

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN IDENTIFIKASI  
MENGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV-VIS  
SENYAWA STEROID FRAKSI PETROLEUM ETER  
HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL  
ALGA MERAH (*Eucheuma spinosum*)**

SKRIPSI

Oleh:  
**RUMZIL LAILI**  
NIM. 12630010



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

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN IDENTIFIKASI  
MENGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV-VIS  
SENYAWA STEROID FRAKSI PETROLEUM ETER  
HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL  
ALGA MERAH (*Eucheuma spinosum*)**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**RUMZIL LAILI**  
**NIM. 12630010**

**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 AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN IDENTIFIKASI  
MENGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV-VIS  
SENYAWA STEROID FRAKSI PETROLEUM ETER  
HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL  
ALGA MERAH (*Eucheuma spinosum*)

SKRIPSI

Oleh:  
RUMZIL LAILI  
NIM. 12630010

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:  
Tanggal: 16 September 2016

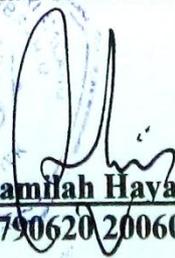
Pembimbing I

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

Pembimbing II

  
Umaiatus Syarifah, M.A  
NIP. 19820925 200901 2 005

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Kimia

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

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN IDENTIFIKASI  
MENGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER UV-VIS  
SENYAWA STEROID FRAKSI PETROLEUM ETHER  
HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL  
ALGA MERAH (*Eucheuma spinosum*)

SKRIPSI

Oleh:  
RUMZIL LAILI  
NIM. 12630010

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 16 September 2016

Penguji Utama	: Eny Yulianti, M.Si NIP. 19760611 200501 2 006	( ..... )
Ketua Penguji	: Rachmawati Ningsih, M.Si NIP. 19810811 200801 2 010	( ..... )
Sekretaris Penguji	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	( ..... )
Anggota Penguji	: Umayyatus Syarifah, M.A NIP. 19820925 200901 2 005	( ..... )

Mengesahkan,  
Ketua Jurusan Kimia



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

### PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Rumzil Laili  
NIM : 12630010  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer Uv-vis Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*)

menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-banar merupakan hasil karya saya 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 dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 16 September 2016



Rumzil Laili  
NIM. 12630010

## KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Puji syukur penulis ucapkan kehadiran Allah SWT, karena atas limpahan Rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan studi di Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, sekaligus menyelesaikan tugas akhir/skripsi ini dengan baik.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Prof. DR. H. Mudjia Raharjo, M.Si, selaku rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Elok Kamilah Hayati, M.Si, selaku ketua Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. A. Ghanaim Fasya, M.Si, Rachmawati Ningsih, M.Si, Umayyatus Syarifah, M.A, selaku dosen pembimbing skripsi yang telah banyak memberikan pengarahan dan pengalaman yang berharga.
5. Segenap sivitas akademika Jurusan Kimia, terutama seluruh dosen, terima kasih atas segenap ilmu dan bimbingannya.
6. Ayahanda dan Ibunda tercinta yang senantiasa memberikan doa dan restunya kepada penulis dalam menuntut ilmu, adik penulis yang selalu memberikan semangat kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.

7. Teman-teman angkatan 2012, khususnya tim makro alga yang telah memberi semangat dan berbagai bantuan.
8. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materiil maupun moril.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga skripsi ini memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya bagi penulis secara pribadi. *Amin Ya Rabbal Alamin.*

