL air laut, setetes larutan ragi roti pada masing-masing botol vial dan dilakukan pengocokan hingga homogen. Kemudian dilakukan penambahan 10 mL air laut pada masing-masing botol vial. Selanjutnya dimasukkan 10 ekor larva *Artemia salina Leach*. Kemudian dilakukan pengamatan setelah 24 jam terhadap kematian larva udang (Wati, 2020).

Kematian larva udang dibandingkan dengan beberapa kontrol yaitu kontrol tanpa isolat, kontrol pelarut dan kontrol DMSO. Kontrol tanpa isolat dibuat dengan cara tanpa penambahan isolat, yaitu dimasukkan 100  $\mu$ L pelarut dan diuapkan.

Kemudian ditambahkan 100  $\mu$ L DMSO, setetes larutan ragi roti, dan ditambahkan air laut hingga volumenya 10 mL dan 10 ekor larva *Artemia salina* Leach. Sedangkan kontrol pelarut dibuat dengan cara yang sama, namun tanpa penambahan DMSO dan isolat. Pembuatan kontrol DMSO juga dilakukan dengan ditambahkan DMSO sebanyak 100  $\mu$ L dan tanpa penambahan isolat dan pelarut. Masing-masing larutan kontrol dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali. Kemudian dilakukan pengamatan setelah 24 jam terhadap kematian larva udang.

### **3.9 Analisis Data**

Isolat hasil kromatografi kolom dilakukan uji toksisitas untuk mengetahui tingkan toksisitasnya dengan menggunakan metode BSLT. Hasil yang diperoleh dari uji tersebut berupa data kematian dari larva udang yang kemudian akan dianalisis angka probitnya menggunakan program Minitab17. Pengolahan data dilakukan dengan memasukkan nilai mortalitas, nilai konsentrasi dan total larva yang digunakan. Nilai mortalitas merupakan angka kematian pada organisme uji. Penelitian ini menggunakan pengulangan untuk memilih ketepatan angka kematian pada organisme uji sehingga perlu menentukan modus. Modus pada penelitian ini diartikan sebagai mortalitas atau angka kematian. Nilai mortalitas akan diubah menjadi nilai probit analisis yang diolah otomatis pada software sehingga sumbu (y) adalah nilai probit analisis sedangkan pada sumbu (x) merupakan log konsentrasi. Kedua nilai tersebut diplotkan dan diolah pada program Minitab17 yang kemudian akan mendapatkan nilai  $LC_{50}$  dalam bentuk ppm. (Okomoda, dkk., 2013).

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1 Rendemen Preparasi Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan tumbuhan *Hydrilla verticillata* yang diambil di daerah pinggiran Danau Ranu Grati Pasuruan. Sampel dilakukan pencucian untuk menghilangkan kontaminan berupa kotoran, tanah dan lumpur. Proses pengeringan sampel dilakukan dengan dikering anginkan (tidak langsung terkena sinar matahari). Hal tersebut dilakukan karena untuk menjaga mutu dan komposisi senyawa kimia yang terkandung pada sampel. Metode pengeringan tersebut telah dilakukan oleh Tapotubun (2018) pada sampel rumput laut khas Maluku yang menyatakan bahwa pengeringan yang dilakukan dengan cara dikering anginkan menghasilkan kandungan kimia lebih tinggi dibandingkan dengan pengeringan sinar matahari langsung.

Sampel yang sudah kering dilakukan penghalusan untuk memperkecil luas permukaan pada sampel. Pengecilan luas permukaan dapat menyebabkan pemecahan dinding dan membran pada sampel, sehingga mempermudah senyawa yang di dalamnya naik ke permukaan. Sel yang rusak juga dapat mengakibatkan meningkatnya laju perpindahan massa serta jarak difusi sehingga dapat mempercepat proses ekstraksi (Ardyanti, ddk., 2020). Sampel akhir yang didapatkan setelah proses penghalusan dalam penelitian ini sebesar 500 gram dari berat awal 8 Kg sampel basah, sehingga diperoleh nilai rendemen serbuk kering sebesar 6,250% (Lampiran 3.1).

Penentuan kadar air secara thermogravimetri pada sampel juga dilakukan, Penggunaan metode dalam penentuan kadar air dikenal dengan metode pengeringan

dan penimbangan yang mengacu pada SNI 01-2354.2-2006. Nilai kadar air yang dihasilkan pada penelitian ini sebesar 8,919% (Lampiran 3.2). Nilai kadar air yang didapatkan dalam penelitian ini sesuai dengan persyaratan yang telah ditetapkan oleh Kementerian Kesehatan Republik Indonesia dengan nomer surat 661/MENKES/SK/VII/1994, yang menyatakan bahwa nilai kadar air yang terkandung dalam simplisia berupa serbuk harus kurang dari 10%.

Kadar air yang tidak memenuhi persyaratan mengakibatkan terjadinya pertumbuhan mikroba sehingga dapat terjadi berlangsungnya reaksi-reaksi enzimatik yang dapat menguraikan senyawa-senyawa aktif di dalamnya. Nilai kadar air yang terlalu tinggi juga dapat mempengaruhi hasil ekstraksi. Hal tersebut dinyatakan dalam penelitian Prasetia, dkk. (2012) yang menyatakan bahwa proses ekstraksi dengan waktu yang sama pada kadar air yang lebih tinggi akan menghasilkan rendemen yang lebih sedikit. Hal ini dikarenakan gugus hidrogen pada air dapat membentuk ikatan hidrogen dengan pelarut sehingga air dalam sampel akan terikat oleh pelarut (Amalia, dkk., 2018).

### **4.3 Rendemen Ekstrak Hasil Maserasi**

Ekstraksi sampel *Hydrilla verticillata* pada penelitian ini menggunakan metode maserasi. Metode tersebut digunakan karena target senyawa yang berupa steroid tidak tahan panas. Pelarut yang digunakan berupa metanol *p.a.*, karena metabolit sekunder yang berada di simplisia umumnya bersifat polar sehingga dapat terlarut dalam pelarut polar.

Proses maserasi dilakukan dengan perendaman selama 24 jam dengan 3 kali pengulangan menggunakan pelarut baru pada sampel yang tetap dengan tujuan

untuk memaksimalkan terekstraknya metabolit sekunder pada pelarut yang ditandai dengan sedikit mudarnya filtrat yang dihasilkan. Penguapan pelarut hasil maserasi menggunakan *rotary evaporator vacum*. Alat tersebut bekerja berdasarkan pada titik didih pelarut dan memanfaatkan tekanan yang dapat menyebabkan uap dari pelarut terkumpul pada kondensor yang mengakibatkan uap mengembun dan jatuh pada tabung penerima, hasil ekstrak berupa cairan kental berwarna hijau pekat. Ekstrak tersebut masih tersisa pelarut yang perlu dilakukan penguapan kembali. Penggunaan gas N<sub>2</sub> dalam proses penguapan ekstrak karena gas tersebut bersifat *inert* sehingga sampel tidak mengalami oksidasi. Ekstrak yang didapatkan diperoleh rendemen sebesar 5,489% (Lampiran 3.3.1).

#### **4.4 Hidrolisis dan Rendemen Hasil Partisi**

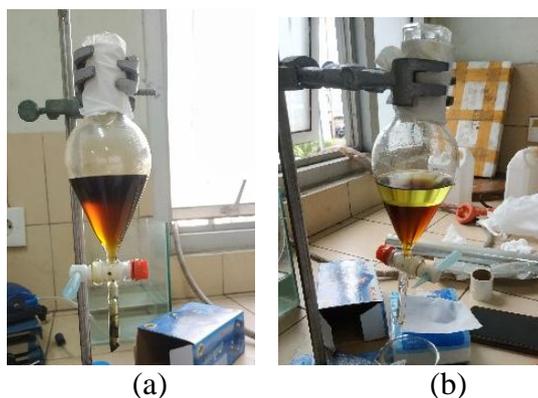
Ekstrak kasar yang didapatkan dari hasil maserasi merupakan ekstrak yang mengandung metabolit sekunder dengan gugus gula yang berikatan glikosida. Untuk memutus ikatan tersebut dilakukan proses hidrolisis dengan bantuan katalis asam berupa HCl 2N. Pemilihan katalis HCl dengan konsentrasi 2N tersebut dikarenakan hasil produk yang didapatkan berupa garam yang tidak berbahaya berupa NaCl (Yuniwati, dkk., 2011), sedangkan pemilihan konsentrasi 2N merupakan konsentrasi yang optimum menurut penelitian Artati, dkk. (2013). Penelitian tersebut melakukan proses hidrolisis dengan katalis HCl dalam beberapa variasi konsentrasi, hasil optimum didapatkan pada konsentrasi 2N dengan menghasilkan berat glukosa mencapai 2,900 gram. Semakin besar glukosa yang didapatkan maka semakin banyak ikatan glikosida yang terputus.

Reaksi hidrolisis bersifat *reversible* sehingga perlu untuk dihentikan dengan menambahkan larutan  $\text{NaHCO}_3$  hingga larutan mencapai pH 7. Dalam reaksinya pada Gambar 2.4 menyebutkan bahwa hasil dari hidrolisis membentuk garam, gas karbon dioksida dan air. Hal ini dibuktikan pada saat penetralan larutan terbentuk gelembung-gelembung yang menandakan bahwa terbentuknya gas karbon dioksida ( $\text{CO}_2$ ) yang dapat ditampilkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Pembentukan gas  $\text{CO}_2$  reaksi hidrolisis

Pemisahan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak hasil hidrolisis dilakukan dengan proses partisi beringkat. Proses partisi dalam penelitian ini menggunakan pelarut petroleum eter dan etil asetat. Pelarut petroleum eter pertama kali ditambahkan dalam partisi bertingkat karena senyawa-senyawa metabolit sekunder jenis steroid cenderung bersifat nonpolar sehingga dimungkinkan terekstrak secara maksimal. Fasa air yang dihasilkan dilakukan partisi kembali dengan pelarut etil asetat. Hal ini dikarenakan dimungkinkan senyawa yang memiliki kepolaran berbeda yang belum terekstrak dalam pelarut petroleum eter. Hasil dari proses partisi pada kedua pelarut petroleum eter maupun etil asetat diperoleh 2 lapisan yang tidak saling campur. Hal tersebut dapat ditampilkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Hasil Partisi (a) Pelarut petroleum eter, (b) Pelarut etil asetat

Dua lapisan yang tidak saling campur disebabkan karena masing-masing lapisan memiliki massa jenis yang berbeda. Massa jenis air ( $\rho_{air} = 0,997 \text{ gr/mL}$ ) sedangkan massa jenis pelarut petroleum eter ( $\rho_{PE} = 0,693 \text{ gr/mL}$ ) dan etil asetat ( $\rho_{EA} = 0,902 \text{ gr/mL}$ ) yang menandakan lapisan bawah berupa fasa air dan lapisan atas berupa fasa organik karena massa jenis air lebih besar dari pada massa jenis fasa organik. Hasil partisi dari kedua pelarut tersebut dirangkum dalam Tabel 4.1

Tabel 4.1 Hasil partisi pelarut petroleum eter dan etil asetat secara bertingkat

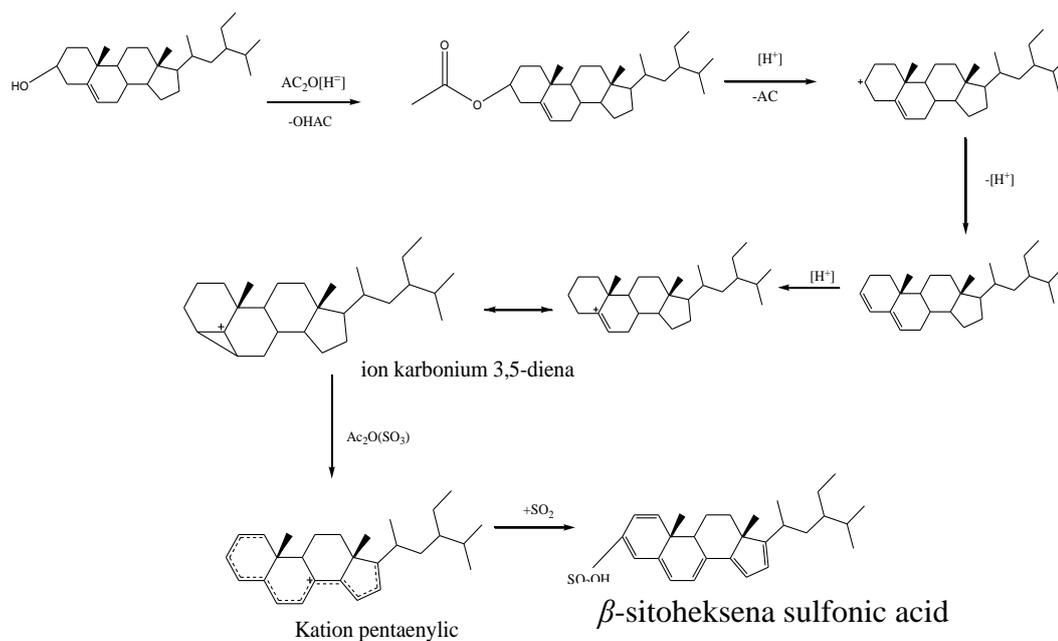
Pelarut	Berat Fraksi Pekat (g)	Rendemen (%)
Petroleum eter	3,413	68,270
Etil asetat	0,140	2,800

Berdasarkan Tabel 4.1 randemen yang diperoleh pada partisi bertingkat menghasilkan fraksi petroleum eter lebih besar dibandingkan dengan fraksi etil asetat. Selisih nilai randemen antara fraksi petroleum eter dan etil asetat sangat tinggi yaitu mencapai 65,470%, sehingga dapat disimpulkan bahwa senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak *Hydrilla verticillata* memiliki

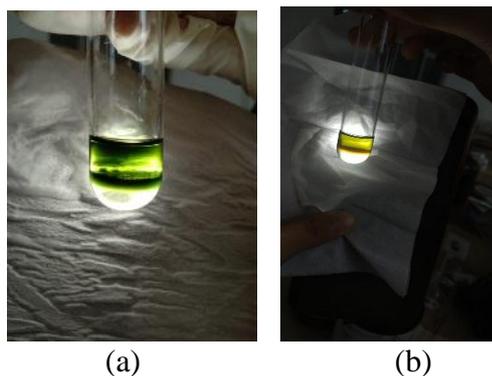
sifat kepolaran yang sama dengan pelarut petroleum eter dari pada pelarut etil asetat.

