

**UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KLTP FRAKSI  
PETROLEUM ETER HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL ALGA  
MERAH (*Eucheuma spinosum*)**

SKRIPSI

Oleh :  
**LAILI NUR AZIZAH**  
NIM. 12630002



**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2016**

**UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KLTP FRAKSI  
PETROLEUM ETHER HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL ALGA  
MERAH (*Eucheuma spinosum*)**

**SKRIPSI**

Oleh :  
**LAILI NUR AZIZAH**  
NIM. 12630002

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

**JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
2016**

**UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KLTP FRAKSI  
PETROLEUM ETER HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL ALGA  
MERAH (*Eucheuma spinosum*)**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**LAILI NUR AZIZAH**  
NIM. 12630002

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:  
Tanggal: 15 September 2016

**Pembimbing I**

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

**Pembimbing II**

  
**Umairatus Syarifah, M.A**  
NIP. 19820925 200901 2 005

**Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia**

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

UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KLT.P FRAKSI  
PETROLEUM ETHER HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL ALGA  
MERAH (*Eucheuma spinosum*)

SKRIPSI

Oleh:  
LAILI NUR AZIZAH  
NIM. 12630002

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 15 September 2016

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

( ..... )

Ketua Penguji : A. Hanapi, M.Sc  
NIDT. 19851225 20160801 1 069

( ..... )

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

( ..... )

Anggota Penguji : Umayyatus Syarifah, M.A  
NIP. 19820925 200901 2 005

( ..... )

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia



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

**SURAT PERNYATAAN  
ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Laili Nur Azizah

NIM : 12630002

Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia

Judul Penelitian : Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter  
Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma  
spinosum*)

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

Apabila ternyata hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggung jawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 15 September 2016

Yang Membuat Pernyataan,



  
Laili Nur Azizah  
NIM. 12630002

## KATA PENGANTAR

*Assalamualaikum wa Rahmatullahi wa Barakatuh*

Puji Syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada panulis atas terselesainya skripsi dengan judul “**Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*)**”. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada junjungan kita, Nabi Muhammad SAW yang telah membimbing kita kejalan yang benar, yaitu jalan yang diridhai Allah SWT. Skripsi ini merupakan salah satu studi yang harus ditempuh untuk syarat menyelesaikan program S-1 (strata-1) di Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

Penulisan laporan ini tidak luput dari bantuan semua pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, penulis menghaturkan terimakasih yang sedalam-dalamnya kepada:

1. Bapak Prof. H. Mudjia Raharjo, M.Si., selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. Drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si., selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si., selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si dan Ibu Umayyatus Syarifah, M.A selaku pembimbing dan Bapak A.Hanapi Selaku konsultan Terimakasih atas bimbingannya sampei terselesainya skripsi.

5. Seluruh dosen jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu pengetahuan, wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
6. Teman-teman seperjuangan yang melakukan penelitian organik bahan alam terimakasih telah menjadi teman saat menjalani penelitian
7. Rekan-rekan Jurusan Kimia angkatan 2012 kimia A khususnya dan semua mahasiswa Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah berjuang bersama sama, yang memberikan motivasi, informasi, dan masukan terhadap penulis.
8. Semua rekan-rekan dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala bantuan dan motivasinya kepada penulis.

Semoga amal perbuatan Bapak/Ibu serta semua pihak yang membantu dalam proses penyelesaian skripsi diridloi Allah SWT dan dicatat sebagai amal sholeh Bapak/Ibu/Saudara sekalian.

Penulis menyadari adanya kekurangan dan keterbatasan dalam skripsi ini. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat mendukung dari semua pihak demi penyempurnaan laporan PKL ini. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua, yaitu bagi penulis pada khususnya dan bagi para pembaca umumnya.

Amiin.

*Wassalamualaikum wa Rahmatullahi wa Barakatuh.*

Malang, 2016

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN .....</b>	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>xii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar belakang .....	1
1.2 Rumusan masalah .....	6
1.3 Tujuan.....	6
1.4 Batasan masalah.....	6
1.5 Manfaat penelitian .....	7
<b>BAB II KAJIAN PUSTAKA .....</b>	<b>8</b>
2.1 Alga merah <i>Eucheuma spinosum</i> .....	8
2.2 Senyawa steroid .....	10
2.3 Isolasi senyawa steroid .....	12
2.3.1 Ekstraksi senyawa steroid .....	12
2.3.2 Hidrolisis dan partisi .....	14
2.3.3 Isolasi senyawa steroid dengan kromatografi lapis tipis Preparative .....	16
2.4 Uji toksisitas metode BSLT ( <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> ).....	19
2.4.1 Larva Udang <i>Artemia Salina Leach</i> .....	20
2.4.2 Klasifikasi <i>Artemia Salina Leach</i> .....	23
2.5 Analisa probit.....	23
2.6 Identifikasi senyawa steroid dengan menggunakan FTIR.....	24
2.7 <i>Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry</i> (LC-MS) .....	26
2.7.1 Penggabungan MS dengan metode <i>Liquid chromatography</i> .....	30
2.7.2 Identifikasi senyawa steroid dengan MS .....	30
<b>BAB III METODOLOGI .....</b>	<b>33</b>
3.1 Lokasi dan waktu penelitian .....	33
3.2 Alat dan bahan .....	33
3.2.1 Alat.....	33
3.2.2 Bahan .....	33
3.3 Rancangan penelitian.....	33
3.4 Tahapan penelitian.....	34
3.5 Cara kerja.....	35
3.5.1 Preparasi sampel .....	35
3.5.2 Penentuan kadar air secara thermografimetri .....	35
3.5.3 Uji kadar garam .....	36

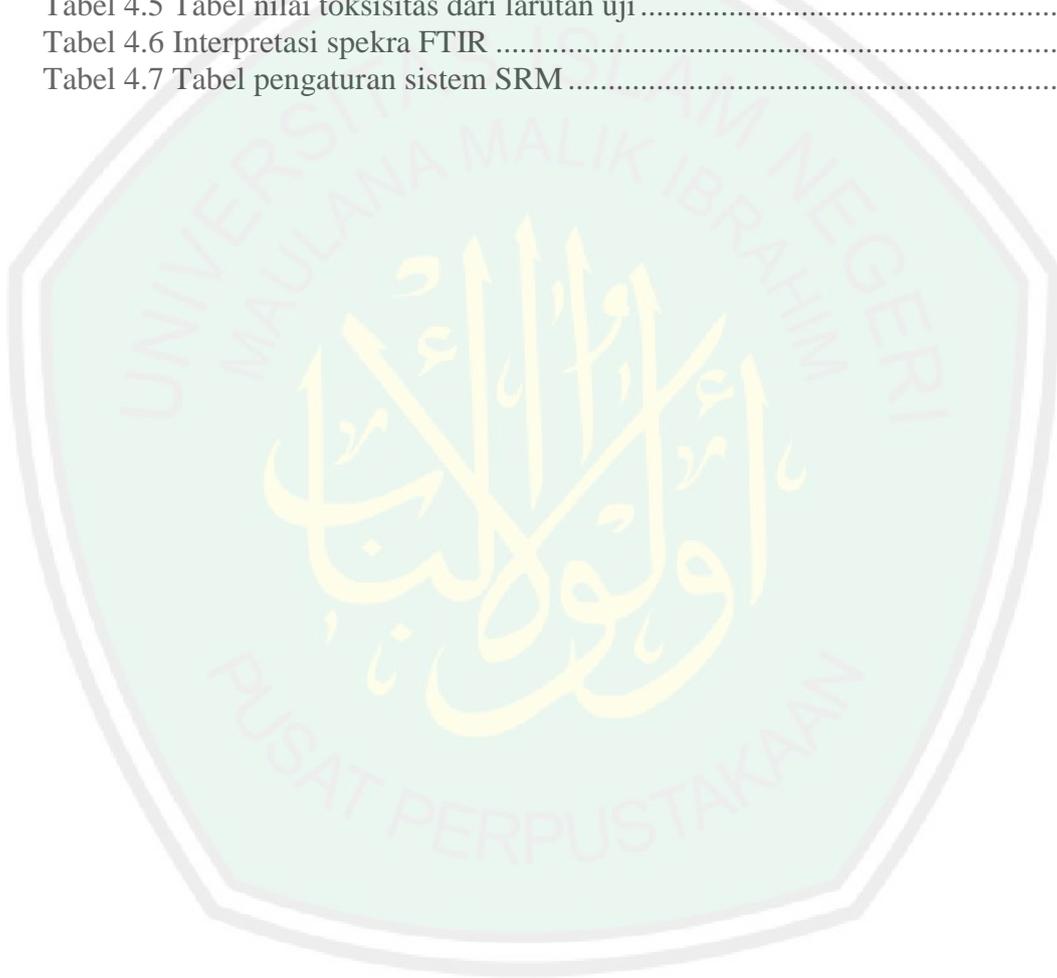
3.5.4 Ekstraksi sampel .....	36
3.5.5 Hidrolisis dan ekstraksi cair cair (partisi) ekstrak pekat Metanol.....	37
3.5.6 Uji Fitokimia senyawa steroid.....	37
3.5.7 Pemisahan senyawa steroid fraksi petroleum eter ekstrak metanol alga merah menggunakan KLT analitik .....	38
3.5.8 Pemisahan senyawa steroid fraksi petroleum eter ekstrak metanol alga merah menggunakan eluen terbaik menggunakan KLT preparatif .....	38
3.5.9 Uji Toksisitas.....	39
3.5.9.1 Penetasan telur.....	39
3.5.9.2 Uji Toksisitas.....	39
3.5.10 identifikasi menggunakan FTIR .....	40
3.5.11 Identifikasi dengan LC-MS .....	40
3.6 Analisis data.....	41
<b>BAB IV PEMBAHASAN.....</b>	<b>42</b>
4.1 Preparasi sampel .....	42
4.2 Analisis kadar air .....	43
4.3 Analisis kadar garam .....	44
4.4 Ekstraksi maserasi .....	45
4.5 Hidrolisis dan Partisi .....	47
4.6 Uji fitokimia senyawa steroid.....	48
4.7 Pemisahan senyawa steroid fraksi petroleum eter ekstrak metanol alga merah <i>Eucheuma spinosum</i> menggunakan KLTA.....	50
4.8 Pemisahan senyawa steroid fraksi petroleum eter ekstrak metanol alga merah <i>Eucheuma spinosum</i> menggunakan Kromatografi lapis tipis preparative.....	53
4.9 Uji toksisitas .....	54
4.10 Identifikasi senyawa steroid menggunakan FTIR .....	59
4.10 Identifikasi senyawa steroid menggunakan LC-MS.....	64
4.11 Pemanfaatan rumput laut dalam perspektif islam .....	67
<b>BAB V PENUTUP.....</b>	<b>71</b>
5.1 Saran .....	71
5.2 Kesimpulan.....	71
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>72</b>
LAMPIRAN .....	77

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Alga merah ( <i>Eucheuma spinosum</i> ) .....	9
Gambar 2.2 Struktur inti senyawa steroid.....	10
Gambar 2.3 Gambar reaksi Liebermann-Buchard dengan steroid.....	12
Gambar 2.4 Dugaan reaksi hidrolisis glikosida .....	15
Gambar 2.5 Identifikasi senyawa steroid dari minyak zaitun menunjukkan adanya senyawa <i>erythrodiol</i> dan <i>uvaol</i> <i>m/z</i> 395,30 (A), <i>cholesterol</i> <i>m/z</i> 369,20 dan <i>fucosterol</i> <i>m/z</i> 395,30 (B), <i>stigmasterol</i> <i>m/z</i> 395,30 (C), $\beta$ <i>sitosterol</i> <i>m/z</i> 397,30 (D), <i>sitostanol</i> <i>m/z</i> 397,30 (E) .....	31
Gambar 2.9 Hasil identifikasi senyawa steroid dari minyak goreng yang diidentifikasi menggunakan APCI positif mode LC-MS .....	32
Gambar 4.1 Reaksi hidrolisis glikosida dan reaksi penetralan .....	48
Gambar 4.2 Profil kromatografi lapis tipis analitik (KLTA) fraksi petroleum eter ekstrak metanol dari alga merah ( <i>Eucheuma spinosum</i> ) .....	51
Gambar 4.3 Pola spektra FTIR isolat 5 .....	60
Gambar 4.4 Pola spektra FTIR isolat 6.....	61
Gambar 4.5 Pola spektra FTIR isolat 7 .....	62
Gambar 4.6 Hasil identifikasi LC-MS isolat steroid.....	66

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Hasil KLTP fraksi petroleum eter ekstrak metanol menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (17:3) .....	19
Tabel 2.2 Pita serapan IR senyawa steroid dari spons <i>Biemna triraphis</i> .....	26
Tabel 4.1 Kadar air yang terkandung dalam alga merah <i>Eucheuma spinosum</i> ....	44
Tabel 4.2 Tabel hasil identifikasi menggunakan pereaksi Liebermann-Buchard .	52
Tabel 4.3 Hasil kromatografi lapis tipis preparatif fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah .....	53
Tabel 4.4 Tabel hasil pengamatan kematian larva udang .....	56
Tabel 4.5 Tabel nilai toksisitas dari larutan uji .....	57
Tabel 4.6 Interpretasi spektra FTIR .....	63
Tabel 4.7 Tabel pengaturan sistem SRM .....	66



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan penelitian.....	77
Lampiran 2. Skema kerja .....	78
Lampiran 3. Perhitungan dan pembuatan larutan .....	84
Lampiran 4. Perhitungan kadar air.....	87
Lampiran 5. Perhitungan kadar garam .....	90
Lampiran 6. Perhitungan rendemen .....	91
Lampiran 7. Hasil KLTA dan perhitungan Rf .....	92
Lampiran 8. Hasil KLTP dan perhitungan Rf.....	93
Lampiran 9. Data dan perhitungan hasil uji toksisitas .....	94
Lampiran 10. Gambar .....	107



## ABSTRAK

Azizah, L.N. 2016. **Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*)**. Skripsi. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si. Pembimbing II: Umayyatus Syarifah, M. A.

**Kata Kunci:** Alga merah (*Eucheuma spinosum*), Steroid, Kromatografi Lapis Tipis, Uji toksisitas, FTIR

Alga merah *Eucheuma spinosum* merupakan salah satu jenis makro alga yang banyak dibudidayakan di Indonesia. Ekstrak *Eucheuma spinosum* banyak yang digunakan sebagai antioksidan, antibakteri, dan senyawa toksik. Manfaat tersebut berasal dari senyawa aktif yang terdapat didalamnya. Salah satu senyawa aktifnya adalah steroid. Senyawa steroid dari berbagai tumbuhan banyak dimanfaatkan sebagai senyawa toksik dan anti kanker. Sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat toksisitas senyawa steroid yang dikhususkan pada tanaman *Eucheuma spinosum* beserta identifikasinya.

Penelitian dilakukan dengan preparasi sampel *Eucheuma spinosum* yang dilanjutkan dengan ekstraksi menggunakan metanol. Ekstrak pekat metanol kemudian dihidrolisis menggunakan HCl dan dilanjutkan partisi menggunakan petroleum eter. Hasil partisi yang diperoleh kemudian diuji fitokimia senyawa steroid dan dipisahkan senyawanya menggunakan KLT. Isolat steroid hasil pemisahan kemudian diuji toksisitas menggunakan metode BSLT dan dilanjutkan dengan identifikasi. Data kematian larva udang hasil uji toksisitas dianalisis dengan analisis probit untuk mengetahui nilai  $LC_{50}$ .

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat steroid dari fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol *Eucheuma spinosum* dapat digunakan sebagai senyawa toksik dengan nilai  $LC_{50}$  sebesar 27,0614; 15,8658 dan 31,6876 berurutan untuk isolat 5,6, dan 7. Isolat hasil isolasi tersebut diidentifikasi menunjukkan senyawa steroid yang memiliki gugus O-H, C=C,  $-C(CH_3)_2$ ,  $C_{sp^3}$ -H, O-H, =C-H. Identifikasi menggunakan LC-MS tidak dapat menemukan senyawa target.

## ABSTRACT

Azizah, L.N. 2016. **Toxicity Test Isolate Steroid Result of PTLC Petroleum Ether Fraction Of Hidrolized Red Algae (*Eucheuma Spinosum*) Methanol Extract**. Essay. Chemistry Department. Science and Technology Faculty of State Islamic University Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Sc. Supervisor II: Umaiatus Syarifah, MA

**Keywords:** red algae (*Eucheuma spinosum*), Steroid, Thin Layer Chromatography, toxicity test, FTIR

Red algae *Eucheuma spinosum* is the kind of macro-algae that many cultivated in Indonesia. *Eucheuma spinosum* extract can use as an antioxidant, antibacterial, and toxic compounds. The benefits from active compounds contained inside of *Eucheuma spinosum*. One of the active compounds are steroids. Steroid compounds from flora used as toxic compounds and anti-cancer. The purpose of this study to determine the level of toxicity from steroid compound from *Eucheuma spinosum* and their identification.

The study was conducted with a preparation sample *Eucheuma spinosum*, followed by extraction with methanol. Then methanol extract hydrolyzed using HCl and continued partition using petroleum ether. The results of partition are then phytochemical test of steroid compounds and the compounds separated by TLC. Isolate steroid then tested the toxicity used BSLT method and followed identification. Data shrimp larvae results toxicity test were analyzed by probit analysis to determine the LC<sub>50</sub> value.

The results of the study that isolate steroid of fractions of petroleum ether hydrolyzed from methanol extract *Eucheuma spinosum* can used as a toxic compound with LC<sub>50</sub> value of 27.0614; 15.8658 and 31.6876 serially to isolate 5,6, and 7. Isolate in identification using FTIR showed steroid compounds that have the O-H, C=C, -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, C<sub>sp3</sub>-H, O-H, =C-H. That identification using LC-MS can't find target compound.

## ملخص

عزيزة، ل. ن. 2016. اختبار سمية وتحديد عزلات المنشطات جزء البترول الأثير النتائج التحليل المائي مقتطف الميثانول الطحالب الحمراء (*Eucheuma spinosum*). بحث جامعي. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة الإسلامية الحكومية مولانا مالك إبراهيم مالانج. المشرف الأول: أ غنام فشى ، الماجستير المشرفة الثانية: امية الشريفة الماجستير

---

كلمات الرئيسية: الطحالب الحمراء (*Eucheuma spinosum*)، المنشطات، اللوني طبقة رقيقة، واختبار السمية، تحويل فورييه الأشعة تحت الحمراء

الطحالب الحمراء *Eucheuma spinosum* هو شمال شرق من نوع من الطحالب الكلي المزروعة على نطاق واسع في إندونيسيا. استخراج *Eucheuma spinosum* كمضاد للأكسدة، مضاد للجراثيم، والمركبات السامة. الفوائد المستمدة من المركبات النشطة الواردة فيه. واحدة من المركبات النشطة هي المنشطات. وتستخدم مركبات الستيرويد من مختلف الأعشاب والمركبات السامة والمضادة للسرطان. وهكذا وتهدف هذه الدراسة إلى تحديد مستوى سمية مركب المنشطات الذي خصص المحاصيل *Eucheuma spinosum* والتعرفه.

وقد أجريت الدراسة على عينة الشائكة إعداد *Eucheuma spinosum* ، تليها استخراج مع الميثانول. ثم تحلل يتركز استخراج الميثانول باستخدام حمض الهيدروكلوريك واستمر القسم باستخدام الأثير البترول. ثم يتم اختبار قسم النتائج التي تم الحصول عليها المركبات النباتية والمركبات الستيرويدية مفصولة اعدادي طبقة رقيقة اللوني يعزل كانت الستيرويد نتائج الفصل سمية ثم اختبارها باستخدام BSLT طريقة تليها تحديد الهوية من جانب تحويل فورييه الأشعة تحت الحمراء. وقد تم تحليل وفيات الروبيان البيانات اليرقات سمية نتائج الاختبار مع تحليل الاحتمالية لتحديد قيم  $LC_{50}$

وأظهرت النتائج أن عزل المنشطات من كسور البترول الأثير التحلل يوكيما الشائكة استخراج الميثانول *Eucheuma spinosum* يمكن أن تستخدم مركب سام مع قيم  $LC_{50}$  من 15.777. 26.146 و 31.687 وبالتتابع لعزل 5،6، و 7. عزل نتائج العزلة في تحديد استخدام تحويل فورييه الأشعة تحت الحمراء أظهرت مركب الستيرويد الذي لديه مجموعة  $C=C$ ،  $O-H$ ،  $-C(CH_3)_2$ ،  $C-OH$ ،  $C-H$ .

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Allah SWT berfirman dalam al-Quran surat an Nahl (16):14:

وَهُوَ الَّذِي سَخَّرَ الْبَحْرَ لِتَأْكُلُوا مِنْهُ لَحْمًا طَرِيًّا وَتَسْتَخْرِجُوا مِنْهُ حَبْلًا مَلْبَسًا وَتَرَى  
الْفُلَّكَ مَوَاجِرَ فِيهِ وَلِتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ وَلِعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ ۝ ۱۴

Artinya:

“Dan Dialah, Allah yang menundukkan lautan (untukmu), agar kamu dapat memakan daripadanya daging yang segar, dan kamu mengeluarkan dari lautan itu perhiasan yang kamu pakai; dan kamu melihat bahtera berlayar padanya, dan supaya kamu mencari (keuntungan) dari karunia-Nya, dan supaya kamu bersyukur”  
QS. an Nahl (16) :14

Lafadz *sakhara al-bahra* menjelaskan bahwa Allah SWT menurunkan kepada hambanya laut sebagai sumberdaya alam yang mempunyai banyak manfaat yang dapat digunakan oleh hambanya (Asy-Syanqithi, 2007). Dalam firman di atas, Allah SWT juga memerintahkan untuk memakan (*li ta'kulu*), mengeluarkan (*tastakhriju*), melihat (*wa taraa*) dan mencari (*li tabtaghu*) supaya manusia bisa mengambil manfaat sumberdaya laut. (Al-Qurtubi, 2008). Salah satu sumberdaya laut adalah alga. Ditinjau dari ukurannya, alga terbagi atas dua macam yaitu mikro alga dan makro alga.

Makro alga merupakan sumber daya hayati yang keberadaannya melimpah di perairan Indonesia. Dalam dunia perdagangan, makro alga disebut dengan rumput laut (*Seaweed*). Rumput laut merupakan tumbuhan yang tidak dapat dibedakan antara akar, batang, dan daun sejati sehingga tanaman ini tergolong dalam devisio Thallophyta. Devisio tersebut terbagi atas empat kelas yaitu *Chloropyceae* (alga hijau), *Rhodophyceae* (alga merah), *Phaeophyceae* (alga coklat), dan *Cyanophyceae* (alga biru-hijau) (Waryono, 2001). Alga merah merupakan

spesies terbanyak diantara kelas makro alga yang lain, yaitu sekitar 452 spesies alga merah (Winarno, 1996 dalam Suparmi, 2009). Salah satu spesies yang banyak dibudidayakan di Indonesia adalah alga merah *Eucheuma spinosum*.

Pemanfaatan ekstrak dari *Eucheuma spinosum* dapat digunakan sebagai sumber karagenan untuk meningkatkan kekenyalan mie kering (Ulfah, 2009), antioksidan (Mardiyah dkk., 2013); (Damongilala, 2013), antibakteri (Ahmad dkk., 2013); (Wiyanto, 2010) dan senyawa toksik (Kholidiyah dkk., 2013). Berbagai manfaat tersebut berasal dari kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam *Eucheuma spinosum*.

Ekstrak yang dianggap sebagai senyawa toksik perlu dilanjutkan pengujian toksisitas terhadap senyawa yang terkandung dalam ekstrak *Eucheuma spinosum*. Pengujian tersebut digunakan untuk mengetahui peran senyawa tertentu dalam uji toksisitas dari ekstrak kasar. Uji toksisitas suatu senyawa dapat dilakukan dengan menggunakan hewan uji yang berupa larva udang *Artemia salina Leach* (Nurhayati, 2006).

Menurut *National Cancer Institute United State of America* (NCI USA), terdapat hubungan antara uji toksisitas metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dengan senyawa antitumor atau antikanker, sehingga metode ini digunakan sebagai uji invitro senyawa antikanker atau antitumor. Pengujian dengan metode tersebut merupakan pengujian toksisitas yang cepat, aman, praktis, dan ekonomis untuk skrining, fraksinasi, dan penentuan bioaktivitas senyawa bahan alam yang nilai toksisitasnya dinyatakan dengan nilai  $LC_{50}$  (*Lethal Concentration 50*) (Aras, 2013).

Kholidiyah dkk., (2013) melakukan partisi ekstrak metanol *Eucheuma spinosum* menggunakan pelarut n-butanol dan petroleum eter yang dilanjutkan

dengan uji toksitas pada kedua fraksi tersebut. Hasil uji toksisitas menunjukkan bahwa fraksi petroleum eter merupakan fraksi toksik dengan nilai  $LC_{50} = 176,06$  ppm. Fraksi toksik tersebut diuji fitokimia menunjukkan adanya senyawa alkaloid dan steroid.

Steroid merupakan senyawa bioaktif yang terkandung dalam alga merah *Eucheuma spimosum*. Senyawa tersebut merupakan lipid yang tidak memiliki gugus asam lemak dan bukan termasuk turunan ester yang kebanyakan dari strukturnya membentuk struktur dasar dari 17 atom karbon (Kristanti, 2008). Senyawa steroid jenis diketosteroid dari alga laut *Tydemania expeditionis* toksik terhadap sel kanker prostat DU145, PC3 dan LNCaP dengan nilai  $IC_{50}$  berturut-turut adalah  $31,27 \pm 1,50$ ;  $40,59 \pm 3,10$  dan  $19,80 \pm 3,84$   $\mu$ M (Zhang, 2012).

Berdasarkan penelitian Masroh (2010) hasil uji toksisitas senyawa steroid yang berhasil di isolasi dari ekstrak n-heksana daun pecut kuda (*Stachythrphyta jamaicensis L. Vahl*) menghasilkan nilai  $LC_{50}=78,59$  ppm. Hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa steroid dari daun pecut kuda merupakan senyawa toksik diantara senyawa metabolit sekunder lain yang berhasil diisolasi. Senyawa toksik tersebut diidentifikasi menggunakan UV-Vis dan FTIR menunjukkan senyawa steroid stigmasterol.

Aprelia dan Suyatno (2013) melakukan uji toksisitas senyawa steroid fraksi etil asetat dari tanaman paku *Cristella arida*. Hasil uji toksisitas tersebut menunjukkan bahwa senyawa steroid dari tanaman tersebut mempunyai nilai  $LC_{50} = 27,837$   $\mu$ g/mL. Senyawa tersebut diidentifikasi dengan menggunakan UV-Vis, FTIR, dan GC-MS menunjukkan adanya senyawa kampesterol, dan  $\beta$ -sitosterol yang merupakan senyawa golongan steroid.