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Malang, Agustus 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 ORISINALITAS .....</b>	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>vii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>xii</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1. 1. Latar Belakang.....	1
1. 2. Rumusan Masalah .....	7
1. 3. Tujuan Penelitian.....	7
1. 4. Batasan Masalah .....	7
1. 5. Manfaat Penelitian.....	8
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2. 1. Alga Merah ( <i>Eucheuma spinosum</i> ) .....	9
2. 2. Kandungan dan Khasiat <i>Eucheuma spinsoum</i> .....	11
2. 3. Senyawa Steroid .....	13
2. 4. Ekstraksi Steroid.....	16
2. 4. 1. Prinsip Ekstraksi .....	16
2. 4. 2. Maserasi.....	16
2. 5. Hidrolisis Asam .....	17
2. 6. Ekstraksi Cair-cair (Partisi) .....	18
2. 7. Uji Fitokimia Senyawa Steroid.....	20
2. 8. Pemisahan Steroid dengan KLTA .....	20
2. 9. Pemisahan Steroid dengan KLTP .....	21
2. 10. Antioksidan.....	23
2. 10. 1. Mekanisme Antioksidan .....	23
2. 10. 2. Antioksidan Alami dan Antioksidan Sintetik.....	25
2. 11. Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH.....	27
2. 12. Identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis.....	29

**BAB III METODOLOGI PENELITIAN**

3. 1.	Pelaksanaan Penelitian .....	33
3. 2.	Alat dan Bahan .....	33
3.2.1.	Alat .....	33
3.2.2.	Bahan .....	33
3. 3.	Rancangan Penelitian .....	34
3. 4.	Tahapan Penelitian .....	34
3. 5.	Cara Kerja.....	35
3.5.1.	Preparasi Alga Merah ( <i>Eucheuma spinosum</i> ).....	35
3.5.2.	Penentuan Kadar Air.....	35
3.5.3.	Ekstraksi Alga Merah ( <i>Eucheuma spinosum</i> ).....	36
3.5.4.	Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol .....	36
3.5.5.	Uji Fitokimia Senyawa Steroid.....	37
3.5.6.	Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTA.....	37
3.5.7.	Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP .....	38
3.5.8.	Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan DPPH.....	38
3.5.9.	Senyawa Hasil Pemisahan Dianalisis Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.....	40
3.6.	Analisis Data .....	41

**BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

4.1.	Preparasi Sampel .....	42
4.2.	Penentuan Kadar Air .....	42
4.3.	Ekstraksi Alga merah <i>Eucheuma spinosum</i> .....	43
4.4.	Hidrolisis dan Partisi .....	45
4.5.	Uji Fitokimia Senyawa Steroid .....	47
4.6.	Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTA.....	48
4.7.	Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP .....	51
4.8.	Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan metode DPPH.....	52
4.9.	Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis .....	56
4.10.	Potensi <i>Eucheuma spinosum</i> dalam Perspektif Islam.....	58

**BAB V PENUTUP**

5.1.	Kesimpulan.....	63
5.2.	Saran .....	63

<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>64</b>
-----------------------------	-----------

<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>71</b>
----------------------	-----------

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komposisi nilai nutrisi alga merah <i>Eucheuma spinosum</i> .....	13
Tabel 2.2 Ketentuan Kekuatan Antioksidan .....	28
Tabel 4.1 Hasil uji KLTA fraksi petroleum eter dibawah sinar UV 366 nm.....	49
Tabel 4.2 Hasil Pemisahan Senyawa steroid menggunakan KLT Preparatif.....	50
Tabel 4.3 Nilai EC <sub>50</sub> aktivitas antioksidan dan pembanding .....	54



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Alga merah <i>Eucheuma spinosum</i> .....	10
Gambar 2.2 Struktur Dasar Steroid .....	14
Gambar 2.3 Rumus struktur beberapa senyawa steroid .....	15
Gambar 2.4 Dugaan reaksi hidrolisis ikatan <i>O</i> -glikosida .....	18
Gambar 2.5 Reaksi antara HCl dan natrium bikarbonat .....	18
Gambar 2.6 Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipid ....	24
Gambar 2.7 Reaksi penghambatan antioksidan antar radikal antioksidan.....	25
Gambar 2.8 Struktur kimia asam askorbat .....	26
Gambar 2.9 Struktur kimia BHT.....	26
Gambar 2.10 Reaksi antara antioksidan dengan molekul DPPH.....	27
Gambar 2.11 Spektrum UV-Vis isolat tumbuhan paku <i>Christella arida</i> .....	31
Gambar 2.12 Spektrum UV-Vis <i>Laurencia obtusa</i> ekstrak petroleum eter (A), esktrak benzena (B).....	32
Gambar 4.1 Reaksi penetralan asam dengan NaHCO <sub>3</sub> .....	45
Gambar 4.2 Hasil spektra UV-Vis larutan DPPH.....	52
Gambar 4.3 Hasil spektrum UV-Vis isolat kelima steroid .....	55
Gambar 4.4 Hasil spektrum UV-Vis isolat keenam steroid.....	56
Gambar 4.5 Hasil spektrum UV-Vis isolat ketujuh steroid .....	56

