

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA STEROID HASIL
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS PREPARATIF FRAKSI n-BUTANOL
ALGA MERAH (*Eucheuma Cottonii*) DARI PERAIRAN WONGSOREJO
BANYUWANGI**

SKRIPSI

**Oleh:
DIMAS HADI ADJIE PRATAMA
NIM. 16630010**



**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2022**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA STEROID HASIL
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS PREPARATIF FRAKSI n-BUTANOL
ALGA MERAH (*Eucheuma Cottonii*) DARI PERAIRAN WONGSOREJO
BANYUWANGI**

SKRIPSI

**Oleh:
DIMAS HADI ADJIE PRATAMA
NIM. 16630010**

**Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri 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
2022**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA STEROID HASIL
KROMATOGRafi LAPIS TIPIS PREPARATIF FRAKSI N-BUTANOL
ALGA MERAH (*Eucheuma Cottonii*) DARI PERAIRAN WONGSOREJO
BANYUWANGI**

SKRIPSI

**Oleh:
DIMAS HADI ADJIE PRATAMA
NIM. 16630010**

**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 6 Juni 2022**

Pembimbing I



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

Pembimbing II



**Ahmad Hanapi, M.Sc
NIDT. 19851225 20160801 1 069**

**Mengesahkan,
Ketua Program Studi**



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

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA STEROID HASIL
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS PREPARATIF FRAKSI N-BUTANOL
ALGA MERAH (*Eucheuma Cottonii*) DARI PERAIRAN WONGSOREJO
BANYUWANGI**

SKRIPSI

**Oleh:
DIMAS HADI ADJIE PRATAMA
NIM. 16630010**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 17 Juni 2022**

**Ketua Penguji : Eny Yulianti, M.Si
NIP. 19760611 200501 2 006**

(.....)

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

(.....)

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

(.....)

**Anggota Penguji III : Ahmad Hanapi, M.Sc
NIDT. 19851225 20160801 1 069**

(.....)

**Mengesahkan,
Ketua Program Studi**


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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dimas Hadi Adjie Pratama
NIM : 16630010
Program Studi : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Steroid Hasil
Kromatografi Lapis Tipis Preparatif Fraksi N-Butanol
Alga Merah (*Eucheuma Cottonii*) Dari Perairan
Wongsorejo Banyuwangi

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

Yang membuat pernyataan
Malang, 24 April 2022



Dimas Hadi Adjie Pratama
NIM. 16630010

HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillah wa syukurillah, penulis ucapkan sebagai luapan rasa syukur kepada Allah SWT, Tuhan yang selalu memberikan rahmat kepada seluruh alam semesta. Sehingga berkat kasih sayang dan ridha-Nya yang tak akan pernah habis dan terputus ini, penulis dapat menikmati indahnya thalabul ilmi bersama dengan orang-orang ahli ilmu di badangnya masing-masing.. Shalawat Serta salam penulis ucapkan kepada junjungan umat muslim, nabi agung Muhammad SAW, atas segalakeselimpahan syafa'at yang semoga saja kita dapatkan hingga hari kiamat nanti. Kiranya berkenan sebuah karya tulis ini penulis persembahkan kepada:

1. Ayah dan Ibu tercinta yang tak pernah berhenti memberikan support berupa material dan spiritual, sehingga penelitian ini bisa berjalan dengan lancar hingga terciptanya sebuah karya ini.
2. Bapak dan Ibu dosen Kimia UIN Malang, terkhusus untuk pembimbing Bapak A. Ghanaim Fasya dan Bapak Ahmad Hanapi yang bersedia membimbing, memberikan petunjuk dan arahan serta beberapa patah kata wejangan, sehingga menuntaskan karya ini. Kepadanya penulis ucapkan beribu banyak terimakasih.
3. Kepada penguji Ibu Eny Yulianti dan Ibu Rachmawati Ningsih, penulis mengucapkan banyak terimakasih telah memberikan banyak masukan hingga terwujudnya karya yang lebih baik dan sempurna.
4. Kepada laboran kimia UIN Malang, terkhusus Ibu Rika , Bapak Chalid Al-Ayubi, Ibu Isnaeni dan seluruh laboran kimia yang telah memberikan banyak pertolongan selama menjalani penelitian.

Terakhir penulis ucapkan terimakasih kepada teman-teman yang telah membantu dalam menjalani penelitian, penulis ucapkan satu-persatu. Semoga kesuksesan selalu menyertai kalian

MOTTO

”Mungkin karena sensasi keberhasilan setelah berusaha keras, melatih hal yang tidak kita bisa akan terasa luar biasa”

”Jika Kamu tidak sanggup menahan lelahnya belajar maka kamu harus sanggup menahan perihnya kebodohan.

“Imam Syafi’i”

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi penelitian ini dengan baik. Skripsi penelitian yang telah disusun penulis berjudul **UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA STEROID HASIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS PREPARATIF FRAKSI N-BUTANOL ALGA MERAH (*Eucheuma Cottonii*) DARI PERAIRAN WONGSOREJO BANYUWANGI**. Sholawat serta salam tak henti-hentinya penulis panjatkan kepada junjungan besar Nabi Muhammad SAW yang kelak di akhir kita harapkan syafaatnya.

Dalam kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang membantu. Ucapan terimakasih penulis ucapkan kepada:

1. Prof. Dr. M. Zainuddin, MA selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Rachmawati Ningsih, M.Si selaku Ketua Program Studi Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. A. Ghanaim Fasya, M.Si selaku dosen pembimbing penelitian.
5. Ahmad Hanapi, M.Sc selaku dosen pembimbing agama Program Studi Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
6. Segenap keluarga yang telah memberi support dan do'a.
7. Segenap teman-teman yang telah membantu meluangkan ide dan waktunya dalam menyusun skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi penelitian ini. Kritik dan saran dari pembaca sangat diharapkan agar penulis dapat mengetahui kekurangan dari skripsi yang kami tuliskan. Semoga susunan proposal penelitian ini dapat berguna dan memberi manfaat kepada banyak orang.

Malang, 19 Februari 2022

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR JUDUL	i
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
LEMBAR PERSEMBAHAN	v
MOTTO	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
مستخلص البحث.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan	5
1.4 Batasan Masalah.....	6
1.5 Manfaat	6
BAB II TINAJUAN PUSTAKA	7
2.1 Alga Merah.....	7
2.2 Senyawa Steroid.....	10
2.3 Ekstraksi Maserasi	11
2.4 Hidrolisis	12
2.5 Partisi	13
2.6 Uji Fitokimia Steroid	14
2.7 Pemisahan Senyawa Steroid Menggunakan KLT.....	15
2.8 Uji Antioksidan Senyawa Steroid Menggunakan Metode DPPH.....	17
2.9 Analisa Senyawa Steroid.....	20
2.9.1 Analisa Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	20
2.9.2 Analisa Steroid Menggunakan Spektrofotometer FTIR.....	21
2.9.3 Analisa Steroid Menggunakan Spektrofotometer LCMS/MS	22
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	24
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian	24
3.2 Alat Dan Bahan Penelitian	24
3.2.1 Alat Penelitian.....	24
3.2.2 Bahan Penelitian	24
3.3 Rancangan Penelitian	25
3.4 Tahapan Penelitian	25
3.5 Pelaksanaan Penelitian	26
3.5.1 Preparasi Sampel.....	26
3.5.2 Analisa Kadar Air Secara Termografi	26

3.5.3 Ekstraksi Maserasi.....	27
3.5.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Peekat Metanol <i>Eucheuma Cottonii</i>	27
3.5.5 Uji Fitokimia.....	28
3.5.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif.....	28
3.5.7 Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Steroid dengan DPPH	28
3.5.8 Analisis Senyawa Steroid	29
3.5.8.1 Analisis Senyawa dengan Spektrofotometri UV-Vis.....	29
3.5.8.2 Analisis Senyawa dengan Spektroskopi FTIR	30
3.5.8.3 Analisis Senyawa dengan Spektroskopi LCMS/MS	30
3.6 Analisa Data	31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1 Preparasi Sampel.....	32
4.2 Analisa Kadar Air	33
4.3 Ekstraksi Sampel.....	33
4.3.1 Maserasi	33
4.3.2 Hidrolisis.....	34
4.3.3 Partisi	35
4.4 Uji Fitokimia Senyawa Steroid	37
4.5 Pemisahan senyawa steroid menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif	38
4.6 Uji Aktivitas Antioksidan	39
4.6.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH.....	39
4.6.2 Pengukuran Potensi Aktivitas Antioksidan	39
4.7 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan Spektrofotometri UV-Vis	41
4.8. Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan Spektroskopi FTIR	43
4.9 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan Spektroskopi LC-MS/MS.....	45
4.10 Pemanfaatan Alga Merah <i>Eucheuma Cottonii</i> dalam Perspektif Islam	59
BAB V Penutup	51
5.1 Kesimpulan	51
5.2 Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA	53
LAMPIRAN.....	59

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Pengolahan tingkat aktivitas antioksidan.....	19
Tabel 4.1 Hasil Kromatografi Lapis Tipis Preparatif.....	38
Tabel 4.2 Nilai persen aktivitas antioksidan sampel dan nilai IC ₅₀ masing-masing sampel	40
Tabel 4.3 Interpretasi Spektra FTIR Isolat 9 dan 10.....	44
Tabel 4.4 Hasil Deteksi Ion Steroid LC-MS/MS Isolat 10.....	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Alga Merah (<i>Eucheuma Cottonii</i>)	7
Gambar 2.2 Struktur Inti Senyawa Steroid	11
Gambar 2.3 Mekanisme Reaksi Uji Firokimia <i>Liebermann-burchard</i>	15
Gambar 2.4 a. Struktur kimia radikal bebas DPPH b. struktur kimia non radikal bebas DPPH.....	17
Gambar 2.5 Mekanisme Reaksi Aktivitas Antioksidan dengan DPPH	18
Gambar 2.6 Spektrum UV-Vis Steroid dari <i>Eucheuma alvarezy</i> dorthy	21
Gambar 2.7 Spektrum FTIR steroid dari <i>Eucheuma alvarezy</i> doty	23
Gambar 2.8 Kromatogram LC Isolat Steroid.....	23
Gambar 2.9 Spektrogram Massa Isolat pada Waktu Retensi 7.49 Menit	23
Gambar 4.1 Dugaan reaksi Hidrolisis pada Ikatan <i>O</i> -Glikosida.....	35
Gambar 4.2 Hasil Uji Fitokimia Isolat Fraksi n-butanol.....	37
Gambar 4.3 Panjang Gelombang Maksimum DPPH.....	39
Gambar 4.4 Hasil Pengukuran Serapan Maksimum (a) Isolat 9 dan (b) Isolat 10.....	42
Gambar 4.5 Serapan Hasil Identifikasi FTIR (a) Isolat 9 (b) Isolat 10.....	43
Gambar 4.6 Hasil Kromatogram Isolat 10 n-butanol <i>Eucheuma Cottonii</i>	45
Gambar 4.7 Spektrum dari 12-Dehydrodeoxycholic acid.....	47
Gambar 4.8 Spektrum dari Quingstanol.....	47
Gambar 4.9 Spektrum dari Eplerenon.....	48
Gambar 4.10 Spektrum dari Nandlore Benzoat	48
Gambar 4.11 Struktur Steroid (a) Eplerenone, (b) Nandrolone benzoat, (c) 12-Dehydrodeoxycholic acid dan (d) Quingstanol	48

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian	59
Lampiran 2. Diagram Alir.....	60
Lampiran 3. Pembuatan Larutan dan Reagen	66
Lampiran 4. Data Pengamatan dan Perhitungan	72
Lampiran 5. Hasil KLTP	74
Lampiran 6. Pengujian Aktivitas Antioksidan	76
Lampiran 7. Hasil Identifikasi menggunakan UV-Vis	79
Lampiran 8. Hasil Identifikasi menggunakan FTIR	81
Lampiran 9. Hasil Identifikasi menggunakan LC-MS/MS	82
Lampiran 10. Dokumen Penelitian	85

ABSTRAK

Pratama, Dimas Hadi Adjie. **UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA STEROID HASIL KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS PREPARATIF FRAKSI N-BUTANOL ALGA MERAH (*Eucheuma Cottonii*) DARI PERAIRAN WONGSOREJO BANYUWANGI**. Skripsi. Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Ahmad Hanapi M.Si

Kata Kunci : Red algae (*Eucheuma Cottonii*), Steroid, Kromatografi Lapis Tipis Preparatif, TLC, UV-Vis, FTIR, LC-MS/MS.

Alga merah (*Eucheuma Cottonii*) merupakan tumbuhan laut yang banyak tersebar khususnya di negara tropis. *Eucheuma Cottonii* dalam keseharian secara luas digunakan dalam berbagai macam hal dalam kesehatan. Tumbuhan *Eucheuma Cottonii* mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, saponin, tanin, flavonoid, dan triterpenoid (steroid) yang terbukti memiliki kemampuan sebagai obat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan fraksi n-butanol serta mengetahui golongan senyawa aktif yang memiliki antioksidan tertinggi dengan metode DPPH

Alga Merah *Eucheuma Cottonii* diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol p.a. Kemudian ekstrak metanol dihidrolisis dengan larutan HCL 2 N, kemudian dipartisi dengan menggunakan pelarut n-butanol. Masing-masing fraksi diuji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dengan parameter IC₅₀. Identifikasi senyawa aktif dilakukan dengan uji fitokimia dilanjutkan dengan identifikasi menggunakan Spektroskopi UV-Vis, Spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infra Red Refraction*), dan Spektrometri LC-MS/MS. Hasil penelitian menunjukkan isolat steroid 9, 10 dan vitamin C memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ 12,0076 ppm, 8,9352 ppm dan 9,7636 ppm.. Kedua isolat ini dikategorikan sebagai antioksidan kuat, tetapi isolat 10 memiliki aktivitas lebih kuat dibandingkan dengan vitamin C. Hasil pengujian UV-Vis menunjukkan isolat 9 steroid memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang 203,0 ;207,0; 210,0; 166,0 dan 589,9 nm sedangkan pada isolat 10 steroid memiliki serapan pada panjang gelombang 204,0; 207,0; 266,0; dan 602,9 nm. Hasil pengujian FTIR menghasilkan serapan OH *stretching*, Csp³-H, C=O, C-H, CH₂, C-O, =C-O dan C=CH. Hasil pengujian LC-MS/MS menunjukkan senyawa steroid pada isolat merupakan steroid 12-Dehydrodeoxycholic acid, Quingestanol, Eplernon dan Nandrolene benzoat (steroid ester).

ABSTRACT

Pratama, Dimas Hadi Adjie. **ANTIOXIDANT ACTIVITY TEST OF STEROID COMPOUNDS RESULTS BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY N-BUTANOL FRACTION OF RED ALGAE (*Eucheuma Cottonii*) FROM WONGSOREJO BANYUWANGI WATERS.** Thesis. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University, Malang. Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Advisor II: Ahmad Hanapi M.Si

Keyword: Red algae (*Eucheuma Cottonii*), Steroid, Thin Layer Chromatography Preparatif, TLC, UV-Vis, FTIR, LC-MS.

Red algae (*Eucheuma Cottonii*) is a marine plant that is widely distributed, especially in tropical countries. *Eucheuma Cottonii* in everyday life is widely used in various ways in health. *Eucheuma Cottonii* contains secondary metabolites, namely alkaloids, saponins, tannins, flavonoids, and triterpenoids (steroids) which are proven to have medicinal properties. This study aims to determine the antioxidant activity of the n-butanol fraction and to determine which active compound has the highest antioxidant activity using the DPPH method.

Red Algae *Eucheuma Cottonii* was extracted by maceration method using methanol p.a solvent. Then the methanol extract was hydrolyzed with 2 N HCl solution, then partitioned using n-butanol as solvent. Each fraction was tested for antioxidant activity using the DPPH method with IC₅₀ parameter. Identification of active compounds was carried out by phytochemical test followed by identification using UV-Vis Spectroscopy, FTIR (Fourier Transform Infra Red Reflection) Spectrometry, and LC-MS/MS Spectrometry. The results showed that steroid 9, 10 and vitamin C isolates had antioxidant activity with IC₅₀ values of 12.0076 ppm, 8.9352 ppm and 9.7636 ppm. Both isolates were categorized as strong antioxidants, but isolate 10 had stronger activity than vitamin C. UV-Vis test results showed that 9 steroid isolates had maximum absorption at wavelengths of 203.0 ;207.0; 210.0; 166.0 and 589.9 nm while the 10 steroid isolates had absorption at a wavelength of 204.0; 207.0; 266.0; and 602.9 nm. The results of the FTIR test resulted in the absorption of OH stretching, Csp³-H, C=O, C-H, CH₂, C-O, =C-O and C=CH. The results of the LC-MS/MS test showed that the steroid compounds in the isolates were steroids 12-Dehydrodeoxycholic acid, Quingestanol, Eplernon and Nandrolene benzoate (steroid ester).

مستخلص البحث

براتاما ، ديماس هادي أدجي . 2022. اختبار النشاط المضاد للأكسدة مركبات الستيرويد من كروماتوجرافيا اللون رقيقة من الكسر التحضيري N-بيتانول من الطحالب الحمراء (*Eucheuma Cottonii*) من مياه ونسورجو بانجوانغي. البحث العلمي. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: أحمد غنائم فشى، ماجستير؛ المشرف الثاني: أحمد حنافي، ماجستير

الكلمات المفتاح : الطحالب الحمراء، كروماتوجرافيا لطبقة الرقيقة التحضيرية، المنشطات، LC، FTIR، TLC، MS/MS، UV-Vis

الطحالب الحمراء (*Eucheuma Cottonii*) هي نبات البحر الذي ينتشر على نطاق الواسع وخاصة في البلدان الاستوائية. يستخدم الطحالب الحمراء في الحياة اليومية على الأشياء المختلفة في الصحة. تحتوي نباتات *Eucheuma Cottonii* على مستقبلات ثانوية وهي قلووية، العفص، الفلافونويد والترايتربينويد (الستيرويد) التي ثبت لأداء القدرة على أن تكون دواء. تهدف هذه الدراسة على تحديد النشاط المضاد للأكسدة لكسر N-بيوتانول ومعرفة مجموعة المركبات النشطة التي لديها على أعلى مضادات الأكسدة مع طريقة DPPH.

تم استخراج الطحالب الحمراء يوتشيوما قطني بطريقة النقع باستخدام المذيب الميثانول p.a. ثم يستخرج الميثانول بمحلول حل هيدروكلورايد 2N، ثم يقسم باستخدام حل N-بيوتانول. تم اختبار كل جزء من أجل نشاط مضادات الأكسدة باستخدام طريقة DPPH مع معامل IC₅₀. تم تحديد المركب النشطة عن طريق اختبار كيميائي نباتي متبعًا بالتعرف واستخدام التحليل الطيفي للأشعة المرئية وفوق البنفسجية وطيف الانعكاس الطيفي FTIR (تحويل فورييه للأشعة تحت الحمراء) وقياس الطيف LC-MS / MS. ظهرت النتائج أن عزلات الستيرويد 9 و 10 وفيتامين ج كان لها نشاط مضاد للأكسدة حيث بلغت قيم IC₅₀ 12.0076 جزء في المليون و 8.9352 جزء في المليون و 9.7636 جزء في المليون. تم تصنيف كلا العزلين على أنهما من مضادات الأكسدة القوية، ولكن العزلة 10 كان لها نشاط أقوى من فيتامين ج. أظهرت نتائج اختبار الأشعة فوق البنفسجية UV-Vis للعزل 9 أن أقصى امتصاص عند أطوال موجية 203.0 ؛ 207.0 ؛ 210.0 ؛ 166.0 و 589.9 نانومتر بينما امتصت عزلات الستيرويد العشر بطول موجة 204.0 ؛ 207.0 ؛ 266.0 ؛ و 602.9 نانومتر. أدت نتائج اختبار FTIR إلى امتصاص تمدد C=O، Csp³-H، C=O، C-H، CH₂، C-O، و C=CH. أظهرت نتائج اختبار LC-MS / MS أن مركبات الستيرويد في العزلات هي الستيرويدات 12-حمض ديهيدروديوكسيكوليك، كوينجستانول، إبلرنون وبنزوات الناندرولون (استر الستيرويد).

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan salah penyakit yang disebabkan pertumbuhan sel-sel jaringan tubuh yang tidak normal. Menurut Mangan (2009) Sel-sel kanker akan berkembang dengan cepat dan tidak terkendali dalam perkembangannya dan menjadi penyebab kematian di dunia. Penyebab kanker salah satunya adalah terakumulasinya radikal bebas yang berlebih dalam tubuh yang tidak dapat dinetralkan lagi sehingga perlu adanya antioksidan dalam tubuh. Banyak usaha dilakukan para ilmuwan untuk menemukan obat antikanker, baik sebagai untuk penghambat perkembangan kanker maupun untuk penghilang kanker. Salah satu obat yang di uji banyak berasal dari biota yang terdapat di laut, baik tumbuhan, hewan, maupun mikroba. Ada banyak literatur yang menyatakan bahwa biota laut memiliki senyawa antikanker dan antivirus (Wikata, dkk. 2005).

Radikal bebas merupakan salah satu senyawa oksigen reaktif yang umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas dapat dihasilkan oleh tubuh secara alami misalnya pada proses pernafasan (Yuslianti, 2018). Tingginya kadar radikal bebas dalam tubuh dapat memicu munculnya berbagai penyakit degeneratif. Senyawa antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif didalam tubuh. Radikal bebas terdiri dari berbagai macam spesies oksigen reaktif yang mampu menyerang membran lipid, asam nukleat, protein dan enzim. Hal ini dapat menghancurkan struktur sel-sel tubuh

serta mengubah ukuran dan bentuknya. Kerusakan sel-sel tersebut pada akhirnya menimbulkan dampak merugikan bagi kesehatan (Winarsi, 2007).

Tubuh manusia tidak mempunyai cadangan antioksidan dalam jumlah berlebih, sehingga jika terjadi paparan radikal bebas berlebih maka tubuh membutuhkan antioksidan yang berasal dari luar tubuh. Menurut Asri (2014) Berdasarkan sumbernya, antioksidan dibagi menjadi antioksidan endogen (enzim-enzim yang bersifat antioksidan atau diperoleh dari dalam tubuh secara alami) dan eksogen (antioksidan yang didapat dari luar tubuh/makanan baik secara alami maupun sintetik). Berbagai bahan alam di Indonesia banyak mengandung antioksidan dengan berbagai bahan aktif antara lain vitamin C, E, pro vitamin A, *organosulfur*, *α-tocopherol*, *flavonoid*, *thymoquinone*, *statin*, *niasin*, *phycocyanin*, *steroid*, dan lain-lain.

Sumber-sumber antioksidan secara alami dapat diperoleh dari tumbuhan. Salah satu tumbuhan yang dapat dijadikan sumber antioksidan yaitu alga. Alga merupakan salah satu sumber daya alam yang memiliki tingkat keragaman yang tinggi. Menurut Kasim (2016), alga merupakan tumbuhan laut yang tidak dapat dibedakan antara akar, daun dan batang, sehingga seluruh tubuhnya disebut thallus. Sebagaimana dalam firman Allah SWT dalam surah as-Syu'ara ayat 7 :

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَيْفَ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya :

“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan (tumbuh-tumbuhan) yang baik?”

Alga merah merupakan salah satu tumbuhan laut yang mengandung senyawa metabolit sekunder. Menurut Dominguez (2013), alga merah jenis

Eucheuma Cottonii mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid, steroid, dan alkaloid. Fungsi dari metabolit sekunder yaitu untuk mempertahankan diri dari kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan. Karena dengan keberadaan penyakit tersebut, manusia akan mencari cara untuk bisa mencegah maupun mengatasi penyakit tersebut. Namun dalam hal ini, Allah SWT yang akan menentukan apakah penyakit itu bisa dicegah ataupun diatasi, karena manusia hanya dapat berusaha dan berdoa. Sebagaimana firman Allah SWT dalam surat as Syu'ara' ayat 80 :

وَإِذَا مَرَضْتُ فَبُهِرْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ ۝

Artinya :

“dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan aku,”

Keberadaan suatu penyakit merupakan salah satu bentuk dinamika dalam kehidupan yang diciptakan oleh Allah SWT. Ketika seseorang sakit, sesuatu yang amat diinginkan adalah nikmatnya kesehatan. Untuk ini, ada proses berikutnya, yaitu perintah untuk berobat. Setiap penyakit sudah disediakan obat penawar oleh Allah di dalam hadist nabi Muhammad SAW dalam riwayat Imam Bukhori yaitu:

حَدَّثَنَا مُحَمَّدُ بْنُ الْمُثَنَّى حَدَّثَنَا أَبُو أَحْمَدَ الزُّبَيْرِيُّ حَدَّثَنَا عُمَرُ بْنُ سَعِيدٍ بْنُ أَبِي حُسَيْنٍ قَالَ حَدَّثَنِي عَطَاءُ بْنُ أَبِي رِبَاحٍ عَنْ أَبِي هُرَيْرَةَ رَضِيَ اللَّهُ عَنْهُ عَنِ النَّبِيِّ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ قَالَ مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

Artinya :

“Telah menceritakan kepada kami Muhammad bin al-Mutsanna telah menceritakan kepada kami Abu Ahmad Az Zubairi telah menceritakan kepada kami 'Umar bin Sa'id bin Abu Husain dia berkata; telah menceritakan kepadaku 'Atha`bin Abu Rabah dari Abu Hurairah radliallahu 'anhu dari Nabi shallallahu 'alaihi wasallam beliau bersabda: "Allah tidak akan menurunkan penyakit melainkan menurunkan obatnya juga.”