Sapar (2004) melakukan identifikasi senyawa toksik dengan nilai  $LC_{50} = 76$  ppm yang berasal dari ekstrak etanol hewan laut *Biemna triraphisn* dengan menggunakan H-NMR, GC-MS dan FTIR. Hasil interpretasi menunjukkan bahwa senyawa toksik tersebut merupakan senyawa  $\beta$ -sitosterol. Sedangkan Diastuti (2010) melakukan identifikasi menggunakan FTIR dan GC-MS pada isolat ekstrak kloroform *Rhizophora mucronata* yang mempunyai sifat toksik terhadap sel kanker myeloma dengan nilai  $IC_{50} = 5 \mu\text{g/mL}$ . Hasil interpretasi menunjukkan bahwa dalam isolate terdapat senyawa 4-metil-kolest-24-en-ol dan 4-metil-stigmast-22-en-ol. Selain menggunakan instrumen tersebut senyawa steroid dapat diidentifikasi menggunakan LC-MS.

Lin, dkk (2010) melakukan isolasi senyawa steroid dari alga merah *Pyessonnelia* sp. Senyawa tersebut menunjukkan aktivitas toksik terhadap sel kanker dengan nilai  $IC_{50} = 1,63$  dan  $1,41 \mu\text{M}$ . keua senyawa steroid yang memiliki aktivitas anti kanker tersebut kemudian diidentifikasi menggunakan LC-MS, 1D NMR dan 2D NMR menunjukkan senyawa 19-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-19-hydroxy-cholest-4-en-3-one dan 19-*O*- $\beta$ -D-N-acetyl-2-aminoglucopyranosyl-19-hydroxy-cholest-4-aen-3-one.

Senyawa steroid yang terkandung dalam fraksi n-heksana alga merah *Palmaria* sp. dapat diidentifikasi dengan menggunakan LC-MS. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa dalam alga merah *Palmaria* sp. menunjukkan adanya senyawa *fucosterol*, *24-methylenecholesterol*, dan desmosterol yang merupakan golongan senyawa steroid (Machado dkk., 2004). Untuk mendapatkan senyawa steroid murni perlu dilakukan proses isolasi senyawa steroid. Salah satu metode yang digunakan untuk isolasi senyawa steroid dari *Eucheuma spinosum* adalah menggunakan

kromatografi lapis tipis preparatif dengan menggunakan eluen terbaik (Ningsih dkk., 2015).

Berdasarkan penelitian Setiyawan dkk. (2015) eluen terbaik yang digunakan untuk memisahkan senyawa steroid dari fraksi petroleum eter ekstrak metanol *Eucheuma spinosum* adalah campuran pelarut n-heksana:etil asetat (17:3). Hasil isolasi dengan menggunakan eluen tersebut menghasilkan 8 spot senyawa. Spot hasil kromatografi lapis tipis preparatif diidentifikasi senyawanya menggunakan pereaksi warna Liebermann-Buchard terdapat 4 spot berwarna hijau-biru menunjukkan senyawa steroid (Sulastry dan Nilam, 2010).

Berdasarkan uraian tersebut akan dilakukan uji toksisitas dan identifikasi senyawa steroid dari fraksi petroleum eter ekstrak metanol *Eucheuma spinosum*. Untuk memperoleh isolat senyawa steroid dilakukan isolasi menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif dengan menggunakan eluen terbaik berdasarkan penelitian terdahulu. Hasil isolasi senyawa steroid diuji toksisitasnya menggunakan metode BSLT sebagai skrining awal senyawa yang berpotensi sebagai antikanker yang dinyatakan nilai toksisitasnya dengan  $LC_{50}$ . Isolat senyawa steroid *Eucheuma spinosum* akan dilakukan identifikasi dengan menggunakan FTIR dan LC-MS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*).

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, dapat dihasilkan rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana toksisitas senyawa steroid hasil isolasi menggunakan KLTP fraksi petroleum eter ekstrak metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) terhadap *Artemia salina* Leach?
2. Bagaimana hasil identifikasi isolat senyawa steroid yang terdapat dalam fraksi petroleum eter ekstrak metanol Alga merah (*Eucheuma spinosum*) menggunakan FTIR dan LC-MS?

### 1.3 Tujuan

Dari rumusan masalah dapat dituliskan beberapa tujuan, diantaranya adalah:

1. Untuk mengetahui toksisitas senyawa steroid hasil isolasi menggunakan KLTP fraksi petroleum eter ekstrak metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) terhadap *Artemia salina* Leach.
2. Untuk mengetahui hasil identifikasi senyawa steroid yang terdapat pada fraksi petroleum eter ekstrak metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) menggunakan FTIR dan LC-MS.

### 1.4 Batasan Masalah

Penelitian ini mempunyai beberapa batasan masalah, diantaranya adalah:

1. Sampel yang digunakan dalam penelitian merupakan makro alga jenis Alga merah (*Eucheuma spinosum*) yang berasal dari pantai Jumiang Pamekasan Madura.
2. Alga merah diekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut metanol, dan difraksinasi menggunakan petroleum eter.

3. Isolasi senyawa steroid dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif.
4. Uji aktivitas toksisitasnya menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) yang dinyatakan dengan nilai LC<sub>50</sub>.
5. Identifikasi senyawa steroid dilakukan dengan menggunakan FTIR dan yang memiliki sifat paling toksik diidentifikasi menggunakan LC-MS.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada pembaca mengenai cara isolasi, tingkat ketoksikan, dan cara identifikasi senyawa steroid yang terkandung dalam alga merah *Eucheuma spinosum* yang dapat dikembangkan untuk meningkatkan ilmu pengetahuan sehingga dapat diaplikasikan penggunaannya dalam masyarakat.

## BAB II

### KAJIAN PUSTAKA

#### 2.1 Alga Merah *Eucheuma spinosum*

Indonesia merupakan Negara kepulauan dengan panjang pantai 81.000 Km atau 14 % garis pantai seluruh dunia. Wilayah Indonesia terdiri dari 2/3 perairan laut perairan Indonesia tersebut menghasilkan sumberdaya hayati yang berupa rumput laut dengan berbagai macam jenisnya. Rumput laut yang dibudidayakan di wilayah Lombok, Nusa Tenggara Barat, Jawa dan Madura (Costa, 2003 dalam Sharo, 2013).

al-Quran surat al-Anam (6):99 menyebutkan:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرَجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنَ النَّخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُشْتَبِهٍ أَنْظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ٩٩

Artinya:

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

Lafadz نبات كل (Bermacam macam tumbuhan) menjelaskan bahwa Allah SWT menurunkan air hujan, kemudian dengan air tersebut Allah SWT mengeluarkan setiap jenis tumbuh-tumbuhan yang bermacam macam bentuk, ciri-ciri serta mempunyai kelebihan dan kekurangan masing masing (Maraghi, 1992).

Meskipun banyak tumbuhan yang hidup di darat, namun juga terdapat tumbuhan yang hidup di laut, seperti alga.

Klasifikasi tumbuhan tingkat rendah yang disebut dengan alga merah (*Eucheuma spinosum*) adalah sebagai berikut (Anggadiredja, dkk., 2006):

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Rhodophyta
Kelas	: Rhodophyceae
Ordo	: Gigartinales
Famili	: Solieriaceae
Genus	: Eucheuma
Spesies	: <i>Eucheuma spinosum</i>



Gambar 2.1. Alga merah (*Eucheuma spinosum*) (Anggadireja, dkk., 2006)

Ciri-ciri umum Genus Eucheuma adalah (Aslan, 1998):

- Thalli* (Kerangka tubuh tanaman) bulat silindris atau gepeng
- Berwarna merah, merah-coklat, hijau kuning dan sebagainya
- Bercabang berselang tidak teratur, *di* atau *trikhomotomous*
- Memiliki benjolan-benjolan (*blunt nodule*) dan duri-duri atau spines
- Substansi thalli “gelatinus” dan atau “kartilagenus” (lunak seperti tulang rawan)

Alga merah tersusun dari pigemen Klorofil a, klorofil d dan pikobiliprotein. Zat penyusun dinding alga merah terdiri atas  $\text{CaCO}_3$  (kalsium karbonat), selulosa dan produk fotosintesis berupa karagenan, agar, fulcolleanan, dan porpiran. Alga merah hidup di laut dan sedikit di air tawar (Suparmi, 2009).

Allah SWT berfirman dalam al Quran surat asy Syuara (26):7.

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ۝٧

Artinya

“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?”

Lafadz زوج كريم diartikan sebagai tumbuhan yang baik. Tumbuhan baik dijelaskan sebagai tumbuhan yang tumbuh subur dan menghasilkan manfaat bagi manusia. Dengan adanya tumbuhan yang bermanfaat tersebut seorang mukmin harus berfikir tentang manfaat dari bagian tumbuhan tersebut (Shihab, 2002). Alga dapat bermanfaat dalam berbagai sektor. Di sektor industri alga merah *Euचेuma spinosum* dapat digunakan sebagai penghasil karagenan. Karagenan digunakan untuk pengemulsi, pengikat, stabilizer, suspensi dan pelarut (Suparmi, 2009). Kadar karagenan tertinggi alga merah *Euceuma spinosum* pada umur panen 35 hari dengan kadar 47,52%. Selain waktu panen cara penanganan saat panen, penjemuran dapat mengurangi kadar karaginan (Erpin, 2013).

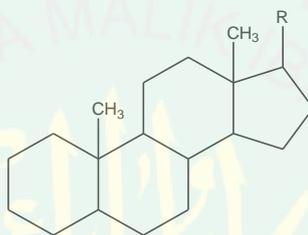
Kandungan alga merah *Euचेuma spinosum* selain digunakan sebagai penghasil karagenan dapat digunakan untuk meningkatkan kekenyalan mie kering (Ulfah, 2009). Bidang kesehatan memanfaatkannya sebagai senyawa toksik (Kholidiyah dkk., 2013), antioksidan (Mardiyah dkk., 2013), antibakteri (Ahmad dkk., 2013), dan meningkatkan jumlah limfosit pada tikus wistar (Olivianny, 2009).

## 2.2 Senyawa Steroid

Steroid merupakan senyawa yang tergolong dalam senyawa lemak yang terdiri dari rantai karbon dengan 4 cincin, 3 cincin utama sikloheksana dan 1 cincin siklopentana. Pengelompokan senyawanya berdasarkan pada gugus yang terikat

pada kerangka dasar rantai karbon (Kristanti, 2008). Turunan senyawa steroid yang banyak keberadaannya adalah sterol (Poedjiadi, 1994).

Senyawa steroid yang berada ditumbuhan disebut dengan fitosterol, yang terdapat dalam hewan disebut dengan zoolesterol dan di fungi disebut sebagai (Mikosterol) (Vembriarto, 2013). Selain pelindung diri, steroid juga berfungsi sebagai hormon. Kolesterol, ergosterol, progesteron, dan estrogen merupakan hormon yang senyawanya turunan dari steroid (Poedjiadi, 1994).



Gambar 2.2 Struktur Inti Senyawa Steroid (Lenny, 2006).

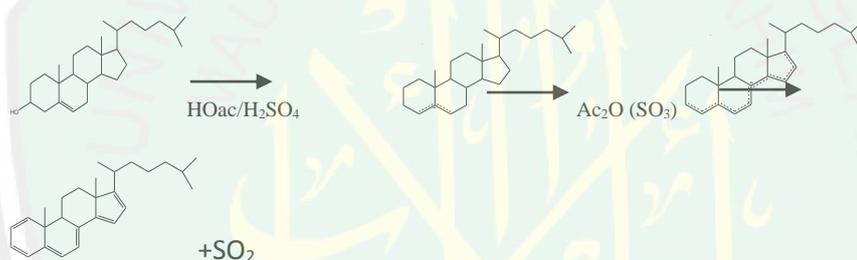
Senyawa steroid secara umum dapat digunakan sebagai (Vembriarto, 2013):

- Bermanfaat untuk menurunkan kolesterol dan mampu menghambat perkembangan kanker usus.
- Digunakan sebagai bahan campuran dalam produk makanan.
- Lemak sterol, berperan untuk fungsi seluler tubuh serta menjadi substrat awal bagi vitamin yang larut dalam lemak dan hormon steroid.
- Berperan sebagai indikator kontaminasi.
- Dimanfaatkan dalam budidaya ikan.

Senyawa metabolit sekunder dapat diidentifikasi menggunakan pereaksi warna yang akan menghasilkan visualisasi yang berbeda berdasarkan warnanya. Pereaksi warna yang dapat digunakan untuk analisa senyawa steroid adalah reagen Liebermann-Buchard yang menghasilkan warna hijau biru. Adanya penambahan

asam kuat dapat menyebabkan dehidrasi pada senyawa steroid dan membentuk garam yang dapat memberikan warna (Masroh, 2010).

Selain dengan menggunakan pereaksi Liebermann Buchard, pereaksi warna untuk senyawa steroid dapat digunakan pereaksi salkowski. Uji tersebut dilakukan dengan ekstrak kasar yang dilarutkan pada kloroform. Larutan kloroform tersebut kemudian ditetesi dengan beberapa tetes asam sulfat. Hasil pengamatan steroid dengan menggunakan uji ini bila positif senyawa tersebut menghasilkan warna merah di lapisan bawah tabung (Atun, 2014). Reaksi yang terjadi antara senyawa steroid dengan reagen Liebermann-buchard ditunjukkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Gambar reaksi Liebermann-Buchard dengan steroid (Burke, 1974).

Senyawa steroid dapat digunakan sebagai senyawa antioksidan (Krisna, 2014), antikanker (Diastuti, 2010), (Zhang dkk., 2012), serta digunakan sebagai senyawa toksik (Sapar, 2004). Senyawa steroid dari alga merah *p. cruentum* terdiri dari 22-Dehydrocholesterol (60%), kolesterol (5%), desmosterol (20%), ergosterol (5%), C<sub>29</sub>-sterol (10%) (Kanazawa, 1972).

## 2.3 Isolasi Senyawa Steroid

### 2.3.1 Ekstraksi Senyawa Steroid

Isolasi senyawa steroid dari alga merah *Eucheuma spinosum* dapat dilakukan dengan beberapa tahapan. Menurut Setiyawan (2015) isolasi senyawa steroid dapat dilakukan dengan metode ekstraksi, Hidrolisis dan partisi, dan

kromatografi lapis tipis. Sedangkan menurut (Sulastry, 2010) isolasi senyawa steroid dapat dilakukan tanpa fraksinasi hanya melakukan ekstraksi dan kromatografi.

Sampel dipreparasi terlebih dahulu sebelum dilakukan proses maserasi. Preparasi yang dilakukan adalah dengan mencuci alga hingga bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada alga. Kemudian alga dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 38°C atau dengan dikering anginkan tanpa sinar matahari. Pengeringan dilakukan untuk meminimalisir keberadaan mikroorganisme yang akan tumbuh bila kadar air tinggi. Sehingga, alga merah kering dapat disimpan dalam waktu yang lama sebelum dilakukan maserasi (Mardiyah dkk., 2013).

Ekstraksi yang digunakan untuk mengisolasi senyawa steroid adalah menggunakan metode maserasi. Metode maserasi merupakan metode pemisahan senyawa dengan menggunakan pelarut organik pada suhu ruang dengan perendaman. Penggunaan metode maserasi pada isolasi senyawa steroid dikarenakan maserasi murah, mudah dilakukan (Sa'adah, 2010). Kekurangan metode maserasi memerlukan pelarut banyak, perlu pengadukan dan membutuhkan waktu yang lama (Atun, 2014). Saat maserasi terjadi perbedaan tekanan antara pelarut dan sel tumbuhan atau hewan. Tekanan tersebut menyebabkan pemecahan dinding dan membran sel dan senyawa metabolit yang berada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut yang digunakan (Sa'adah, 2010).

Proses maserasi tidak dapat dilakukan hanya sekali perendaman karena dimungkinkan masih ada senyawa metabolit yang tertinggal, maka perlu dilakukan remaserasi. Remaserasi dilakukan dengan menambahkan pelarut yang digunakan

pada sampel minimal 3x pengulangan atau sampai senyawa yang diinginkan telah terekstrak. Hasil dari maserasi dan remaserasi yang telah dilakukan kemudian dikumpulkan dan dipekatkan (Atun, 2014).

Pelarut pada proses maserasi dapat digunakan pelarut organik, baik pelarut polar maupun non polar sesuai kebutuhan tergantung senyawa yang diinginkan. Ekstraksi maserasi dari *Eucheuma spinosum* dapat dilakukan dengan pelarut metanol dan n-heksana. Hasil rendemen ekstraksi dari kedua pelarut tersebut secara berurutan adalah 16,25% dan 0,88% (Kutsiyah dkk., 2012). Hasil tersebut dapat diartikan bahwa untuk maserasi *Eucheuma spinosum* baik dilakukan dengan pelarut metanol.

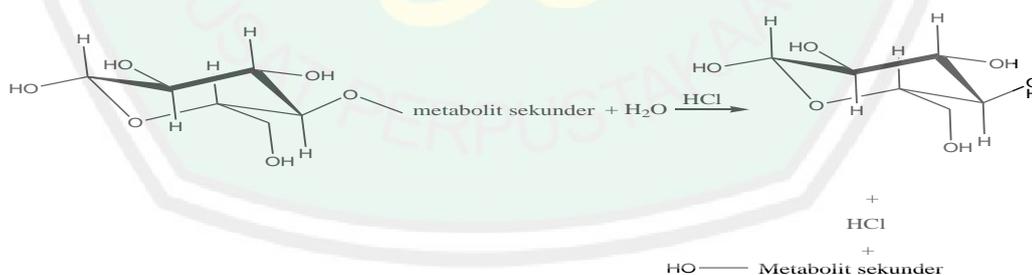
Pelarut metanol memiliki titik didih yang lebih rendah, mudah diuapkan dan memiliki sifat lebih toksik bila dibandingkan dengan etanol (Atun, 2014). Selain sifat tersebut metanol merupakan pelarut universal yang memiliki gugus polar (-OH) dan non polar (CH<sub>3</sub>) sehingga dapat menarik senyawa polar dan nonpolar yang ada pada alga merah (Astarina, 2013). Hasil maserasi yang telah dilakukan dengan menggunakan metanol menghasilkan rendemen sebesar 16,25%, 7,54%, 16,256% (Hanapi, 2013), (Kholidyah, 2013), (Mardiyah, 2013).

### 2.3.2 Hidrolisis dan Partisi

Hidrolisis merupakan suatu reaksi untuk memecah suatu senyawa menggunakan air berlebih. Namun, reaksi antara air dengan selulosa lambat sehingga perlu katalisator untuk mempercepat reaksi. Katalis yang digunakan untuk hidrolisis adalah menggunakan katalis asam dan katalis enzim. Hidrolisis dengan menggunakan katalis asam digunakan asam klorida, asam nitrat dan asam sulfat (Artati, 2012).

Berdasarkan penelitian Artati (2012), hidrolisis pelepah pisang dilakukan dengan menggunakan asam sulfat dengan asam. Penggunaan asam klorida dengan konsentrasi 2N menghasilkan kadar gula yang tinggi. Semakin tinggi konsentrasi asam semakin banyak hasil yang diperoleh. Namun, konsentrasi 2N merupakan konsentrasi optimum untuk dilakukan hidrolisis. Kecepatan reaksi hidrolisis pelepah pisang dengan menggunakan asam sulfat sebesar 0,0043 / menit dan tetapan kecepatan reaksi dengan menggunakan asam klorida sebesar 0,0066 /menit. Hidrolisis dengan menggunakan asam sulfat menghasilkan gula sebesar 8,2 gram dan hidrolisis dengan asam klorida menghasilkan gula 9 gram.

Hasil ekstraksi maserasi kemudian dihidrolisis dengan menggunakan HCL 2N (Setiyawan dkk., 2015). Hal tersebut dikarenakan senyawa metabolit di alam umumnya memiliki ikatan glikosida antara metabolit sekunder (aglikon) dengan komponen gula (glikon) yang saling berikatan. (Mardiyah, 2014). Dugaan reaksi pemutusan ikatan O-glikosida dari senyawa metabolit sekunder dengan HCl ditunjukkan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Dugaan reaksi hidrolisis glikosida (Mardiyah, 2014)

Setelah dilakukan proses hidrolisis isolasi senyawa steroid dapat dilanjutkan dengan partisi. Hal tersebut karena senyawa steroid merupakan senyawa nonpolar namun diekstraksi dengan pelarut polar maka perlu dilakukan partisi dengan pelarut nonpolar. Partisi ekstrak metanol alga merah *Eucheuma spinosum* dapat dilakukan

dengan pelarut seperti n-heksana (Ningsih, 2015) atau petroleum eter (Kholidyah, 2013), (Setiyawan, 2015).

### **2.3.3 Isolasi Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif**

Pemisahan senyawa steroid dari ekstrak kasar hasil fraksinasi dapat dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis. Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan teknik pemisahan campuran senyawa berdasarkan fasa diam yang dilapiskan pada pelat kaca atau alumunium dengan suatu pelarut. Proses pengaliran pelarut yang naik sepanjang permukaan pelat KLT oleh gaya kapiler disebut dengan elusi. Dengan proses elusi tersebut pelarut membawa komponen-komponen yang terdapat dalam pelarut sesuai dengan kepolarannya (Atun, 2014). Sebelum digunakan pelarut yang digunakan sebagai fasa gerak dijenuhkan terlebih dahulu sampai berbentuk uap. Penjenuhan dilakukan dengan menutup rapat bejana yang telah terisi eluen dengan dilapisi kertas saring pada bagian atas. Jika uap telah mencapai kertas saring maka pelarut telah jenuh (Rohman, 2007).

Sampel yang dibutuhkan dalam KLT sedikit, hanya ditotolkan sedikit menggunakan pipa kapiler pada pelat. Fasa gerak yang digunakan pada kromatografi didasarkan pada hasil eksperimen sendiri dengan mempertimbangkan sifat-sifatnya. Karena, polaritas pelarut sangat berpengaruh terhadap mobilitas komponen campuran (Atun, 2014). Senyawa yang memiliki kepolaran lebih rendah lebih cepat terelusi bila dibandingkan dengan senyawa polar. Senyawa polar akan lebih tertahan pada fasa diamnya karena fasa diam bersifat polar (Dian, 2011).

Fasa diam yang digunakan untuk kromatografi lapis tipis mengandung substansi yang dapat berpendar dalam sinar ultraviolet (Solihat, 2004). Salah satu plat yang sering digunakan dan yang dapat berpendar warna adalah gel 60 GF<sub>254</sub>.

Hasil spot senyawa yang dihasilkan akan nampak gelap dengan *background* plat yang berpendar bila disinari dengan lampu UV  $\lambda_{254}$  (Kristanti, 2008).

Penotolan sampel untuk KLT harus dilakukan dengan hati-hati. Penotolan sampel yang terlalu banyak akan menyebabkan pemisahan kurang maksimal. Pemisahan yang optimal terjadi bila ukuran bercak sempit dan melebar bila pemisahannya kurang sempurna. Penotolan sampel lebih dari 2 – 10  $\mu\text{L}$  dilakukan dengan mengeringkan terlebih dahulu setiap totolan (Rohman, 2007).

Identifikasi senyawa yang terpisah dapat dilakukan dengan menggunakan pereaksi warna pada senyawa-senyawa yang tidak memiliki warna. Maka pada hasil KLT dapat dilakukan identifikasi dengan cara (Rohman, 2007):

- a. Menyemprot lempeng KLT dengan reagen kromogenik yang akan bereaksi secara kimia dengan seluruh solut yang mengandung gugus fungsional tertentu sehingga menjadi berwarna.
- b. Mengamati lempeng dibawah lampu ultra violet yang dipasang pada panjang gelombang 254 atau 366 untuk menampakkan bercak dan ditandai bercak yang dihasilkan.
- c. Menyemprot dengan asam sulfat pekat atau asam nitrat pekat lalu dipanaskan untuk mengoksidasi solut-solut organik yang akan nampak sebagai bercak hitam samapi kecoklat coklatan.
- d. Memaparkan lempeng dengan uap iodium dalam *chamber* tertutup.
- e. Melakukan *scanning* pada permukaan lempeng dengan densitometer.

Analisa kualitatif dari metode kromatografi lapis tipis dapat dilakukan dengan menentukan nilai  $R_f$  senyawa yang berhasil diisolasi. Penentuan nilai  $R_f$

dilakukan dengan membandingkan nilai Rf hasil KLT dengan nilai Rf dari standarnya. Nilai Rf didefinisikan sebagai berikut (Dian, 2011).

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Pada gugus yang besar dari senyawa-senyawa yang susunannya mirip memiliki nilai Rf yang berdekatan (Sastrohamidjojo, 2007).

Senyawa steroid alga merah memberikan warna yang berbeda jika diamati pada sinar UV  $\lambda_{366}$ . Setelah diamati pada lampu UV setelah disemprot reagen Liebermann-Buchard menghasilkan warna biru, ungu, dan sampai menghasilkan warna coklat (Syamsudin, 2007).

Isolasi senyawa aktif ekstrak metanol alga coklat *Sargassum vulgurae* dilakukan menggunakan KLT dengan eluen n-heksana:etil asetat (7:3). Hasil dari pemisahan tersebut menunjukkan 5 spot merupakan steroid bila disemprot dengan reagen Liebermann-Buchard. Pada ekstrak n-heksana dengan sampel yang sama dilakukan isolasi senyawa dengan KLT. Eluen yang digunakan adalah n-heksana:etil asetat (7:3). Hasil pemisahannya merupakan pemisahan terbaik dengan menghasilkan 8 spot. Hasil identifikasi dengan reagen Liebermann Buchard menunjukkan ada 7 spot yang mengandung senyawa steroid (Jannah, 2014). Sharo (2013) melakukan isolasi senyawa ekstrak n-heksana alga merah *Eucheuma cottonii* dengan KLT menggunakan eluen n-heksana:etil asetat (17:3). Hasil pemisahannya menghasilkan 8 spot. Spot yang dihasilkan di semprot dengan reagen Liebermann Buchard menunjukkan 2 spot senyawa steroid.

Setiyawan (2015) melakukan isolasi senyawa yang berasal dari alga merah *Eucheuma spinosum* menggunakan variasi eluen pada KLTA. Selanjutnya dari KLTA dihasilkan suatu eluen terbaik yang berupa n-heksana etil asetat (17:3) yang

digunakan untuk memisahkan menggunakan KLTP. Hasil dari KLTP menunjukkan 4 spot yang merupakan senyawa steroid.

**Tabel 2.1. Hasil KLTP fraksi petroleum eter ekstrak metanol menggunakan eluen n-heksana:etil aasetat (17:3)**

Noda	Nilai Rf	Warna noda	
		Sebelum diberi reagen	Setelah diberi reagen
1	0,17	Orange	Ungu
2	0,3	Hijau	Hijau
3	0,36	Ungu	Ungu
4	0,44	Hijau	Hijau
5	0,53	Ungu	Ungu
6	0,69	Hijau	Hijau
7	0,83	Orange	Merah jingga
8	0,89	Biru	Biru

#### 2.4 Uji Toksisitas Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Uji toksisitas merupakan bagian toksikologi yang mempelajari racun, bukan hanya efeknya namun mekanismenya juga dipelajari. Racun yang dimaksud adalah zat yang menyebabkan fungsi tubuh menjadi tidak normal. Uji toksisitas digunakan untuk membandingkan senyawa lain dengan menunjukkan ke suatu efek berbahaya atas jaringan biologi tertentu. Dari uraian tersebut maka, toksisitas dapat diartikan sebagai kemampuan racun untuk menimbulkan kerusakan apabila masuk dalam organ yang sensitif terhadap senyawa tersebut (Soemirat, 2005).