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian .....	71
Lampiran 2 Diagram Alir .....	72
Lampiran 3 Pembuatan Larutan dan Reagen .....	79
Lampiran 4 Hasil Pengukuran Uji Kadar Air Alga Merah <i>Eucheuma spinosum</i> .	83
Lampiran 5 Hasil Rendemen.....	85
Lampiran 6 Perhitungan nilai Rf.....	86
Lampiran 7 Pengujian Aktivitas Antioksidan.....	88
Lampiran 8 Dokumentasi.....	99



## ABSTRAK

Laili, R. 2016. **Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*)**. Skripsi. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing 1: A. Ghanaim Fasya, M.Si. Pembimbing 2: Umayyatus Syarifah, M.A. Konsultan: Rachmawati Ningsih, M.Si.

Kata Kunci: *steroid, Eucheuma spinosum, isolasi, kromatografi lapis tipis preparatif, antioksidan, spektrofotometer uv-vis*

---

Rumput laut merupakan salah satu kekayaan laut yang menyediakan sumber daya alam dalam jumlah yang melimpah. Alga merah (*E.spinosum*) dapat dimanfaatkan sebagai obat karena didalamnya terdapat kandungan metabolit sekunder. Salah satu metabolit sekunder dalam alga merah (*E.spinosum*) yaitu senyawa steroid. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan senyawa steroid dan hasil identifikasi senyawa steroid menggunakan Spektrofotometer Uv-vis.

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak pekat hasil maserasi dihidrolisis menggunakan HCl 2N dan dipartisi menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan pelarut Petroleum eter kemudian di uji dengan reagen Liberman Burchard. Pemisahan senyawa steroid dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif dengan eluen terbaik pada kromatografi lapis tipis analitik. Noda yang menunjukkan senyawa steroid dilakukan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan dilakukan identifikasi menggunakan Spektrofotometer Uv-vis.

Pemisahan senyawa steroid fraksi petroleum eter menghasilkan 8 noda, 3 diantaranya menunjukkan adanya senyawa steroid. Noda pertama yang mengandung senyawa steroid memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai  $EC_{50}$  sebesar 123,5 ppm dan identifikasi dengan Spektrofotometer Uv-vis menghasilkan panjang gelombang 276,1 nm yang diduga senyawa steroid poriferasta-3,5-dien-7-one. Noda kedua memiliki aktivitas antioksidan yang tergolong kuat dengan nilai  $EC_{50}$  sebesar 94,98 ppm dan hasil identifikasi diperoleh dua puncak serapan yaitu pada panjang gelombang 276,0 nm dan 284,0 nm. Pada noda ketiga memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai  $EC_{50}$  sebesar 104,6 ppm dan hasil identifikasi dengan Spektrofotometer Uv-vis diduga senyawa steroid  $\beta$ -sitosterol dengan panjang gelombang maksimum sebesar 202,0 nm.

## ABSTRACT

Laili, R. 2016. **Antioxidant Activity Test and Identification Using UV-Vis Spectrophotometer of Steroids Compounds Petroleum Ether Fraction Hydrolysis From Methanol Extract Red Algae (*Eucheuma spinosum*)**. Thesis. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor 1: A. Ghanaim Fasya, M.Si. Supervisor 2: Umayyatus Syarifah, M.A Consultant: Rachmawati Ningsih, M.Si.

Keywords: *steroids, Eucheuma spinosum, isolation, preparatif thin layer chromatography, antioxidants, uv-vis spectrophotometer*

---

Seaweed is one of the marine resources that provide natural resources in large quantities. Red algae (*E.spinosum*) can be used as a drug because they content secondary metabolite. One of the secondary metabolites in red algae (*E.spinosum*) is a steroid compound. The purpose of this research was to determine the antioxidant activity of steroid compounds and the results of steroid compound identification using Uv-vis spectrophotometer.