#### 4.5 Fitokimia Hasil Fraksi Petroleum eter dan Etil asetat

Uji fitokimia merupakan tahapan paling penting untuk dilakukan dalam penelitian ini karena suatu uji awal untuk mengetahui keberadaan senyawa steroid yang akan dipisahkan pada tahap selanjutnya. Keberadaan senyawa steroid pada fraksi petroleum eter dan etil asetat *Hydrilla verticillata* diuji dengan penambahan reagen *Limbermann burchard*. Reaksi steroid dengan pereaksi reagen *Limbermann burchard* akan memberikan perubahan warna dengan terbentuknya cincin hijau kebiruan. Hal tersebut didasari oleh kemampuan senyawa steroid membentuk warna dengan  $H_2SO_4$  dalam pelarut asam asetat anhidrat. Terbentuknya warna hijau kebiruan diakibatkan adanya perbedaan gugus pada atom C-4 (Habibi, dkk., 2018). Dugaan reaksi senyawa steroid dapat ditampilkan pada Gambar 4.3 dan hasil uji fitokimia kedua fraksi dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.3 Dugaan reaksi senyawa steroid dan reagen *Limbermann burchard*



Gambar 4.4 Hasil uji fitokimia steroid (a) fraksi petroleum eter (b) fraksi etil asetat

Hasil uji fitokimia pada penelitian ini menunjukkan terdapat golongan senyawa steroid yang ditandai dengan terbentuknya cincin hijau setelah ditetesi reagen *Limbermann burchard* pada kedua fraksi. Cincin hijau yang terbentuk dalam kedua fraksi memiliki sedikit perbedaan. Fraksi petroleum eter memiliki warna hijau lebih tajam dari pada fraksi etil asetat. Perbedaan tersebut dimungkinkan adanya pengaruh senyawa steroid yang kuat dalam fraksi petroleum eter dari pada senyawa steroid yang berada pada fraksi etil asetat. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Amalia, dkk. (2018); Wati (2020) dan Vania (2020) yang menyatakan fraksi petroleum eter dan etil asetat pada *Hydrilla verticillata* positif terhadap steroid dengan ditandai terbentuknya cincin warna hijau kebiruan setelah ditetesi reagen *Limbermann burchard*.

#### 4.6 Isolat Hasil Kromatografi Kolom

Senyawa steroid yang terdapat pada fraksi petroleum eter dan etil asetat dilakukan pemisahan kembali menggunakan kromatografi kolom dengan eluen terbaik. Untuk memaksimalkan pemisahan perlu dilakukan pengaktifan gugus hidroksil (-OH) pada fase diam untuk membentuk ikatan hidrogen dengan senyawa

yang sesuai. Selain itu, penjenuhan kolom juga dilakukan untuk memadatkan silika dalam kolom agar proses pemisahan dapat berlangsung secara maksimal.

Senyawa-senyawa yang berada dalam fraksi dimungkinkan akan terjadi interaksi dengan fase diam maupun fase gerak saat proses elusi, dikarenakan adanya gaya-gaya Van Der Waals seperti gaya London, dipol-dipol, dipol induksi dan bahkan ikatan hidrogen (Wonohardjo, 2013). Gradien eluen yang digunakan dalam penelitian ini adalah dari eluen yang bersifat nonpolar hingga semi polar. Hal ini dikarenakan sebagian besar senyawa steroid bersifat nonpolar sehingga lebih cepat terelusi. Penampungan eluet dilakukan sesedikit mungkin yaitu 2 mL/menit dalam satu botol vial. Hal ini dikarenakan untuk menghindari tercampurnya senyawa yang telah dipisahkan (Pramitania, 2019). Isolat yang dihasilkan dari fraksi petroleum eter sebanyak 133 vial dan fraksi etil asetat sebanyak 140 vial. Semakin lama pemisahan, warna eluet yang dihasilkan berwarna kuning kehijauan baik dari fraksi petroleum eter maupun etil asetat.

#### **4.7 Isolat Hasil Monitoring KLTA**

Monitoring KLTA bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengelompokkan hasil isolat kromatografi kolom berdasarkan nilai  $R_f$  dan warna noda yang muncul setelah disinari lampu UV 366 nm. Fase diam yang digunakan berupa silika gel F<sub>254</sub> yang berada pada plat, sedangkan eluen yang digunakan merupakan perbandingan terbaik dari pelarut *n*-heksana:etil asetat (17:3) (Baderos, 2017).

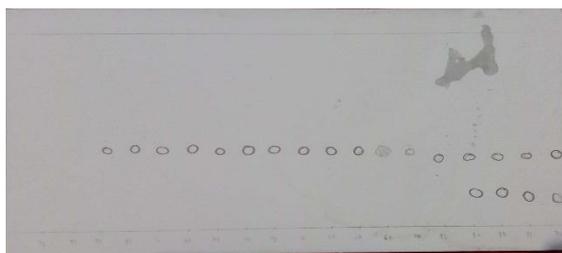
Isolat hasil kromatografi kolom fraksi petroleum eter maupun etil asetat dilakukan monitoring sebagian pada vial yang bernomer ganjil hingga vial nomer 133 untuk isolat petroleum eter, sedangkan untuk etil asetat hingga vial nomer 139.

Hal tersebut dilakukan untuk mengefisiensi waktu pekerjaan, apabila terdapat noda atau nilai  $R_f$  yang berbeda pada nomer vial yang berdekatan, maka dilakukan monitoring ulang pada vial yang ditentukan. Hasil monitoring isolat petroleum eter dapat dirangkum pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil monitoring KLTA isolat petroleum eter

Iso lat	Vial	Warna UV <sub>366</sub>	Jarak senyawa (cm)	Jarak elusi (cm)	$R_f$	Rende men	Dugaan senyawa
A	1-46	-	-	8	-	-	-
<b>B</b>	<b>47-69</b>	<b>Hijau</b>	<b>3,500</b>	<b>8</b>	<b>0,437</b>	<b>8,200</b> %	<b>Steroid</b>
C	70-80	Hijau	3	8	0,375	3.200	Steroid
		Merah	1,500	8	0,187	%	Triterpenoid
<b>D</b>	<b>81-94</b>	<b>Merah</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>0,250</b>	<b>4,300</b> %	<b>Triterpenoid</b>
E	95-106	Merah	1,900	8	0,237	2,600	Triterpenoid
		Merah	0	8	0	%	Triterpenoid
F	107-120	Merah	1,900	8	0,237	3,400	Triterpenoid
		Merah	1,200	8	0,150	%	Triterpenoid
		Merah	0	8	0		Triterpenoid
G	121-133	Merah	1,700	8	0,212	1,700	Triterpenoid
		Merah	1,200	8	0,150	%	Triterpenoid
		Merah	0	8	0		Triterpenoid

Hasil monitoring KLTA isolat petroleum eter terdapat 6 kelompok dengan nilai  $R_f$  dan noda yang berbeda. Noda tunggal yang dihasilkan berupa senyawa steroid dan senyawa triterpenoid. Senyawa steroid ditunjukkan dengan terbentuknya noda yang berwarna hijau sedangkan senyawa triterpenoid berwarna merah. Kedua noda tersebut muncul setelah disinari lampu UV<sub>366</sub>. Hasil monitoring KLTA senyawa steroid dapat ditampilkan pada Gambar 4.5 dan 4.6.



Gambar 4.5 Hasil monitoring KLTA isolat petroleum eter



Gambar 4.6 Hasil monitoring KLTA isolat petroleum eter disinari UV

Warna noda sesuai dengan penelitian yang dilakukan Fatimah (2020) yang melakukan identifikasi senyawa steroid menggunakan KLTA dari hasil kromatografi kolom pada Alga merah. Senyawa steroid dengan spot tunggal pada hasil penelitian ini ditunjukkan pada isolat B yang berada pada vial nomer 47-69, sedangkan senyawa triterpenoid ditunjukkan pada isolat D dengan nomer vial 81-94. Berat isolat yang didapatkan sebesar 5,500 mg untuk isolat B, sedangkan isolat D sebesar 2,900 mg. Nilai  $R_f$  yang dihasilkan pada isolat B sebesar 0,437 sedangkan nilai  $R_f$  isolat D sebesar 0,250. Perolehan nilai  $R_f$  isolat B pada penelitian ini hampir mirip dengan nilai  $R_f$  steroid hasil penelitian Wati (2020) sebesar 0,450. Hasil tersebut menyatakan bahwa senyawa steroid berinteraksi kuat dengan fase gerak dari pada fase diam yang dibuktikan dengan nilai  $R_f$  isolat B lebih besar dari pada nilai  $R_f$  isolat D. Semakin besar nilai  $R_f$ , maka isolat yang didapatkan memiliki sifat kemiripan dengan fase gerak (Fatimah, 2020). Sehingga dapat dikatakan bahwa senyawa steroid yang didapatkan cenderung bersifat

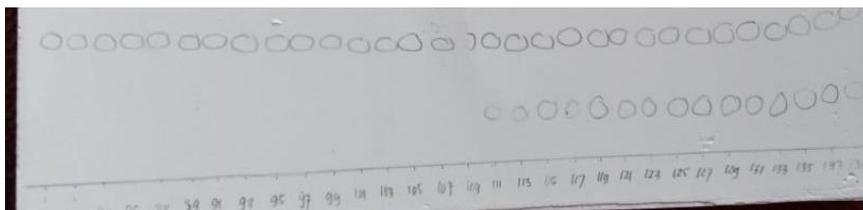
nonpolar karena fase gerak yang digunakan bersifat nonpolar. Adapun hasil kromatografi kolom etil asetat dirangkum pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil monitoring KLTA isolat etil asetat

Iso lat	Vial	Warna UV <sub>366</sub>	Jarak senyawa (cm)	Jarak elusi (cm)	$R_f$	Rend emen	Dugaan senyawa
A	1-78	-	-	8	-	-	-
<b>B</b>	<b>79-109</b>	<b>Hijau</b>	<b>2,500</b>	<b>8</b>	<b>0,312</b>	<b>13,20</b> <b>0%</b>	<b>Steroid</b>
C	110-140	Hijau Merah	2,500 1	8 8	0,312 0,125	13,20 0%	Steroid Tritererpenoid

Hasil monitoring KLTA isolat etil asetat terdapat 3 kelompok, satu diantaranya memiliki spot noda tunggal. Isolat tersebut merupakan jenis steroid dengan noda berwarna hijau pada vial nomer 79-109. Nilai  $R_f$  yang didapatkan sebesar 0,312 dengan berat isolat sebesar 8,900 mg. Hasil  $R_f$  yang didapatkan sesuai dengan penelitian Mardaneni (2017) yang melakukan monitoring KLTA dengan eluen 17:3 menghasilkan spot yang diduga steroid dengan nilai  $R_f$  sebesar 0,337. Selain spot tunggal yang berwarna hijau, isolat etil asetat menunjukkan adanya spot ganda yang memiliki warna dan nilai  $R_f$  berbeda. Perbedaan tersebut menunjukkan adanya senyawa yang berbeda dalam isolat etil asetat. Berdasarkan penelitian Mardaneni (2017) spot berwarna hijau dengan nilai  $R_f$  0,337 merupakan senyawa steroid sedangkan spot berwarna merah dengan  $R_f$  0,125 merupakan senyawa triterpenoid dalam hasil monitoring KLTA ekstrak metanol *Euchema cottoni*. Nilai  $R_f$  pada spot ganda yang dihasilkan dalam penelitian ini sebesar 0,312 (hijau) dan 0,125 (merah), sehingga dapat dikatakan bahwa perbedaan nilai  $R_f$  dan warna spot menunjukkan adanya senyawa yang berbeda, selain itu nilai  $R_f$  yang

berbeda juga menunjukkan adanya sifat kepolaran yang berbeda, semakin tinggi nilai  $R_f$  yang dihasilkan maka sifat kepolaran suatu senyawa semakin mirip dengan fase gerak. Monitoring KLTA isolat etil asetat dapat ditampilkan pada Gambar 4.7 dan 4.8.



Gambar 4.7 Hasil monitoring KLTA isolat etil asetat

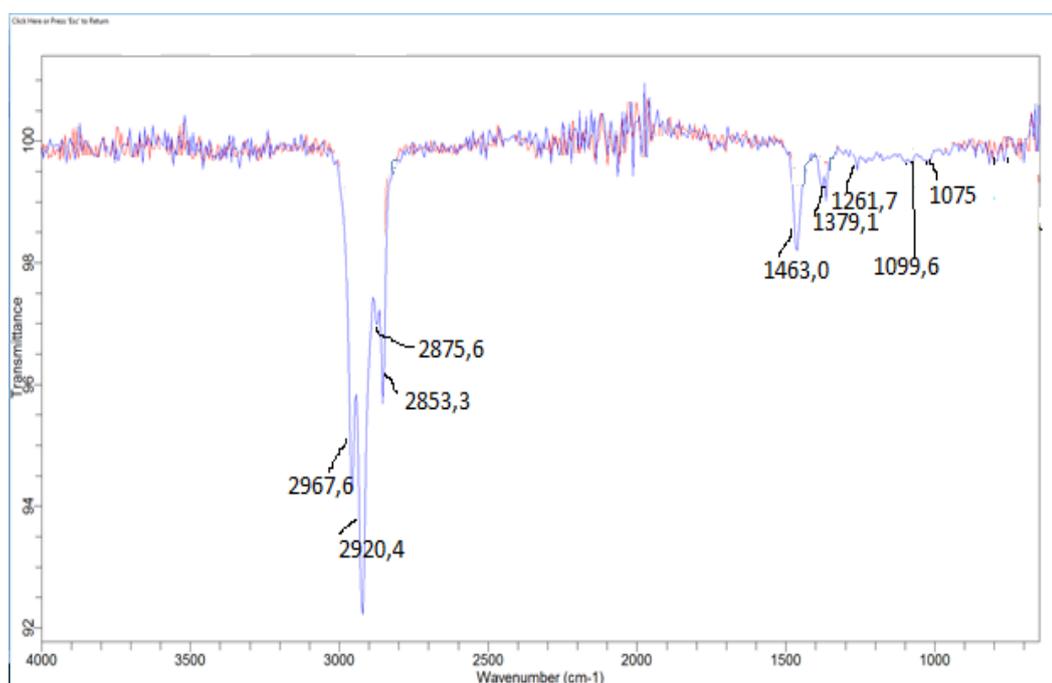


Gambar 4.8 Hasil monitoring KLTA isolat etil asetat disinari UV

Nilai  $R_f$  yang diduga senyawa steroid pada spot tunggal yang didapatkan pada isolat petroleum eter dan etil asetat berbeda. Perbedaan tersebut dimungkinkan jenis senyawa steroid yang didapatkan berbeda. Nilai  $R_f$  petroleum eter lebih besar dibandingkan etil asetat, yaitu 0,437 dibanding 0,312. Dari hasil tersebut dimungkinkan senyawa steroid pada petroleum eter memiliki sifat lebih nonpolar dari pada senyawa steroid pada etil asetat. Perbedaan sifat tersebut dimungkinkan adanya perbedaan struktur senyawa steroid.