Uji toksisitas yang sering dilakukan adalah dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) karena senyawa yang memiliki bioaktivitas tertentu cenderung bersifat toksik terhadap larva udang. Kemampuan untuk mematikan larva udang dijadikan uji in vivo bioaktivitas suatu senyawa yang memiliki sifat toksik. Bila hasil uji toksisitas menggunakan metode BSLT menunjukkan hasil yang baik, maka perlu dilakukan pengujian lebih lanjut terhadap sampel tersebut (Kristanti dkk., 2008).

Uji BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) telah dilakukan sejak 1956 untuk pengamatan toksisitas senyawa bahan alam. Uji toksisitas menggunakan larva udang merupakan uji penapisan senyawa bioaktif tahap awal dan rangkaian uji toksisitas awal untuk mendapatkan dosis aman untuk manusia. Kelebihan metode BSLT adalah cepat, sederhana, murah, serta memenuhi kebutuhan data statistik dengan menggunakan sedikit sampel (Meyer, 1982)

Uji toksisitas dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* didasarkan pada kemampuan senyawa yang dapat mematikan larva udang.. Metode BSLT ditentukan tingkat toksisitasnya berdasarkan nilai LC<sub>50</sub> setelah penelitian dilakukan selama 24 jam. Metode tersebut merupakan metode murah, sederhana, dan relatif cepat untuk menentukan efeknya (McLaughlin,1998).

Data yang digunakan untuk menentukan nilai LC<sub>50</sub> adalah jumlah kematian larva udang yang dihitung dengan rumus berikut (Kristanti, dkk., 2008):

$$\% \text{kematian} = \frac{A-B}{C} \times 100 \%$$

A= jumlah larva udang yang mati pada larutan uji

B= jumlah larva udang yang mati pada kontrol

C= jumlah larva udang mula-mula

#### 2.4.1 Larva Udang *Artemia salina* Leach.

*Artemia salina* yang sering disebut dengan *brine shrimp* merupakan udang udangan primitif yang keberadaannya merupakan penyusun utama ekosistem laut. *Artemia* digunakan dalam uji laboratorium untuk mendeteksi toksisitas senyawa dari ekstrak tumbuhan (Kanwar, 2007).

*Artemia* merupakan hewan yang tergolong dalam phylum antropoda. *Artemia* hidup planktonik dalam air yang mempunyai kadar garam tinggi (antara

15-300 per mil). Suhu lingkungan hidup berkisar antara 25 – 30 °C dengan kadar oksigen sekitar 3 mg/L serta pH sekitar 7,3 – 8,4. Kadar garam suatu perairan kurang dari 6‰ maka telur *Artemia* akan tenggelam dan tidak dapat menetas. Namun, bila kadar garam lebih 25‰ telurnya dapat menetas dengan normal karena berada dalam kondisi tersuspensi (Mudjiman, 1995).

*Artemia salina* memiliki beberapa fase dalam pertumbuhannya yakni (Aras, 2013):

**Kista** : Kista dalam air laut mengalami pertumbuhan pecahnya cangkang dan muncul embrio yang dibungkus selimut. Proses tersebut terjadi setelah berada dalam air laut selama 24 jam.

**Nauplius** : proses ini terjadi setelah embrio muncul, dan terdapat nauplius yang berenang bebas. Nauplius merupakan larva stadium istar pertama yang mempunyai warna kecoklatan karena adanya kandungan kuning telur.

**Dewasa** : pada fase ini terdapat mata majemuk bertangkai, antena sensor, saluran pencernaan dan 11 pasang thoracopoda pada larva udang.

Penggunaan larva udang *Artemia salina* sebagai hewan uji memiliki fase yang baik untuk digunakan. Fase yang digunakan untuk uji toksisitas adalah saat larva udang mengalami nauplius aktif. Fase tersebut berada pada 48 jam penetasan lalu digunakan untuk uji aktifitas sitotoksik dari senyawa bioaktif (Alam, 2002 dalam Aras, 2013)

Kadar racun suatu zat kimia ditentukan dengan istilah  $LC_{50}$  (*Lethal Concentration-50*).  $LC_{50}$  adalah kadar atau konsentrasi suatu zat yang dinyatakan dalam miligram bahan kimia per meter kubik media uji yang dapat menyebabkan

50% kematian pada binatang percobaan dari suatu kelompok spesies setelah binatang percobaan tersebut terpapar dalam waktu tertentu (Kholidiyah,2010). Menurut Meyer (1982) senyawa yang dianggap toksik memiliki nilai  $LC_{50} < 1000$  ppm. Sedangkan untuk senyawa sangat toksik memiliki nilai  $LC_{50} < 30$  ppm.

Penelitian Kholidiyah (2013) yang melakukan uji toksisitas ekstrak kasar dari fraksi petroleum eter, fraksi butanol dan ekstrak metanol alga merah *Eucheuma spinosum*. Hasil uji toksisitas menunjukkan bahwa ekstrak kasar fraksi petroleum eter ekstrak metanol merupakan ekstrak paling toksik dengan nilai  $LC_{50} = 176,06$  ppm. Dari ekstrak tersebut diuji fitokimia menunjukkan terdapat senyawa alkaloid dan steroid.

Masroh (2010) melakukan isolasi senyawa steroid dari ekstrak heksana daun pecut kuda. Isolat tersebut diuji toksisitas menggunakan metode BSLT menghasilkan nilai  $LC_{50} = 78,59$  ppm. Sapar (2004) melakukan isolasi senyawa toksik yang berasal dari ekstrak *Biemna triraphis*. Hasil isolasi menunjukkan bahwa senyawa  $\beta$ -sitosterol menunjukkan senyawa toksik dengan nilai  $LC_{50} = 76$  ppm.

Aprelia dan Suyatno (2013) melakukan uji toksisitas senyawa steroid fraksi etil asetat dari tanaman paku *Cristella arida*. Hasil uji toksisitas tersebut menunjukkan bahwa senyawa steroid dari tanaman tersebut mempunyai nilai  $LC_{50} = 27,837$   $\mu\text{g/mL}$ . Sedangkan Novadiana (2016) melakukan uji toksisitas terhadap ekstrak metanol, kloroform dan senyawa steroid dari daun kerehau (*Callicarpa longifoila* Lam.). Hasil uji toksisitas menunjukkan bahwa senyawa steroid merupakan senyawa toksik dibandingkan ekstraknya. Nilai  $LC_{50}$  dari uji toksisitas senyawa steroid tersebut adalah sebesar 96,4096 ppm.

#### **2.4.2 Klasifikasi *Artemia salina* L.**

*Artemia salina* Leach merupakan hewan uji yang memiliki keistimewaan dalam beradaptasi dan mempertahankan diri dari lingkungan yang mempunyai kadar garam tinggi (Meyer, dkk., dalam Makalalang, 2011)

*Artemia salina* Leach yang digunakan dalam uji tosisitas mempunyai klasifikasi sebagai berikut (Harefa, 2003):

Filum	: Antropoda
Kelas	: Crustaseae
Sub Kelas	: Branchiopoda
Bangsa	: Anostraca
Suku	: Artemida
Marga	: Artemia
Jenis	: <i>Artemia salina</i> L.

## 2.5 Analisa Probit

Parameter untuk menentukan sifat toksik dari hasil uji BSLT dilakan dengan menghitung nilai angka probit (50% kematian hewan uji). Jumlah larva udang yang mati 50% dari jumlah larva uji dihitung nilai LC<sub>50</sub> dengan memasukkan nilai angka probit yang telah diketahui. Efek toksik dianalisa dari pengamatan persen kematian (Nurhayati, 2006).

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{Jumlah larva udang yang mati}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100 \%$$

Dari nilai persen kematian tersebut kemudian digunakan untuk menghitung angka probit melalui tabel dan kemudian dibuat persamaan garis (Nurhayati, 2006)

$$y = bx + a$$

$$y = \log \text{ konsentrasi}$$

$$x = \text{Angka probit}$$

Hasil dari persamaan tersebut nilai probit merupakan nilai LC<sub>50</sub>. Namun, apabila pada kontrol terdapat larva yang mati maka persen kematian ditentukan dengan rumus abbot (Meyer *et al.*, 1982 pada Nurhayati, 2006)

$$\% \text{ kematian} = \frac{T-K}{10} \times 100\%$$

Keterangan:

T = Jumlah larva uji yang mati

K = Jumlah larva control yang mati

10 = Jumlah larva uji

Program aplikasi yang digunakan adalah program minitab. Minitab dapat digunakan untuk mengolah data untuk analisa regresi, membuat ANOVA, membuat alat pengendalian statistik, *design* eksperimen, peramalan reabilitas, dan multivariate. Minitab mempunyai akurasi yang tinggi dan dapat digunakan untuk analisa sosial dan teknik (Iriawan, 2006).

## 2.6 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Menggunakan FTIR

Spektroskopi FTIR digunakan untuk identifikasi senyawa berdasarkan gugus fungsinya. Daerah serapan spektra IR dibagi menjadi 3 bagian, yaitu IR dekat (12.500–4.000 cm<sup>-1</sup>), IR tengah (4.000-400 cm<sup>-1</sup>), dan IR jauh (400-10 cm<sup>-1</sup>) (Rohman dan Gandjar, 2012).

Absorpsi radiasi IR berkisar antara 1-10 kkal/mol setara dengan perubahan energi. Radiasi pada energi tersebut ekuivalen dengan frekwensi vibasi ulur dan tekuk dari ikatan kovalen molekul (Rohman dan Gandjar, 2012). Senyawa yang dikenai radiasi IR akan mengalami vibrasi pada ikatan kovalennya. vibrasi dari ikatan kovalen tersebut digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi senyawa.

Setiap gugus fungsi mempunyai tipe ikatan yang mempunyai ikatan yang berbeda dan punya serapan IR yang khas.

Ningsih, dkk (2015) melakukan identifikasi senyawa steroid dari *Eucheuma spinosum* hasil identifikasi menunjukkan adanya serapan pada panjang gelombang  $3417\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus O-H, serapan pada bilangan gelombang  $2923$  dan  $2853\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus  $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ . Gugus C=C ditunjukkan pada serapan bilangan gelombang  $1647\text{ cm}^{-1}$  dan gugus C-O alkohol berada pada serapan bilangan gelombang  $1099\text{ cm}^{-1}$ .

Spektra IR senyawa steroid hasil isolasi dari ekstrak etil asetat tumbuhan paku memberikan serapan gugus fungsi –OH ditunjukkan pada daerah serapan  $3375$  dan  $3421,8\text{ cm}^{-1}$ , vibrasi ulur –CH<sub>3</sub> dan –CH<sub>2</sub> pada daerah serapan  $2926,4$  dan  $2862,7\text{ cm}^{-1}$ , C=C pada daerah serapan  $1625,8\text{ cm}^{-1}$ , C-H pada daerah serapan  $1460,9$  dan  $1382,2\text{ cm}^{-1}$ , dan C-O pada daerah serapan  $1097,3$  dan  $1029,9\text{ cm}^{-1}$ . Terdapat regangan C-H alkil ( $2926,4$  dan  $2862,7\text{ cm}^{-1}$ ), regang C=C ( $1625,8\text{ cm}^{-1}$ ), dan vibrasi tekuk C-H ( $1460,9$  dan  $1382,2\text{ cm}^{-1}$ ) mendukung adanya kerangka isolat steroid. Serapan gugus fungsi –OH dan C-O mendukung isolat tersebut merupakan senyawa steroid jenis sterol (Aprelia, 2013).

Spektra IR senyawa steroid dari spons *Biemna triraphis* menunjukkan beberapa pita serapan yang dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Pita serapan IR senyawa steroid dari spons *Biemna triraphis* (Sapar, 2004).

No.	Gugus Fungsi	Serapan (cm <sup>-1</sup> )
1	Uluran O-H	3432,67
2	Uluran C-H alifatik	2931,26
3	Uluran C-H simetrik	2869,55
4	Uluran C=C	1635,33
5	Tekukan C-H	1457,92 dan 1280,78
6	Uluran C-O	1056,79
7	Tekukan C-H	802,24

Dari hasil identifikasi FTIR tersebut disimpulkan senyawa steroid yang berhasil diisolasi merupakan senyawa steroid yang mempunyai gugus fungsi tersebut.

### 2.7 Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry (LC-MS/)

Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry (LC-MS/) merupakan kromatografi cair dengan detektor spektrometer massa. Penggunaan LC-MS sering digunakan dalam bio-analisis. Alat ini mempunyai kelebihan tersendiri. Dibandingkan alat lain, yaitu (Michael. 2008):

1. Hasil analisa sangat khas dan spesifik dari adanya spektrometer massa yang tandem dengan alat.
2. Pengaplikasian alat yang luas, tidak terbatas untuk molekul volatil, mampu mengukur analit yang sangat polar dan persiapan sampel sederhana tanpa adanya teknik derivatisasi.
3. Pengujian berbeda dapat dikembangkan dengan fleksibilitas yang tinggi dengan waktu analisa yang singkat.
4. Data kuantitatif maupun kualitatif dapat diperoleh karena seleksi ion yang cepat dengan banyak parameter.

Spektrometer massa bekerja dengan mengionkan molekul yang kemudian memilahnya dengan rasio fragmentasi ( $m/z$ ). Komponen penting yang harus terdapat dalam alat ini adalah sumber ion, dan analisis massa. Kedua komponen tersebut memiliki berbagai macam jenis yang disesuaikan dengan kepolaran senyawa serta memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing (Agilent Teknologi, 2001).

a. Sumber Ion (*Ion source*)

Teknik ionisasi pada LC-MS awalnya menggunakan sistem antar muka yang kurang efektif untuk memisahkan fasa gerak dan analit. Molekul analit akan terionisasi pada kondisi *vacuum*, dimana peristiwa tersebut terjadi pada ionisasi elektron tradisional. Saat ini digunakan ionisasi tekanan atmosfer yang memiliki keuntungan dapat memperluas jumlah senyawa yang dapat dianalisis. Molekul molekul analit akan terionisasi terlebih dahulu pada tekanan atmosfer kemudian secara mekanis dan elektrostatis terpisah dari inti molekulnya. Teknik ionisasi yang ada dalam LC/MS adalah (Agilent Teknologi, 2001):

1. Ionisasi elektron spray (*Electrospray Ionization/ESI*).

Ionisasi elektron spray bergantung pada pelarut yang digunakan supaya analit dapat mengion sebelum masuk ke spektrometer massa. Eluen LC dan gas yang dipanaskan masuk dalam bidang elektrostatis. Gas menyebabkan menyusutnya analit yang disebabkan oleh menguapnya pelarut. Ion-ion yang telah dikeluarkan dalam bentuk fasa gas tertarik melewati pipa kapiler yang akan diteruskan dalam analisis massa. Ionisasi elektron spray berguna untuk menganalisa protein, peptida, dan oligonukleotida serta dapat menganalisa molekul kecil seperti benzodiazepin (Agilent Teknologi, 2001).

## 2. Ionisasi Kimia Tekanan Atmosfer (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization/ APCI*)

Eluen LC disemprotkan melalui pemanas bersuhu tinggi ( $200^{\circ} - 400^{\circ} \text{C}$ ) pada tekanan atmosfer. Cairan menguap adanya uap panas yang timbul dari pemanas. Fase gas pelarut yang dihasilkan akan terionisasi dan ion-ionnya akan mentransfer muatan pada molekul analit. Ion dari analit melewati pipa kapiler yang dilanjutkan menuju spektrometer massa. APCI sering digunakan pada kromatografi fase normal karena analit yang digunakan merupakan fasa normal (Agilent Teknologi, 2001).

## 3. Photoionisasi Tekanan Atmosfer (*Atmospheric Pressure Photoionization / APPI*)

Photoionisasi tekanan atmosfer ionisasi dengan mengubah eluen LC menjadi fasa gas. Foton yang dihasilkan oleh lampu dengan energi ionisasi dalam kisaran yang kecil. Kisaran energi dipilih merupakan energi yang mampu mengionisasi analit dan mampu meminimalkan adanya ionisasi pelarut. Ion yang dihasilkan kemudian menuju pipa kapiler dan menuju penganalisa massa. LC-MS digunakan untuk menganalisa senyawa yang sangat nonpolar dengan laju alir rendah (Agilent Teknologi, 2001).

### b. Analisa massa (*mass analyzer*)

Terdapat 4 jenis analisis massa yang sering digunakan dalam analisa, yaitu:

#### 1. *Quadropole*

Jenis analisa massa quadropole terdiri atas empat batang paralel yang diatur dalam persegi yang ditengah persegi dialirkan ion analit. Bidang ini

digunakan untuk menentukan rasio massa dari senyawa yang dianalisa yang dapat melewati bagian filter dengan waktu tertentu (Agilent Teknologi, 2001).

## 2. *Time of Flights*

Jenis analisa ini diterapkan untuk semua ion dengan menggunakan gaya elektrostatik yang menyebabkan ion akan dipercepat melewati tabung analisa massa. Fragmentasi ion analisa massa jenis Time of flight ditentukan oleh kedatangan ion pada detektor. Kisaran massa senyawa hasil analisa yang diperoleh lebih luas dan akurat (Agilent Teknologi, 2001).

## 3. Perangkap ion

Bagian dari analisa massa perangkap ion terdiri atas elektroda melingkar cincin dua penutup di dua ujungnya membentuk sebuah ruang. Ruang tersebut digunakan untuk menjebak ion dengan medan elektromagnetik sedangkan bagian lain digunakan untuk mengeluarkan ion dengan memilahnya dari perangkap (Agilent teknologi, 2001).

## 4. *Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR)*

FT-ICR merupakan bentuk lain dari perangkap ion. Ion memasuki ruangan kemudian terjebak dalam lingkaran orbit oleh medan listrik dan medan magnet yang kuat yang ada dalam perangkap ion. Eksitasi dilakukan oleh frekwensi radio (RF) dalam medan listrik, ion dapat menghasilkan arus bergantung dengan waktu. Arus yang dihasilkan kemudian dikonversi menjadi frekwensi orbital sesuai dengan rasio massa muatan relatifnya oleh fourier (Agilent Teknologi, 2001).

### 2.7.1 Penggabungan MS dengan Metode *Liquid chromatography*.

Hasil teknik ionisasi tekanan atmosfer menghasilkan:

1. Molekul ion  $M^+$
2. Molekul terprotonasi  $[M+H]^+$
3. Ionisasi molekul sederhana  $[M+Na]^+$
4. Ion yang mewakili kehilangan molekul sederhana seperti hilangnya air  $[M+H-H_2O]^+$

Berat molekul yang dihasilkan dapat memberikan informasi yang dapat melengkapi informasi struktural. Ion analit terfragmentasi karena molekul bertabrakan dengan molekul netral yang dikenal sebagai disosiasi tabrakan induksi atau disosiasi tabrakan diaktifkan (Agilent Teknologi, 2001).

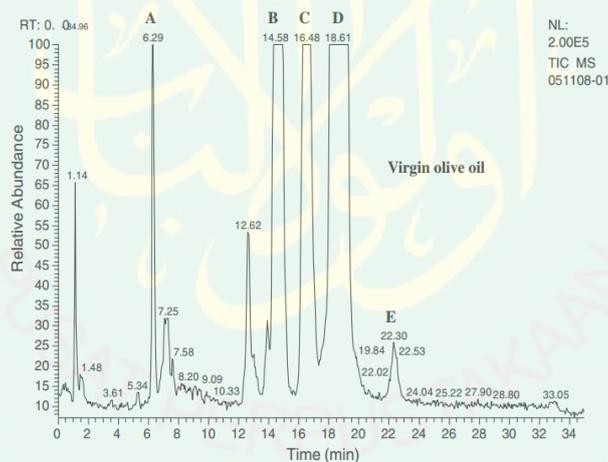
Penggunaan LC-MS dapat digunakan untuk analisa kualitatif maupun kuantitatif. Identifikasi menggunakan LC-MS untuk analisa kualitatif tidak hanya memberikan nilai waktu retensi seperti pada HPLC namun LC-MS memberikan informasi mengenai pemisahan ion suatu senyawa. Suatu senyawa yang diidentifikasi dilihat dari pola fragmentasi dengan melihat perbandingan massa terhadap muatan yang dihasilkan. Hasil analisa LC-MS disebut dengan spektrogram dengan menunjukkan nilai berat molekul  $m/z$  dan luas area kromatogram (Rahayu, 2014).

### 2.7.2 Identifikasi Senyawa Steroid dengan LC-MS

Steroid dapat diidentifikasi menggunakan *Liquid chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS) dengan menggunakan APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) positif mode sebagai sumber ionisasi. APCI mode

menganalisa  $m/z$  dengan range 70 – 1000. Sistem LC menggunakan alliance 2695 lengkap dengan autosampler, degasser, dan pemanas kolom. MS sistem menggunakan ZQ 2000 single quadropole. Data yang diperoleh dari LC-MS dikumpulkan dengan menggunakan software MassLynx 4.0. Kolom yang digunakan adalah kolom  $C_{18}$  150 x 2,1 mm dengan fasa gerak asetonitril/air (0,01 % asam asetat) dengan laju alir 0,5 mL/menit (Diaz 2006).

Identifikasi senyawa steroid dari minyak zaitun yang diidentifikasi menggunakan LC-MS dengan kondisi tersebut menghasilkan kromatogram seperti pada Gambar 2.4 berikut ini.

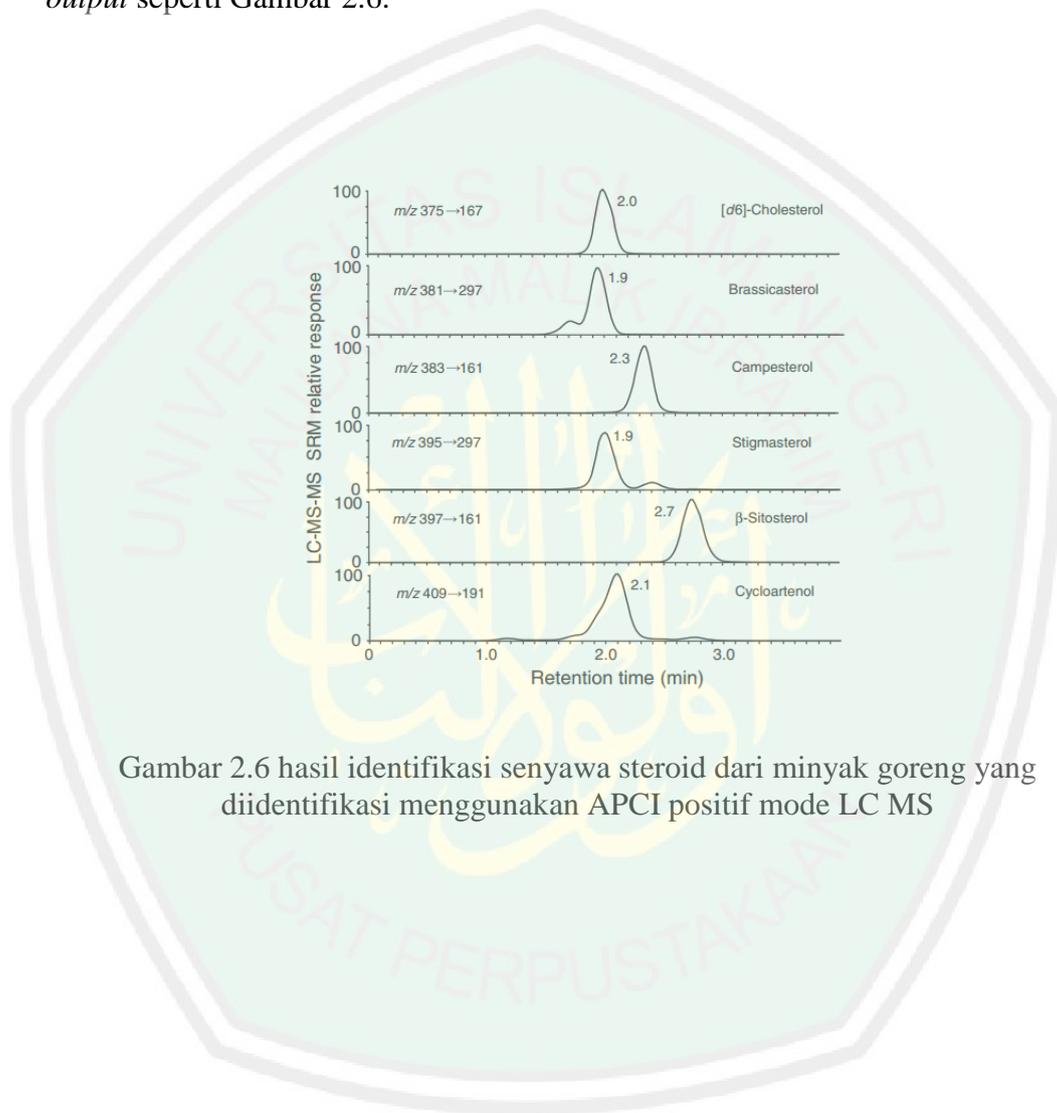


Gambar 2.5 Identifikasi senyawa steroid dari minyak zaitun menunjukkan adanya senyawa *erytrodial* dan *uvaol*  $m/z$  425,30 (A), *cholesterol*  $m/z$  369,20 dan *fucosterol*  $m/z$  395,30 (B), *stigmasterol*  $m/z$  395,30 (C),  $\beta$ -*sitosterol*  $m/z$  397,30 (D), *sitostanol*  $m/z$  397,30 (E) (Diaz, 2006)

Mo dkk., (2013) melakukan analisa senyawa fitosterol dari minyak goreng menggunakan APCI *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. Hasil analisa menunjukkan 6 puncak senyawa yang memiliki nilai *Retention Time* yang

berbeda. Puncak-puncak tersebut menunjukkan adanya senyawa [d6]-cholesterol, brassicasterol, campesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, cycloartenol

Hasil identifikasi senyawa steroid dari minyak goreng menghasilkan *output* seperti Gambar 2.6.



Gambar 2.6 hasil identifikasi senyawa steroid dari minyak goreng yang diidentifikasi menggunakan APCI positif mode LC MS

## **BAB III**

### **METODOLOGI**

#### **3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan akan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan April – Juni 2016

#### **3.2 Alat Dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelien ini adalah seperangkat alat gelas, neraca analitik, mortar, pisau, kertas saring, corong buchner, rotary evaporator, shaker, vortex, corong pisah, desikator, oven, desikator, seperangkat pipet volume, seperangkat pipet ukur, pipet tetes, bejana kromatografi, sentrifuge, plat KLT, lampu UV dan seperangkat alat LC-MS.

##### **3.2.2 Bahan**

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini alga merah (*Eucheuma spinosum*) yang berasal dari pantai Pamekasan Madura, metanol p. a, petroleum eter p. a, akuades, HCl 2 N, larva udang, natrium bikarbonat, n-heksana, etil asetat, dimetil sulfoksida, ragi roti, kloroform, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, asam asetat anhidrat.