Steroid merupakan dengan kerangka karbonnya berasal dari 6 satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C₃₀ asiklik yaitu sikloalkena. Senyawa ini memiliki struktur siklik yang kebanyakan berupa alkohol, aldehida, atau asam karboksilat. Senyawa tersebut dapat dijumpai pada bagian akar, batang, daun, buah maupun biji tanaman. Steroid yang paling penting dan paling tersebar luas adalah steroid pentasiklik yang umum terdapat dalam tanaman berbiji (Makin dan Gower, 2010). Steroid dapat diisolasi dari berbagai tanaman menggunakan metode maserasi dan salah satu cara terbaik untuk memisahkan dan mengidentifikasi senyawa steroid adalah dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) (Harborne, 1987). Pemisahan senyawa golongan steroid dengan KLT-P dapat menggunakan beberapa variasi eluen. Eluen-eluen yang akan digunakan adalah eluen yang memang khusus memisahkan senyawa-senyawa steroid. Eluen ini diambil dari penelitian-penelitian terdahulu tentang pemisahan senyawa steroid dengan sedikit variasi dan komposisi masing-masing sudah cukup mewakili dari kepolaran senyawa steroid. Pentingnya senyawa steroid dalam kehidupan, membuat penulis ingin melakukan isolasi senyawa steroid dari alga merah (*Eucheuma Cottonii*). Penelitian ini diawali dengan mengekstrak alga merah (*Euchema Cottonii*) menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol p.a kemudian dipekatkan dengan HCl dan dipartisi dengan n-butanol Kemudian hasil partisi diidentifikasi dengan KLTA, setelah itu diisolasi menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP). Isolat yang diperoleh diuji dengan menggunakan metode DPPH dan diidentifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis, FTIR, dan Spektrometri LC-MS/MS.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini antara lain :

1. Bagaimana hasil pemisahan senyawa steroid dari fraksi n-butanol ekstrak metanol menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif *Euchemia Cottonii*?
2. Bagaimana aktivitas antioksidan senyawa steroid dari fraksi n-butanol ekstrak metanol menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif ?
3. Bagaimana hasil identifikasi senyawa steroid fraksi n-butanol dari *Euchemia Cottonii* menggunakan UV-Vis, FTIR dan LC-MS/MS?

1.3 Tujuan

Adapun tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini antara lain :

1. Mengetahui bagaimana pemisahan kromatografi lapis tipis preparatif senyawa steroid fraksi n-butanol dari *Euchemia cottonii*.
2. Mengetahui bagaimana aktivitas antioksidan senyawa steroid dari fraksi n-butanol ekstrak metanol menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif
3. Mengetahui hasil analisis senyawa steroid fraksi n-butanol yang terdapat dalam alga merah (*Euchemia cottonii*) menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan LC-MS/MS.

1.4 Batasan Masalah

Adapun batasan masalah dalam penelitian ini antara lain :

1. Sampel alga merah (*Eucheuma Cottonii*) yang digunakan dalam penelitian ini berasal dan di ambil disekitar perarian Wongsorejo, Banyuwangi
2. Uji awal sampel meliputi kadar air, dan kadar garam.
3. Ekstraksi yang dilakukan menggunakan pelarut metanol.
4. Eluen n-heksana dengan etil asetat menggunakan perbandingan (85:15).
5. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH
6. Identifikasi senyawa dilakukan dengan Spektrofotometri UV-Vis FTIR, dan LC-MS/MS.

1.5 Manfaat

Manfaat dari hasil penelitian diharapkan dapat menebrikan informasi ilmiah, bahwa ekstrak metanol alga merah dipisahkan menggunakan fraksi n-butanol mengandung senyawa steroid.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Alga Merah (*Eucheuma Cottonii*)

Rumput laut merupakan salah satu tumbuhan laut yang tergolong dalam makroalga yang biasanya hidup melekat di dasar perairan. Menurut Suparmi dan Sahri (2009) ada beberapa klasifikasi rumput laut dibagi berdasarkan kandungan pigmen warnanya antara lain: rumput laut hijau (*Chlorophyta*), rumput laut merah (*Rhodophyta*), rumput laut coklat (*Phaeophyta*) dan rumput laut pirang (*Chrysophyta*). Alga merah merupakan organisme tingkat rendah yang berada dilaut, umumnya tumbuh melekat pada substrat tertentu, tidak mempunyai akar, batang maupun daun sejati tetapi hanya menyerupai batang yang disebut thallus. Alga tumbuh dengan mendekati dirinya pada karang, lumpur, pasir, batu dan tumbuhan lain secara spesifik.



Gambar 2.1 Alga merah (*Eucheuma Cottonii*)

Menurut Anantharaman dan Kannan (2009), *Eucheuma Cottonii* merupakan salah satu jenis rumput laut merah (*Rhodophyceae*) dan berubah nama menjadi *Eucheuma Cottonii* karena karaginan yang dihasilkan termasuk fraksi kappa-karaginan. Secara taksonomi, *Eucheuma cottonii* memiliki klasifikasi sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
 Divisi : Rhodophyta
 Kelas : Rhodophyceae
 Ordo : Gigartinales
 Famili : Solieracea
 Genus : *Eucheuma*
 Species : *Eucheuma Cottonii*

Ciri fisik *Eucheuma Cottonii* yaitu mempunyai talus silindris, percabangan talus berujung runcing atau tumpul, ditumbuhi nodulus (tonjolan-tonjolan), permukaan licin, berwarna coklat kemerahan, bersifat *dichotomus* (percabangan dua-dua) atau *trichotomus* (sistem percabangan tiga-tiga), dan *cartilogeneus* (menyerupai tulang rawan/muda). Keadaan warna tidak selalu tetap, kadang-kadang berwarna hijau, hijau kuning, abu-abu atau merah. Perubahan warna sering terjadi hanya karena faktor lingkungan (Jana, 2006).

Setiap jenis alga mempunyai perbedaan dalam proses metabolismenya. Pertumbuhan alga yang mempunyai perbedaan dalam kesesuaian faktor fisika dan kimia dapat dijelaskan dalam firman Allah SWT surat al-Furqon ayat 53 :

وَهُوَ الَّذِي مَرَجَ الْبَحْرَيْنِ هَذَا عَذْبٌ فُرَاتٌ وَهَذَا مِلْحٌ أُجَاجٌ وَجَعَلَ بَيْنَهُمَا بَرْزَخًا وَحِجْرًا مَّحْجُورًا

Artinya :

“Dan Dialah yang membiarkan dua laut mengalir (berdampingan); yang ini tawar dan segar dan yang lain sangat asin lagi pahit; dan Dia jadikan antara keduanya dinding dan batas yang tidak tembus.”

Ayat tersebut menjelaskan adanya dua lautan yang bertemu dan saling dipisahkan oleh dinding batas. Akibat adanya batas ini, menyebabkan laut yang satu mempunyai karakter yang berbeda yaitu suhu, kadar keasinan (salinitas), berat jenis, maupun tekanan dengan laut yang saling berdampingan dengannya, oleh karena itu, makhluk hidup seperti alga mempunyai karakter yang berbeda juga antara jenis satu dengan lainnya ataupun dari tempat satu dengan lainnya.

Alga merah memiliki pigmen fikoeiretrin (*Phycoerethrin*) dan fikosianin yang struktur dasarnya pirol dan berprotein. Fikoeiretrin adalah 9 pigmen yang berwarna merah cerah dan memancarkan warna oranye, sedangkan fikosianin berwarna biru dan memancarkan warna merah tua. Alga merah mempunyai sifat adaptik kromatik, yaitu mempunyai penyesuaian antara proporsi pigmen dengan berbagai kualitas pencahayaan sehingga pada kenyataan di alam, alga merah menunjukkan variasi warna lain seperti pirang, violet, merah tua, merah muda, coklat, kuning dan hijau (Kasanah, 2015).

Fikosianin merupakan salah satu dari tiga pigmen (klorofil, fikosianin dan karotenoid) yang mampu menangkap radiasi yang tersedia dari matahari paling efisien. Fikosianin bermanfaat dalam proses fotosintesis karena merupakan prekursor bagi klorofil dan hemoglobin dengan kandungan magnesium dan besi (Amaranggana, 2017). Perbedaan warna yang didasarkan atas perbedaan kandungan pigmen tersebut telah dijelaskan dalam surat az-zumar ayat 21 tentang tanaman yang memiliki bermacam-macam warna:

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَسَلَكَهُ يَنَابِيعَ فِي الْأَرْضِ ثُمَّ يُخْرِجُ بِهِ زَرْعًا مُّخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ ثُمَّ يَهْبِجُ فَتَرَاهُ مُمْصِقًا ثُمَّ يَجْعَلُهُ حُطَامًا إِنَّ فِي ذَلِكَ لَذِكْرًا لِأُولِي الْأَلْبَابِ ؕ

Artinya :

”Apakah engkau tidak memperhatikan, bahwa Allah menurunkan air dari langit, lalu diaturnya menjadi sumber-sumber air di bumi, kemudian dengan air itu ditumbuhkan-Nya tanam-tanaman yang bermacam-macam warnanya, kemudian menjadi kering, lalu engkau melihatnya kekuning-kuningan, kemudian dijadikan-Nya hancur berderai-derai. Sungguh, pada yang demikian itu terdapat pelajaran bagi orang-orang yang mempunyai akal sehat.”

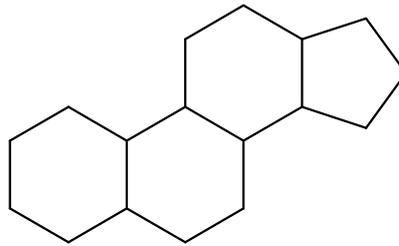
Pada ayat tersebut, Allah SWT telah menunjukkan kekuatan besarnya penciptaan dua unsur yang berbeda, bagaimana dia telah menciptakan dua laut. Laut, segar lezat yang masing-masing mempunyai sifat yang berbeda, ada yang berasa manis, pahit dan asin. Laut merupakan karunia Allah SWT yang sangat besar untuk dimanfaatkan dan disyukuri, salah satu cara mensyukuri nikmat tersebut dengan melakukan telaah ilmu dan penelitian kelautan.

Ayat ini menyebutkan proses terjadinya mutiara, serta pemanfaatan hewan dan tumbuhan laut untuk dijadikan obat dan makanan bagi manusia, salah satunya yaitu rumput laut yang mempunyai manfaat yang sangat banyak bagi kebutuhan manusia. Sehingga dari nikmat yang besar ini, manusia diwajibkan bersukur karena Allah SWT telah menciptakan lautan dan isinya yang sangat kompleks dan beragam untuk dimanfaatkan secara luas. Dan semua ini dengan kasih karunia dan rahmatnya.

2.2. Senyawa Steroid

Steroid merupakan senyawa golongan lemak sterol tidak terhidrolisis yang diturunkan dari hasil reaksi penurunan dari terpena atau stirena. Steroid merupakan

kelompok lipid jenuh yang memiliki struktur dasar sterena jenuh. Senyawa steroid jenuh yang dinamakan 1,2-siklopentanoperhidrofenantrena. Steroid jenuh ini memiliki inti dengan 3 cincin sikloheksana terpadu dan satu cincin siklopentana yang tergabung pada ujung cincin sikloheksana tersebut. Ada beberapa turunan senyawa steroid yang penting yaitu steroid alkohol atau sterol. Steroid lain antara lain asam-asam empedu, hormon seks (androgen dan estrogen) dan hormon kortikosteroid. Tumbuhan memiliki senyawa steroid yang disebut fitosterol, yang terdapat dalam hewan disebut zoosterol, dan yang terdapat dalam fungi disebut mikosterol (Makin dan Gower, 2010)



Gambar 2.2 Struktur Inti Senyawa Steroid (Makin dan Gower, 2010)

2.3. Ekstraksi Maserasi

Maserasi merupakan metode perendaman sampel untuk mengikat komponen yang diinginkan dengan kondisi temperatur dingin diskontinyu menggunakan pelarut yang mudah terdistribusi ke dalam sel tumbuhan. Keuntungan menggunakan metode ini yakni praktis, pelarut yang digunakan sedikit dan tidak memerlukan pemanasan, tetapi dibutuhkan waktu yang relatif lebih lama. Secara umum ekstraksi senyawa metabolit sekunder dari semua bagian tumbuhan seperti bunga, buah, daun, kulit batang dan akar menggunakan metode maserasi (Putra, 2014).

Proses maserasi ini lebih menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam, karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi kontak sampel dan pelarut yang cukup lama, dan dengan kemungkinan terdistribusinya pelarut organik yang terus menerus ke dalam sel tumbuhan mengakibatkan perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga pemecahan dinding dan membran sel dan metabolit sekunder yang berada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik, dan lama perendaman dapat diatur untuk memaksimalkan ekstraksi senyawa yang sempurna. Metode maserasi ini sangat menguntungkan karena pengaruh suhu dapat dihindari karena suhu yang tinggi kemungkinan akan mengakibatkan terdegradasinya senyawa-senyawa metabolit sekunder (Puspitasari dan Prayogo, 2017).

Pemilihan pelarut yang tepat untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dengan pelarutnya. Ada beberapa pelarut yang digunakan untuk proses maserasi bahan alam. Secara umum pelarut metanol dan etanol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam, karena dapat melarutkan seluruh golongan metabolit sekunder (Obenu, 2019).

2.4. Hidrolisis

Hidrolisis merupakan proses dekomposisi kimia yang terjadi dengan adanya pemutusan ikatan glikosida yang menjadi penghubung antara monomer yang melalui reaksi air (H_2O) sehingga membentuk bagian-bagian yang lebih sederhana (Adhitama dkk, 2012). Tetapi reaksi hidrolisis membutuhkan bantuan katalis asam karena hidrolisis menggunakan air berlangsung secara lambat. penambahan asam

kuat pada reaksi hidrolisis akan mempengaruhi kekuatan asam dalam melepas proton tersebut sehingga proton akan membantu pemutusan ikatan glikosida yaitu pengikat antara glikon dan antiglikon. Asam yang bisa digunakan adalah asam kuat seperti HCl dan H₂SO₄. Namun penggunaan HCl lebih menguntungkan dari pada H₂SO₄, karena sifatnya lebih reaktif, mudah dipisahkan dari produknya karena sifat dari HCl mudah menguap. katalisator asam HCl akan membentuk garam yang tidak berbahaya yaitu garam NaCl (Suri, 2013).

2.5. Partisi

Partisi merupakan suatu pemisahan didasarkan pada sifat kelarutan komponen target dan distribusinya dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur membentuk dua fasa. Kedua fasa yang mengandung zat terdispersi, dikocok untuk memperluas area pendistribusian kontak antara kedua pelarut sehingga meratakan pendistribusian. Kemudian didiamkan hingga terpisah sempurna dan terbentuk dua lapisan fasa. Komponen kimia akan terpisah kedalam kedua fasa tersebut sesuai dengan tingkat kepolarannya. Syarat pelarut yang digunakan untuk ekstraksi cair-cair adalah memiliki kepolaran yang sesuai dengan bahan yang di ekstraksi dan harus terpisah secara pengocokan (Gunawan, 2005). Senyawa steroid dalam bentuk aglikon merupakan senyawa non polar, sehingga perlu dilakukan partisi menggunakan pelarut non polar. Salah satu pelarut yang dapat digunakan adalah n-butanol (Khamidinal, 2009).

Sampel yang diekstrak, selanjutnya dilakukan pengocokan, fasa organik yang didapat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* untuk menguapkan pelarutnya. *Rotary evaporator* mampu menguapkan pelarut dibawah titik didih zat

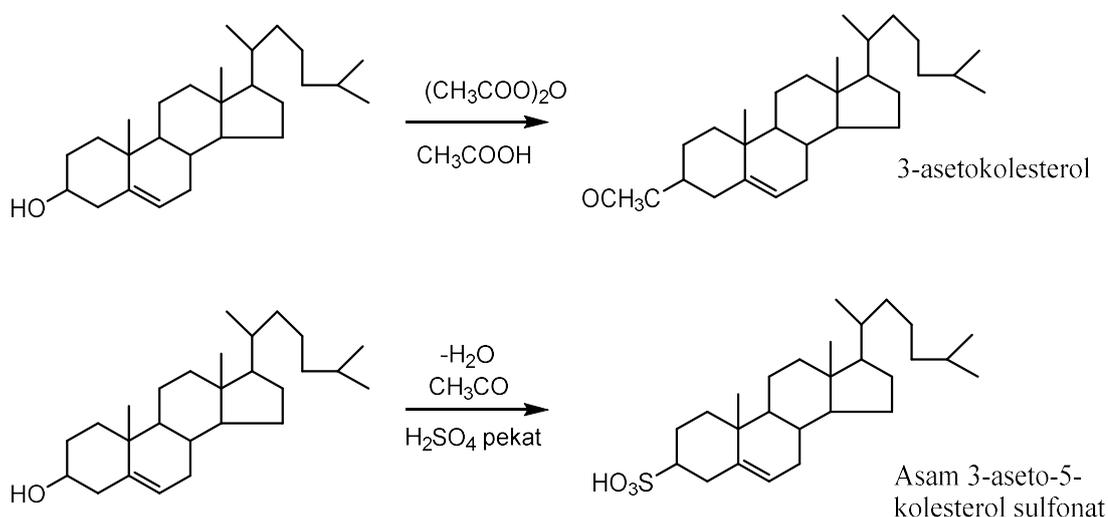
yang terkandung didalam pelarut tidak rusak oleh suhu tinggi (terdekomposisi). Titik didih n-butanol adalah 117,2°C, maka digunakan *rotaty evaporator* pada suhu 60-65°C pada tekanan 15-20 Psi dan pemekatan selanjutnya dialiri oleh gas nitrogen.

2.6. Uji Fitokimia Steroid

Uji fitokimia merupakan pengujian secara kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam suatu sampel baik pada tumbuhan maupun hewan (Harborne, 1998). Prinsip kerja untuk uji fitokimia menggunakan reagen didasarkan pada perubahan warna dari pereaksi warna, dimana perubahan warna tersebut dicocokkan dengan warna yang ada (Adriani, 2013). Reaksi warna yang digunakan untuk uji warna steroid adalah reaksi *Lieberman-burchard*, hasil positif ditunjukkan dengan warna hijau dan biru (Kristanti, 2008). Berdasarkan Penelitian Fatimah (2020) uji fitokimia yang dilakukan untuk mengetahui senyawa steroid pada hasil partisi n-butanol dari alga merah *Eucheuma Cottonii* menggunakan penambahan reagen *Liebermann-burchard* menunjukkan hasil positif steroid dengan. Reagen *Liebermann-burchard* merupakan campuran dari asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat pada dinding tabung reaksi. Uji fitokimia ini dilakukan dengan mengambil hasil partisi dan menambahkan reagen *Liebermann-burchard*.

Prinsip dari uji *Lieberman-burchard* ini yaitu senyawa asam asetat anhidrat akan mengasetilisasi gugus hidroksil sehingga gugus asetil (gugus pergi) akan lepas atau mengalami eliminasi. Proses ini akan membentuk ikatan rangkap terkonjugasi. Kemudian terjadi pelepasan gugus hidrogen dengan elektron gugusnya yang

menyebabkan ikatan rangkap mengalami perpindahan. Senyawa akan mengalami resonansi yang bertindak sebagai elektrofil atau karbokation. Serangan karbokation mengakibatkan adisi elektrofil diikuti dengan pelepasan hidrogen. Eliminasi hidrogen ini mengakibatkan terjadinya penggabungan cincin segi enam tak jenuh sehingga ikatan rangkap terkonjugasi akan diperpanjang, kemudian menghasilkan warna coklat pada triterpenoid yang mengabsorpsi spektrum dengan panjang gelombang tertentu (Robinson, T., 1995). Dugaan reaksi senyawa steroid dengan pereaksi *Liebermann-burchard* ditunjukkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Mekanisme Reaksi Uji Firokimia *Liebermann-burchard*. (Sahriawa. dkk, 2019)

2.7. Pemisahan Senyawa Steroid Menggunakan KLT

Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan dan metode uji senyawa kimia yang digunakan untuk analisis secara kuantitatif dan kualitatif, prinsipnya melibatkan dua perubahan sifat fasa diam dan fasa gerak. Fasa diam dalam KLT merupakan suatu lapisan dibuat dari bahan-bahan berbutuir halus yang ditempatkan pada suatu lempengan yang berfungsi sebagai permukaan penyerap. Silika gel GF_{258} merupakan salah satu fasa diam yang sering digunakan dalam KLT.

Pendeteksian bercak hasil pemisahan dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain dengan menambahkan pereaksi kimia dan disinari lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Rubiyanto, 2017).

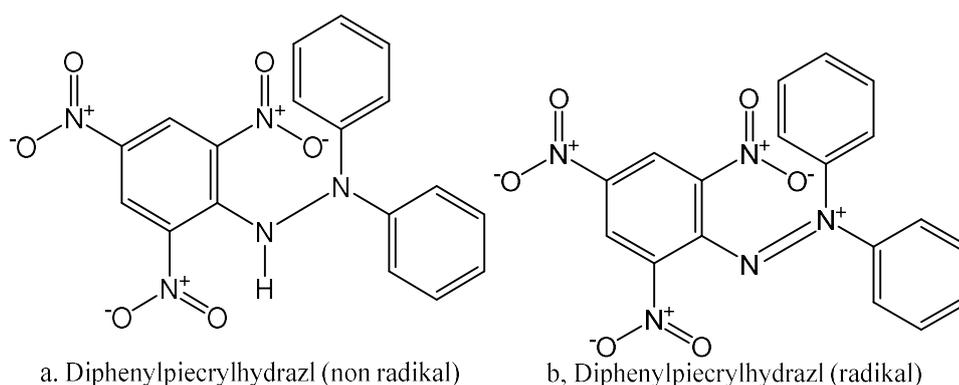
Parameter yang digunakan dalam pengukuran KLT berupa fakto retensi (R_f). Harga R_f komponen senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga R_f senyawa standar yang sudah ada, karena pada kondisi tertentu senyawa pengujian akan memiliki nilai R_f yang sama. Ada beberapa faktor yang memepengaruhi nilai R_f antara lain: tebal lapisan penyerap atau tebal kertas, kadar air jenis eluen, suhu, tingkat kejenuhan, dan ukuran partikel yang diserap (Rubianto, 2017). Penentuan harga R_f dilakukan dengan persamaan :

$$\text{harga } R_f = \frac{\text{jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}} \dots\dots\dots 2.4$$

Kromatografi lapis tipis preparatif merupakan salah satu metode kromatografi lapis tipis yang ideal untuk memisahkan sample dalam jumlah kecil (50mg-1gram). Pemisahan larutan sample dengan cara ditotolkan pada yang sudah ditandai berupa garis pada salah satu sisi pelat kemudian dielusi dengan fasa gerak. setelah dielusi akan muncul bercak berupa garis atau pita pemisahan. Visualisasi ini dipilih cara yang tidak merusak. Jika terpaksa digunakan cara-cara merusak mis, disemprot dengan pereaksi, maka pelat ditutup sebagian dan bagian kecil lain yang disemprot. Sehingga dapat diperkirakan letak bercak berbentuk pita/garis lurus. Pita yang diinginkan dikerok dan dilarutkan dengan pelarut yang sesuai. Fase diam yang sering digunakan yaitu kertas silika gel dan fasa gerak yang sering digunakan yaiu (Saidi, 2018).

