

**UJI ANTIOKSIDAN DAN IDENTIFIKASI ISOLAT STEROID FRAKSI
PETROLEUM ETER DAN ETIL ASETAT *Hydrilla verticillata* HASIL
KROMATOGRAFI KOLOM GRADIEN ELUEN**

SKRIPSI

**Oleh:
ERLINA NOVITA SARI
NIM. 17630077**



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

**UJI ANTIOKSIDAN DAN IDENTIFIKASI ISOLAT STEROID FRAKSI
PETROLEUM ETER DAN ETIL ASETAT *Hydrilla verticillata* HASIL
KROMATOGRAFI KOLOM GRADIEN ELUEN**

SKRIPSI

**Oleh:
ERLINA NOVITA SARI
NIM. 17630077**

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

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

**UJI ANTIOKSIDAN DAN IDENTIFIKASI ISOLAT STEROID FRAKSI
PETROLEUM ETER DAN ETIL ASETAT *Hydrilla verticillata* HASIL
KROMATOGRAFI KOLOM GRADIEN ELUEN**

SKRIPSI

Oleh:
ERLINA NOVITA SARI
NIM. 17630077

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal : 17 Desember 2021

Pembimbing I



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

Pembimbing II



Nur Aini, M.Si
NIP. 19840608 20160801 2 070

**Mengesahkan,
Ketua Program Studi**



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

**UJI ANTIOKSIDAN DAN IDENTIFIKASI ISOLAT STEROID FRAKSI
PETROLEUM ETER DAN ETIL ASETAT *Hydrilla verticillata* HASIL
KROMATOGRAFI KOLOM GRADIEN ELUEN**

SKRIPSI

**Oleh:
ERLINA NOVITA SARI
NIM. 17630077**

**Telah Diperiksa di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 21 Desember 2021**

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

**Ketua Penguji : Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc
NIDT. 19900905 20180201 2 239**

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

**Anggota Penguji : Nur Aini, M.Si
NIP. 19840608 201903 2 009**

(.....)

(.....)

(.....)

(.....)

**Mengesahkan,
Ketua Program Studi**



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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Erlina Novita Sari

NIM : 17630077

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Uji Antioksidan dan Identifikasi Isolat Steroid Fraksi Petroleum Eter dan Etil Asetat *Hydrilla verticillata* Hasil Kromatografi Kolom Gradien Eluen

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini 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 di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 21 Desember 2021

Yang membuat pernyataan,



Erlina Novita Sari
NIM. 17630077

PERSEMBAHAN

Alhamdulillah atas kehendak Allah Swt. dan dukungan dari orang-orang sekitar, saya bisa menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Skripsi ini saya persembahkan untuk:

Kedua orang tua yang terkasih dan tersayang, Bapak Santoso dan Ibu Mariani yang selalu mendukung dan memberikan doa terbaik untuk saya. Terima kasih atas perjuangan dan kerja kerasnya sehingga saya bisa menuntut ilmu hingga jenjang perguruan tinggi. Meskipun Bapak lulusan SD dan Ibu lulusan SMP, tetapi beliau selalu memberikan semangat dan motivasi untuk kedua anaknya agar bisa mempunyai pendidikan yang lebih tinggi dari beliau. Semoga ini menjadi amal jariyah untuk beliau, dan semoga Allah senantiasa melimpahkan rahmat dan karunianya. Aamiin.

Adikku tersayang, Ferin Oktavia Rahmadhani, yang selalu membantu, membuatkan camilan dan menemani saya dalam segala hal. Karena dia, saya termotivasi untuk menjadi kakak yang terbaik buat dia. Terima kasih telah menjadi malaikat kecil yang selalu memberikan kebahagiaan. Semoga Allah mengabulkan apa yang kamu cita-citakan.

Bapak dan Ibu dosen,
Yang telah sabar membimbing saya selama masa perkuliahan, khususnya Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si dan Ibu Nur Aini M.Si selaku dosen pembimbing, Ibu Suci Amalia, M.Sc selaku dosen wali, serta Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si dan Ibu Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc selaku penguji yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing serta menguji saya dengan sabar dan telaten serta memberikan motivasi dan kepercayaan diri kepada saya saat mengalami kesulitan.

Teman terbaikku, Ahmad Yoga Novianto, yang selalu menemaniku dalam keadaan apapun. Terima kasih untuk setiap perhatian dan kasih sayangnya, terima kasih juga selalu mengantar jemputku khususnya waktu ngeLab. Semoga Allah memberikan takdir terbaik untuk kita.

Teman-teman yang saya sayangi,
Khususnya *partner Hydrilla* (Happy), Puspa, Putri, Raniqul, Nining, Wariatus, Kimia B, Neon'17 dan sahabat-sahabat saya SD dan SMA yang selalu memberikan semangat, doa, dan dukungannya untuk saya sehingga saya bisa menyelesaikan skripsi ini

MOTTO

“Jangan membandingkan dirimu dengan siapapun di dunia ini, karena ketika kamu melakukannya, kamu sedang menghina dirimu sendiri”

~Bill Gates~

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahrabbi'l'amin, puji syukur kehadiran Allah Swt. yang telah melimpahkan rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyusun skripsi penelitian ini yang berjudul **“Uji Antioksidan dan Identifikasi Isolat Steroid Fraksi Petroleum Eter dan Etil Asetat *Hydrilla verticillata* Hasil Kromatografi Kolom Gradien Eluen”**. Selawat dan salam semoga senantiasa mengalun indah dan tulus terucap kepada Nabi Muhammad saw., keluarganya, sahabatnya dan para umat serta pengikutnya. Penyusunan skripsi penelitian ini tidak luput dari dukungan, motivasi serta bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, izinkanlah penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. M. Zainuddin, MA., selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si., selaku Ketua Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si., selaku Dosen Pembimbing yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing, memberikan pengarahan, memotivasi serta memberi masukan dalam penulisan skripsi penelitian ini.
5. Ibu Nur Aini, M.Si., selaku Dosen Pembimbing yang telah mengarahkan dan memberikan masukan dalam penulisan skripsi penelitian ini.

6. Seluruh Dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah mengalirkan ilmu, pengetahuan, pengalaman, wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
7. Orang tua penulis, Bapak Santoso, Ibu Mariani, Adik Ferin serta seluruh keluarga, yang dengan sepenuh jiwa memberikan dukungan baik moril maupun materiil serta kasih sayangnya, yang tidak mungkin terbalaskan.
8. Happy, Raniqul, Putri, Puspa, Yoga, organik bahan alam 2017, Bachem, dan Neon 2017 selaku sahabat dan rekan seperjuangan yang selalu memberikan semangat, doa, dan motivasi selama penyusunan skripsi ini.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala bantuan dan motivasinya kepada penulis.

Semoga amal baik semua pihak yang telah membantu penulis mendapatkan imbalan pahala yang berlipat ganda dari Allah Swt. Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam skripsi penelitian ini. Untuk itu penulis mengharapkan masukan yang bersifat membangun demi menyempurnakan skripsi ini. Semoga tulisan ini bisa bermanfaat bagi penulis pada khususnya dan bagi pembaca pada umumnya.

Malang, 05 Maret 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 TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT.....	xv
مُلَخَّصُ البَحْثِ	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan	6
1.4 Batasan Masalah	6
1.5 Manfaat	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Tumbuhan dalam Perspektif Islam	8
2.2 <i>Hydrilla verticillata</i>	9
2.3 Senyawa Steroid	12
2.4 Isolasi Senyawa Steroid.....	14
2.4.1 Ekstraksi Senyawa Steroid Menggunakan Metode Maserasi	14
2.4.2 Hidrolisis dan Partisi	16
2.4.3 Kromatografi Kolom.....	18
2.4.4 Monitoring Menggunakan KLTA	20
2.4.5 Uji Antioksidan <i>Hydrilla verticillata</i> dengan Metode DPPH.....	21
2.4.6 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis	23
BAB III METODE PENELITIAN	25
3.1 Waktu dan Tempat.....	25
3.2 Alat dan Bahan	25
3.2.1 Alat.....	25
3.2.2 Bahan	25
3.3 Rancangan Penelitian.....	25
3.4 Tahapan Penelitian.....	26
3.5 Cara Kerja.....	27
3.5.1 Preparasi Sampel.....	27
3.5.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri.....	27
3.5.3 Ekstraksi Senyawa Steroid.....	28
3.5.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol	28
3.5.5 Uji Steroid dengan <i>Lieberman Burchard</i>	29
3.5.6 Isolasi Senyawa Steroid dengan Metode Kromatografi Kolom.....	29

3.5.7 Monitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik.....	29
3.5.8 Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH.....	30
3.5.8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	30
3.5.8.2 Pengukuran Potensi Antioksidan Sampel	30
3.5.9 Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.....	31
3.5.10 Analisis Data	31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1 Preparasi Sampel.....	32
4.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri.....	33
4.3 Ekstraksi Maserasi	33
4.4 Hidrolisis dan Partisi	34
4.5 Uji Fitokimia Golongan Senyawa Steroid	35
4.6 Pemisahan Steroid dengan Kromatografi Kolom dan Monitoring KLTA..	37
4.7 Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.....	40
4.8 Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH	44
4.8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH.....	44
4.8.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel.....	45
4.9 Pemanfaatan <i>Hydrilla verticillata</i> dalam Perspektif Islam	47
BAB V PENUTUP.....	50
5.1 Kesimpulan	50
5.2 Saran.....	50
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN.....	60

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Kandungan nutrisi <i>Hydrilla verticillata</i> (Pal dan Nimse, 2006)	11
Tabel 2. 2 Hasil pemisahan KLTA fraksi etil asetat dan petroleum eter <i>Hydrilla verticillata</i> (Wati, 2020)	21
Tabel 2. 3 Ketentuan aktivitas antioksidan (Molyneux, 2004)	23
Tabel 4. 1 Hasil rendemen fraksi petroleum eter dan etil asetat	35
Tabel 4. 2 Hasil monitoring KLTA fraksi petroleum eter	39
Tabel 4. 3 Hasil monitoring KLTA fraksi etil asetat	39
Tabel 4. 4 Data hasil % aktivitas antioksidan dan nilai EC ₅₀ fraksi petroleum eter dan isolat hasil kromatografi kolom fraksi petroleum eter.....	45
Tabel 4. 5 Data hasil % aktivitas antioksidan dan nilai EC ₅₀ fraksi etil asetat dan isolat hasil kromatografi kolom fraksi etil asetat.....	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 <i>Hydrilla verticillata</i>	10
Gambar 2. 2 Struktur dasar senyawa steroid.....	12
Gambar 2. 3 Struktur kimia beberapa fitosterol (a) β -sitosterol (b) stigmasterol (c) kampesterol (d) brassicasterol (Decloedt, dkk., 2016).....	13
Gambar 2. 4 Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida (Vania, 2020).....	17
Gambar 2. 5 Reaksi netralisasi asam (Day dan Underwood, 1993).....	17
Gambar 2. 6 Reaksi radikal DPPH dengan antioksidan (Sayuti, 2015).....	22
Gambar 2. 7 Spektra UV-Vis pada isolat steroid hasil KLTP fraksi n-heksana (Fasya, dkk., 2019).....	24
Gambar 4. 1 Jalur reaksi reagen <i>Liebermann-Burchard</i> dengan steroid (Xiong, dkk., 2007).....	36
Gambar 4. 2 Hasil uji fitokimia fraksi (a) petroleum eter (b) etil asetat.....	37
Gambar 4. 3 Hasil Spektra UV-Vis fraksi petroleum eter dan isolat petroleum eter.....	41
Gambar 4. 4 Hasil Spektra UV-Vis fraksi etil asetat dan isolat etil asetat.....	41
Gambar 4. 5 Spektra UV-Vis larutan DPPH 0,2mM.....	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian	60
Lampiran 2. Diagram Alir	61
Lampiran 3. Perhitungan	65
Lampiran 4. Data Pengamatan dan Hasil Perhitungan.....	68
Lampiran 5. Dokumentasi	83

ABSTRAK

Sari, Erlina Novita. 2021. Uji Antioksidan dan Identifikasi Isolat 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: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Nur Aini, M.Si.

Kata Kunci: *Hydrilla verticillata*, Antioksidan, Steroid, Kromatografi Kolom, Petroleum Eter, Etil Asetat.

Hydrilla verticillata merupakan tumbuhan air yang terdapat pada perairan tergenang seperti sungai, waduk, dan juga danau. *Hydrilla verticillata* mengandung beberapa metabolit sekunder, salah satunya adalah steroid. Steroid memiliki berbagai potensi, salah satunya sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil isolasi senyawa steroid, aktivitas antioksidan isolat steroid *Hydrilla verticillata* hasil kromatografi kolom fraksi petroleum eter dan etil asetat terhadap DPPH, dan hasil karakterisasi isolat steroid menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Isolasi senyawa steroid dilakukan dengan 3 tahapan yaitu diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol, dihidrolisis menggunakan HCl 2 N dan dipartisi menggunakan petroleum eter dan etil asetat. Hasil partisi diuji fitokimia menggunakan reagen *Liebermann-Burchard*. Setelah itu, pemisahan senyawa dilakukan dengan kromatografi kolom gradien eluen menggunakan pelarut *n*-heksana:etil asetat (19:1; 18:2; dan 17:3). Hasil pemisahan dimonitoring menggunakan KLTA dengan eluen *n*-heksana:etil asetat (17:3). Fraksi petroleum eter dan etil asetat serta isolat steroid hasil pemisahan kromatografi kolom diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH dengan parameter nilai EC₅₀ dan diidentifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemisahan menggunakan kromatografi kolom fraksi petroleum eter dan etil asetat masing-masing menghasilkan beberapa fraksi isolat, satu diantaranya merupakan fraksi isolat steroid tunggal. Hasil EC₅₀ fraksi petroleum eter, fraksi etil asetat, isolat petroleum eter, dan isolat etil asetat berturut-turut sebesar 94,66; 84,02; 9,231; 11,74 ppm. Hasil identifikasi UV-Vis fraksi petroleum eter menunjukkan serapan pada λ_{maks} 204,1; 224,9; 405,9; dan 665,9 nm, fraksi etil asetat pada λ_{maks} 204; 224; dan 662,1 nm, isolat steroid hasil kromatografi kolom fraksi petroleum eter pada λ_{maks} 204 dan 224,9 nm, serta isolat steroid hasil kromatografi kolom fraksi etil asetat pada λ_{maks} 205 dan 223 nm.

ABSTRACT

Sari, Erlina Novita. 2021. Antioxidant Test and Identification of Steroid Isolates of Petroleum Ether and Ethyl Acetate Fraction *Hydrilla verticillata* Results of Column Chromatography Gradient Eluent. *Bachelor Thesis*. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Supervisor II: Nur Aini, M.Si.

Keywords: *Hydrilla verticillata*, Antioxidants, Steroids, Column Chromatography, Petroleum Ether, Ethyl Acetate.

Hydrilla verticillata is an aquatic plant found in stagnant waters such as rivers, reservoirs, and lakes. *Hydrilla verticillata* contains several secondary metabolites, one of which is steroids. Steroids have various potentials, one of which is as an antioxidant. This study aims to determine the results of the isolation of steroid compounds, the antioxidant activity of the steroid isolate *Hydrilla verticillata* from column chromatography of the petroleum ether and ethyl acetate fractions against DPPH and the results of the characterization of steroid isolates by UV-Vis Spectrophotometer. Isolation of steroid compounds was carried out in 3 stages, namely extracted by maceration method using methanol as solvent, hydrolyzed using 2 N HCl and partitioned using petroleum ether and ethyl acetate. Partition results were tested for phytochemical using *Liebermann-Burchard* reagent. After that, the compound was separated by eluent gradient column chromatography using *n*-hexane:ethyl acetate (19:1; 18:2; and 17:3) as solvent. The results of the separation were monitored using ATLC with *n*-hexane:ethyl acetate as eluent (17:3). The petroleum ether and ethyl acetate fractions and steroid isolates from column chromatography separation were tested for their antioxidant activity using the DPPH method with the parameter value of EC₅₀ and identified using UV-Vis Spectrophotometer. The results showed that the separation by column chromatography of petroleum ether and ethyl acetate fractions each produced several isolate fractions, one of which was a single steroid isolate fraction. The EC₅₀ results of petroleum ether fraction, ethyl acetate fraction, petroleum ether isolate, and ethyl acetate isolate were 94.66; 84.02; 9.231; 11.74 ppm. The result of UV-Vis identification of petroleum ether fraction showed absorption at λ_{max} 204.1; 224.9; 405.9; and 665.9 nm, ethyl acetate fraction at λ_{max} 204; 224; and 662.1 nm, steroid isolates from petroleum ether fraction column chromatography at λ_{max} 204 and 224.9 nm, and steroid isolates from ethyl acetate fraction column chromatography at λ_{max} 205 and 223 nm.

ملخص البحث

ساري، إيرينا نوفييتا. ٢٠٢١. تجرئة انثيووكسيديان و تعرف ايسولات ستيرويث فراكسي فتروليوم ايتير و ايتيل استينات هيدرلا فرتيشلات (*Hydrilla verticillata*) انتاج كروماتوكراي كولوم كرادين ايلووين. البحث العلمي. قسم الكيمياء كلية العلم و التقني الجامعة الإسلامية الرسنية مولانا مالِك ابراهيم مالانج. المشرقة الأولى: أ. عتيم فاشا، ماجستير و المشرقة الثانية: نور عيني، ماجستير.

الكلمات الرئيسية: هيدرلا فرتيشلات (*Hydrilla verticillata*)، انثيووكسيديان، ستيرويث، كروماتوكراي كولوم، فتروليوم ايتير، ايتيل استينات.

هيدرلا فرتيشلات (*Hydrilla verticillata*) هو نبات المياه في المياه العارفة كالنهر، الحاووز، و البحيرة. و يشمل هيدرلا فرتيشلات (*Hydrilla verticillata*) من ميثابوليث الفرعي، أخده ستيرويث. و ستيرويث له القوة، اخطاها انثيووكسيديان. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد نتائج عزل مركبات الستيرويث، والنشاط المضاد للإكسدة لعزل الستيرويث (*Hydrilla verticillata*) من كروماتوجرافيا العمود لكسور فتروليوم ايتير و ايتيل استينات ضد DPPH، ونتائج توصيف ايسولات ستيرويث باستخدام مقاييس الطيف الضوئي-UV Vis. و يعمل ايسولايبي سيباوا ستيرويث بثلاث طريقي و هي تخلص بالطريقة ماسيرايبي تستخدم ميسيل ميطانول، و يعمل هيدروليسيس باستخدام هتشي ٢ ن (HCl 2 N) و يُنفسام باستخدام فتروليوم ايتيرو ايتيل استينات. و نتيجة الانهسام تجرب فيتوكيماي باستخدام ليفيرمان-بورشر (*Liebermann-Burchard*). و بعد ذلك، تفریق المستخضر يعمل بكروماتوكراي كولوم كرادين ايلووين يستخدم ميسيل ن- هيكسانا: ايتيل استينات (١٩:١، ١٨:٢، و ١٧:٣). و نتيجة التفریق تراقب باستخدام كل ل ت ا (KLTA) بايلووين ن- هيكسانا: ايتيل استينات (١٧:٣). و فراكسي فتروليوم ايتير و ايتيل استينات و ايسولات ستيرويث و نتيجة تفریق كروماتوكراي كولوم تجرب بعملية انثيووكسيديان باستخدام طريقة د د ف ه (DPPH) مؤشرات نتيجة EC₅₀ و تعرف استخدام سفيكتروفوتوميتر ا ف-فيس (UV-Vis). و يستخدم التفریق كروماتوكراي كولوم فراكسي فتروليوم ايتير و ايتيل استينات كلها تحصل بعض فراكسي ايسولات أخده فراكسي ايسولات ستيرويث الوحده. و نتيجة فراكسي فتروليوم ايتير EC₅₀، فراكسي ايتيل استينات، ايسولات فتروليوم ايتير، ايسولات ايتيل استينات متواليا قدر ١١٩.٤؛ ٣٧.٤٠؛ ٢٦٩.٩؛ ٤٠٥.١ جزوي المليون. و نتيجة تعرف أو في-فيس فراكسي فتروليوم ايتير تدا سيرافان في λ_{maks} ٢٠٤.١؛ ٢٢٤.٩؛ ٤٠٥.٩؛ و ٦٦٥.٩ نانومتر، فراكسي ايتيل استينات في λ_{maks} ٢٠٤؛ ٢٢٤؛ و ٦٦٢.١ نانومتر، ايسولات ستيرويث نتيجة كروماتوكراي كولوم فراكسي فتروليوم ايتير في λ_{maks} ٢٠٤ و ٢٢٤.٩ نانومتر، و ايسولات ستيرويث نتيجة كروماتوكراي كولوم فراكسي ايتيل استينات في λ_{maks} ٢٠٥ و ٢٢٣ نانومتر.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Allah Swt. berfirman dalam QS. asy Syu'ara' (26) ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَيْفَ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ (٧)

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan (tumbuh-tumbuhan) yang baik?.”(QS. asy Syu'ara'/26:7).

Surat asy Syu'ara' ayat 7 menjelaskan bahwa Allah Swt. telah menciptakan berbagai macam tumbuhan yang baik di bumi. Menurut Shihab (2002) dalam buku Tafsir Al-Misbah menjelaskan bahwa kata *إلى* di bagian awal ayat merupakan kata yang mengandung makna batas akhir, yang berarti bahwa manusia diharuskan untuk mengarahkan pandangan hingga batas kemampuannya memandang sampai mencakup seluruh bumi, dengan aneka tanah dan tumbuhannya serta aneka keajaiban yang terdapat pada tumbuh-tumbuhannya. Sedangkan kata *كريم* di bagian akhir ayat digunakan untuk menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap objek yang disifatinya. Tumbuhan yang baik, adalah tumbuhan yang subur dan bermanfaat. Salah satu tumbuhan yang dapat dikategorikan sebagai tumbuhan baik adalah *Hydrilla verticillata*.

Hydrilla verticillata merupakan salah satu tumbuhan air yang seluruh bagiannya tenggelam di bawah permukaan air (Amalia, dkk., 2018) dan berasal dari beberapa bagian Asia, Afrika, Eropa, dan Australia (Stachowiak, dkk., 2021). Tumbuhan ini banyak ditemukan di kolam, waduk, sungai, dan danau (Das, dkk., 2015). Salah satu danau di Indonesia yang didominasi dengan tumbuhan *Hydrilla*

adalah Danau Ranu Grati, Pasuruan, yang mana masyarakat sekitarnya biasa menyebutnya sebagai “ganggeng”.

Pengetahuan yang masih kurang tentang pemanfaatan *Hydrilla verticillata* di masyarakat, menyebabkan pemanfaatan tanaman ini di Indonesia hanya sebatas sebagai hiasan akuarium dan selebihnya dibuang begitu saja. Padahal sebenarnya *Hydrilla verticillata* ini mempunyai banyak manfaat, di antaranya sebagai pupuk organik (Misra, dkk., 2012; Tanor, 2004; Marwan, dkk., 2017), biofiltrasi pada pengolahan limbah (Mulya, dkk., 2020), makanan ikan dan produksi biogas (Prabha & Rajkumar, 2015), biosorben logam berat seperti Cd dan Co (Sridhar, dkk., 2020). Selain itu, *Hydrilla verticillata* juga dapat dimanfaatkan sebagai antitumor (Araki, dkk., 2003), antikonvulsan (Das, dkk., 2015), antimalaria (Annie, dkk., 2016), antibakteri (Jannah, 2020), antimikroba (Prabha & Rajkumar, 2015) dan antioksidan (Pal dan Nimse, 2006; Purwantoro, 2019; Fasya, dkk., 2020; Vania, 2020).