#### **3.3 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian eksperimental di laboratorium. Alga merah yang telah diambil dibersihkan dari kotoram kemudian dikeringkan dan ditentukan nilai kadar airnya. Sampel dihaluskan kemudian dimaserasi

menggunakan metanol sampai semua senyawa di dalamnya terambil oleh pelarut. Hasil maserasi dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* kemudian dihidrolisis menggunakan HCl dan difraksinasi menggunakan petroleum eter. Sebagian fraksi petroleum eter dipisahkan senyawanya menggunakan KLT preparatif. Hasil KLT preparatif yang berupa steroid dikerok dan dibuat berbagai konsentrasi kemudian diujikan toksisitas menggunakan metode BSLT. Konsentrasi yang digunakan dalam percobaan ini terdiri dari 6 variasi:

M<sub>1</sub>: 30 ppm

M<sub>2</sub>: 25 ppm

M<sub>3</sub>: 20 ppm

M<sub>4</sub>: 15 ppm

M<sub>5</sub>: 10 ppm

M<sub>6</sub>: 5 ppm

Yang kemudian dilakukan ulangan sebanyak 5 kali ulangan. Dari hasil uji tosisitas tersebut diamati jumlah udang yang mati dari total larva uji. Kemudian dihitung nilai LC<sub>50</sub> dengan memasukkan nilai angka probit. Nilai LC<sub>50</sub> teredah merupakan senyawa steroid yang mempunyai aktivitas toksik terbaik. Isolaat steroid diidentifikasi menggunakan FTIR dan yang memiliki sifat paling toksik diidentifikasi menggunakan LC-MS.

### 3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan langkah langkah sebagai berikut:

1. Preparasi sampel
2. Penentuan kadar air secara thermogravimetri

3. Uji kadar garam
4. Ekstraksi sampel
5. Hidrolisis dan Ekstraksi cair-cair (partisi) Ekstrak pekat metanol
6. Uji fitokimia
7. Pemisahan senyawa steroid dari ekstrak kasar dengan KLT analitik
8. Pemisahan senyawa steroid dari ekstrak kasar dengan KLT preparatif
9. Uji toksisitas isolat steroid menggunakan metode BSLT
10. Identifikasi isolat steroid dengan FTIR
11. Identifikasi isolat steroid menggunakan LC-MS

### **3.5 Cara Kerja**

#### **3.5.1 Preparasi Sampel**

Sampel yang digunakan merupakan sampel alga merah sebanyak 10 Kg kemudian dicuci dengan air. Sampel bersih diiris kecil-kecil dan dikeringkan tanpa menggunakan pemanasan matahari, dengan menggunakan oven pada suhu 38 °C selama 24 jam. Setelah proses pengeringan alga merah kemudian dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan 60 – 250 mesh.

#### **3.5.2 Penentuan Kadar Air secara Termografimetri (Kholidiyah, 2013)**

Pada penentuan kadar air, cawan porselen disiapkan, lalu dipanaskan dalam oven pada suhu 105 °C sekitar 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya. Cawan disimpan dalam desikator sekitar 10 menit, lalu ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Kemudian 5 gram sampel dimasukkan dalam cawan porselen dan dimasukkan dalam oven pada suhu 105 °C selama  $\pm 15$  menit. Sampel kemudian disimpan dalam desikator sekitar  $\pm 10$  menit

dan ditimbang, sampel tersebut dipanaskan kembali dalam oven  $\pm$  15 menit, didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi sampai berat konstan.

Kadar air dapat dihitung menggunakan persamaan:

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

Dimana:

a = Bobot cawan kosong

b = bobot sampel + cawan sebelum dikeringkan

c = bobot cawan + sampel setelah dikeringkan

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}} \times 100 \% \dots\dots\dots(3.2)$$

% kadar terkoreksi = Kadar air – faktor koreksi

### 3.5.3 Uji Kadar Garam

Sebanyak 5 gram sampel dimasukkan ke dalam *beaker glass* kemudian ditambahkan dengan 10 mL akuades, dan diaduk selama 5 menit. Ekstraksi diulangi sebanyak 5 kali pada sampel agar garam dapat larut dalam akuades. Sampel kemudian disaring menggunakan penyaring *vacuum buchner* agar penyaringan maksimal. Garam yang sudah terekstrak ke dalam pelarut akuades diukur kadarnya menggunakan salinometer.

### 3.5.4 Ekstraksi Sampel (Anam dkk., 2015)

Ekstraksi komponen aktif dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi atau perendaman. Alga merah yang telah dikeringkan ditimbang sebanyak 50 g dan diekstraksi secara maserasi menggunakan 250 mL pelarut metanol. Perendaman dilakukan selama 24 jam dan dilakukan pengocokan menggunakan shaker dengan kecepatan 150 rpm. Setelah itu, filtrat disaring menggunakan corong *buchner*.

Ampas yang diperoleh dimaserasi kembali menggunakan pelarut yang sama sebanyak 3 kali pengulangan dengan perlakuan yang sama, setelah itu dilakukan penyaringan. Ketiga fitrat yang diperoleh digabung menjadi satu dan dipekatkan menggunakan *rotary vacum evaporator*. Ekstrak pekat ditimbang lalu dihitung rendemennya

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

### 3.5.5 Hidrolisis dan Ekstraksi Cair-cair (partisi) Ekstrak Pekat Metanol (Setiyawan dkk., 2015)

Ekstrak pekat metanol alga merah *Eucheuma spinosum* sebanyak 2,5 gram, dimasukkan ke dalam *beaker glass*, kemudian dihidrolisis dengan menambahkan 5 mL asam klorida (HCl) 2N ke dalam ekstrak pekat dengan perbandingan (1:2). Hidrolisis dilakukan selama 1 jam menggunakan *magnetik stirer hot plate* pada suhu ruang. Hidrolisat yang diperoleh ditambahkan dengan Natrium bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) sampai pH-nya netral, lalu dipartisi dengan 25 mL metanol dan 25mL pelarut petroleum eter. Perlakuan tersebut dilakukan dengan 3x pengulangan. Ekstrak hasil partisi dipekatkan dengan *rotary evaporator*, ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemennya.

### 3.5.6 Uji Fitokimia Senyawa Steroid (Indrayani dkk., 2006).

Ekstrak kasar dimasukkan ke dalam tabung reaksi dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, lalu ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrida dan 1 – 2 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat melalui dinding tabung. Jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya golongan senyawa steroid.

### **3.5.7 Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga Merah Kasar menggunakan KLT Analitik**

Pemisahan dengan KLT analitik digunakan plat silika G60F<sub>254</sub> dengan ukuran 1 cm x 10 cm yang sudah diaktifkan dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100 °C selama 10 menit. Masing-masing plat dengan ukuran 1 cm x 10 cm. Fraksi petroleum eter ekstrak metanol alga merah (*Eucheuma spinosum*) ditotolkan pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler kemudian dikeringkan dan dielusi dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (17:3) (Setiyawan, 2015). Setelah eluen mencapai garis batas, elusi dihentikan. Noda yang terbentuk diukur harga R<sub>f</sub> nya. Noda yang terbentuk disemprot dengan menggunakan reagen Libermann-Buchard yang kemudian diperiksa dengan lampu UV-Vis pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

### **3.5.8 Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga Merah menggunakan KLT Preparatif**

Pemisahan senyawa dengan KLTP digunakan plat silika gel GF<sub>254</sub> dengan ukuran 10x20 cm. Ekstrak pekat hasil ekstraksi ditotolkan sepanjang plat pada jarak 1 cm dari garis tepi bawah dan 1 cm dari garis tepi plat dengan pipa kapiler. Sampel kemudian dikeringkan dan dielusi sejauh 18 cm dengan menggunakan eluen yang berupa n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17:3 yang merupakan eluen yang memberikan pemisahan terbaik (Setiyawan,2015). Setelah larutan pengembang sampai pada titik batas, elusi dihentikan. Plat hasil elusi dikeringkan, noda yang terbentuk diamati dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. Noda yang diduga merupakan senyawa golongan steroid dikerok kemudian dilarutkan dalam pelarut yang memisahkannya selanjutnya disentrifugasi untuk

mengendapkan silikanya. Dipisahkan silika dari supernatannya dan diuapkan pelarutnya.

### **3.5.9 Uji Toksisitas**

#### **3.5.9.1 Penetasan Telur (Juniarti, 2009)**

Sebanyak 250 mL air laut dimasukkan dalam botol penetasan, dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina* Leach. Selanjutnya diaeserasi dan telur akan menetas dalam waktu  $\pm$  48 jam dan siap digunakan sebagai target uji toksisitas.

#### **3.5.9.2 Uji Toksisitas**

Perlakuan uji dilakukan 5 kali pengulangan pada masing masing sampel. Botol disiapkan untuk pengujian, masing-masing ekstrak membutuhkan 5 botol dan 1 botol untuk kontrol. konsentrasi dibuat 30 ppm, 25 ppm, 20ppm, 15 ppm, 10 ppm 5 ppm dan 0 sebagai kontrol. Larutan uji tersebut kemudian di masukkan dalam vial dan diuapkan pelarutnya. Setelah pelarutnya menguap, ditambahkan dengan 100  $\mu$ L dimetil sulfoksida (DMSO), setetes larutan ragi roti dan air laut sampai volumenya 10 mL. Larutan uji ditambahkan dengan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L. 10 ekor

Kontrol digunakan untuk pembandingan terhadap DMSO dan pelarut. Sehingga kontrol dibuat dengan 3 variasi, yaitu, tanpa penambahan sampel, dengan penambahan DMSO, dan dengan penambahan DMSO dan pelarut yang diperlakukan sama dengan sampel yang digunakan. Kemudian larutan kontrol ditambahkan air laut sampai volumenya 10 mL, kemudian larva udang *Artemia salina* L. sebanyak 10 ekor. Pengamatan dilakukan selama 24 jam terhadap

kematian larva udang kemudian dianalisa menggunakan analisa probit untuk menunjukkan nilai LC<sub>50</sub> dengan menghitung nilai % mortilitas larva udang

$$\% \text{ mortilitas} = \frac{\text{jumlah larva yang mati}}{\text{jumlah artemia yang diuji}} \times 100\%$$

### 3.5.10 Identifikasi menggunakan FTIR

Isolat hasil KLT preparatif digerus bersama dengan KBr menggunakan mortar agate. Kemudian dipres selama 10 menit pada tekanan 80 Torr. Lalu diletakkan dalam instrumentasi FIR dan dilakukan identifikasi.

### 3.5.10 Identifikasi dengan LC-MS

Isolat senyawa steroid yang memiliki sifat paling toksik dianalisa menggunakan LC-MS/MS. Kolom yang digunakan dengan spesifikasi *hypersil gold* (50 mm x 2.1 mm x 1,9 μm). UHPLC merk ACCELLA type 1250 buatan *Thermo Scientific* yang terdiri dari *degasser* vakum, pompa *quaterner*, *autosampler* thermostatik yang dikendalikan oleh komputer melalui program x-calibur 2.1. Fasa gerak yang digunakan adalah 0,1% asam format dalam air (fasa A) dan 0,1% asam format dalam asetonitril (fase B). Pengaturan eluen secara gradien linier 100% (A) : 0% (B) sampai 0% (A) : 100% (B) yang diatur selama 5 menit dengan laju alir 500 μL/menit. Volume yang diinjeksikan 2μL. Kolom dikontrol pada suhu 30 °C, dan kompartemen autosampler ditetapkan untuk 10 °C.

MS yang digunakan adalah MS/MS triple Q (*Quadrupole*) spektrometer massa TSQ QUANTUM ACCESS MAX dari Thermo Finnigan dengan sumber ionisasi APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) dikendalikan oleh software TSQ Tune yang dikendalikan dengan mode positif. Kondisi ion APCI

adalah sebagai berikut: Arus yang digunakan 4 $\mu$ A, Suhu penguapan 250 °C, Suhu kapiler 300 °C, sheat gas pressure 45 arbitrary units, dan Aux gas pressure 15 arbitrary units.

### 3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari isolasi senyawa steroid menggunakan KLT preparatif dianalisa secara deskriptif dengan memperhatikan pola pemisahan pada kromatogram. Identifikasi senyawa steroid dilakukan dengan menginterpretasikan hasil kromatogram dan spekta MS yang dihasilkan dari LC-MS. Sehingga dapat ditentukan jenis senyawa steroid yang terdapat dalam Alga merah (*Eucheuma spinosum*). Uji toksisitas menghasilkan data berupa angka kematian dari larva udang. Angka kematian yang dihasilkan kemudian diolah untuk mendapatkan nilai angka probit menggunakan program MINITAB16 dengan tingkat kepercayaan 95 %. Hasil pengolahan data tersebut berupa nilai LC<sub>50</sub> yang menunjukkan nilai konsentrasi yang menyebabkan 50 % kematian.

## **BAB IV**

### **PEMBAHASAN**

Penelitian uji toksisitas dan identifikasi senyawa steroid fraksi petroleum eter dari ekstrak metanol alga merah (*Eucheuma spinosum*) dilakukan dengan beberapa tahapan meliputi preparasi sampel, analisa kadar air, analisis kadar garam, ekstraksi sampel, hidrolisis dan partisi ekstrak pekat metanol. Senyawa steroid fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah dipisahkan dengan KLT analitik. Senyawa steroid fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah dipisahkan dengan KLT preparatif. Uji toksisitas steroid menggunakan metode BSLT yang kemudian dilanjutkan untuk identifikasi senyawa steroid menggunakan LC-MS dan FTIR.

#### **4.1 Preparasi Sampel**

Sampel alga merah (*Eucheuma spinosum*) basah didapatkan dari pantai jumiang Pamekasan Madura. Sampel tersebut kemudian dicuci bersih untuk menghilangkan kotoran lainnya yang masih menempel pada tallusnya. Alga bersih dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 37-40 °C. Pengeringan tersebut dilakukan supaya senyawa dalam sampel alga merah *Eucheuma spinosum* tidak mengalami kerusakan karena suhu yang tinggi

Alga merah kering berwarna kuning kecoklatan kemudian dihaluskan menggunakan penggiling dan dihasilkan serbuk sampel sebesar 90 mesh. Penyerbukan sampel ini bertujuan untuk memperluas permukaan sampel sehingga proses ekstraksi akan menjadi maksimal dan pelarut dapat terserap langsung ke dalam sampel dan menembus dinding sampel. Semakin kecil sampel luas

permukaan semakin besar dan interaksi antara pelarut dan sampel semakin besar dan hasil maserasi yang diperoleh maksimal. Hasil yang didapat dari proses ini menunjukkan bahwa dari 32 Kg sampel basah didapatkan serbuk *Eucheuma spinosum* 750 gram.

#### 4.2 Analisis Kadar Air

Penentuan kadar air pada sampel bertujuan untuk mengetahui kadar air dalam sampel *Eucheuma spinosum*. Kadar air dalam sampel dapat berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroorganisme, lama penyimpanan, dan proses ekstraksi. Analisis kadar air dilakukan dengan metode *thermogravimetri* menggunakan oven pada suhu 105 – 110 °C sampai menghasilkan berat konstan. Selisih antara berat sampel sebelum dipanaskan dan sesudah dipanaskan merupakan nilai kadar air (Winarno, 2002).

Cawan porselen kosong dipanaskan pada suhu 105 – 110 °C selama 15 menit supaya kandungan air dalam cawan hilang, kemudian diletakkan dalam desikator selama 10 menit untuk menghindari penyerapan kelembaban udara oleh cawan. Perlakuan tersebut di ulang sampai mendapatkan berat cawan konstan. Cawan tersebut kemudian ditambahkan dengan sampel alga merah *Eucheuma spinosum* basah maupun kering yang telah dipotong kecil-kecil. Sampel yang telah berada dalam cawan diberi perlakuan yang sama seperti cawan kosong tersebut sampai beratnya konstan.

Analisis kadar air dilakukan dengan pengulangan sebanyak 3 kali ulangan dengan tujuan agar diperoleh data yang tepat. Data perhitungan kadar air dengan sampel alga merah *Eucheuma spinosum* ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Kadar air yang terkandung dalam alga merah *Eucheuma spinosum*.

Sampel	Kadar air yang terkandung dalam sampel alga merah <i>Eucheuma spinosum</i>			
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	Rata-rata
Alga merah basah	90,57%	89,42 %	89,92 %	89,97%
Alga merah kering	8,12 %	8 %	8,20 %	8,10 %

Kandungan air dalam alga merah cukup tinggi, yaitu sebesar 89,97 %. Sedangkan, nilai kadar air alga kering adalah sebesar 8,10 %. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Cahyono (2011) bahwa kadar air >10% akan menyebabkan reaksi enzimatik yang akan mempercepat pembusukan dan dapat mempercepat tumbuhnya mikroorganisme. Sehingga sampel alga merah *Eucheuma spinosum* memiliki nilai kadar air yang baik untuk proses maserasi, semakin rendah nilai kadar air sampel maka akan lebih mudah pelarut untuk mengekstrak komponen senyawa aktif yang diinginkan, dapat bertahan lama dan terhindar dari tumbuhnya mikroorganisme.

#### 4.3 Analisis Kadar Garam

Analisis kadar garam pada alga merah dilakukan untuk mengukur kandungan garam pada sampel. Kadar garam sering disebut sebagai salinitas. Salinitas dipengaruhi oleh kondisi lingkungan tempat alga tumbuh, sehingga setiap wilayah perairan tempat tumbuh alga memiliki kadar salinitas yang berbeda.

Penetapan kadar garam ini dilakukan karena dapat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan kematian larva udang *Artemia salina* L. *Artemia salina* hidup pada air laut yang memiliki rentang salinitas tinggi (15 – 300 ppt) (Aras, 2003).

Menurut Suprpto (2010) kadar garam  $> 20$  ppt akan menyebabkan kematian larva udang galah dalam waktu yang singkat.

Penetapan kadar garam dilakukan dengan menggunakan salinometer. Salinometer merupakan alat yang digunakan untuk mengukur salinitas. Pengukurannya didasarkan pada daya hantar listrik dari sampel yang digunakan. Semakin tinggi salinitas maka semakin besar daya hantar listriknya.

Alga merah *Eucheuma spinosum* kering dilarutkan dalam aquades untuk mengekstrak kandungan garam yang ada dalam sampel. Setelah diasumsikan semua garam yang terkandung dalam alga merah telah terekstrak kemudian diuji menggunakan salinometer. Pengujian dilakukan dengan meneteskan ekstrak garam pada sensor salinometer. Hasil pengujian kadar garam alga merah *Eucheuma spinosum* adalah sebesar 13 %.

Berdasarkan penelitian Hanapi, dkk (2013) kadar garam *Eucheuma spinosum* sebesar 11,5 %. Hal tersebut berbeda dikarenakan kadar air sampel yang digunakan berbeda. Semakin tinggi kadar air maka semakin kecil kadar garam dari sampel.

#### 4.4 Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi maserasi. Ekstraksi maserasi dipilih karena caranya yang sederhana, murah, mudah dilakukan, dan tidak memerlukan pemanasan yang dapat merusak senyawa. Sampel akan mengalami pemecahan dinding sel karena perbedaan tekanan antara luar dan di dalam sel bila

ditambah dengan pelarut. Sehingga metabolit sekunder dalam sitoplasma akan bergerak menuju pelarut.

Ekstraksi maserasi dilakukan dengan merendam serbuk alga merah ke dalam pelarut metanol p.a. kemudian diaduk menggunakan shaker dengan kecepatan 120 rpm selama 3 jam pada suhu kamar. Pengadukan dilakukan untuk memaksimalkan kontak antara pelarut. Setelah dilakukan pengadukan, sampel didiamkan selama 24 jam dan dilakukan penyaringan untuk memisahkan filtrat dan residu. Pengulangan maserasi tersebut dilakukan sebanyak 3 kali ulangan.

Penggunaan metanol dikarenakan senyawa metabolit sekunder bahan alam berikatan glikosida dengan gugus gulanya, sehingga digunakan pelarut polar untuk mengekstrak senyawa bahan alam tersebut. Menurut Astarina (2013) metanol merupakan pelarut universal karena terdapat gugus polar (-OH) dan nonpolar (-CH<sub>3</sub>) pada metanol. Sedangkan menurut Atun (2014) metanol memiliki titik didih lebih rendah dibandingkan etanol, sehingga lebih mudah diuapkan pada suhu yang lebih rendah, tetapi memiliki sifat toksik. Sedangkan etanol yang memiliki titik didih lebih tinggi lebih sulit diuapkan walaupun tidak memiliki sifat toksik.

Filtrat yang dihasilkan ditampung dan dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator*. Ekstrak cair hasil maserasi dimasukkan ke dalam labu alas bulat dengan volume 2/3 bagian, kemudian waterbath dipanaskan sesuai dengan suhu pelarut yang digunakan yaitu 50 °C. Setelah suhu tercapai, labu alas bulat yang telah berisi sampel dipasang dengan kuat pada ujung rotor yang menghubungkan dengan kondensor. Selanjutnya aliran air pendingin dan pompa vakum dijalankan. *Vacum rotary evaporator* merupakan alat yang menggunakan prinsip penurunan tekanan sehingga pelarut dapat menguap pada suhu di bawah titik didihnya.

Penguapan terjadi karena pemanasan yang dipercepat oleh putaran dari labu alas bulat yang dibantu dengan penurunan tekanan, dengan bantuan pompa vakum. uap pelarut naik ke kondensor dan mengalami kondensasi menjadi cair kembali pada penampung pelarut. Penguapan pelarut dengan *vacum rotary evaporator* dihentikan setelah diperoleh ekstrak pekat, dan tidak ada pelarut yang menetes pada labu alas bulat penampung. Setelah proses penguapan selesai, vakum rotary evaporator dihentikan dan dihasilkan ekstrak coklat.

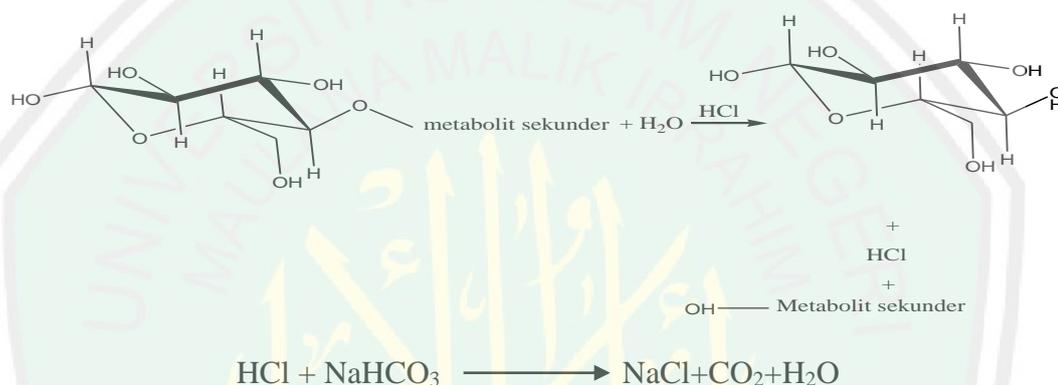
Hasil ekstrak pekat yang didapatkan pada penelitian ini sebesar 3,60 %. Sedangkan penelitian Setiyawan (2015) menghasilkan rendemen sebesar 8,54 %. Perbedaan hasil rendemen terjadi karena perbedaan umur panen antara sampel yang digunakan. penelitian tersebut menggunakan sampel berusia 45 hari sesuai dengan umur panen *Euheuma spinosum* (Fahrul, 2006), sedangkan pada penelitian ini digunakan sampel dengan umur 38 hari.

#### **4.5 Hidrolisis dan Partisi**

Hidrolisis merupakan reaksi kimia yang digunakan untuk memutus ikatan glikosida dengan memecah molekul menjadi dua bagian (glikon dan aglikon) dengan penambahan molekul air ( $H_2O$ ). Reaksi hidrolisis berjalan lambat sehingga perlu bantuan katalisator untuk mempercepat reaksi. Salah satu katalis yang dapat digunakan untuk hidrolisis adalah HCl.

Hidrolisis dilakukan dengan menimbang ekstrak pekat metanol *Euheuma spinosum* kemudian ditambahkan HCl 2 N sebagai katalis. Campuran diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam pada suhu ruang supaya HCl dan ekstrak pekat tercampur maksimal dan gula yang dihasilkan maksimal.

Hidrolisat yang diperoleh kemudian ditambahkan natrium bikarbonat sampai pHnya netral. Penetralan pH dengan natrium bikarbonat digunakan untuk menghentikan reaksi hidrolisis. Reaksi hidrolisis berjalan secara bolak balik sehingga perlu dihentikan supaya reaksi tidak kembali menjadi reaktan. Reaksi yang terjadi saat hidrolisis glikosida dan penetralan ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Reaksi hidrolisis glikosida dan reaksi penetralan (Mardiyah, 2014).

Setelah proses hidrolisis selesai proses dilanjutkan dengan partisi (ekstraksi cair-cair). Ekstraksi cair-cair ekstrak metanol *Euheuma spinosum* dilakukan dengan menggunakan pelarut petroleum eter. Petroleum eter digunakan untuk memisahkan senyawa yang memiliki sifat nonpolar dalam ekstrak metanol. Komponen gula (glikon) akan terekstrak dalam pelarut yang bersifat polar (fase air) sedangkan aglikon akan terekstrak pada fase petroleum eter.

Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali ulangan untuk memaksimalkan distribusi senyawa nonpolar pada petroleum eter. Lapisan organik yang diperoleh diuapkan pelarutnya menggunakan *vacuum rotary evaporator*. Hasil pemekatan ditimbang dan didapatkan hasil sebesar 14,072 % dari ekstrak metanol yang digunakan.

#### 4.6 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Uji fitokimia senyawa steroid digunakan untuk mengetahui keberadaan senyawa steroid pada fraksi petroleum eter ekstrak metanol alga merah *Eucheuma spinosum*. Pengujian ini dilakukan dengan mengamati perubahan warna dari ekstrak pekat bila ditambahkan dengan reagen Liebermann-Buchard.

Uji fitokimia senyawa steroid dilakukan dengan menambahkan kloroform untuk melarutkan senyawa steroid yang ada dalam sampel. Setelah sampel larut semua ditambahkan dengan asam asetat anhidrat yang digunakan untuk membentuk turunan asetil setelah penambahan kloroform. Kemudian ditambahkan dengan asam sulfat untuk membentuk garam karena terjadi proses dehidrasi (Lemberg *et al.*, 1946).

Hasil uji fitokimia fraksi petroleum eter ekstrak metanol alga merah *Eucheuma spinosum* terdapat warna cincin hijau. Menurut astarina (2013) uji fitokimia senyawa steroid pada suatu ekstrak kasar dengan menggunakan reagen Liebermann buchard akan membentuk warna cincin biru kehijauan bila terdapat senyawa steroid. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Setiyawan (2015) bahwa terdapat isolat steroid pada hasil isolasi fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah *Eucheuma spinosum*.

#### 4.7 Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga

##### **Merah *Eucheuma spinosum* menggunakan KLTA.**

Isolasi senyawa menggunakan KLTA digunakan untuk mengetahui eluen terbaik, pola pemisahan senyawa dan untuk membuktikan bahwa eluen yang

digunakan merupakan eluen terbaik untuk memisahkan senyawa. Isolasi menggunakan KLTA dilakukan dengan silika yang dilapiskan pada plat alumunium sebagai fasa diam. Identifikasi hasil KLTA dapat dilakukan dengan menentukan nilai Rf, menyemprot dengan reagen penampak, dan dengan menggunakan penyinaran dibawah lampu UV.

Pemisahan senyawa steroid pada fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah dilakukan dengan KLTA dilakukan dengan menjenuhkan eluen n-heksana : etil asetat (17:3) selama 1 jam supaya maksimal dalam memisahkan senyawa dalam bejana pengembang. Plat yang akan digunakan diaktivasi pada suhu 100 °C untuk menghilangkan kandungan air pada plat supaya pemisahan tidak dipengaruhi oleh adanya air yang masih terjerap dalam pori-pori silika. Kemudian sampel ditotolkan dan di elusi sampai eluen mencapai batas atas elusi.