Extraction was done by maceration method using methanol. Concentrated extract of maceration results hydrolyzed using 2N HCl and partitioned using liquid extraction with solvents Petroleum ether then tested by Liberman Burchard reagent. Separation of steroid compounds by preparative thin layer chromatography with the best eluent on analytical thin layer chromatography. Spot that indicate steroid compounds tested antioxidant activity using DPPH method and identification using uv-vis spectrophotometer.

Separation of steroid compound petroleum ether fraction produce 8 spots, three of them showed steroid compound. The first spot containing steroid compound have antioxidant activity with EC<sub>50</sub> value of 123,5 ppm and identification with uv-vis spectrophotometer generate wavelength 276,1 nm alleged steroid compound poriferasta-3,5-dien-7-one. The second spot have relatively strong antioxidant activity with EC<sub>50</sub> value of 94,98 ppm and identification result is obtained by two absorption peaks at a wavelength of 276,0 nm and 284,0 nm. In the third spots have antioxidant activity with EC<sub>50</sub> value of 104,6 ppm and identification with uv-vis spectrophotometer alleged steroid compound  $\beta$ -sitosterol with maximum wavelength of 202,0 nm.

## ملخص

ليلي، رمز. ٢٠١٦. أنشطة الاختبار مضادات الأكسدة وتحديد طريق مقياس الطيف أشعة فوق البنفسجية المرئية (UV-Vis) المركبات سترويد الكسر للبتروال الأثير النتائج التحليل المائي مقتطف الميثانول عشب ماء الأحمر (*Eucheuma spinosum*). بحث جامعي. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة الإسلامية الحكومية مولانا مالك إبراهيم مالانج. المشرف الأول: أحمد غنائم فشى الماجستير. المشرف الثاني: أمية الشريفة الماجستير. المستشار: راحماواتي نكسيه الماجستير

كلمات الرئيسية: المنشطات، *Eucheuma spinosum*، عزل، إعدادي رقيقة اللوني طبقة، ومضادات الأكسدة، الأشعة فوق البنفسجية المرئية سفيكتروفوميتر

الأعشاب البحرية هي واحدة من المصادر البحرية التي توفر الموارد الطبيعية بكميات كبيرة. الطحالب الحمراء (*E. spinosum*) تمكن استخدامها التي توجد على نسبة الأيض الثانوية. واحدة من المركبات الثانوية في الطحالب الحمراء (*E. spinosum*) هو مركب الستيرويد. وكان الغرض من هذه الدراسة هو تحديد النشاط المضاد للأكسدة لمركبات الستيرويد ونتائج تحديد مركب الستيرويد باستخدام مطياف الأشعة فوق البنفسجية المرئية.

ويتم استخراج من طريقة النقع باستخدام الميثانول. مقتطف مركزة من النتائج النقع تحلل باستخدام  $N_2$  حمض الهيدروكلوريك وتقسيم باستخدام استخراج السائل جزء الأثير البترول. جزء الأثير البترول تحتبر ليرمان بورشارد، ثم القيام التحليلي رقيقة اللوني طبقة. فصل مركبات الستيرويد التي إعدادي رقيقة اللوني طبقة مع شاطئ أفضل على التحليلي رقيقة اللوني طبقة. البقع التي تشير إلى مركبات الستيرويد اختبار النشاط المضاد للأكسدة باستخدام طريقة DPPH وتحديد باستخدام الأشعة فوق البنفسجية المرئية سفيكتروفوميتر. فصل المركبات الستيرويدية كسور الأثير البترول لإنتاج ٨ نقاط، ثلاثة منهم أظهر مركب الستيرويد. وصمة عار الأولى التي تحتوي على مركبات الستيرويد لديها النشاط المضاد للأكسدة مع المفوضية الأوروبية  $EC_{50}$  ١٢٣،٥ جزء في المليون والتماهي مع الأشعة فوق البنفسجية تجاه معمل توليد الطول الموجي ٢٧٦،١ نانومتر المزعومة مركبات الستيرويد *Poriferasta-3,5-dien-7-one*. نودا على حد سواء والنشاط المضاد للأكسدة قوي نسبيا مع المفوضية الأوروبية  $EC_{50}$  ٩٤،٩٨ جزء من المليون، ويتم الحصول على نتيجة تحديد من قبل اثنين من قمم امتصاص عند طول موجة من ٢٧٦،٠ نانومتر و ٢٨٤،٠ نانومتر. في البقع الثالثة لها نشاط مضاد للأكسدة مع المفوضية الأوروبية  $EC_{50}$  ١٠٤،٦ جزء في المليون، والتماهي مع الأشعة فوق البنفسجية تجاه معمل المزعومة مركبات الستيرويد  $\beta$ -سيتوستيترول مع الطول الموجي الأقصى من ٢٠٢،١ نانومتر.