Pemanfaatan *Hydrilla verticillata* yang beragam tersebut disebabkan oleh adanya kandungan senyawa metabolit primer maupun sekunder yang ada di dalamnya. Pal dan Nimse (2006) menyatakan bahwa *Hydrilla* mengandung senyawa kimia seperti vitamin, saponin, mineral, β -karoten, mikro dan makronutrien. Selain itu, Kensa dan Neelamegum (2016) menyebutkan bahwa hasil skrining *Hydrilla verticillata* mengandung metabolit sekunder yaitu flavonoid, alkaloid, dan steroid. Sementara Amalia, dkk. (2018), dalam penelitiannya menyebutkan bahwa *Hydrilla verticillata* mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid dan triterpenoid.

Steroid merupakan senyawa turunan dari hidrokarbon 1,2-Siklopentenoperhidrofenantrena, yang mana pada tumbuh-tumbuhan secara umum terdapat dalam bentuk sterol (Suryelita, dkk., 2017). Golongan senyawa ini diketahui mempunyai aktivitas bioinsektisida (Sugita, dkk., 2000), antibakteri (Jannah, 2020; Lalitha dkk., 2010), antifungi (Saraswathi, dkk., 2010), antimikroba (Contini, dkk., 2003), anti-inflamasi (Patel dan Savjani, 2015), dan antioksidan (Fasya, dkk., 2020; Vania, 2020). Menurut Jones, dkk. (2000) sterol tumbuhan (fitosterol) dapat menurunkan kolesterol dalam darah dan menghambat penyerapan kolesterol pada usus sehingga dapat menghambat perkembangan kanker usus besar dan menekan kolesterol hati. Potensi senyawa steroid dalam bidang kesehatan sebagai obat, menjadi dasar pentingnya isolasi steroid pada *Hydrilla verticillata*.

Steroid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang dapat memberikan aktivitas antioksidan yang tinggi. Hal tersebut dibuktikan dalam penelitian Krisna, dkk. (2014) yang mana isolat steroid daun gayam (*Inocarpus fagiferus* Fosb) memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 4 ppm. Penelitian selaras juga dilakukan oleh Fasya, dkk. (2019) bahwa isolat steroid fraksi n-heksana *Hydrilla verticillata* memiliki nilai EC_{50} sebesar 5,109 ppm. Antioksidan memiliki peranan penting dalam mencegah oksidasi radikal bebas yang dapat menyebabkan berbagai penyakit seperti karsinogenik dan penuaan (Yan, dkk., 1998). Saat ini antioksidan yang umum digunakan merupakan antioksidan sintetik di antaranya *Butylated hydroxyanisole* (BHA), *Butylated hydroxytoluene* (BHT), *Propylgallate* (PG) dan *Tert-Butylhydroquinone* (TBHQ). Akan tetapi, senyawa tersebut dicurigai dapat menyebabkan keracunan dan efek karsinogenik (Grillo, dkk., 1995; Safer, dkk., 1999; Shanab, 2007). Oleh karena itu, pengembangan serta

pemanfaatan antioksidan yang lebih efektif dan berasal dari alam penting untuk dilakukan.

Isolasi senyawa steroid yang terdapat pada *Hydrilla verticillata* diawali dengan proses ekstraksi menggunakan metode maserasi. Pemilihan metode maserasi karena metode ini aman digunakan dan dapat mengantisipasi senyawa yang rentan panas (Fasya, dkk., 2016). Pelarut yang digunakan dalam metode ini adalah metanol, karena senyawa steroid yang terkandung dalam *Hydrilla verticillata* masih dalam bentuk glikosida yang bersifat polar (Luki, 2018). Hafiz (2017) dalam penelitiannya mendapatkan rendemen ekstrak kasar metanol lebih besar daripada ekstrak n-heksana dan kloroform *Hydrilla verticillata* yaitu sebesar 12,72 %.

Pemisahan senyawa metabolit sekunder yang lebih spesifik dapat diperoleh melalui proses hidrolisis dan partisi. Proses hidrolisis dilakukan dengan menggunakan HCl 2 N, hal tersebut dilakukan karena menurut Fasya, dkk. (2016) penambahan katalis asam dapat mempercepat reaksi pemutusan ikatan glikosida. Selanjutnya dilakukan partisi untuk mengambil senyawa target yaitu steroid yang mempunyai kesamaan kepolaran dengan pelarut. Partisi dilakukan secara bertingkat menggunakan pelarut petroleum eter dan etil asetat. Vania (2020) telah melakukan uji aktivitas antioksidan fraksi petroleum eter dan etil asetat dari ekstrak metanol *Hydrilla verticillata* dihasilkan nilai EC₅₀ berturut-turut sebesar 94,92 ppm dan 61,43 ppm.

Senyawa steroid pada *Hydrilla verticillata* diisolasi lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom untuk mendapatkan senyawa yang lebih murni. Pemisahan kromatografi kolom dilakukan secara elusi gradien agar senyawa

terpisahkan sesuai berdasarkan tingkat kepolarannya dan menghasilkan pemisahan senyawa steroid yang lebih banyak. Luki (2018) telah mengisolasi senyawa steroid menggunakan kromatografi kolom sistem gradien eluen dengan perbandingan n-heksana:etil asetat 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30 mL menghasilkan 4 isolat senyawa golongan steroid.

Fraksi yang dihasilkan dari pemisahan kromatografi kolom selanjutnya dimonitoring dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) untuk mengetahui tingkat kemurnian isolat yang didapat. Berdasarkan penelitian Wati (2020) pemisahan KLTA fraksi etil asetat dan petroleum eter *Hydrilla verticillata* dengan eluen n-heksana:etil asetat 17:3 menghasilkan pemisahan terbaik dengan jumlah noda terbanyak dan noda terduga steroid terlihat jelas pada kedua fraksi serta jarak antar noda terlihat jelas tidak berekor.

Isolat steroid yang dihasilkan selanjutnya diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH. Metode ini dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel (Sayuti, 2015). Identifikasi isolat steroid dilakukan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Hasil penelitian yang didapatkan diharapkan bisa memberikan pengetahuan serta wawasan baru khususnya dalam pemanfaatan *Hydrilla verticillata* sebagai sumber senyawa antioksidan alami.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana hasil isolasi senyawa steroid fraksi petroleum eter dan etil asetat *Hydrilla verticillata* hasil kromatografi kolom?

2. Bagaimana hasil uji aktioksidan isolat steroid fraksi petroleum eter dan etil asetat *Hydrilla verticillata* hasil kromatografi kolom terhadap DPPH?
3. Bagaimana hasil identifikasi isolat steroid fraksi petroleum eter dan etil asetat *Hydrilla verticillata* menggunakan Spektrofotometer UV-Vis?

1.3 Tujuan

Tujuan dalam penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui hasil isolasi senyawa steroid fraksi petroleum eter dan etil asetat *Hydrilla verticillata* hasil kromatografi kolom.
2. Untuk mengetahui hasil uji antioksidan isolat steroid fraksi petroleum eter dan etil asetat *Hydrilla verticillata* hasil kromatografi kolom terhadap DPPH.
3. Untuk mengetahui hasil identifikasi isolat steroid fraksi petroleum eter dan etil asetat *Hydrilla verticillata* menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Sampel *Hydrilla verticillata* yang digunakan diambil dari Danau Ranu Grati Pasuruan.
2. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut metanol.
3. Partisi menggunakan pelarut petroleum eter dan etil asetat.
4. Teknik pemisahan menggunakan kromatografi kolom gradien eluen n-heksana:etil asetat (19:1, 18:2, 17:3) 100 mL.
5. Uji antioksidan menggunakan metode DPPH.
6. Identifikasi isolat steroid menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

1.5 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai metode isolasi steroid dari *Hydrilla verticillata* dan identifikasinya menggunakan instrumen Spektrofotometer UV-Vis, serta memberikan informasi mengenai potensi antioksidan isolat steroid *Hydrilla verticillata* sehingga dapat meningkatkan pemanfaatannya dalam bidang kesehatan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tumbuhan dalam Perspektif Islam

Allah Swt. telah menciptakan berbagai macam makhluk hidup di bumi ini dengan manfaatnya masing-masing. Tidak ada satupun makhluk ciptaan Allah Swt. yang sia-sia. sebagaimana firman-Nya dalam QS. Ali 'Imran ayat 191:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمٰوٰتِ وَالْاَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هٰذَا بٰطِلًا سُبْحٰنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ (١٩١)

Artinya: (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri, duduk atau dalam keadaan berbaring, dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata), “Ya Tuhan kami, tidaklah Engkau menciptakan semua ini sia-sia; Mahasuci Engkau, lindungilah kami dari azab neraka”(QS. Ali 'Imran/3:191).

Menurut tafsir al-Misbah, رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هٰذَا بٰطِلًا (Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia) menjelaskan bahwa ia adalah sebagai natijah (hasil) dan kesimpulan upaya zikir dan pikir. Bisa juga dipahami zikir dan pikir itu mereka lakukan sambil membayangkan dalam benak mereka bahwa alam raya tidak diciptakan Allah sia-sia (Shihab, 2002). Hal ini menunjukkan bahwa segala sesuatu yang diciptakan Allah Swt. tidaklah sia-sia. Salah satu jenis ciptaan Allah Swt. adalah tumbuhan. Tumbuhan diciptakan dengan berbagai manfaat, sebagaimana firman Allah Swt. dalam QS. Luqman (31) ayat 10:

خَلَقَ السَّمٰوٰتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرْوٰهُمَا وَالْفِى فِي الْاَرْضِ رَواسِي اَنْ تَمِيْدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيْهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ وَاَنْزَلْنَا مِنَ السَّمٰوٰتِ مَآءً فَاَنْبَتْنَا فِيْهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيْمٍ (١٠)

Artinya: *Dia menciptakan langit tanpa tiang sebagaimana kamu melihatnya, dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi agar ia (bumi) tidak*

menggoyangkan kamu; dan memperkembangbiakkan segala macam jenis makhluk bergerak yang bernyawa di bumi. Dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuhan yang baik (QS. Luqman/31:20).

Menurut tafsir al-Misbah, kata **كَرِيم** digunakan untuk menyifati segala sesuatu yang baik sesuai obyeknya. Pasangan tumbuhan yang karim adalah yang tumbuh subur dan menghasilkan apa yang diharapkan dari penanamannya (Shihab, 2002). *Hydrilla verticillata* merupakan salah satu tumbuhan ciptaan Allah Swt. yang memiliki berbagai manfaat, antara lain sebagai antitumor (Araki, dkk., 2003), antikonvulsan (Das, dkk., 2015), antimalaria (Annie, dkk., 2016), antibakteri (Jannah, 2020), antimikroba (Prabha & Rajkumar, 2015) dan antioksidan (Pal dan Nimse, 2006), terlepas dari anggapan sebagian manusia yang menganggap tumbuhan ini sebagai gulma (Baniszewski, dkk., 2016). Sebagai manusia yang ulul albab, kita perlu berusaha untuk menggali manfaat dari *Hydrilla verticillata* ini dengan melakukan sebuah penelitian. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menimbulkan rasa tawakkal, berserah diri, serta lebih mengagungkan kebesaran Allah Swt.

2.2 *Hydrilla verticillata*

Hydrilla verticillata adalah tanaman air yang sering ditemukan di sungai, waduk, dan danau (Fasya, dkk., 2020). dan pertama kali ditemukan di Amerika Serikat dekat Miami, FL dan di Crystal River, FL pada tahun 1960 (Baniszewski, dkk., 2016). *Hydrilla verticillata* dianggap sebagai salah satu gulma air berbahaya di dunia yang penyebarannya sangat cepat (Byju, dkk., 2013).

Menurut Ramesh, dkk. (2014), tumbuhan *Hydrilla verticillata* memiliki klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Liliopsida
Ordo : Hydrocharitales
Suku : Hydrocharitaceae
Genus : Hydrilla
Spesies : *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle

Hydrilla verticillata memiliki batang berwarna hijau, tegak, ramping, bercabang dan jarang memiliki bunga. Daun *Hydrilla verticillata* berwarna hijau tipis, dengan tepi bergerigi dan berduri, memiliki lebar 2-4 mm dan panjang 6-20 mm, setiap tiga atau empat helai daun tumbuh melingkar dan membentuk ruas-ruas pada batang tanaman. Tangkai daun berwarna hijau dan berdiameter 0,1 mm. Pelepah daun sering berwarna merah dan memiliki satu duri di bawah permukaannya (Marer dan Garvey, 2001). Adapun tumbuhan *Hydrilla verticillata* ditunjukkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2. 1 *Hydrilla verticillata*

Hydrilla verticillata dapat bertahan hidup di kedalaman air mulai dari beberapa sentimeter hingga kedalaman 14 m dan tumbuh hingga 2,5 cm per hari

(Prabha, dkk., 2020). Kandungan unsur hara terlarut, reaksi aktif dan mineralisasi air, jenis sedimen dasar, penerangan, dan laju aliran tidak secara signifikan membatasi pertumbuhan dan persebaran *Hydrilla verticillata* (Efremov, dkk., 2020). Pertumbuhan *Hydrilla verticillata* yang berlebihan, dapat membentuk lapisan tebal di permukaan air yang dapat mengurangi laju aliran air, merusak bendungan, dan mengganggu aktivitas berperahu dan memancing (Prabha, dkk., 2019), sehingga keberadaannya kurang diharapkan.

Hydrilla verticillata mengandung 1,74% protein, 0,54% lemak, 1,82% serat kasar, 1,51% abu, 3,97% karbohidrat dan 90,42% air (Tanor, 2004). Menurut Kurniawan dkk. (2010) *Hydrilla verticillata* memiliki kandungan klorofil total sebesar 4,43 mL/g, karotenoid 0,92 mL/g dan vitamin C 4,70 mg/30 g. *Hydrilla verticillata* juga mengandung beberapa kandungan kimia di antaranya saponin, polisakarida, dan juga beberapa kandungan nutrisi seperti pada Tabel 2.1. (Pal dan Nimse, 2006).

Tabel 2. 1 Kandungan nutrisi *Hydrilla verticillata* (Pal dan Nimse, 2006).

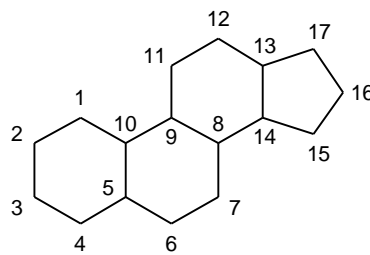
Nutrisi/mineral	Jumlah (mg/10,5 g)	Nutrisi/mineral	Jumlah (mg/10,5 g)
Vitamin B-1	26,2	Magnesium	76,1
Vitamin B-2	0,08	Potassium	245
Vitamin B-3	5,20	Fosfor	29,7
Vitamin B-5	11,4	Besi	35,8
Vitamin B-6	35,9	Zink	6,30
Vitamin B-12	1,10	Mangan	24,5
Kalsium	1460	Tembaga	0,20
Kobalt	0,40	molibdenum	15 µg
B-karoten	19600 IU		

Penelitian yang dilakukan Prabha, dkk. (2019) menunjukkan bahwa ekstrak etanol *Hydrilla verticillata* mengandung senyawa fenol, saponin, alkaloid, tanin, dan terpenoid. Sementara Amalia, dkk. (2018) menyebutkan bahwa ekstrak etanol *Hydrilla verticillata* mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid dan

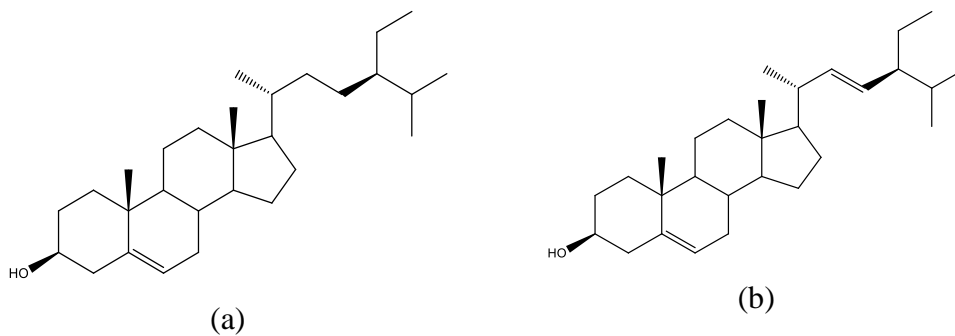
triterpenoid. Prabha dan Rajkumar (2015) melaporkan bahwa *Hydrilla verticillata* mengandung *bicyclo heptane, 2,6,6-trimethyl-2- pentadecanone, hexadecanoic acid, ethyl ester, phytol, linolenic acid ethyl ester,* dan *9,12,15- octadecatrienoic acid ethyl ester.*

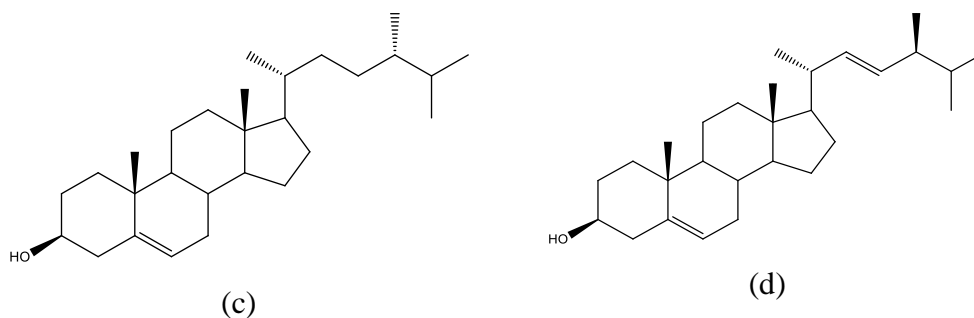
2.3 Senyawa Steroid

Steroid merupakan kelompok senyawa bahan alam yang kebanyakan strukturnya terdiri atas 17 karbon dengan membentuk struktur 1,2-siklopentenoperhidrofenantren yang ditunjukkan pada gambar 2.2. Pengelompokan senyawa steroid bergantung pada gugus fungsi yang terikat pada kerangka dasar rantai karbon (Kristanti, dkk., 2008). Beberapa struktur senyawa steroid pada tumbuhan (fitosterol) ditunjukkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2. 2 Struktur dasar senyawa steroid (Kristanti, dkk., 2008).





Gambar 2. 3 Struktur kimia beberapa fitosterol (a) β -sitosterol (b) stigmasterol (c) kampesterol (d) brassicasterol (Decloedt, dkk., 2016).

Ditinjau dari segi struktur, perbedaan antara berbagai kelompok steroid ditentukan oleh jenis substituent yang terikat pada kerangka dasar sedangkan perbedaan antara senyawa yang satu dengan senyawa yang lain dari satu kelompok ditentukan oleh panjangnya rantai karbon substituent, gugus fungsi yang terdapat pada substituent, jumlah dan posisi gugus fungsi oksigen serta ikatan rangkap pada kerangka dasar serta konfigurasi pusat asimetris pada kerangka dasar (Endarini, 2016).

Steroid tersusun dari isopren-isopren dari rantai panjang hidrokarbon sehingga menyebabkan sifatnya nonpolar. Beberapa senyawaan steroid mengandung gugus hidroksil yang terletak pada C-3 sehingga disebut sterol (Robinson, 1995). Senyawa steroid yang berada pada tumbuhan disebut dengan fitosterol, sementara yang terdapat pada hewan disebut zoolesterol, dan di fungi disebut mikosterol (Vembriarto, 2013). Senyawa steroid dapat digunakan sebagai antibakteri (Lalitha dkk., 2010), antifungi (Saraswathi, dkk., 2010), antimikroba (Contini, dkk., 2003), anti-inflamasi (Patel dan Savjani, 2015), dan antioksidan (Fasya, dkk., 2020; Vania, 2020).

Keberadaan senyawa steroid dalam ekstrak maupun fraksi dalam sampel dapat diketahui dengan penambahan reagen *Liebermann-Burchard* (LB). Prinsip

dasar dari uji LB adalah senyawa steroid mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat yang akan membentuk garam dan mengalami perpanjangan konjugasi dengan memberikan warna hijau kebiruan (Robinson, 1995).

Azah (2018) dalam penelitiannya berhasil mengisolasi steroid berupa senyawa β -sitosterol dan kampesterol dari ekstrak n-heksana dan petroleum eter *Hydrilla verticillata*. Sementara Salima (2019) berhasil mengisolasi senyawa steroid berupa senyawa β -sitosterol dan stigmasterol dari fraksi n-heksana *Hydrilla verticillata* yang dipisahkan menggunakan kromatografi kolom dan didapatkan juga nilai EC_{50} sebesar 24,48 ppm. Sedangkan Fasya, dkk. (2019) berhasil mengisolasi senyawa steroid berupa senyawa β -sitosterol dari fraksi n-heksana *Hydrilla verticillata* yang dipisahkan menggunakan KLTP dan didapatkan juga nilai EC_{50} sebesar 5,109 ppm.

2.4 Isolasi Senyawa Steroid

2.4.1 Ekstraksi Senyawa Steroid Menggunakan Metode Maserasi

Ekstraksi digunakan untuk memperoleh kandungan senyawa kimia yang larut pada pelarut. Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada suhu ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena melalui perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan (Darwis, 2000). Pada proses maserasi perlu dilakukan pengocokan untuk meratakan konsentrasi larutan di luar simplisia (Jaya,

2007).

Kelebihan metode ini adalah sederhana, tidak memerlukan alat-alat yang rumit dan relatif murah (Kiswandono, 2011). Hasil penelitian Sayuti (2017) menunjukkan bahwa hasil rendemen metode maserasi lebih besar (7,7%) dibandingkan dengan metode ekstraksi ultrasonik (5,63%). Sementara Daud, dkk. (2011) menyatakan bahwa aktivitas antioksidan daun jambu biji menggunakan ekstraksi maserasi lebih tinggi daripada ekstraksi soxhlet.

Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut. Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan pelarut yaitu dapat melarutkan senyawaan sesuai kepolarannya, memiliki titik didih rendah sehingga mudah diuapkan, bersifat inert, dan harga terjangkau (Guenther, 1987). Pelarut yang sering dipakai dalam ekstraksi maserasi adalah metanol, karena memiliki konstanta dielektrikum yang tinggi yaitu 33,60 yang menandakan bersifat sangat polar. Kepolaran metanol mampu melarutkan senyawa metabolit sekunder yang polar dan juga non polar (masih berikatan dengan glikon). Metanol memiliki titik didih 64°C sehingga mudah teruapkan pada suhu rendah (Atun, 2014).

Pemilihan pelarut metanol merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Hafiz (2017) telah melakukan ekstraksi maserasi terhadap *Hydrilla verticillata* menggunakan variasi pelarut berupa metanol, kloroform, dan n-heksana menghasilkan rendemen berturut-turut sebesar 12,72; 4,96; dan 3,80%. Sementara Ikfi (2017) melakukan uji antioksidan terhadap ekstrak metanol, kloroform, dan n-heksana dari *Hydrilla verticillata* menghasilkan nilai EC₅₀ berturut-turut sebesar 256,6; 457,6; dan 2763 ppm. Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat diketahui

bahwa ekstrak metanol *Hydrilla verticillata* selain mempunyai rendemen terbanyak, juga mempunyai aktivitas antioksidan tertinggi dibandingkan dengan ekstrak kloroform dan n-heksana.