#### 4.8 Identifikasi Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom dengan FT-IR

Identifikasi suatu senyawa menggunakan instrumen FT-IR bertujuan untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat didalamnya. Gugus fungsi dalam suatu senyawa memiliki ikatan dengan tipe yang berbeda-beda, sehingga setiap gugus fungsi akan mempunyai nilai serapan yang khas. Spektrum yang muncul pada FT-IR dikarenakan adanya interaksi sampel dengan radiasi inframerah yang memiliki dampak berupa vibrasi molekul dalam sampel yang menghasilkan penyerapan dan/atau transmisi energi. Vibrasi molekul yang dapat merubah momen dipol dalam senyawa akan muncul sebagai spektrum pada FT-IR. Spektrum FT-IR dari hasil isolat petroleum eter dapat ditampilkan pada Gambar 4.9 dan interpretasinya dirangkum pada Tabel 4.4.



Gambar 4.9 Spektrum hasil FT-IR isolat petroleum eter

Tabel 4.4 Interpretasi spektra FT-IR isolat petroleum eter

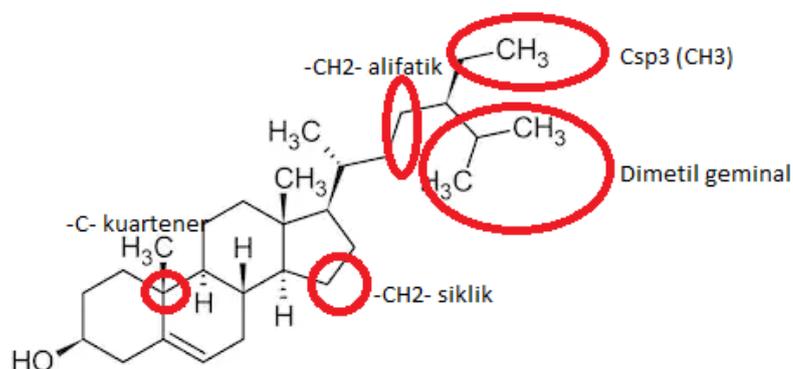
Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Range Pustaka (Socrates, 1994)	Jenis vibrasi	Intensitas
2967,6	2970-2915	C-H <i>sp</i> <sup>3</sup> pada CH <sub>3</sub>	Kuat
2920,4		asimetris <i>stretching</i>	Kuat
2875,6	2875-2840	C-H <i>sp</i> <sup>3</sup> pada CH <sub>2</sub> simetris	Kuat
2853,3		<i>stretching</i> (alifatik)	
1463,0	1410-1310	C-C pada CH <sub>2</sub> <i>bending</i>	Kuat
1379,1	1370-1365	Dimetil geminal (CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )	Sedang
1261,7	1270-1230	-C- (kuartener)	Lemah
1099,6	1100-1040	-CH <sub>2</sub> - <i>bending</i>	Lemah
1075,3			

Hasil identifikasi FT-IR pada Gambar 4.4 dan Tabel 4.4 menunjukkan bahwa isolat petroleum eter memiliki gugus fungsi yang berbeda-beda. Gugus fungsi yang muncul sebagian besar berupa gugus fungsi golongan metil seperti C-H *sp*<sup>3</sup> asimetris dan simetris *stretching*, C-C pada CH<sub>2</sub> *bending*, dan C-H *bending* dan dimetil geminal (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). Gugus fungsi hasil identifikasi menggunakan FT-IR sangat terbatas dalam menentukan suatu jenis senyawa, sehingga perlu adanya identifikasi lain.

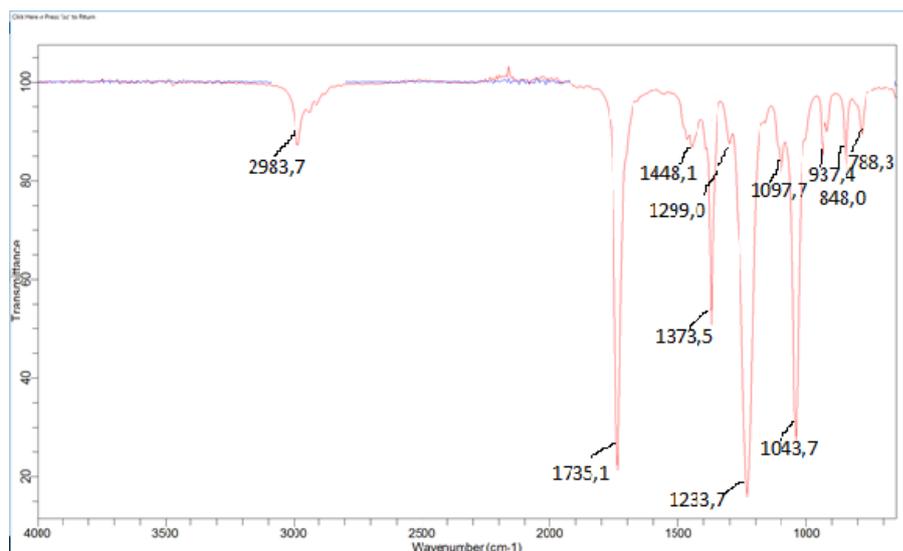
Identifikasi lain yang dilakukan dalam penelitian ini berupa identifikasi secara kimia dengan uji fitokimia menggunakan reagen *Lieberman burchard*. Identifikasi tersebut menunjukkan adanya cincin hijau yang menyatakan adanya senyawa steroid, selain itu keberadaan senyawa steroid juga ditunjukkan adanya spot hijau kebiruan pada saat monitoring KLTA, namun gugus fungsi maupun hasil spektrum dalam penelitian ini berbeda dengan hasil gugus fungsi yang dihasilkan oleh Mawaddah (2019) yang menganalisis senyawa steroid pada *Hydrilla verticillata* menggunakan FT-IR dan LC-MS. Penelitian Mawaddah (2019) dalam hasil FT-IRnya menghasilkan serapan berupa gugus O-H, C=O dan golongan metil

seperti C-H, C-C, C=C, =C-H dan dimetil geminal ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ). Perbedaan hasil spektrum dimungkinkan karena perbedaan konsentrasi yang digunakan saat menguji sampel pada FT-IR. Hasil spektrum pada penelitian ini memiliki nilai transmittan yang rendah (dilihat pada Gambar 4.9). Nilai transmittan yang rendah dapat mengakibatkan munculnya *noise* yang tinggi sehingga dapat dimungkinkan gugus fungsi yang harusnya muncul akan tumpang tindih dengan *noise* sehingga tidak terlihat dan tidak muncul pada spektrum.

Keberadaan senyawa steroid juga dikuatkan dalam penelitian Khasanah (2018) yang melakukan identifikasi senyawa steroid pada sampel yang sama menggunakan LC-MS/MS yang menyatakan bahwa dalam *Hydrilla verticillata* terkandung senyawa steroid muncul pada puncak tunggal pada retensi waktu 2,190 menit dengan berat molekul 397  $m/z$  yang menunjukkan senyawa  $\beta$ -sitosterol. Berdasarkan serapan-serapan gugus fungsi yang dihasilkan dalam penelitian ini dapat dikorelasikan pada gugus fungsi yang berada pada struktur senyawa steroid yang dapat dilihat pada Gambar 4.10. Adapun isolat etil asetat juga dilakukan identifikasi menggunakan FT-IR yang dapat ditampilkan pada Gambar 4.11 dan interpretasinya dirangkum pada Tabel 4.5.



Gambar 4.10 Struktur  $\beta$ -sitosterol



Gambar 4.11 Spektrum hasil FT-IR isolat etil asetat

Tabel 4.5 Interpretasi spektra FT-IR isolat etil asetat

Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Range Pustaka (Socrates, 1994)	Jenis vibrasi	Intensitas
2983,7	2995-2955	C-H <i>sp</i> <sup>3</sup> asimetris pada O-CH <sub>3</sub> <i>stretching</i>	Sedang
1735,1	1740-1725	C=O <i>stretching</i> ( <i>exocyclic double bond</i> )	Kuat
1448,1	1475-1445	C-C pada CH <sub>2</sub> <i>bending</i>	Sedang
1373,5	1395-1365	Dimetil geminal (CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> )	Kuat
1233,7	1250-1230	C-O-C(ester)	Kuat
1097,7	1100-1040	-CH <sub>2</sub> - <i>bending</i>	Sedang
1043,7			Kuat
937,4	995-650	-CH=CH <sub>2</sub>	Sedang
848,0			
788,3			

Spektrum yang dihasilkan isolat etil asetat ditunjukkan dalam Gambar 4.5 dan Tabel 4.5 menunjukkan adanya berbagai macam gugus fungsi dalam suatu senyawa. Gugus fungsi yang dihasilkan pada isolat etil asetat sedikit berbeda dengan isolat petroleum eter, pada isolat etil asetat muncul gugus fungsi sedikit lebih banyak. Gugus fungsi tersebut berupa C=O, C=O, -CH=CH<sub>2</sub> dan golongan metil seperti C-H, C-C, dan dimetil geminal (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). Kemunculan gugus-gugus

fungsi maupun hasil spektrum tersebut juga berbeda dengan penelitian Wati (2020) yang melakukan identifikasi senyawa steroid pada *Hydrilla verticillata* isolat steroid menggunakan FT-IR menghasilkan gugus fungsi berupa O-H, C=O, golongan metil seperti C-H, C-C, C=C, =C-H dan dimetil geminal (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

Spektra FT-IR pada isolat petroleum eter dan etil asetat menghasilkan pola berbeda yang ditampilkan pada Gambar 4.10 dan 4.11. Hal tersebut mengindikasikan bahwa senyawa yang dihasilkan pada kedua isolat berbeda, meskipun ada beberapa spektrum yang muncul pada posisi-posisi puncak yang sama. Salah satu indikasi yang menyatakan bahwa senyawa yang didapatkan pada kedua isolat berbeda terletak pada spektrum yang muncul pada bilangan gelombang sekitar 1700 cm<sup>-1</sup>. Isolat etil asetat diduga mengandung gugus fungsi berupa ester yang dikuatkan dengan munculnya spektrum pada bilangan gelombang 1735,1 cm<sup>-1</sup> dengan intensitas yang kuat yang menunjukkan gugus C=O, dan gugus C-O pada bilangan gelombang 1233,7 cm<sup>-1</sup>. Analisis spektrum tersebut sesuai dengan Dachriyanus (2004) yang menganalisis hasil spektrum FT-IR yang mengandung gugus ester dengan menyatakan bahwa absorpsi dari gugus O-H hilang sedangkan absorpsi untuk ikatan C-H berada pada daerah dibawah 3000 cm<sup>-1</sup> dan terlihat adanya spektrum pada daerah 1740 cm<sup>-1</sup> dan 1230-1250 cm<sup>-1</sup> dengan intensitas kuat yang menunjukkan adanya serapan C=O dan C-O. Hasil dari penelitian ini sesuai dengan Dachriyanus (2004) yang ditunjukkan dengan pola spektrum isolat etil asetat pada daerah 2900 cm<sup>-1</sup> yang sama dengan bilangan gelombang pada C-H berada dibawah 3000 cm<sup>-1</sup> yaitu 2983,7 cm<sup>-1</sup> dan adanya kemunculan gugus C=O dan C-O. Bilangan gelombang pada daerah 1735,1 dan 1233,7 cm<sup>-1</sup> tidak dipunyai oleh hasil spektrum isolat petroleum eter.

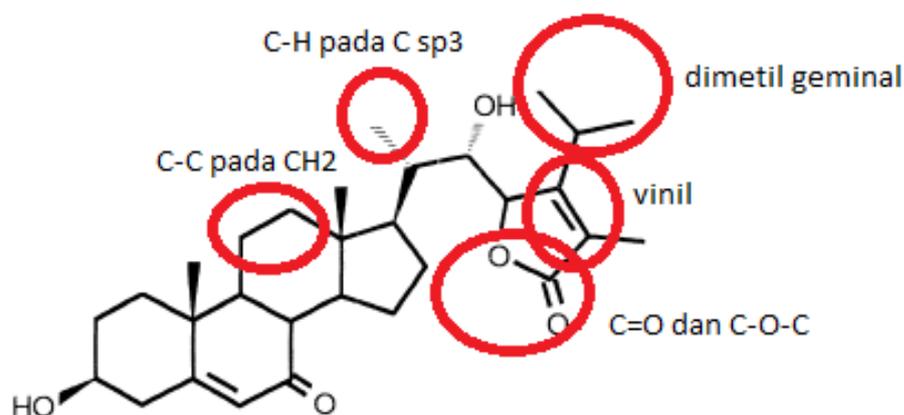
Hasil spektrum isolat etil asetat pada bilangan gelombang sekitar  $2900\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan pola berbeda dengan nilai intensitas yang lebih lemah dibandingkan spektrum isolat petroleum eter. Spektrum yang dihasilkan pada daerah bilangan gelombang sekitar  $2900\text{ cm}^{-1}$  pada kedua isolat menunjukkan gugus yang sama yaitu gugus C-H. Namun pola spektrum yang dihasilkan berbeda. Hal tersebut dikarenakan adanya pengaruh gugus lain yang berdekatan dengan gugus C-H yang dapat mempengaruhi vibrasi C-H pada etil asetat dan petroleum eter. Menurut penjelasan Socrates (1980) vibrasi C-H simetris sangat sensitif apabila berdekatan dengan gugus yang lebih polar atau gugus lain sehingga vibrasi peregangan simetris terbagi menjadi dua bagian yang ditampilkan pada pola spektrum. Sedangkan vibrasi C-H asimetris relatif tidak sensitif sehingga tidak merubah peregangan asimetris. Dalam penelitian ini isolat petroleum eter menunjukkan adanya vibrasi C-H simetris sehingga peregangan bersifat sensitif yang mengakibatkan vibrasi peregangan terbagi menjadi 2 yang ditunjukkan dengan munculnya spektrum ganda pada bilangan gelombang  $2967\text{-}2920\text{ cm}^{-1}$  dan  $2875\text{-}2853\text{ cm}^{-1}$ . Sedangkan pada isolat etil asetat hanya menunjukkan vibrasi C-H asimetris sehingga apabila berdekatan dengan gugus lain atau gugus yang lebih polar tidak terjadi vibrasi lain yang ditunjukkan dengan adanya spektrum tunggal pada bilangan gelombang  $2983,7\text{ cm}^{-1}$ .