2.8. Uji Antioksidan Senyawa Steroid Menggunakan Metode DPPH

Analisis antioksidan diukur berdasarkan kemampuan menghambat radikal bebas. Salah satu metode pengukuran antioksidan dengan metode DPPH. DPPH digunakan untuk menguji kemampuan senyawa yang berperan sebagai pendonor elektron hidrogen. DPPH dapat menggunakan pelarut polar maupun non polar (kristanti, 2008). DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang berwarna ungu dan stabil dalam larutan yang berair atau metanol. Senyawa yang bersifat pekat terhadap cahaya, oksigen dan pH. Pengukuran antioksidan dengan menggunakan metode DPPH termasuk sangat akurat karena senyawa DPPH bersifat stabil dalam pengukuran. Pengujian DPPH dilakukan dengan cepat, mudah dan sensitif pada senyawa tertentu (Abdullah, 2011). Reaksi perubahan dari DPPH radikal bebas menjadi senyawa DPPH yang stabil ditandai dengan pudarnya warna ungu dan stabil menjadi warna kuning. Evaluasi antioksidan dilakukan dengan mengamati perubahan absorbansi DPPH dalam Spektroskopi UV-Vis.

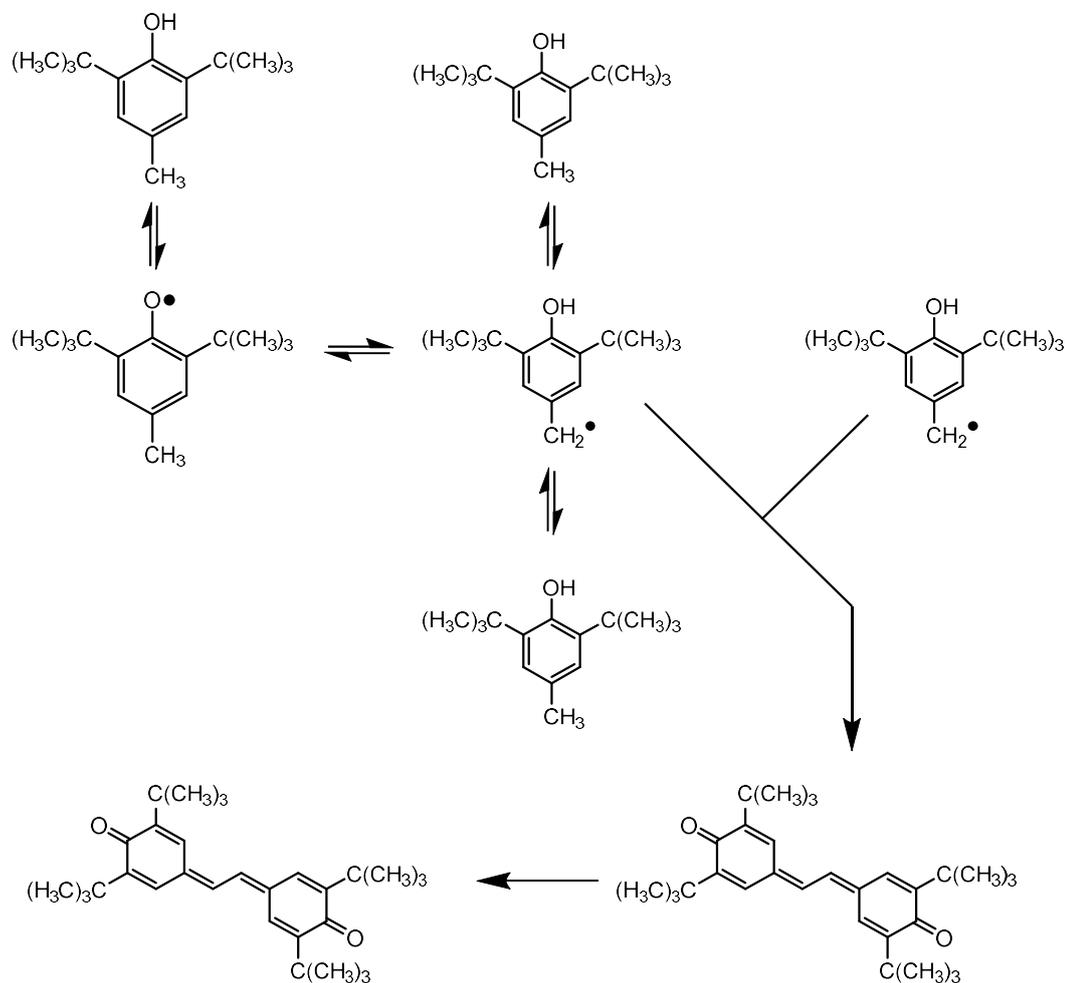


Gambar 2.4 a. Struktur kimia radikal bebas DPPH

b. Struktur kimia non radikal bebas DPPH (Molyneux, 2004)

Prinsip pengujian dengan metode DPPH berdasarkan pada reaksi penangkapan hidrogen oleh DPPH dari senyawa antioksidan sampel. Peran DPPH sebagai radikal bebas akan diredam antioksidan dari ekstrak sampel. Kemudian

DPPH akan diubah menjadi DPPH-H oleh sampel antioksidan. DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil dan dapat disimpan lama dalam keadaan kering dan kondisi penyimpanan yang baik. DPPH dapat digunakan untuk screening sampel dalam penentuan aktivitas antioksidan. Sampel yang digunakan dalam pengujian DPPH dapat berupa larutan maupun padatan dan tidak khusus untuk komponen antioksidan partikular, tetapi secara keseluruhan sampel uji kapasitas antioksidan (Setiawan, dkk. 2018).



Gambar 2.5 Mekanisme Reaksi Aktivitas Antioksidan dengan DPPH (Molyneux,2004)

Mekanisme reaksi dari metode DPPH dibagi terbagi menjadi 3 tahapan . tahap pertama yaitu delokalisasi elektron pada gugus tersubstitusi dari senyawa tersebut. Atom hidrogen tersebut menyebabkan DPPH menjadi tereduksi. Tahapan kedua yaitu dimerisasi antara dua radikal fenoksil yang mentransfer radikal hidrogen yang akan bereaksi dengan DPPH. Tahapan ketiga yaitu pembentukan kompleks antara radikal dengan DPPH. Pembentukan DPPH kompleks bergantung pada kestabilan dan potensi reaksi dari struktur molekulnya (Molyxneus, 2004).

Hasil dalam pengukuran metode DPPH dengan menggunakan Spektroskopi UV-Vis. Prinsip pengujian ini melalui ekstrak sampel yang diukur dengan serapan cahayanya dan dihitung aktivitas antioksidannya dalam presentase inhibisi. Presentase inhibisi diperoleh dari banyaknya aktivitas senyawa antioksidan yang menangkal radikal bebas DPPH. Parameter yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan menggunakan IC_{50} yaitu bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat aktivitas dari suatu radikal (Setiawan, 2018).

IC_{50} ditentukan dari persamaan kurva standar dari presentase inhibisi sebagai sumbu y dan konsentrasi fraksi antioksidan sebagai sumbu x. IC_{50} dihitung dengan memasukkan nilai 50% dari persamaan kurva standar dengan y kemudian dihitung nilai y sebagai konsentrasi IC_{50} (Molyneux, 2004). Penggolongan aktivitas antioksidan (Tabel 2.1)

Tabel 2.1 Pengolahan tingkat aktivitas antioksidan (Setiawan, 2018)

Intensitas antioksidan	Nilai IC_{50}
Sangat Kuat	<50
Kuat	50 sampai <100
Sedang	100 sampai <150
Lemah	150 sampai <200
Sangat Lemah	>200

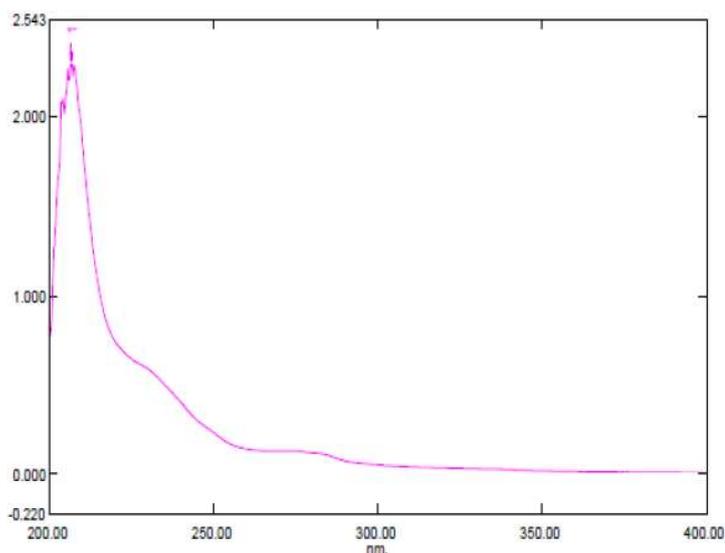
Menurut Meita (2019) nilai IC_{50} menunjukkan nilai 106,021 ppm, ekstrak metanol fraksi etanol sedangkan pada penelitian Aminah (2020) menunjukkan nilai IC_{50} 6,55ppm.

2.9. Analisa Senyawa Steroid

2.9.1. Analisa Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis adalah absorpsi sinar UV-Vis oleh molekul/atom yang disebabkan promosi elektron dari keadaan elektronik dasar ke keadaan tereksitasi. Spektrum yang diabsorpsi oleh suatu senyawa adalah sejumlah sinar yang diserap oleh satu senyawa pada panjang gelombang tertentu. Untuk senyawa berwarna akan memiliki satu atau lebih penyerapan spektrum yang tertinggi di daerah spektrum tampak (400-700 nm). Spektrum yang terserap pada ultra violet (200-400 nm) dan daerah nampak terjadi karena adanya perubahan energi elektron terluar dari molekul yang disebabkan adanya ikatan atau bukan ikatan. Umumnya elektron yang berpindah tempat ini disebabkan adanya ikatan rangkap karbon-karbon atau pasangan nitrogen dengan oksigen (Sudarmadji, 1996).

Menurut Haris (2020) melakukan penelitian isolat steroid hasil kromatografi kolom fraksi n-heksana *Eucheuma Cottonii* menunjukkan bahwa memberikan serapan pada panjang gelombang maksimum 206,80 nm hasil spektrum dapat dilihat pada Gambar 2.6.

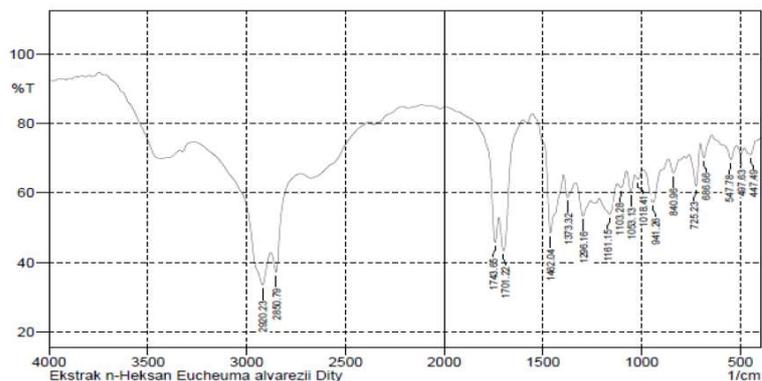


Gambar 2.6 Spektrum UV-Vis Steroid dari *Eucheuma alvarezii dorthy* (Haris, 2020)

2.9.2. Analisa Steroid Menggunakan Spektrofotometer FTIR

Spektroskopi inframerah merupakan metode pengukuran interaksi radiasi elektromagnetik (inframerah) dengan materi. Identifikasi menggunakan FT-IR dapat memberikan informasi mengenai gugus fungsi dari senyawa. Setiap gugus fungsi memiliki jenis ikatan yang berbeda sehingga masing-masing serapan yang khas. Hasil identifikasi dinyatakan berhasil jika gugus fungsi yang didapatkan sesuai dengan serapan pada daerahnya masing-masing dibandingkan dengan senyawa standarnya (Chatwall, 1985).

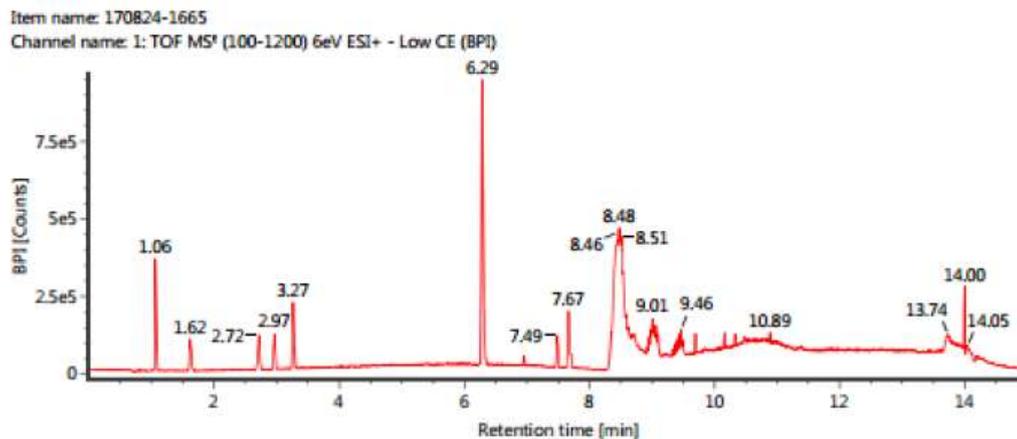
Menurut Haris (2020) penelitian isolat steroid hasil kromatografi lapis tipis fraksi n-heksana *Eucheuma Cottonii* memberikan spektrum pada Gambar 2.7. hasil spektrum menunjukkan serapan yang khas gugus O-H stretching , Csp³ H stretching dan C=O.



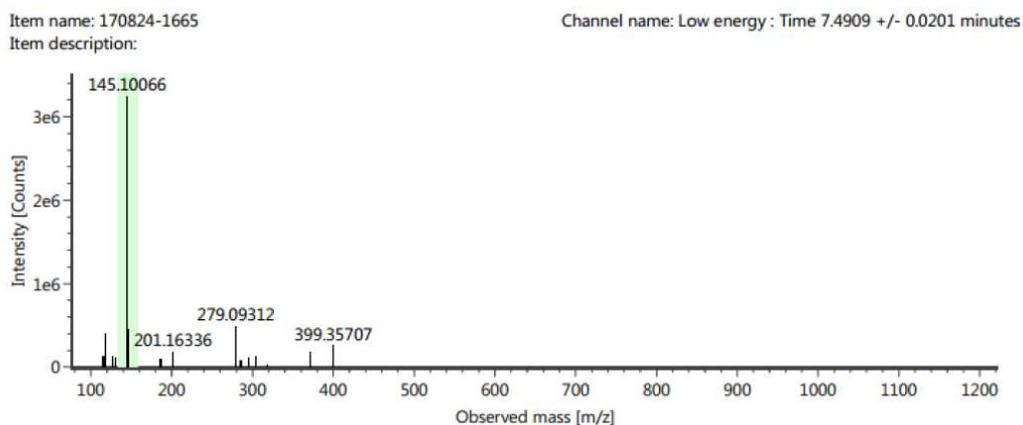
Gambar 2.7 Spektrum FTIR steroid dari *Eucheuma alvarezii* doty (Haris, 2020)

2.9.3. Analisa Steroid Menggunakan Spektrofotometer LCMS/MS

Liquid Chromatography Mass Spectrofotometry (LCMS) merupakan salah satu jenis instrumentasi yang digunakan untuk melakukan suatu proses pemisahan. LCMS termasuk dalam salah satu jenis kromatografi cair yang digunakan untuk mengukur massa suatu senyawa yang dipisahkan. Penggunaan LCMS saat ini sangat beragam, mulai digunakan dari analisis sintesis baik dalam bidang farmasi untuk obat-obatan, analisis dari zat seperti hormon, zat beracun, dan analisis lingkungan. Kunggulan LCMS dibandingkan GCMS diantaranya memiliki kutub untuk banyak kontaminan, tahap derivatisasi untuk senyawa yang tahan panas, peningkatan jumlah bahan yang dianalisis serta waktu analisis total yang tidak lama (Andrey, 2003).



Gambar 2.8 Kromatogram LC Isolat Steroid (Fauzia, 2018)



Gambar 2.9 Spektrogram Massa Isolat pada Waktu Retensi 7.49 Menit (Fauzia, 2018)

Hasil kromatogram LC pada gambar 2.8 terdapat puncak. Salah satu puncak dengan waktu retensi 7,49 menit yang menunjukkan adanya senyawa steroid yang akan teridentifikasi struktur dan berat molekulnya dengan melihat spektrogram massa yang dihasilkan. Spektrogram pada waktu retensi 7,49 menit ditunjukkan pada Gambar 2.9. Berdasarkan hasil LCMS/MS di tersebut senyawa hasil isolasi merupakan senyawa golongan steroid yaitu Brassicasterol (Fauzia, 2018).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Maret 2020 sampai bulan April 2020 di laboratorium kimia organik, kimia analitik, bioteknologi jurusan kimia, bioteknologi Program Studi biologi, dan laboratorium instrumentasi, UV-Vis, FTIR dan LCMS/MS Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

3.2. Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain ayakan 80-100 mesh, hot plate, pisau, blender, aluminium foil, desikator, oven, cawan penguap, kaca arloji, timbangan analitik, gelas ukur, erlenmeyer, pengaduk kaca, penyaring buchner, *shaker*, *rotary evaporator*, gelas beker, pipa kapiler, bola hisap, pipet tetes, pipet ukur, pipet mikro, labu ukur, plat silika gel GF₂₅₄, lampu, UV 254 nm dan 366 nm, seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis merk varian cary 50 conc dan spektrofotometer FTIR merk varian tipe FT 1000.

3.2.2. Bahan

Bahan digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh bagian tanaman alga merah jenis *Eucheuma Cottonii* yang diperoleh dari sekitar perairan laut Banyuwangi.

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: aseton, asam sulfat pekat, HCl 2 N, kloroform p.a, natrium bikarbonat, etil

asetat p.a, metanol p.a, aquades, n-butanol, diklorometana, asam asetat anhidrat, etanol, plat KLT dan KBr.

3.3. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian eksperimental di laboratorium. Sampel yang diambil adalah Alga merah jenis *Eucheuma Cottonii*. Tahap pertama dilakukan preparasi sampel dan dilanjutkan dengan penentuan kadar air, kemudian serbuk sampel diekstraksi dengan menggunakan pelarut metanol sehingga diperoleh ekstrak cair dari tanaman alga merah. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak tersebut dihidrolisis menggunakan HCl 2 N dan dinetralkan menggunakan natrium bikarbonat kemudian dipartisi dengan etil asetat. Kemudian ekstrak tersebut diidentifikasi dengan uji reagen. Selanjutnya dilakukan pemisahan terhadap senyawa Steroid dengan KLTA berdasarkan berbagai campuran eluen. Eluen yang memberikan pemisahan paling baik pada KLTA digunakan untuk memisahkan senyawa Steroid dengan KLTP. Selanjutnya Isolat Steroid dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis, Spektrofotometer FTIR, dan Spektroskopi LCMS/MS.

3.4. Tahapan Penelitian

Adapun tahapan penelitian yang dilakukan antara lain :

1. Preparasi Sampel
2. Analisis Kadar Air Secara Termografi,
3. Ekstraksi Maserasi
4. Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat *Eucheuma Cottonii*
6. Uji Fitokimia Fraksi n-Butanol *Eucheuma Cottonii*

7. Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif
8. Uji Antioksidan Hasil Steroid Menggunakan Metode DPPH.
9. Analisis Golongan Steroid :
 - A. Analisis Dengan Spektrofotometer UV-Vis
 - B. Analisis Dengan Spektrofotometer FTIR
 - C. Analisis Dengan Spektrofotometer LCMS/MS

3.5. Pelaksanaan Penelitian

3.5.1. Preparasi Sampel

Preparasi sampel tanaman alga merah *Eucheuma Cottonii* yaitu seluruh bagian tanaman diambil sebanyak 20 Kg, kemudian dicuci dan dikeringanginkan. Selanjutnya dikeringkan dengan oven pada suhu sekitar 38°C selama 24 jam, kemudian dipotong kecil-kecil dan dihaluskan menggunakan mesin penghalus sampai terbentuk serbuk, diayak dengan ukuran 100 mesh.

3.5.2. Analisis Kadar Air Secara Termografi (AOAC, 2016)

Diambil sampel sebanyak 1 g dan dimasukkan ke dalam cawan yang sudah dikeringkan dan sudah diketahui bobotnya. Kemudian sampel dan cawan dikeringkan dalam oven suhu 105°C selama 1 jam. Cawan didinginkan dalam desikator dan ditimbang, setelah itu cawan dikeringkan kembali sampai diperoleh bobot yang konstan

$$\text{Kadar Air Basah} \left(\frac{\text{g}}{100\text{g}} \text{ bahan basah} \right) = \frac{W-(W_1-W_2)}{W} \times 100 \dots\dots\dots (3.1)$$

3.5.3. Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi komponen aktif dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi atau perendaman dengan pelarut metanol p.a Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan karena dimungkinkan bahwa kandungan senyawa pada tanaman sudah cukup banyak yang terekstrak pada masing-masing tahapnya. Serbuk tanaman *Eucheuma Cottonii* ditimbang sebanyak 10 gram dan diekstraksi secara maserasi dengan menambahkan pelarut metanol sebanyak 150 mL di dalam erlenmeyer 250 mL (Nurhasanawati, 2017), ditutup dengan alumunium foil dan diaduk dengan menggunakan shaker dengan kecepatan 120 rpm (rotation per minutes) selama 24 jam. Kemudian disaring dan ampas yang diperoleh dimaserasi kembali dengan pelarut dan perlakuan yang sama sampai 3 kali pengulangan sampai diperoleh filtrat yang cukup bening. Selanjutnya kelima filtrat yang diperoleh kemudian digabung menjadi satu. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dan tekanan -750 Hpa, sampai diperoleh ekstrak pekat metanol. Ekstrak pekat yang didapatkan kemudian dihitung randemennya dengan menggunakan persamaan 3.2 (Khopkar, 2003).

$$\%Randemen = \left(\frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Sampel}} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

3.5.4. Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol *Eucheuma Cottonii*.

Ekstrak pekat maserasi dihidrolisis sebanyak 10 gram *Eucheuma Cottonii* menggunakan HCl 2N sebanyak 100 mL dan distirer selama 1 jam (Sandi, 2016). Kemudian, ekstrak pekat dinetralkan dengan menggunakan natrium bikarbonat. Ekstrak dipartisi dengan menggunakan 100 mL n-butanol sebanyak 5 kali. Hasil

partisi dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan dialiri gas N₂. Dihitung randemen dengan menggunakan persamaan 3.2.

3.5.5. Uji Fitokimia

Uji fitokimia senyawa steroid dilakukan dengan mengambil ekstrak metanol dan fraksi n-butanol alga merah *Eucheuma Cottonii* dimasukkan dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform lalu ditambah dengan 3 tetes asam asetat anhidrat. Campuran ini selanjutnya ditambah dengan H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika memiliki kandungan steroid hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut.

3.5.6. Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Ekstrak pekat hasil evaporasi fraksi n-butanol ditotolkan pada plat KLT silika berukuran 5 x 20 cm dengan ketebalan 1 mm memakai pipa kapiler, kemudian dimasukkan kedalam bejana elusi dengan pelarut terbaik dengan perbandingan (85:15) (Ratnasari, 2017). Noda hasil totolan ini kemudian dielusi didalam bejana elusi tertutup. Jika proses elusi telah selesai, noda-noda ekstrak hasil elusi diambil dan diukur *R_f*. Noda-noda tersebut dikerok, lalu diekstrak dengan etanol untuk mendapatkan kadar isolatnya.

3.5.7. Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Steroid dengan DPPH (Panggua dkk, 2015)

Larutan stok DPPH dibuat dengan melarutkan 0.008 gram padatan DPPH pada 67.2 mL metanol pro analisis dengan konsentrasi 0.4 mM. Pembuatannya pada kondisi suhu rendah dan terhindar dari sinar matahari. Larutan stok DPPH

5000 ppm yang sudah dibuat dipipet 0.4 mL dan ditambahkan 1.6 mL methanol pro analisis sehingga menjadi 1000 ppm.