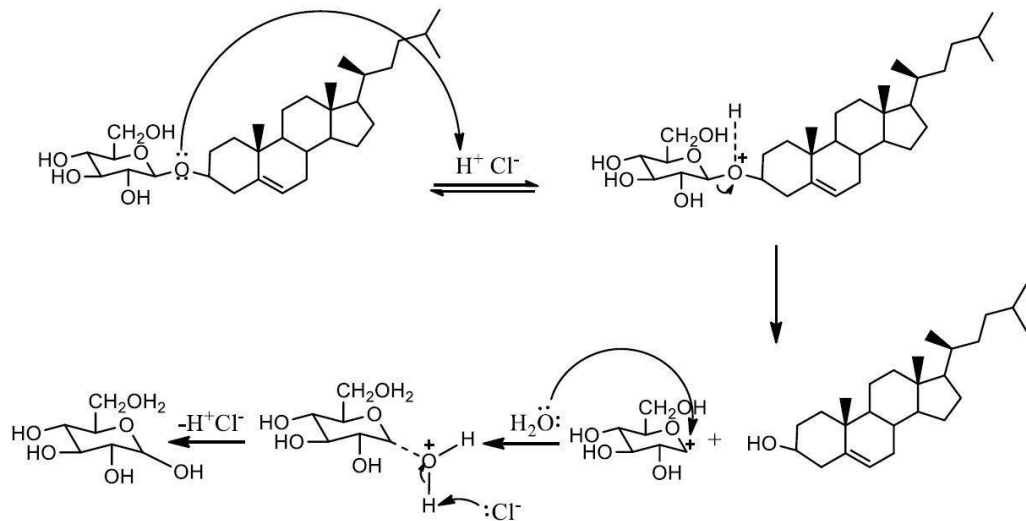
2.4.2 Hidrolisis dan Partisi

Pemisahan senyawa metabolit sekunder yang lebih spesifik dapat diperoleh melalui proses hidrolisis dan partisi. Senyawa organik yang ada di dalam tanaman umumnya berbentuk glikosida yaitu terdiri dari gula (glikon) dan senyawa bukan gula (aglikon). Senyawa metabolit sekunder tergolong senyawa aglikon (Fasya, dkk., 2016). Untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder dapat dilakukan dengan pemutusan ikatan glikosida menggunakan reaksi hidrolisis (Saifudin, dkk., 2006).

Reaksi hidrolisis menggunakan air berlangsung sangat lambat sehingga memerlukan bantuan katalisator (Nihlati, dkk., 2008). Katalis yang sering digunakan adalah katalis asam seperti asam klorida dan asam sulfat (Artati, dkk., 2012). Katalis asam yang digunakan dalam penelitian ini adalah HCl 2 N karena asam kuat akan lebih mudah melepas proton (H^+) secara sempurna di dalam air. Semakin banyak proton yang terionisasi dalam air, maka semakin kuat peranan proton dalam pemutusan ikatan glikosida (Handoko, 2006). Selain itu, HCl akan membentuk garam NaCl yang tidak berbahaya pada saat proses penetralan dengan $NaHCO_3$ (Saleh, dkk., 2016).

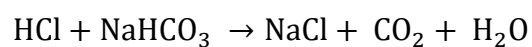
Penggunaan HCl 2 N merujuk pada penelitian yang dilakukan Artati, dkk. (2012) tentang pengaruh jenis dan konsentrasi asam terhadap reaksi hidrolisis, didapatkan hasil bahwa jenis asam dan konsentrasi yang optimum untuk reaksi hidrolisis pada pelepah pisang (*Musa Paradisiaca* L.) yaitu HCl dengan konsentrasi

2 N. Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis pada senyawa steroid dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2. 4 Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida (Vania, 2020)

Menurut Wahyudi dkk. (2011) penggunaan asam kuat seperti HCl pada proses hidrolisis lebih baik dibandingkan menggunakan H_2SO_4 karena sifatnya yang lebih reaktif. Reaksi hidrolisis bersifat *reversible* sehingga dapat dihentikan dengan penambahan natrium bikarbonat (NaHCO_3) yang dapat menetralkan kondisi asam pada larutan. Reaksi penetralan ditampilkan di bawah ini.



Gambar 2.5 Reaksi netralisasi asam (Day dan Underwood, 1993)

Setelah hasil hidrolisis netral maka dilakukan partisi untuk mengambil senyawa target menggunakan pelarut yang memiliki kepolaran yang berbeda, sehingga dalam proses ini terdapat dua lapisan yang tidak saling bercampur, dan diduga pelarut yang bersifat polar (fase air) akan mengekstrak komponen gula (glikon), sedangkan pelarut semi polar maupun non polar (fase organik) akan

mengekstrak metabolit sekunder (aglikon) yang sudah terpisah dengan komponen gula. Senyawa steroid bersifat nonpolar sehingga akan lebih terdistribusi pada fase organik (Mardiyah, dkk., 2014).

Partisi pada penelitian ini dilakukan secara bertingkat menggunakan pelarut petroleum eter dan etil asetat, yang mana kedua pelarut tersebut memiliki kepolaran yang berbeda. Proses partisi dengan pelarut yang berbeda kepolaran ini dimaksudkan agar senyawa-senyawa yang memiliki kepolaran yang berbeda dapat terekstrak ke dalam pelarut yang sesuai. Amalia, dkk. (2018) melakukan partisi pada ekstrak etanol *Hydrilla verticillata* menggunakan pelarut petroleum eter dan etil asetat menghasilkan rendemen pada fraksi petroleum eter sebesar 30,27% dan pada fraksi etil asetat sebesar 38,80% dan positif mengandung steroid. Sementara Anggraeni, dkk. (2014) menunjukkan bahwa fraksi petroleum eter (27,26 ppm) *Chlorella sp.* memiliki aktivitas antioksidan tertinggi daripada fraksi kloroform (182 ppm), fraksi n-heksana (173,7 ppm), fraksi etil asetat (332,7 ppm), dan ekstrak metanol (1334 ppm).

2.4.3 Kromatografi Kolom

Isolasi senyawa steroid *Hydrilla verticillata* dilakukan menggunakan kromatografi kolom yang tergolong dalam pemisahan preparatif yang dapat menghasilkan isolat dalam jumlah yang cukup besar. Prinsip dasar kromatografi kolom adalah suatu pemisahan yang didasarkan pada prinsip adsorpsi (Sastrohamidjojo, 2005). Efisiensi pemisahan menggunakan kromatografi kolom dipengaruhi oleh adsorben, eluen, diameter kolom dan laju alir (Fasya, dkk., 2018). Menurut Kristanti, dkk. (2008) faktor yang paling berperan pada keberhasilan

pemisahan dengan kromatografi kolom adalah pemilihan adsorben, pemilihan pelarut, dan pengemasan kolom.

Fasa diam yang digunakan pada penelitian ini yaitu silika gel G-60 dengan ukuran 0,063-0,200 mm (Maryam, dkk., 2020) dengan rasio sampel:silika adalah 1:150 (Fasya, dkk., 2018). Pengemasan kolom dilakukan dengan cara basah karena menghasilkan pemisahan yang lebih baik daripada cara kering. Hal tersebut dibuktikan oleh penelitian Handoko (2016) yang telah melakukan isolasi senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* dengan cara basah mendapatkan isolat sebanyak 7,7 mg dengan 5 fraksi yang murni dan cara kering 7 mg dengan 2 fraksi. Kolom yang digunakan berdiameter 1 cm dengan panjang 50 cm (Fasya, dkk., 2018) dengan kecepatan laju alir 2 mL/menit (Fitri, 2017).

Pemilihan fasa gerak merupakan langkah penting untuk menentukan keberhasilan isolasi senyawa. Eluen yang digunakan dalam penelitian ini adalah n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 19:1; 18:2; dan 17:3. Variasi cenderung bersifat non polar, karena senyawa steroid bersifat nonpolar. Luki (2018) mengisolasi senyawa steroid fraksi etil asetat dari makroalga *Eucheuma cottonii* dengan eluen n-heksana dan etil asetat 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30 mL. Hasil isolasi dihasilkan eluen terbaik pada perbandingan eluen 95:5 dan 90:10 mL atau (19:1 dan 18:2) yang berhasil memisahkan 4 isolat senyawa golongan steroid. Sementara Madjid, dkk. (2020) telah melakukan isolasi steroid dan triterpenoid alga merah *Eucheuma cottonii* dengan variasi komposisi eluen n-heksana:etil asetat 16:4; 17:3; 18:2, diperoleh variasi eluen terbaik perbandingan 18:2 yang dihasilkan 2 fraksi steroid dan 3 fraksi triterpenoid.

Penelitian ini menggunakan metode elusi gradien, yaitu selama elusi menggunakan eluen yang berubah-ubah sifat kepolarannya. Pemisahan dilakukan dari fase gerak yang bersifat nonpolar ke pelarut yang lebih polar. Gradien eluen digunakan untuk meningkatkan resolusi campuran yang kompleks, terutama jika sampel memiliki kisaran polaritas yang luas (Gandjar dan Rohman, 2007). Menurut Tonius, dkk. (2016) metode elusi gradien dapat dilakukan untuk menghasilkan fraksi murni senyawa target dalam jumlah besar.

2.4.4 Monitoring Menggunakan KLTA

Monitoring hasil isolasi senyawa dari kromatografi kolom dapat dilakukan dengan menggunakan KLTA. Ilyas, dkk. (2015) menganalisis hasil fraksinasi Kromatografi Kolom Cair Vakum (KCV) ekstrak n-heksana kulit batang kayu bitti (*Vitex cofassus*) menggunakan KLT dengan tujuan pengelompokkan lebih lanjut terhadap fraksi-fraksi yang diperoleh berdasarkan kesamaan profil kandungan kimia dari bercak KLT yang terbentuk dengan nilai *Retention factor* (R_f) yang sama. Identifikasi dari senyawa yang telah terpisah dapat dilakukan menggunakan nilai R_f sebagai dasar penggabungan isolat hasil kromatografikolom yang mempunyai nilai R_f sama dengan persamaan (Kusmiyati, dkk., 2011):

$$\text{Harga } R_f = \frac{\text{jarak tempuh senyawa}}{\text{jarak tempuh pelarut}}$$

Keberhasilan dalam pemisahan steroid dari komponen yang lainnya pada monitoring KLTA didasarkan pada pemilihan fasa gerak. Fase gerak untuk KLTA yang digunakan dalam penelitian ini berupa campuran dua komponen, n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 17:3. Wati (2020) menunjukkan bahwa eluen terbaik yang digunakan untuk pemisahan steroid fraksi etil asetat dan

petroleum eter *Hydrilla verticillata* dengan KLTA adalah n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17:3. Hal tersebut dibuktikan melalui hasil pemisahan KLTA yang ditunjukkan pada tabel 2.2.

Tabel 2. 2 Hasil pemisahan KLTA fraksi etil asetat dan petroleum eter *Hydrilla verticillata* (Wati, 2020)

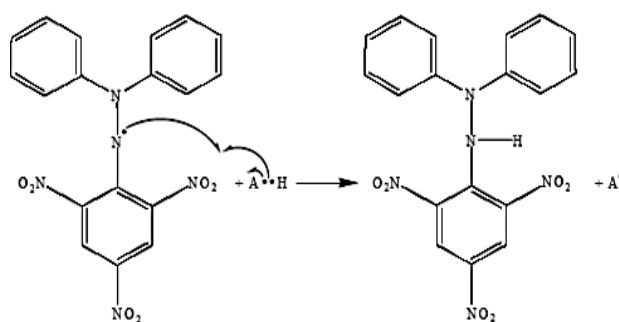
Variasi Eluen (n-hesana:etil asetat)	Fraksi	Jumlah Noda pada 366 nm	Jumlah noda terduga steroid
15:5	Etil asetat	9	1
	Petroleum eter	10	0
16:4	Etil asetat	7	1
	Petroleum eter	11	0
17:3	Etil asetat	5	1
	Petroleum eter	9	1
18:2	Etil asetat	3	1
	Petroleum eter	6	1
19:1	Etil asetat	1	1
	Petroleum eter	2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

Berdasarkan Tabel 2.2, dapat diketahui bahwa variasi eluen 17:3 merupakan eluen dengan perbandingan terbaik karena dapat menghasilkan 5 noda pada fraksi etil asetat dan 9 noda pada petroleum eter dengan masing-masing 1 noda berwarna hijau kebiruan yang diduga sebagai noda steroid.

2.4.5 Uji Antioksidan *Hydrilla verticillata* dengan Metode DPPH

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (elektron donor) atau reduktan. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) merupakan suatu radikal bebas yang stabil selama bertahun-tahun jika disimpan dalam keadaan kering dan kondisi penyimpanan yang baik (Molyneux, 2004). Metode DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel.

Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning yang diukur pada panjang gelombang 515 nm (Lailiyah, dkk., 2014). Saat elektron tunggal pada DPPH berpasangan dengan hidrogen dari senyawa antioksidan, warna DPPH yang semula ungu akan berubah menjadi kuning, membentuk senyawa *1,1-difenil-2-pikrilhidrazin* (DPPH-H) (Dehpour, dkk., 2009; Ionita, 2005). Mekanisme penangkapan radikal bebas oleh senyawa antioksidan ditunjukkan pada Gambar 2.6.



Gambar 2. 6 Reaksi radikal DPPH dengan antioksidan (Sayuti, 2015)

Persen (%) aktivitas antioksidan merupakan salah satu parameter yang menunjukkan kemampuan suatu antioksidan dalam menghambat radikal bebas. Semakin tinggi persen (%) aktivitas antioksidan menunjukkan banyaknya atom hidrogen yang diberikan senyawa aktif kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazin*) (Mardiyah, dkk., 2014). Persen (%) aktivitas antioksidan yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan persamaan regresi non linear menggunakan *GraphPad prism7 software, Regression for analyzing dose-response data*, sehingga nantinya didapatkan nilai EC_{50} dari sampel. EC_{50} (*Effective concentration*) merupakan parameter yang menunjukkan konsentrasi ekstrak uji yang mampu menangkap radikal sebanyak 50%. Semakin

kecil nilai EC_{50} suatu senyawa uji maka senyawa tersebut semakin aktif sebagai penangkap radikal bebas atau antioksidan. Dengan kata lain EC_{50} merupakan konsentrasi yang dibutuhkan untuk menurunkan sebesar 50% dari konsentrasi substrat (radikal DPPH) (Mardiyah, dkk., 2014). Ketentuan kekuatan antioksidan dapat dirangkum pada Tabel 2.3.

Tabel 2. 3 Ketentuan aktivitas antioksidan (Molyneux, 2004)

Nilai EC_{50} (ppm)	Kategori
<50	Sangat kuat
50-100	Kuat
100-150	Sedang
150-200	Lemah
>200	Sangat Lemah

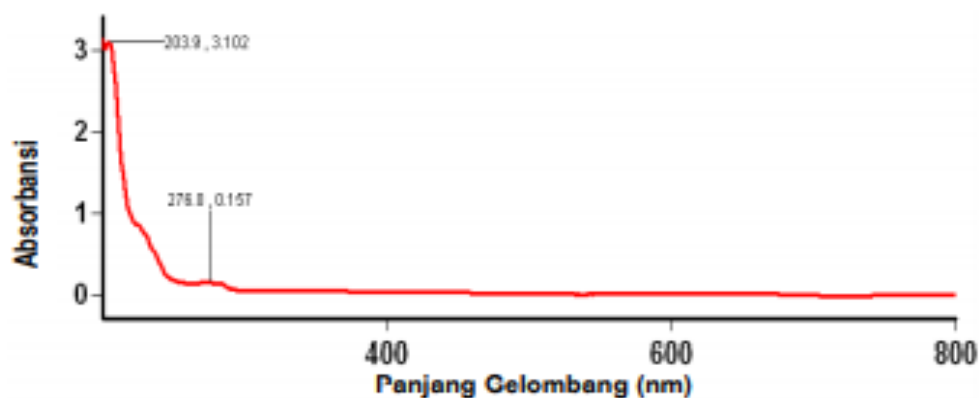
2.4.6 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis didasarkan pada interaksi antara materi dengan radiasi elektromagnetik. Apabila seberkas radiasi (cahaya) dikenakan pada cuplikan (larutan sampel), maka sebagian dari cahaya diserap molekul tersebut. Kisaran panjang gelombang untuk radiasi UV-Vis adalah 200-800 nm. Untuk radiasi UV, kisaran panjang gelombangnya adalah 200-400 nm, sementara radiasi sinar tampak mempunyai kisaran panjang gelombang 400-800 nm. Radiasi pada kisaran ini (200-800 nm) mempunyai energi yang cukup untuk mengeksitasi elektron valensi dalam beberapa molekul. Spektroskopi UV-Vis termasuk ke dalam kelompok spektroskopi molekuler, karena melibatkan eksitasi elektron valensi suatu molekul (Gandjar dan Rohman, 2015).

Interaksi sinar ultraviolet atau sinar tampak menghasilkan transisi elektronik dari elektron-elektron ikatan, baik ikatan sigma (σ) dan pi (π) maupun elektron non ikatan (n) yang ada dalam molekul organik. Transisi elektronik yang terjadi merupakan perpindahan elektron dari orbital ikatan atau non ikatan ke tingkat

orbital antiikatan atau disebut dengan tingkat eksitasi. Orbital ikatan atau non ikatan sering disebut dengan orbital dasar, sehingga transisi elektron sering dinyatakan sebagai transisi elektron dari tingkat dasar ke tingkat tereksitasi (Suhartati, 2017). Transisi-transisi elektronik yang terjadi di antara tingkat-tingkat energi di dalam suatu molekul ada 4, yaitu transisi sigma-sigma *star* ($\sigma \rightarrow \sigma^*$) yang melibatkan elektron sigma, transisi *n*-sigma *star* ($n \rightarrow \sigma^*$) dan transisi *n*-*phi* *star* ($n \rightarrow \pi^*$) yang melibatkan elektron tidak berpasangan, serta transisi *phi*-*phi* *star* yang melibatkan elektron-elektron *phi* ($\pi \rightarrow \pi^*$) (Gandjar dan Rohman, 2015).

Fasya, dkk. (2019) melakukan identifikasi isolat steroid hasil kromatografi lapis tipis dari fraksi n-heksana *Hydrilla verticillata* menghasilkan spektrum seperti pada Gambar 2.7. Berdasarkan spektrum tersebut, dihasilkan serapan maksimum pada panjang gelombang 203,9 dan 276 nm. Panjang gelombang 203,9 nm menunjukkan bahwa terdapat ikatan C=C tidak terkonjugasi dengan transisi π - π^* , sedangkan panjang gelombang 276 nm menunjukkan bahwa hasil isolasi ini memiliki ikatan rangkap terkonjugasi.



Gambar 2. 7 Spektra UV-Vis pada isolat steroid hasil KLTP fraksi n-heksana (Fasya, dkk., 2019)

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Juni sampai Juli 2021.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, kertas saring, *Erlenmeyer* vakum, corong *Buchner*, timbangan analitik, spatula, *shaker*, *vacuum rotary evaporator*, desikator, kolom silika, statif, pipa kapiler, bola hisap, pipet tetes, gunting, botol vial, oven, cawan porselen, tabung reaksi, rak tabung reaksi, blender, dan bejana KLT. Instrumentasi yang digunakan yaitu Spektrofotometer UV-Vis.

3.2.2 Bahan

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Hydrilla verticillata* dari danau Ranu Grati, Pasuruan. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah metanol, NaHCO₃, HCl 2 N, petroleum eter, etil asetat, asam asetat anhidrat, kloroform, H₂SO₄, DPPH, plat silika gel GF₂₅₄, n-heksana dan silika gel G-60.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dimulai dengan pengambilan sampel *Hydrilla verticillata* di Danau Ranu Grati Pasuruan. Sampel kemudian dibersihkan, dikeringkan, dan

dihaluskan hingga ukurannya 90 mesh. Serbuk yang didapat ditentukan kadar airnya kemudian dimaserasi selama 3x24 jam menggunakan metanol dengan perbandingan 1:5. Hasil maserasi dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* kemudian dihidrolisis menggunakan HCl 2 N dan dipartisi bertingkat menggunakan petroleum eter dan etil asetat. Kemudian hasil partisi diuji fitokimia menggunakan *Lieberman Burchard*. Isolasi senyawa steroid dengan metode kromatografi kolom dengan gradien eluen n-heksana:etil asetat (19:1, 18:2, 17:3) 100 mL. Monitoring hasil kromatografi kolom menggunakan KLT dengan eluen n-heksana:etil (17:3). Uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH. Isolat steroid dengan aktivitas antioksidan terbaik dianalisis menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

3.4 Tahapan Penelitian

Tahapan-tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu:

1. Preparasi sampel
2. Penentuan kadar air secara termogravimetri
3. Ekstraksi senyawa steroid
4. Hidrolisis dan partisi ekstrak metanol
5. Uji steroid dengan *Lieberman Burchard*
6. Isolasi senyawa steroid dengan metode kromatografi kolom
7. Monitoring dengan kromatografi lapis tipis analitik
8. Uji aktivitas antioksidan dengan DPPH
9. Identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis
10. Analisis data

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Preparasi Sampel

Pengambilan sampel *Hydrilla verticillata* di Danau Ranu Grati Pasuruan sebanyak 8,66 Kg. Kemudian sampel dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan (tidak terkena sinar matahari secara langsung) selama 7 hari. Setelah itu, sampel kering dihaluskan dengan ukuran 90 mesh di Materia Medika Batu (Sulistiyani, 2018).

3.5.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri

Penentuan kadar air, dilakukan dengan cara menyiapkan cawan porselen, lalu cawan dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C sekitar 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya. Kemudian cawan dimasukkan ke dalam desikator selama 10 menit, lalu ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Setelah itu, sebanyak 5 gram sampel dimasukkan dalam cawan porselen, kemudian dimasukkan dalam oven dan dikeringkan pada suhu 105°C selama ±15 menit, kemudian sampel disimpan dalam desikator sekitar ±10 menit dan ditimbang. Sampel tersebut dipanaskan kembali dalam oven ±15 menit, didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali hingga berat konstan. Kadar air dalam *Hydrilla verticillata* dihitung menggunakan persamaan berikut (Hanapi, dkk., 2013):

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

Di mana:

a = bobot cawan kosong

b = bobot sampel + cawan (sebelum dikeringkan)

c = bobot cawan + sampel (setelah dikeringkan)

3.5.3 Ekstraksi Senyawa Steroid

Ekstraksi komponen aktif dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi (perendaman). Sampel *Hydrilla verticillata* yang telah dihaluskan, ditimbang sebanyak 50 g, lalu dimasukkan ke dalam Erlenmeyer tutup. Setelah itu, ditambahkan 250 mL pelarut metanol serta dilakukan pengocokan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Ekstrak hasil perendaman disaring menggunakan corong Buchner. Residu yang diperoleh dimaserasi kembali menggunakan pelarut yang sama sebanyak 3 kali pengulangan dengan perlakuan yang sama hingga filtrat yang dihasilkan bening, setelah itu dilakukan penyaringan. Ketiga filtrat yang diperoleh digabung menjadi satu, kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang lalu dihitung rendemennya dengan persamaan berikut (Sulistiyani, 2018):

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

3.5.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol

Ekstrak pekat metanol diambil sebanyak 5 gr, kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* 100 mL. Setelah itu, ditambahkan 10 mL HCl 2 N dan *distirrer* dengan *hot plate stirrer* selama 1 jam pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan NaHCO₃ jenuh hingga pH-nya netral. Hidrolisat yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Hidrolisat selanjutnya diekstraksi bertingkat dengan pelarut ptroleum eter dengan volume 25 mL sebanyak 3 kali. Setelah itu, fraksi air yang didapatkan dipartisi dengan pelarut etil asetat dengan volume 25 mL sebanyak 3 kali. Fraksi petroleum eter dan etil asetat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator vacum* kemudian ditimbang dan dihitung rendemennya menggunakan rumus (Anggraeni, dkk., 2014):

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

3.5.5 Uji Steroid dengan *Lieberman Burchard*

Sebanyak 1 mg ekstrak pekat ditambahkan 0,5 mL kloroform dan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Setelah itu, larutan ditambahkan dengan 1-2 mL H₂SO₄ pekat. Adanya steroid ditunjukkan dengan warna hijau kebiruan pada larutan (Amalia dkk., 2018).