Indikasi lain yang menyatakan perbedaan senyawa pada kedua isolat ditunjukkan dengan spektrum pada bilangan gelombang sekitar  $1200\text{ cm}^{-1}$ . Pada isolat etil asetat spektrum pada daerah sekitar  $1200\text{ cm}^{-1}$  muncul spektrum dengan intensitas kuat pada bilangan gelombang  $1233,7\text{ cm}^{-1}$ . Sedangkan pada isolat petroleum eter muncul spektrum dengan intensitas yang sangat lemah pada

bilangan gelombang  $1261,7 \text{ cm}^{-1}$ . Perbedaan pola dan bilangan gelombang yang muncul tersebut menandakan gugus yang dihasilkan pada keduanya berbeda. Bilangan gelombang  $1233,7 \text{ cm}^{-1}$  pada isolat etil asetat menunjukkan gugus C-O-C (ester), sedangkan pada isolat petroleum eter dengan bilangan gelombang  $1261,7 \text{ cm}^{-1}$  menunjukkan -C- (kuartener). Kemudian muncul spektrum pada isolat etil asetat sekitar daerah  $900\text{-}700 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya gugus vinil pada bilangan gelombang  $937,4\text{-}788,3 \text{ cm}^{-1}$  sedangkan pada isolat petroleum eter tidak. Hal tersebut menandakan bahwa gugus fungsi yang muncul berbeda dan senyawa yang ada pada kedua isolat jelas berbeda. Namun, ada beberapa spektrum yang muncul dengan pola yang sama pada isolat etil asetat maupun petroleum eter. Spektrum tersebut ditunjukkan pada bilangan gelombang  $1448,1, 1373,5$  dan  $1097,7 \text{ cm}^{-1}$  pada isolat etil asetat, sedangkan pada isolat petroleum eter ditunjukkan pada bilangan gelombang  $1463,0, 1379,1$  dan  $1099,6 \text{ cm}^{-1}$ , pada bilangan gelombang tersebut menunjukkan adanya gugus fungsi C-C bervibrasi *bending*, dimetil geminal ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ) dan  $\text{CH}_2$  *bending*.

Kemunculan *noise* pada spektrum isolat petroleum eter dan etil asetat juga berbeda, *noise* yang muncul pada isolat petroleum eter sangat tinggi karena memiliki nilai transmitan yang rendah sedangkan *noise* pada isolat etil asetat sangat rendah karena nilai transmitannya tinggi, *noise* yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan tumpang tindih dengan spektrum lain. Kedua spektrum muncul gugus yang menjadi ciri khas senyawa steroid menurut Madjid, dkk. (2020) berupa gugus dimetil geminal yang muncul pada bilangan gelombang  $1396\text{-}1365 \text{ cm}^{-1}$ , dalam penelitian ini gugus dimetil geminal muncul pada serapan  $1373,5 \text{ cm}^{-1}$  dengan intensitas yang kuat pada isolat etil asetat, sedangkan pada isolat petroleum

eter muncul pada bilangan gelombang  $1379,1 \text{ cm}^{-1}$ . Berdasarkan serapan-serapan gugus fungsi yang dihasilkan dalam isolat etil asetat dapat dikolerasikan pada gugus fungsi senyawa steroid yang dapat dilihat pada Gambar 4.12.



Gambar 4.12 Struktur artemidiol

#### 4.9 Larva Udang Hasil Penetasan untuk Uji Toksisitas

Penetasan kista menggunakan media air laut bertujuan agar kista mengalami hidrasi sehingga terjadi perkembangan *embryonal* dalam kista. Penggunaan aerator juga perlu untuk memberikan oksigen pada perkembangan *embryonal* dan untuk mencegah terjadinya pengendapan didasar akuarium. Pengendapan kista ditimbulkan akibat adanya kondisi anaerob yang membuat perkembangan *embryonal* terhambat. Dalam penetasan larva udang *Artemia salina* Lench juga dibantu cahaya yang bertujuan untuk merangsang pengaktifan kembali *embryonal*. Larva yang sudah menetas dengan umur 48 jam yang digunakan dalam uji toksisitas berbentuk naupli aktif. Fase tersebut sudah terbentuk organ-organ yang lengkap dan paling sensitif digunakan sebagai hewan uji menurut Panggabean (1984).

#### 4.10 Toksisitas Hasil Isolat Steroid

Uji toksisitas metode BSLT menggunakan *Artemia salina* Lench merupakan uji pendahuluan untuk mengetahui adanya bioaktivitas dari suatu sampel. Sampel yang diuji pada penelitian ini berupa isolat steroid dari hasil kromatografi kolom fraksi petroleum eter dan etil asetat. Kontrol yang digunakan dalam uji toksisitas berupa kontrol tanpa isolat, pelarut dan DMSO. Tujuan adanya kontrol adalah untuk mengetahui pengaruh kematian larva selain isolat. DMSO berperan sebagai surfaktan dalam uji toksisitas. Hal ini dikarenakan senyawa uji yang berupa steroid memiliki sifat kepolaran yang berbeda dengan air laut. Senyawa steroid bersifat non polar sedangkan air laut bersifat polar sehingga untuk melarutkan senyawa steroid dalam air laut dibutuhkan surfaktan. Hasil uji toksisitas pada penelitian ini dirangkum pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Hasil uji toksisitas isolat petroleum eter dan etil asetat

Konsentrasi (ppm)	Isolat Petroleum eter	Isolat Etil asetat
	Mortalitas	Mortalitas
0*	0	0
0**	0	0
0	0	0
1	0	0
2	0	1
3	1	1
4	1	2
5	1	2

Keterangan: 0 adalah kontrol tanpa isolat  
 0\* adalah kontrol pelarut  
 0\*\* adalah kontrol DMSO

Hasil uji toksisitas senyawa steroid pada Tabel 4.6 menunjukkan bahwa kematian larva udang tidak dipengaruhi oleh pelarut dan penambahan DMSO. Hal tersebut dapat dilihat dari nilai mortalitas masing-masing kontrol adalah nol. Pada

Tabel 4.6 juga menunjukkan adanya peningkatan larva yang mati (mortalitas) dengan bertambahnya konsentrasi. Penentuan nilai  $LC_{50}$  juga dapat dilakukan dengan analisis probit pada Minitab17. Nilai  $LC_{50}$  dirangkum pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Nilai  $LC_{50}$  isolat petroleum eter dan etil asetat

Sampel Uji	Nilai $LC_{50}$ (ppm)
Isolat petroleum eter	14,288
Isolat etil asetat	11,729

Berdasarkan nilai  $LC_{50}$  yang ditunjukkan pada Tabel 4.7 isolat petroleum eter dan etil asetat memiliki potensi sebagai antitumor dan antikanker, karena memiliki nilai  $LC_{50} < 30$  ppm (ditunjukkan dalam Tabel 2.2). Nilai  $LC_{50}$  yang didapatkan berada pada *range* sangat toksik menurut McLaunglin (1991), padahal mortalitas kematian larva udang tidak sampai 50%, melainkan sekitar 10-20%. Hal tersebut diakibatkan karena konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini terlalu rendah yaitu 1-5 ppm. Apabila konsentrasi yang digunakan lebih tinggi dimungkinkan mortalitas kematian larva udang mencapai 50% dan nilai  $LC_{50}$  yang didapatkan berada pada *range* konsentrasi yang ditentukan.

Hasil penelitian ini menunjukkan potensi yang sama dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Wati (2020) yang melakukan uji toksisitas isolat petroleum eter dan etil asetat tumbuhan *Hydrilla verticillata*. Namun, dalam penelitian Wati (2020) nilai  $LC_{50}$  yang didapatkan menunjukkan isolat petroleum eter lebih kecil dari pada etil asetat, sedangkan nilai  $LC_{50}$  yang dihasilkan dalam penelitian ini isolat petroleum eter lebih besar dari pada isolat etil asetat, yang artinya dalam penelitian ini isolat etil asetat lebih toksik dari pada isolat petroleum eter. Hal tersebut dikarenakan adanya perbedaan jenis senyawa steroid masing-

masing isolat. Perbedaan jenis steroid ditandai dengan perbedaan pola spektrum yang dihasilkan pada kedua isolat dan gugus fungsi yang muncul pada bilangan gelombang yang berbeda. Senyawa yang dihasilkan dalam isolat etil asetat diduga senyawa steroid dengan substitusi gugus ester, senyawa tersebut diduga jenis steroid anteridiol. Dugaan tersebut berdasarkan atas hasil analisis FT-IR dengan munculnya spektrum yang kuat pada bilangan gelombang 1735,1 dan 1233,7  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan gugus C=O dan C-O-C pada isolat etil asetat, sedangkan pada isolat petroleum eter tidak muncul serapan.

Potensi antikanker dan antitumor dalam penelitian Rimpelova, dkk. (2021) menyatakan bahwa selain gugus sakarida, substituen pada kerangka steroid *Cardiac glycosides* berupa gugus karbonil dan hidroksil secara signifikan juga mempengaruhi penghambatan interaksi  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{-ATPase}$  (NKA) yang dapat mengakibatkan kematian meningkat, adanya gugus karbonil dalam senyawa akan mengakibatkan meningkatnya kematian larva sekitar 150 kali lipat. Namun tidak hanya itu, kemampuan penghambat interaksi  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{-ATPase}$  (NKA) juga tergantung pada modifikasi struktur serta posisi konformasinya. Sehingga dapat disimpulkan bahwa tingkat ketoksikan suatu senyawa steroid tergantung pada struktur dan posisi yang dimilikinya. Namun, uji toksisitas dalam penelitian ini merupakan uji awal yang digunakan untuk mengetahui berpotensi atau tidaknya suatu senyawa sebagai bioaktivitas antikanker dan antitumor, sehingga perlu dilakukan uji lanjutan.

Menurut Raharjo, dkk. (2015) senyawa steroid bertindak sebagai *Stomach poisoning* atau racun perut yang mengganggu alat pencernaan larva apabila masuk ke dalam tubuh larva. Selain itu juga bertindak sebagai penghambat reseptor yang

mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus. Mekanisme kematian udang menurut Sumihe, dkk. (2014) disebabkan tingginya metabolit sekunder dalam lingkungan sel. pemasukan ion  $\text{Na}^+$  yang tidak terkendali dalam sel menyebabkan pecahnya membran sel. Hal tersebut dikarenakan adanya gugus hidroksil pada metabolit sekunder berikatan dengan protein integral membran sehingga terbendungnya transport aktif  $\text{Na}^+$  dan  $\text{K}^+$ . *Transport* aktif yang terbendung menyebabkan pemasukan ion  $\text{Na}^+$  yang tidak terkendali dalam sel sehingga menyebabkan pecahnya membran yang berakibat kematian sel.

#### 4.11 Pemanfaatan *Hydrilla verticillata* dalam Islam

Allah SWT telah menunjukkan kekuasaan dan keagungan-Nya dengan menurunkan Al-qur'an kepada Nabi Muhammad SAW melalui malaikat jibril. Segala bentuk kekuasaan dan keagungan Allah SWT ditunjukkan dengan diciptakannya segala sesuatu di bumi tidak ada yang sia-sia, melainkan ada kemanfaatannya. Hal tersebut dibuktikan dalam firman Allah SWT dalam surah Ali Imran ayat 190-191:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ۚ  
 الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمُوتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ  
 هَذَا بَطْلًا 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 SWT sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): “Ya Tuhan kami, tidaklah engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka”*

Berdasarkan ayat diatas Syekh imam Al-Qurthubi dalam kitab tafsirannya menyatakan bahwa Allah SWT memerintahkan kepada manusia untuk selalu melihat, merenung (berdzikir) dalam keadaan apapun atas kebesaran Allah SWT yang telah menciptakan langit dan bumi dengan segala isinya tanpa ada yang sia-sia. Ayat tersebut membuktikan dengan ditumbuhkannya tumbuhan air berupa *Hydrilla verticillata* yang dianggap sebagai gulma air dan hanya memiliki manfaat sebagai makanan ikan oleh masyarakat, ternyata memiliki manfaat yang besar dibidang kesehatan salah satunya menghambat pertumbuhan sel kanker karena adanya metabolit sekunder di dalamnya, sehingga berpotensi untuk dijadikan sebagai obat. Nabi Muhammad SAW bersabda:

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ، فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ

Artinya:

“Setiap penyakit ada obatnya. Apabila ditemukan obat yang tepat untuk penyakit, maka akan sembuh dengan izin Allah” (HR. Muslim).

Berdasarkan hadist tersebut menjelaskan bahwa segala jenis penyakit ada obatnya dan Allah Swt. akan menyembuhkan suatu penyakit dengan adanya doa dan usaha. Salah satu usaha yang dilakukan adalah dengan mencari obat yang cocok untuk menyembuhkan penyakit dengan dilakukannya sebuah penelitian oleh para ilmuwan. Penelitian ini juga merupakan suatu bentuk usaha untuk mengetahui potensi metabolit sekunder yang berupa senyawa steroid dalam *Hydrilla verticillata*. Uji awal toksisitas dengan menggunakan metode BSLT menunjukkan bahwa isolat steroid dari hasil kromatografi kolom faraksi petroleum eter dan etil aasetat berpotensi sebagai antikanker atau antitumor yang ditunjukkan dalam nilai LC<sub>50</sub> nya kurang dari 30 ppm yaitu sebesar 14,288 dan 11,729 ppm.

## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1 Kesimpulan**

- a). Hasil uji fitokimia menunjukkan adanya senyawa steroid dengan terbentuknya cincin hijau pada larutan, dan dengan didukung hasil identifikasi menggunakan FT-IR menunjukkan adanya gugus fungsi berupa C-H, -CH<sub>2</sub>-, C-C, (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), -C- (kuartener) untuk isolat petroleum eter sedangkan untuk isolat etil asetat berupa C-H, C=O, -CH<sub>2</sub>-, C-C, (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), C-O, H-C=C-H.
- b). Hasil uji toksisitas senyawa steroid *Hydrilla verticillata* fraksi etil asetat dan fraksi petroleum eter dalam metode partisi bertingkat hasil kromatografi kolom gradien eluen terhadap udang *Artemmia salina Leach* menunjukkan nilai LC<sub>50</sub> sebesar 14,288 ppm untuk isolat petroleum eter dan 11,729 ppm untuk isolat etil asetat yang berpotensi sebagai antitumor dan antikanker berdasarkan McLaughlin (1991).