Larutan uji 1000 ppm dibuat konsentrasinya menjadi 10, 20, 30, dan 40 ppm. Vitamin C yang menjadi kontrol positif dibuat dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4 ,dan 5 ppm. Masing masing konsentrasi ditambahkan 1mL 0.4 mM DPPH. Kemudian metanol ditambahkan 5 mL. selanjutnyapada referensi persiapan direaksikan dengan 4 mL metanol dan 1mL DPPH 0.4 mM DPPH pada tabung uji (tabung reaksi). Setiap larutan dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Kemudian menentukan Panjang gelombang (λ) maksimum absorbansi dari larutan larutan DPPH. Kemudian pengukuran absorbansi larutan uji dan referen. Uji antioksidan menyatakan persen inhibition yang dituliskan dengan persamaan rumus.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\text{blanko} - \text{sampel}) \text{ absorbansi}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\% \dots\dots\dots (3.3)$$

Konsentrasi sampel dan persentase inhibition masing-masing diplot dalam sumbu x dan y dan diperoleh regresi persamaan linear. Persamaan tersebut menjelaskan nilai IC₅₀.

3.5.8. Analisis Senyawa Steroid

3.5.8.1. Analisis Senyawa dengan Spektrofotometri UV-Vis

Identifikasi isolat steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis dilakukan dengan tahap Isolat sampel yang diperoleh dari hasil kromatografi lapis tipis preparatif fraksi n-butanol ditambahkan dengan 5 mL etanol. Kemudian di vortex hingga metanol dapat melarutkan isolat steroid. Selanjutnya dimasukkan dalam kuvet dan dianalisis pada panjang gelombang 200-800 nm. Pada blanko,

pelarut metanol dimasukkan ke dalam kuvet setengahnya dan dianalisis dengan spektrofotometer pada rentang panjang gelombang 200-800 nm, data disimpan. Spektra yang terbentuk diamati dan dicatat Panjang gelombang serta absorbansi pada puncak yang terbentuk

3.5.8.2. Analisis Senyawa dengan Spektroskopi FTIR

Isolat sampel hasil kromatografi lapis tipis preparatif yang diduga senyawa Steroid dianalisis dengan spektrofotometer FTIR. Isolat yang diperoleh digerus dengan KBr menggunakan mortar agate kemudian dipress dengan tekanan 80 torr selama 10 menit sehingga menjadi pelet. Selanjutnya pelet dimasukkan kedalam spektrofotometer FTIR untuk dianalisis gugus fungsinya.

3.5.8.3. Analisis Senyawa dengan Spektroskopi LCMS/MS

Isolat steroid hasil KLTP yang diduga mengandung senyawa steroid dianalisis dengan spektrofotometer LCMS/MS. Spesifikasi LC yang digunakan adalah LC sistemnya menggunakan *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC), kolom yang digunakan C18 (1,8 μ m 2,1x100 mm) HSS dan Mass Spectrometer berupa Xevo G2-S Qtof dengan sistem *electrospray ionization* (ES). Isolat yang didapatkan dilarutkan dengan menggunakan pelarut lalu dimasukkan kedalam kolom SPE yang telah dikondisikan. Bahan organik yang tertinggal di kolom tersebut dielusi dengan 10 mL metanol. Filtrat metanol ditampung lalu dilanjutkan dengan dielusi menggunakan 10m diklorometan, filtrat diklorometan kemudian ditampung hingga terdapat filtrat metanol dan filtrat diklorometan pada wadah terpisah.

Metabolit profiling berbagai ekstrak dilakukan dengan menggunakan instrumen UPLC-MS. Sampel yang telah dipreparasi kemudian diinjeksikan kedalam instrumen UPLC-MS sebanyak 5 μ L menggunakan *micro syringe*. Setelah itu diperoleh data mentah berupa kromatogram dan spektra tiap sampel yang diolah dengan software *Masslynx* untuk mendapatkan data luas puncak waktu retensi, measure mass, calculate mass dan rumus formula dari setiap puncak yang terdeteksi. Selanjutnya dilakukan interpretasi data melalui website Chemspider, HMDB dan Pubchem. Software *Chemdraw* digunakan untuk menuliskan struktur dan nama senyawa yang ditemukan.

3.6. Analisa Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan deskriptif dengan memperlihatkan pola pemisahan dan penmpakan noda pada kromatografi dari eluen yang digunakan. Analisa steroid dilakukan dengan memperhatikan bentuk umum spektrum UV-Vis dan didukung dengan interpretasi kromatogram FTIR, dan kromatogram LC-MS/MS. Hasil yang didapat merupakan senyawa steroid yang terdapat dalam alga merah (*Eucheuma Cottonii*) perairan wongsorejo banyuwangi. Identifikasi uji antioksidan senyawa steroid untuk menghambat senyawa steroid diolah menggunakan microsoft excel untuk mengetahui nilai IC₅₀ antara sampel dan pembanding.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan alga merah jenis *Eucheuma Cottonii* yang berasal dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi Provinsi Jawa Timur. Preparasi sampel dilakukan dengan mencuci semua bagian *Eucheuma Cottonii* dengan air bersih untuk menghilangkan kotoran yang ikut setelah diambil dari perairan laut. Kemudian sampel dipotong menjadi ukuran kecil untuk mempercepat proses pengeringan. Metode untuk mengeringkan sampel dengan cara kering angin, dengan tujuan untuk menghindari kerusakan senyawa metabolit sekunder dan menghilangkan kadar air dalam sampel *Eucheuma cottonii*. Menurut Ketaren (1986) menyatakan bahwa kadar air yang rendah dapat memperkecil terjadinya proses hidrolisis, sehingga akan mengurangi terbentuknya asam lemak bebas dan gliserol yang menyebabkan ketengikan.

Sampel basah *Eucheuma Cottonii* yang sudah dikeringkan, kemudian dihaluskan dengan alat penggiling dan disaring dengan menggunakan ayakan dengan ukuran 100 mesh bertujuan untuk menyeragamkan ukuran serbuk sampel dan memperluas permukaan sampel sehingga memaksimalkan proses ekstraksi dan pelarut dapat terserap langsung pada dinding sampel. Menurut Elda (2019) ukuran sampel yang semakin kecil dan luas permukaan yang besar akan membuat lebih banyak kontak dengan pelarut yang akan mengekstrak, sehingga akan mempengaruhi proses ekstraksi menjadi lebih optimal. Sampel basah *Eucheuma Cottonii* sebanyak 20 Kg dan sampel yang didapat setelah melalui proses pengeringan sebesar 0,80 Kg

4.2 Analisa Kadar Air

Analisa kadar air *Eucheuma Cottonii* menggunakan metode *thermogravimetri*. Analisis ini bertujuan untuk mengetahui kadar air dalam sampel kering makro alga *Eucheuma Cottonii*. Kadar air yang tinggi dapat mengakibatkan sampel menjadi lembab sehingga akan mudah terdegradasi oleh mikroorganisme seperti jamur atau bakteri (Sari dkk, 2019). Analisis kadar air dihentikan ketika berat yang diperoleh sudah mencapai konstan. Hasil penentuan kadar air sampel dalam penelitian ini sebesar 9,22%. Penelitian Wahyuni (2014) menyatakan bahwa batas maksimal kadar air dalam suatu sampel padat berkisar 10%. Nilai kadar air yang disyaratkan agar proses ekstraksi berlangsung secara optimum yaitu antara 10-40% (Dorta dkk., 2013). Berdasarkan hasil penentuan kadar air tersebut sampel makro alga *Eucheuma Cottonii* tidak melebihi batas maksimum dari kadar air yang sudah ditentukan sehingga tidak mempengaruhi proses ekstraksi.

4.3 Ekstraksi Sampel

4.3.1 Maserasi

Ekstraksi sampel menggunakan metode maserasi bertujuan untuk mengekstrak senyawa aktif yang terdapat pada *Eucheuma Cottonii* dengan menggunakan pelarut organik. Penelitian ini menggunakan pelarut metanol p.a yang bersifat polar karena senyawa steroid umumnya pada tanaman memiliki sifat polar karena dalam bentuk ikatan glikosida. Metode ini didasarkan pada perendaman sampel didalam pelarut metanol yang memiliki konsentrasi tinggi masuk, kemudian menarik metabolit sekunder yang ada didalam sel sitoplasma yang terikat dalam gugus gula akan keluar. Maserasi menggunakan pelarut metanol didasarkan pada prinsip *like dissolve like* (Kristanti, 2008) sehingga senyawa

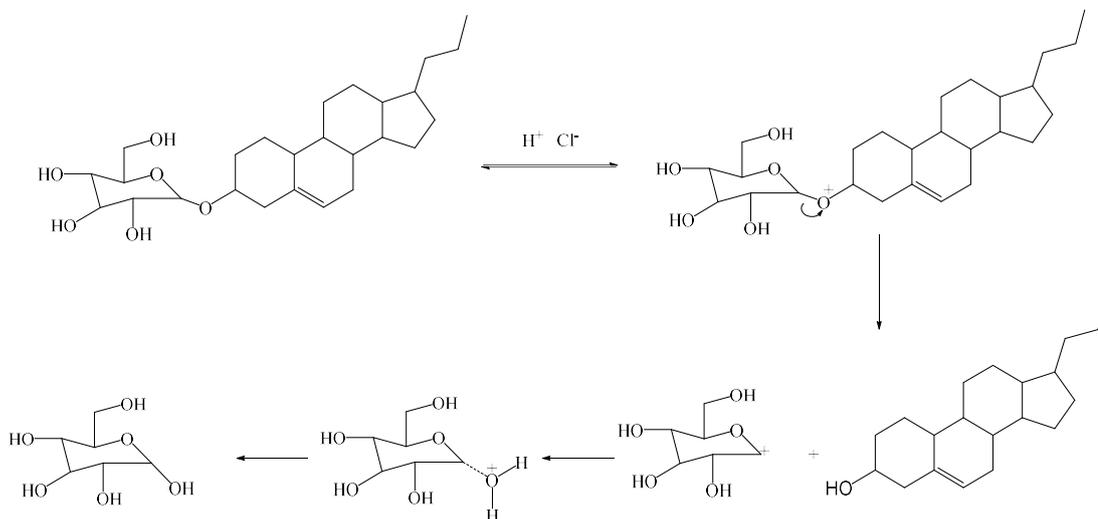
steroid di dalam sampel *Eucheuma Cottonii* terekstrak sesuai dengan sifat pelarut dari metanol. Pelarut metanol digunakan karena pada umumnya senyawa metabolit sekunder di alam berada dalam bentuk glikosida dan mempunyai titik didih yang rendah yaitu 74°C dibandingkan dengan etanol dengan titik didih 78°C sehingga lebih mudah diuapkan (Hart, 2003).

Proses ekstraksi maserasi alga merah *eucheuma cottonii* dilakukan sebanyak 3 kali. Pada setiap pengulangan terjadi penurunan warna-warna filtrat yang dapat diasumsikan bahwa ekstrak telah maksimum terekstrak dalam pelarut metanol. Hasil ekstraksi maserasi dari alga merah *eucheuma cottonii* menggunakan pelarut metanol didapatkan hasil sebesar 14,5615 gram dengan randemen sebesar 14,56%. Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Fatimah (2020) dan Madjid dkk (2020) mengekstraksi alga merah *Eucheuma Cottonii* dengan pelarut yang metanol secara berturut-turut sebesar 10,62% dan 11,86% .Perbedaan hasil randemen tersebut disebabkan karena adanya perbedaan waktu pengambilan, perbedaan kadar air, perbedaan waktu atau umur panen, lingkungan, tempat tumbuh, iklim, penanganan pra, dan pasca panen dapat mempengaruhi kandungan ekstrak *Eucheuma Cottonii*.

4.3.2 Hidrolisis Ekstrak Hasil Maserasi *Eucheuma Cottonii*

Ekstrak pekat metanol alga merah *Eucheuma Cottonii* hasil maserasi dihidrolisis dengan menggunakan asam kuat HCl. Tujuan penambahan ini untuk memutus ikatan glikosida sehingga diperoleh senyawa metabolit sekunder dalam keadaan bebas. Reaksi hidrolisis dapat berlangsung secara reversibel, apabila tidak dihentikan maka akan kembali terbentuk ikatan glikosida (Fessenden dan

Fessenden, 1986). Reaksi pemutusan ikatan glikosida dari senyawa metabolit sekunder ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Dugaan Reaksi Hidrolisis pada Ikatan *O*-Glikosida (Singgih, 2016)

Setelah proses hidrolisis atau pemutusan ikatan glikosida untuk menghentikan reaksi tersebut, larutan perlu dinetralkan menggunakan senyawa basa natrium bikarbonat sampai pH menjadi netral dan reaksi reversibel berhenti dan hasil samping berupa garam dapur yang tidak beracun. Setelah dilakukan hidrolisis, selanjutnya dilakukan proses pemisahan steroid dari glikon melalui proses partisi (fraksinasi).

4.3.3 Partisi

Partisi merupakan pemisahan senyawa yang ingin di ambil berdasarkan pada terdistribusinya pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya. Proses partisi menghasilkan dua lapisan antara lain lapisan air dan lapisan organik. Berdasarkan penelitian ismi (2020) n-butanol merupakan pelarut yang baik untuk memisahkan senyawa steroid pada alga merah *Eucheuma Cottonii*. Hal ini ditunjukkan dari nilai

EC₅₀ 35,03 dan 38,11 ppm. Pelarut ini digunakan karena senyawa steroid yang diisolasi memiliki sifat kepolaran yang mirip. Suatu senyawa yang memiliki kepolaran yang sama maka akan saling bercampur atau sering dikenal sebagai *like dissolve like* (Khopkar, 2008).

Lapisan air berada dibawah dan lapisan organik berada diatas karena berat jenis air lebih besar (1 g/L) daripada berat jenis n-butanol (0,81 g/L). Komponen gula (glikon) akan terekstrak dalam pelarut yang bersifat polar (fasa air) sedangkan aglikon akan terekstrak pada fasa organik (n-butanol). Fasa organik yang didapat berwarna coklat. Proses partisi dilakukan sampai fasa air terlihat bening yang dapat diasumsikan telah banyak senyawa yang terdistribusi ke dalam fasa organik. Lapisan organik yang mengandung aglikon diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat. Selain itu, sisa pelarut yang ada dihilangkan dengan dialiri gas N₂ dan dihitung randemen hasil ekstrak.

Ekstrak kasar sebanyak 5 gram yang dihidrolisis kemudian dipartisi didapatkan fraksi pekat n-butanol 16,59%. Hasil ini lebih besar kurang dibandingkan dengan hasil partisi menggunakan pelarut non polar pada n-heksana sebesar 11,52% (Pramitania, 2019), petroleum eter sebesar 8,03% (Madjid. dkk., 2020). Namun hasil randemen Fatimah (2020) yang melakukan partisi pada alga merah *Eucheuma Cottonii* menggunakan pelarut n-butanol sebesar 27,058%. hasil ini diduga karena kurang maksimalnya dari pengocokan sehingga kemungkinan senyawa metabol sekunder masih belum terekstrak sempurna ke dalam pelarut n-butanol dan masih tertinggal dalam fasa airnya.

4.4 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Skrining fitokimia merupakan langkah awal untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam suatu sampel. Uji fitokimia dalam penelitian ini untuk mengetahui kandungan senyawa steroid dalam ekstrak sampel fraksi n-butanol *Eucheuma Cottonii*. Perlakuan yang digunakan dengan cara mereaksikan ekstrak sampel fraksi n-butanol *Eucheuma Cottonii* suatu reagen *liebermann-burchard*. Reagen *liebermann-burchard* terdiri dari asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat dan kloroform. Sampel yang sudah larut dalam. Hasil uji fitokimia dari fraksi n-butanol memberikan hasil positif mengandung senyawa steroid ditandai dengan terbentuknya warna hijau pada bagian atas tabung reaksi, ditunjukkan pada Gambar 4.2. Hal ini sesuai dengan pernyataan Harborne (1987) yang menyatakan hasil uji positif mengandung steroid apabila pada larutan uji mengalami perubahan warna larutan menjadi kebiruan.



Gambar 4.2 Hasil Uji Fitokimia Isolat Fraksi n-butanol

4.5 Pemisahan Senyawa Steroid menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Fraksi n-butanol alga merah *Eucheuma cottonii* hasil hidrolisis yang mengandung senyawa steroid dipisahkan menggunakan metode kromatografi lapis

tipis preparatif. Penggunaan metode ini dilakukan untuk mendapatkan isolat yang akan digunakan dalam identifikasi senyawa steroid selanjutnya. Metode ini dilakukan dengan penotolan fraksi n-butanol hasil hidrolisis ekstrak metanol *Eucheuma Cottonii* pada sepanjang garis di salah satu plat. Penelitian Azizah (2016) menunjukkan bahwa penggunaan fasa gerak yang efektif untuk pemisahan senyawa steroid alga merah *Eucheuma Cottonii* dengan perbandingan (17:3). Sedangkan fasa diam yang digunakan yaitu plat alumunium berlapis silika yang dapat berpendar dalam sinar *ultraviolet*.

Tabel 4.1 Hasil Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

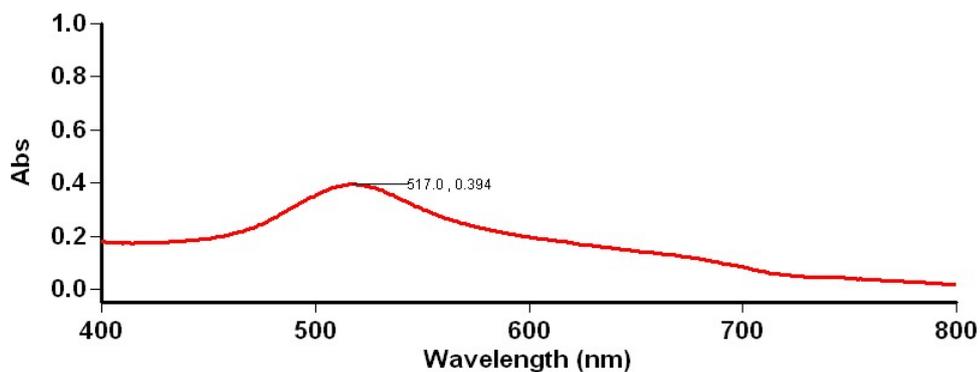
No	Warna UV 366nm	Dugaan Seyawa	Jarak Senyawa (cm)	Jarak Elusi (cm)	Rf
1	Merah	Triterpenoid	0,9	18	0,05
2	Merah	Triterpenoid	1,4	18	0,0778
3	Merah	Triterpenoid	2,1	18	0,1167
4	Merah	Triterpenoid	4,2	18	0,2333
5	Merah	Triterpenoid	4,7	18	0,2611
6	Merah	Triterpenoid	6,4	18	0,3556
7	Merah	Triterpenoid	7	18	0,3889
8	Merah	Triterpenoid	7,9	18	0,4389
9	Biru	Steroid	8,9	18	0,4944
10	Hijau	Steroid	10,7	18	0,5944
11	Merah	Triterpenoid	13,5	18	0,75
12	Merah	Triterpenoid	14,4	18	0,8

Hasil noda pemisahan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif terdapat 12 spot senyawa yang berbeda. Senyawa yang diduga steroid yang berada pada spot yang berwarna hijau dan biru. Hal ini sesuai dengan hasil dari uji fitokimia *liebermann-burchard*. Isolat steroid pada umumnya memiliki nilai R_f yang besar, hal ini menunjukkan adanya perbedaan struktur dan distribusi senyawa pada fasa diam dan fasa gerak yang digunakan. Hasil isolat yang diduga senyawa steroid kemudian diidentifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis, Spektrofotometri FTIR dan Spektroskopi LC-MS/MS.

4.6 Uji Aktivitas antioksidan

4.6.1 Penentuan Panjang Gelombang maksimum DPPH

Aktivitas antioksidan sampel diukur melalui pengukuran intensitas serapan dari setiap sampel setelah ditambahkan DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada Panjang gelombang tertentu. Berdasarkan hal tersebut, sebelum dilakukan pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan terlebih dahulu penentuan panjang gelombang maksimal larutan DPPH. Pengukuran ini untuk lebih maksimal kepekaan dan meminimalkan kesalahan (Wanahyu dkk, 2019). Menurut Siddiq (2016) yang menyatakan bahwa DPPH memiliki absorbansi pada Panjang gelombang antara 515-520 nm. Hasil percobaan menunjukkan serapan maksimum DPPH terletak pada panjang gelombang 517,0 nm. Hal ini berarti bahwa pengukuran serapan atas peredamaan seluruh isolat steroid terhadap radikal bebas DPPH dilakukan pada Panjang gelombang 517,0 nm. Hasil spektra UV-Vis dari pengukuran yang telah dilakukan dapat dilihat pada Gambar 4.3:



Gambar 4.3 Panjang Gelombang Maksimum DPPH

4.6.2 Pengukuran Potensi Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan isolat steroid alga merah *Eucheuma Cottonii* dilakukan dengan menggunakan metode DPPH. Pengujian aktivitas antioksidan

pada isolat senyawa steroid hasil kromatografi lapis tipis preparatif dilakukan dengan variasi konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm dan diukur serapan pada panjang gelombang 517,0 nm. Pengukuran aktivitas antioksidan ini menggunakan kontrol larutan DPPH 0.2 nm. Larutan kontrol berfungsi untuk menentukan absorbansi radikal DPPH sebelum direduksi oleh sampel. Selisih absorbansi kontrol dengan absorbansi sampel yang telah tereduksi DPPH merupakan sisa radikal DPPH yang terbaca pada spektrofotometer UV-Vis. Absorbansi kontrol dan absorbansi isolat yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menentukan persen aktivitas antioksidan. Pengujian aktivitas antioksidan diinkubasi pada suhu 37°C karena pada suhu ini reaksi antara radikal DPPH dengan senyawa metabolit sekunder berlangsung lebih optimal (Aji, 2014). Berikut ini merupakan hasil dari pengujian aktivitas antioksidan.

Tabel 4.2 Nilai persen aktivitas antioksidan sampel dan nilai IC₅₀ masing-masing sampel

Konsentrasi (ppm)	% Aktivitas antioksidan sampel		
	Isolat 9	Isolat 10	Vitamin C
1	1,948424	3,359151	24,1247
2	3,13276	6,727431	29,16509
3	7,860846	17,37093	30,05693
4	15,61284	19,80689	34,85138
5	18,26464	20,45729	35,5185
IC ₅₀	12,0072 ppm	8,9352 ppm	9,7636 ppm

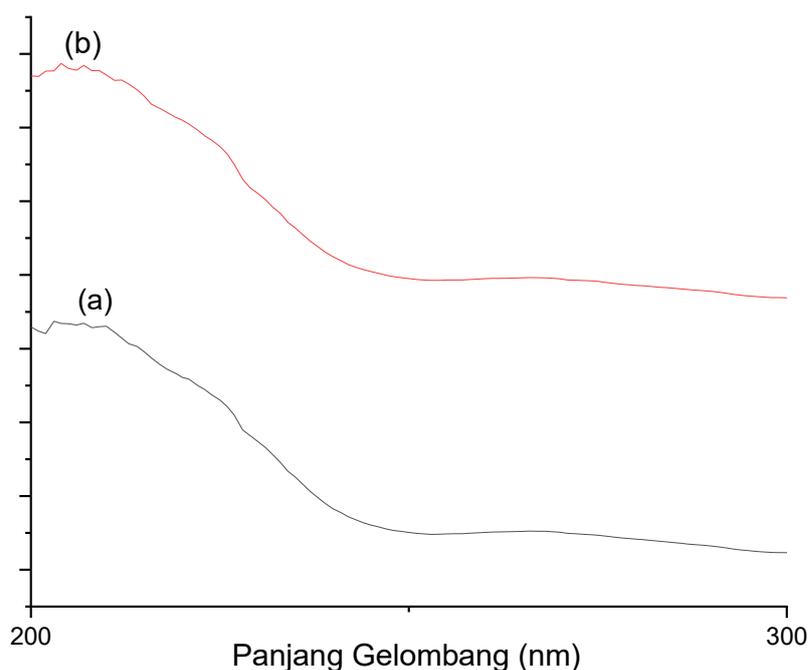
Berdasarkan Tabel 4.2 diketahui bahwa bertambahnya konsentrasi isolat steroid menyebabkan persen aktivitas antioksidan meningkat hal tersebut menunjukkan semakin banyak konsentrasi yang digunakan, maka semakin banyak

senyawa pada sampel menghambat radikal bebas DPPH (Kholidah, 2020). Data yang didapat dari perhitungan persen aktivitas antioksidan digunakan untuk menghitung. Berdasarkan Tabel 4.2 menunjukkan bahwa isolat steroid 9 dan 10 fraksi n-butanol alga merah *Eucheuma Cottonii* pada kedua isolat memiliki kemampuan aktivitas antioksidan untuk menghambat radikal bebas dengan nilai IC_{50} masing-masing yaitu sebesar 12,0072 ppm dan 8,9352 ppm, sehingga kedua isolat dikategorikan sebagai antioksidan yang sangat kuat dan bereaksi dengan radikal bebas DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan pada sampel dibandingkan dengan aktivitas antioksidan Vitamin C dimana masing-masing mewakili antioksidan alami dan sintetik. Vitamin C digunakan sebagai pembanding karena berfungsi untuk mengetahui seberapa kuat potensi aktivitas antoksidan dalam sampel jika dibandingkan dengan antioksidan yang sering dipakai seperti Vitamin C. Pembanding Vitamin C memiliki potensi antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan isolat steroid fraksi n-butanol yaitu dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 9,3676 ppm. Semakin kecil nilai IC_{50} maka aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh suatu bahan semakin kuat. Berdasarkan hasil isolat 9 memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik daripada isolat steroid kedua yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} yang lebih kecil yaitu 8,9352 ppm.