3.5.6 Isolasi Senyawa Steroid dengan Metode Kromatografi Kolom

Proses isolasi steroid *Hydrilla verticillata* menggunakan kromatografi kolom basah dengan metode elusi gradien. Fase diam yang digunakan adalah silika gel G-60 sebanyak 10 g yang telah diaktivasi dalam oven selama 2 jam pada suhu 110°C lalu didinginkan dan dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit. Bubur silika dibuat dengan cara silika gel yang telah diaktivasi, dicampur dengan 20 mL pelarut n-heksana:etil asetat (19:1) dan dihomogenkan selama ±1 jam, kemudian dimasukkan ke dalam kolom dan didiamkan selama 24 jam. Setelah itu, 0,067 g sampel dilarutkan dengan 1 mL eluen n-heksana: etil asetat (19:1) dan dimasukkan dalam kolom berdiameter 1 cm dengan panjang kolom 50 cm. (Fasya, dkk., 2018). Proses elusi dilakukan secara gradien eluen dengan perbandingan n-heksana:etil asetat (19:1, 18:2, 17:3) masing- masing 100 mL. Kran dibuka dengan kecepatan alir diatur 2 mL/menit dan eluat ditampung pada botol vial tiap 2 mL.

3.5.7 Monitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik

Identifikasi fraksi hasil isolasi kromatografi kolom dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis analitik (KLTA), yang mana fase diamnya adalah plat silika

gel GF₂₅₄ dan fase geraknya berupa pelarut campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17:3 (Wati, 2020). Fraksi ditotolkan pada plat silika gel yang telah diaktivasi kemudian dimasukkan ke dalam bejana pengembang yang berisikan eluen yang sudah dijenuhkan dan dielusi sampai tanda batas atas. Noda/bercak hasil pemisahan dideteksi dengan menyemprotkan reagen *Liebermann-Burchard* (LB) kemudian diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, lalu dianalisis terbentuknya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid (Amalia, dkk., 2018). Eluat yang mempunyai *R_f* (*Retention factor*) dan bercak yang sama dikumpulkan menjadi satu sebagai fraksi yang sama. Fraksi yang menunjukkan hasil positif steroid digabungkan.

3.5.8 Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH

3.5.8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 3 mL etanol 95%. Kemudian ditutup tabung reaksi dengan aluminium foil dan dihomogenkan. Setelah itu, dimasukkan ke dalam kuvet dan dicari λ_{maks} larutan serta dicatat hasil pengukuran λ_{maks} untuk digunakan pada tahap selanjutnya.

3.5.8.2 Pengukuran Potensi Antioksidan Sampel

Isolat hasil kromatografi kolom fraksi petroleum eter dan etil asetat divariasikan konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm dalam etanol 95%. Isolat masing-masing konsentrasi dipipet 3 mL ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 mL. Setelah itu campuran isolat dan DPPH diinkubasi dengan suhu 37°C selama 30 menit, lalu diukur absorbansinya pada λ_{maks} yang telah diperoleh.

Data absorbansi yang diperoleh dari tiap konsentrasi masing-masing isolat dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya. Nilai tersebut diperoleh dengan rumus:

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{A_o - A_c}{A_o} \times 100\% \dots \dots \dots (3.5)$$

Di mana, A_o = Absorbansi control, A_c = Absorbansi sampel

Kontrol yang digunakan yaitu Larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 mL dalam 3 mL etanol 95%.

Nilai % aktivitas antioksidan yang diperoleh kemudian digunakan untuk menghitung nilai EC_{50} dengan prinsip regresi nonlinear menggunakan program “*GraphPad Prism8, Regression for analyzing doseresponse data*”.

3.5.9 Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Isolat steroid hasil kromatografi kolom fraksi petroleum eter dan etil asetat diidentifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Konsentrasi isolat yang dipakai adalah 5 ppm. Isolat steroid *Hydrilla verticillata* dilarutkan dalam etanol. Kemudian isolat steroid dimasukkan ke dalam kuvet lalu dianalisis pada rentang panjang gelombang 200-800 nm.

3.5.10 Analisis Data

Analisis dilakukan dengan mendeskripsikan pola pemisahan berdasarkan monitoring dari hasil kromatografi kolom. Monitoring didasarkan pada pengukuran jarak (R_f) dan warna spot pada plat KLT. Data persen aktivitas antioksidan dianalisis menggunakan persamaan regresi nonlinear dengan menggunakan aplikasi *GraphPad prism8 software, regression for analyzing dose-response data* sehingga didapatkan nilai EC_{50} . Senyawa steroid yang diidentifikasi menggunakan instrumen Spektrofotometer UV-Vis dianalisis spektrumnya.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Hydrilla verticillata yang digunakan sebagai sampel pada penelitian ini diperoleh dari Danau Ranu Grati, Pasuruan. Tahapan preparasi sampel meliputi pencucian, pengeringan, dan penghalusan. Pencucian sampel dilakukan menggunakan air mengalir bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang dapat mempengaruhi rendemen maupun hasil ekstraksi. Pengeringan bertujuan untuk menurunkan kadar air sehingga memudahkan saat proses ekstraksi, menambah masa penyimpanan sampel, serta memudahkan pengolahan.

Pengeringan dilakukan dengan cara diangin-anginkan, hal ini bertujuan agar metabolit sekunder yang terkandung dalam sampel tidak rusak oleh sinar matahari. Menurut Winangsih, dkk. (2013) sinar ultraviolet dari matahari menimbulkan kerusakan pada kandungan kimia bahan yang dikeringkan. Selain itu, penelitian Dharma, dkk. (2020) menunjukkan bahwa metode pengeringan kering angin pada simplisia wedang uwuh memiliki kapasitas antioksidan lebih tinggi daripada pengeringan dengan metode pengeringan sinar matahari, rumah kaca, dan oven. Sampel yang telah kering, kemudian dihaluskan dengan ukuran 90 mesh di Materia Medica Batu untuk memperluas ruang interaksi antara sampel dengan pelarut agar diperoleh hasil ekstraksi yang maksimal. Serbuk kering *Hydrilla verticillata* yang diperoleh sebesar 0,56 Kg dari 8,66 Kg sampel basah, sehingga diperoleh rendemen sebesar **6,46%**. Hasil tersebut tidak berbeda jauh dengan penelitian sebelumnya yang didapatkan rendemen sebesar 7,14% (Wati, 2020).

4.2 Penentuan Kadar Air secara Termogravimetri

Penentuan kadar air serbuk kering *Hydrilla verticillata* bertujuan untuk mengetahui kandungan air yang ada di dalamnya. Menurut Khoiriyah, dkk. (2014) apabila kandungan air pada sampel rendah, maka akan mempermudah proses ekstraksi karena tidak ada gangguan dari molekul air saat pelarut akan menembus dinding sel sampel. Selain itu, kandungan air yang rendah pada sampel dapat mencegah tumbuhnya bakteri dan jamur sehingga menambah waktu penyimpanan (Katno, 2008). Hasil analisa kadar air serbuk *Hydrilla verticillata* pada penelitian ini sebesar **8,68%**. Hal ini menunjukkan bahwa kadar air pada sampel telah memenuhi standar yang ditetapkan oleh Depkes RI (2008) bahwa batas maksimum kadar air yang disyaratkan untuk sampel berupa serbuk simplisia adalah $\leq 10\%$. Hasil kadar air tersebut tidak berbeda jauh dengan penelitian Azah (2019) yang mendapatkan hasil kadar air *Hydrilla verticillata* sebesar 9,64%.

4.3 Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi maserasi bertujuan untuk mengekstrak metabolit sekunder yang terdapat pada *Hydrilla verticillata*. Ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut metanol p.a yang bersifat polar, karena metabolit sekunder dalam bahan alam masih berikatan dengan gugus glikosida sehingga bersifat polar, hal ini sesuai dengan prinsip ekstraksi yaitu *like dissolve like*. Perendaman sampel pada proses ekstraksi *Hydrilla verticillata* dilakukan selama 24 jam dan disertai dengan pengocokan menggunakan *shaker* agar kontak antara sampel dengan pelarut lebih maksimal.

Proses maserasi pada penelitian ini dilakukan 3 kali remaserasi dengan pelarut baru agar memberikan hasil yang lebih optimal. Filtrat yang didapatkan

kemudian digabungkan menjadi satu lalu dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Setelah itu dilanjutkan dengan dialiri gas N₂ untuk menghilangkan pelarut yang masih tersisa pada ekstrak. Pada penelitian ini didapatkan ekstrak pekat metanol dari *Hydrilla verticillata* dengan warna hijau tua pekat dan rendemen sebesar **5,67%**. Sedikit berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya yang didapatkan rendemen sebesar 6,495% (Wati, 2020). Perbedaan ini dikarenakan waktu pengambilan sampel yang berbeda serta perbedaan kadar air serbuk.

4.4 Hidrolisis dan Partisi

Senyawa metabolit sekunder yang ada di tanaman umumnya berada dalam bentuk glikosidanya, sehingga untuk memutuskan ikatan glikosida tersebut dilakukan hidrolisis. Ekstrak pekat metanol *Hydrilla verticillata* dihidrolisis menggunakan katalis HCl 2 N dengan tujuan untuk mempercepat pemutusan ikatan glikosida antara glikon dan aglikon. Reaksi hidrolisis bersifat *reversible* (bolak-balik), sehingga untuk menghentikannya dilakukan penetralan menggunakan NaHCO₃. Proses penetralan ini akan menghasilkan gelembung-gelembung gas CO₂ yang mengindikasikan terjadinya reaksi antara HCl dengan NaHCO₃. Adapun dugaan mekanisme reaksi hidrolisis ikatan glikosida dan reaksi penetralan oleh NaHCO₃ ditunjukkan pada Gambar 2.4 dan Gambar 2.5.

Hidrolisat yang diperoleh selanjutnya dipartisi secara bertingkat menggunakan petroleum eter (nonpolar) dan etil asetat (semipolar). Penggunaan pelarut yang berbeda kepolaran ini dimaksudkan agar senyawa-senyawa yang berbeda kepolaran terekstrak pada pelarut yang sesuai. Proses partisi pada kedua pelarut menghasilkan dua lapisan yang tidak saling bercampur, hal tersebut terjadi

karena perbedaan sifat kepolaran. Dua lapisan tersebut adalah fasa air yang mengandung komponen gula (glikon) dan garam hasil hidrolisis dan fasa organik yang mengandung aglikon (metabolit sekunder). Fasa organik pada partisi menggunakan pelarut petroleum eter dan etil asetat keduanya berada di lapisan atas, sedangkan fasa air berada di lapisan bawah. Hal ini dikarenakan massa jenis air lebih besar dibandingkan dengan massa jenis petroleum eter dan etil asetat. Hasil rendemen kedua fraksi dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Hasil rendemen fraksi petroleum eter dan etil asetat

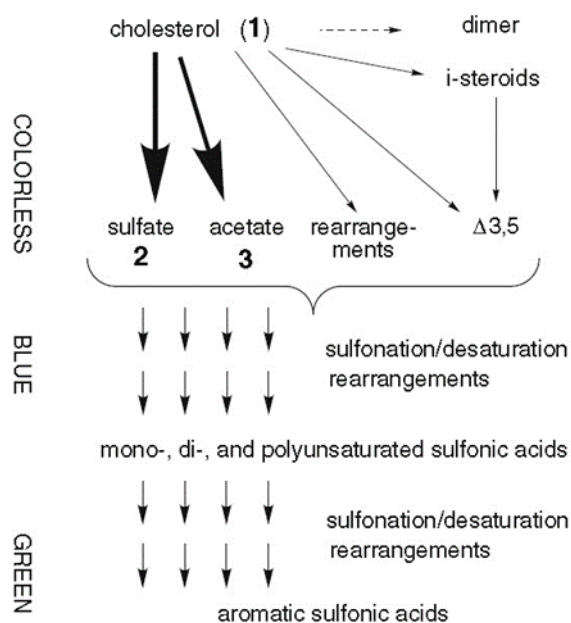
Pelarut	Warna Fraksi Pekat	Berat fraksi pekat (g)	Rendemen
Petroleum eter	Hijau kehitaman	3,4135	68,27%
Etil asetat	Hijau	0,14	2,8%

Berdasarkan tabel dapat diketahui bahwa fraksi petroleum eter memiliki rendemen yang jauh lebih besar daripada fraksi etil asetat. Hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak metanol *Hydrilla verticillata* memiliki kepolaran yang sama dengan kepolaran petroleum eter sehingga menyebabkan ekstrak tersebut lebih terdistribusi ke pelarut petroleum eter. Penelitian Anggraeni, dkk. (2014) juga menginformasikan bahwa rendemen hasil partisi bertingkat ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* fraksi petroleum eter lebih besar daripada fraksi etil asetat yaitu berturut-turut 8,1854% dan 7,4377%.

4.5 Uji Fitokimia Golongan Senyawa Steroid

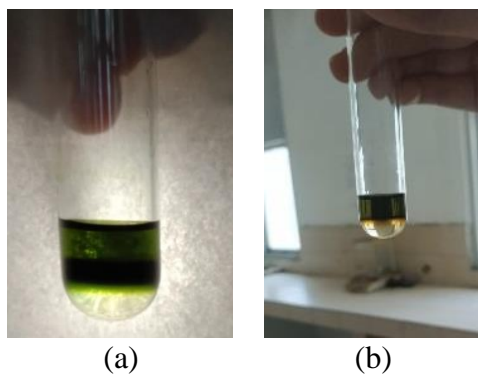
Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui adanya senyawa steroid pada fraksi petroleum eter dan etil asetat *Hydrilla verticillata* dengan menggunakan

reagen *Liebermann-Burchard*. Reagen *Liebermann-Burchard* terdiri dari kloroform, asam asetat anhidrat, dan asam sulfat. Penambahan kloroform berfungsi sebagai pelarut fraksi yang tidak mengandung air. Penambahan asam asetat anhidrat berfungsi untuk asetilasi gugus hidroksil yang akan membentuk turunan asetil. Penambahan asam sulfat berfungsi untuk menghidrasi senyawa steroid sehingga akan membentuk garam dan mengalami perpanjangan konjugasi yang ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kebiruan (Robinson, 1995). Jalur reaksi reagen *Liebermann-Burchard* dengan steroid dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Jalur reaksi reagen *Liebermann-Burchard* dengan steroid (Xiong, dkk., 2007)

Hasil uji fitokimia fraksi petroleum eter dan etil asetat ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2. Hasil uji fitokimia fraksi (a) petroleum eter (b) etil asetat

Berdasarkan Gambar 4.2 dapat diketahui bahwa fraksi petroleum eter dan etil asetat *Hydrilla verticillata* ekstrak metanol positif mengandung steroid karena pada keduanya terbentuk cincin hijau. Hal ini juga ditunjukkan oleh Amalia, dkk (2018) dan Vania (2020) yang menyebutkan bahwa fraksi petroleum eter dan etil asetat pada ekstrak etanol dan ekstrak metanol *Hydrilla verticillata* positif mengandung steroid.

4.6 Pemisahan Steroid dengan Kromatografi Kolom dan Monitoring

KLTA

Pemisahan senyawa steroid pada fraksi petroleum eter dan etil asetat *Hydrilla verticillata* menggunakan kromatografi kolom dilakukan dengan menggunakan silika gel sebagai fase diam karena ukurannya yang kecil dan campuran n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 19:1, 18:2, dan 17:3 dalam 100 mL sebagai fase gerak yang cenderung bersifat nonpolar karena untuk memaksimalkan pemisahan steroid yang juga bersifat nonpolar. Metode elusi yang digunakan adalah gradien eluen yang bertujuan untuk memperoleh senyawa yang sesuai dengan tingkat kepolarannya. Silika gel diaktivasi terlebih dahulu sebelum

digunakan untuk menghilangkan kandungan air dan mengaktifkan gugus hidroksil (-OH). Selanjutnya silika gel yang sudah diaktivasi dijadikan *slurry* (bubur silika) menggunakan n-heksana:etil asetat yang bertujuan untuk menghomogenkan antara fasa diam dengan fasa geraknya agar kerapatannya lebih tinggi, sehingga tidak terdapat celah udara yang dapat mempengaruhi pemisahan.

Perbandingan sampel dengan fasa diam yang digunakan pada penelitian ini adalah 1:150 yang merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Iyani (2017). Pada saat mengelusi, eluen dimasukkan ke dalam kolom secara berurutan dan terus menerus tanpa jeda mulai dari perbandingan eluen 19:1, 18:2, dan 17:3. Senyawa dalam *Hydrilla verticillata* akan dielusi dan dipisahkan sesuai dengan polaritasnya. Semakin polar senyawa akan semakin lama berinteraksi dengan fase diam. Senyawa steroid yang bersifat nonpolar akan terelusi lebih dahulu dan keluar dari kolom lebih cepat. Eluat yang keluar ditampung setiap 2 mL/menit ke dalam vial dan dalam penelitian ini didapatkan 133 vial untuk fraksi petroleum eter dan 140 vial untuk fraksi etil asetat.

Eluat yang terdapat dalam vial-vial kemudian dimonitoring menggunakan KLTA dengan fasa diam silika gel F₂₅₄ dan fasa gerak n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 17:3, yang dilakukan setiap vial kelipatan 2 untuk dikelompokkan lebih lanjut. Vial yang mempunyai nilai R_f, jumlah spot, dan warna spot yang sama akan digabungkan menjadi satu fraksi besar. Hasil monitoring KLTA untuk fraksi petroleum eter yang diamati di bawah lampu UV 366 nm ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil monitoring KLTA fraksi petroleum eter

No	Vial	Warna UV ₃₆₆	Jarak Senyawa (cm)	Jarak Elusi (cm)	R _f	Dugaan Senyawa
1	1-46	-	-	8	-	-
2	47-69	Hijau	3,5	8	0,4375	Steroid
3	70-80	Hijau	3	8	0,375	Steroid
4	81-94	Merah	1,5	8	0,1875	Triterpenoid
5	95-106	Merah	2	8	0,25	Triterpenoid
6	107-120	Merah	1,9	8	0,2375	Triterpenoid
		Merah	0	8	0	Triterpenoid
		Merah	1,9	8	0,2375	Triterpenoid
7	121-133	Merah	1,2	8	0,15	Triterpenoid
		Merah	0	8	0	Triterpenoid
		Merah	1,7	8	0,2125	Triterpenoid

Hasil monitoring KLTA fraksi petroleum eter diperoleh 2 noda tunggal dengan 1 noda tunggal berwarna hijau yang diduga merupakan golongan senyawa steroid. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Fardilla, dkk (2018) yang mengatakan bahwa noda berwarna hijau dengan R_f 0,4375 hasil monitoring KLTA ekstrak n-heksana daun tumbuhan majapahit merupakan noda yang diduga sebagai steroid yang kemudian diidentifikasi lebih lanjut menggunakan instrumen UV-Vis, FT-IR, dan GC-MS didapatkan senyawa terduga yaitu *stigmasta-5,22-dien-3-β ol*. Hasil monitoring KLTA untuk fraksi etil asetat yang diamati di bawah lampu UV 366 nm ditunjukkan pada Tabel 4.3

Tabel 4.3 Hasil monitoring KLTA fraksi etil asetat

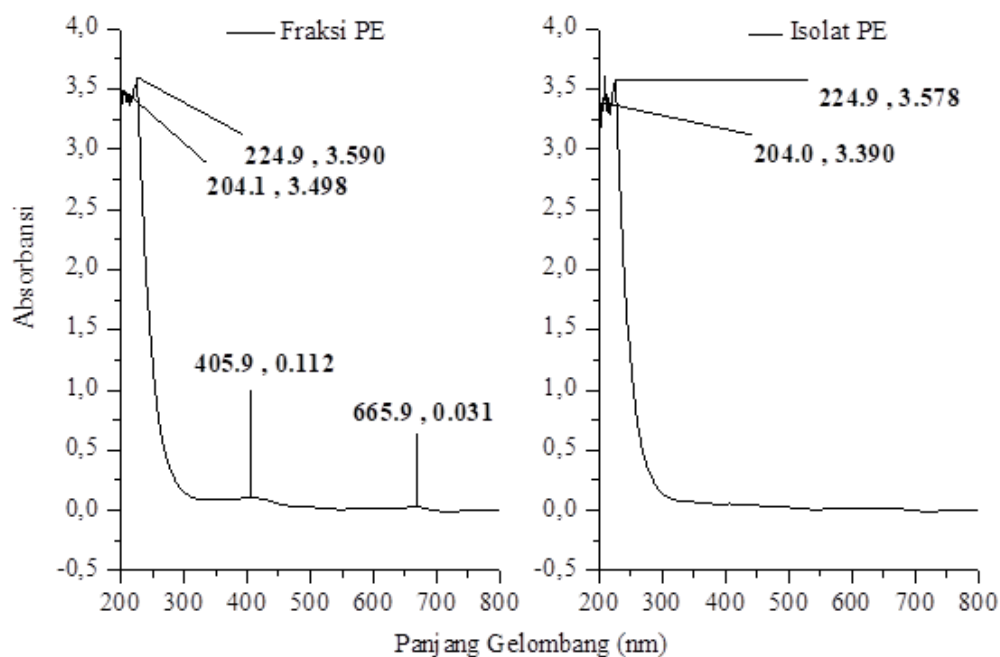
No	Vial	Warna UV ₃₆₆	Jarak Senyawa (cm)	Jarak Elusi (cm)	R _f	Dugaan Senyawa
1	1-78	-	-	8	-	-
2	79-109	Hijau	2,5	8	0,3125	Steroid
3	110-140	Hijau	2,5	8	0,3125	Steroid
		Merah	1	8	0,125	Triterpenoid

Hasil monitoring KLTA fraksi etil asetat diperoleh 1 noda tunggal berwarna hijau yang diduga merupakan golongan senyawa steroid. Selaras dengan penelitian Rahmawati (2017) yang menyatakan bahwa monitoring KLTA hasil kromatografi kolom fraksi petroleum eter alga merah *Eucheuma spinosum* mendapatkan R_f sebesar 0,3125 yang diduga sebagai senyawa steroid.

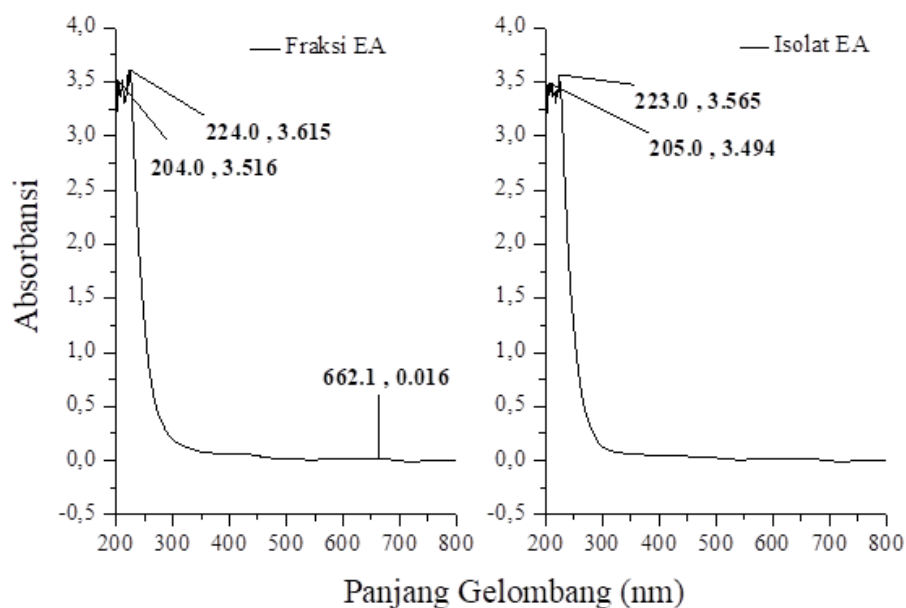
Hasil monitoring KLTA kedua fraksi, petroleum eter dan etil asetat, menunjukkan adanya noda yang diduga steroid dengan kepolaran yang berbeda. Dugaan steroid yang berada pada fraksi petroleum eter memiliki kepolaran yang lebih rendah jika dibandingkan dengan dugaan steroid yang berada di fraksi etil asetat. Hal ini dibuktikan dengan nilai R_f steroid yang berada di fraksi petroleum eter lebih besar daripada steroid yang berada di etil asetat. Adanya perbedaan kepolaran tersebut dimungkinkan karena perbedaan struktur steroid yang terkandung pada masing-masing fraksi.