#### **5.2 Saran**

Proses ekstraksi dapat dilakukan dengan metode sonikasi untuk mengefisiensi waktu dan identifikasi dapat dilakukan lebih spesifik seperti LC-MS/MS. Selain itu, konsentrasi yang digunakan pada uji toksisitas dibuat lebih tinggi lagi minimal sesuai dengan nilai LC<sub>50</sub> yang didapatkan pada penelitian ini agar mendapatkan nilai LC<sub>50</sub> yang sesuai

## DAFTAR PUSTAKA

- Adhiatama, I., Zainudin, M., Rokhati, N. 2012. Hidrolisis Kitosan menggunakan Katalis Asam Klorida. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*, 1 (1): 245 – 251.
- Afif, Sholeh A., Fasya, A. Ghanaim., Ningsih, Rachmawati. 2015. Extraction, Toxicity Assay and Identification of Active Compounds of Red Algae (*Eucheuma cottonii*) from Sumenep Madura. *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, 4(2): 101-106.
- Amalia, Suci., Fasya, A. Ghanaim., Hasanah, Faiqatul., Yuliani, Dewi. 2018. Pemisahan Senyawa Aktif Fraksi Petroleum Eter dan Etil Asetat Hasil Hidrolisis Ekstrak Etanol *Hydrilla verticillata* dari Ranu Grati Pasuruan. *ALCHEMY: Journal Of Chemistry*, 6(2): 50-56.
- Anggraini, D.I., L. H. Nabillah. 2018. Activiyty Test Of Suji Leaf Extract (*Dracaena angustifolia* Roxb.) On In Vitro Cholesterol Lowering. *Journal Of Scientific And Applied Chemistry*, 21 (22): 54-58.
- Aisyah T.S., A. Asnani. 2012. Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum*) Menggunakan Berbagai Pelarut Dan Metode Ekstraksi. *Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut*, 6 (1) : 22.
- Anggraeni, N. O., Fasya, A. Ghanaim., Munirul, Abidin., Hanapi, Ahmad. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, Dan N-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* *ALCHEMY: Journal Of Chemistry*, 3(2): 173-188.
- Artati, Kriswiyanti E., Wulandari, F., Sukma, Nalendra Risky. 2013. Pengaruh Konsentrasi Katalis Asam Dan Kecepatan Pengadukan Pada Hidrolisis Selulosa Dari Ampas Batang Sorgum Manis. *Ekulilibrium*, 12(1): 17-22.
- Atun, S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Konservasi Cagar Budaya Borobudur*, 8(2): 53 – 61.
- Annie SW., Raveen R., Paulraj MG., Samuel T., Arivoli S. 2016. Screening of *Hydrilla verticillata* (L. F.) Royle (Hydrocharitaceae) crude leaf extracts for larvicidal efficacy against the filarial vector *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). *International Journal of Entomology Research*, 1(3): 43-48.
- Ansel, H.C. 1984. Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi. Edisi keempat. Jakarta: UI Press.
- Ardyanti, Trisna Novy Komang N., Suhendra L., Putra Ganda G. P. 2020. Pengaruh Ukuran Partikel dan Lama Maserasi Terhadap Karakteristik Ekstrak *Virgin Coconut Oil* Wortel (*Daucus carota* L.) sebagai Pewarna Alami. *Jurnal*

*Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, 8(3): 423-434.

- Azizah, L.N. 2016. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kltp Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma Spinosum*). *Skripsi*. Malang: Uin Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Baderos, A. 2017. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma Cottonii*) Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis Dan Identifikasi Menggunakan LC-MS. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Babayi, H., Kolo, I., Ogokun, J.I., Ijah, U.J.J. 2004. The Antimicrobial Activities Of Metanolic Extract Of *Eucalyptus camaldulensis* And *Terminalia catappa* Against Some Pathogenic Microorganism. *An International Journal Nigeria Society For Experimental Biology*, 6(2): 106-111.
- Byu, K., V. Anuradha., Emilda R., N. C. Kumar., S. M. Nair. 2013. Chemical Characterization Of The Lipophilic Extract Of *Hydrilla Verticillata*: A Widely Spread Aquatic Weed. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 22 (3): 304-311.
- Cahyono, A.B. 2004. *Keselamatan kerja bahan kimia di industri*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press
- Dachriyanus. 2004. Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi. Sumatera Barat: Lembaga pengembangan teknologi informasi dan komunikasi (LPTIK) Universitas Andalas.
- Desianti, N. 2014. Uji toksisitas dan identifikasi golongan senyawa aktif fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter, dan n-heksana hasil hidrolisis ekstrak metanol mikro alga *Chlorella* sp. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Dhingra, N., T.R. Bhardwaj, N. Metha, T. Mukopadhyay, A. Kumar, dan M. Kumar. 2010. Synthesis, antiproliferative, acute toxicity and assessment of antiandrogenic activities of some newly synthesized steroidal lactams. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45: 2229-2236.
- Dinan L., Harmatha, Juraj., Rene, Lafont. 2001. Cromatographic Prosedures for the Isolation of Plant Steroids. *Journal Of Chromatography A*, 935: 105-123.
- Djeridjane A., M. Yousfi, J.M. Brunel, P. Stocker. 2010. Isolation and Characterization Of A New Steroid Derivative As A Powerful Antioxidant From Cleome Arabic In Screening The In Vitro Antioxidant Capacity Of 18 Algaria Medicial Plant. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 2599-2606.

- Fachriyah, E., Dewi K., dan W. W. Hidayah. 2016. Isolasi, Identifikasi Senyawa Steroid dari Daun Getih-Getihan (*Rivina humilis* L.) dan Uji Aktivitas sebagai Antibakteri. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi* 19 (1): 32 – 37.
- Fariyah. 2008. Uji toksisitas ekstrak daun *ficus benjamina* I. terhadap *artemia salina leach* dan profil kromatografi lapis tipis. *Skripsi*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Fasya, A. Ghanaim., A. R. Dinasti, M. Shofiyah, L. M. Rahmawati, N. Millati, dan D. A. Safitri, S. Handoko, A. Hanapi, & R. Ningsih. 2016. Ekstraksi, Hidrolisis dan Partisi Metabolit Sekunder dari mikroalga *Chorella* sp. *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, 5(1): 5-9.
- Fasya A. Ghanaim., Purwantoro, Bagas., Ulya, Lulu'atul Hamidatu., dan M. Ahmad. 2020. Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis dari Fraksi n-Heksana *Hydrilla verticillata*. *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, 8 (1): 23-34.
- Fatimah, Fitri. 2020. Uji Toksisitas Senyawa Steroid Hasil Kromatografi Kolom Basah Fraksi n-Butanol Ekstrak Metanol Alga Merah *Euclima cottonii* dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *Skripsi*. Malang: Universitas Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Fernandez, V.P., Rocca, L.M., Tomai, P., Fanali, S., dan Gentili, A. 2017. Recent advancements and future trends in environmental analysis: Sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 983: 9-41.
- Fuad T. Muhammad. 2013. Efektivitas Kombinasi *Salvinia molesta* Dengan *Hydrilla verticillata* Dalam Remediasi Logam Cu Pada Limbah Elektroplating. *Jurnal Sains Dan Seni Pomits*, 2 (1): 2337-3520.
- Groggins. P. H., 1958. *Unit Process In Organic Synthesis*. New York: Mc Graw Hill Book Company.
- Habibah, H. Adi, T.K., Fauziyah, B., Fitriyaningsih, A.A.. 2012. Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Alga Merah *Euclima spinosum* Pantai Lobuk Madura terhadap Larva Udang *Artemia Salina Leach*. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Hala, Yusafir. 2012. Biosorpsi Campuran Logam  $Pb^{2+}$  dan  $Zn^{2+}$  oleh *Chaetoceros calcitrans*. *Chem Prog*, 5(2): 86-98.
- Hullatti, K., Pathade N., Mandavkar Y., Godavarthi A., Biradi M. 2013. Bioactivity-Guided Isolation Of Cytotoxic Constituents From Three Medicinal Plant. *Pharm Boil*. 51 : 601-606.

- Hafiz, Nur, M. 2017. Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Metanol, Kloroform dan N-Heksana *Hydrilla verticillata* (L.F) Royle Dari Danau Ranu Kab. Pasuruan terhadap larva udang *artemia salina leach*. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ikfi, S. 2017. Uji Antoksidan Ekstrak Kasar Metanol, Kloroform Dan N-Heksana *Hydrilla verticillata* (L.F) Royle Dari Danau Ranu Kab. Pasuruan Menggunakan Metode Difenil Hidrazil (DPPH). *Skripsi*. Malang: Universitas islam negeri maulana malik Ibrahim malang.
- Idirawati, N., Natia Afriani, Andi Hairil Alimudin. 2016. Skrining Fitokimia Dan Uji Toksisitas Ekstrak Akar Mentawa (*Artocarpus*) Terhadap Larva *Artemia salina*. *JKK*, 5(1): 58-64.
- Karan K. S., S. K. Mishra, Dilipkumar P., dan A. Mondal. 2012. Isolation of  $\beta$ -sitosterol and evaluation of antidiabetic activity of *Aristolochia indica* in alloxan-induced diabetic mice with a reference to *in-vitro* antioxidant activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(7): 1219-1223.
- Khopkar, S. M. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Khasanah, N. F. 2018. Uji Toksisitas Senyawa Aktif Fraksi N-Heksana, Kloroform, Dan N-Butanol *Hydrilla verticillata* Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Dari Perairan Danau Ranu Pasuruan. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Kristianti, P. A. 2008. Isolasi dan identifikasi glikosida saponin pada herba krokor (*Portulaca oleracea* L.). *Skripsi*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.
- Kurniawati, N., dan Taty Sulastry. 2010 Isolasi Steroid dari Ekstrak Metanol daun Bluntas (*Plucea Indica* L) Isolation of steroids from Methanol Extracts of Bluntas leaves (*Plucea Indica* L). *Jurnal Chemica*, 11: 52 – 56.
- Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoida, Fenilpropanoida dan Alkaloida. *Usu Repository*, 1–25.
- Langeland, K.A. 1996. *Hydrilla* : The Perfect Aquatic Weed. *Center for Aquatic and Invasitive Plants*. 61: 293-304.
- Luki, C.E. 2018. Pemisahan Steroid Fraksi Etil Asetat Makroalga *Euचेuma Cottonii* Menggunakan Kromatografi Kolom Gradien Eluen Secara Eksperimen Dan Studi *In Silico* Serta Uji Antioksidannya. *Skripsi*, Malang: Uin Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Masroh, L. F. 2010. Isolasi Senyawa Aktif Dan Uji Toksisitas Ekstrak Heksana Daun Pecut Kuda (*Stachytharpheta Jamaicensis* L Vahl). *Skripsi*. Malang : Uin Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Madjid A. D. R., Dwi Anik Rahmawati, A.Ghanaim Fasya. 2020. Variasi Komposisi Eluen pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* dengan Kromatografi Kolom Basah. *ALCHEMY: Journal Of Chemistry*, 8(1): 35-40.
- Mawaddah. 2019. Uji Toksisitas Isolate Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi N-Heksana *Hydrilla verticillata*. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Mamahit, L. 2009. Satu Senyawa Steroid Dari Daun Gedi (*Abelmoschus manihot* L. Medik) Adal Sulawesi Utara. *Jurnal Teknologi Pertanian Universitas Sam Ratulangi*, 2(1): 33-38.
- Manik, Yuliana., Fachriyah E., Kusriani D. 2013. Isolasi, Identifikasi dan Uji Sitotoksik Senyawa Steroid Dari Daun Binahong (*Anredera Cordifolia* (Ten.) Stennis). *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 16(1): 23-26.
- Mardaneni. 2017. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid Alga Merah (*Eucheuma cottoni*) Fraksi Etil Asetat Perairan Wongsorejo-Banyuwangi dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan LC-MS/MS. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Misfadhila, Sestry., Candra Boy., Wahyuni, Yully. 2020. Pengaruh Fraksi Air, Etil Asetat, Dan N-Heksan Dari Ekstraketanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) Terhadap Kelarutan Kalsium Batu Ginjal Secara In Vitro. *Jurnal Farmasihigea*, 12(2): 115-123.
- Meyer, B. N, Ferrigni, N. R, Putnam, J. E, Jacobsen, L. B, Nichols, dan D. E. McLaughlin, J. L. 2009. A Comparative Study On Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of Root of *Alstonia Scholaris* With The Roots, Leaves and Stea, Bark. *Phytochem. Pharmacol*, 1 (2): 77-82.
- Mulya, P. M., Damris M., Anis Tatik M. 2020. Pemanfaatan Tumbuhan Air (*Hydrilla verticillata*) dalam Meningkatkan Karakteristik Limbah Cair Tahu Dengan Metode Biofiltrasi. *Jurnal Pembangunan Berkelanjutan*, 3(1): 1-10.
- Noviyanti, L. 2010. Modifikasi Teknik Kromatografi Kolom untuk Pemisahan Trigliserida dari Ekstrak Buah Merah (*Pandanus conoideus Lamk*). *Skripsi*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Ningsih, R., Fasya , A. Ghanaim., A.P Tyas., F. A. Mubarakah., A. D. R Madjid. 2018. Variasi Diameter Kolom dan Rasio Sampel-Silika pada isolasi steroid dan triterpenoid alga merah *Eucheuma cottoni* dengan kromatografi kolom Basah. *ALCHEMY: Journal Of Chemistry*, 6(2): 57-64.
- Nihlati, I., Abdul, R., dan Triana, H. 2008. Daya Antioksidan Ekstrak Etanol

Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata (roxb) Schlecth*) dengan Metode Penangkapan Radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). *Skripsi* diterbitkan. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.

Neelamegum R., V. M. Kensa. 2016. GC-MS Determination of Bioactive Constituents Of *Hydrilla Verticillata* (L.f.) Royle. Collected From Unpolluted Dan Polluted Water Sources. *Asian Journal Biology*, 1(1) : 1-6.

Okomoda, T. V., Shola, G. S., Ataguba, A. G., Ayuba, O. V., Asuwaju, F. P. 2013. Acute Toxicity In Aquaculture: A Review. *Banat's Journal Of Biotechnology*, 4(8): 59-64.

Oscik, J. 1982. *Adsorption*. New York. John Wiley dan Sons.

Pal, D. K., dan Nimse, S.B. 2006. *Little know uses of common aquatic plant, Hydrilla verticillata (Linn. F.) Royle*.

Pennington, Judith C. 1985. *Biological Control Of Hydrilla verticillata (L.f.) Royle With Lytic Enzyme-Producing Microorganisms*. Department Of The Army: Waterways Experiment Station.

Phukan, Phukan, R., dan Phukan,. S.N. 2015. Heavy metal uptake capacity of *Hydrilla verticillata*: A commonly available Aquatic Plant. *International Research Journal Of Environment Science*, 4 (3): 2319-1414.

Prabha, S, P., dan Rajkumar, J. 2015. Research Article Phytochemical screening and bioactive potential of *Hydrilla verticillata*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 7(3): 1809–1815.