4.7 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan Spektrofotometri UV-Vis

Isolat hasil kromatografi lapis tipis preparatif dapat dilakukan identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil Pengukuran pada isolat hijau dan biru menghasilkan serapan pada Panjang gelombang yang ditampilkan pada Gambar 4.4 :



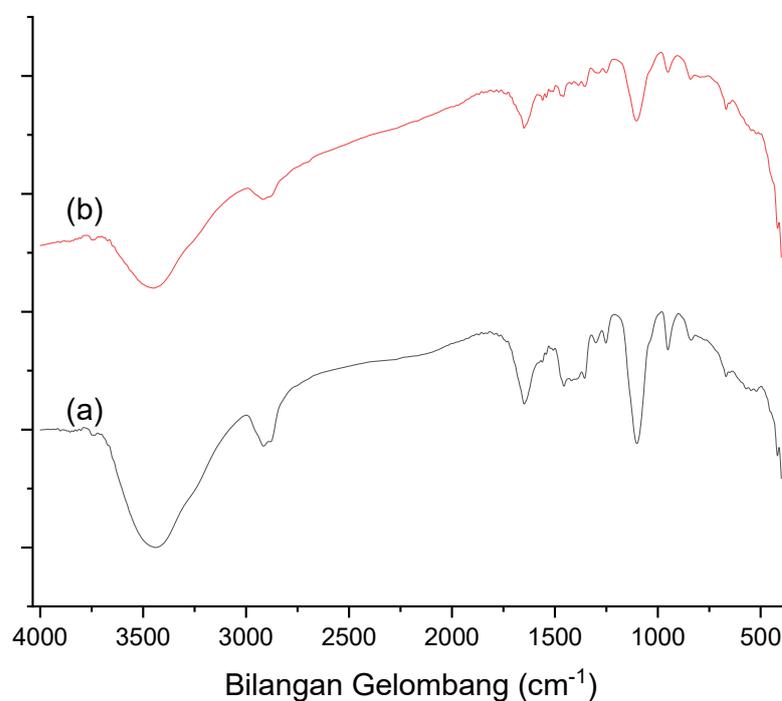
Gambar 4.4 Hasil Pengukuran Serapan Maksimum (a) Isolat 9 dan (b) Isolat 10

Hasil identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis pada Gambar 4.4 menunjukkan serapan panjang gelombang maksimum 203,8 pada isolat 9 yang memberikan dugaan senyawa memiliki transisi π - π^* . Menurut suharman (1995) puncak serapan pada daerah 190-210 nm serapan ini terjadi karena akibat transisi elektronik dari kromofor yang mengandung ikatan π yaitu gugus C=C tak terkonjugasi dan memberikan transisi elektronik dari π - π^* . Selain itu, terdapat juga serapan yang terdeteksi pada isolat biru pada panjang gelombang 204 nm menunjukkan terjadinya transisi π - π^* disebabkan oleh adanya ikatan C=C terkonjugasi. Menurut Suryelita (2017) menjelaskan bahwa senyawa steroid pada analisa UV-Vis terdapat serapan diena terkonjugasi pada transisi π - π^* pada daerah ≥ 270 nm. Isolat pada Gambar 4.4 memiliki transisi elektronik π - π^* yang mengindikasikan ikatan C=C terkonjugasi karena muncul serapan pada panjang gelombang maksimum 190 dan 230 nm. Suryelita (2017) melakukan isolasi

senyawa steroid dari ekstrak daun tumbuhan cemara natal memiliki satu pita serapan UV-Vis pada panjang gelombang 203 nm. Isolat tersebut dikonfirmasi dengan instrumen FTIR dihasilkan senyawa merupakan senyawa steroid.

4.8 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan Spektroskopi FTIR

Isolat hasil KLTP alga merah *Eucheuma Cottonii* selanjutnya dilakukan identifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR untuk mengetahui interaksi antara radiasi elektromagnetik dengan sampel yang melibatkan vibrasi molekul. Senyawa yang akan diidentifikasi dihaluskan dengan *mortar agate* dengan bantuan garam KBr sebagai *background* dan dilakukan pengepresan pada tekanan 80 tor selama 10 menit hingga didapat pellet tipis. Hasil spektra yang didapat ditampilkan pada Gambar 4.5 serta interpretasi spektra FTIR ditampilkan pada Tabel 4.3.



Gambar 4.5 Serapan Hasil Identifikasi FTIR (a) Isolat 9 (b) Isolat 10

Tabel 4.3 Interpretasi Spektra FTIR Isolat 9 dan 10

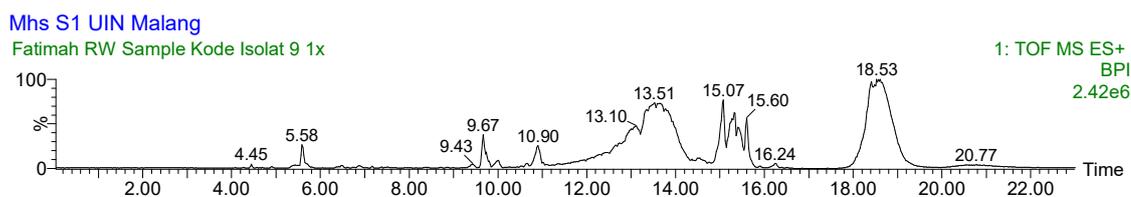
Gusus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm^{-1})		Intensitas
	Isolat 9	Isolat 10	
-OH, <i>stereching</i> (alkohol)	3449,605	3440,104	m-s
-Csp ³ -H, <i>streching</i> , (alkena)	2918,279	2914,672	M
C=C, <i>streching</i> ,	1649,651	1649,159	m-s
-CH pada CH ₂ <i>Bending scissoring</i>	1459,007	1455,747	M
CH ₃ pada CH ₂ <i>Bending wagging</i>	1354,901	1355,539	Vs
C-O (ester)	-	1300,817	w-s
C-O (alkohol) sekunder	1103,738	1101,405	m-s
=C-H siklik (<i>broad</i>)	950,724	950,715	m-s
C=CH (<i>bend</i>)	667,955	668,207	m-s

Pada spektra tersebut terdapat puncak pada bilangan gelombang 3449,605 cm^{-1} dan 3440,104 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus OH yang diduga merupakan gugus yang terikat pada struktur dasar steroid. Pada bilangan gelombang 2918,279 cm^{-1} (isolat 9) dan 2914,672 cm^{-1} (isolat 10) menunjukkan adanya ikatan Csp³-H menunjukkan ikatan alifatik yang diperkuat oleh puncak pada bilangan gelombang 1459,007 cm^{-1} (isolat 9) dan 1455,747 cm^{-1} (isolat 10) yang menunjukkan gugus -CH₂ dan dan puncak pada bilangan gelombang 1354,901 cm^{-1} (isolat 9) dan 1355,539 cm^{-1} (isolat 10) menunjukkan gugus CH₃. Puncak pada bilangan gelombang 11603 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan C-O dan pada bilangan gelombang 667,955 cm^{-1} (isolat 9) dan 668,207 cm^{-1} menunjukkan ikatan C=CH.

Pemanfaatan Alga Merah *Eucheuma Cottonii* dalam Islam Berdasarkan hasil isolasi yang dilakukan, plat KLT yang digunakan menghasilkan pemisahan warna yang dapat dilihat menggunakan sinar UV. Hasil tersebut di semprot menggunakan larutan *liebermann-burchard* menimbulkan hasil berupa warna yang berubah pada spot 9 dan 10. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa yang diisolasi merupakan senyawa steroid. Selanjutnya untuk memastikan struktur kandungan senyawa steroid yang dikandung dalam isolat, dilakukan analisis lanjut dengan spektroskopi LC-MS/MS.

4.9 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan Spektroskopi LC-MS/MS

Identifikasi menggunakan instrumentasi LC-MS/MS dilakukan pada isolat steroid fraksi n-butanol *Eucheuma Cottonii* yang tergambar pada Gambar 4.6. LC-MS/MS merupakan instrumen yang berfungsi untuk memisahkan senyawa berdasarkan pada berat dan struktur molekul, juga distribusi kepolarannya terhadap fasa diam dan fasa yang sedang digunakan. Masing-masing ekstrak yang telah dipreparasi diinjeksikan ke dalam instrumen LCMS/MS sebanyak 5 μ l menggunakan *micro syringe*. Hasil pertama diperoleh yaitu berupa kromatogram. Kromatogram diperoleh setelah sampel memasuki kolom dan terjadi proses pemisahan senyawa kimia yang terdapat dalam isolat sehingga senyawa tersebut melalui detektor.



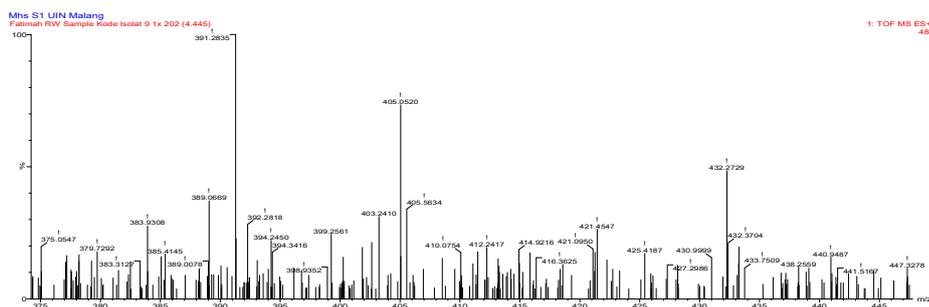
Gambar 4.6 Hasil Kromatogram Isolat 10 n-butanol *Eucheuma Cottonii*

Software Masslynx versi 4.1 dapat digunakan untuk mengolah dan menginterpretasikan kromatogram dan spektra untuk mengetahui massa dan memprediksikan rumus molekul dari senyawa yang telah ditentukan. *Measured mass* merupakan massa yang ditentukan dari senyawa yang diidentifikasi, sedangkan *calculate mass* merupakan massa tepat dari suatu rumus formula. *Measured mass* dan *calculated mass* tidak harus sama persis, akan tetapi ada batas yang ditolerir untuk rumus molekul tersebut dapat dikatakan sebagai rumus molekul dari peak tersebut, yaitu apabila selisish antara keduanya sebesar $\leq 0,00055$ Da.

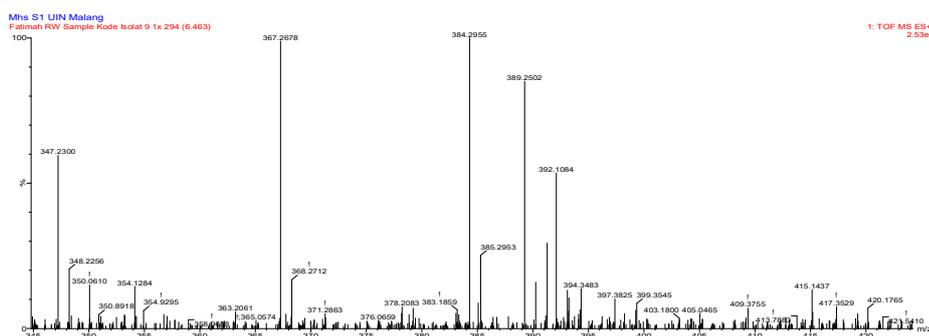
Pencarian nama senyawa berdasarkan rumus molekul yang telah diketahui tersebut dapat diakses melalui website *chemspider* dengan mengurangi atom H pada rumus molekul terlebih dahulu. Hal tersebut karena molekul akan terprotonisasi dengan 1 atom H dalam proses ionisasi ESI positif., sehingga jumlah massa yang diketahui juga dikurangi sebesar 1,00782 Da. Setelah diketahui nama senyawa dari rumus molekul yang ditentukan, maka dilakukan penggambaran struktur senyawa menggunakan software Chemdraw Ultra versi 15. Penentuan presentase area juga dilakukan dengan cara membagi luas area peak tersebut dengan luas area dari keseluruhan peak lalu dikali dengan 100%. Hasil dari interpretasi data masing-masing ekstrak disediakan dalam Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Hasil Deteksi Ion Steroid LC-MS/MS Isolat 10

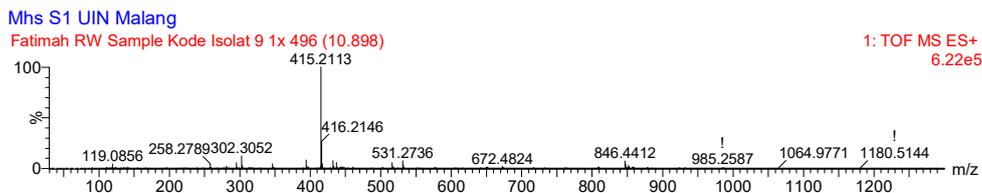
RT	%	Steroid	Rumus Molekul	Massa (m/z)	
				Measured Mass	Calculated Mass
4,445	0,12	“12-Dehydrodeoxycholic acid” 3-Hydroxy-12-oxocholan-24-oic acid	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	391,2835	391,2848
6,463	0,16	“QUINGESTANOL” Norethisterone 3-cyclopentyl enol ether	C ₂₅ H ₃₄ O ₂	367,2678	367,2637
		“Eplerenon”			
10,898	1,78	9,11-Epoxy-7-(methoxycarbonyl)-3-oxo-17-pregn-4-ene-21,17-carbolactone	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	415,2113	415,2121
15,342	10,02	“Nandrolone benzoat” 17beta-Hydroxyestr-4-en-3-one	C ₂₅ H ₃₁ O ₃	389,2248	389,2273



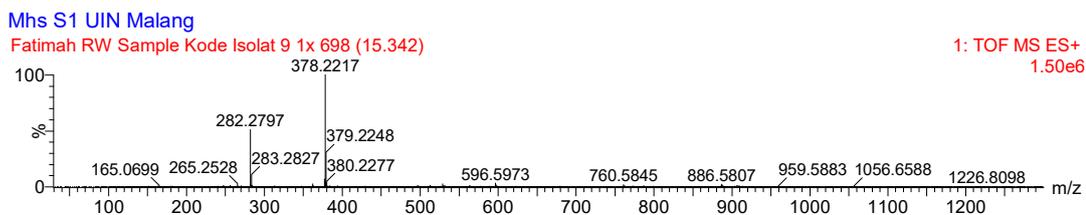
Gambar 4.7 Spektrum dari 12-Dehydrodeoxycholic acid



Gambar 4.8 Spektrum dari Quingestanol

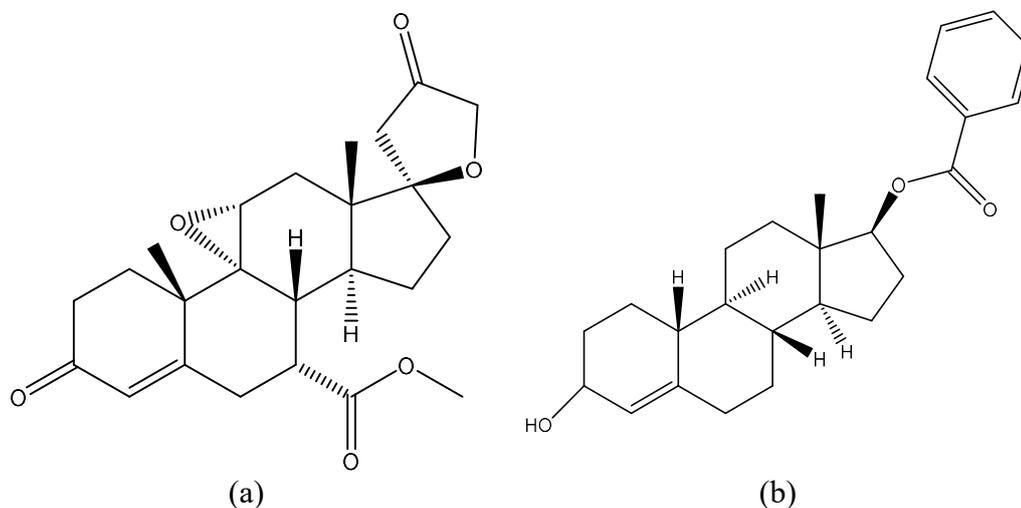


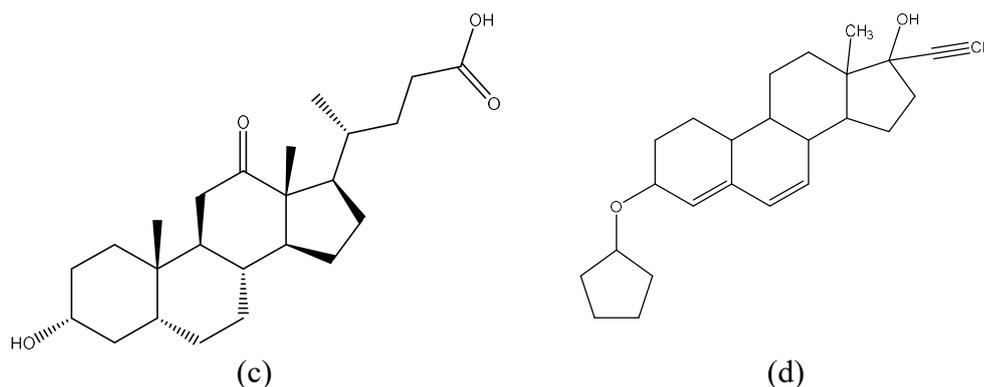
Gambar 4.9 Spektrum dari Eplerenon



Gambar 4.10 Spektrum dari Nandlore Benzoat

Berdasarkan profil isolat pada Tabel 4.4, diketahui bahwa pada isolat *n-butanol eucheuma cottonii* senyawa yang terdeteksi Eplerenone dan Nandrolone benzoat. Senyawa Eplerenone diketahui memiliki fungsi sebagai penghambat aldosteron (zat menaikkan tekanan darah) yang bergerak secara spesifik dan selektif, sehingga dapat digunakan sebagai obat hipertensi (Delyani, 2001). Nandrolone benzoat yang ditemukan merupakan dari isolat termasuk golongan steroid ester digunakan dalam pengobatan anemia, cachexia (*sindrom wasting*), osteoporosis, kanker payudara, dan untuk indikasi lainnya (Sneader, 2005).





Gambar 4.11 Struktur Steroid (a) Eplerenone, (b) Nandrolone benzoat,

(c) 12-Dehydrodeoxycholic acid dan (d) Quingstanol

4.10 Pemanfaatan Alga Merah *Eucheuma Cottonii* dalam Perspektif Islam

Berdasarkan hasil penelitian pada kandungan senyawa steroid dari alga merah *Eucheuma Cottonii* digunakan untuk senyawa antioksidan memiliki hasil IC_{50} sebesar 12,0072 ppm pada isolat 9 dan 8,9352 ppm pada isolat 10. Hal ini menunjukkan senyawa steroid yang terkandung dalam alga merah *Eucheuma Cottonii* lebih kuat digunakan sebagai senyawa antioksidan dibandingkan vitamin C sebesar 9,76 ppm. Selain diaplikasikan sebagai antioksidan alga merah *eucheuma Cottonii* dapat dimanfaatkan sebagai pembuatan krim tabir surya dan bahan baku etanol. Allah SWT berfirman dalam Al Quran surat as-Sad ayat 27:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَاطِلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا فَوَيْلٌ لِلَّذِينَ كَفَرُوا مِنَ النَّارِ ۚ ٢٧

Artinya :

“Kami tidak menciptakan langit dan bumi serta apa yang ada di antara keduanya secara sia-sia. Itulah anggapan orang-orang yang kufur. Maka, celakalah orang-orang yang kufur karena (mereka akan masuk) neraka.”

Ayat ini memberikan kabar kepada umat manusia bahwa segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah SWT mempunyai manfaat atau hikmah yang

terkandung di dalamnya. Manfaat tersebut juga terdapat pada penciptaan tumbuhan *Eucheuma Cottonii*. *Eucheuma Cottonii* berpeluang untuk dijadikan sebagai tanaman obat maupun non obat. Akan tetapi, perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kandungan senyawa lain didalam *Eucheuma Cottonii*. Pendekatan ilmiah dan teknologi menghasilkan adanya beberapa penelitian yang banyak dilakukan terhadap *Eucheuma Cottonii*. *Eucheuma Cottonii* berpotensi digunakan untuk krim tabir surya (Maharany, 2017) dan bahan baku pembuatan etanol (Wiratmaja, 2011). Hal ini yang membuat manusia akan senantiasa menyadari dan berfikir sesungguhnya pada penciptaan langit dan bumi terdapat kekuasaan Allah SWT. Adanya tanda-tanda kekuasaan Allah SWT, sepatutnya kita sebagai manusia selalu berfikir dan berdzikir kepada Allah dalam keadaan apapun.

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian ini yaitu

1. Hasil pemisahan senyawa steroid fraksi n-butanol menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif menghasilkan dua noda tunggal yang berwarna hijau dan biru pada UV 366 nm dengan nilai R_f 0,478 dan 0,639 yang diduga mengandung senyawa steroid.
2. Isolat senyawa steroid *Eucheuma cottonii* dari kromatografi lapis tipis preparatif fraksi n-butanol memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} untuk isolat 9, 10 dan Vitamin C berturut turut sebesar 12,0072 ppm, 8,9352 ppm, dan 9,7636 ppm.
3. Hasil identifikasi isolat senyawa steroid dari *Eucheuma Cottonii* dengan UV-Vis menunjukkan adanya serapan pada panjang gelombang 190-210 nm yang mengindikasikan adanya transisi $\pi-\pi^*$ menyebabkan adanya serapan C=C dan ikatan diena terkonjugasi. Hasil identifikasi dengan FTIR menunjukkan bahwa adanya ikatan dari senyawa steroid dilihat gugus fungsi Csp^3 *stretching*, *bending*, dan *wagging*. Hasil Identifikasi dari LC-MS/MS menunjukkan bahwa senyawa steroid yang terkandung yaitu 12-Dehydrodeoxycholic acid, Quingstanol, Eplerenon dan Nanrolene benzoat (steroid ester).

5.2 Saran

Saran dari penelitian ini adalah agar dilakukan uji aktivitas lain seperti antitumor dan antiinflamasi terhadap isolat steroid alga merah *Eucheuma cottonii*, kemudian dapat dilakukan metode pemisahan senyawa steroid lain seperti kromatografi cair vakum dan dilanjutkan pemurnian dengan metode rekristalisasi untuk mendapat hasil yang lebih murni.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah. 2011. Potensi Bakau (*Rhizophora apiculata*) sebagai Inhibitor Tirosinase dan Antioksidan. *Tesis*. Bogor: IPB.
- Adhitama, Irsan., M. Zainudin, dan Nur Rokhati. 2012. Hidrolisis Kitosan Menggunakan Katalis Asam Klorida (HCl). *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. 1(1):245-251.
- Aji, R.M. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Daging Daun Lidah Buaya (*Aloe vera*) Menggunakan Metode DPPH (*1,1-Diphenil-2-Picrylhydrazyl*) *Skripsi*. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah.
- Auliawan, Riky dan Bambang Cahyono. 2014. Efek Hidrolisis Ekstrak Daun Iler (*Coleus scutellarioides*) Terhadap Aktivitas Inhibisi Enzim α -glukosidase. *Jurnal Sains dan Matematika*. 22(1):15-19.
- Aminah, dkk. 2020. Potensi Ekstrak Rumput Laut (*Euclima Cottonii*) Sebagai Antioksidan. *As-Syifaa Jurnal Farmasi*. 12(1):36-41.
- Anantharaman, P dan L. Kannan., 2009. *Seaweeds*. Center of Advance Study in Marine Biology: Annamalai University.
- Amaranggana. Larasati dan Nasrul Wathoni. (2017). Manfaat Alga Merah (*Rhodopyta*) sebagai sumber obat dari bahan alam. *Majala Farmasetika*. 2(1):16-19.
- Andrey, E.R. 2003. *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy: An Introduction*. New York : John Wiley & Sons.
- Azizah, Laili Nur. 2016. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah *Euclima sponsium*. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Chatwall, G. 1985. *Spectroscopy Atomic and Molecule*. Bombay: Himalaya Publishing House.
- Delyani JA, Rocha R, Cook CS, Tobert DS, Levin S, Roniker B, et al. 2001. Eplerenone: a selective aldosterone receptor antagonist (SARA). *Cardiovascular Drug Reviews*. 19 (3): 185–200.
- Dominguez, H. 2013. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. Amsterdam: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Elsevier Science.