4.7 Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Fraksi dan isolat steroid hasil pemisahan dengan kromatografi kolom kedua fraksi selanjutnya diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-800 nm. Hasil pengukuran spektra UV-Vis pada fraksi petroleum eter dan isolat petroleum eter ditunjukkan pada Gambar 4.3. Sedangkan serapan pada fraksi etil asetat dan isolat etil asetat ditunjukkan pada Gambar 4.4.



Gambar 4.3 Hasil Spektra UV-Vis fraksi petroleum eter dan isolat petroleum eter



Gambar 4.4 Hasil Spektra UV-Vis fraksi etil asetat dan isolat etil asetat

Berdasarkan Gambar 4.3 dan Gambar 4.4 diketahui bahwa spektra kedua fraksi tersebut memiliki panjang gelombang yang mirip dengan isolatnya. Fraksi petroleum eter memiliki beberapa panjang gelombang maksimum pada daerah 204,1 dan 224,9 nm. Begitu juga pada isolat petroleum eter terdapat serapan pada panjang gelombang 204 dan 224,9 nm. Kemudian fraksi etil asetat memiliki

beberapa panjang gelombang maksimum pada daerah 204 dan 224 nm, begitu juga pada isolat etil asetat terdapat serapan pada panjang gelombang 205 dan 223 nm.

Serapan pada panjang gelombang 204,1; 204; 205; 223; 224; dan 224,9 nm menunjukkan adanya ikatan rangkap C=C tidak terkonjugasi dengan transisi elektron π - π^* . Keenam serapan tersebut dapat menjadi serapan maksimum dari senyawa steroid, yang mana dapat diperkuat dengan penelitian Suryelita, dkk. (2017) dan Fasya, dkk. (2019) yang juga mendapatkan hasil serapan maksimum senyawa steroid berturut-turut pada panjang gelombang 203 nm dan 203,9 nm. Kemudian Vania (2020) juga menemukan serapan steroid pada panjang gelombang 203; 204; dan 221,9 nm. Penelitian Saputri, dkk. (2016) dan Haryati, dkk. (2019) juga mendapatkan hasil serapan steroid berturut-turut pada panjang gelombang 223 nm dan 224 nm. Sementara Elfita, dkk. (2003) mengidentifikasi hasil isolasi steroid dari tumbuhan jeruju (*Acanthus illicifolius* L.) mendapatkan hasil serapan pada panjang gelombang 224 nm, kemudian diidentifikasi lanjut dengan FT-IR dan GC-MS didapatkan hasil serapan ciri khas adanya rangka dasar siklopentana pada bilangan gelombang $1465,8\text{ cm}^{-1}$ dan puncak ion molekul (M^+) pada m/e 414. Sehingga diduga struktur molekul untuk senyawa murni fraksi n-heksan tersebut adalah β -sitosterol ($C_{29}H_{50}O$).

Selain mempunyai kemiripan panjang gelombang yang muncul, kedua fraksi tersebut juga mempunyai perbedaan panjang gelombang yang muncul dengan isolatnya. Pada spektra UV-Vis isolat petroleum eter dan etil asetat menunjukkan bahwa tidak ada serapan yang muncul pada daerah panjang gelombang 400-800 nm. Berbeda dengan spektra UV-Vis fraksi petroleum eter dan etil asetat, yang mana pada fraksi petroleum eter terdapat serapan pada panjang

gelombang 405,9 dan 665,9 nm, sedangkan pada fraksi etil asetat muncul serapan pada panjang gelombang 662,1 nm.

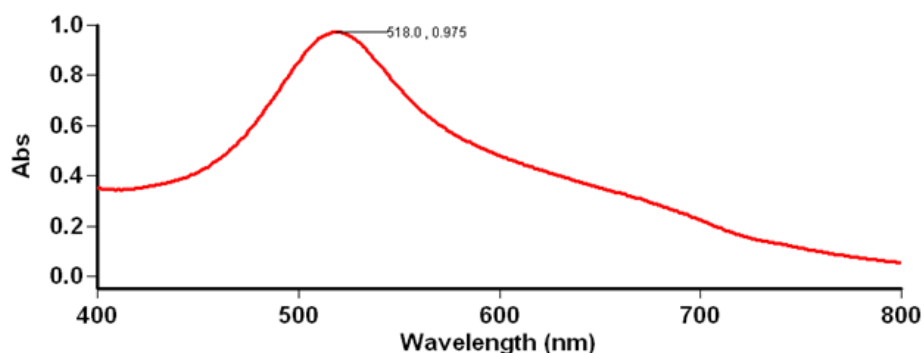
Serapan pada panjang gelombang maksimum 405,9 nm menunjukkan adanya transisi $n-\pi^*$ karena adanya ikatan dengan atom yang memiliki pasangan elektron bebas. Penelitian Jannah (2020) juga mendapatkan serapan maksimum 408,5 nm pada fraksi petroleum eter *Hydrilla verticillata*. Selain itu, penelitian yang telah dilakukan Sukadana, dkk. (2018) yang mengisolasi dan mengidentifikasi golongan senyawa aktif antimakan daun Tenggulun, juga menemukan adanya serapan pada panjang gelombang maksimum 403 nm yang diduga merupakan senyawa golongan triterpenoid alkohol. Sedangkan serapan pada panjang gelombang 665 dan 662,1 merupakan serapan dari klorofil. Jannah (2020) dalam penelitiannya juga mendapatkan serapan 665 nm dan 666 nm pada fraksi petroleum eter dan etil asetat *Hydrilla verticillata*. Gibson, dkk. (2017) yang melakukan analisa kualitas klorofil daun jarak kepyar (*Ricinus comunis* L.) sebagai bahan pewarna didapatkan serapan 665 nm pada ekstrak etanol yang merupakan puncak serapan klorofil.

Berdasarkan uraian di atas, diketahui bahwa fraksi petroleum eter dan etil asetat mempunyai serapan yang lebih banyak daripada isolat petroleum eter dan etil asetat. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada kedua fraksi mengandung lebih dari 1 dugaan senyawa, sedangkan pada kedua isolat mengandung dugaan senyawa target yang lebih murni. Hal ini dikarenakan pada isolat telah dilakukan proses pemisahan yang lebih spesifik menggunakan kromatografi kolom.

4.8 Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH

4.8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang yang memiliki serapan tertinggi. Pengukuran sampel dilakukan pada panjang gelombang maksimum untuk mengoptimalkan kepekaan DPPH dan meminimalkan kesalahan. Kuntorini (2010) menjelaskan bahwa DPPH memiliki warna komplementer ungu karena memiliki elektron yang tidak berpasangan dan memiliki absorbansi maksimum pada panjang gelombang 515-520 nm. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH 0,2 mM pada penelitian ini adalah 518 nm yang ditunjukkan pada Gambar 4.4 Hasil pengukuran ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Bariyyah, dkk. (2013) dan Anggraeni, dkk. (2014) yang mendapatkan panjang gelombang maksimum DPPH sebesar 518 nm. Panjang gelombang ini akan digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan pada isolat petroleum eter dan etil asetat dari *Hydrilla verticillata*.



Gambar 4.4 Spektra UV-Vis larutan DPPH 0,2mM

4.8.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan pada fraksi petroleum eter dan etil asetat serta isolat hasil kromatografi kolom fraksi petroleum eter dan etil asetat dengan variasi konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm dan menggunakan larutan kontrol DPPH 0,2 mM yang kemudian diukur pada panjang gelombang maksimum DPPH, yaitu 518 nm. Data yang diperoleh adalah absorbansi kontrol dan absorbansi sampel yang nantinya dapat digunakan untuk menentukan % aktivitas antioksidan. Data % aktivitas antioksidan dan EC_{50} fraksi dan isolat steroid dapat dilihat dalam Tabel 4.4 dan Tabel 4.5.

Tabel 4.4 Data hasil % aktivitas antioksidan dan nilai EC_{50} fraksi petroleum eter dan isolat hasil kromatografi kolom fraksi petroleum eter

Konsentrasi (ppm)	% Aktivitas Antioksidan	
	Fraksi PE	Isolat PE
1	1,043098	3,620082
2	1,313834	4,641977
3	2,523135	6,278767
4	3,468817	18,8715
5	4,151959	21,72455
EC_{50}	94,66	9,231

Tabel 4.5 Data hasil % aktivitas antioksidan dan nilai EC_{50} fraksi etil asetat dan isolat hasil kromatografi kolom fraksi etil asetat

Konsentrasi (ppm)	% Aktivitas Antioksidan	
	Fraksi EA	Isolat EA
1	0,940539	1,225389
2	1,581432	5,97891
3	2,47606	9,069156
4	3,391604	18,24148
5	4,42472	19,27156
EC_{50}	84,02	11,74

Berdasarkan Tabel 4.4, dapat diketahui bahwa isolat hasil kromatografi kolom fraksi petroleum eter memiliki potensi sebagai antioksidan yang sangat kuat dengan nilai EC_{50} = 9,231 ppm dan fraksi petroleum eter memiliki potensi sebagai antioksidan yang kuat dengan nilai EC_{50} = 94,66 ppm. Kemudian Tabel 4.5,

menunjukkan bahwa isolat hasil kromatografi kolom fraksi etil asetat memiliki potensi sebagai antioksidan yang sangat kuat dengan nilai EC_{50} = 11,74 ppm dan fraksi etil asetat juga memiliki potensi sebagai antioksidan yang kuat dengan nilai EC_{50} = 84,02 ppm.

Berdasarkan nilai EC_{50} yang didapatkan, dapat diketahui bahwa isolat petroleum eter dan etil asetat lebih berpotensi sebagai antioksidan jika dibandingkan dengan fraksi petroleum eter dan etil asetat. Hal tersebut selaras dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Rahmawati (2016) yang menyatakan bahwa nilai EC_{50} fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* sebesar 152 ppm, sedangkan nilai EC_{50} isolat hasil KLTP sebesar 73,82 ppm. Penelitian Maghfiroh (2019) juga mendapatkan nilai EC_{50} fraksi n-heksana *Chlorella sp.* sebesar 1673 ppm sedangkan nilai EC_{50} isolat hasil kromatografi kolom sebesar 6,235 ppm.

Hasil perbedaan aktivitas ini menunjukkan bahwa dalam fraksi petroleum eter dan etil asetat *Hydrilla verticillata* masih terdapat banyak campuran senyawa, yang memungkinkan dapat memberikan efek antagonis yang dapat menurunkan aktivitas antioksidan. Menurut Rachman dkk. (2008) kombinasi ekstrak dapat bersifat sinergis (meningkatkan aktivitas antioksidan) dan dapat bersifat antagonis (menurunkan aktivitas antioksidan) dari masing-masing ekstrak. Notariza, dkk. (2017) melakukan perbandingan aktivitas antioksidan campuran ekstrak-etanol *A.indica* dan *C.asiatica* terhadap ekstrak-etanol *A.indica* dihasilkan bahwa penambahan *C.asiatica* 0,5% justru menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan pada ekstrak-etanol *A.indica*.

Selain faktor sinergis dan antagonis campuran, tingkat kemurnian dari isolat diduga juga mempengaruhi aktivitas antioksidan. Tingkat kemurnian isolat lebih

tinggi daripada fraksi, sehingga dengan konsentrasi yang sama, steroid pada isolat lebih banyak daripada pada fraksi. Hal ini menyebabkan aktivitas antioksidan pada isolat lebih tinggi daripada fraksi.

4.9 Pemanfaatan *Hydrilla verticillata* dalam Perspektif Islam

Hydrilla verticillata memiliki banyak manfaat yang disebabkan oleh kandungan senyawa yang ada di dalamnya, salah satunya adalah steroid. Senyawa steroid dapat digunakan sebagai obat. Hal ini dibuktikan dalam penelitian ini yang menjelaskan bahwa isolat steroid *Hydrilla verticillata* hasil kromatografi kolom fraksi petroleum eter dan etil asetat berpotensi sebagai antioksidan. Antioksidan dapat dijadikan sebagai obat untuk menangkal radikal bebas yang dapat menyebabkan berbagai penyakit. Aktivitas antioksidan isolat petroleum eter dan isolat etil asetat tergolong dalam kategori antioksidan sangat kuat dengan nilai EC_{50} berturut-turut 9,231 dan 11,74 ppm. Nilai tersebut tidak berbeda jauh dengan nilai EC_{50} vitamin C dan BHT (antioksidan komersial) yang berturut-turut sebesar 4,58 dan 14,10 ppm. Suatu sampel dapat dikatakan memiliki kemampuan meredam radikal bebas apabila menyamai nilai EC_{50} vitamin C dan BHT (Rizkia, dkk., 2014).

Pemanfaatan steroid sebagai obat merupakan ikhtiar untuk memperoleh kesembuhan dari Allah Swt. yang Maha Penyembuh, karena merupakan kewajiban setiap manusia untuk berikhtiar mengobati penyakit. Namun selain berikhtiar, manusia wajib bertawakal karena sungguh tidak ada yang bisa memberikan kesembuhan selain Allah Swt. Sebagaimana firman Allah Swt. dalam surah asy Syu'ara ayat 80:

وَإِذَا مَرَضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِي (٨٠)

Artinya: “dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan aku.” (QS. asy Syu'ara'/26:80).

Lafadz وَإِذَا مَرَضْتُ (dan apabila aku sakit), berbeda dengan redaksi lainnya. Perbedaan pertama adalah penggunaan kata *idza* (apabila) dan mengandung makna besarnya kemungkinan atau bahkan kepastian terjadinya apa yang dibicarakan, dalam hal ini adalah sakit. Ini mengisyaratkan bahwa sakit - berat atau ringan, fisik atau mental - merupakan salah satu keniscayaan hidup manusia. Perbedaan kedua adalah redaksinya yang menyatakan “Apabila aku sakit” bukan “Apabila Allah menjadikan aku sakit”. Namun demikian, dalam hal penyembuhan - seperti juga dalam pemberian hidayah, makan dan minum - secara tegas beliau menyatakan bahwa Yang melakukannya adalah Dia, Tuhan semesta alam itu (Shihab, 2002). Meskipun demikian, bukan berarti upaya manusia untuk meraih kesembuhan tidak diperlukan lagi. Manusia tetap diharuskan mencari obat dari penyakit yang sedang dideritanya.

Sebagai khalifah di bumi, manusia mempunyai tugas untuk berpikir, mengkaji, serta mengembangkan penelitian untuk mendapatkan manfaat dari segala sesuatu yang telah diciptakan Allah Swt. Sebagaimana firman Allah Swt. dalam QS. Qaf (50) ayat 7-8:

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا وَأَلْقَيْنَا فِيهَا رَوَاسِيَ وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ بَهِيجٍ (٧) تَبَصَّرَةٌ وَذِكْرَىٰ لِكُلِّ عَبْدٍ

مُنِيبٍ (٨)

Artinya: “Dan bumi yang Kami hamparkan dan Kami pancangkan di atasnya gunung-gunung yang kokoh dan Kami tumbuhkan di atasnya tanaman-tanaman yang indah, untuk menjadi pelajaran dan peringatan bagi setiap hamba yang kembali (tunduk kepada Allah).” (QS. Qaf/50:7-8).

Kata (بِهَيْجٍ) *bahij* berasal dari kata (بَهَاجٍ) *bahaja* yakni sesuatu yang indah warnanya dan menyenangkan. Bahwa aneka jenis tumbuhan dengan keistimewaannya masing-masing yang tumbuh dari air dan tercurah dari langit, itu saja sudah menunjukkan betapa kuasa Allah Swt. Ditambah lagi bahwa aneka tumbuhan itu di samping bermanfaat juga indah dipandang mata. Dengan demikian penyebutan kata *bahij* di sini lebih membuktikan lagi kuasa-Nya (Shihab, 2002). Manusia yang senantiasa berfikir atas manfaat dari segala sesuatu yang diciptakan Allah Swt. akan mengerti betapa besar kekuasaan-Nya.

Hydrilla verticillata merupakan salah satu tanda kekuasaan Allah Swt. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa isolat petroleum eter dan etil asetat *Hydrilla verticillata* dapat digunakan sebagai obat (antioksidan), yang mana akan mencegah oksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas yang dapat menyebabkan berbagai penyakit karsinogenik dan penuaan (Yan, dkk., 1998). Potensi tersebut dibuktikan dengan nilai EC₅₀ masing-masing isolat yang dikategorikan sebagai antioksidan sangat kuat. Dengan hasil tersebut diharapkan dapat menjadikan kita menyadari dan berfikir bahwa sesungguhnya dibalik penciptaan langit dan bumi beserta isinya terdapat bukti-bukti kekuasaan Allah Swt., maka hendaknya kita selalu bersyukur dengan apa yang telah diberikan Allah Swt. dan selalu berdzikir kepada Allah Swt. disetiap waktu untuk memperkuat iman dan takwa.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

- a. Hasil pemisahan senyawa steroid fraksi petroleum eter dan etil asetat menggunakan kromatografi kolom gradien eluen menghasilkan masing-masing 1 noda tunggal yang diduga mengandung senyawa steroid yang mempunyai nilai R_f berturut-turut sebesar 0,4375 dan 0,3125.
- b. Hasil EC_{50} isolat petroleum eter dan isolat etil asetat berturut-turut sebesar 9,231 dan 11,74 ppm. Kedua isolat tersebut memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori yang sangat kuat.
- c. Hasil identifikasi UV-Vis isolat petroleum eter menunjukkan panjang gelombang maksimum pada 204 dan 224,9 nm. Sedangkan pada isolat etil asetat menunjukkan panjang gelombang maksimum pada 205 dan 223 nm. Panjang gelombang tersebut menunjukkan adanya transisi elektron $\pi-\pi^*$ yang merupakan panjang gelombang khas dari golongan senyawa steroid.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan pemisahan senyawa steroid dengan metode lain seperti kromatografi vacum cair (KVC) dan pemurnian senyawa menggunakan teknik kromatografi kolom *flash* untuk mendapatkan senyawa steroid yang lebih murni.
2. Perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut menggunakan instrumen LC-MS/MS dan $^1\text{H-NMR}$ serta $^{13}\text{C-NMR}$ untuk mengetahui lebih lanjut struktur senyawanya.

DAFTAR PUSTAKA

- Amalia, S., Fasya, A. G., Hasanah, F., & Yuliani, D. 2018. Pemisahan Senyawa Aktif Fraksi Petroleum Eter dan Etil Asetat Hasil Hidrolisis Ekstrak Etanol *Hydrilla verticillata* dari Ranu Grati Pasuruan. *Alchemy*, 6(2), 50.
- Anggraeni, O. N., Fasya, A. G., & Hanapi, A. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* *Alchemy*, 3(1).
- Annie, S.W., R. Raveen, M. G. Paulraj, T. Samuel, & S. Arivoli, 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*, vol. 1, no. 3, pp. 43-48.
- Araki, H., M. Inoue, & T. Katoh. 2003. Total Synthesis and Absolute Configuration of Otteliones A and B, Novel and Potent Antitumor Agents from a Freshwater Plant. *Organic Letters*, vol. 5, no. 21, pp. 3903-3906.
- Artati, E. K., Feliciano Irvina W. H., dan Fatimah. 2012. Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Asam terhadap Kinetika Reaksi Hidrolisis Pelepeh Pisang (*Musa Paradisiaca* L). *Ekuilibrium*, 11(2): 73-77.
- Atun, S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Konversi Cagar Budaya Borobudur*. 8(2)
- Auterhoof, H., dan Kovar, K. A. 1987. *Identifikasi Obat*. Bandung: ITB.
- Azah, S. 2018. Uji Toksisitas dan Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLTP Ekstrak n-Heksana dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata* Menggunakan UV-Vis dan LC-MS/MS. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Baniszewski, J., Cuda, J. P., Gezan, S. A., Sharma, S., & Weeks, E. N. I. 2016. Stem fragment regrowth of *Hydrilla verticillata* following desiccation. *Journal of Aquatic Plant Management*, 54.
- Byju, K., Anuradha, V., Rosmine, E., Kumar, N. C., & Nair, S. M. 2013. Chemical Characterization of the Lipophilic Extract of *Hydrilla verticillata*: A Widely Spread Aquatic Weed. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22(3).
- Choi, J. M., Lee, E. O., Lee, H. J., Kim, K. H., Ahn, K. S., Shim, B. S., Kim, N. Il, Song, M. C., Baek, N. I., & Kim, S. H. 2007. Identification of Campesterol from *Chrysanthemum coronarium* L. and Its Antiangiogenic Activities. *Phytotherapy Research*, 21(10).
- Contini, S. H. T., Salvador, M. J., Watanabe, E., Ito, I. Y., & Oliveira, D. C. R. 2003. Antimicrobial Activity of Flavonoids and Steroids Isolated from Two *Chromolaena* Species. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39(4): 403-408.

- Darwis, D. 2000. Teknik Dasar Laboratorium dalam Penelitian Senyawa Bahan Alam Hayati, *Workshop Pengembangan Sumber Daya Manusia dalam Bidang Kimia Organik Bahan Alam Hayati*. Padang: FMIPA Universitas Andalas Padang.
- Das, B., Pal, D., & A. Halda. 2015. Pharmacognostical and Physiochemical Study of the Aquatic Weed *Hydrilla verticillata* (L.F.) Royle Known as Nutrient Power House. *International Journal of Research in Pharmacy and Science*. vol. 5. no. 1. pp. 1–6.
- Daud, M. F., Esti R. S., Endah R. 2011. Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) Berdaging Buah Putih. *Prosiding Seminar Nasional Penelitian dan PKM Sains, Teknologi, dan Kesehatan*. Vol 2, No.1 ISSN:2089-3582
- Decloedt, A. I., Van Landschoot, A., & Vanhaecke, L. 2016. Fractional Factorial Design-Based Optimisation and Application of an Extraction and UPLC-MS/MS Detection Method for the Quantification of Phytosterols in Food, Feed and Beverages Low in Phytosterols. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(27).
- Dehpour, A. A., Ebrahimzadeh, M. A., Fazel, N. S., & Mohammad, N. S. 2009. Antioxidant Activity of Methanol Extract of *Ferula Assafoetida* and Its Essential Oil Composition. *Grasas Aceites*, 60(4): 405-412.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008. Farmakope Herbal Indonesia (Edisi I). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dharma, M. A., Nocianitri, K. A., Yusasrini, N. L. 2020. Pengaruh Metode Pengeringan Simplisia Terhadap Kapasitas Antioksidan Wedang Uwuh. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. ISSN : 2527-8010 (ejournal) Vol. 9, No. 1, 88-95.
- Diaz, B. C. A., Carretero, A. S., Gutierrez, A. F., Vega, A. B., Frenich, A. G., Vidal, J. L. M., dan Matoz, J. D. 2007. Separation and Determination of Sterol in Olive Oil by HPLC-MS. *Food Chemistry*. 7: 593-598.
- Efremov, A. N., Pushkina, A. A., & Bolotova, Y. V. 2020. Features of Biomorph of *Hydrilla verticillata* (Hydrocharitaceae). *Inland Water Biology*, 13(4).
- Elfita, Yusuf, S., Aini, H. 2003. Studi Aktivitas Sititoksik dan Isolasi Steroid dari Tumbuhan Jeruju (*Acanthus illicifolius* Linn). *Jurnal Penelitian Sains*, No. 14, ISSN: 1410-7058.
- Endarini, L. H. 2016. *Farmakognisi dan Fitokimia*. Jakarta Selatan: Pusdik SDM Kesehatan.
- Fardilla, I. dan Hidajati, N. 2018. Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak n-Heksana Daun Tumbuhan Majapahit (*Crescentia cujete*). *Journal of Chemistry*. Vol. 7, No. 1
- Fasya, A. G., Amalia, S., Megawati, D. S., Salima, F., Kusuma, V. A., & Purwantoro, B. 2020. Isolation, Identification, and Bioactivity of Steroid Isolates from *Hydrilla verticillata* Petroleum Ether Fraction. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 456: 1-8.