Pramitania, A. V. 2019. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi N-Heksana Alga Merah (*Eucheuma Cottonii*) Dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Paramitasari, A., 2014. Kemampuan Tumbuhan Air Kiapu Pistia Stratiotes Dan Kiambang Salvinia Molesta Dalam Fitoremediasi Timbal, Laporan Akhir, Departemen Konservasi Sumberdaya Hutan dan Ekowisata, Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Purwanto, B., Fasya, A.G., Amalia, S., D.S. Megawati., F. Salima., V.A. Kusuma. 2019. Isolation, identification, and bioactivity of steroids isolates from *Hydrilla verticillata* petroleum ether fraction. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*.

Putri, M. E. 2014. Analisis Parameter Optimum Penyerapan Kation Zn (II) Oleh Biomassa *Hydrilla verticillata*. *Widyariset*, 17(3): 373-380.

- Panggabean, Lili G. M. 1984. Teknik Penetasan Dan Pemanenan *Artemia salina*. *Oseana*, 4 (2): 57-65.
- Prasetya, Eka P., Ritaningsih., Purwanto. 2012. Pengambilan Zat Warna Alami Dari Kayu Nangka. *Jurnal Teknologi Kimia Dan Industri*, 1(1): 502-507.
- Qurthubi, Imam. 2008. Tafsir Al Qurthubi. Jakarta: Pustaka
- Raharjo, J. S., Ningsih, W. R. 2015. Aktivitas Sitotoksik Partisi Etil Asetat Ekstrak Petroleum Eter dan Ekstrak Metanol Daun Kayu Apu (*Pistiae Folium*). *Traditional Medicine Journal*, 20(3): 134-139.
- Rahmawati, D.A. 2017. Variasi Komposisi Eluen pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Makroalga (*Eucheuma cottonii*) dengan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim.
- Ramesh, S., Rajan, R., dan Santhanam R. 2014. Freshwater Phytopharmaceutical Compounds. US: CRC Press.
- Rimpelova, S., Zimmermann, T., Drasar, P.B., Dolensky, B.; Bejcek, J., Kmonickova, E., Cihlarova, P., Gurska, S., Kuklíkova, L., Hajduch, M. 2021. Steroid Glycosides Hyrcanoside and Deglucohyrcanoside: On Isolation, Structural Identification, and Anticancer Activity. *Foods*, 10: 1-19.
- Rohman A., dan Ganjar I.G. 2012. *Analisis Obat secara spektrofotometri dan Kromatografi*. Yogyakarta. Pustaka Pelajar (Anggota IKAPI).
- Rudiyansyah. 2013. Steroid dan Ligan dari Kayu Batang *Durio oxleyanus* (Malvaceae). *Valensi*, 3(1): 57-64.
- Sa'adah, L., Elok K. H., Tri Kustono A., 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Tanin dari Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). *Skripsi tidak diterbitkan*. Malang: UIN Malang.
- Sapar, A., Kumanireng, A., Voogd, N.de., dan Noor, A.. 2004. Isolasi dan Penentuan Struktur Metabolit Sekunder Aktif dari Spons *Biemna triraphis* Asal Pulau Kapodasang (Kepulauan Spermonde). *Marina Chimica Acta*, 5(1): 2-5.
- Sastrohamidjojo. 2007. *Kromatografi*. Yogyakarta : UGM Press.
- Socrates, G. 1994. *Infrared Characteristic Group Frequencies Table and Chart Second Edition*. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Shihab, M. Q., 2003. *Tafsiral-Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati.
- Sharo, N.M., Ningsih, R., Nasichuddin, A., dan Hanapi, A. 2013. Uji Toksisitas

Dan Identifikasi Senyawa Ekstrak Alga Merah (*Eucheuma Cottonii*) Terhadap Larva Udang *Artemia Salina Leach*. *ALCHEMY: Journal Of Chemistry*, 2(3): 170-177.

Sholikah, Arieska N L. 2016. Isolasi Senyawa Steroid Dari Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma Spinosum*) Menggunakan Metode Kromatografi Kolom. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

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

Suryelita, S. B. Etika, N. S. Kurnia, 2017. Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Steroid Dari Daun Cemara Natal (*Cupressus funebris* Endl). *Eksakta*, 18(1): 86-94.

Sumihe, G., Runtuwene, J. R. Max., Rorong A. Johnly. 2014. Analisis Fitokimia dan Penentuan Nilai LC<sub>50</sub> Ekstrak Metanol Daun Liwas. *Jurnal Ilmiah Sains*, 14(2): 125-128.

Suryelita. 2000. *Steroid Isolation from Papaya Leaf*. Padang: UNP.

Saleh, C. 2009. Senyawa Steroid Tumbuhan Sidawaya (*Woodfordia floribunda salisb*). *Jurnal Kimia Mulawarman*, 6(2): 1-6.

Sulastri, S., dan S. Kristianingrum. 2010. Berbagai Macam Senyawa Silika : Sintesis, Karakterisasi Dan Pemanfaatan. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian Pendidikan Dan Penerapan MIPA*.

Tapotibun, Marthina Alfonsina. 2018. Komposisi Kimia Rumput Laut Caulerpa lentillifera Dari Perairan Kei Maluku Dengan Metode Pengeringan Berbeda. *Jurnal Pengelolaan Hasil Perikanan Indonesia*, 21(1): 13-23.

Urifah, D., Kusriani, U. Zakiyah, Handaru B.C., Rieke Y. 2017. Adsorpsi Logam Timbal (Pb) Oleh Tanaman Hydrilla (*Hydrilla verticillata*) Lead (Pb) Adsorption By Using *Hydrilla (Hydrilla verticillata)*. *Jurnal Riset Teknologi Industri*, 11(2): 100-108.

Vania, Vera. 2020. Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Etil Asetat dan Petroleum eter hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol *Hydrilla Verticillata*. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Wahyudi, J., Wibowo, W.A., Rais, Y.A., Kusumawardani, dan Atika. 2011. Pengaruh Suhu Terhadap Kadar Glukosa Terbentuk Dan Konstanta Kecepatan Reaksi Pada Hidrolisa Kulit Pisang. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan"*.

- Wati, Vivi S. 2020. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Etil Asetat dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata*. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Wonorahardjo, S. 2013. *Metode-Metode Pemisahan Kimia*. Jakarta: Akademia Permata.
- Wang, T. 2008. *Minor Constituents And Phytochemicals Of Soybean*. Iowa State University: Department Of Food Science And Human Nutrition.
- Yuniwati, M., Ismiyati, D., Kumiasih, R. 2011. Kinetika Reaksi Hidrolisis Pati Pisang Tanduk dengan Katalisator Asam Klorida. *Jurnal Teknologi*, 4 (2): 107-112.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Diagram Alir

#### L.1.1 Preparasi sampel

*Hydrilla Verticillata*

- Diambil di Danau Ranu sebanyak 8 kg
- Dicuci dengan air mengalir
- Dikeringkan dengan cara diangin-anginkan
- Dihaluskan dengan ukuran 100 mesh

Hasil

#### L.1.2 Penentuan kadar air

Gelas porselen

- Dipanaskan pada suhu 100-105°C selama 15 menit di dalam oven
- Dimasukkan dalam desikator selama 10 menit
- Dilakukan penimbangan
- Diulangi sampai konstan

Hasil

- Dimasukkan serbuk *Hydrilla verticillata* sebanyak 1 gram
- Dipanaskan pada suhu 100-105°C selama 15 menit di dalam oven
- Dimasukkan dalam desikator selama 10 menit
- Dilakukan penimbangan
- Diulangi sampai konstan

Hasil

### L.1.3 Ekstraksi menggunakan metode maserasi

Serbuk *Hydrilla Verticillata*

- Ditimbang sebanyak 50 gr
- Dimasukkan ke dalam Erlenmeyer tutup 250 mL
- Ditambahkan 500 mL methanol *p.a*
- Dishaker selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm
- Disaring dengan corong Buchner dan diambil residunya
- Diulangi maserasi menggunakan pelarut yang sama sebanyak 3 kali
- Dicampur ekstrak methanol yang didapat
- Dilakukan evaporasi menggunakan *rotary evaporator vacum* dengan suhu 60°C dan kecepatan putar 30 rpm
- Dialiri gas N<sub>2</sub>

Hasil

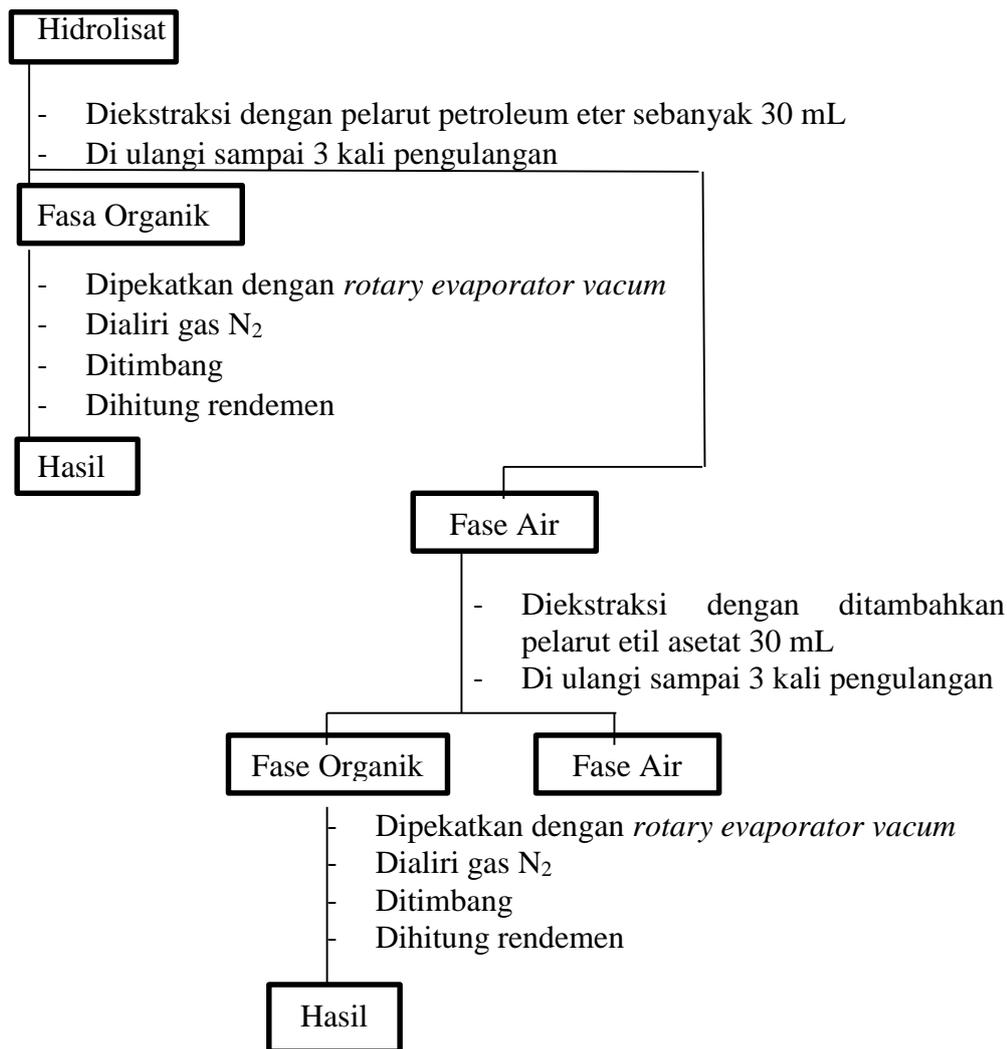
### L.1.4 Hidrolisis ekstrak metanol

Ekstrak methanol

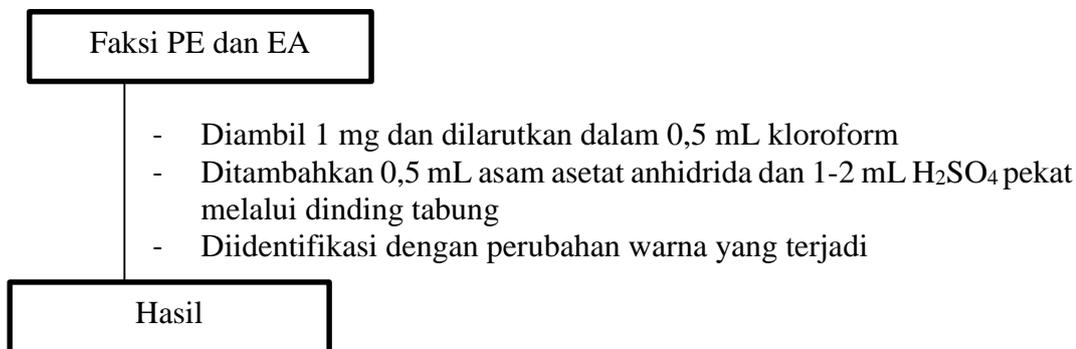
- Diambil 5 gr
- Dimasukkan ke dalam beaker glass 100 mL
- Ditambahkan 10 mL HCl 2 N
- Distirrer dengan *hot plate stirrer* selama 1 jam pada suhu ruang
- Dinetralkan pH-nya dengan NaHCO<sub>3</sub>

Hasil

### L.1.5 Partisi bertingkat



### L.1.6 Uji steroid dengan *Liberman burchard*



### L.1.7 Isolasi senyawa steroid menggunakan kromatografi kolom basah

#### Silika gel

- Dioven selama 1 jam
- Ditambahkan pelarut 19:1 sebanyak 20 ml
- *Distirrer* selama 1 jam
- Dimasukkan *glasswool* kedalam kolom
- Dimasukkan bubuk silika gel kedalam kolom
- Ditambahkan pelarut 19:1
- Dicek silika gel, apabila pecah dilakukan pengocokan kembali
- Didiamkan silika gel selama 24 jam

#### Hasil

#### Fraksi

- Ditimbang sebanyak 0,067 gram
- Ditambahkan pelarut 19:1 sebanyak 1 ml
- Dielusi eluen hingga tanda batas yang telah ditentukan
- Ditambahkan sampel yang sudah dilarutkan dalam pelarut
- Ditambahkan eluen 19:1
- Ditampung eluet sebanyak 2 ml/menit
- Ditambahkan pelarut kembali dengan perbandingan 18:2 dan 17:3
- Didiamkan silika gel selama 24 jam