Identifikasi hasil kromatografi dilakukan dengan menggunakan penyinaran dibawah lampu UV pada panjang gelombang 366 nm. Spot yang nampak ditandai dan dihitung nilai Rf pada masing masing spot. Hasil dari Kromatografi Lapis Tipis (KLT) fraksi petroleum eter ekstrak metanol alga merah *Eucheuma spinosum* dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Profil kromatografi lapis tipis analitik (KLTA) fraksi petroleum eter ekstrak metanol dari alga merah (*Eucheuma spinosum*) menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (17:3).

Gambar 4.2 tersebut merupakan hasil KLT menggunakan fasa gerak n-heksana : etil asetat (17:3). Penggunaan eluen tersebut dikarenakan eluen tersebut merupakan eluen terbaik berdasarkan penelitian Setiyawan (2015) yang telah melakukan variasi eluen untuk memisahkan senyawa dari fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah *Eucheuma spinosum*. Hasil KLTA menunjukkan 8 noda dengan perbedaan nilai Rf.

Perbedaan nilai Rf dari masing-masing isolat terjadi karena perbedaan struktur dan distribusi senyawa terhadap fasa gerak dan fasa diam. Perbandingan antara konsentrasi senyawa dalam fasa diam dengan konsentrasi senyawa dalam fasa gerak merupakan nilai distribusi dari senyawa yang dapat terpisah. Senyawa yang memiliki nilai distribusi yang besar maka senyawa tersebut lebih tertahan

(terdistribusi) dalam fasa diam sehingga memiliki nilai Rf yang kecil. Sedangkan senyawa yang memiliki nilai distribusi yang kecil maka senyawa tersebut lebih terdistribusi dalam fasa gerak sehingga nilai Rf dari senyawa tersebut besar.

Hasil isolasi tersebut kemudian diidentifikasi menggunakan pereaksi Liebermann-Buchard yang disemprotkan terhadap hasil isolasi pada plat tersebut. Hasil identifikasi senyawa yang telah diisolasi ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil kromatografi lapis tipis analitik fraksi petroleum eter ekstrak metanol *Eucheuma spinosum* menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (17:3)

Noda ke-	Rf	Warna sebelum disemprot Liebermann-Buchard	Warna sesudah disemprot Liebermann-Buchard	Dugaan senyawa
1	0,096	Coklat	Merah	Triterpenoid
2	0,165	Merah	Merah	Triterpenoid
3	0,344	Merah	Merah	Triterpenoid
4	0,551	Merah	Merah	Triterpenoid
5	0,613	Merah	Merah	Triterpenoid
6	0,668	Biru	Biru	Steroid
7	0,813	Biru	Biru	Steroid
8	0,910	Hijau	Hijau	Steroid

Hasil identifikasi menggunakan pereaksi Liebermann-Buchard terdapat warna hijau pada hasil isolasi. Menurut Handayani (2008) senyawa yang mempunyai bercak warna hijau-biru setelah disemprot reagen Liebermann-Buchard merupakan senyawa steroid. Hasil isolasi tersebut terdapat 3 noda yang diansumsikan merupakan senyawa steroid.

#### **4.8 Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma spinosum* menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif.**

Penggunaan metode kromatografi lapis tipis preparatif berbeda dengan kromatografi lapis tipis analitik. KLTA digunakan untuk melihat profil pemisahan senyawa dan digunakan untuk menentukan eluen terbaik. Sedangkan KLTP digunakan untuk memperoleh isolat dengan menggunakan eluen terbaik hasil KLTA. Pada KLTP fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol ditotolkan sepanjang garis disalah satu sisi plat. Efisiensi pemisahan senyawa dengan menggunakan KLTP dapat dilihat dari lamanya kontak senyawa dengan eluen yang digunakan. Semakin besar kontak dengan eluen maka pemisahan senyawanya semakin baik (Handayani, 2008).

Fasa diam yang digunakan merupakan plat alumunium yang dilapisi dengan silika. Fasa diam tersebut dapat berpendarflour dalam sinar ultraviolet. Fasa diam KLTP digunakan plat GF<sub>254</sub> dengan ukuran 10 x 20 cm. Plat yang digunakan terlebih dahulu diaktifasi untuk menghilangkan uap air yang dapat mengganggu elusi. Fraksi petroleum eter ekstrak metanol alga merah *Eucheuma spinosum* ditotolkan sepanjang plat pada jarak 1 cm dari garis bawah dan 1 cm dari garis tepi. Hasil penotolan kemudian dielusi dengan pelarut yang digunakan.

Eluen yang digunakan adalah campuran pelarut n-heksana : etil asetat (17:3). Setelah elusi mencapai titik batas atas elusi dihentikan, Noda-noda hasil pemisahan kemudian diidentifikasi dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm yang akan memberikan warna pada spot senyawa yang berhasil dipisahkan. Hasil identifikasi pemisahan senyawa menggunakan KLTP ditunjukkan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Hasil kromatografi lapis tipis preparatif fraksi petroleum eter hasil hidrolis ekstrak metanol alga merah menggunakan eluen n heksana : etil asetat (17:3)

Noda ke-	Rf	Warna noda	Dugaan Senyawa
1	0,088	Merah	Triterpenoid
2	0,122	Merah	Triterpenoid
3	0,266	Merah	Triterpenoid
4	0,444	Merah	Triterpenoid
5	0,527	Biru	Steroid
6	0,633	Biru	Steroid
7	0,694	Hijau	Steroid
8	0,794	Merah	Triterpenoid

Hasil noda pada pemisahan menggunakan KLTP terdapat 3 senyawa steroid yang berada pada isolat 5, 6, dan 7. Isolat steroid hasil isolasi tersebut umumnya memiliki nilai Rf yang besar. Hal tersebut terjadi karena perbedaan struktur dan distribusi senyawa steroid dalam fasa diam dan fasa gerak yang digunakan. Nilai distribusi dinyatakan dengan perbandingan antara konsentrasi senyawa dalam fasa diam terhadap konsentrasi senyawa dalam fasa gerak. Nilai distribusi senyawa besar maka senyawa tersebut lebih tertahan dalam fasa diam dan bila nilai distribusi kecil maka lebih terdistribusi dalam fasa gerak. Sehingga isolat steroid hasil isolasi lebih terdistribusi dalam fasa gerak dan memiliki nilai Rf yang lebih besar. Hasil isolat yang diansumsikan sebagai senyawa steroid tersebut kemudian ditimbang dan diuji toksisitasnya menggunakan metode BSLT.

#### 4.9 Uji Toksisitas

Uji toksisitas merupakan uji aktivitas yang digunakan untuk mengetahui tingkat toksisitas suatu senyawa yang digunakan sebagai tahapan awal mendapatkan dosis toksik untuk manusia. Uji toksisitas digunakan sebagai *screening* awal senyawa yang dapat digunakan sebagai obat. Parameter yang

digunakan untuk mengetahui tingkat toksisitas berdasarkan kematian larva udang *Artemia salina* L.

*Artemia salina* L. merupakan udang yang hidup pada air asin yang berasal dari Filum Artropoda. Telurnya bewarna coklat berbentuk bulat dengan cangkang yang kuat. *Artemia salina* digunakan untuk uji toksisitas karena rentang toksisitasnya yang tinggi, berbentuk kecil dan efek biologisnya dapat diamati dalam waktu yang singkat (24 jam).

Uji toksisitas dengan menggunakan metode BSLT dilakukan dengan dua tahapan, yaitu: penetasan telur dan uji toksisitas dengan senyawanya. Penetasan telur dapat dilakukan dengan menyiapkan bejana untuk penetasan telur. Bejana tersebut diisi dengan air laut yang digunakan sebagai media tumbuh *Artemia salina*. Telur *Artemia salina* kemudian dimasukkan dalam bejana dan diaerasi selama 48 jam. Diletakkan lampu pada samping bejana untuk menghangatkan suhu selama penetasan. Setelah 48 jam *Artemia salina* dapat digunakan sebagai hewan uji.

Perlakuan uji toksisitas dilakukan sebanyak 3 kali ulangan, baik pada ekstrak kasar metanol, fraksi petroleum eter dan isolat steroid. Ketiganya diuji untuk membandingkan aktivitas antara isolat steroid, ekstrak kasar dan fraksi petroleum eter. Lautan ekstrak metanol, fraksi petroleum eter dan isolat steroid dibuat dengan berbagai konsentrasi dan kontrol. Masing masing konsentrasi digunakan 10 larva udang.

Larutan uji ekstrak metanol, fraksi petroleum eter dan isolat steroid dibuat larutan stok kemudian diambil cuplikan untuk dibuat variasi konsentrasi pada botol vial. Masing-masing cuplikan diuapkan palarutnya supaya kematian larva udang tidak dipengaruhi oleh pelarutnya. Setelah pelarutnya menguap ditambahkan

DMSO, setetes ragi roti, dan ditanda bataskan dengan air laut sampai volumenya 5 mL. Larva udang 10 ekor kemudian dimasukkan dalam larutan uji tersebut.

DMSO digunakan sebagai surfaktan karena senyawa uji yang mempunyai kepolaran yang berbeda dengan air laut. Surfaktan merupakan senyawa yang memiliki ujung hidrofilik dan hidrofobik sehingga dapat melarutkan senyawa nonpolar dengan senyawa polar. Ragi roti digunakan untuk makanan larva udang yang digunakan sebagai hewan uji.

Kontrol dibuat dengan cara memasukkan pelarut sesuai dengan jumlah volume cuplikan yang digunakan. Pelarut kemudian diuapkan, ditambahkan DMSO, ragi roti dan ditandabatkan dengan air laut. Pengamatan uji toksisitas dilakukan selama 24 jam terhadap kematian larva udang. Hasil pengamatan kematian larva udang dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Tabel hasil pengamatan kematian larva udang

Isolat 5		Isolat 6		Isolat 7	
Konsentrasi (ppm)	Modus (Larva yang mati)	Konsentrasi (ppm)	Modus (Larva yang mati)	Konsentrasi (ppm)	Modus (Larva yang mati)
Kontrol DMSO	1	Kontrol DMSO	1	Kontrol DMSO	1
0	0	0	0	0	0
5	1	5	0	5	0
10	2	10	2	10	0
15	2	15	3	15	0
20	3	20	6	20	1
25	4	25	8	25	4
30	4	30	8		

Analisa data dari uji toksisitas diperoleh nilai  $LC_{50}$  dengan analisis probit menggunakan minitab.  $LC_{50}$  merupakan nilai dosis dimana senyawa dapat

membunuh 50% dari hewan uji. Hasil kurva yang dihasilkan dari analisa dapat dilihat dalam lampiran 9.

Kurva tersebut menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi masing masing larutan uji maka mortalitas terhadap *Artemia salina* juga semakin besar. Daerah sebelah kanan kurva menunjukkan kematian *Artemia salina* sedangkan bagian kiri menunjukkan kehidupan *Artemia salina*. Adanya penambahan ekstrak menyebabkan pergerakan *Artemia salina* terganggu yang disebabkan adanya efek toksik dari ekstrak metanol, fraksi petroleum eter dan isolat steroid. Sehingga pada Tabel 4.4 menunjukkan bahwa semakin tinggi nilai konsentrasi yang digunakan maka mortalitas larva udang semakin besar.

Menurut Meyer (1982) jika nilai  $LC_{50} < 1000$  ppm dikatakan toksik dan bila nilai  $< 30$  ppm dikatakan sangat toksik. Pengukuran nilai toksisitas dilakukan dengan menggunakan minitab 14. Nilai  $LC_{50}$  dari larutan uji dapat dilihat dalam Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Tabel nilai toksisitas dari larutan uji

Larutan uji	Nilai $LC_{50}$ (ppm)
Ekstrak metanol	481,400
Fraksi petroleum eter	185,086
Isolat 5	31,589
Isolat 6	18,879
Isolat 7	25,978

Hasil pengujian toksisitas dari hasil KLTP, fraksi petroleum eter dan ekstrak metanol masing-masing memiliki sifat toksik. Hal tersebut dapat dilihat pada mortalitas larva udang dan nilai  $LC_{50}$  yang dihasilkan. Nilai  $LC_{50}$  dari masing-masing larutan uji terhadap larva udang menunjukkan bahwa isolat ke-6 merupakan

isolat yang paling toksik. Hal tersebut karena nilai  $LC_{50}$  isolat ke-6 < isolat ke-7 < isolat ke-5 < fraksi petroleum eter < ekstrak metanol.

Masing-masing isolat memiliki nilai  $LC_{50}$  yang kecil bila dibandingkan dengan nilai fraksi petroleum eter dan ekstrak metanol yang memiliki nilai  $LC_{50}$  sebesar 185,086 ppm dan 481,400 ppm. Perbedaan nilai  $LC_{50}$  tersebut disebabkan pada ekstrak metanol dan fraksi petroleum eter terdapat banyak campuran senyawa metabolit sekunder. Campuran senyawa metabolit sekunder memiliki sifat sinergis dan antagonis terhadap hasil uji toksisitas yang dilakukan. Senyawa yang memiliki sifat sinergis dapat meningkatkan toksisitas dari senyawa yang diuji sedangkan senyawa yang memiliki sifat antagonis dapat melemahkan sifat toksik dari senyawa campuran tersebut. Sehingga dalam ekstrak metanol dan fraksi petroleum eter terdapat senyawa yang bersifat antagonis terhadap sifat toksik dari senyawa yang memiliki kemampuan lebih toksik.

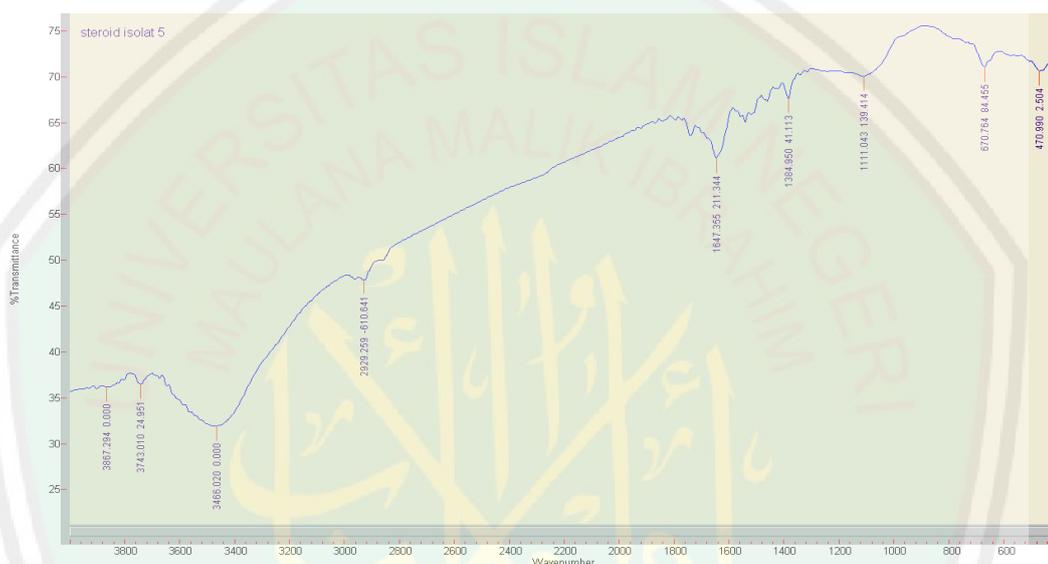
Isolat senyawa hasil pemisahan dari KLTP memiliki sifat lebih toksik dibandingkan fraksi petroleum eter dan ekstrak metanol. Sifat toksik dari isolat steroid tersebut karena sifat senyawa yang terkandung dalam isolat terhadap uji toksisitas. Sifat senyawa pada isolat memiliki sifat sinergis terhadap toksisitas sehingga isolat KLTP toksisitasnya lebih baik bila dibandingkan dengan ekstrak metanol dan fraksi petroleum eter.

#### **4.10 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan Spektrofotometer FTIR**

Spektrofotometer FTIR digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi suatu senyawa berdasarkan vibrasinya. Serapan yang dihasilkan dari spektra FTIR digunakan untuk memperkuat senyawa steroid hasil isolasi. Isolat steroid hasil

isolasi di gerus dengan KBr menggunakan motar agate. Campuran dipres dengan tekanan 80 torr kemudian di identifikasi dengan FTIR.

Hasil spektra FTIR isolat 5 senyawa steroid fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Pola spektra FTIR isolat 5

Gambar 4.3 menunjukkan terdapat serapan pada panjang gelombang  $3466,020\text{ cm}^{-1}$  merupakan gugus fungsi alkohol (OH). Adanya gugus OH didukung dengan munculnya serapan pada bilangan gelombang  $1111,043\text{ cm}^{-1}$  dari rentangan C–O alkohol sekunder. Adanya gugus alkohol menunjukkan senyawa steroid yang diidentifikasi merupakan senyawa sterol. Bilangan gelombang  $2929,259\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan vibrasi  $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{--H}$  alifatik. Gugus tersebut menunjukkan kemungkinan terdapat gugus  $\text{--CH}_2$  dan  $\text{--CH}_3$ . Rentangan C=C ditunjukkan pada panjang gelombang  $1647,356\text{ cm}^{-1}$ . Bilangan gelombang  $1384,950\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan rentangan  $\text{--C(CH}_3)_2$ . Menurut Astuti (2014) adanya vibrasi C-H tekuk pada spektra

inframerah menunjukkan adanya gugus gem dimetil yang lazim ditemukan pada senyawa steroid. Serapan tersebut diperkuat dengan adanya serapan pada bilangan gelombang 670,764  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C-H siklik (Socrates, 1994).

Isolat selanjutnya yang diduga merupakan senyawa steroid adalah isolat 6.

Hasil pola spektra FTIR ditunjukkan pada Gambar 4.4.

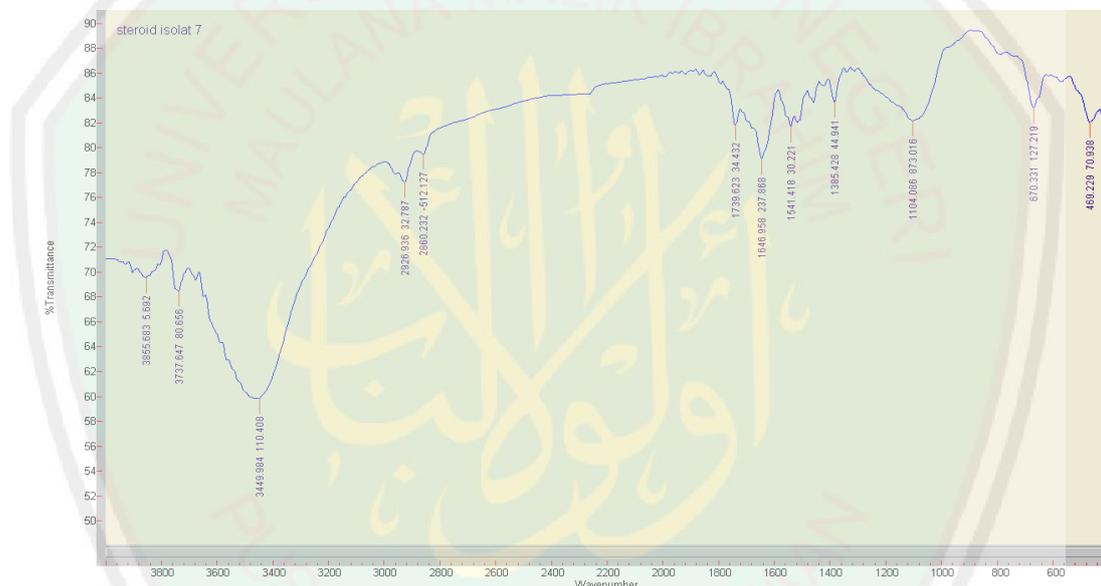


Gambar 4.4 Pola spektra FTIR isolat 6

Gambar 4.4 menunjukkan terdapat serapan pada panjang gelombang 3465,817  $\text{cm}^{-1}$  merupakan gugus fungsi alkohol (OH). Adanya gugus OH menunjukkan bahwa senyawa steroid yang diidentifikasi merupakan senyawa steroid jenis sterol (Aprelia, 2013). Bilangan gelombang 2928,089  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan vibrasi  $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$  alifatik. Gugus tersebut menunjukkan kemungkinan terdapat gugus  $-\text{CH}_2$  dan  $-\text{CH}_3$ . Rentangan  $\text{C}=\text{C}$  ditunjukkan pada panjang gelombang 1649,198  $\text{cm}^{-1}$ . Bilangan gelombang 1384,524  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan rentangan  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  yang merupakan ciri khas dari serapan dari senyawa steroid

(Astuti, 2014). Alkohol sekunder ditunjukkan pada bilangan gelombang 1092,173  $\text{cm}^{-1}$  yang menguatkan adanya gugus OH. Bilangan gelombang 794,925  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C-C. Bilangan gelombang 794,925  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C-H siklik (Socrates, 1994).

Isolat selanjutnya yang diduga senyawa steroid adalah isolat 7. Hasil identifikasi menggunakan FTIR ditunjukkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Pola spektra FTIR isolat 7

Gambar 4.6 menunjukkan terdapat serapan pada panjang gelombang 3449,984  $\text{cm}^{-1}$  merupakan gugus fungsi alkohol (OH). Gugus fungsi alkohol menunjukkan senyawa yang diidentifikasi merupakan senyawa steroid jenis sterol (Aprelia, 2013). Bilangan gelombang 2926,936  $\text{cm}^{-1}$  dan 2860,232  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan vibrasi C-H alifatik. Gugus tersebut menunjukkan kemungkinan terdapat gugus  $-\text{CH}_2$  dan  $-\text{CH}_3$ . Rentangan C=C ditunjukkan pada panjang gelombang 1739,623 dan 1646,958  $\text{cm}^{-1}$ . Serapan pada bilangan gelombang

1541,418  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya serapan dari gugus C-C. Bilangan gelombang 1385,428  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan rentangan  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$  yang merupakan gugus gem dimetil yang terdapat dalam senyawa steroid (Astuti, 2014). Bilangan gelombang 670,331  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C-H siklik (Socrates, 1994). Dari hasil FTIR ketiga isolat hasil interpretasi dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Hasil interpretasi FTIR

Bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )			Range pustaka ( $\text{cm}^{-1}$ ) (Socrates, 1994)	Jenis vibrasi	Intensitas Referensi
Isolat 5	Isolat 6	Isolat 7			
3466,020	3465,817	3449,994	3550-3230	Rentangan O-H dari ikatan intermolekul	m-s
2929,259	2929,099	2926,936 dan 2860,232	2950-2850	Rentangan -CH	m
-	1737,599	1739,623	1780-1730	Rentangan ekso siklik C=C	m
1647,355	1648,198	1648,958	1690-1620	Rentangan C=C	m
-	-	1541,418	1600-1450	C-C stretch	w
1384,950	1384,524	1385,428	1395-1365	$-\text{C}(\text{CH}_3)_2$	m
1111,043	1092,173	1104,958	1125-1000	Rentangan C-O alkohol sekunder	s-w
670,764	794,925 dan 669,508	670,331	995-650	Bengkokan =C-H siklik	w

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

Tabel 4.6 menunjukkan perbedaan hasil FTIR masing-masing isolat. Perbedaan pada hasil identifikasi tersebut terjadi karena senyawa yang dipisahkan memiliki struktur yang berbeda. Sehingga masing-masing isolat memiliki daerah

serapan yang berbeda. Selain pada serapan yang dihasilkan perbedaan juga terdapat pada intensitas serapan dan pergeseran bilangan gelombang. Perbedaan intensitas dan pergeseran panjang gelombang disebabkan oleh konsentrasi sampel isolat steroid yang digunakan.

Hasil FTIR senyawa steroid fraksi n-heksana ekstrak metanol alga merah *Eucheuma spinosum* menunjukkan adanya gugus O-H pada serapan  $3417\text{ cm}^{-1}$ . Serapan  $2923$  dan  $2853\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan gugus  $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ . Serapan  $1647\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan gugus C=C, serta gugus C-O alkohol yang ditunjukkan pada serapan  $1099\text{ cm}^{-1}$  (Ningsih, 2015). Sedangkan hasil identifikasi dengan FTIR senyawa steroid dari ekstrak etil asetat tumbuhan paku menunjukkan adanya gugus OH pada daerah serapan  $2275$  dan  $3421,8\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan senyawa steroid yang diidentifikasi merupakan senyawa steroid jenis sterol, vibrasi ulur  $-\text{CH}_3$  dan  $-\text{CH}_2$  pada daerah  $2926,4$  dan  $2862,7\text{ cm}^{-1}$ , C=C pada daerah  $1625,8\text{ cm}^{-1}$ , C-H pada daerah  $1460,9$  dan  $1382,2\text{ cm}^{-1}$ , dan C-O pada daerah  $1097,3$  dan  $1029\text{ cm}^{-1}$  (Aprelia, 2013) Berdasarkan hasil identifikasi isolat steroid fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol diduga senyawa steroid yang memiliki gugus O-H, C=C,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$  dan alkohol sekunder.

#### 4.11 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan LC-MS/MS

LC-MS merupakan kromatografi cair dengan detektor spektroskopi massa. LC (*liquid chromatography*) digunakan untuk memisahkan senyawa berdasarkan distribusi kepolaran senyawa terhadap fasa diam dan fasa gerak yang digunakan. Sedangkan MS (*mass spectrometry*) digunakan sebagai detektor yang digunakan untuk identifikasi senyawa berdasarkan berat dan struktur molekul.

Hasil identifikasi LC-MS berupa data kromatogram yang menunjukkan peak dan waktu retensi serta data nilai  $m/z$ . Isolat steroid yang diidentifikasi bila memiliki nilai waktu retensi kecil maka isolat tersebut lebih terdistribusi ke fasa gerak. Sedangkan bila isolat steroid yang diidentifikasi memiliki nilai waktu retensi yang besar maka senyawa tersebut lebih terdistribusi dalam fasa diam.