- Fasya, A. G., Purwantoro, B., Ulya, L. H., & Ahmad, M. 2019. Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis dari Fraksi n-Heksana *Hydrilla verticillata*. *Journal of Chemistry*, 8(1), 23–34.
- Fasya, A. G., Tyas, A. P., Mubarokah, F. A., Ningsih, R., Madjid, A. D. R. 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.
- Fasya, A.G., Dinasti, A. R., Syofiyah, M., Rahmawati, L. M., Millati, N., Safitri, D. A., Handoko, S., Hanapi, A., Ningsih, R. 2016. Ekstraksi, Hidrolisis dan Partisi Metabolit Sekunder dari Mikroalga *Chlorella sp.* *Journal of Chemistry*.5(1). EISSN 2460-6871
- Fitri, K. N. 2017. Variasi Laju Alir pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Euचेuma cottonii* Metode Kromatografi Kolom. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Gandjar, I. G., dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Putaka Pelajar.
- Gandjar, I. G., dan Rohman, A. 2015. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Putaka Pelajar.
- Gibson, M., Kasman, dan Iqbal. 2017. Analisa Kualitas Klorofil Daun Jarak Kepyar (*Ricinus comunis* L) Sebagai Bahan Pewarna pada *Dye Sensitized Solar Cell* (DSSC). *Gravitasi*. Vol. 16 No. 2
- Grillo, C. A. and Dulout, F. N. 1995. Cytogenetic Evaluation of Butylated Hydroxytoluene. *Mutat. Res.*, (345) : 73–85.
- Guenther, E. 1987. *Minyak Atsiri Jilid I* terjemahan Ketaren S. Jakarta: Universitas Jakarta Press.
- Hafiz, M. N. 2017. Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Metanol, Kloroform, dan n-Heksana *Hydrilla verticillata* (L.f) Royle dari Danau Ranu Kab. Pasuruan terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hanapi, A., Fasya, A. G., Mardiyah, U., Miftahurrahmah. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Antibakteri Ekstrak Metanol Alga Merah *Euचेum spinosum* dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *Jurnal Alchemy*. 2 (2): 126 – 137.
- Handoko, D. S. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis. *SIGMA: Jurnal Sains dan Teknologi*. 9(1).
- Handoko, S. 2016. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter (PE) Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Metode Kromatografi Kolom Pembuatan Fasa Diam Cara Basah dan Kering. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Haryati, D., Widiyantoro, A., dan Ardinarsih, P. 2019. Karakterisasi Senyawa Steroid dari Fraksi Diklorometana Bunga Nusa Indah (*Mussaenda erythopylla*) dan Aktivitas Sitotoksiknya Terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*. 8(2).

- Ikfi, S. 2017. Uji Antioksidan Ekstrak Kasar Metanol, Kloroform, dan n-Heksana *Hydrilla verticillata* (L.F) Royle dari Danau Ranu Pasuruan Menggunakan Metode DPPH. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ilyas, A., Novianty, I., & Irmayanti, I. 2015. Senyawa Golongan Steroid dari Ekstrak n-heksana Kulit Batang Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) dan Uji Toksisitas terhadap *Artemia Salina Leach*. *Chimica et Natura Acta*, 3 (3): 119-123.
- Ionita, P. 2005. Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species? *Chemical Papers*, 59(1): 11-16.
- Iyani, R. 2017. Variasi Rasio Sampel terhadap Silika Gel pada Pemisahan Steroid dan Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Jannah, M. 2020. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat dan Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata* terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Jaya, I. D. G. K. 2007. Perbedaan Kandungan Minyak Atsiri Ekstrak Rimpang Lengkuas (*Languas galanga* (L.) Stunz) secara Maserasi dan Perkolasi. *Skripsi*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma.
- Jones, P. J., Raeini-Sarjaz, M., Ntanios, F. Y., Vanstone, C. A., Feng, J. Y., & Parsons, W. E. 2000. Modulation of Plasma Lipid Levels and Cholesterol Kinetics by Phytosterol Versus Phytostanol Esters. *Journal of Lipid Research*, 41(5), 697–705.
- Katno. 2008. Tingkat Manfaat, Keamanan dan Efektifitas Tanaman Obat dan Obat Tradisional. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI. Karanganyar.
- Kensa, V., & Neelamegum, R. 2016. GC-MS Determination of Bioactive Constituents of *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. Collected from Unpolluted and Polluted Water Sources. *Asian Journal of Biology*, 1(1), 1–6.
- Khalaf, I., Corciovia, A., Vlase, L., Ivanescu, B., dan Lazar, D. LC/MS Analysis of Sterolic Compound from *Glycyrrhiza glabra*. *Journal Studia UBB Chemia*, 3(1).
- Khoiriyah, S., Hanapi, A., dan Fasya, A. G. 2014. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat, Kloroform, dan Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga Coklat *Sargassum vulgare* dari Pantai Kapong Pamekasan Madura. *Alchemy*. Vol. 3, No. 2.
- Kiswando, A. A. 2011. Perbandingan Dua Ekstraksi yang Berbeda pada Daun Kelor (*Moringa oleifera*, Lamk) terhadap Rendemen Ekstrak dan Senyawa Bioaktif yang Dihasilkan. *Jurnal Sains Natural Universitas Nusa Bangsa*. Vol. 1, No.1
- Krisna, I.G.A.P.S.A., Santi, S.R., & Rustini, N.L. 2014. Senyawa Steroid pada Daun Gayam (*Inocarpus fagiferus* Fosb) dan Aktivitasnya Sebagai Antioksidan Terhadap DPPH. *Jurnal Kimia*, 8(2): 251-256.

- Kristanti, A. N., Aminah, N. S., Tanjung, M., & Kurniadi, B. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: UNAIR Press
- Kuntorini, E. M. 2010. Botani Ekonomi Suku *Zingiberaceae* sebagai Obat Tradisional oleh Masyarakat di Kota Banjarbaru. *Jurnal Bioscientic*. 2(1).
- Kurniawan, M., Munifatul I., Yulita N. 2010. Kandungan Klorofil, Karotenoid, dan Vitamin C pada Beberapa spesies Tumbuhan Akuatik. *Buletin Anatomi dan Fisiologi*. 18(1): 32-36
- Kusmiyati, A. N., dan Handayani S. 2011. Isolation and Identification of Active Compound Methanol Extract of *Curcuma manga Val Rhizomes* of Ethyl Acetate Fraction. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. Vol.1, No.2
- Lailiyah, A., Adi, T. K., & Yusnawan, E. 2014. Kapasitas Antioksidan dan Kandungan Total Senyawa Fenolik Ekstrak Kasar Alga Coklat *Sargassum cristaefolium* dari Pantai Sumenep Madura. *ALCHEMY*, Vol. 3 No. 1
- Lalitha, S., K. Rajeshwaran, P. Senthil Kumar, K. Deepa, K. Gowthami. 2010. In Vivo Screening of Antibacterial Activity of *Acacia Mellifera* (BENTH)(Leguminosae) on Human Pathogenic Bacteria. *Global Journal of Pharmacology*. 4, 3. 148-150
- Luki, C. 2018. Pemisahan Steroid Fraksi Etil Asetat Makroalga *Eucheuma cottonii* Menggunakan Kromatografi Kolom Gradien Eluen Secara Eksperimen Dan Studi *In Silico* Serta Uji Antioksidannya. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Madjid, A. D. R., Rahmawati, D. A., & Fasya, A. G. 2020. Variasi Komposisi Eluen pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottonii* dengan Kromatografi Kolom Basah. *Alchemy*, 8(1), 35–40.
- Maghfiroh, N. 2019. Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi n-heksana Mikroalga *Chlorella* sp. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Mardiyah, U., Fasya, A. G., & Amalia, S. 2014. Ekstraksi, Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *ALCHEMY*, Vol. 3 No. 1
- Marer, P.J., dan Garvey, K.K. 2001. *Aquatic Pest Control*. USA: University of California.
- Marwan, Haruna, N., & Yasin, S. M. 2017. Pemanfaatan *Hydrilla verticillata* (L.F.) Royle Sebagai Pupuk Hijau untuk Memacu Pertumbuhan Bibit Kakao (*Theobroma Cacao* L.). *Journal TABARO*, 1(1), 1–10.
- Maryam, F., Subehan, S., & Musthainah, L. 2020. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Steroid dari Ekstrak Biji Mahoni (*Swietenia mahagoni Jacq.*). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 7(2), 6–11.
- Misra, M. K., A. Panda, & D. Sahu. 2012. Survey of Useful Wetland Plants of South Odisha. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, vol. 11, no. 4, pp. 658–666.

- Mo, S., Dong, L., Hurst, W. J., dan Breemen, R. B. 2013. Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Springer*. pp 949-956.
- Molyneux, P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2): 211-219
- Mulya, M. P., Damris, M., & Maryani, A. T. 2020. Pemanfaatan Tumbuhan Air (*Hydrilla verticillata*) dalam Meningkatkan Karakteristik Limbah Cair Tahu dengan Metode Biofiltrasi. *Jurnal Pembangunan Berkelanjutan*, 3(1), 1–10.
- Nihlati, I., Abdul R., dan Triana H. 2008. Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata (roxb.) Schlecht*) dengan Metode Penangkapan Radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). *Majalah Obat Tradisional*. 45(5).
- Notariza, K. R. dan Krisnamurti, D. G. B. 2017. Perbandingan Aktivitas Antioksidan Campuran Ekstrak-Etanol *A.indica* dan *C.asiatica* terhadap Ekstrak-Etanol *A.indica*., *eJKI*. Vol. 5, No. 2
- Pal, D. K., & Nimse, S. B. 2006. Little Known Uses of Common Aquatic Plant, *Hydrilla verticillata* (Linn . f .) Royle, *Indian Journal of Natural Products and Resources*, vol. 5, no. 2, pp. 108-111.
- Pal, D. K., & Nimse, S. B. 2006. Screening of the Antioxidant Activity of *Hydrilla verticillata* Plant. *Asian Journal of Chemistry*, 18(4).
- Patel, S. S., & Savjani, J. K. 2015. Systematic Review of Plant Steroids as Potential Anti-inflammatory Agents: Current Status and Future Perspectives. *The Journal of Phytopharmacology*, 4(2): 121-125.
- Prabha, P. & J. Rajkumar, 2015. Phytochemical Screening and Bioactive Potential of *Hydrilla verticillata*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, vol. 7, no. 3, pp. 1809-1815.
- Prabha, S. P., Karthik, C., & Chandrika, S. H. 2019. Phytol – A Biosurfactant from the Aquatic Weed *Hydrilla verticillata*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 17. 736–742.
- Prabha, S., Sadhana, S., Karthik, C., & Caroline, D. 2020. In Vitro Evaluation of *Hydrilla verticillata* for Anti-Adipogenesis Activity on 3T3 L1 Cell Lines. *Pharmacognosy Magazine*, 16(5).
- Puwantoro, B. 2019. Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis Fraksi n-Heksana *Hydrilla verticillata*. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Rachman, F., Logawa, E.D., Hegartika, H. & Simanjuntak, P. 2008. Aktivitas antioksidan ekstrak tunggal dan kombinasinya dari tanaman *Curcuma spp*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 6(2)
- Rahayu, D. S., Dewi, K., dan Enny, F. 2010. Penentuan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun Ketapang (*Terminalia catappa* L) dengan Metode DPPH. *Skripsi*. Semarang: Universitas Diponegoro.

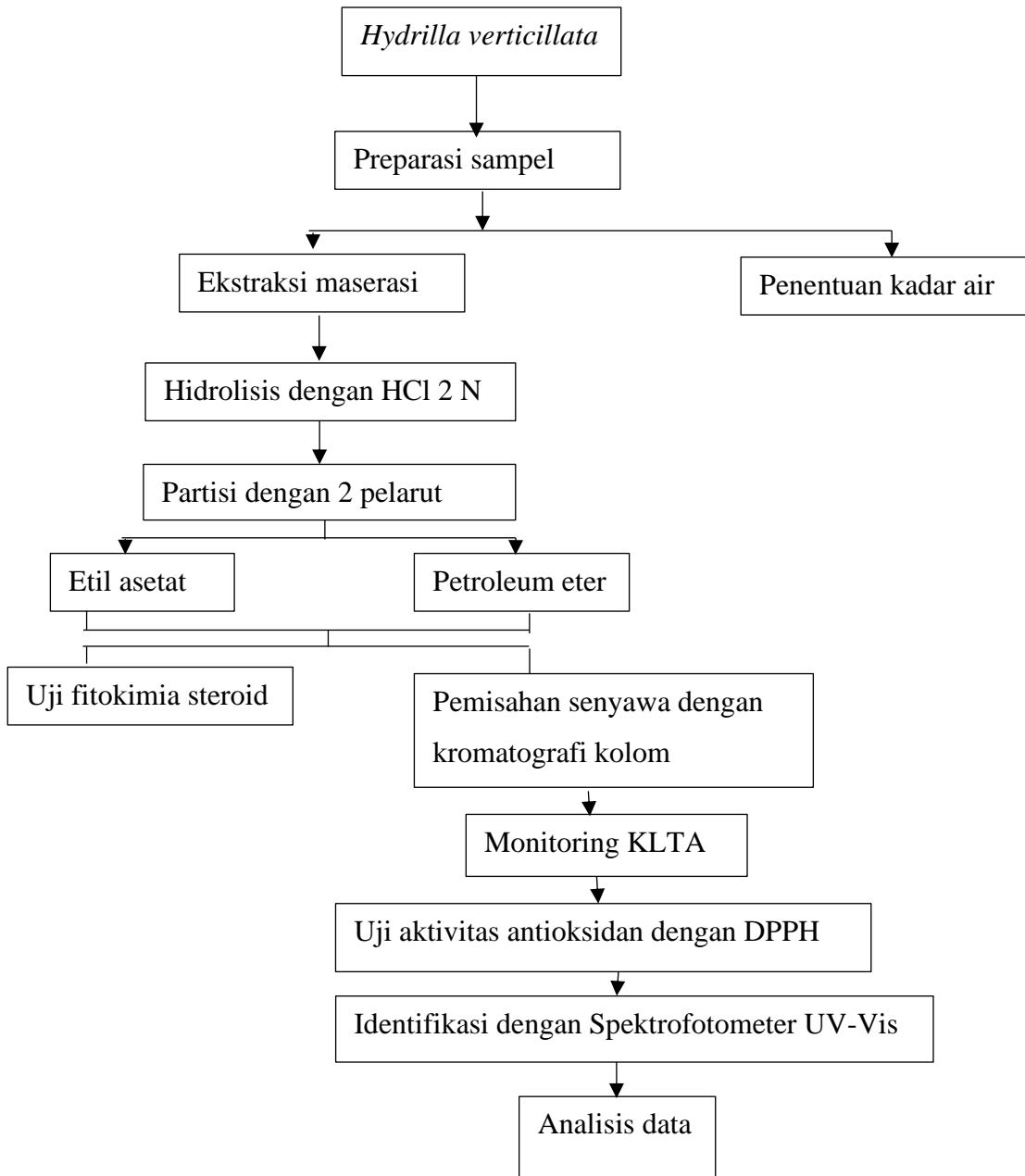
- Rahmawati, L. M. 2016. Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Senyawa Steroid Isolat Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan UV-Vis. *Skripsi*. Fakultas Saintek UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Rahmawati, Y. D. 2017. Variasi Eluen pada Pemisahan Senyawa Triterpenoid dan Steroid Alga Merah *Eucheuma spinosum* Menggunakan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*. Fakultas Saintek UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ramesh, S., Rajan, R., & Santhanam, R. 2014. *Freshwater Phytopharmaceutical Compounds*. Florida: CRC Press
- Rizkia, P., Jannah, A., dan Hasanah, H. 2014. Uji Efektivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 70 %, Ekstrak dan Isolat Senyawa Flavonoid dalam Umbi Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis). *Alchemy*. Vol. 3 No. 2
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Bandung: Penerbit ITB.
- Safer, A. M., dan Nughamish, A. L. 1999. Hepatotoxicity Induced by the Antioxidant Food Additive Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats: An Electron Microscopical Study. *Histol. Histopathol.*, XIV: 391–406.
- Saifudin, A., Suparti., Anang, F., Muhammad D. 2006. Biotransformasi Kurkumin Melalui Kultur Suspensi Sel Daun *Catharanthus roseus* (L) G. Don Berbunga Merah. *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*, Vol. 7, No. 2.
- Saleh, H.A., Saokani, J., dan Rijal, S. 2016. Penentuan Nilai Kalor Serta Pengaruh Asam Klorida (HCl) terhadap Kadar Bioetanol Bonggol Pisang (*Mussa paradisiacal*). *Al-Kimia*, 4(1): 68-77.
- Salima, F. 2019. Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi n-Heksana *Hydrilla verticillata*. *Skripsi*. Fakultas Saintek UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Saputri, R., Astuti, M.D., & Kuntorini, E.M. 2016. Isolasi dan Identifikasi Steroid dari Fraksi Etil Asetat Herba Lampasau (*Diplazium esculentum* Swartz). *Jurnal Pharmascience*, 3(2).
- Saraswathi, R., Lokesh, U., Venkatakrisnan, R., Meera, R., Devi, P. 2010. Isolation and Biological Evaluation of Steroid from Stem of *Costus Igneus*, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2, 5. 444-448
- Sastrohamidjojo. 2005. *Kromatografi*. Yogyakarta: UGM Press.
- Sayuti, K., dan Yenrina, R. 2015. *Antioksidan Alami Dan Sintetik*. Padang: AU Press.
- Sayuti, M. 2017. Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi, Bagian dan Jenis Pelarut Terhadap Rendemen dan Aktifitas Antioksidan Bambu Laut (*Isis Hippuris*). *Technology Science and Engineering Journal*, 1(3): 166-174.
- Shanab, S.M.M. 2007. Antioxidant and Antibiotic Activities of Some Seaweeds (Egyptian Isolates). *Agriculture and Biology*, IX (2): 220–225.
- Shihab, M. Q., 2002. *Tafsiral-Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati.

- Sridhar, A., Khader, P. A., & Ramasamy, T. 2020. Assessment of Cobalt Accumulation Effect on Growth and Antioxidant Responses in Aquatic Macrophyte *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Biologia*, 75(11), 2001–2008.
- Stachowiak, C., Baniszewski, J., Cuda, J. P., St, C., & Weeks, E. N. I. 2021. Influence of Competition and Predation on Survival of the *Hydrilla* Tip Mining Midge and Its Success as a Potential Augmentative Biological Control Agent of *Hydrilla*. *Hydrobiologia*, 848(3), 581–591.
- Sugita, P., Latifah K Darusman, Tuti Setiawati. 2000. Steroid dari Ekstrak *Hopea* mengawan sebagai Bahan Baku Insektisida Bologis, *J. Buletin Kimia*. 37-41.
- Suhartati, T. 2017. *Dasar-Dasar Spektrofotometri UV-Vis dan Spektrometri Massa untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Bandar Lampung: CV. Anugrah Utama Raharja
- Sukadana, I. M., Santi, S. R., dan Monikayani, N. W. 2018. Aktivitas Antimakan Daun Tenggulun (*Protium javanicum* Burm. F.) terhadap Ulat Kubis *Plutella xylostella*. *Jurnal Media Sains*. 2(2).
- Sulistiyan, L. 2018. Pemisahan dan Uji Antioksidan Isolat Steroid Hasil KLTP Ekstrak n-Heksana dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata* Danau Ranu Grati. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Suryelita, Etika, S. B., & Kurnia, N. S. 2017. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Steroid dari Daun Cemara Natal (*Cupressus funebris* Endl.). *Eksakta*.18(1), 87–94.
- Tanor, M. N. 2004. *Hydrilla verticillata* sebagai Sumber Hara pada Sistem Budidaya Kacang Tanah. *Eugenia*. 10(1): 92-101.
- Tonius, J., Wibowo, M. A., dan Idiawati, N. 2016. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Steroid Fraksi n-Heksana Daun Buas-Buas (*Premna serratifolia* L.). *JKK*, 5(1)
- Vania, V. 2020. Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Etil Asetat Dan Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata*. *Skripsi*. Fakultas Saintek UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Vembriarto, J. 2013. *Kimia Steroid*. Malang: Universitas Negeri Malang
- Wahyudi, J., Wusana A. W., Yulian A. R., Atika K. 2011. Pengaruh Suhu terhadap Kadar Glukosa Terbentuk dan Konstanta Kecepatan Reaksi pada Hidrolisis Kulit Pisang. Di dalam: Seminar Nasional Teknik Kimia Kejuangan. *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia Kejuangan*. Yogyakarta: Panitia Kejuangan Yogyakarta.
- Wati, V. S. 2020. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Etil Asetat dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata*. *Skripsi*. Fakultas Saintek UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Winangsih, E. Prihastanti dan S. Parman. 2013. Pengaruh Metode Pengeringan Terhadap Kualitas Simplisia Lempuyang Wangi (*Zingiber aromaticum* L.). *Buletin Anatomi dan Fisiologi*. 21(1), 19-25.

- Xiong, Q., Willson, W.K., & Pang, J. 2007. The *Liebermann-Burchard* Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangement of Cholesterol in Acid. *Lipids*, 42: 87-96.
- Yan, X., Nagata, T., and Xiao, F. 1998. Antioxidative Activities in Some Common Seaweeds. *Journal of Plant Foods for Human Nutrition Institute of Oceanology*,LII.