- Dorta, E., Lobo, M. G., & González, M. 2013. Improving the Efficiency of Antioxidant Extraction from Mango Peel by Using Microwave-assisted Extraction. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68(2), 190–199.
- Dr. Hery Winarsi, M.S. 2007. *Antioksidan Alami Dan Radikal*. Yogyakarta: Kanisius.
- Fauzia, Ditya Vega., Dewi Kusriani, dan Enny Fachriyah. 2018. Isolation and Testing of Bacteria from Steroid Compounds obtained from Anting-anting Leaf (*Acalypha indica* L.). *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. 21(2):64-69.
- Fatimah, Fitri. 2020. Uji Toksisitas Senyawa Steroid Hasil Kromatografi Kolom Basah Fraksi n-butanol Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma Cottonii* dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Fessenden dan Fessenden. 1986. *Kimia Organik*. Jakarta : Erlangga
- Gunawan D. Mulyani S. 2005. *Ilmu Obat Alam (farmakognosi)*. Penebar Swadaya. Bogor.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan. (Terjemah. Kosasih Padmawinata)*. ITB: Bandung.
- Hart, Harold. 2003. *Kimia Organik Suatu Kuliah Singkat*. Erlangga: Jakarta.
- Haris Munandar Nasution. 2020. Skrining Fitokimia dan Isolasi Senyawa Steroid/Triterpenoid Dari Ekstrak N-Heksana Rumput Laut *Eucheuma Alvarezii* Doty. *Jurnal Dunia Farmasi*. 3(3):108-115.
- Jana, Anggadiredjo. (2006). *Rumput Laut*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- J.B Harborne, 1998, *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Inggris, Springer Netherlands
- Kasim, Ma'ruf. 2016. *Makro Alga*. Jakarta: Swadaya.
- Ketaren, S. 1986. *Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan*. Jakarta: UI-Press.
- Kasanah, Noer., Triyanto, Drajad S.S., Windi Amelia, dan Alim Isnansetyo, 2015, *Indones. J. Chem.*, 2015, Antibacterial Compounds From Red Seaweeds (*Rhodophyta*). *Jurnal* . 15(2):201–209.
- Khopkar, S.M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.

- Kim, S.K., dan K. Chojnacka. Marine. 2013. *Algae Extracts: Processes, Products, and Applications*. Wiley
- Kumesan, Ecan Ch, Engel V. Pandey. dan Helen J. Lohoo. 2017. Analisa Total Bakteri, kadar Air dan pH pada rumput laut (*kappaphyucs alvarezii*) dengan Dua Metode Pengeringan. *Jurnal media Teknologi Hasil Perikanan*. 5(1):30-35.
- Khamidinal. 2009. *Teknik Laboratorium Kimia*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Kristanti, A.N., Amindah, N,S., Tanjung, dan Kurniadi, B. 2008. *Buku ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Madjid, Armeida Dwi Ridhowati., Dwi Anik., Ahmad Ghanaim F. 2020. Variasi Komposisi Eluen pada Isolasi Steroid dari Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma Cottonii* dengan Kromatografi Kolom Basah. *Alchemy: Jurnal Of Chemistry*. 8(1):35-40.
- Makin, H.L.J., dan D.B. Gower. (2010). Steroid Analysis. SpringerLink: *Springer e-Books*. Springer Netherlands,
- Mangan, Y. 2009. *Solusi sehat mencegah & mengatasi kanker*. Jakarta: Agromedia Pustaka
- Matanjun, P., Mohamed, S., Kharidah, M., & Noordin, M. M. 2010. Comparison of cardiovascular protective effects of tropical Seaweeds, *Eucheuma Cottoniii*, *Caulerpa lentillifera*, and *Sargassum polycystum*, on high-cholesterol/high-fat diet in rats. *Journal of Medicinal Food*. 13(4):792–800.
- Mulja, M dan Suharman. 1995. *Analisis Instrumenal*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Meita. 2019. Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Etanol Rumput Laut Merah (*Eucheuma Cottoniii*) Di Perairan Kabupaten Aceh Jaya. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Ar-Raniry Banda Aceh.
- Molyneux, P. 2004. The Use of the Stable Free Radical *Diphenylpicrylhydrazyl* (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Original Article: Songklanakarinn J. Sci. Technol*. 26(2).
- Nurhasanawati, H., Sukarmi, dan Fitri Handayani. 2017. Perbandingan metode ekstraksi maserasi dan Soxhlet terhadap aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun jambu bol (*Syzygium malaccense L.*). *Jurnal Ilmia Manuntung*. 3(1):91-95.

- Nurnasari, Elda dan Heri Prabowo. 2019. Pengaruh Ukuran Sampel dan Lama Waktu Destilasi terhadap Randemen Minyak Atsiri Tembakau Lokal Indonesia. *Jurnal Litbang Pertanian Buletin Tanaman Tembakau, Serat & Minyak Industri*. 11(2):47-57.
- Najoan, Jelly Juliana., Max John R. Runtuwene, dan Defny S. Wewengkang. 2016. Uji fitokimia dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun tiga (*Allophylus cobbe L.*).
- Obenu, Noviana M, (2019). Ekstraksi dan identifikasi kandungan metabolit fraksi diklorometana dan aquades ekstrak metanol daun sirsak (*Annona Muriacata Linn*). *Jurnal Saintek Lahan Kering*. 2(1) 17-19.
- Putra, A.A Bawa, N. W. Bogoriani, N.P. Diantariani, dan Ni Luh Utari Sumadewi. 2014. Ekstraksi zat warna alami dari bonggol tanaman pisang (*Musa paradisiaca L.*) dengan metode maserasi, refluks, dan soxlet. *Jurnal Kimia* 8(1):113-119.
- Pramitania, V. A. 2019. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi n-Heksana Alga Merah (*Eucheuma Cottoni*) Dari Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *Skripsi*. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Rubiyanto , Dwiarsono. (2017). *Metode Kromatografi Prinsip Dasar, Praktikum Dan Pendekatan Pembelajaran Kromatografi*. Yogyakarta: DEEPUBLISH.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi. Diterjemahkan Prof Dr. Kosasih Padmawinata (2013)*. Bandung: ITB.
- Suparmi, Sahri A. 2009. Mengenal potensi rumput laut: kajian pemanfaatan sumberdaya rumput laut dari aspek industri dan kesehatan. *Sultan Agung*. XLIV(118): 95-116.
- Setiawan, Finna., Oeke Yunita, dan Ade Kurniawan. 2018. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kayu Secang (*Caesalpinia sappan*) Menggunakan Metode DPPH, ABTS, dan FRAP. *Jurnal Media Pharmaceutica Indonesia*. 2(2): 82-89.
- Sastrawan. Idza N., Meiske Sangi dan Vanda Kamu. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji ADAS (*Foeniculum vulgare*) Menggunakan Metode DPPH. *Jurnal Ilmia Sains*. 13(2):110-115.
- Sahriawati, Sumarlina, dan Sri Wahyuni. 2019. Validasi Metode dan Penetapan Kadar Kolesterol Ayam Broiler dengan Metode *Lieberman-Buchard*. *Jurnal Jurusan Teknologi Pengolahan Hasil Perikanan*. 1(2):31-40

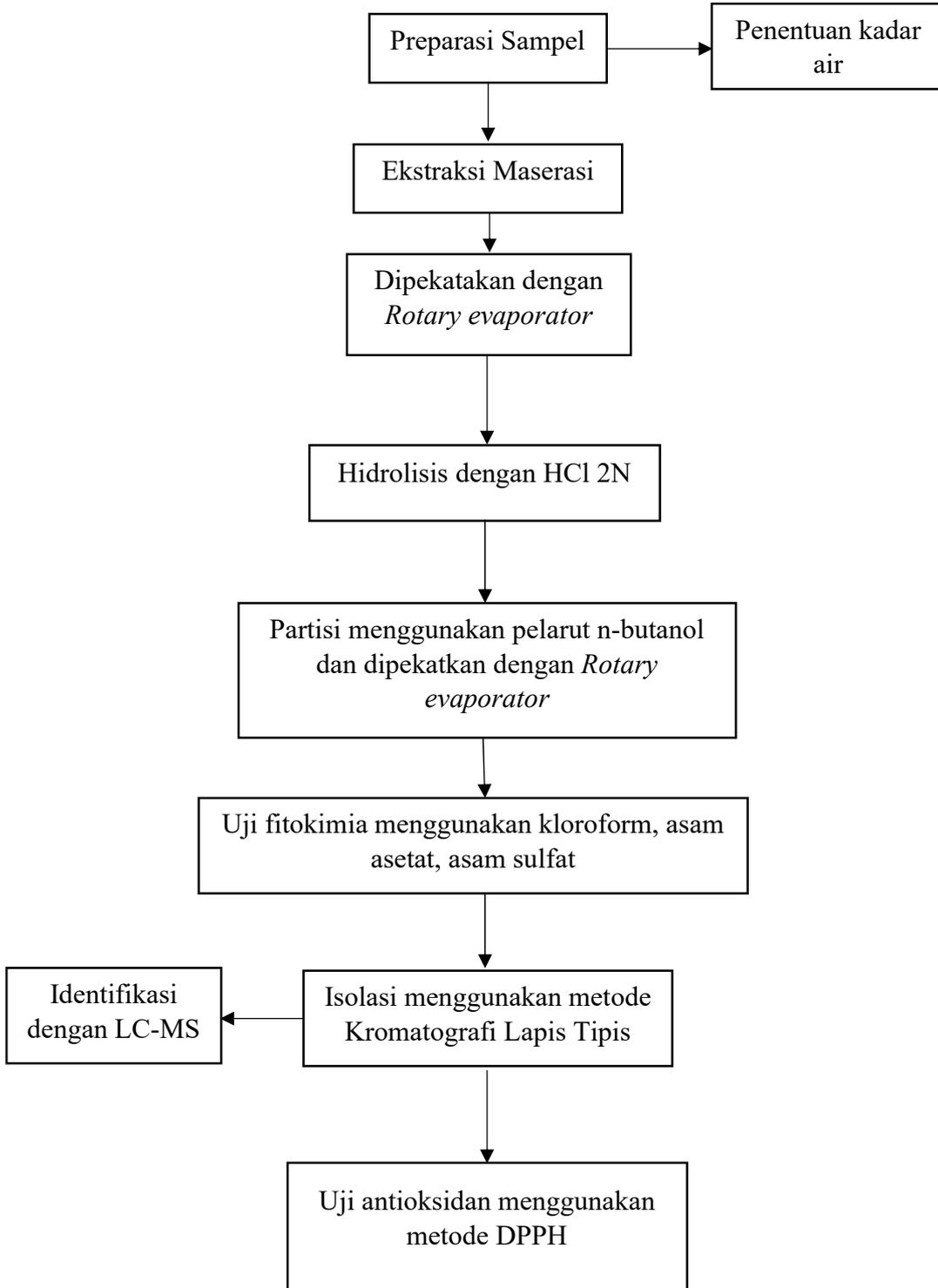
- Sari, A. N., Yoyok B. P., dan Bambang Dwiloka. 2019. Penerapan *Good Manufacturing Practices* (GMP) dengan Metode Skoring pada Analisis Kadar Air, Total Mikroba dan Bakteri Patogen Susu Bubuk Kambing PE di Cv. Halt Manufaktur Tegal. *Jurnal Teknologi Pangan*. 4(1):4-12.
- Saidi, N., Ginting, B., Murnia., dan Mustanir. 2018. *Analisis Metabolit Sekunder*. Syiah Kuala University Press: Banda Aceh.
- Suryelita, Sribenti Etika, Nivi S. K.,. 2017. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Steroid dari Daun Cemara Natal. *Jurnal Eksakta*. 18(1):86-94.
- Siddiq, Hadi Barru Hakam Fajar, Rosida dan Erika Fauziah Prabawati. 2016. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Biji Edamame (*Glycin Max (L) Merril*) Dengan Metode DPPH. *Jurnal Ilmia Farmasi AFKAR*. 1(1):27-31.
- Sudarmadji, S. 1996. *Teknik Analisis Biokimia*. Yogyakarta: Liberty Yogyakarta.
- Sulastry, Taty dan Nilam Kurniawati. 2010. Isolasi Steroid dari Ekstrak Metanol daun Bluntas. *Jurnal Chemica*. 11(1): 52-56.
- Suri, annisa., Yuniarti Yusak, dan Rumondang Bulan. 2013. Pengaruh Lama Fermentasi Terhadap Kadar Bioetanol Dari Fermentasi Glukosa Hasil Hidrolisis Selulosa Tandan Kosong Kelapa Sawit (*Elaeis Guineensis Jack*) Dengan Hcl 30% Menggunakan Ragi Roti. *Jurnal Saintia Kimia*. 1(2).
- Sneader W. 2005. *Drug Discovery: A History*. Brithish: John Wiley & Sons.
- Wahyuni, R., & Rivai, H. 2014. Pengaruh Cara Pengeringan Dengan Oven, Kering Angin dan Cahaya Matahari Langsung Terhadap Mutu Simplisia Herba Sambiloto. *Farmasi Higea*, 6(2), 126-133.
- Wahdaniyah, N.A. 2019. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Fraksi n-Heksana Mikroalga *Chlorella sp.* *Skripsi*. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Werdhasari, Asri. 2014. Peran Antioksidan Bagi Kesehatan. *Jurnal Bioteknologi Medisiana Indonesia*. 3(2):59-68.
- Wikata, Thamrin., Hedi Januari, dan Muhammad Nursid. 2005. Uji Aktivitas Antioksidan, Toksisitas, dan Sitotoksisitas Ekstrak Alga Merah *Rhodymenia palmata*. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. 11(4):41-49.
- Winarno. *Kimia Pangan dan Gizi*. 2004. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.

Wanahyu, Diah Astika., Agustina Retnaningsih, dan Marisa Aprillia. 2019. Penetapan Kadar Flafonoid Pada Kulit Batang Kayu Raru (*Cotylelobium Melanoxylon P.*) dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Analisis Farmasi* 4(1):29-36

Yuslianti, Euis Reni. 2018. *Pengantar Radikal Bebas dan Antioksidan*. Yogyakarta : DEEPUBLISH.

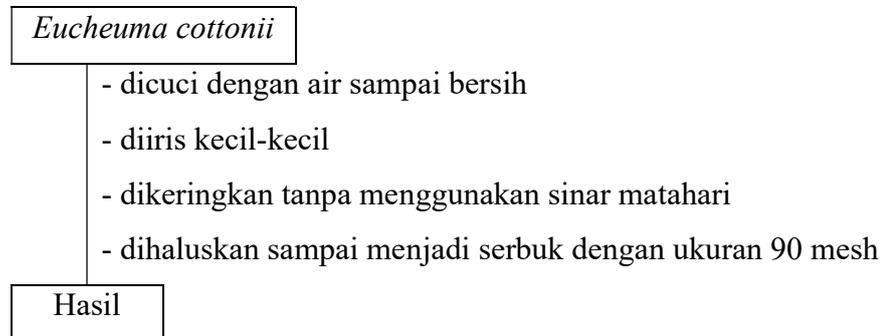
LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian

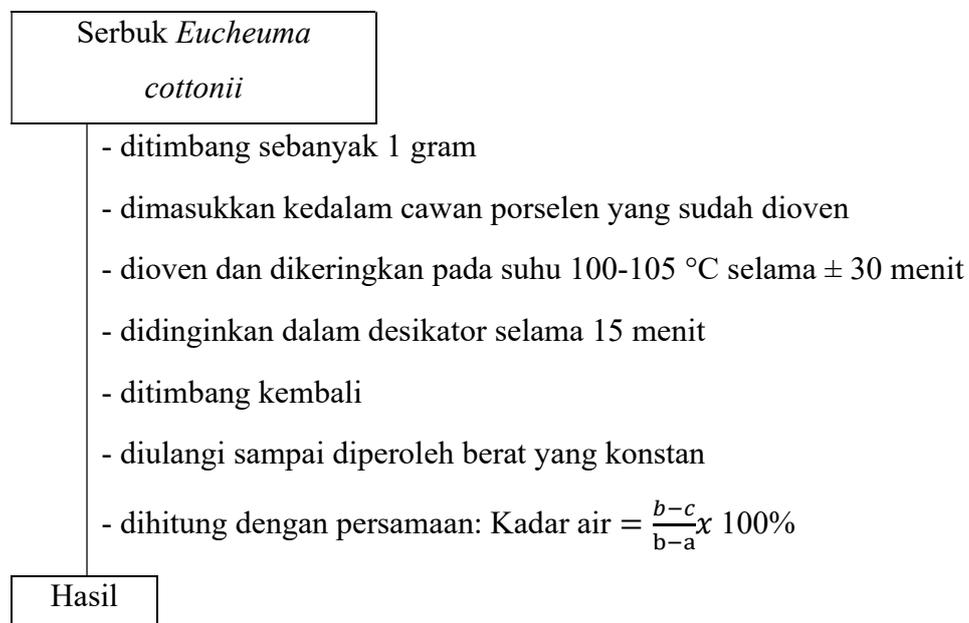


Lampiran 2. Diagram Alir

1. Preparasi Sampel

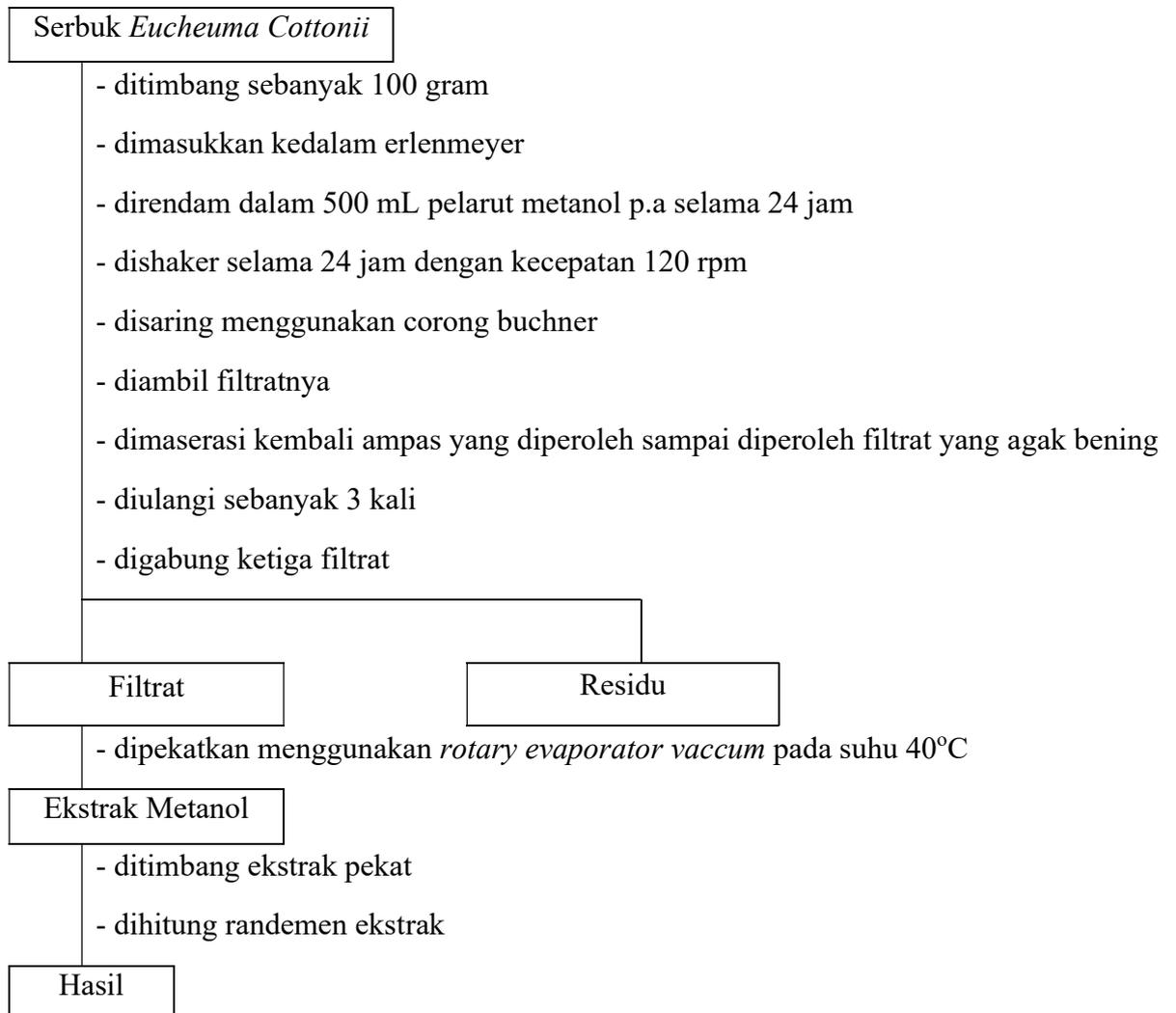


2. Analisis Kadar Air

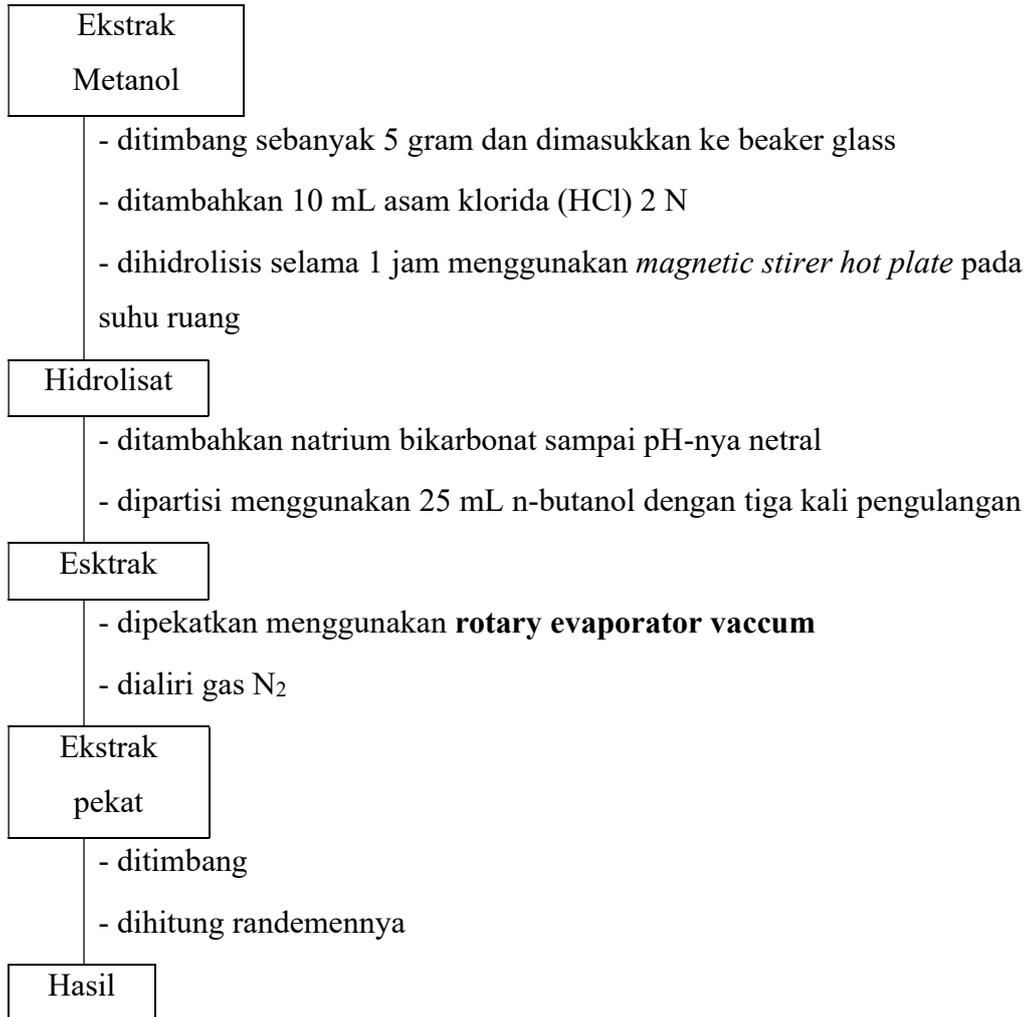


3. Ekstraksi *Eucheuma Cottonii*

3.1 Ekstraksi Maserasi



3.2 Hidrolisis dan Partisi



3.3 Pemisahan dengan metode kromatografi lapis tipis preparatif

Ekstrak pekat fraksi n-butanol

- disiapkan eluen campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17:3 dalam bejana pengembang
- dijenuhkan selama ± 1 jam
- diberi garis batas 1cm pada masing-masing sisi plat KLT
- dioven plat KLT pada suhu 100-105°C selama 30 menit
- ditotolkan fraksi n-butanol sepanjang bagasi batas bawah plat sampai habis
- dimasukkan dalam bejana pengembang berisi eluen yang telah dijenuhkan
- diamati spot noda yang terbentuk dan dikerok