#### Hasil

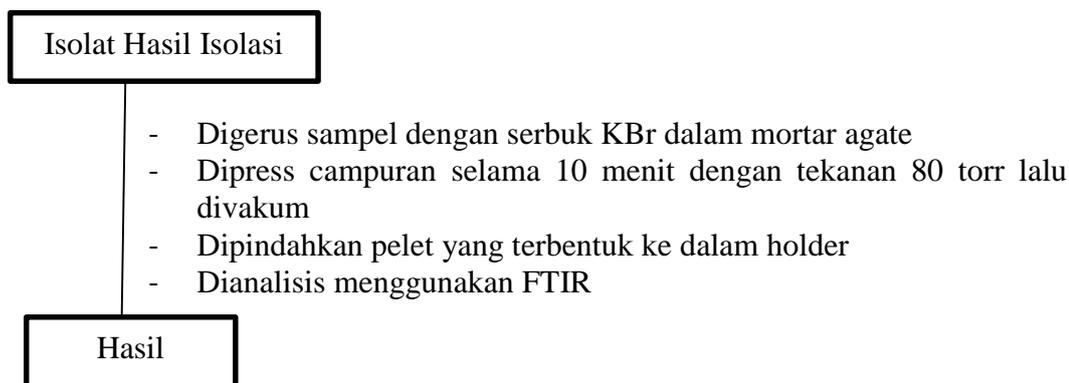
### L.1.8 Monitoring dengan KLTA

#### Fraksi hasil isolasi

- Disiapkan eluen campuran n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan 17:3
- Dijenuhkan selama 1 jam
- Dioven plat KLT pada suhu 110°C selama 30 menit
- Ditotolkan masing-masing kelompok fraksi
- Dimasukkan dalam bejana pengembang berisi eluen yang telah dijenuhkan
- Diamati noda yang terbentuk

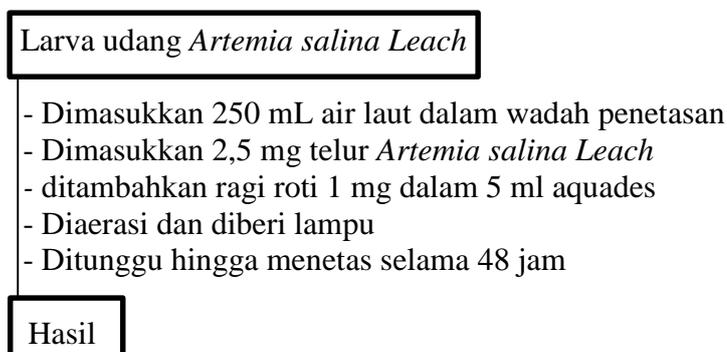
#### Hasil

### L.1.9 Identifikasi menggunakan FTIR

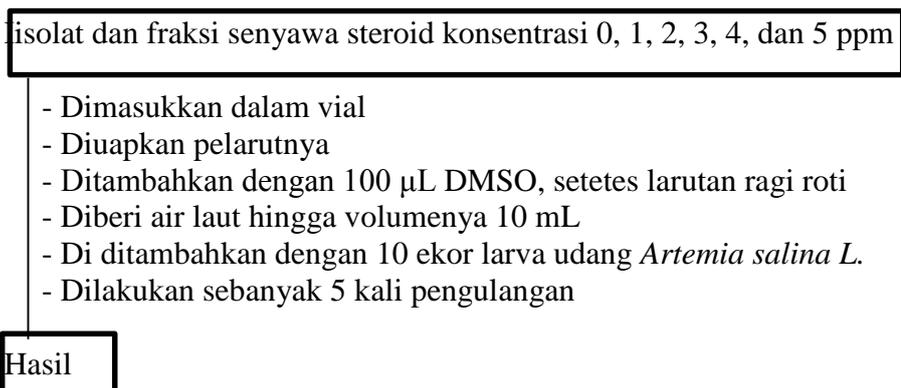


### L.1.11 Uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach

a). Penetasan larva udang



b). Uji toksisitas



## Lampiran 2. Perhitungan dan Pembuatan Larutan

### L.2.1 Pembuatan larutan HCl 2N

$$\begin{aligned} \text{BJ HCl pekat} &= 1,19 \text{ gram/mL} \\ \text{Konsentrasi} &= 37\% = \frac{37 \text{ gram HCl}}{100 \text{ gram larutan}} \\ \text{BM HCl} &= 36,5 \text{ gram/mol} \\ n &= 1 \text{ (jumlah mol ion H}^+) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{mol} &= \frac{\text{gram HCl}}{\text{Mr HCl}} = \frac{37 \text{ gram}}{36,5 \text{ gram/mol}} = 1,014 \text{ mol} \\ 100 \text{ gram larutan} &= \frac{100 \text{ gram}}{1,19 \text{ gram/ml}} = 84,03 \text{ ml} = 0,08403 \text{ L} \\ \text{Molaritas} &= \frac{\text{mol}}{\text{L}} = \frac{1,014 \text{ mol}}{0,08403 \text{ L}} = 12,06 \text{ M} \\ \text{Normalitas} &= n \times \text{Molaritas} = 1 \times 12,06 \text{ M} = 12,06 \text{ N} \\ N_1 \cdot V_1 &= N_2 \cdot V_2 \\ 12,06 \text{ N} \cdot V_1 &= 2\text{N} \cdot 100 \text{ mL} \\ V_1 &= 16,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Prosedur pembuatan larutan HCl 2N dilakukan dengan diambil larutan HCl pekat 37% sebanyak 16,5 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL yang telah berisi 15 mL akuades. Selanjutnya ditambahkan akuades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

### L.2.2 Pembuatan larutan NaHCO<sub>3</sub>

NaHCO<sub>3</sub> memiliki kelarutan sebesar 9,99 gram dalam 100 mL akuades, untuk membuat larutan NaHCO<sub>3</sub> jenuh dengan ditimbang NaHCO<sub>3</sub> dengan berat lebih dari 9,99 gram. Kemudian dilarutkan dalam akuades sampai terdapat endapan padat yang tidak larut. Lalu disaring untuk memisahkan endapan dan filtrat sehingga didapatkan larutan NaHCO<sub>3</sub> jenuh.

### L.2.3 Pembuatan reagen *Lieberman burchard*

Reagen *Lieberman burchard* terdiri dari kloroform, asam asetat anhidrida dan asam sulfat. Masing-masing bahan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi sampel dengan besar kloroform 96 % (0,5 mL), asam asetat anhidrida (0,5 mL), dan asam sulfat 98% (1-2 mL). kemudian diamati perubahan warnanya.

### L.2.4 Pembuatan eluen *n*-heksana : etil asetat

a). Eluen Kromatografi Kolom

Tabel 1. Perbandingan volume *n*-heksana dan etil asetat

Perbandingan	Volume <i>n</i> -heksana (mL)	Volume etil asetat(mL)
19:1 v/v	95	5
18:2 v/v	90	10
17:3 v/v	85	15

Keterangan : pembuatan larutan dilakukan dengan mengambil masing-masing pelarut dengan besar yang sudah tertera pada tabel hingga total volume setiap perbandingan larutan adalah 100 mL.

## b). Eluen monitoring KLTA

Eluen yang digunakan monitoring KLTA hasil dari kromatografi kolom adalah *n*-heksana : etil asetat dengan perbandingan 17:3 dalam 20 mL

- Volume *n*-heksana (17 dalam 20 mL)

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

- Volume etil asetat (3 dalam 20 mL)

$$\text{Etil asetat} = \frac{3}{20} \times 20 = 3 \text{ mL}$$

Sehingga untuk membuat eluen dilakukan dengan mengambil larutan *n*-heksana 17 mL dan etil asetat sebesar 3 mL.

**L.2.5 Pembuatan konsentrasi larutan isolat untuk uji toksisitas**

## a). Pembuatan larutan stok

$$\text{ppm} = \text{mg/L}$$

larutan stok (100 ppm) = mg/L dalam 10 mL pelarutnya

$$100 \text{ ppm} = \frac{\text{mg}}{0,01 \text{ L}}$$

$$\text{mg} = 1 \text{ mg}$$

sehingga untuk membuat larutan stok 100 ppm pada masing-masing ekstrak dilakukan dengan memasukkan 1 mg sampel ke dalam labu ukur 10 mL dan dilarutkan dengan pelarutnya sampai tanda batas.

## b). Pembuatan konsentrasi larutan

## a. Pembuatan larutan ekstrak 1 ppm

$$V1.M1 = V2. M2$$

$$10 \text{ mL. } 1 \text{ ppm} = V2. 100 \text{ ppm}$$

$$\frac{10 \text{ mL. } 1 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} = V2$$

$$0,1 \text{ mL} = V2$$

Untuk membuat larutan 1 ppm dilakukan dengan mengambil 0,1 mL Larutan sampel pada konsentrasi 100 ppm, kemudian di tandabatkan dengan pelarut sampai 10 mL.

## b. Pembuatan larutan ekstrak 2 ppm

$$V1.M1 = V2. M2$$

$$10 \text{ mL. } 2 \text{ ppm} = V2. 100 \text{ ppm}$$

$$\frac{10 \text{ mL. } 2 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} = V2$$

$$0,2 \text{ mL} = V2$$

Untuk membuat larutan 2 ppm dilakukan dengan mengambil 0,2 mL Larutan sampel pada konsentrasi 100 ppm, kemudian di tanda bataskan dengan pelarut sampai 10 mL.

## c. Pembuatan larutan ekstrak 3 ppm

$$V1.M1 = V2. M2$$

$$10 \text{ mL. } 3 \text{ ppm} = V2. 100 \text{ ppm}$$

$$\frac{10 \text{ mL. } 3 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} = V2$$

$$0,3 \text{ mL} = V2$$

Untuk membuat larutan 3 ppm dilakukan dengan mengambil 0,3 mL Larutan sampel pada konsentrasi 100 ppm, kemudian di tanda bataskan dengan pelarut sampai 10 mL.

d. Pembuatan larutan ekstrak 4 ppm

$$V1.M1 = V2. M2$$

$$10 \text{ mL. } 4 \text{ ppm} = V2. 100 \text{ ppm}$$

$$\frac{10 \text{ mL. } 4 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} = V2$$

$$0,4 \text{ mL} = V2$$

Untuk membuat larutan 4 ppm dilakukan dengan mengambil 0,4 mL Larutan sampel pada konsentrasi 100 ppm, kemudian di tanda bataskan dengan pelarut sampai 10 mL.

e. Pembuatan larutan ekstrak 5 ppm

$$V1.M1 = V2. M2$$

$$10 \text{ mL. } 5 \text{ ppm} = V2. 100 \text{ ppm}$$

$$\frac{10 \text{ mL. } 5 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} = V2$$

$$0,5 \text{ mL} = V2$$

Untuk membuat larutan 5 ppm dilakukan dengan mengambil 0,5 mL Larutan sampel pada konsentrasi 100 ppm, kemudian di tanda bataskan dengan pelarut sampai 10 mL.

### Lampiran 3. Data Pengamatan dan Hasil Perhitungan

#### L.3.1 Rendemen sampel kering *Hydrilla verticillata*

$$\begin{aligned}
 \text{Berat sampel basah} &= 8 \text{ kg} \\
 \text{Berat sampel kering} &= 0,5 \text{ kg} \\
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat sampel kering}}{\text{Berat sampel basah}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,5 \text{ Kg}}{8 \text{ Kg}} \times 100\% \\
 &= 6,25\%
 \end{aligned}$$

#### L.3.2 Penentuan kadar air sampel *Hydrilla verticillata*

Tabel L.3.2 Data berat cawan kosong

Ulangan cawan	Berat cawan kosong (g)				Berat cawan konstan
	Sebelum dioven	U1	U2	U3	
C1	65,0622	65,0595	65,0605	65,0603	65,0601
C2	65,9529	65,9475	65,9457	65,9479	65,9470
C3	53,9962	53,9964	53,9961	53,9962	53,9962
C4	53,3903	53,3874	53,3864	53,3864	53,3867

Keterangan: C= Cawan, U= Ulangan

Tabel L.3.2 Data berat cawan + sampel

Ulangan cawan	Berat cawan kosong (g)				Berat cawan konstan
	Sebelum dioven	U1	U2	U3	
C1	66,0617	65,9776	65,9775	65,9771	65,9774
C2	66,9503	66,8578	66,8577	66,8578	66,8577
C3	54,9973	54,9130	54,9126	54,9131	54,9129
C4	54,3887	54,2930	54,2925	54,2921	54,2925

Keterangan: C= Cawan, U= Ulangan

##### a). Rendemen kadar air cawan ke 1

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat sampel+cawan sebelum}) - (\text{berat sampel+cawan setelah})}{(\text{berat sampel+cawan sebelum}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\
 &= \frac{(66,0617)g - (65,9774)g}{(66,0617)g - (65,0601)g} \times 100\% \\
 &= 8,4165\%
 \end{aligned}$$

##### b). Rendemen kadar air cawan ke 2

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat sampel+cawan sebelum}) - (\text{berat sampel+cawan setelah})}{(\text{berat sampel+cawan sebelum}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\
 &= \frac{(66,9503)g - (66,8577)g}{(66,9503)g - (65,9470)g} \times 100\% \\
 &= 9,2295\%
 \end{aligned}$$

c). **Rendemen kadar air cawan ke 3**

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat sampel+cawan sebelum})-(\text{berat sampel+cawan setelah})}{(\text{berat sampel+cawan sebelum})-(\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\ &= \frac{(54,9973)g-(54,9129)g}{(54,9973)g-(53,9962)g} \times 100\% \\ &= 8,4307\% \end{aligned}$$

d). **Rendemen kadar air cawan ke 4**

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat sampel+cawan sebelum})-(\text{berat sampel+cawan setelah})}{(\text{berat sampel+cawan sebelum})-(\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\ &= \frac{(54,3887)g-(54,2925)g}{(54,3887)g-(53,3867)g} \times 100\% \\ &= 9,6000\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kadar air rata-rata sampel} &= \frac{(8,4165\%)+(9,2295\%)+(8,4307\%)+(9,6000\%)}{4} \\ &= 8,9191\% \end{aligned}$$

### L.3.3 Perhitungan rendemen ekstrak dan fraksi

#### L.3.3.1 Rendemen ekstrak metanol *Hydrilla verticillata*

Tabel L.3.3.1 Data rendemen ekstrak metanol

Ulangan	Berat sampel (g)	Berat gelas beker kosong (g)	Berat gelas beker+sampel (g)	Berat ekstrak pekat <i>Hydrilla verticillata</i> (g)
1	50	63,9945	66,6317	2,6372
2	50	62,5133	65,3656	2,8523

$$\begin{aligned} \text{Rendemen ulangan 1} &= \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{2,6372g}{50g} \times 100\% \\ &= 5,2744\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rendemen ulangan 2} &= \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{2,8523g}{50g} \times 100\% \\ &= 5,7046\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rendemen rata-rata ekstrak metanol} &= \frac{(5,2744\%)+(5,7046\%)}{2} \\ &= 5,4985\% \end{aligned}$$