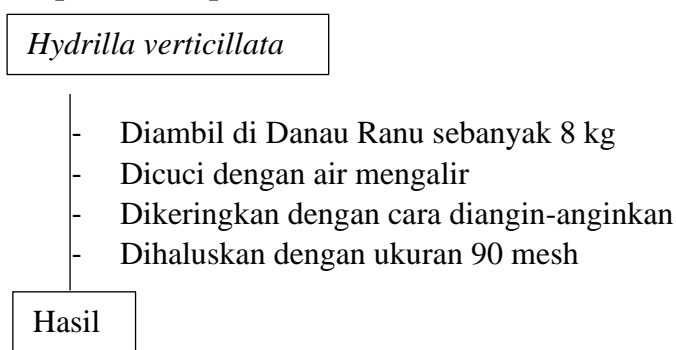
LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian

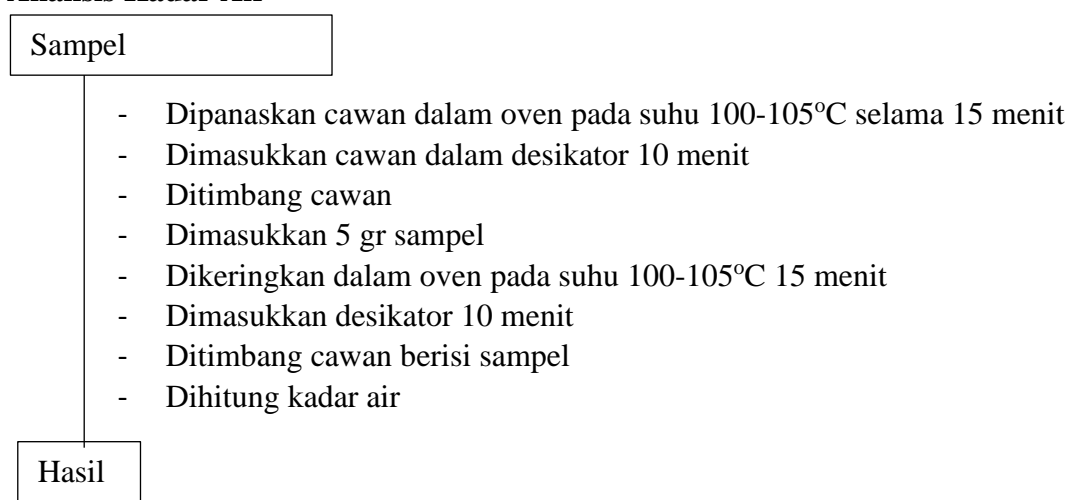


Lampiran 2. Diagram Alir

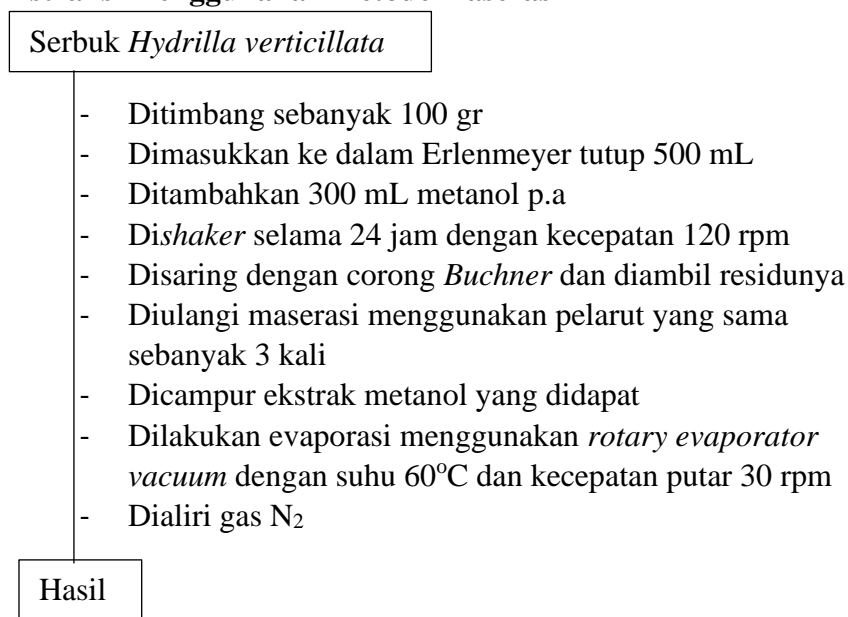
L.2.1 Preparasi Sampel



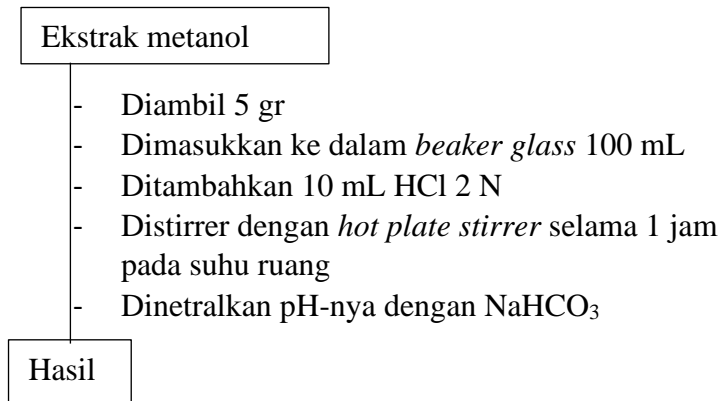
L.2.2 Analisis Kadar Air



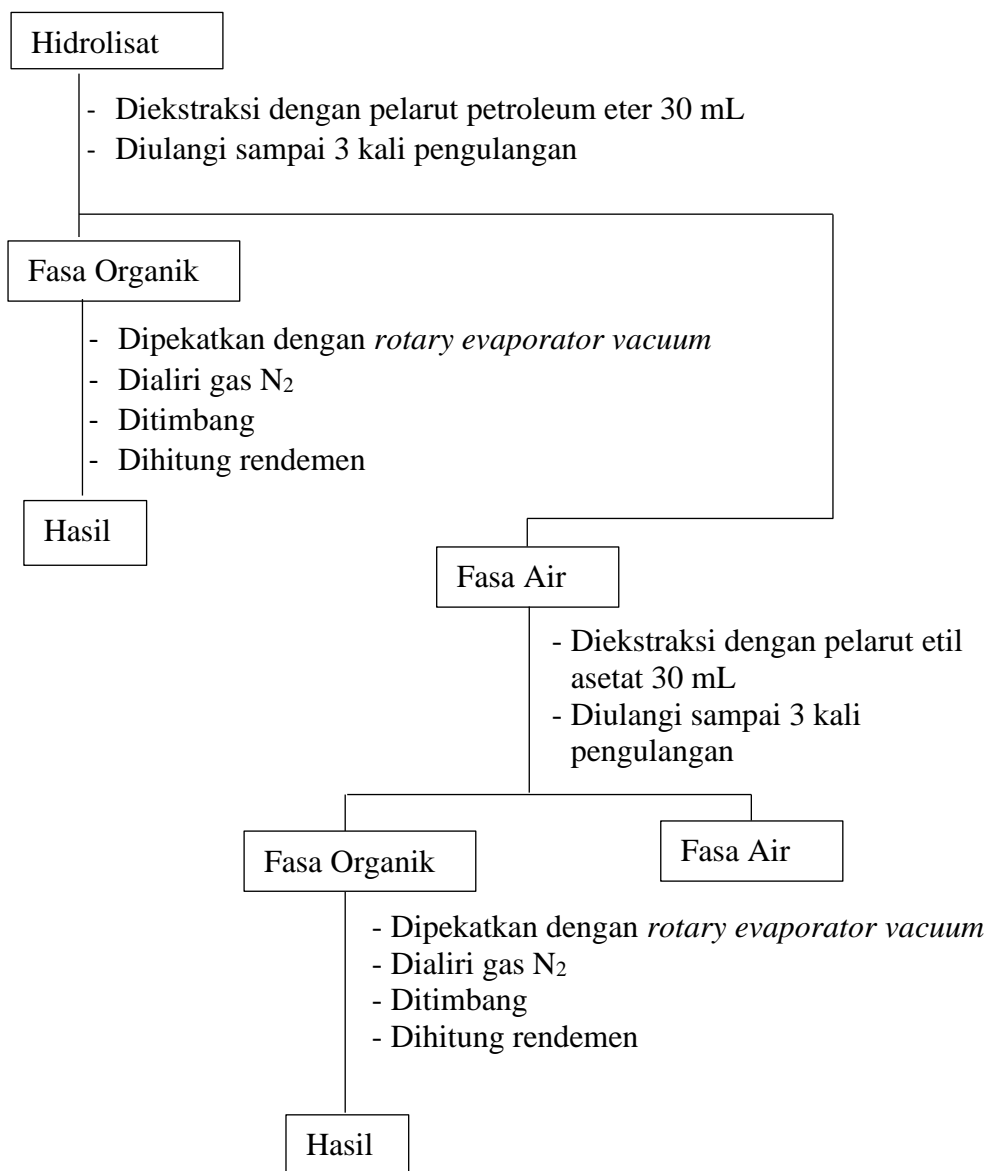
L.2.3 Ekstraksi menggunakan metode maserasi



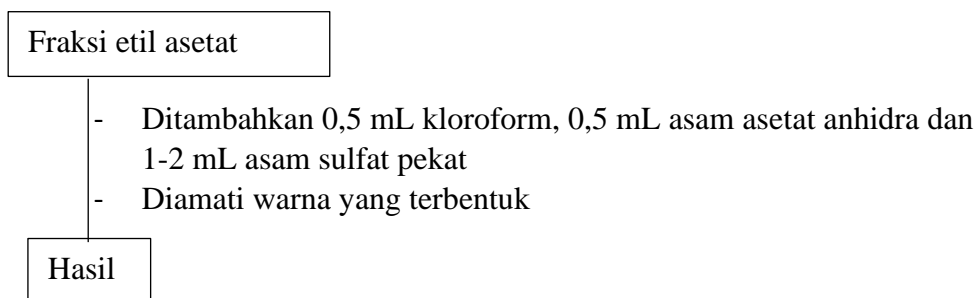
L.2.4 Hidrolisis ekstrak metanol



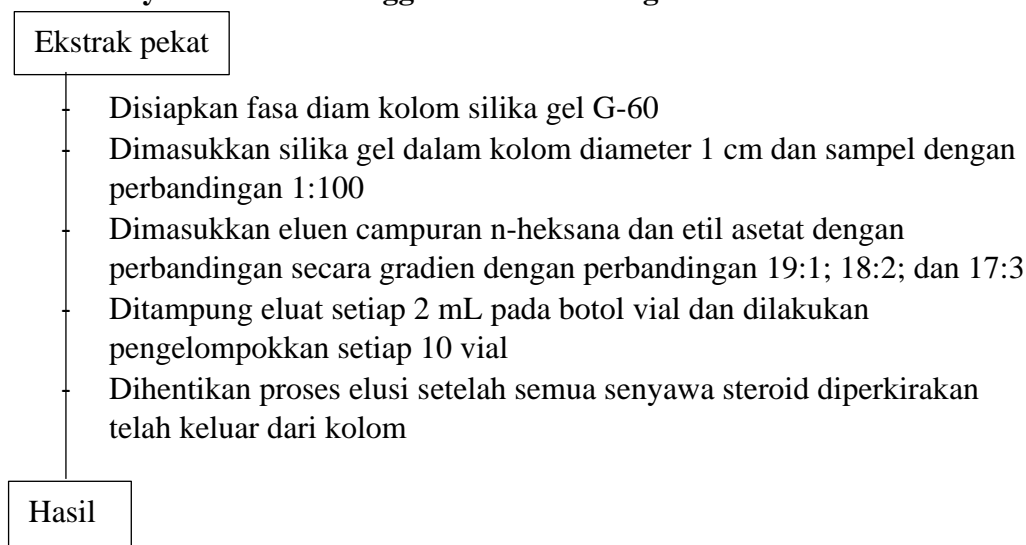
L.2.5 Partisi hidrolisat



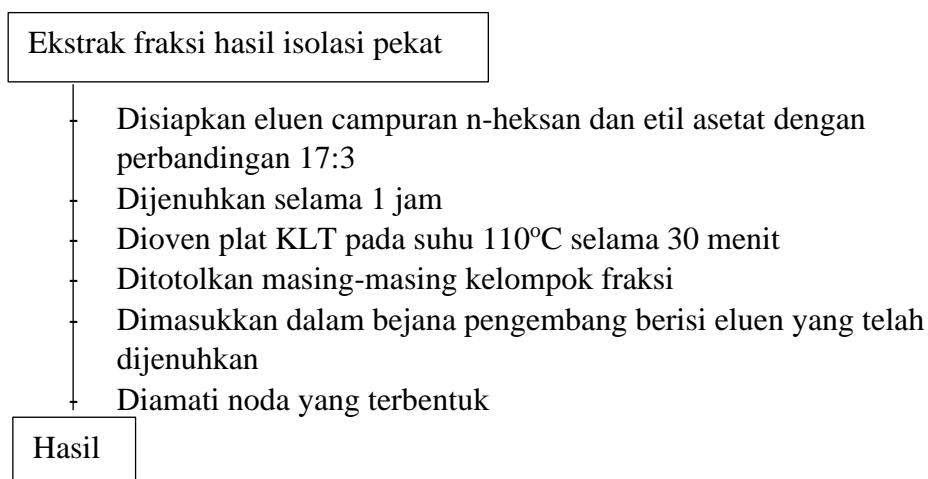
L.2.6 Uji Fitokimia



L.2.7 Isolasi senyawa steroid menggunakan kromatografi kolom

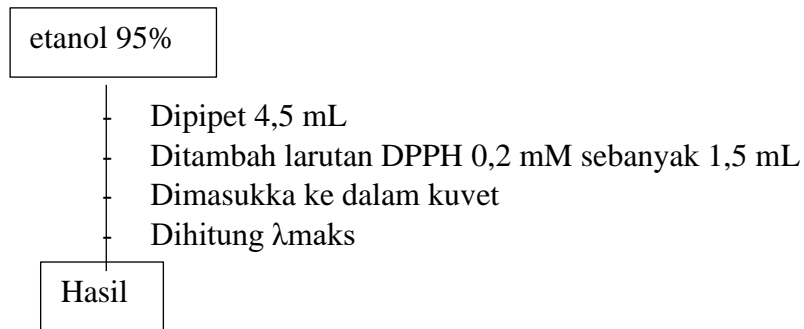


L.2.8 Monitoring dengan KLTA

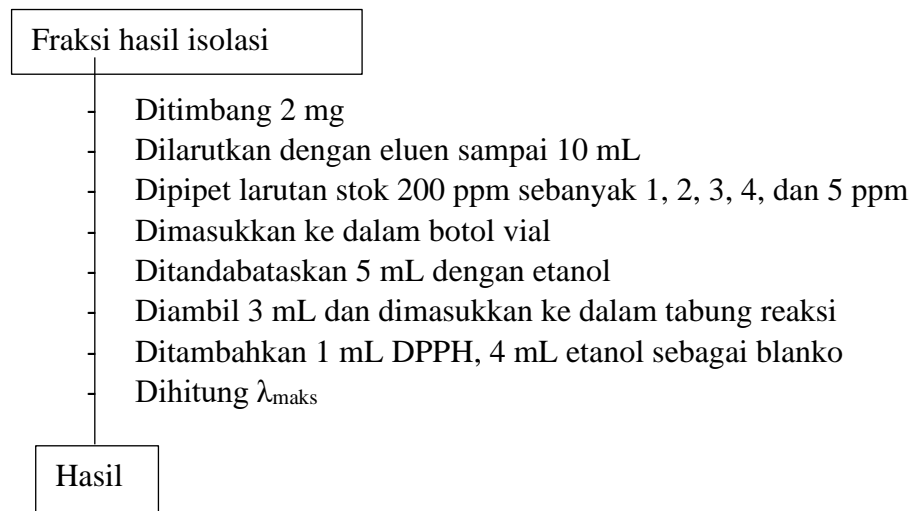


L.2.9 Uji aktivitas antioksidan terhadap DPPH

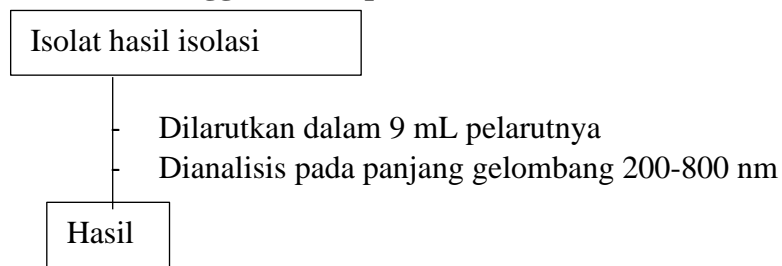
L.2.9.1 Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH



L.2.9.2 Uji Antioksidan



L.2.10 Identifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis



Lampiran 3. Perhitungan

L.3.1 Pembuatan Larutan HCl 2 N

$$\begin{aligned} \rho \text{ HCl } 37\% &= 1,19 \text{ g/mL} = 1190 \text{ g/L} \\ \text{BM HCl} &= 36,42 \text{ g/mol} \\ n &= 1 \text{ (jumlah ion H}^+) \\ \text{Konsentrasi} &= 37\% = \frac{37\text{g}}{100\text{g larutan}} \times 100\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \diamond \text{ Mol HCl dalam konsentrasi } 37\% &= \frac{\text{gram HCl}}{\text{BM HCl}} \\ &= \frac{37 \text{ gram}}{36,42 \text{ g/mol}} \\ &= 1,0159 \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \diamond \text{ Volume larutan HCl dalam } &= \frac{m}{\rho} \\ \text{larutan HCl } 37\% & \\ &= \frac{100 \text{ gram}}{1,19 \text{ g/ml}} \\ &= 84,033 \text{ mL} = 0,084 \text{ L} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \diamond \text{ Molaritas HCl } 37\% &= \frac{\text{mol}}{V \text{ (L)}} \\ &= \frac{1,0159 \text{ mol}}{0,084 \text{ L}} \\ &= 12,094 \text{ mol/L} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \diamond \text{ Normalitas HCl } 37\% &= n \times \text{Molaritas HCl} \\ &= 1 \times 12,094 \text{ mol/L} \\ &= 12,094 \text{ N} \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} N_1 \times V_1 &= N_2 \times V_2 \\ 12,094 \text{ N} \times V_1 &= 2 \text{ N} \times 100 \text{ mL} \\ V_1 &= 16,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

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

L.3.2 Pembuatan Reagen *Lieberman Burchard* (LB)

Pembuatan reagen LB yaitu dengan memipet 0,5 mL kloroform, kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat, dan selanjutnya ditambahkan 1 mL H₂SO₄ 95%.

L.3.3 Pembuatan Larutan DPPH 0,2 mM

DPPH 0,2 mM dalam 50 mL etanol

Mr DPPH = 394,33 g/mol

Mol DPPH = 50 mL × 0,2 mM

$$= 50 \text{ mL} \times \frac{0,2 \text{ M}}{1000}$$

$$= 0,01 \text{ mmol Mg DPPH} = 0,01 \text{ mmol} \times \text{Mr DPPH}$$

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

Cara pembuatan larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 50 mL yaitu dengan menimbang 3,9433 mg padatan DPPH, kemudian dilarutkan dengan 50 mL etanol dalam labu ukur 50 mL. Selanjutnya dikocok hingga homogen

L.3.4 Pembuatan Larutan Stok Isolat

ppm = mg/L

larutan stok (ppm) = 0,5 mg/L dalam 10 mL pelarutnya

$$\text{ppm} = \frac{0,5}{0,01 \text{ L}}$$

ppm = 50 ppm

Jadi, larutan stok 50 ppm pada masing-masing isolat dengan dilarutkan 0.5 mg isolat ke dalam 10 mL pelarutnya.

Pembuatan larutan 1 ppm

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 50 \text{ ppm} = 0,01 \text{ L} \times 1 \text{ ppm}$$

$$V1 = 0,01 \text{ L} \times \frac{1 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}}$$

$$V1 = 0,0002 \text{ L} = 0,2 \text{ mL}$$

Pembuatan larutan 2 ppm

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 50 \text{ ppm} = 0,01 \text{ L} \times 2 \text{ ppm}$$

$$V1 = 0,02 \text{ L} \times \frac{1 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}}$$

$$V1 = 0,0004 \text{ L} = 0,4 \text{ mL}$$

Pembuatan larutan 3 ppm

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 50 \text{ ppm} = 0,01 \text{ L} \times 3 \text{ ppm}$$

$$V1 = 0,03 \text{ L} \times \frac{1 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}}$$

$$V1 = 0,0006 \text{ L} = 0,6 \text{ mL}$$

Pembuatan larutan 4 ppm

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 50 \text{ ppm} = 0,01 \text{ L} \times 4 \text{ ppm}$$

$$V1 = 0,04 \text{ L} \times \frac{1 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}}$$

$$V1 = 0,0008 \text{ L} = 0,8 \text{ mL}$$

Pembuatan larutan 5 ppm

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$V1 \times 50 \text{ ppm} = 0,01L \times 5 \text{ ppm}$$

$$V1 = 0,05L \times \frac{1 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}}$$

$$V1 = 0.001L = 1 \text{ mL}$$

L.3.5 Pembuatan eluen n-heksana : etil asetat

L.3.5.1 Eluen Kromatografi Kolom

Eluen yang digunakan adalah n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 19:1; 18:2; 17:3 dengan volume 100 mL

❖ 19:1

$$\text{n-heksana} = \frac{19}{20} \times 100 \text{ mL} = 95 \text{ mL}$$

$$\text{etil asetat} = \frac{1}{20} \times 100 \text{ mL} = 5 \text{ mL}$$

❖ 18:2

$$\text{n-heksana} = \frac{18}{20} \times 100 \text{ mL} = 90 \text{ mL}$$

$$\text{etil asetat} = \frac{2}{20} \times 100 \text{ mL} = 10 \text{ mL}$$

❖ 17:3

$$\text{n-heksana} = \frac{17}{20} \times 100 \text{ mL} = 85 \text{ mL}$$

$$\text{etil asetat} = \frac{3}{20} \times 100 \text{ mL} = 15 \text{ mL}$$

L.3.5.2 Eluen monitoring KLTA

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

❖ 17:3

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

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

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

Lampiran 4. Data Pengamatan dan Hasil Perhitungan

L.4.1 Rendemen Sampel Serbuk Kering *Hydrilla verticillata*

Berat sampel basah = 8,66 kg

Berat sampel serbuk kering = 0,56 kg

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat sampel serbuk kering}}{\text{Berat sampel basah}} \times 100\% \\ &= \frac{0,56 \text{ kg}}{8,66 \text{ kg}} \times 100\% \\ &= 6,46\% \end{aligned}$$

L.4.2 Data Pengukuran Kadar Air

L4.2.1 Data berat cawan kosong

Ulangan Cawan	Berat Cawan Kosong (g)				Berat Cawan Konstan (g)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
C1	53,9942	53,9964	53,9961	53,9962	53,9962
C2	65,0622	65,0595	65,0605	65,0603	65,0601
C3	65,9529	65,9475	65,9457	65,9479	65,9470

L.4.2.2 Data berat cawan + sampel

Ulangan Cawan	Berat Cawan + sampel (g)				Berat Cawan + sampel Konstan (g)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
C1	54,9973	54,9126	54,9130	54,9131	54,9129
C2	66,0617	65,9779	65,9776	65,9775	65,9777
C3	66,9503	66,8578	66,8577	66,8578	66,8578

1. Kadar air sampel pada cawan C1

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+ sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan+ sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+ sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\ &= \frac{(54,9973 - 54,9129)}{(54,9973 - 53,9962)} \times 100\% \\ &= 8,43\% \end{aligned}$$

2. Kadar air sampel pada cawan C2

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+ sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan+ sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+ sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\ &= \frac{(66,0617 - 65,9777)}{(66,0617 - 65,0601)} \times 100\% \\ &= 8,39\% \end{aligned}$$

3. Kadar air sampel pada cawan C3

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+ sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan+ sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+ sampel sebelum dioven}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\ &= \frac{(66,9503 - 66,8578)}{(66,9503 - 65,9470)} \times 100\% \\ &= 9,22\% \end{aligned}$$

Kadar air rata-rata serbuk kering *H. verticillata* adalah **8,68%**

L.4.3 Perhitungan Rendemen Ekstrak dan Fraksi

L.4.3.1 Rendemen Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata*

Ulangan	Berat Sampel (g)	Berat wadah kosong (g)	Berat wadah + sampel (g)	Berat ekstrak pekat <i>Hydrilla verticillata</i> (g)
1	50	62,5133	65,3656	2,8523
2	50	64,2355	67,0487	2,8132

$$\begin{aligned} \text{Rendemen 1} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat } *Hydrilla verticillata*}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{2,8523 \text{ g}}{50 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 5,7046\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rendemen 2} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat } *Hydrilla verticillata*}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{2,8132 \text{ g}}{50 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 5,6264\% \end{aligned}$$

$$\text{Rendemen rata-rata ekstrak } *H. verticillata* = \frac{(5,7046\% + 5,6264\%)}{2} = 5,6655\%$$

L.4.3.2 Rendemen Fraksi Petroleum Eter

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

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

L.4.3.3 Rendemen Fraksi Etil Asetat

Berat sampel (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + fraksi pekat (g)	Berat fraksi pekat (g)	Rendemen
5	63,8416	63,9816	0,14	2,8%

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

L.4.4. Penggabungan Vial dan Hasil Monitoring Menggunakan KLTA

L.4.4.1 Hasil Monitoring Kromatografi Kolom Fraksi PE Menggunakan KLTA

No	Vial	Warna UV _{254/366}	Jarak Senyawa (cm)	Jarak Elusi (cm)	R _f	Dugaan Senyawa	Berat Isolat (mg)
1	1-46	-	-	8	-	-	-
2	47-69	Hijau	3,5	8	0,4375	Steroid	5,5
3	70-80	Hijau	3	8	0,375	Steroid	2,2
		Merah	1,5	8	0,1875	Triterpenoid	
4	81-94	Merah	2	8	0,25	Triterpenoid	2,9
5	95-106	Merah	1,9	8	0,2375	Triterpenoid	1,8
		Merah	0	8	0	Triterpenoid	
		Merah	1,9	8	0,2375	Triterpenoid	
6	107-120	Merah	1,2	8	0,15	Triterpenoid	2,3
		Merah	0	8	0	Triterpenoid	
		Merah	1,7	8	0,2125	Triterpenoid	
7	121-133	Merah	1,2	8	0,15	Triterpenoid	1,2
		Merah	0	8	0	Triterpenoid	