Silika spot

- ditambahkan eluen n-heksana pada silika hasil KLT
- divortex dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit
- dipisahkan eluen n-heksana dan endapan silika
- dimasukkan eluen n-heksana pada botol vial dan diuapkan

Hasil

4. Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Ekstrak sampel

- dimasukkan kedalam tabung reaksi
- dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform
- ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat
- ditambahkan 1-2 mL asam sulfat pekat pada dinding tabung
- diamati warna yang terbentuk

Hasil

5. Uji Aktivitas Antioksidan Makroalga *Eucheumma Cottonii* dengan DPPH

5.1 Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Larutan DPPH 0,2
mM

- dipipet sebanyak 1mL
- ditambahkan etanol p.a sebanyak 3 mL
- didiamkan selama ± 10 menit
- dimasukkan dalam kuvet
- dicari panjang gelombang maksimum (λ_{\max})
- dicatat untuk digunakan pada tahap selanjutnya

Hasil

5.2 Pengukuran Potensi Antioksidan Sampel

Larutan stock sampel

- dilarutkan kedalam etanol p.a dengan konsentrasi berturut-turut 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm
- dipipet masing-masing sebanyak 3 mL
- ditambahkan larutan DPPH 0.2 mM sebanyak 1ml
- diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit
- diukur nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang (λ_{\max})
- dihitung data absorbansi yang didapat tiap konsentrasi ekstrak nilai (%) aktivitas antioksidan :

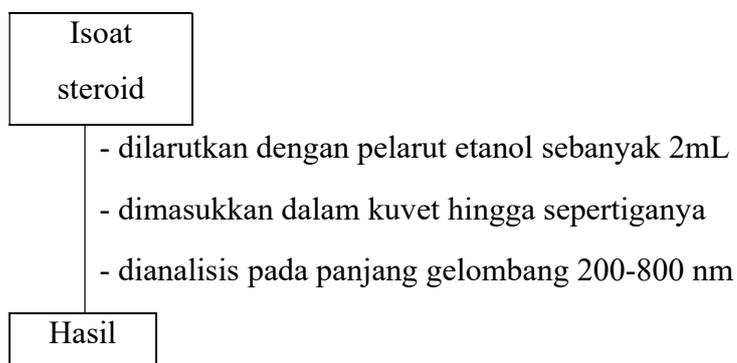
$$\text{Aktivitas antioksidan} = \frac{\text{A. Kontrol} - \text{A. sampel}}{\text{A. Kontrol}} \times 100\%$$

- Dihitung nilai IC₅₀ menggunakan program "Microsoft Exel"

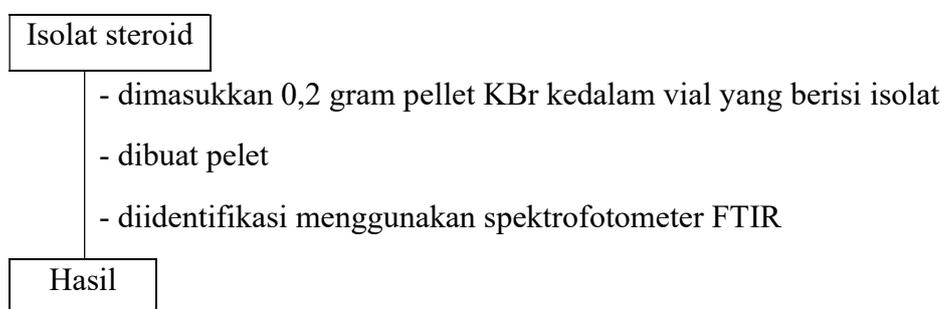
Hasil

6. Identifikasi Steroid

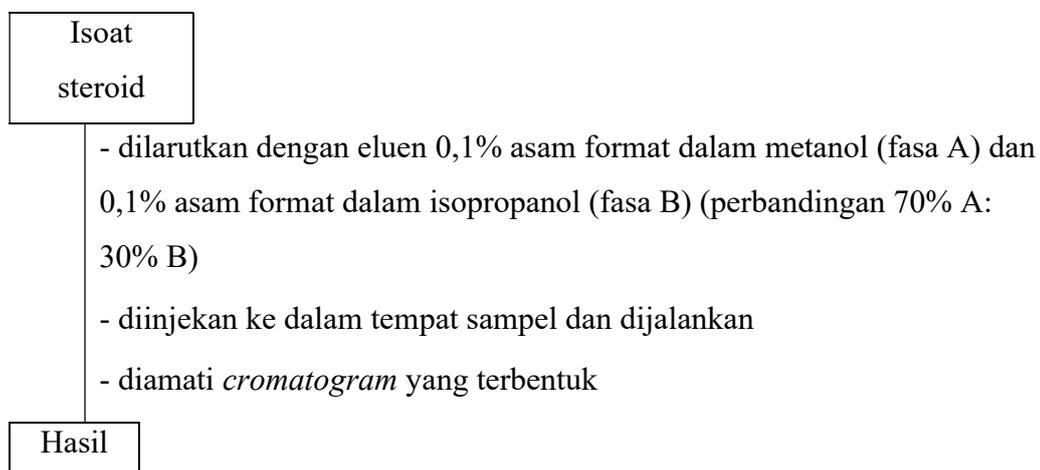
6.1 Identifikasi dengan UV-Vis



6.2 Identifikasi dengan FTIR



6.3 Identifikasi dengan LC-MS/MS



Lampiran 3. Pembuatan Reagen dan Larutan

1. Pembuatan Larutan HCl 2 N

BJ HCl pekat = 1,267 g/mL

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

BM HCl = 36,5 g/mol

$n = 1$ (jumlah mol ion H^+)

$$\text{mol} = \frac{g \text{ HCl}}{Mr \text{ HCl}} = \frac{37 \text{ g}}{36,5 \text{ g/mol}} = 1,014 \text{ mol}$$

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

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

Normalitas = $n \times$ Molaritas

$$= 1 \times 12,85 \text{ M} = 12,85 \text{ N}$$

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

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

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

Adapun prosedur pembuatannya adalah diambil larutan HCl pekat 37% sebanyak 16,5 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL yang berisi 15 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

2. Pembuatan Larutan NaHCO_3

Kelarutan NaHCO_3 sebesar 9,99 gr dalam 100 mL aquades. Sehingga untuk membuat larutan NaHCO_3 jenuh ditimbang NaHCO_3 dengan berat $> 9,99$ gr (sampai terdapat endapan padatan yang tidak larut). Lalu disaring larutan tersebut untuk memisahkan residu dan filtrat sehingga didapatkan larutan NaHCO_3 jenuh.

3. Pembuatan Reagen *Liberman-Burchard*

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

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

4. Pembuatan Eluen n-heksana : etil asetat

Dibuat eluen untuk elusi pada pemisahan dengan kromatografi kertas lapis tipis dan untuk pemisahan senyawa steroid Kromatografi Lapis Tipis Preparatif dengan perbandingan n-butanol : etil asetat dengan volume total 100 mL.

4.1 Eluen Kromatografi kertas lapis tipis

➤ 85:15

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

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

5. Pembuatan Larutan DPPH 0.2 mM 20 mL

➤ DPPH 0.2 mM dalam 20mL etanol

➤ Mr DPPH = 394,33 g/mol

➤ mmol DPPH = Volume DPPH x Mol DPPH

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

$$= 0.004 \text{ mmol}$$

➤ Berat DPPH = mmol x MrDPPH

$$= 0.004 \text{ mmol} \times 394,33 \text{ g/mol}$$

$$= 1,39732 \text{ mg}$$

$$= 0.00139732 \text{ g}$$

Cara pembuatannya adalah dengan ditimbang serbuk DPPH x mg, kemudian dilarutkan dengan etanol 20 mL dan dimasukkan kedalam labu takar 20 mL. Selanjutnya ditambahkan etanol sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

6. Pembuatan larutan stok 50 ppm dalam 20 mL pelarut

$$\text{Ppm} = \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

$$50 \text{ ppm} = \frac{\text{mg}}{0,02 \text{ L}}$$

$$\text{mg} = 1$$

Jadi untuk membuat larutan stok 50 ppm yaitu diperlukan 1 mg isolat dilarutkan dalam 20 mL etanol. Kemudian di vortex sampai homogen.

7. Pembuatan Larutan Sampel Uji Antioksidan 1,2,3,4, dan 5 ppm

➤ 1 ppm

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

$$50 \text{ ppm} \times V_1 = 1 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,1 \text{ mL}$$

$$V_1 = 100 \mu\text{L}$$

Maka cara pembuatan larutan sampel Isolat 1 ppm yaitu diambil 100 μL dari larutan stock 50 ppm kemudian dimasukkan kedalam labu takar 5 mL dan ditandabatkan dengan etanol.

➤ 2 ppm

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

$$50 \text{ ppm} \times V_1 = 2 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,2 \text{ mL}$$

$$V_1 = 200 \mu\text{L}$$

Maka cara pembuatan larutan sampel Isolat 2 ppm yaitu diambil 200 μL dari larutan stock 50 ppm kemudian dimasukkan kedalam labu takar 5 mL dan ditandabatkan dengan etanol.

➤ 3 ppm

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

$$50 \text{ ppm} \times V_1 = 3 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,3 \text{ mL}$$

$$V_1 = 300 \mu\text{L}$$

Maka cara pembuatan larutan sampel Isolat 3 ppm yaitu diambil 300 μ L dari larutan stock 50 ppm kemudian dimasukkan kedalam labu takar 5 mL dan ditandabatkan dengan etanol.

➤ 4 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm}_1 \times V_1 &= \text{ppm}_2 \times V_2 \\ 50 \text{ ppm} \times V_1 &= 4 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,4 \text{ mL} \\ V_1 &= 400 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Maka cara pembuatan larutan sampel Isolat 4 ppm yaitu diambil 400 μ L dari larutan stock 50 ppm kemudian dimasukkan kedalam labu takar 5 mL dan ditandabatkan dengan etanol.

➤ 5 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm}_1 \times V_1 &= \text{ppm}_2 \times V_2 \\ 50 \text{ ppm} \times V_1 &= 5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,5 \text{ mL} \\ V_1 &= 500 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Maka cara pembuatan larutan sampel Isolat 5 ppm yaitu diambil 500 μ L dari larutan stock 50 ppm kemudian dimasukkan kedalam labu takar 5 mL dan ditandabatkan dengan etanol.

8. Pembuatan Larutan Stock untuk Vitamin C

Pembuatan larutan stock 100 ppm untuk vitamin C

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

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

Pembuatan larutan Vitamin C aktivitas antioksidan 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm

➤ 1 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm}_1 \times V_1 &= \text{ppm}_2 \times V_2 \\ 100 \text{ ppm} \times V_1 &= 1 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,05 \text{ mL} \\ V_1 &= 50 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Maka cara pembuatan larutan vitamin C 1 ppm yaitu diambil 50 μL dari larutan stock 100 ppm kemudian dimasukkan kedalam labu takar 5 mL dan ditandabatkan dengan etanol.

➤ 2 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm}_1 \times V_1 &= \text{ppm}_2 \times V_2 \\ 100 \text{ ppm} \times V_1 &= 2 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,1 \text{ mL} \\ V_1 &= 100 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Maka cara pembuatan larutan vitamin C 2 ppm yaitu diambil 100 μL dari larutan stock 100 ppm kemudian dimasukkan kedalam labu takar 5 mL dan ditandabatkan dengan etanol.

➤ 3 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm}_1 \times V_1 &= \text{ppm}_2 \times V_2 \\ 100 \text{ ppm} \times V_1 &= 3 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,15 \text{ mL} \\ V_1 &= 150 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Maka cara pembuatan larutan vitamin C 3 ppm yaitu diambil 150 μL dari larutan stock 100 ppm kemudian dimasukkan kedalam labu takar 5 mL dan ditandabatkan dengan etanol.

➤ 4 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm}_1 \times V_1 &= \text{ppm}_2 \times V_2 \\ 100 \text{ ppm} \times V_1 &= 4 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,2 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$V_1 = 200 \mu\text{L}$$

Maka cara pembuatan larutan vitamin C 4 ppm yaitu diambil 300 μL dari larutan stock 100 ppm kemudian dimasukkan kedalam labu takar 5 mL dan ditandabatkan dengan etanol.

➤ 5 ppm

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

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

$$V_1 = 0,25 \text{ mL}$$

$$V_1 = 250 \mu\text{L}$$

Maka cara pembuatan larutan vitamin C 5 ppm yaitu diambil 250 μL dari larutan stock 100 ppm kemudian dimasukkan kedalam labu takar 5 mL dan ditandabatkan dengan etanol.

Lampiran 4. Data Pengamatan dan Perhitungan

L.4.1 Data pengukuran Kadar Air

Berat cawan kosong sebelum ditambahkan serbuk *Eucheuma Cottonii*.

Ulangan Cawan	Ulangan Cawan				Berat Konstan (g)
	Sebelum Dioven	U1	U2	U3	
C1	71.9238	71.9315	71.9310	71.9250	71.9295
C2	71.0774	71.0752	71.0700	71.0752	71.0741
C3	72.2856	72.2847	72.2862	72.2846	72.2843

Keterangan: C=Cawan, U=Ulangan

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

Ulangan Cawan	Ulangan Cawan				Berat Konstan (g)
	Sebelum Dioven	U1	U2	U3	
C1	72.9295	72.8298	72.8315	72.8390	72.8388
C2	72.0731	71.9937	71.9172	71.8116	71.9806
C3	73.2843	73.1953	73.2017	73.1992	73.1941

Keterangan: C=Cawan, U=Ulangan

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

1 Kadar air cawan ke-1

$$\begin{aligned} \text{Kadar Air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\ &= \frac{72,9295-72,8388}{72,9295-71,9295} \times 100\% \\ &= 9,07\% \end{aligned}$$

2 Kadar air cawan ke-2

$$\begin{aligned} \text{Kadar Air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\ &= \frac{72,0471-71,9806}{72,0741-71,0741} \times 100\% \\ &= 9,35\% \end{aligned}$$

3 Kadar air cawan ke-3

$$\text{Kadar Air} = \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan+sampel setelah dioven})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dioven})-(\text{berat cawan kosong})} \times 100\%$$

$$= \frac{73,2843-73,1941}{73,2843 -72,2843} \times 100\%$$

$$= 9,02\%$$

Kadar air kering rata-rata pada sampel *Euceuma Cottonii* adalah 9,14%

L.4.2 Perhitungan Randemen dan Data

L.4.2.1 Ekstrak Metanol

Berat Sampel (g)	Berat Wadah (g)	Berat Wadah + ekstrak pekat (g)	Berat Ekstak Pekat (g)	Randemen (%)
100	141,8273	127,2658	14,5615	14,5615

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

$$= \frac{14,5615}{100} \times 100\%$$

$$= 14,5615 \%$$

L.4.2.2 Hasil Partisi

Berat Sampel (g)	Berat Wadah (g)	Berat Wadah + ekstrak pekat (g)	Berat Ekstak Pekat (g)	Randemen (%)
5	62,7998	64,1980	0,8297	16,5940

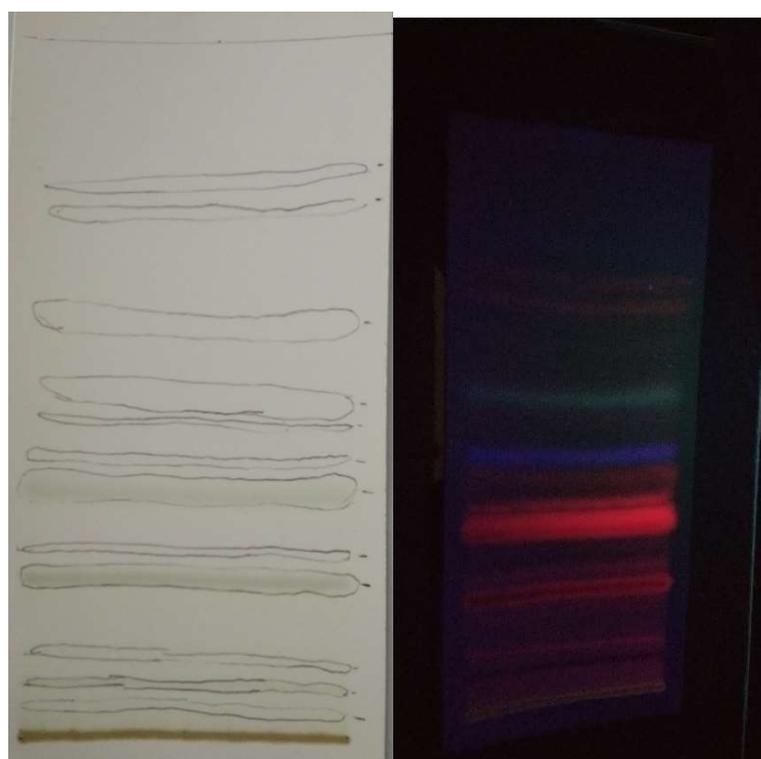
$$\text{Randemen} = \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,8297}{5} \times 100\%$$

$$= 16,5940 \%$$

Lampiran 5. Hasil KLTP

No	Warna UV366nm	Dugaan Senyawa	Jarak Senyawa (cm)	Jarak Elusi (cm)	Rf
1	Merah	Triterpenoid	0,9	18	0,05
2	Merah	Triterpenoid	1,4	18	0,0778
3	Merah	Triterpenoid	2,1	18	0,1167
4	Merah	Triterpenoid	4,2	18	0,2333
5	Merah	Triterpenoid	4,7	18	0,2611
6	Merah	Triterpenoid	6,4	18	0,3556
7	Merah	Triterpenoid	7	18	0,3889
8	Merah	Triterpenoid	7,9	18	0,4389
9	Biru	Steroid	8,9	18	0,4944
10	Hijau	Steroid	10,7	18	0,5944
11	Merah	Triterpenoid	13,5	18	0,75
12	Merah	Triterpenoid	14,4	18	0,8



1.1 Perhitungan Nilai Rf Hasil KLTP dan randemen tunggal dan campuran

1.1.1 Perhitungan Nilai Rf

Nilai Rf isolat steroid dapat dihitung menggunakan rumus dibawah ini:

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

$$\begin{aligned} Rf &= \frac{0,9}{18} \\ &= 0,05 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rf} &= \frac{1,4}{18} \\ &= 0,0778 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rf} &= \frac{2,1}{18} \\ &= 0,1167 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rf} &= \frac{4,2}{18} \\ &= 0,2333 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rf} &= \frac{4,7}{18} \\ &= 0,2611 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rf} &= \frac{6,4}{18} \\ &= 0,3556 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rf} &= \frac{7}{18} \\ &= 0,3889 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rf} &= \frac{7,9}{18} \\ &= 0,4389 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rf} &= \frac{8,9}{18} \\ &= 0,4944 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rf} &= \frac{10,7}{18} \\ &= 0,5944 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rf} &= \frac{13,5}{18} \\ &= 0,75 \end{aligned}$$

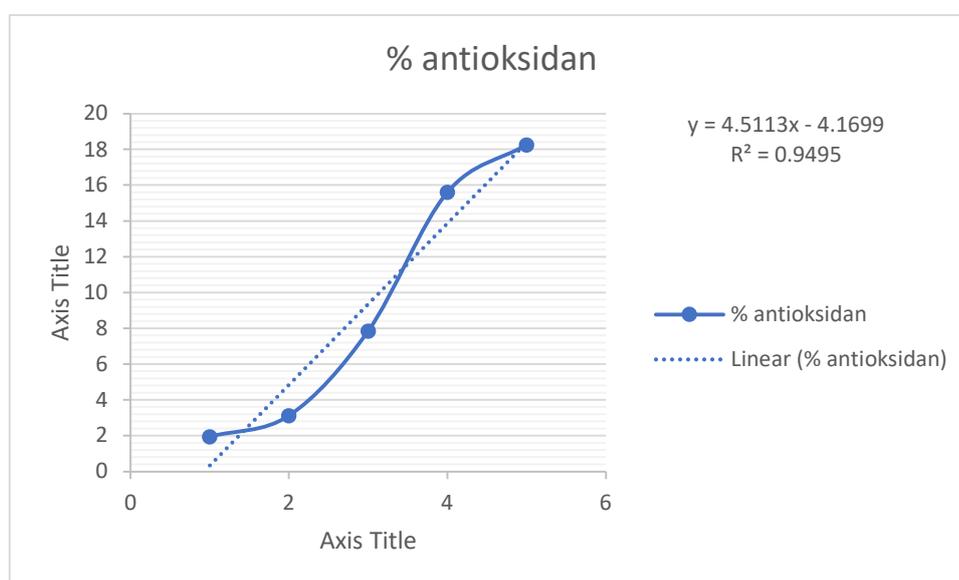
$$\begin{aligned} \text{Rf} &= \frac{14,4}{18} \\ &= 0,8 \end{aligned}$$

Lampiran 6. Pengujian Aktivitas Antioksidan

L.6.1 Pengujian antioksidan Isolat steroid 9

Konsentrasi Isolat (ppm)	Absorbansi kontrol	Absorbansi Sampel	% Aktivitas Antioksidan
1	0.3490	0.3422	1,94
2	0.3490	0.3380	3,13
3	0.3672	0.3443	7,86
4	0.3900	0.3266	15,61
5	0.3900	0.3140	18,26

Hasil perhitungan IC_{50} berdasarkan Microsoft Excel



$$y = ax + b$$

$$y = 50$$

$$a = 4,5113$$

$$b = (-4,1699)$$

$$IC_{50} = x$$

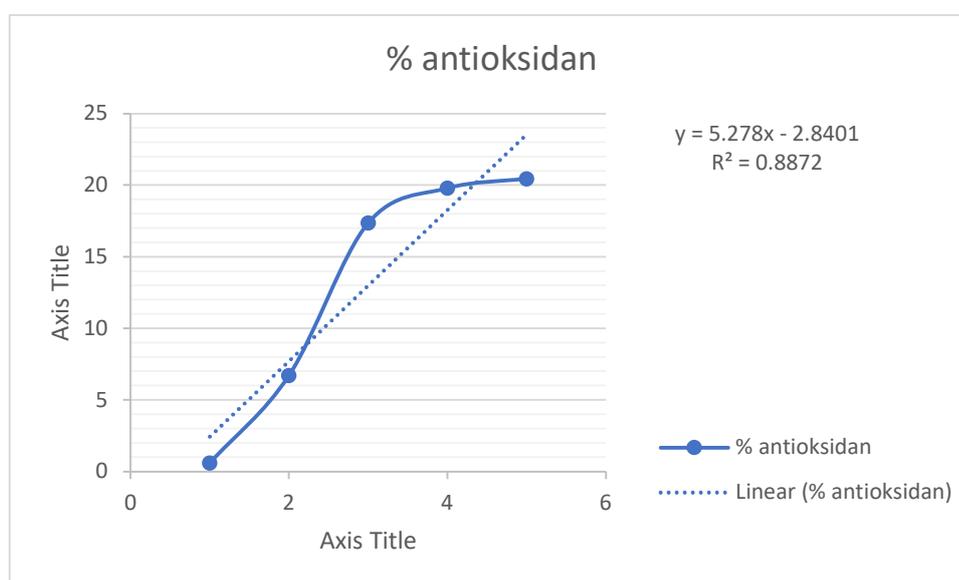
$$IC_{50} = (50 - (-4,1699)) / 4,5113$$

$$IC_{50} = 12,0076 \text{ ppm}$$

L.6.2 Pengujian antioksidan Isolat Steroid 10

Konsentrasi Isolat (ppm)	Absorbansi kontrol	Absorbansi Sampel	% Aktivitas Antioksidan
1	0.8258	0.8188	0,61
2	0.4459	0.4298	6,73
3	0.3663	0.3420	17,37
4	0.3672	0.3370	19,80
5	0.3863	0.3073	20,46