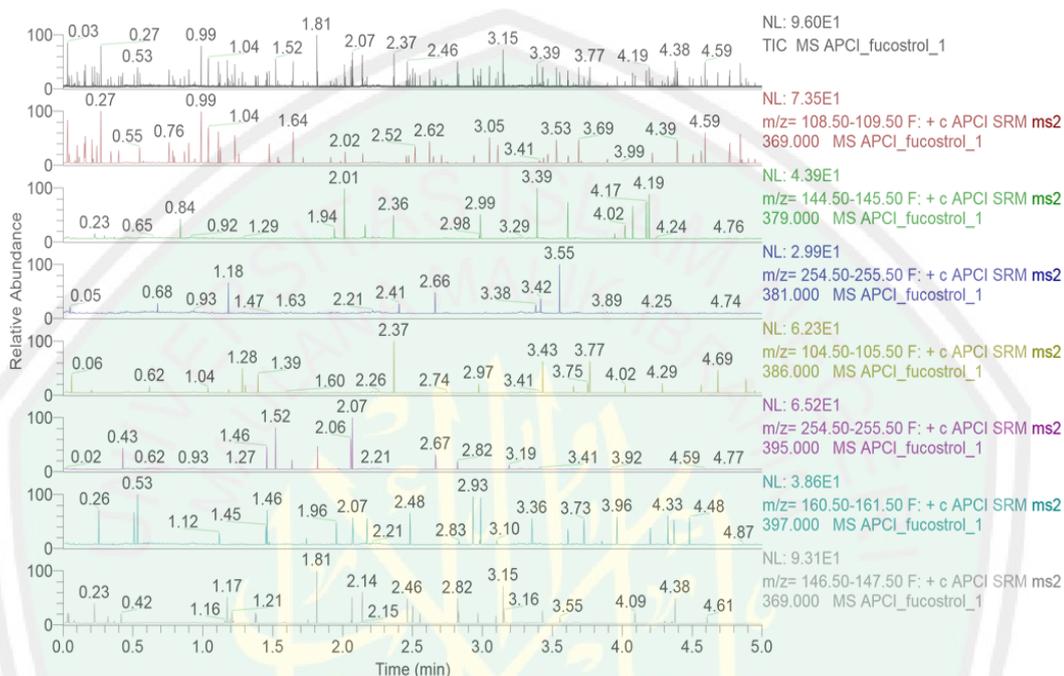
Isolat dari fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah *Eucheuma spinosum* dapat diisolasi dan diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS karena salah satu kelebihan alat tersebut dapat digunakan tidak terbatas hanya untuk molekul volatil tanpa adanya derivitisasi. Isolat steroid dapat diisolasi dan dipisahkan dengan LC-MS/MS metode terbalik. Metode terbalik menggunakan kolom yang berupa nonpolar dan fasa gerak yang digunakan polar.

Isolat steroid diidentifikasi menggunakan kolom *hypersil gold* yang bersifat nonpolar dengan fasa gerak berupa 0,1% asam format dalam air dan 0,1% asam format dalam acetonitril. Pengaturan fasa gerak selama 5 menit dengan laju alir 300  $\mu\text{L}/\text{menit}$ . MS yang digunakan berupa MS/MS *triple quadrupole* dengan sumber ionisasi APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) dengan mode operasi SRM (*Selected Reaction Monitoring*). Pengaturan sistem SRM diatur seperti pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Tabel pengaturan sistem SRM

<b><i>Parent mass</i></b>	<b><i>Daughter product mass</i></b>	<b>Jenis steroid</b>
381	255	Brassicasterol
397	147	$\beta$ sitosterol
386	105	Campesterol
369	109	Cholesterol
379	145	Ergosterol
396	147	Fucosterol
395	255	stigmasterol

Hasil identifikasi isolat steroid menggunakan LC-MS/MS dengan pengaturan tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Hasil identifikasi LC-MS/MS isolat steroid

Dari hasil LC-MS/MS pada Gambar 4.6 dapat diketahui bahwa tidak menunjukkan adanya senyawa target. Hasil tersebut hanya menunjukkan noise tidak menunjukkan adanya peak pada masing-masing golongan senyawa steroid. Sehingga dari hasil identifikasi tersebut tidak terdapat senyawa golongan sterol seperti kolesterol, ergosterol, stigmasterol, campesterol, brassicasterol,  $\beta$ -sitosterol, dan fucosterol. Hal tersebut terjadi dimungkinkan karena isolat steroid yang diidentifikasi tidak mengandung senyawa steroid dalam pengaturan sistem LC-MS/MS dan sedikit senyawa yang terdapat dalam sampel sehingga tidak terdeteksi.

#### 4.12 Pemanfaatan Rumput Laut dalam Perspektif Islam

Allah SWT menciptakan alam semesta dan segala isinya agar dimanfaatkan dengan sebaik-baiknya oleh manusia. Salah satunya adalah tumbuhan alga.

Allah SWT berfirman dalam surat an-Nahl (16):11:

يُنَبِّتُ لَكُمْ بِهِ الزَّرْعَ وَالزَّيْتُونَ وَالنَّخِيلَ وَالْأَعْنَابَ وَمِنْ كُلِّ الثَّمَرَاتِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً  
لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ ۝۱۱

Artinya:

*“Dia menumbuhkan bagi kamu dengan air hujan itu tanam-tanaman; zaitun, korma, anggur dan segala macam buah-buahan. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar ada tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang memikirkan”* (Q.s. an-Nahl (16):11).

Lafadz كل الثمرات menjelaskan tanaman diciptakan oleh Allah SWT sebagai nikmat dan tanda kekuasaan-Nya. Tumbuhan diciptakan dengan air hujan sebagai rizki dan makanan pokok bagi manusia. Lafadz يتفكرون (memikirkan) menjelaskan manusia dapat mengambil pelajaran dan memikirkan tentang ciptaan Allah yang berupa tumbuhan (Al-Maraghi, 1992). Memikirkan manfaat alga merah untuk kehidupan manusia adalah salah satu sarana untuk mengambil pelajaran dan memikirkan tentang ciptaan-Nya.

Alga dapat dimanfaatkan sebagai obat. Hal ini telah dibuktikan dari hasil penelitian bahwa senyawa steroid fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah dapat digunakan sebagai senyawa toksik dengan nilai LC<sub>50</sub> 27,0614 ppm, 15,9890 ppm, dan 31,6876 ppm pada masing masing isolat 5,6 dan 7. Hasil uji toksisitas tersebut dapat digunakan sebagai uji pendahuluan senyawa yang digunakan sebagai antikanker.

Pengobatan tidaklah melanggar syariat Islam, pengobatan telah dijelaskan sejak zaman Rasulullah SAW.

عَنْ أُسَامَةَ بْنِ شَرِيكٍ قَالَ كُنْتُ عِنْدَ النَّبِيِّ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ وَجَاءَتِ  
 الْأَعْرَبُ فَقَالُوا يَا رَسُولَ اللَّهِ أَنْتَ دَاوَى فَقَالَ نَعَمْ عِبَادَ اللَّهِ تَدَاوَوْا فَإِنَّ اللَّهَ عَزَّوَجَلَّ  
 لَمْ يَضَعْ دَاءً إِلَّا وَضَعَ لَهُ دَوَاءً غَيْرَ دَاءٍ وَاحِدٍ قَالُوا مَا هُوَ قَالَ الْهَرَمُ

“Dari Usamah bin Syarik berkata, “ bahwa saya pernah berada di sisi Rasulullah, lalu datang sekelompok Arab badui. Mereka berkata, “Wahai Rasulullah, apakah kami bisa berobat?” Nabi menjawab, “Ya, berobatlah, karena Allah SWT tidak pernah menyimpan satu penyakit, melainkan Dia juga menyediakan penyembuhannya, kecuali untuk satu penyakit saja, lalu mereka berkata, “Apa itu wahai Rasulullah?” Beliau menjawab, “Penyakit usia/masa tua”, ”(HR. Ahmad, Al-Bukhari dalam Al-Adabul Mufrad, Abu Dawud, Ibnu Majah, dan At-Tirmidzi, beliau berkata bahwa hadits ini hasan shahih. Syaikhuna Muqbil bin Hadi Al-Wadi’i menshahihkan hadits ini dalam kitabnya Al-Jami’ Ash-Shahih mimma Laisa fish Shahihain, 4/486).

Hadist tersebut berlaku umum untuk semua penyakit baik yang mematkan atau tidak. Rasulullah SAW memposisikan obat dan penyakit saling berlawanan, sehingga setiap penyakit memiliki lawan dari obat. Allah SWT menciptakan obat untuk suatu penyakit, tetapi bila penyakit tersebut tetap tidak sembuh maka ilmu manusia tidak dapat menjangkaunya dan hanya kekuasaan-Nya lah yang berhak menyembuhkan. Manusia tidak bisa melepaskan diri dari tawakal kepada Allah untuk memperoleh penyembuhan walaupun seorang dokter atau tabib telah memberi obat untuk penyembuhan (Mahmud, 2007).

Ibnu sina (980 – 1037 M). Dalam karyanya “*Al-Qamus Fi al-Thibb*” berisi tentang manfaat-manfaat nabati dan rumput-rumputan secara ramuan maupun tumbuhan itu sendiri. Dari pengobatan terdahulu para ilmuwan menumbuhkan pengobatan alternatif (*back to nature*) yang terus melakukan penelitian memperoleh obat-obatan dari bahan alami. Abu Qurath 4500 tahun lalu berkata “*Jadikanlah makananmu sebagai obatmu, dan obatilah setiap penderita dengan nabati yang*

*tumbuh di bumi, karena nabati itulah yang pantas untuk penyembuhannya”*  
(Mahmud, 2007).

Pemanfaatan senyawa steroid dari fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah pada penelitian dapat digunakan sebagai senyawa toksik yang memiliki korelasi dengan obat kanker. Namun, manusia wajib berusaha untuk memperoleh penyembuhan dari Allah SWT Yang Maha Penyembuh dan tidak ada yang dapat menyembuhkan kecuali atas izin-Nya. Allah SWT berfirman dalam surat asy-Syu'ara (26):80.

وَإِذَا مَرَّضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ ٨٠

Artinya:

*“dan apabila aku sakit, Dialah Yang menyembuhkan aku”.*

Sesungguhnya kesehatan merupakan nikmat besar yang Allah berikan kepada manusia. Sedangkan sakit merupakan ujian dari Allah SWT. Sehingga apabila sakit manusia hendaknya tetap berfikir tentang makna dari musibah tersebut karena Allah memberikan ujian kepada umatnya yang mampu melewati ujian tersebut.

## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1 Kesimpulan

1. Isolat steroid hasil KLTP dari fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah memiliki sifat toksik. Sifat toksik dinyatakan dengan nilai  $LC_{50}$ . Hasil  $LC_{50}$  isolat 5, 6, 7 secara berurutan sebesar 31,589; 18,879 dan 25,978 ppm. Hasil tersebut menunjukkan bahwa isolat 6 merupakan isolat yang paling toksik.
2. Hasil identifikasi senyawa steroid hasil isolasi dari fraksi petroleum eter ekstrak metanol alga merah *Eucheuma spinosum* menggunakan FTIR menunjukkan adanya gugus O-H, C=C,  $C_{sp^3}$ -H,  $-C(CH_3)_2$ , C-O alkohol sekunder, dan =C-H dan tidak dapat menunjukkan senyawa target saat diidentifikasi menggunakan LC-MS.

#### 5.2 Saran

1. Metode isolasi dapat dikembangkan dengan menggunakan metode lain yang lebih maksimal supaya didapatkan isolat yang lebih murni dengan kuantitas yang lebih banyak.
2. Identifikasi senyawa steroid dapat dikembangkan dengan melakukan identifikasi menggunakan alat lain sehingga dapat diketahui jenis steroid yang terdapat dalam fraksi petroleum eter ekstrak metanol *Eucheuma spinosum*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agilent Technologies. 2010. *basic of LC-MS*. USA
- Ahmad, A. dan Muh, Nasrum M. 2013. Inhibitive Enhancement of Isoniasid Treatment on Mycobacterium Tuberculosis Through Triterpenoid Carbocyclic Acid from Red Algae *Eucheuma spinosum*. *International Journal of Pharma and Bio Science*. ISSN 1975-6299.
- Anam, K, Fasya A.G, dan Abtokhi A. 2015. Isolasi Senyawa Triterpenoid dari Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Analisisnya Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. *Skripsi*. Malang: UIN Malang
- Anggadiredja, J. T., Zاتمika A., Purwoto H, Dan Istini, S. 2006. *Rumput Laut*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Aprilia, F dan Suyatno. 2013 . Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Eil Asetat Tumbuhan Paku *Cristella arida* dan Uji Pendahuluan Sebagai Antikanker. *Unesa Journal Of Chemistry* Vol. 2 No. 3
- Aras, T. R. 2013. Uji Toksisitas Terhadap Teripang *Holothuria scabra* Terhadap *Artemia salina*. *Skripsi*. Makasar : Universitas Hasanudin.
- Aslan, L. M. 1998. *Budidaya Rumput Laut*. Yogyakarta: Kanisius
- Astarina. Astuti, K.W. Warditiani, N. K. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum roxb.*). *Jurnal Farmasi Universitas Udayana*. Bali: Universitas Udayana
- Astuti, M. D., Abdi M. Evi M.K. 2014. Isolasi Steroid dari Fraksi n-Heksana Batang Bajakah Tampala (*Spatholobus littoralis* Hassk.) Prosiding Seminar Nasional Kimia ISBN: 978-602-0951-00-3.
- Arifudin, R. d. (2001). Penelusuran Protein Bioaktif Dalam Makro Alga Sebagai Bahan Antibakteri Dan Antijamur. *Marine Chemics Acta* , 11-18.
- Artati, Eny K, Feliciana I W H., dan Fatimah. 2012. Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Asam Terhadap kinetika reaksi Hidrolisis Pelepah Pisang (*Musa paradisiaca* L). *Ekulibrium*. ISSN 1412-9124. 73 – 77.
- Atun, S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Konservasi Cagar Budaya Borobudur*. Volume 8, Nomor 2. 53 – 61.
- Autherhoffm H., Dan Kovar, K.A. 1987. *Identifikasi Obat*. Bandung: ITB.

- Cahyono, B., Muhammad D.K.H dan Leenawaty L. 2011. Pengaruh Proses Pengeringan Rimpang Temulawak (*Curcuma Xanthorrhiza* Roxb) Terhadap Kandungan dan Komposisi Kurkuminoid. *Reaktor*. Vol. No. 3, Juni 2011. Hal 165-171
- Colegate, S. M, dan Molyneux, R. J. 2007. *Bioactive Natural Products: Determination, Isolation and Structural Determination Second Edition*. Prancis: CRC Press.
- Damongilala, L. J., S. B Widanarko, E.Zubaidah, dan M.R.J. Runtuwene, 2013. Antioxidant Activity Agains Methanol Extraction of *Eucheuma cotonii* and *Eucheuma spinosum* Colletes From North Sulawesi Waters, Indonesia. *Food science and Quality Management*. ISSN 2225-0557
- Dian, I. 2011. Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Turunan Terpenoid dari Kulit Batang Slati (*Calophyllum soulattri* Burm. F). *Skripsi*. Surakarta. Universitas Sebelas Maret.
- Diastuti, H, dan Warsinah. 2010. Identifikasi Senyawa Antikanker dari Ekstrak Kloroform Kulit Batang *Rhizopora mucronata*. *Majalah Farmasi Indonesia*. 21 (4), 266 – 271.
- Diaz, B C, A. Segura Carretero, A. Fernandez-Gutierrez, A. Belmonte Vega, A. Garrido Frenich, J.L. Martinez Vidal, J. Duran Martos. 2007. Separation and Determination of Sterol in Olive Oil by HPLC-MS. *Food Chemistry*. 593 – 598.
- Dirhami. A. Dedi F, Nuri A, Endang S. 2911. Karakteristik Karagenan Hasil Isolasi *Eucheuma spnosum* (Alga Merah) dari Perairan Sumenep Madura. *Jurnal perikanan dan Kelautan*. 16,1. 117 – 124.
- Erpin. Abdul, R., dan Ruslaini. 2013. Pengaruh Umur Panen dan Bibit Terhadap Pertumbuhan dan Kandungan Karagenan Rumput laut (*Eucheuma spinosum*) Menggunakan Metode Long Line, *Jurnal Mina Laut Indonesia*. ISSN:2303-3959. 156 – 163.
- Fahrul. 2006. Panen dan Pasca Panen. Pelatihan Budidaya Laut. Makasar : Yayasan Mattiroasi.
- Fattah, A. L. 2012. Efektifitas Alga Merah (*Euchema Spinosum*) Sebagai Anti Bakteri Patogen pada Organisme Budidaya pesisir dan Manusia. Makasar: Universitas Hasanuddin
- Hanapi, A. A. Ghanaim, F. Ulfatul, M dan Miftahurrahmah. 2013. Uji Aktivitas Antoksidan dan Antibakteri Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Alchemy*. Vol. 2 No. 2 Maret 2013. 126-137.

- Harefa, F. 1996. *Mengenal Sifat Biologis Artemia*. Swadaya. Jakarta. <http://www.o-fish.com/> [21 januari 2010] diakses Tanggal 19 Juni 2015.
- Indrayani, L. Hartati S. dan Lydia S. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta janaicensis* L. Vahl) Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach. *Berk. Penel. Hayati*: 12 (57 – 61)
- Iriawan. N. dan S.P. Astuti. 2006. *Mengolah Data Statistika dengan Mudah Menggunakan Minitab 14*. Yogyakarta: CV andi offset.
- Jannah, Miftahul. A. Hanapi, dan A. Ghanaïm F. Uji Toksisitas dan Fitokimia Ekstrak Kasar Metanol, Kloroform dan N-heksana Alga Coklat *Sargassum vulgare* dari Pantai Kapong Pamekasan Madura. *Alchemy*. Vol 3 No 2 . 194 – 203.
- Juniarti. 2009. Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (Brine Shrimp Lethality Test) dan Antioksidan (1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazyl) dari Ekstrak Daun Saga (*Abrus precatorius* L.). *Jurnal Kimia Fakultas Kedokteran Universitas YARSI Jakarta*. Vol 13, No 1: 50-54.
- Kanazawa, Akio. Mitsuki Y. Shin-inci T. 1972. Sterol in Some Red Algae. Vol 21, No1. pp 103 – 107.
- Kanwar, A. 2007. Brine shrimp (*Artemia salina*) Marine Animal for Simple and Rapid Biological Assays. *Journal of Clinical Medicine* 2(4):236 – 240.
- Kholidiyah, M. 2013. Uji Toksisitas Ekstrak Rumpun Laut Jenis *Eucheuma spinosum* Perairan Madura Terhadap Larva Udang (*Artemia salina*) Menggunakan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). *skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Krisna, I. G. 2014. Senyawa Steroid pada Daun Gayam (*Inocarpus fagiferus Fosb*) dan Aktivasinya Sebagai Antioksidan Terhadap Difenil Hidrazil (DPPH). *JURNAL KIMIA* 8, 251-256.
- Kristanti, A. N. Nanik Siti Aminah. Mulyadi Tanjung. Bambang Kurniadi. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya : Universitas Airlangga Press.
- Kutsiyah. 2012. Penentuan Kandungan Senyawa Fenolik Total dan Kapasitas Antioksidan Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Pantai Lobak Madura. *Skripsi tidak diterbitkan*. Malang: UIN Malang
- Lemberg. R, D. Tandy, N.E Goldsworthy. 1946. Identification of Aminobenzoic Acid in Relation to Bacterial Metabolism. *Nature*. Vol. 157
- Mahmud, M.H. 2007. *Mukjizat Kedokteran Nabi*. Jakarta: Kesehatan Alami Qultum Media

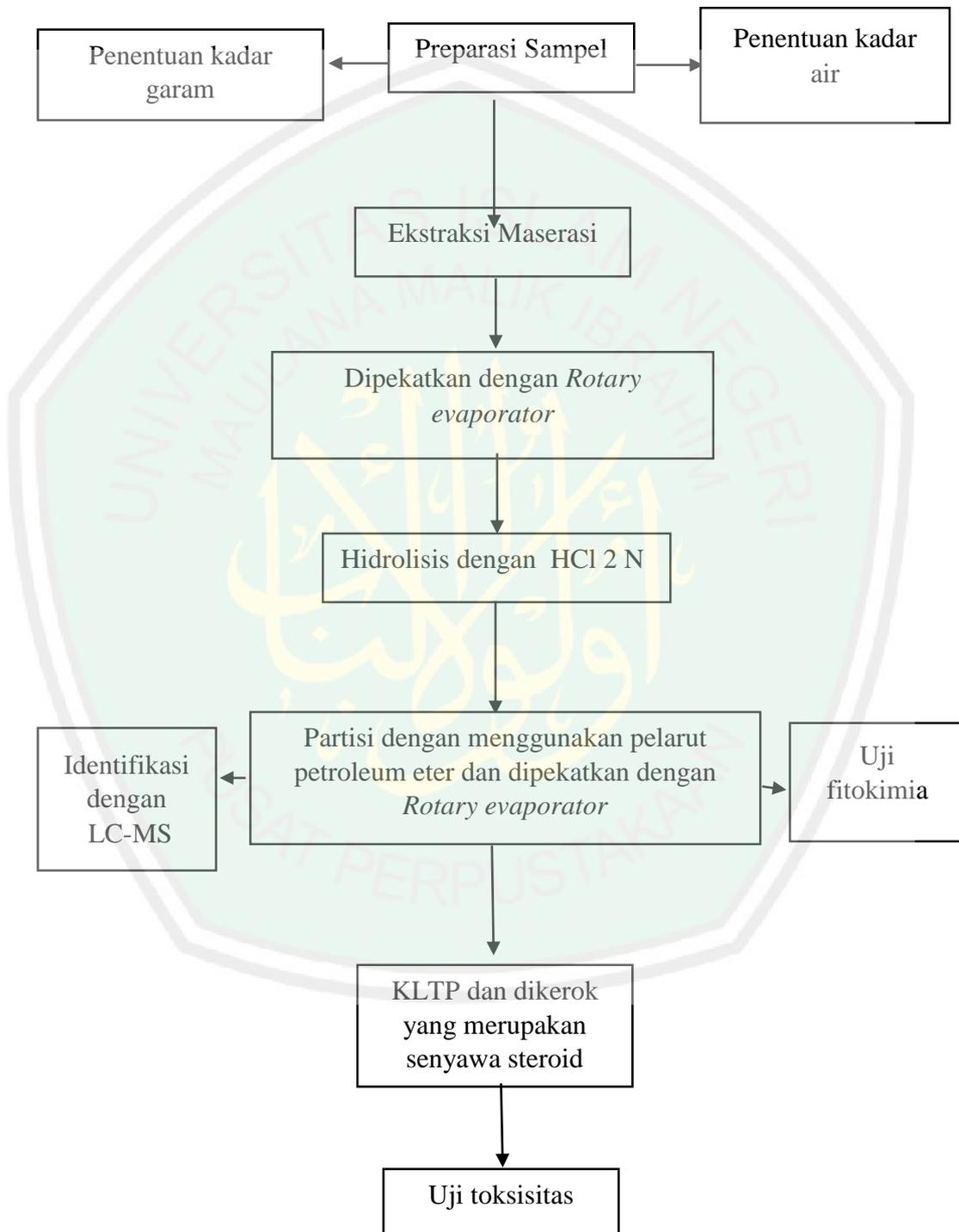
- Maraghi, A.M.1992. Terjemah Tafsir Al-Maraghi. Semarang: CV. Toha Putra Semarang
- Mardiyah, U. A. Ghanaim, F. Begum F dan Suci, A. 2014. Ekstraksi, Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Alchemy*. Vol. 3 No. 1 Maret 2014. 39 – 46.
- Masroh, L. F. 2010. Isolasi Senyawa Aktif Dan Uji Toksisitas Ekstrak Heksana Daun Pecut Kuda (*Stachytharpheta jamaicensis L Vahl*). *skripsi*. Malang : UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- McLaughlin, J.L. 1991. Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractination. *Methods in Plants Biochemistry* 6 (1): 1-30.
- Meyer, B N. Ferrigni, N. R, Putnam, J. E, Jacobsen, L. B, Nichols, D. E, McLaughlin, J. L. 2009. A Comparative Study on Phitochemical Sreening an Antibacterial Activity of Root of Alsotonia Schoolaris With The Roots, Leaver and Stea , *Bakr. Phytochem Pharmacon*. Vol. 1.No. 2. 77-82
- Mudjiman, A. 1995. *Udang Renik Air Asin (Artemia salina )*. Jakarta: Bhatara Karya Aksara.
- Ningsih, E.M. 2015. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid pada Fraksi n-Heksana Hasil Hidrolisis Estrak Metanol Alga Merah. *Skripsi Tidak diterbitkan*. .Malang: UIN Malang
- Novidiana, A., Erwin, dan Pasaribu S.P., 20014. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid Fraksi Kloroform dari Fraksinasi ekstrak Metanol Daun Kerehau (*Callicarpa longifobia Lam.*). *Jurnal Kimia Mulawarman Vol. 12 No. 1 November 2014*. ISSN 1693-5616.
- Nurhayati, A. P. D., Nurita A. dan Rachmat F. 2006. Uji ToksisitasEkstrak *Eucheuma alvarezil* Terhadap Artemia Salina Sebagai Studi Pendahuluan Poteni Antikanker. *Akta kimindo*. Vol. 2 No. 1. 41 – 46.
- Oliviany, Windi. 2009. Pengaruh Diet Rumput Laut *Eucheuma sp.* Terhadap Jumlah Limfosit Tikus Wistar dengan Diabetes Alokson. *Skripsi*. Semarang: Universitas Diponegoro.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Qurthubi, I. 2008. *Tafsir al-Qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azam.
- Resy, R. 2009. *Efek Rumput Laut Euchema sp. Terhadap Kadar Glukosa Darah dan Jumlah Mnosit pada Tikus yang Diinduksi Alokson*. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.

- Rita, W. S., I. W. Suirtadan A. Sabirin. 2008. Isolasi dan Identifikasi Senyawa yang Berpotensi Sebagai Antitumor pada Daging Buah Pare (*Momordicacarantia L.*). Bukit Jimbaran: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana. *Jurnal Kimia* 2(1). ISSN 1907-9850: 1-6.
- Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka pelajar.
- Sa'adah, L., Elok K. H., Tri Kustono A., 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Tanin dari Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*). *Skripsi tidak diterbitkan*. Malang: UIN Malang
- Sapar, A. A.S. Kumanireng. N.de Voogd, dan Alfian, N. 2004. Isolasi dan Penentuan Struktur Metabolit Sekunder Atif dari Spons *Biemna triraphis* Asal Pulau Kapodasang (Kepulauan Spermonde). *Marina chimica Acta*. ISSN. 1411-2132. 2 – 5.
- Sastrohamidjojo, H. 2007. *Spektroskopi*. Yogyakarta: Liberty Yogyakarta
- Setiyawan, M. I. 2015 Isolasi Senyawa Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol dan Identifikasinya Menggunakan FTIR. *Skripsi tidak diterbitkan*. Malang: UIN Malang
- Shihab, M.Q. 2002. Tafsir Al Mishbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an. Jakarta: Lentera Hati
- Socrates, G. 1994. *Infrared Characteristic Group Frequencies tables and Charts*. Newyork: John Wiley an Sons
- Soemirat, J. 2005. *Toksikologi Lingkungan*. Yogyakarta: Toksikologi Lingkungan.
- Solihat, U. 2004. Analisis Kromaografi Tipis dan Kromatografi Kertas. Bandung : Dinas Pendidikan Program Analisis Kimia
- Sulastry, Taty dan Kurniawati N. Isolasi Steroid dari Metanol daun Blntas (*Plucea Indica L.*). *Journal Chemica Vol. 11 No. 1 Juni 2010*. 52 – 56.
- Suparmi, dan Achmad Sahri. 2009. Mengenal potensi Rumput laut: Kajian Pemanfaatan Sumber Daya Rumput Luat dari Aspek Industri dan Kesehatan. *Sultan Agung Vol. XLIV No. 118*.
- Suprpto. R dan Dadan S. 2010. Pengaruh Perubahan Salinitas Terhadap Sintasan dan Keragaan Pertumbuhan Post Larva Udang Galah (*Macrobrachium rosenbergil*) Populasi Clasem pada Skala Laboratotium. *Forum Inovasi teknologi Akuakultur*. Teknologi Budidaya Ai Tawar.