L.4.4.2 Hasil Monitoring Kromatografi Kolom Fraksi EA Menggunakan KLTA

No	Vial	Warna UV _{254/366}	Jarak Senyawa (cm)	Jarak Elusi (cm)	R _f	Dugaan Senyawa	Berat Isolat (mg)
1	1-78	-	-	8	-	-	-
2	79-109	Hijau	2,5	8	0,3125	Steroid	8,9
3	110-140	Hijau	2,5	8	0,3125	Steroid	8,9
		Merah	1	8	0,125	Triterpenoid	

L.4.5 Data Hasil Uji Aktivitas Antioksidan

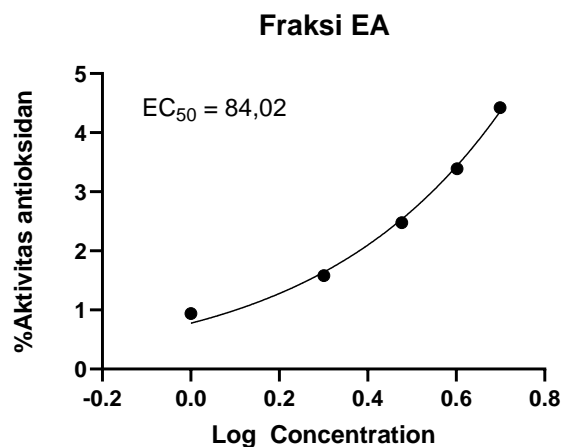
L.4.5.1 Hasil Uji Antioksidan Fraksi Etil Asetat

C (ppm)	Ulangan 1			Ulangan 2		
	abs kontrol	abs sampel	% Aktv. Antioksidan	abs kontrol	abs sampel	% Aktv. Antioksidan
1	0,9610	0,9600	0,104058273	0,4108	0,4035	1,777020448
2	0,9605	0,9397	2,165538782	0,4111	0,407	0,997324252
3	0,9621	0,9510	1,153726224	0,4107	0,3951	3,798392988
4	0,9610	0,92267	3,98855359	0,4115	0,4	2,794653706
5	0,9603	0,9238	3,800895553	0,412	0,3912	5,048543689

C (ppm)	% Aktv. Antioksidan	EC ₅₀
1	0,940539	
2	1,581432	
3	2,47606	84,02
4	3,391604	
5	4,42472	

Comparison of Fits	Can't calculate
Null hypothesis	Different curve for each data set
Alternative hypothesis	One curve for all data sets
P value	
Conclusion (alpha = 0.05)	Models have the same DF
Preferred model	Different curve for each data set
F (DFn, DFd)	
Different curve for each data set	
Best-fit values	
Bottom	= 0,000
Top	= 100,0
LogEC50	1,924
HillSlope	1,095
EC50	84,02
Span	= 100,0
95% CI (profile likelihood)	
LogEC50	1,709 to 2,205
HillSlope	0,9060 to 1,308
EC50	51,18 to 160,4
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	3
R squared	0,9946
Sum of Squares	0,04213
Sy.x	0,1185
Constraints	
Bottom	Bottom = 0
Top	Top = 100
One curve for all data sets	
Best-fit values	

Bottom	= 0,000	
Top	= 100,0	
LogEC50	1,924	1,924
HillSlope	1,095	1,095
EC50	84,02	84,02
Span	= 100,0	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	1,709 to 2,205	1,709 to 2,205
HillSlope	0,9060 to 1,308	0,9060 to 1,308
EC50	51,18 to 160,4	51,18 to 160,4
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R squared	0,9946	0,9946
Sum of Squares	0,04213	0,04213
Sy.x		0,1185
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
# of X values	5	
# Y values analyzed	5	



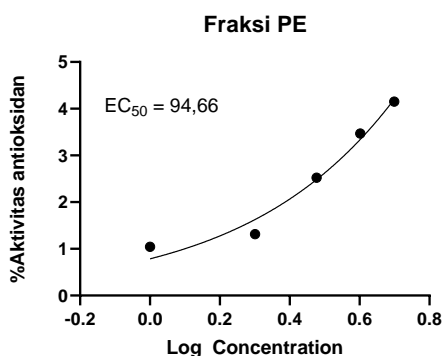
L.4.5.2 Hasil Uji Antioksidan Fraksi Petroleum Eter

C (ppm)	Ulangan 1			Ulangan 2		
	abs kontrol	abs sampel	% Aktv. Antioksidan	abs kontrol	abs sampel	% Aktv. Antioksidan
1	0,9602	0,9584	0,187460946	0,4108	0,403	1,898734177
2	0,9617	0,9542	0,779868982	0,4113	0,4037	1,84779966
3	0,9600	0,9483	1,21875	0,4128	0,397	3,82751938
4	0,9596	0,9425	1,781992497	0,4112	0,39	5,155642023
5	0,9601	0,9398	2,114363087	0,4136	0,388	6,189555126

C (ppm)	% Aktv. Antioksidan	EC ₅₀
1	1,043098	
2	1,313834	
3	2,523135	94,66
4	3,468817	
5	4,151959	

Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		Different curve for each data set
Alternative hypothesis		One curve for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		Different curve for each data set
F (DFn, DFd)		
Different curve for each data set		
Best-fit values		
Bottom	= 0,000	
Top	= 100,0	
LogEC50	1,976	
HillSlope	1,063	
EC50	94,66	
Span	= 100,0	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	1,551 to 2,751	
HillSlope	0,6872 to 1,544	
EC50	35,58 to 564,2	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	
R squared	0,9743	
Sum of Squares	0,1847	
Sy.x	0,2481	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
One curve for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0,000	
Top	= 100,0	
LogEC50	1,976	1,976
HillSlope	1,063	1,063
EC50	94,66	94,66
Span	= 100,0	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	1,551 to 2,751	1,551 to 2,751
HillSlope	0,6872 to 1,544	0,6872 to 1,544
EC50	35,58 to 564,2	35,58 to 564,2
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R squared	0,9743	0,9743
Sum of Squares	0,1847	0,1847
Sy.x		0,2481
Constraints		

Bottom Bottom = 0
 Top Top = 100
 LogEC50 LogEC50 is shared
 HillSlope HillSlope is shared
 Number of points
 # of X values 5
 # Y values analyzed 5



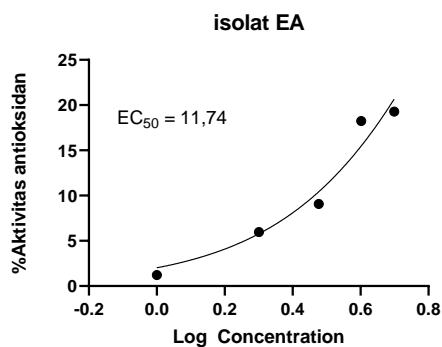
L.4.5.3 Hasil Uji Antioksidan Isolat Etil Asetat

C (ppm)	Ulangan 1			Ulangan 2		
	abs kontrol	abs sampel	% Aktv. Antioksidan	abs kontrol	abs sampel	% Aktv. Antioksidan
1	0,4584	0,4643	-1,287085515	0,412	0,3966	3,737864078
2	0,4574	0,4186	8,482728465	0,4115	0,3972	3,47509113
3	0,4587	0,4026	12,23021583	0,4113	0,387	5,90809628
4	0,4581	0,4026	12,11525868	0,4112	0,311	24,36770428
5	0,4594	0,3959	13,82237701	0,4118	0,31	24,72073822

C (ppm)	% Aktv. Antioksidan	EC ₅₀
1	1,225389	
2	5,97891	
3	9,069156	11,74
4	18,24148	
5	19,27156	

Comparison of Fits Can't calculate
 Null hypothesis Different curve for each data set
 Alternative hypothesis One curve for all data sets
 P value
 Conclusion (alpha = 0.05) Models have the same DF
 Preferred model Different curve for each data set
 F (DFn, DFd)
 Different curve for each data set
 Best-fit values
 Bottom = 0,000
 Top = 100,0
 LogEC50 1,070

HillSlope	1,577	
EC50	11,74	
Span	= 100,0	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	0,8771 to 1,572	
HillSlope	0,7989 to 2,775	
EC50	7,535 to 37,36	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	
R squared	0,9508	
Sum of Squares	12,05	
Sy.x	2,004	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
One curve for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0,000	
Top	= 100,0	
LogEC50	1,070	1,070
HillSlope	1,577	1,577
EC50	11,74	11,74
Span	= 100,0	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	0,8771 to 1,572	0,8771 to 1,572
HillSlope	0,7989 to 2,775	0,7989 to 2,775
EC50	7,535 to 37,36	7,535 to 37,36
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R squared	0,9508	0,9508
Sum of Squares	12,05	12,05
Sy.x		2,004
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
# of X values	5	
# Y values analyzed	5	



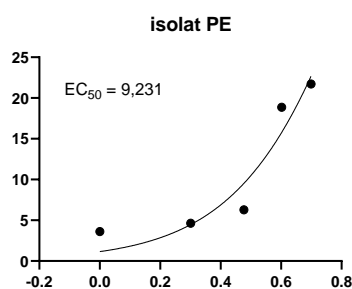
L.4.5.4 Hasil Uji Antioksidan Isolat Petroleum Eter

C (ppm)	Ulangan 1			Ulangan 2		
	abs kontrol	abs sampel	% Aktv. Antioksidan	abs kontrol	abs sampel	% Aktv. Antioksidan
1	0,4567	0,437	4,313553755	0,6663	0,6468	2,926609635
2	0,4558	0,418	8,293111014	0,6661	0,6595	0,990842216
3	0,4556	0,421	7,594381036	0,6649	0,6319	4,963152354
4	0,4544	0,3753	17,40757042	0,6678	0,532	20,33542977
5	0,4522	0,362	19,94692614	0,6693	0,512	23,50216644

C (ppm)	% Aktv. Antioksidan	EC ₅₀
1	3,620082	
2	4,641977	
3	6,278767	9,231
4	18,8715	
5	21,72455	

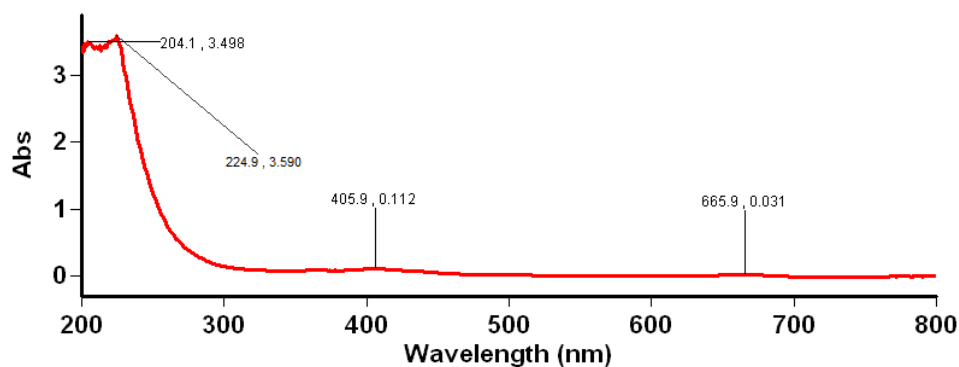
Comparison of Fits	Can't calculate
Null hypothesis	Different curve for each data set
Alternative hypothesis	One curve for all data sets
P value	
Conclusion (alpha = 0.05)	Models have the same DF
Preferred model	Different curve for each data set
F (DFn, DFd)	
Different curve for each data set	
Best-fit values	
Bottom	= 0,000
Top	= 100,0
LogEC50	0,9652
HillSlope	2,002
EC50	9,231
Span	= 100,0
95% CI (profile likelihood)	
LogEC50	0,7860 to 1,809
HillSlope	0,6483 to 4,643
EC50	6,110 to 64,35
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	3
R squared	0,9079
Sum of Squares	27,10
Sy.x	3,005
Constraints	
Bottom	Bottom = 0
Top	Top = 100
One curve for all data sets	
Best-fit values	
Bottom	= 0,000

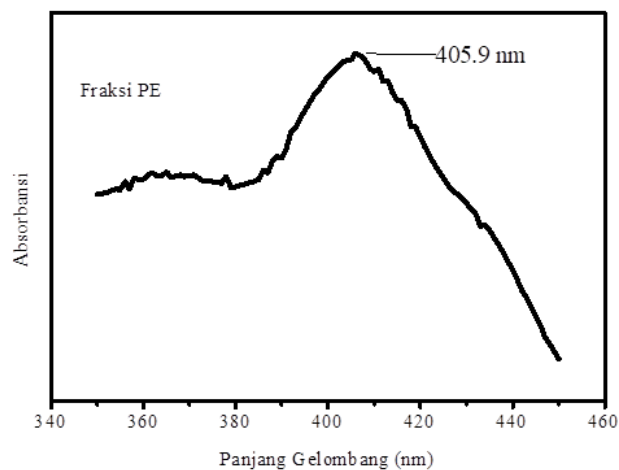
Top	= 100,0	
LogEC50	0,9652	0,9652
HillSlope	2,002	2,002
EC50	9,231	9,231
Span	= 100,0	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	0,7860 to 1,809	0,7860 to 1,809
HillSlope	0,6483 to 4,643	0,6483 to 4,643
EC50	6,110 to 64,35	6,110 to 64,35
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R squared	0,9079	0,9079
Sum of Squares	27,10	27,10
Sy.x		3,005
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
# of X values	5	
# Y values analyzed	5	



L.4.6 Hasil Identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis

L.4.6.1 Hasil Identifikasi fraksi petroleum eter





Scan Analysis Report

Report Time : Fri 02 Jul 03:07:11 PM 2021

Method:

Batch: D:\Erlina Novitasari\Lamdha Maks Fraksi PE (02-07-2021).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: Fraksi PE

Collection Time 7/2/2021 3:07:15 PM

Peak Table

Peak Style

Peaks

Peak Threshold

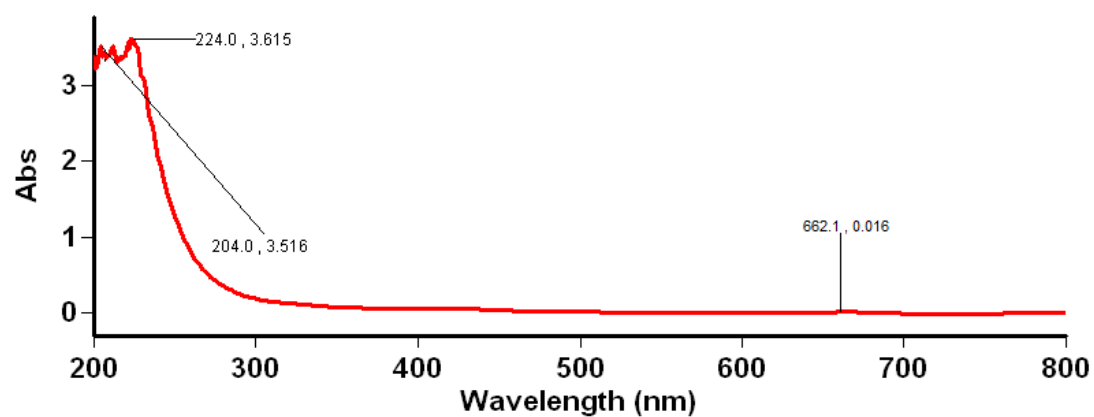
0.0100

Range

800.0nm to 200.0nm

Wavelength (nm)	Abs
665.9	0.031
405.9	0.112
224.9	3.590
223.0	3.537
219.0	3.501
216.0	3.441
213.0	3.449
210.0	3.423
204.1	3.498
202.0	3.475

L.4.6.1 Hasil Identifikasi fraksi etil asetat



Scan Analysis Report

Report Time : Wed 07 Jul 12:55:59 PM 2021

Method:

Batch: D:\Erlina Novitasari\Lamdha Maks Fraksi EA (07-07-2021).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: Fraksi EA

Collection Time

7/7/2021 12:56:25 PM

Peak Table

Peak Style

Peaks

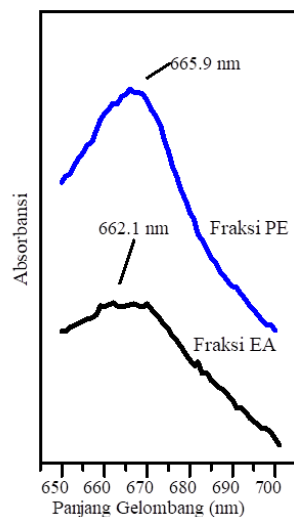
Peak Threshold

0.0100

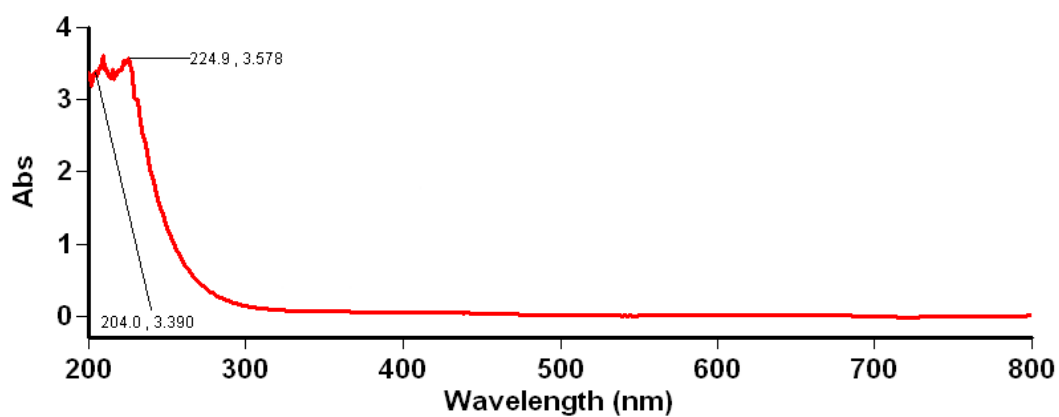
Range

800.0nm to 200.0nm

Wavelength (nm)	Abs
662.1	0.016
224.0	3.615
221.0	3.573
216.0	3.369
212.1	3.520
205.9	3.433
204.0	3.516



L.4.6.1 Hasil Identifikasi isolat petroleum eter



Scan Analysis Report

Report Time : Wed 07 Jul 01:06:48 PM 2021

Method:

Batch: D:\Erlina Novitasari\Lamdha Maks Isolat PE (07-07-2021).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: Isolat PE

Collection Time 7/7/2021 1:06:56 PM

Peak Table

Peak Style Peaks

Peak Threshold 0.0100

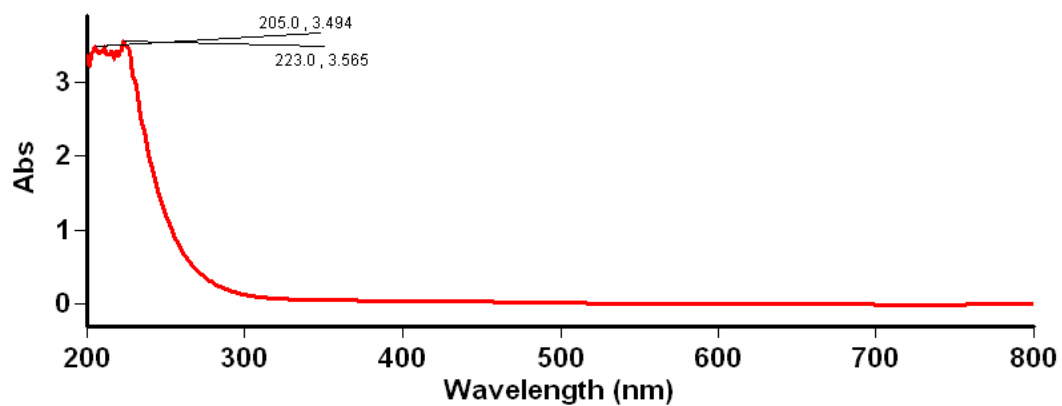
Range 800.0nm to 200.0nm

Wavelength (nm) Abs

224.9 3.578

223.0	3.554
216.9	3.366
215.0	3.431
211.0	3.461
209.1	3.608
204.0	3.390

L.4.6.1 Hasil Identifikasi isolat etil asetat



Scan Analysis Report

Report Time : Wed 07 Jul 12:59:37 PM 2021

Method:

Batch: D:\Erlina Novitasari\Lamdha Maks Isolat EA (07-07-2021).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: Isolat EA

Collection Time 7/7/2021 12:59:44 PM

Peak Table

Peak Style Peaks

Peak Threshold 0.0100

Range 800.0nm to 200.0nm

Wavelength (nm)	Abs
223.0	3.565
221.0	3.421
219.0	3.431
215.0	3.407
213.0	3.386
211.0	3.489
208.0	3.419
205.0	3.494

Lampiran 5 Dokumentasi

L.5.1 Preparasi sampel



Pencucian *Hydrilla verticillata*



Pengeringan *Hydrilla verticillata*



Serbuk *Hydrilla verticillata* 90 mesh

L.5.2 Analisis kadar air



Penimbangan cawan kosong



Pengovenan cawan kosong



Pendinginan cawan kosong



Penimbangan sampel



Pengovenan sampel



Pendinginan sampel

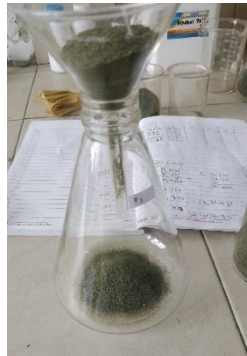


Penimbangan sampel setelah di oven

L.5.3 Ekstraksi sampel



Penimbangan sampel



Memasukkan dalam erlenmayer tutup



Proses *shaker* 24 jam



Penyaringan filtrat



Filtrat hari ke-1



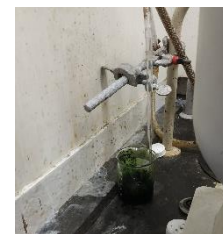
Filtrat hari ke-2



Filtrat hari ke-3



Proses evaporasi



Diuapkan dengan gas N_2

L.5.3 Hidrolisis



Dishaker selama 1 jam



Ditambahkan $NaHCO_3$



Dicek pH hingga netral

L.5.4 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.5.5 Uji fitokimia



Hasil PE



Hasil EA

L.5.6 Pemisahan menggunakan kromatografi kolom basah

L.5.6.1 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.5.6.2 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 EA

L.5.7 Monitoring KLTA

L.5.7.1 Fraksi Petroleum eter



Proses elusi pada KLTA



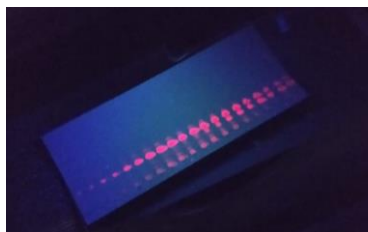
Proses elusi pada KLTA



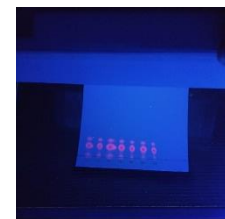
Hasil KLTA isolat
1-39



Hasil KLTA isolat 41-79



Hasil KLTA isolat 81-119



Hasil KLTA isolat
121-133

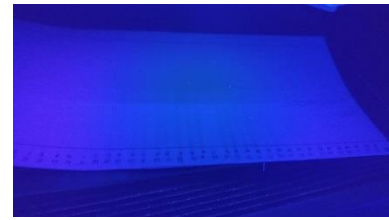
L.5.7.2 Fraksi etil asetat



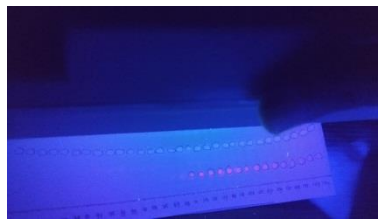
Proses elusi
pada KLTA



Proses elusi pada KLTA



Hasil KLTA isolat 1-77



Hasil KLTA isolat 79-139

L.5.8 Uji Aktivitas Antioksidan



Sampel sebelum ditambah DPPH



Sampel sesudah ditambah DPPH