Hasil perhitungan IC_{50} berdasarkan Microsoft Excel



$$y = ax + b$$

$$y = 50$$

$$a = 5,218$$

$$b = (-2,8401)$$

$$IC_{50} = x$$

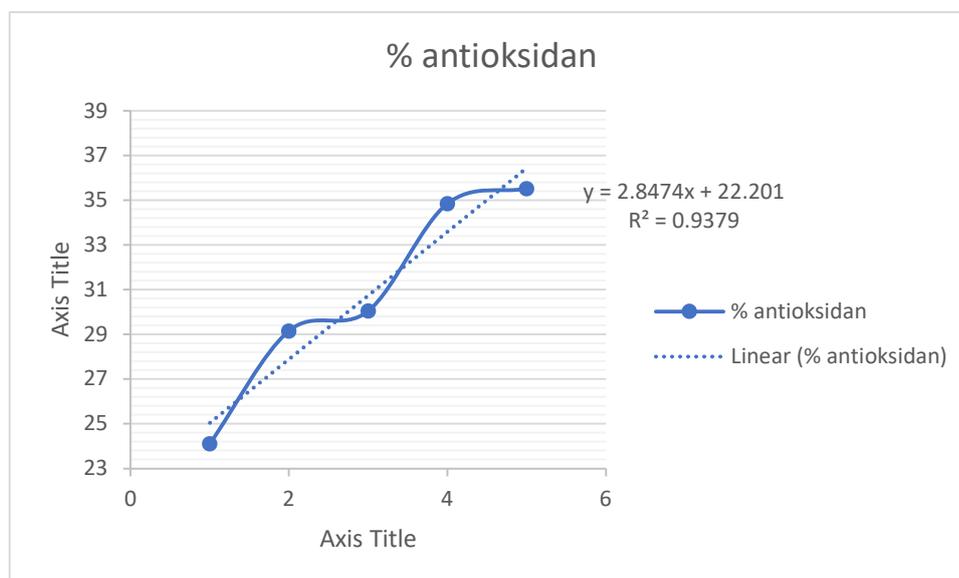
$$IC_{50} = (50 - (-2,8401)) / 5,218$$

$$IC_{50} = 8,9351 \text{ ppm}$$

L.6.3 Pengujian antioksidan Vitamin C

Konsentrasi Isolat (ppm)	Absorbansi kontrol	Absorbansi Sampel	% Aktivitas Antioksidan
1	0.6255	0.4746	24,12
2	0.7917	0.5608	29,17
3	0.7905	0.5529	30,06
4	0.7839	0.5107	34,85
5	0.7836	0.5105	35,52

Hasil perhitungan IC_{50} berdasarkan Microsoft Excel



$$y = ax + b$$

$$y = 50$$

$$a = 2,8474$$

$$b = 22,201$$

$$IC_{50} = x$$

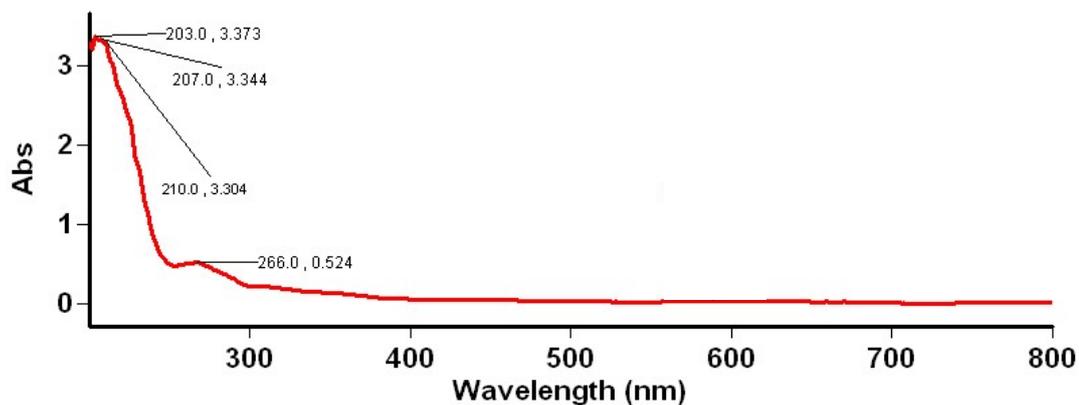
$$IC_{50} = (50-22,201)/2,8474$$

$$IC_{50} = 9,7636 \text{ ppm}$$

Lampiran 7. Hasil Identifikasi menggunakan Uv-Vis

L.7.1 Hasil Identifikasi menggunakan UV-Vis Isolat 9

Lamdba Maks Isolat 9 Steroid (29-09-2021)



Scan Analysis Report

Report Time : Wed 29 Sep 01:41:38 PM 2021

Method:

Batch: D:\Mahasiswa On Going\Fatimah Ratna\Lamdba Maks Isolat 9 Steroid (29-09-2021).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: Isolat 9 Steroid

Collection Time

9/29/2021 1:42:03 PM

Peak Table

Peak Style

Peaks

Peak Threshold

0.0100

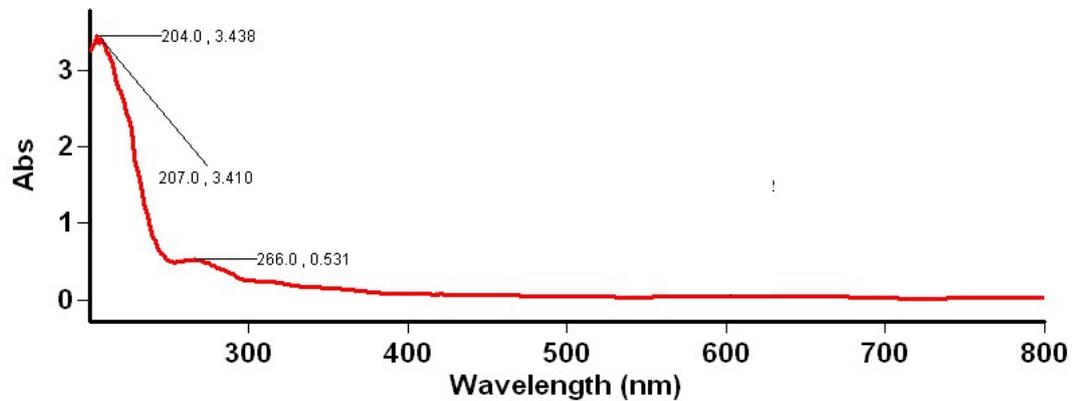
Range

800.0nm to 200.1nm

Wavelength (nm)	Abs
266.0	0.524
210.0	3.304
207.0	3.344
203.0	3.373

L.7.1 Hasil Identifikasi menggunakan UV-Vis Isolat 10

Lamdba Maks Isolat 10 Steroid (29-09-2021)



Scan Analysis Report

Report Time : Wed 29 Sep 01:44:31 PM 2021

Method:

Batch: D:\Mahasiswa On Going\Fatimah Ratna\Lamdba Maks Isolat 10 Steroid (29-09-2021).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: Isolat 10 Steroid

Collection Time 9/29/2021 1:44:36 PM

Peak Table

Peak Style

Peak Threshold

Range

Peaks

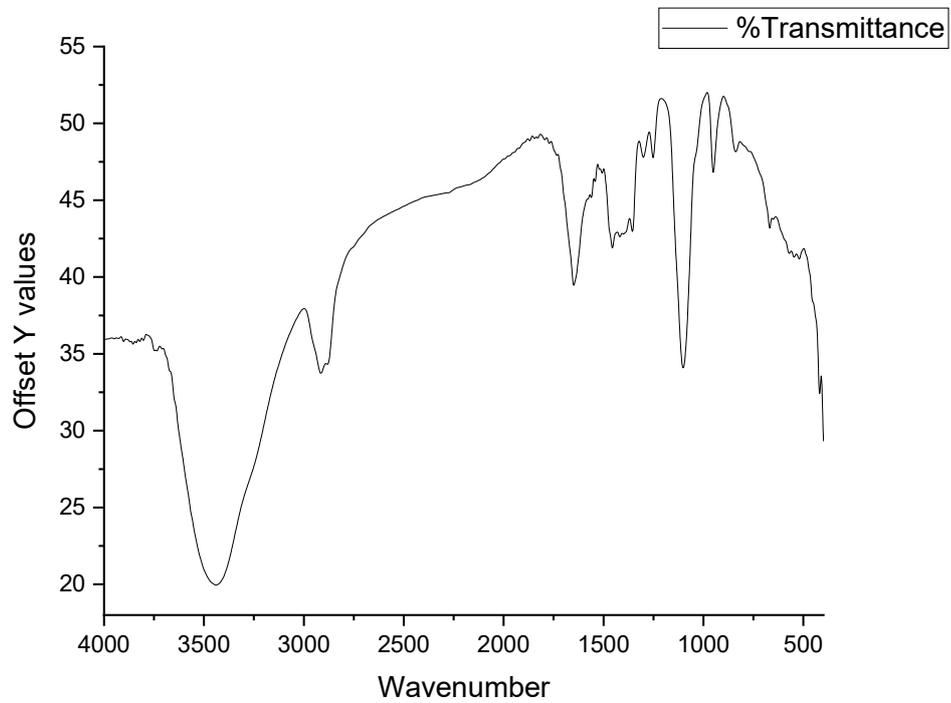
0.0100

800.0nm to 200.1nm

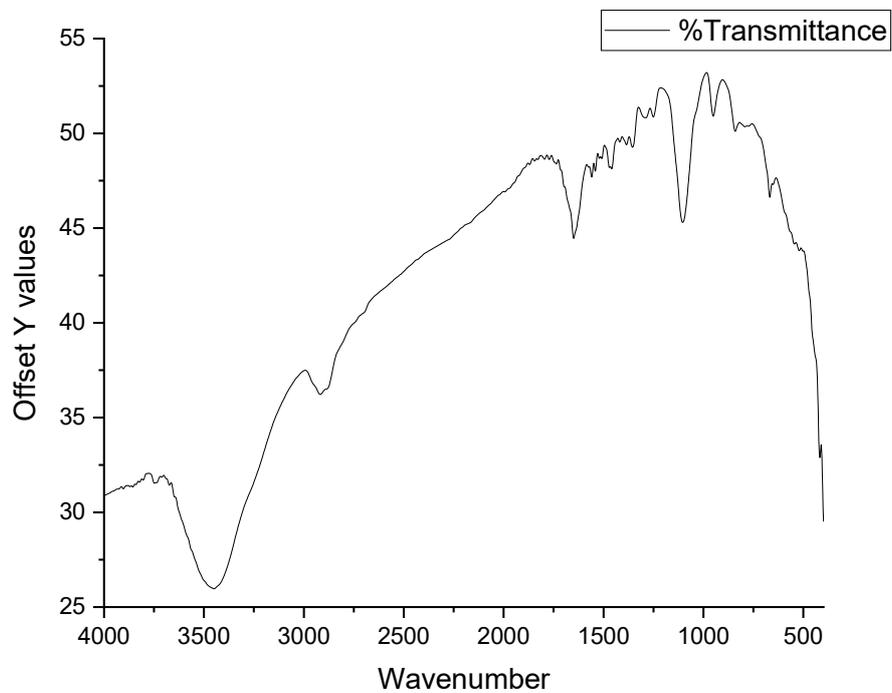
Wavelength (nm)	Abs
266.0	0.531
207.0	3.410
204.0	3.438

Lampiran 8. Hasil Identifikasi menggunakan FTIR

L.8.1 Hasil Identifikasi menggunakan FTIR Isolat 9

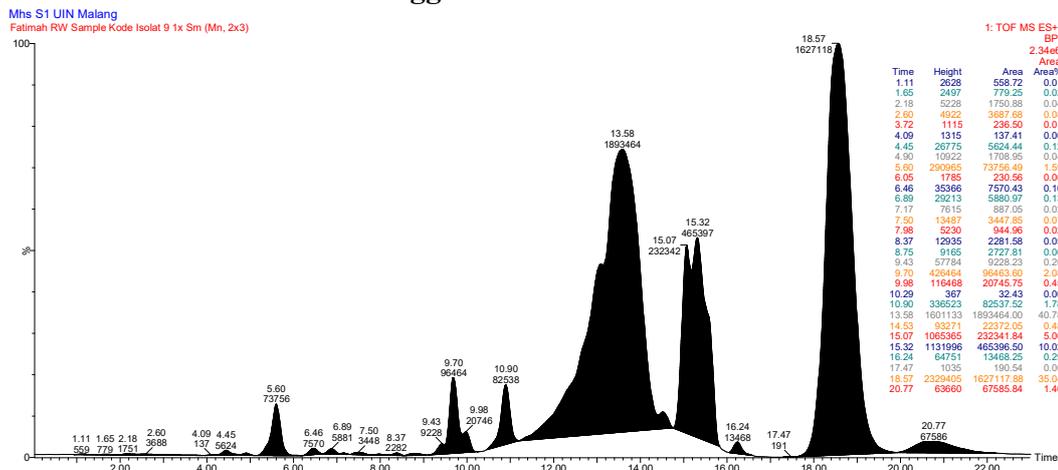


L.8.2 Hasil Identifikasi menggunakan FTIR Isolat 10



Lampiran 9. Hasil Identifikasi menggunakan LC-MS/MS

L.9.1 Hasil Identifikasi menggunakan LC-MS/MS Isolat 10

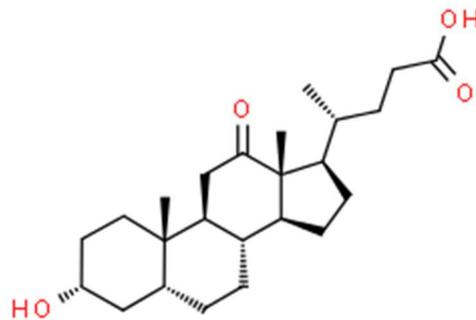
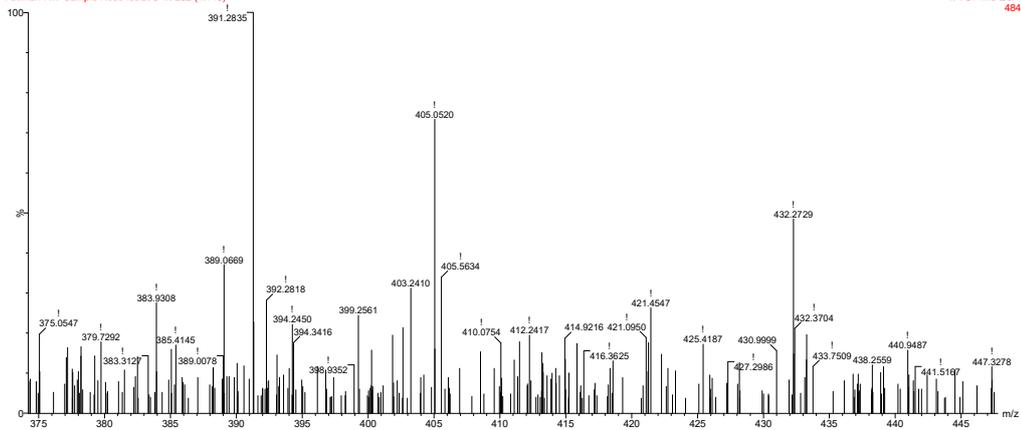


RT	Persen Area	Measured mass (m/z)	Calculate Mass (m/z)	Rumus Senyawa	Dugaan Senyawa
4,445	0,12	391,2835	391,2848	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	“12-Dehydrodeoxycholic acid” 3-Hydroxy-12-oxocholan-24-oic acid
6,463	0,16	367,2678	367,2637	C ₂₅ H ₃₄ O ₂	“QUINGESTANOL” Norethisterone 3-cyclopentyl enol ether; 3-(Cyclopentyloxy)-17 α -ethynylestra-3,5-dien-17 β -ol
10,898	1,78	415,2113	415,2121	C ₂₅ H ₃₀ O ₆	“Eplerenon” 9,11-Epoxy-7-(methoxycarbonyl)-3-oxo-17-pregn-4-ene-21,17-carbolactone
15,342	10,04	389,2248	389,2273	C ₂₅ H ₃₁ O ₃	“Nandrolone benzoat” 17beta-Hydroxyestr-4-en-3-one

RT 4,445

Mhs S1 UIN Malang

Fatimah RW Sample Kode Isolat 9 1x 202 (4.445)

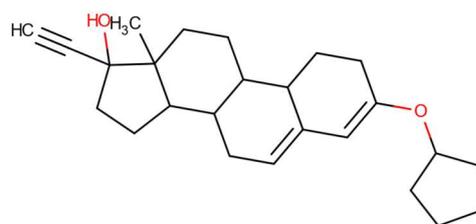
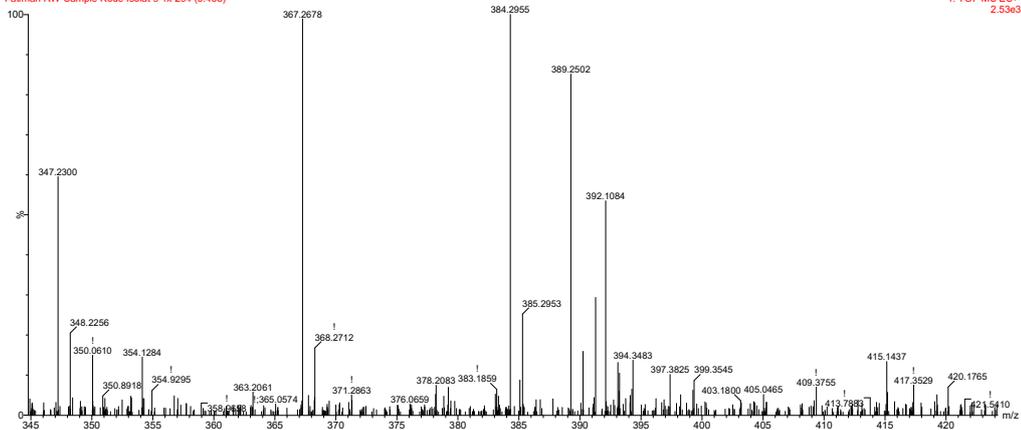
1: TOF MS ES+
484

12-Dehydrodeoxycholic acid

RT 6,463

Mhs S1 UIN Malang

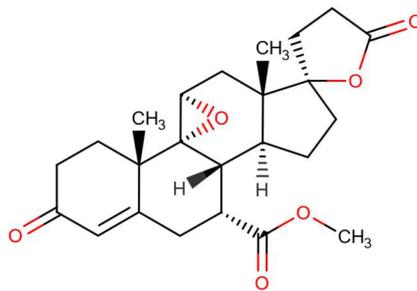
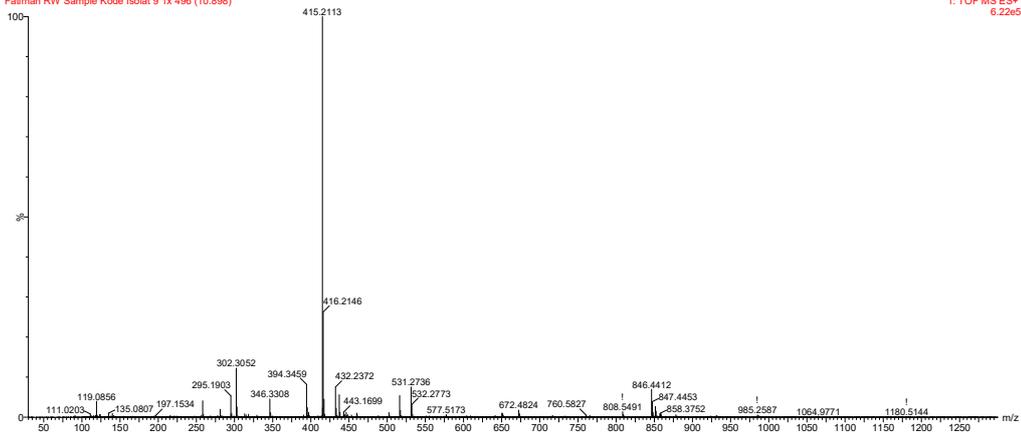
Fatimah RW Sample Kode Isolat 9 1x 294 (6.463)

1: TOF MS ES+
2.53e35-(cyclopentyloxy)-14-ethynyl-15-methyltetracyclo[8.7.0.0^{2,7}.0^{11,15}]heptadeca-5,7-dien-14-ol

RT 10,898

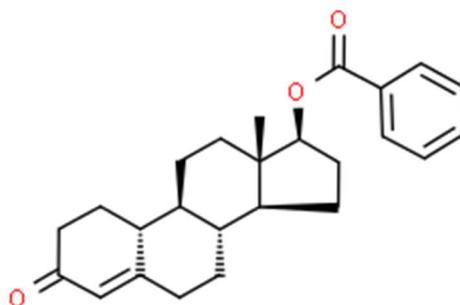
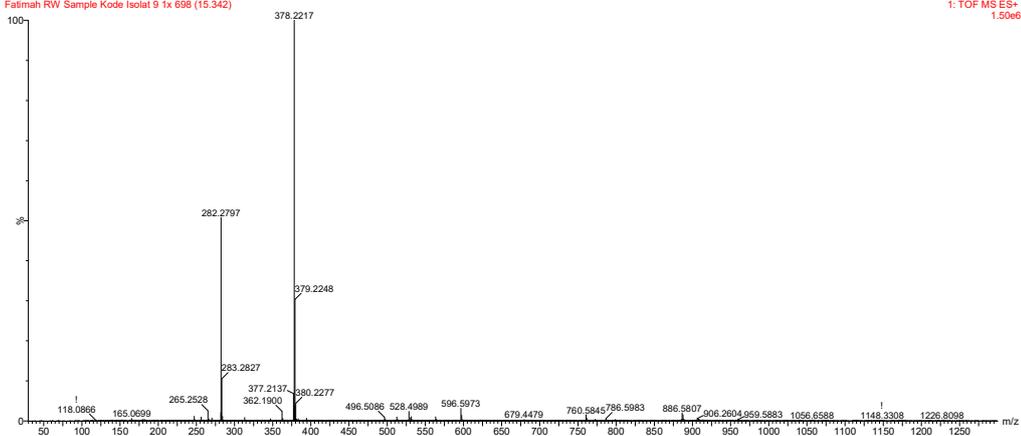
Mhs S1 UIN Malang

Fatimah RW Sample Kode Isolat 9 1x 496 (10.898)

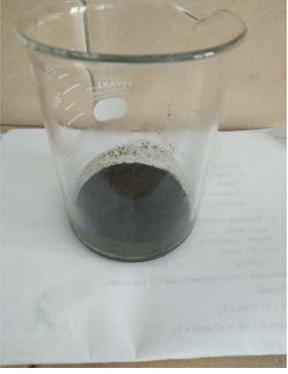
1: TOF MS ES+
6.22e5**Eplerenone****RT 15,342**

Mhs S1 UIN Malang

Fatimah RW Sample Kode Isolat 9 1x 698 (15.342)

1: TOF MS ES+
1.50e6**Nandlore benzoat (Steroid Ester)**

Lampiran 10. Dokumen Penelitian

 <p>Pengoven an Cawan Kosong + sampel</p>	 <p>Desikator Cawan + sampel</p>
 <p>Filtrat Hasil Maserai 1</p>	 <p>Filtrat Hasil Maserasi 2</p>
 <p>Filtrat Hasil Maserasi 3</p>	
 <p>Hasil Filtrat Ektrak Maserasi hasil Rotary Evaporator</p>	 <p>Proses Hidrolisis</p>

 <p>Partisi ke 1</p>	 <p>Partisi Ke 2</p>
 <p>Partisi ke 3</p>	 <p>Uji Fitokimia isolat steroid dan triterpenoid</p>
 <p>Rotary Evaporator</p>	 <p>Plat A di Panjang gelombang 254nm</p>
 <p>Hasil Pengerusan Plat KLTP</p>	 <p>Hasil Vortex silika Plat KLTP</p>



Uji Antioksidan



Isolat Steroid sebelum inkubasi



Isolat Steroid akan diinkubasi