- Swantara, I. M. D. dan Parwata, I. M. D. A. 2011. Kajian Senyawa Antioksidan pada Rumput Laut dari Sekitar Bali. Universitas Udayana.
- Syanqithi. 2007. *Tafsir Adhwa'ul Bayan*, Penerjemah Fathurazi. Jakarta: Pustaka Azam.
- Syamsudin. Soesanto T., Subagus W., Mustofa. 2007 Aktivitas Antiplasmodium dari Dua Fraksi Ekstrak n-Heksana Kulit Batang Asam Kandis (*Garcinia parvifolia* Miq). *Majalah Farmasi Indonesia*. Vol 18(4). 210 – 215.
- Tensiska, d. et. al. 2007. *Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Isoflavon dari Ampas Tahu Hasil Penelitian Dosen Jurusan Teknologi Industri Pangan*. Bandung: Universitas Padjajaran.
- Thabari, Abu Ja'far. 2008. *Tafsir at-Thabari*. Jakarta: Pustaka Azam.
- Ulfah, Marya. 2009. Pemanfaatan Iota Karaginan (*Eucheuma spinosum* dan Kappa Karaginan (*Kappaphycus alvarezii*) sebagai Sumber Serat untuk Meningkatkan Kekenyalan Mie Kering. *Skripsi*. Bogor: ITB
- Vembriarto, J. 2013. *Kimia Steroid*. Malang : Universitas Negeri Malang.
- Waryono, T. 2001. Biogeografi Alga Makro dikawasan Pesisir Indonesia. *Seminar Ikatan Geografi Indonesia*. Malang.
- Wiyanto, D. B. 2010. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* dan *Eucheuma denticullatum* Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Vibrio harveyii*. *Jurnal Kelautan* Vol 3, No. 1. ISSN: 1907-9931.
- Zhang, Jian Long. dkk. 2012 Steroids With Inhibitory Activity Against the Postate Cancer Cells and Chemical Diversity of Marine Alga *Tydemania expeditions*. *Fitoterapia*. 973-978.

## LAMPIRAN

## Lampiran 1. Rancangan penelitian



## Lampiran 2. Skema kerja

### 1. Preparasi sampel

Alga merah 10 Kg

- dicuci dengan air
- diiris kecil-kecil
- dikeringkan tanpa menggunakan pemanasan matahari
- dioven pada suhu 38 ° C sampai kering
- dihaluskan menggunakan blender
- diayak dengan ayakan 60 – 250 mesh

Serbuk alga merah

### 2. Analisa kadar air

Alga merah (*Eucheuma spinosum*)

- dimasukkan kedalam cawan yang beratnya telah konstan
- ditimbang 5 gram
- dikeringkan di dalam oven pada suhu 100-105 °C selama sekitar 15 menit
- disimpan dalam desikator selama 10 menit
- ditimbang cawan dan sampel
- dipanaskan kembali sampel dalam oven selama 15 menit
- didinginkan kembali dalam desikator selama 10 menit
- ditimbang kembali sampel dan cawan
- diulangi sampai berat konstan
- dihitung kadar air dengan menggunakan rumus berikut

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

keterangan:

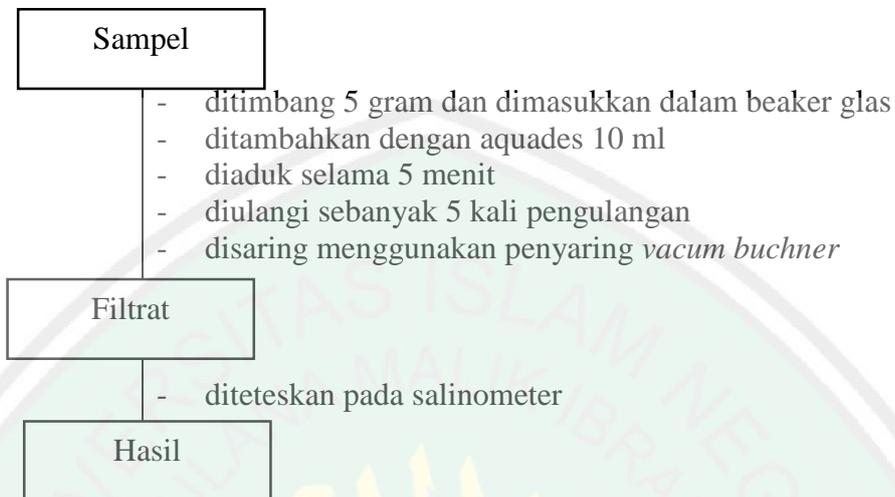
$a$  = berat konstan cawan kosong

$b$  = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

$c$  = berat konstan cawan + sampel setelah kering

Hasil

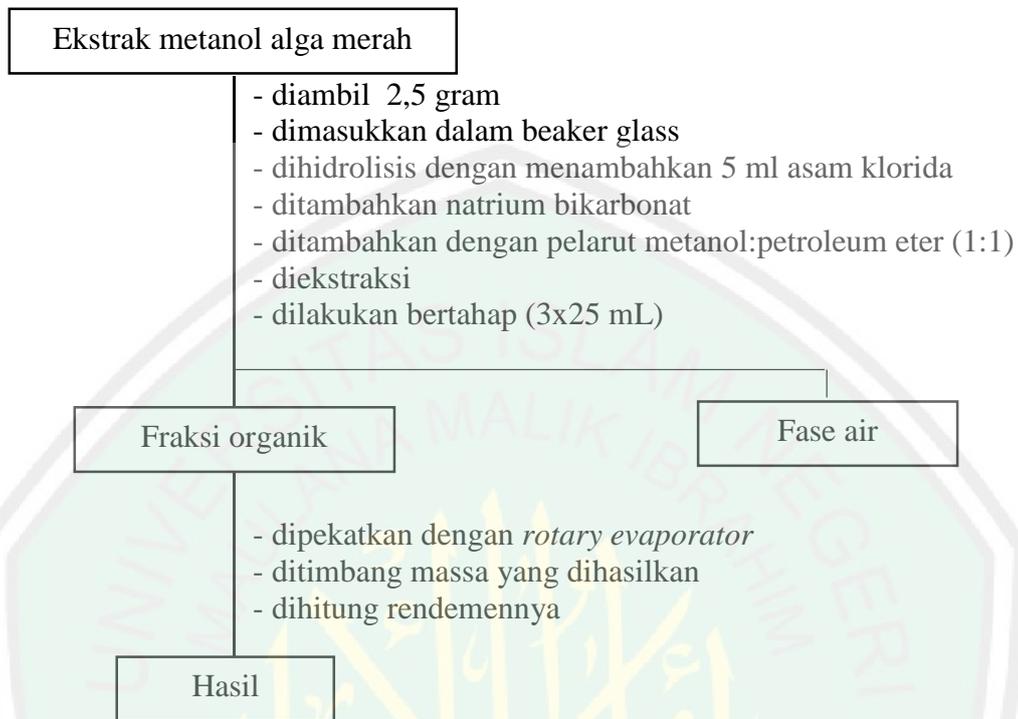
### 3. Uji Kadar Garam



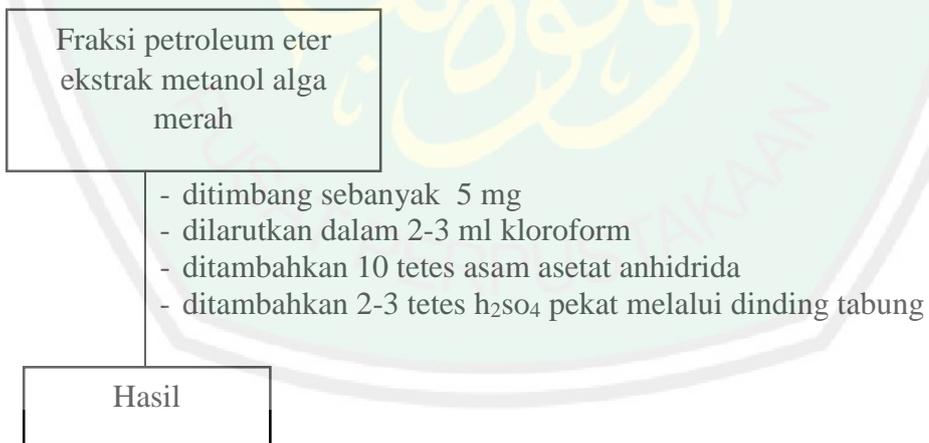
### 4. Ekstraksi sampel



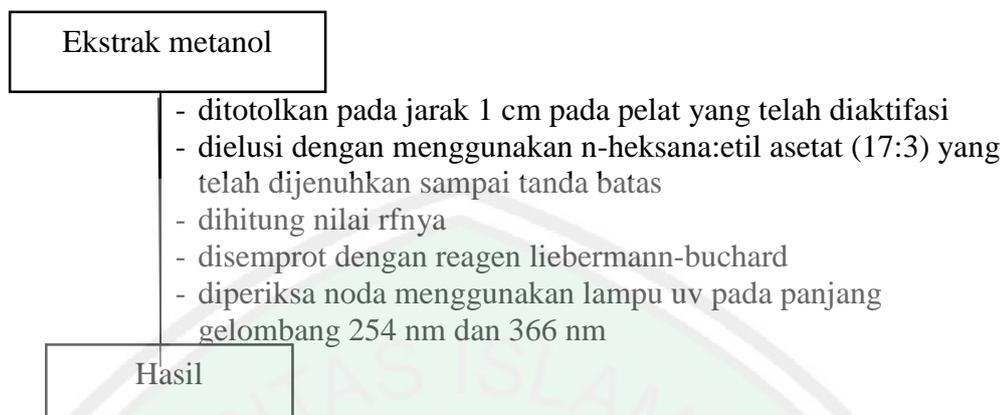
## 5. Hidrolisis dan partisi



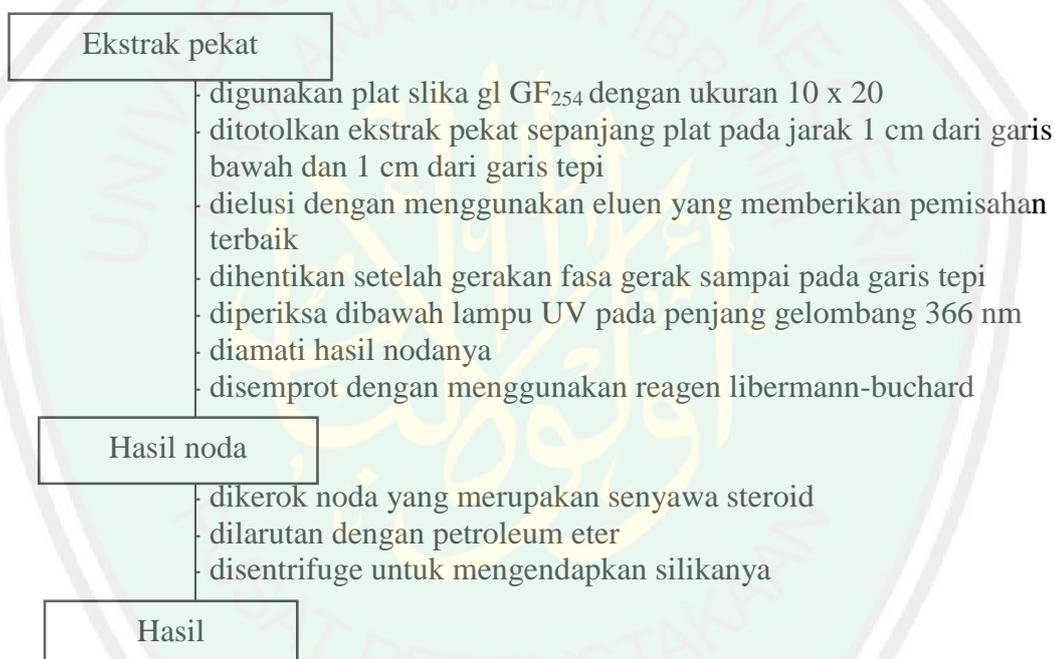
## 6. Uji Fitokimia



## 7. Pemisahan senyawa menggunakan KLT analitik

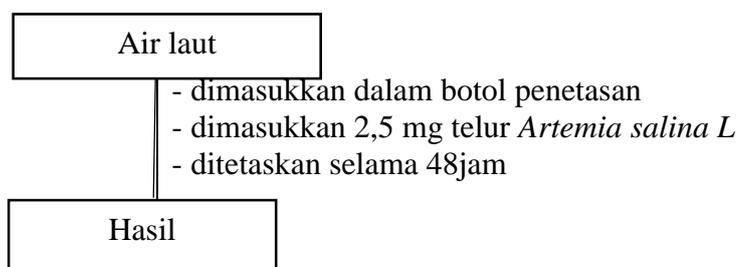


## 8. Pemisahan senyawa menggunakan KLTP

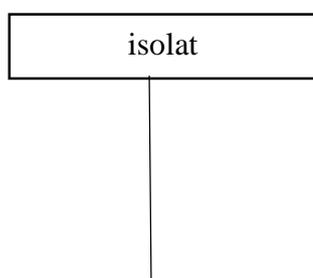


## 9. Uji toksisitas

### 9.1 Penetasan telur



### 9.2 Uji Toksisitas dengan larva udang



- dibuat konsentrasi 200 ppm, 150 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm
- dimasukkan dalam vial
- diuapkan pelarutnya
- ditambahkan 100  $\mu$ L dimetil sulfoksida
- ditambahkan setetes ragi roti
- ditambahkan air laut sampai volumenya 10 mL
- ditambahkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L.
- diamati selama 24 jam
- dihitung nilai %mortalitas

#### 10. Identifikasi menggunakan FTIR

Isolat

- digerus dengan KBr menggunakan mortar agate
- dipres selama 10 menit dengan tekanan 10 Torr
- diletakkan dalam instrumentasi FTIR
- diidentifikasi

Hasil

#### 11. Identifikasi menggunakan LC-MS

Fraksi petroleum eter ekstrak metanol alga merah

- diambil beberapa cuplikan
- dilarutkan dalam pelarutnya
- diinjektikan dalam instrumen LC-MS
- dijalankan instrumentasi

Hasil

Kolom : spesifikasi *hypersil gold* (50 mm x 2.1 mm x 1,9  $\mu$ m).

Alat : UHPLC merk *ACCELLA type 1250* buatan *Thermo*

*Scientific* yang terdiri dari : *degasser* vakum, pompa

*quartener, autosampler* thermostatik yang dikendalikan oleh computer melalui program x-calibur 2.1.

Fasa gerak :0,1% asam format dalam air (fasa A) dan 0,1% asam format dalam asetonitril (fase B).

Laju alir : 0,5 mL/menit.

Volume injeksi : 2 $\mu$ L.

MS : MS/MS triple Q (*Quadrupole*) spektrometer massa TSQ QUANTUM ACCESS MAX dari Thermo Finnigan

Sumber ionisasi : APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) dikendalikan oleh software TSQ Tune yang dikendalikan dengan mode positif.

Kondisi ion APCI adalah sebagai berikut: Arus yang digunakan 4 $\mu$ A, Suhu penguapan 250 °C, Suhu kapiler 300 °C, sheat gas pressure 45 arbitrary units, dan Aux gas pressure 15 arbitrary units.

### **Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan**

#### **1. Pembuatan reagen libermann buchard**

Asam sulfat pekat 5mL

Anhidrida asetat 5 mL

Etanol absolut 50 mL

Cara pembuatannya adalah asam sulfat pekat 5 mL dan anhidrida asetat 5 mL dicampur ke dalam etanol absolut 50 mL. Kemudian didinginkan dalam lemari pendingin. Penggunaan reagen ini digunakan langsung setelah pembuatan (Wagner, 2011).

## 2. Pembuatan larutan HCl 2 N

$$\begin{aligned}
 \text{BJ HCl pekat} &= 1,19 \text{ g/mL} \\
 \text{Konsentrasi} &= 37\% \\
 \text{BM HCl} &= 36,5 \text{ g/mol} \\
 n &= 1 (\text{jumlah mol ion H}^+) \\
 \text{Normalitas HCl} &= n \times \text{Molaritas HCl} \\
 &= 1 \times \frac{37\% \times \text{BJ HCl} \times 10}{\text{BM HCl pekat}} \\
 &= \frac{37\% \times 1,19 \frac{\text{g}}{\text{mL}} \times 10}{36,5 \text{ g/mol}} \\
 &= 12,06 \text{ N} \\
 N_1 \cdot V_1 &= N_2 \cdot V_2 \\
 12,06 \text{ N} \cdot V_1 &= 2 \text{ N} \cdot 100 \text{ mL} \\
 V_1 &= 16,58 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

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 dihomogenkan.

## 3. Pembuatan NaHCO<sub>3</sub> jenuh

Kelarutan NaHCO<sub>3</sub> sebesar 9,99 g dalam 100 mL aquades. Sehingga untuk membuat larutan NaHCO<sub>3</sub> jenuh maka dilarutkan lebih dari 9,99 gram NaHCO<sub>3</sub> pada aquades 100 mL sampai terjadi endapan. Endapan lalu disaring

## 4. Pembuatan larutan stok 500 ppm dari isolat senyawa steroid

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

Larutan stok 500 ppm = mg/L dalam 10 mL pelarutnya

$$500 \text{ ppm} = \frac{\text{mg}}{0,01 \text{ L}}$$

$$\text{mg} = 500 \text{ mg/L} \cdot 0,01 \text{ L}$$

$$\text{mg} = 5 \text{ mg}$$

jadi, larutan stok 500 ppm pada masing masing ekstrak dan isolat dibuat dengan dilarutkan 5 mg isolat kedalam 10 mL pelarutnya

### 3. Pembuatan isolat 5 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\ V_1 \cdot 500 \text{ ppm} &= 0.005 \text{ L} \cdot 5 \text{ ppm} \\ V_1 &= 0,025 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 500 \text{ ppm} \\ V_1 &= 0,00005 \text{ L} \\ &= 0.05 \text{ mL} \end{aligned}$$

### 4. Pembuatan larutan ekstrak 10 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\ V_1 \cdot 500 \text{ ppm} &= 0.005 \text{ L} \cdot 10 \text{ ppm} \\ V_1 &= 0,05 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 500 \text{ ppm} \\ V_1 &= 0,0001 \text{ L} \\ &= 0,1 \text{ mL} \end{aligned}$$

### 5. Pembuatan larutan ekstrak 15 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\ V_1 \cdot 500 \text{ ppm} &= 0.005 \text{ L} \cdot 15 \text{ ppm} \\ V_1 &= 0.15 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 500 \text{ ppm} \\ V_1 &= 0,00015 \text{ L} \\ &= 0,15 \text{ mL} \end{aligned}$$

### 6. Pembuatan larutan ekstrak 20 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\ V_1 \cdot 500 \text{ ppm} &= 0.005 \text{ L} \cdot 20 \text{ ppm} \\ V_1 &= 0,1 \text{ L} \cdot \text{ppm} / 500 \text{ ppm} \\ V_1 &= 0,0002 \text{ L} \end{aligned}$$

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

**7. Pembuatan larutan ekstrak 25 ppm**

$$\begin{aligned}V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\V_1 \cdot 500 \text{ ppm} &= 0,005 \text{ L} \cdot 25 \text{ ppm} \\V_1 &= 0,125 \text{ L.ppm} / 500 \text{ ppm} \\V_1 &= 0,00025 \text{ L} \\&= 0,25 \text{ mL}\end{aligned}$$

**8. Pembuatan larutan ekstrak 30 ppm**

$$\begin{aligned}V_1 \cdot M_1 &= V_2 \cdot M_2 \\V_1 \cdot 500 \text{ ppm} &= 0,005 \text{ L} \cdot 30 \text{ ppm} \\V_1 &= 0,15 \text{ L.ppm} / 500 \text{ ppm} \\V_1 &= 0,0003 \text{ L} \\&= 0,3 \text{ mL}\end{aligned}$$

#### Lampiran 4. Perhitungan Uji Kadar air

##### A. Perhitungan kadar air alga merah basah

##### Data pengukuran kadar air basah

Sampel	Berat cawan kosong (g)			Rata-rata
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
1	19,144	19,142	19,146	19,146
2	34,678	34,695	34,694	34,689
3	34,678	34,564	34,563	34,556

Sampel	Berat cawan kosong + sampel (g)				Rata-rata
	Sampel basah	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
1	20,101	19,231	19,236	19,236	19,236
2	35,644	34,747	34,789	34,790	34,790
3	35,538	34,668	34,653	34,655	34,655

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

Keterangan: a = berat konstan cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

$$\text{faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}}$$

% kadar air terkoreksi = kadar air – faktor koreksi

$$1. \text{ Kadar air 1} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\%$$

$$= \frac{20,101 \text{ g} - 19,234 \text{ g}}{20,101 \text{ g} - 19,146 \text{ g}} \times 100\% = 90,57\%$$

$$2. \text{ Kadar air 1} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\%$$

$$= \frac{35,644 \text{ g} - 34,790 \text{ g}}{35,644 \text{ g} - 34,619 \text{ g}} \times 100\% = 89,42\%$$

$$3. \text{ Kadar air 1} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\%$$

$$= \frac{35,538 \text{ g} - 34,655 \text{ g}}{35,538 \text{ g} - 34,556 \text{ g}} \times 100\% = 89,92\%$$

Kadar air rata-rata = 89,97%

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}}$$

$$= \frac{100}{100-89,97} = 9,97 \%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ kadar air terkoreksi} &= \text{kadar air} - \text{faktor koreksi} \\ &= 89,97 \% - 9,97\% \\ &= 80 \% \end{aligned}$$

## B. perhitungan kadar air kering

Data perhitungan uji kadar air alga merah kering.

Sampel	Berat cawan kosong (g)			Rata-rata
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
1	24,917	24,917	24,917	24,917
2	17,494	17,494	17,494	17,494
3	19,153	19,152	19,153	19,153

Sampel	Barat cawan kosong + sampel (g)				Rata-rata
	Sampel basah	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	
1	27,417	27,213	27,214	27,215	27,214
2	19,995	19,794	19,796	19,796	19,795
3	21,654	21,450	21,450	21,448	21,449

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

Keterangan: a = berat konstan cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

$$\text{faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}}$$

% kadar air terkoreksi = kadar air – faktor koreksi

$$\begin{aligned} 1. \text{ Kadar air 1} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\% \\ &= \frac{27,417 \text{ g} - 27,214 \text{ g}}{27,417 \text{ g} - 24,917} \times 100\% = 8,12\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2. \text{ Kadar air 1} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\% \\ &= \frac{19,995 \text{ g} - 19,795 \text{ g}}{19,995 \text{ g} - 17,494 \text{ g}} \times 100\% = 8,00\% \end{aligned}$$

$$3. \text{ Kadar air 1} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\%$$

$$= \frac{21,654 \text{ g} - 21,449 \text{ g}}{21,654 \text{ g} - 19,153 \text{ g}} \times 100\% = 8,20\%$$

Kadar air rata-rata = 8,10 %

$$\begin{aligned} \text{Faktor koreksi} &= \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}} \\ &= \frac{100}{100 - 8,10} = 1,08 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ kadar air terkoreksi} &= \text{kadar air} - \text{faktor koreksi} \\ &= 8,09\% - 1,08\% \\ &= 7,01\% \end{aligned}$$



### Lampiran 5. Perhitungan kadar garam

#### Data hasil uji kadar garam

Sampel	Ulangan 1 (‰)	Ulangan 2 (‰)	Ulangan 3 (‰)	Rata-rata (‰)
Alga merah <i>Eucheuma spinosum</i>	4	4	5	4,33

Penentuan berat garam

$$4,33 \text{ ‰} = 4,33 \text{ ppt}$$

$$4,33 \text{ ppt} = 4,33 \frac{g}{L} = \frac{g}{0,15 L}$$

$$g = \frac{4,33 g \times 0,15 L}{1 L}$$

$$= 0,65 g$$

$$\% \text{ kadar garam} = \frac{\text{berat garam}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,65 \text{ gram}}{5 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$= 13 \%$$

## Lampiran 6. Perhitungan Rendemen

### A. Perhitungan Rendemen Hasil Maserasi

Diketahui:

Berat sampel = 100 gram

Berat ekstrak = 3,607 gram

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{3,607 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} \times 100 \% \\ &= 3,60 \% \end{aligned}$$

### B. Perhitungan Rendemen Hasil Partisi dengan Menggunakan Petroleum

Eter

Diketahui :

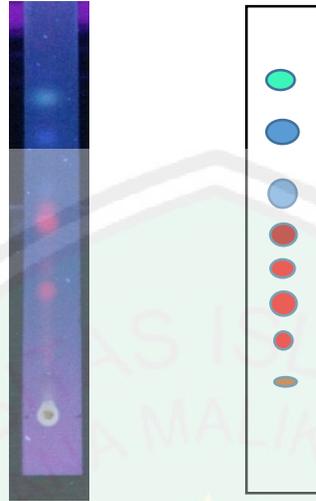
Berat ekstrak metanol = 12,5 gram

Berat fraksi Petroleum eter = 1,759 gram

$$\begin{aligned} \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat fraksi petroleum eter}}{\text{berat ekstrak metanol}} \times 100 \% \\ &= \frac{1,759 \text{ gram}}{12,5 \text{ gram}} \times 100 \% \\ &= 14,072\% \end{aligned}$$

## Lampiran 7. Hasil KLTA dan Perhitungan Rf

### A. Hasil KLTA



Gambar hasil KLTA yang diidentifikasi dibawah sinar UV

### B. Perhitungan Rf

$$\text{Spot 1} = \frac{\text{jarak spot}}{\text{panjang elusi}} = \frac{0,7 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,096$$

$$\text{Spot 2} = \frac{\text{jarak spot}}{\text{panjang elusi}} = \frac{1,2 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,165$$

$$\text{Spot 3} = \frac{\text{jarak spot}}{\text{panjang elusi}} = \frac{2,5 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,344$$

$$\text{Spot 4} = \frac{\text{jarak spot}}{\text{panjang elusi}} = \frac{4 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,551$$

$$\text{Spot 5} = \frac{\text{jarak spot}}{\text{panjang elusi}} = \frac{4,45 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,613$$

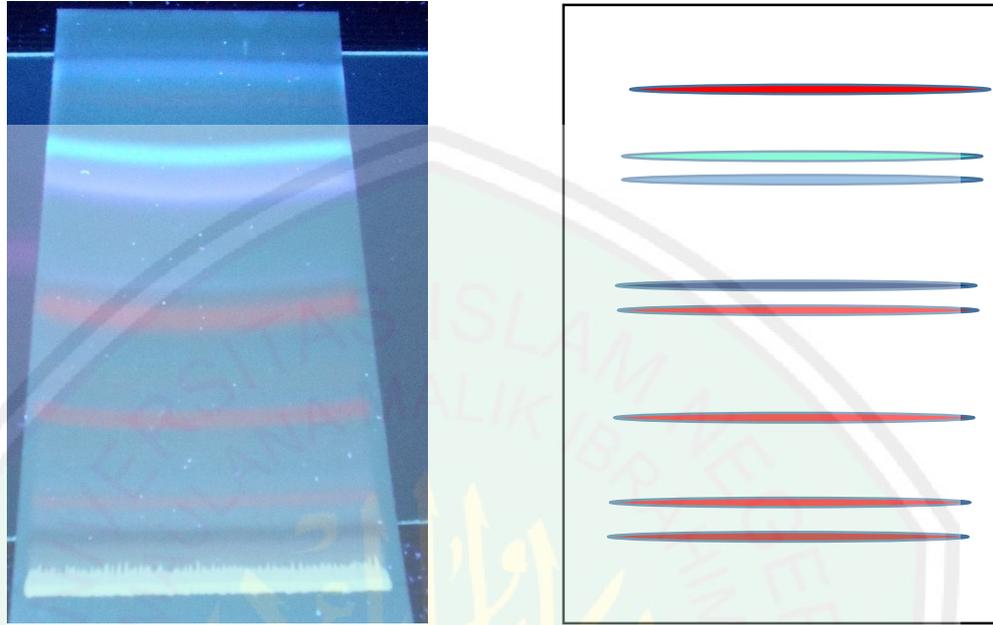
$$\text{Spot 6} = \frac{\text{jarak spot}}{\text{panjang elusi}} = \frac{4,85 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,668$$

$$\text{Spot 7} = \frac{\text{jarak spot}}{\text{panjang elusi}} = \frac{5,9 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,813$$

$$\text{Spot 8} = \frac{\text{jarak spot}}{\text{panjang elusi}} = \frac{6, \text{cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,910$$