#### L.3.3.2 Rendemen fraksi petroleum eter dan etil asetat

Tabel L.3.3.2 Data rendemen fraksi petroleum eter

Berat sampel (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah+sampel (g)	Berat fraksi (g)	Rendemen (%)
5	62,5094	65,9229	3,4135	68,27

$$\begin{aligned}\text{Rendemen} &= \frac{\text{berat fraksi}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{3,4135}{5 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 68,27\%\end{aligned}$$

Tabel L.3.3.2 Data rendemen fraksi etil asetat

Berat sampel (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah+sampel (g)	Berat fraksi (g)	Rendemen (%)
5	63,8416	63,9819	0,14	2,8

$$\begin{aligned}\text{Rendemen} &= \frac{\text{berat fraksi}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{0,14\text{g}}{5\text{g}} \times 100\% \\ &= 2,8\%\end{aligned}$$

## Lampiran 4. Hasil monitoring KLTA

### L.4.1 Isolat petroleum eter

Isolat	Vial	Warna UV <sub>254</sub>	Jarak senyawa (cm)	Jarak elusi (cm)	R <sub>f</sub>	Rendemen	Dugaan senyawa
A	1-46	-	-	-	-	-	-
B	47-69	Hijau	3,5	8	0,4375	8,2%	Steroid
C	70-80	Hijau	3	8	0,375	3,2%	Steroid
		Merah	1,5	8	0,1875		Terpenoid
D	81-94	Merah	2	8	0,25	4,3%	Terpenoid
E	95-106	Merah	1,9	8	0,2375	2,6%	Terpenoid
		Merah	0	8	0		Terpenoid
F	107-120	Merah	1,9	8	0,2375	3,4%	Terpenoid
		Merah	1,2	8	0,15		Terpenoid
		Merah	0	8	0		Terpenoid
G	121-133	Merah	1,7	8	0,2125	1,7%	Terpenoid
		Merah	1,2	8	0,15		Terpenoid
		Merah	0	8	0		Terpenoid

### L.4.2 Isolat etil asetat

Isolat	Vial	Warna UV <sub>254</sub>	Jarak senyawa (cm)	Jarak elusi (cm)	R <sub>f</sub>	Rendemen	Dugaan senyawa
A	1-78	-	-	-	-	-	-
B	79-109	Hijau	2,5	8	0,3125	13,2%	Steroid
C	110-140	Hijau	2,5	8	0,3125	13,2%	Steroid
		Merah	1	8	0,125		Terpenoid

### L.4.3 Perhitungan randemen hasil kromatografi kolom

#### L.4.3.1 Randemen isolat petroleum eter

##### a). Isolat B

$$\begin{aligned} \% \text{ Randemen} &= \frac{\text{berat isolat}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{5,5 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% = 8,2\% \end{aligned}$$

##### b). Isolat C

$$\begin{aligned} \% \text{ Randemen} &= \frac{\text{berat isolat}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{2,2 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% = 3,2\% \end{aligned}$$

##### c). Isolat D

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{berat isolat}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{2,9 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% = 4,3\% \end{aligned}$$

**d). Isolat E**

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{berat isolat}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{1,8 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% = 2,6 \%\end{aligned}$$

**e). Isolat F**

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{berat isolat}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{2,3 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% = 3,4 \%\end{aligned}$$

**f). Isolat G**

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{berat isolat}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{1,2 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% = 1,7 \%\end{aligned}$$

**L.4.3.2 Rendemen isolat etil asetat****a). Isolat B**

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{berat isolat}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{8,9 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% = 13,2 \%\end{aligned}$$

**b). Isolat C**

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{berat isolat}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{8,9 \text{ mg}}{67 \text{ mg}} \times 100\% = 13,2\%\end{aligned}$$

## Lampiran 5. Hasil uji toksisitas

### L.5.1 Hasil uji toksisitas isolat petroleum eter

Konsentrasi(ppm)	Jumlah larva mati (ekor)					Modus	Mortalitas
	I	II	III	IV	V		
0*	0	0	0	0	0	0	0
0**	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0
2	1	1	0	0	0	0	0
3	1	1	1	0	0	1	1
4	1	1	1	0	2	1	1
5	1	1	1	0	0	1	1

### Probit Analysis: Mortalitas, Jumlah Larva versus Konsentrasi

Distribution: Lognormal

#### Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas	Event	3
	Non-event	47
Jumlah Larva	Total	50

Estimation Method: Maximum Likelihood

#### Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-2.78551	1.19493	-2.33	0.020
Konsentrasi Natural Response	1.04739	0.887218	1.18	0.238

Log-Likelihood = -10.238

#### Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	0.840929	3	0.840
Deviance	0.970674	3	0.808

#### Tolerance Distribution

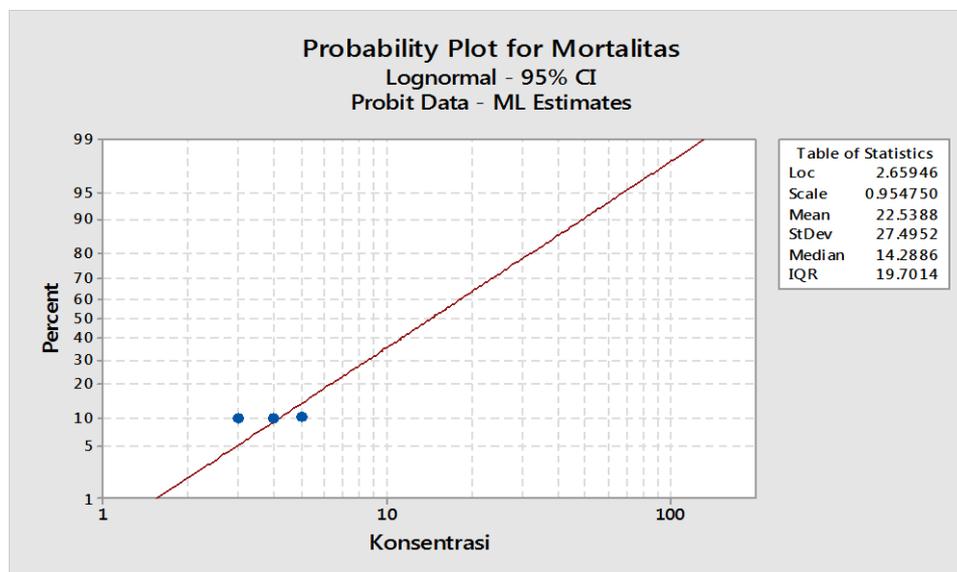
#### Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Location	2.65946	1.18413	0.338614	4.98031
Scale	0.954750	0.808741	0.181494	5.02248

#### Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	1.55020	1.22014	*	*
2	2.01103	1.18127	*	*
3	2.37210	1.11589	*	*
4	2.68584	1.05403	*	*
5	2.97142	1.01029	*	*
6	3.23828	0.995242	*	*
7	3.49192	1.01595	*	*
8	3.73583	1.07493	*	*
9	3.97243	1.17024	*	*
10	4.20343	1.29723	*	*
20	6.39761	3.51409	*	*
30	8.66066	6.75134	*	*
40	11.2187	11.0686	*	*
50	14.2886	16.9195	*	*
60	18.1986	25.1830	*	*
70	23.5738	37.6912	*	*
80	31.9126	59.0959	*	*
90	48.5709	107.049	*	*
91	51.3954	115.714	*	*
92	54.6503	125.863	*	*
93	58.4677	137.973	*	*
94	63.0471	152.777	*	*
95	68.7094	171.470	*	*
96	76.0149	196.166	*	*
97	86.0691	231.114	*	*
98	101.522	286.732	*	*
99	131.702	400.865	*	*

### Probability Plot for Mortalitas



### L.5.2 Hasil uji toksisitas isolat etil asetat

Konsentrasi(ppm)	Jumlah larva mati (ekor)					Modus	Mortalitas
	I	II	III	IV	V		
0*	2	0	0	0	0	0	0
0**	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
1	3	1	0	0	2	0	0
2	0	1	2	2	1	1	1
3	1	1	1	0	1	1	1
4	0	0	2	2	1	2	2
5	2	0	0	1	2	2	2

### Probit Analysis: Mortalitas, Jumlah Larva versus Konsentrasi

Distribution: Lognormal

Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas	Event	6
	Non-event	44
Jumlah Larva	Total	50

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-2.14115	0.729718	-2.93	0.003
Konsentrasi	0.869652	0.571178	1.52	0.128
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -16.841

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	0.535709	3	0.911
Deviance	0.661767	3	0.882

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

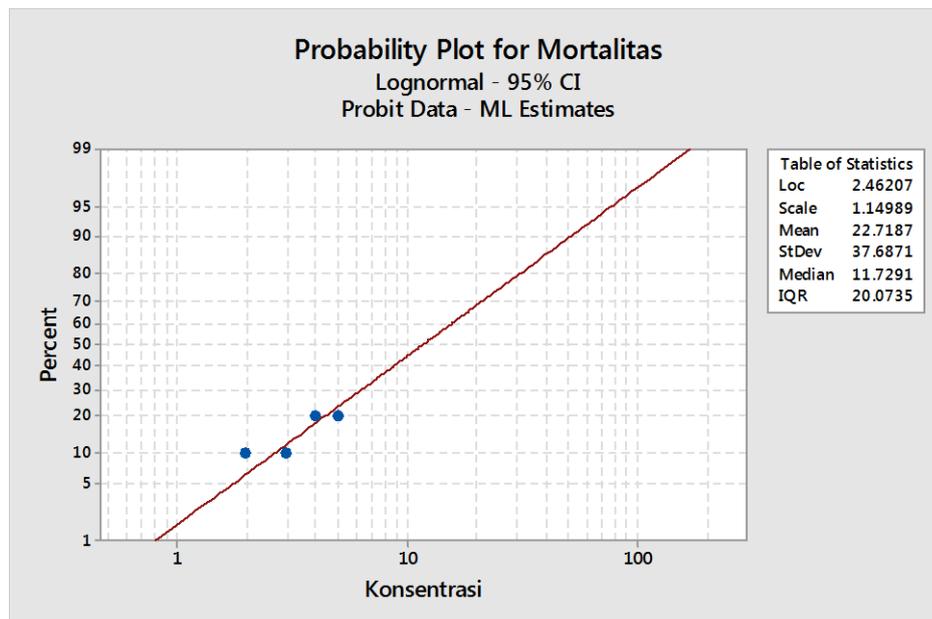
Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Location	2.46207	0.870589	0.755750	4.16839
Scale	1.14989	0.755232	0.317391	4.16595

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	0.808188	0.785715	*	*
2	1.10572	0.859263	*	*
3	1.34902	0.885974	*	*

4	1.56672	0.891796	*	*
5	1.76947	0.886403	*	*
6	1.96258	0.875112	*	*
7	2.14917	0.861663	*	*
8	2.33124	0.849175	*	*
9	2.51019	0.840517	*	*
10	2.68703	0.838423	*	*
20	4.45624	1.49755	*	*
30	6.41778	3.27973	*	*
40	8.76487	6.06464	*	*
50	11.7291	10.2112	*	*
60	15.6958	16.5388	*	*
70	21.4360	26.8455	*	*
80	30.8717	45.9038	*	*
90	51.1985	92.8942	*	*
91	54.8053	101.861	*	*
92	59.0121	112.515	*	*
93	64.0115	125.430	*	*
94	70.0972	141.495	*	*
95	77.7474	162.178	*	*
96	87.8087	190.124	*	*
97	101.979	230.748	*	*
98	124.418	297.656	*	*
99	170.222	442.064	*	*

### Probability Plot for Mortalitas



## Lampiran 6. Dokumentasi

### L.6.1 Preparasi sampel



Pencucian *Hydrilla verticillata*



Pengeringan *Hydrilla verticillata*



Serbuk *Hydrilla verticillata* 90 mesh

### L.6.2 Analisis kadar air



Penimbangan cawan kosong



Pengovenan cawan kosong



Pendinginan cawan kosong



Penimbangan sampel



Pengovenan sampel



Pendinginan sampel



Penimbangan sampel setelah di oven

### L.6.3 Ekstraksi sampel



Penimbangan sampel



Memasukkan dalam erlenmayer tutup



Proses shaker 24 jam



Penyaringan filtrat

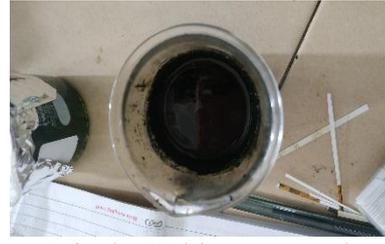
### L.6.4 Hidrolisis



Dishaker selama 1 jam



Ditambahkan  $\text{NaHCO}_3$



Dicek pH hingga netral

### L.6.5 Partisi



Partisi dengan PE pertama



Partisi dengan PE kedua



Partisi dengan PE ketiga



Partisi dengan EA pertama



Partisi dengan EA kedua



Partisi dengan EA ketiga



Fraksi PE



Fraksi PE dan EA

### L.6.6 Uji fitokimia



## L.6.7 Pemisahan menggunakan kromatografi kolom basah

### L.6.7.1 Fraksi petroleum eter



Proses pembuburan silika gel



Penjenuhan kolom selama 24 jam



Pemasukan sampel pada kolom



Penambahan eluen pada kolom



Proses elusi



Hasil kolom isolat PE

### L.6.7.2 Fraksi etil asetat



Proses pembuburan silika gel



Penjenuhan kolom selama 24 jam



Pemasukan sampel pada kolom



Penambahan eluen pada kolom



Proses elusi



Hasil kolom isolat PE

## L.6.8 Monitoring KLTA

### L.6.8.1 Fraksi Petroleum eter



Proses elusi pada KLTA



Proses elusi pada KLTA



Hasil KLTA isolat  
1-39



Hasil KLTA isolat 41-79



Hasil KLTA isolat 81-119



Hasil KLTA isolat  
121-133

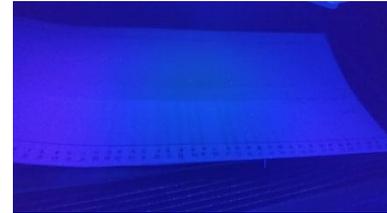
### L.6.8.1 Fraksi etil asetat



Proses elusi pada  
KLTA



Proses elusi pada KLTA



Hasil KLTA isolat 1-77

## L.6.9 Uji toksisitas fraksi petroleum eter dan etil asetat



Proses penguapan  
pelarut



Penetasan udang  
*Artemia salina L.*



Penambahan larutan  
DMSO