## Lampiran 8. Hasil KLTP dan Perhitungan Rf

### A. Hasil KLTP



### B. Perhitungan Rf

$$\text{Spot 1} = \frac{\text{jarak spot}}{\text{panjang elusi}} = \frac{1,6 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,088$$

$$\text{Spot 2} = \frac{\text{jarak spot}}{\text{panjang elusi}} = \frac{2,2 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,122$$

$$\text{Spot 3} = \frac{\text{jarak spot}}{\text{panjang elusi}} = \frac{4,8 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,266$$

$$\text{Spot 4} = \frac{\text{jarak spot}}{\text{panjang elusi}} = \frac{8 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,444$$

$$\text{Spot 5} = \frac{\text{jarak spot}}{\text{panjang elusi}} = \frac{9,5 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,527$$

$$\text{Spot 6} = \frac{\text{jarak spot}}{\text{panjang elusi}} = \frac{11,4 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,633$$

$$\text{Spot 7} = \frac{\text{jarak spot}}{\text{panjang elusi}} = \frac{12,5 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,694$$

$$\text{Spot 8} = \frac{\text{jarak spot}}{\text{panjang elusi}} = \frac{14,3 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,794$$

## Lampiran 9. Data dan Perhitungan Hasil Uji Toksisitas

### A. Data Kematian Larva Udang

#### 1. Data Uji Toksisitas Ekstrak Metanol

Konsentrasi (ppm)	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Modus
Kontrol DMSO	1	1	1	1
0	1	1	1	1
100	4	2	2	1
200	4	3	3	2
300	4	4	4	4
400	4	4	4	4
500	6	6	6	6

#### 2. Data Uji Toksisitas Fraksi Petroleum Eter

Konsentrasi (ppm)	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Modus
Kontrol DMSO	1	1	1	1
0	1	1	1	1
25	2	2	1	2
50	2	3	3	3
100	5	5	4	5
150	6	6	5	6
200	7	7	7	7

#### 3. Data Uji Toksisitas Senyawa Steroid Isolat 5

Konsentrasi (ppm)	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Modus
Kontrol DMSO	1	1	1	1
0	1	1	1	1
5	2	1	2	2
10	2	3	3	3
15	3	3	3	3
20	4	4	3	4
25	5	5	2	5
30	0	5	5	5

#### 4. Data Uji Toksisitas Senyawa Steroid Isolat 6

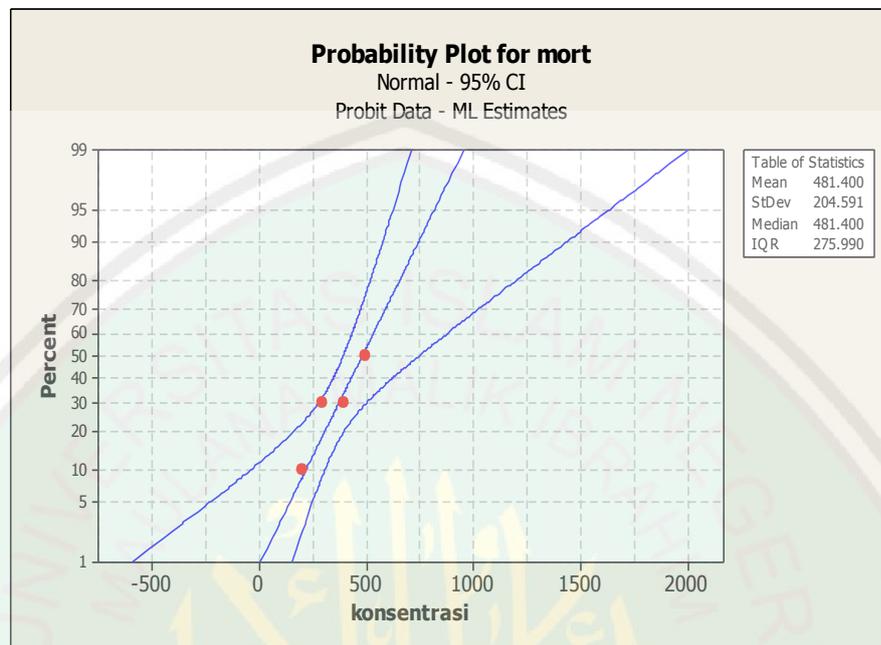
Konsentrasi (ppm)	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Modus
Kontrol DMSO	1	1	1	1
0	1	1	1	1
5	1	1	0	1
10	3	1	3	3
15	4	4	2	4
20	7	7	1	7
25	9	9	6	9
30	6	9	9	9

#### 5. Data Uji Toksisitas Senyawa Steroid Isolat 7

Konsentrasi (ppm)	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Modus
Kontrol DMSO	1	1	1	1
0	1	1	1	1
5	1	1	0	1
10	0	1	1	1
15	0	1	1	1
20	2	2	1	2
25	1	5	5	5

## B. Perhitungan Nilai LC<sub>50</sub>

### 1. Nilai LC<sub>50</sub> Ekstrak Metanol



9/15/2016 11:46:08 PM

### Probit Analysis: mort, n versus konsentrasi

Distribution: Normal

#### Response Information

Variable	Value	Count
mort	Event	12
	Non-event	48
n	Total	60

Estimation Method: Maximum Likelihood

\* NOTE \* 6 cases were used  
\* NOTE \* 1 cases contained missing values

#### Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-2.35298	0.586199	-4.01	0.000
konsentrasi	0.0048878	0.0015733	3.11	0.002
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -23.263

#### Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	1.41862	4	0.841
Deviance	1.72668	4	0.786

## Tolerance Distribution

## Parameter Estimates

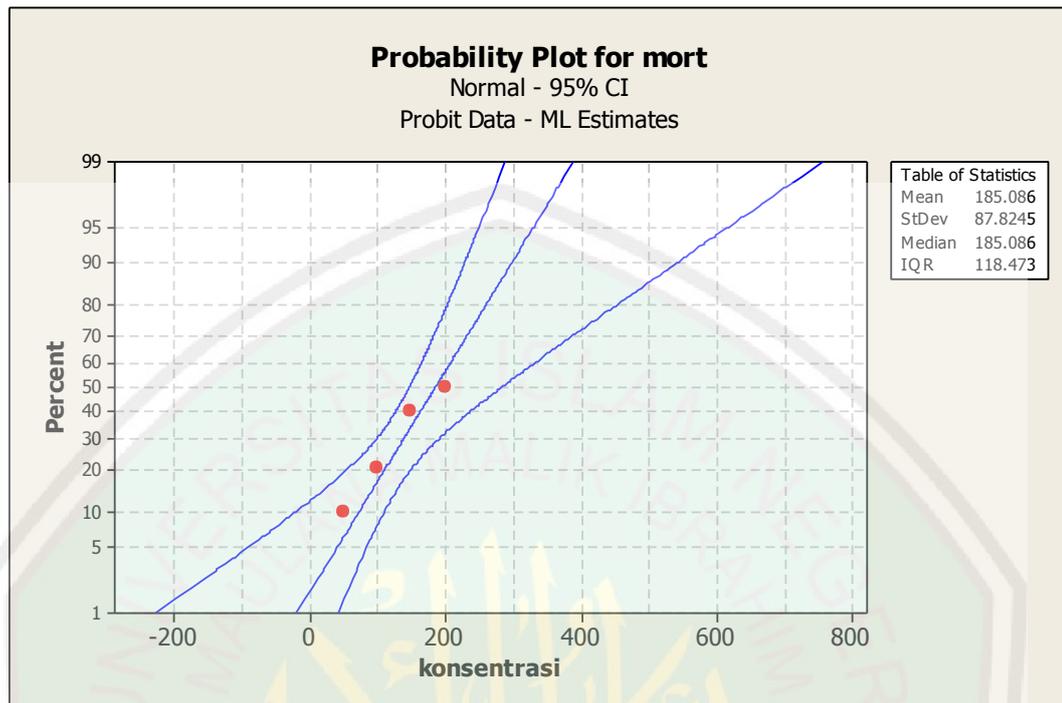
Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	481.400	60.7765	362.280	600.520
StDev	204.591	65.8562	108.866	384.487

## Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	5.44885	118.295	-595.865	153.959
2	61.2203	101.778	-447.717	191.107
3	96.6055	91.5788	-354.335	215.289
4	123.224	84.1081	-284.541	233.934
5	144.877	78.1974	-228.152	249.484
6	163.306	73.3132	-180.506	263.068
7	179.466	69.1657	-139.058	275.308
8	193.934	65.5797	-102.269	286.589
9	207.093	62.4414	-69.1293	297.168
10	219.205	59.6725	-38.9460	307.228
20	309.211	44.7286	167.815	399.504
30	374.112	43.7875	279.505	503.441
40	429.567	50.3759	345.344	621.848
50	481.400	60.7765	392.588	746.813
60	533.232	73.5295	433.261	878.350
70	588.688	88.6316	473.178	1022.68
80	653.588	107.382	517.436	1194.05
90	743.594	134.435	576.541	1433.98
91	755.707	138.135	584.370	1466.39
92	768.865	142.167	592.850	1501.63
93	783.334	146.613	602.146	1540.41
94	799.493	151.594	612.498	1583.74
95	817.923	157.292	624.268	1633.20
96	839.575	164.008	638.053	1691.36
97	866.194	172.292	654.944	1762.90
98	901.579	183.344	677.315	1858.10
99	957.351	200.841	712.419	2008.29

## Probability Plot for mort

## 2. Nilai LC<sub>50</sub> Fraksi Petroleum eter



9/15/2016 11:46:08 PM

### Probit Analysis: mort, n versus konsentrasi

Distribution: Normal

#### Response Information

Variable	Value	Count
mort	Event	12
	Non-event	48
n	Total	60

Estimation Method: Maximum Likelihood

\* NOTE \* 6 cases were used

\* NOTE \* 1 cases contained missing values

#### Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-2.10746	0.476396	-4.42	0.000
konsentrasi	0.0113864	0.0033728	3.38	0.001
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -22.744

#### Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	1.18254	4	0.881
Deviance	1.65415	4	0.799

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

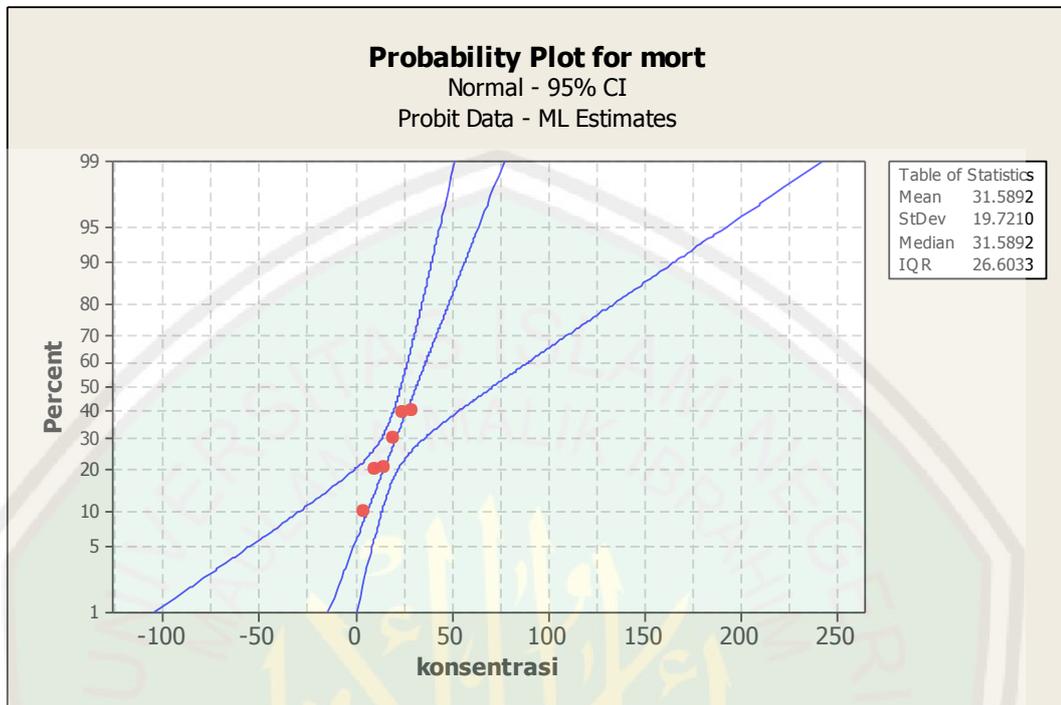
Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	185.086	25.4172	135.269	234.903
StDev	87.8245	26.0146	49.1451	156.946

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-19.2241	47.0091	-228.607	41.9320
2	4.71675	40.5922	-172.916	58.4668
3	19.9065	36.6500	-137.865	69.2396
4	31.3331	33.7764	-111.703	77.5499
5	40.6278	31.5138	-90.5943	84.4822
6	48.5390	29.6535	-72.7826	90.5374
7	55.4756	28.0819	-57.3096	95.9910
8	61.6865	26.7305	-43.5941	101.013
9	67.3350	25.5543	-31.2560	105.715
10	72.5346	24.5228	-20.0333	110.179
20	111.171	19.1345	56.6339	150.072
30	139.031	18.9486	99.3249	191.429
40	162.836	21.4689	126.411	236.159
50	185.086	25.4172	146.809	282.886
60	207.336	30.2990	164.704	332.115
70	231.141	36.1280	182.382	386.254
80	259.001	43.4128	202.022	450.663
90	297.638	53.9785	228.258	540.986
91	302.837	55.4271	231.733	553.198
92	308.486	57.0061	235.496	566.475
93	314.697	58.7484	239.622	581.086
94	321.633	60.7011	244.216	597.419
95	329.544	62.9360	249.439	616.063
96	338.839	65.5715	255.555	637.987
97	350.266	68.8241	263.049	664.966
98	365.456	73.1664	272.972	700.867
99	389.396	80.0456	288.542	757.523

Probability Plot for mort

### 3. Nilai LC<sub>50</sub> Isolat 5



9/15/2016 11:46:08 PM

Welcome to Minitab, press F1 for help.

#### Probit Analysis: mort, n versus konsentrasi

Distribution: Normal

#### Response Information

Variable	Value	Count
mort	Event	16
	Non-event	54
n	Total	70

Estimation Method: Maximum Likelihood

#### Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1.60180	0.385806	-4.15	0.000
konsentrasi	0.0507073	0.0190322	2.66	0.008
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -33.673

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	1.18035	5	0.947
Deviance	1.69051	5	0.890

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

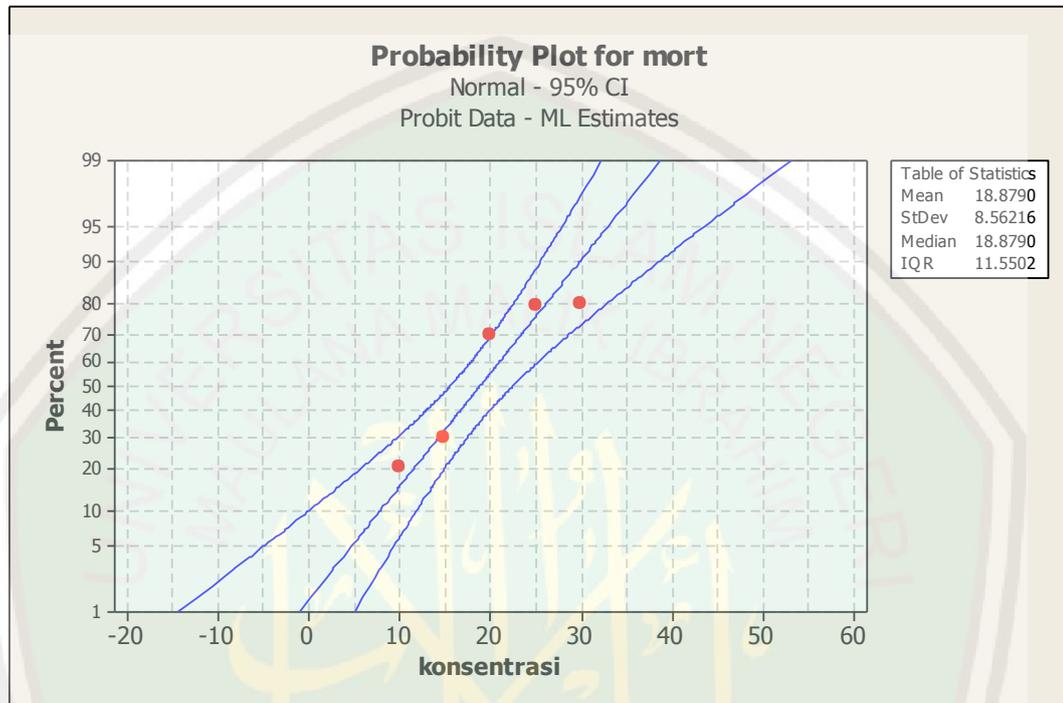
Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	31.5892	6.13656	19.5618	43.6167
StDev	19.7210	7.40199	9.45027	41.1543

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-14.2888	12.6250	-105.281	0.376981
2	-8.91283	10.6982	-85.1299	3.65950
3	-5.50198	9.49539	-72.3869	5.78405
4	-2.93612	8.60526	-62.8330	7.41452
5	-0.848995	7.89384	-55.0901	8.76917
6	0.927477	7.29993	-48.5264	9.94902
7	2.48509	6.79033	-42.7979	11.0100
8	3.87976	6.34503	-37.6957	11.9870
9	5.14814	5.95111	-33.0837	12.9037
10	6.31570	5.59979	-28.8682	13.7775
20	14.9916	3.63788	0.229419	22.4973
30	21.2475	3.65040	13.7894	36.2063
40	26.5930	4.70529	19.7227	53.5733
50	31.5892	6.13656	23.6705	71.4037
60	36.5855	7.75940	27.1038	89.7488
70	41.9309	9.59807	30.5360	109.617
80	48.1869	11.8194	34.4002	133.022
90	56.8627	14.9642	39.6238	165.615
91	58.0303	15.3909	40.3195	170.009
92	59.2987	15.8552	41.0738	174.783
93	60.6933	16.3666	41.9016	180.035
94	62.2510	16.9385	42.8243	185.902
95	64.0274	17.5918	43.8747	192.595
96	66.1146	18.3606	45.1062	200.461
97	68.6804	19.3074	46.6169	210.134
98	72.0913	20.5683	48.6204	222.999
99	77.4672	22.5600	51.7694	243.283

**Probability Plot for mort**

#### 4. Nilai LC<sub>50</sub> Isolat 6



9/15/2016 11:46:08 PM

#### Probit Analysis: mort, n versus konsentrasi

Distribution: Normal

#### Response Information

Variable	Value	Count
mort	Event	28
	Non-event	42
n	Total	70

Estimation Method: Maximum Likelihood

#### Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-2.20493	0.468663	-4.70	0.000
konsentrasi	0.116793	0.0237488	4.92	0.000

Natural

Response 0

Log-Likelihood = -28.990

#### Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	3.09288	5	0.686
Deviance	3.52178	5	0.620

#### Tolerance Distribution

#### Parameter Estimates

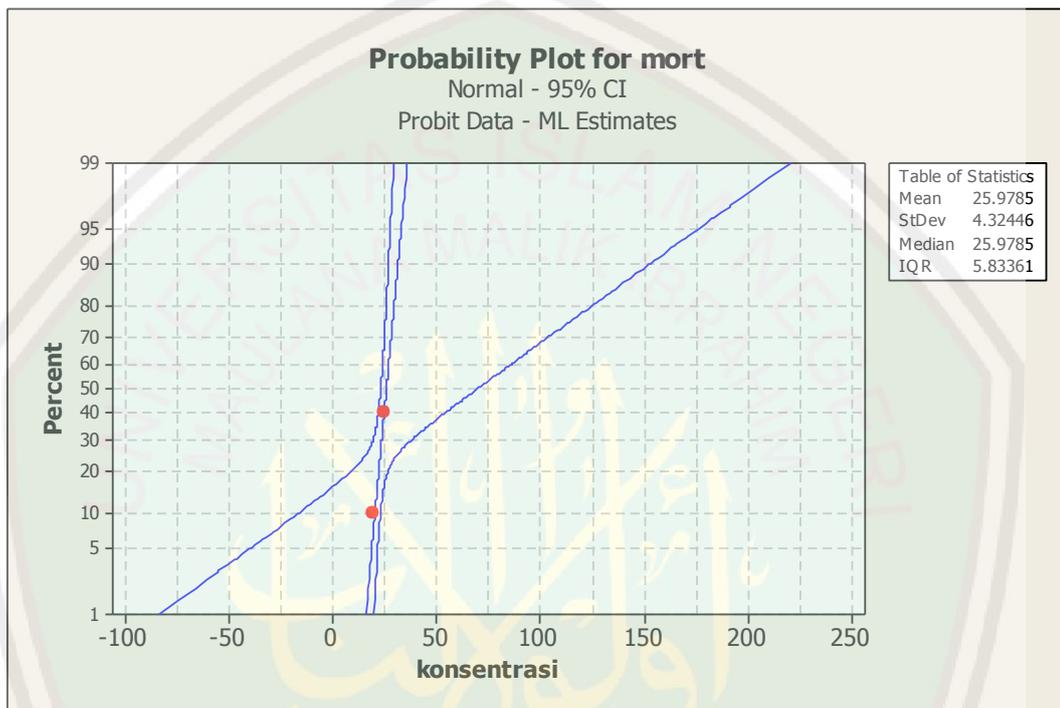
Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	18.8790	1.61387	15.7159	22.0421
StDev	8.56216	1.74104	5.74777	12.7546

#### Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-1.03956	4.20734	-14.3401	5.03844
2	1.29448	3.77301	-10.5400	6.78788
3	2.77535	3.50287	-8.14008	7.90894
4	3.88935	3.30318	-6.34199	8.75956
5	4.79551	3.14344	-4.88495	9.45704
6	5.56679	3.00968	-3.64939	10.0553
7	6.24305	2.89431	-2.57005	10.5839
8	6.84856	2.79270	-1.60723	11.0608
9	7.39925	2.70186	-0.734886	11.4978
10	7.90616	2.61968	0.0650181	11.9031
20	11.6729	2.06849	5.87886	15.0453
30	14.3890	1.77297	9.83845	17.5437
40	16.7098	1.62995	12.9572	19.9430
50	18.8790	1.61387	15.5768	22.4810
60	21.0482	1.71509	17.9001	25.3153
70	23.3690	1.93206	20.1190	28.6144
80	26.0851	2.28575	22.4828	32.7086
90	29.8519	2.88153	25.5273	38.6202
91	30.3588	2.96767	25.9242	39.4285
92	30.9095	3.06244	26.3529	40.3091
93	31.5150	3.16794	26.8216	41.2802
94	32.1912	3.28722	27.3420	42.3677
95	32.9625	3.42492	27.9320	43.6115
96	33.8687	3.58871	28.6211	45.0769
97	34.9827	3.79265	29.4630	46.8837
98	36.4635	4.06745	30.5745	49.2932
99	38.7976	4.50740	32.3125	53.1047

#### Probability Plot for mort

**5. Nilai LC<sub>50</sub> Isolat 7**



9/15/2016 11:46:08 PM

**Probit Analysis: mort, n versus konsentrasi**

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mort	Event	5
	Non-event	55
n	Total	60

Estimation Method: Maximum Likelihood

- \* NOTE \* 6 cases were used
- \* NOTE \* 1 cases contained missing values

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-6.00734	2.54796	-2.36	0.018

konsentrasi 0.231243 0.110167 2.10 0.036  
 Natural  
 Response 0

Log-Likelihood = -10.057

#### Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	0.097595	4	0.999
Deviance	0.152371	4	0.997

#### Tolerance Distribution

#### Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	25.9785	1.99687	22.0647	29.8923
StDev	4.32446	2.06022	1.69985	11.0015

#### Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	15.9183	3.62103	-83.6893	19.8653
2	17.0972	3.10908	-66.0059	20.5849
3	17.8451	2.79418	-54.8119	21.0671
4	18.4077	2.56445	-46.4112	21.4499
5	18.8654	2.38348	-39.5958	21.7792
6	19.2550	2.23468	-33.8120	22.0766
7	19.5965	2.10901	-28.7579	22.3547
8	19.9023	2.00103	-24.2506	22.6216
9	20.1805	1.90718	-20.1704	22.8834
10	20.4365	1.82503	-16.4353	23.1451
20	22.3390	1.40878	9.45240	26.9569
30	23.7108	1.42600	19.5299	38.2948
40	24.8829	1.65892	22.0555	54.0679
50	25.9785	1.99687	23.2604	69.9664
60	27.0741	2.40164	24.1481	86.1820
70	28.2463	2.87680	24.9563	103.673
80	29.6181	3.46458	25.8139	124.230
90	31.5205	4.31119	26.9260	152.818
91	31.7766	4.42693	27.0715	156.669
92	32.0547	4.55303	27.2287	160.854
93	32.3605	4.69210	27.4006	165.456
94	32.7021	4.84787	27.5917	170.597
95	33.0916	5.02607	27.8084	176.462
96	33.5493	5.23609	28.0616	183.353
97	34.1119	5.49513	28.3710	191.827
98	34.8599	5.84074	28.7796	203.095
99	36.0387	6.38786	29.4187	220.859

#### Probability Plot for mort

## Lampiran 10. Gambar

L.10.1 Gambar preparasi sampel *Eucheuma spinosum* basah (a) dan *Eucheuma spinosum* yang telah menjadi serbuk



(a)



(b)

L.10.2. Gambar Uji kadar air



L.10.3 Gambar Uji kadar garam



L.10.4 Gambar proses ekstraksi maserasi



Proses penguapan pelarut

### Proses perendaman

L.10.5 Gambar hidrolisis dan partisi



Proses hidrolisis

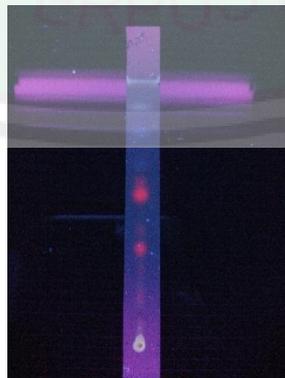


proses partisi

L.10.6 Gambar uji fitokimia senyawa steroid



L.10.7 Gambar hasil KLTA



L.10.8 Gambar hasil KLTP