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Rumput laut merupakan salah satu kekayaan laut yang dapat menyediakan sumber daya alam dalam jumlah yang melimpah, namun belum dimanfaatkan secara maksimal oleh masyarakat. Selama ini, masyarakat hanya memanfaatkannya sebagai bahan konsumsi saja. Aslan (2005) mengatakan bahwa rumput laut dimanfaatkan sebagai bahan baku pembuatan tepung agar-agar, kerajinan dan alginat.

Kekayaan laut merupakan salah satu rahmat dari Allah SWT yang dapat dimanfaatkan sebagai kebutuhan manusia yang tidak ternilai harganya, karena Allah SWT menciptakan segala sesuatu di bumi sesuai manfaatnya masing-masing. Sebagaimana disebutkan dalam al-Quran Surat Faathir (35) :12:

وَمَا يَسْتَوِي الْبَحْرَانِ هَذَا عَذْبٌ فُرَاتٌ سَائِغٌ شَرَابُهُ وَهَذَا مِلْحٌ أُجَاجٌ وَمِن  
 كُلِّ تَأْكُلُونَ لَحْمًا طَرِيًّا وَتَسْتَخْرِجُونَ حِلْيَةً تَلْبَسُونَهَا وَتَرَى الْفَلَكَ فِيهِ مَوَازِيرَ  
 لَتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ ۗ وَلِعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ ﴿١٢﴾

*“Dan tiada sama (antara) dua laut; yang ini tawar, segar, sedap diminum dan yang lain asin lagi pahit. Dan dari masing-masing laut itu kamu dapat memakan daging yang segar dan kamu dapat mengeluarkan perhiasan yang dapat kamu memakainya, dan pada masing-masingnya kamu lihat kapal-kapal berlayar membelah laut supaya kamu dapat mencari karunia-Nya dan supaya kamu bersyukur.” (QS. Faatir(35):12).*

Ayat di atas menjelaskan tentang kekuasaan Allah SWT yang menciptakan laut dengan berbagai macam kekayaan di dalamnya. Lafadz *تَأْكُلُونَ لَحْمًا طَرِيًّا* maksudnya adalah dari setiap lautan itu manusia dapat memakan daging yang segar, yaitu ikan yang berasal dari laut yang tawar airnya, dan dari laut yang asin serta pahit rasanya (Thabari, 2008). Berdasarkan Undang-undang RI Nomor 45 Tahun 2009 tentang perikanan, pasal 1 menjelaskan bahwa ikan adalah segala jenis organisme yang seluruh atau sebagian dari siklus hidupnya berada di dalam lingkungan perairan. Kekayaan laut tersebut memiliki peluang besar yang dapat dimanfaatkan sesuai dengan keperluan manusia, baik dijadikan sebagai bahan makanan maupun sebagai obat. Salah satu sumber kekayaan laut yang dapat dimanfaatkan adalah alga (rumpun laut).

Rumput laut secara tradisional telah lama digunakan sebagai bahan makanan, karena kaya akan mineral, elemen makro dan elemen mikro lainnya (Yunus, 2009). Menurut Soenardjo (2011), rumput laut atau alga merupakan tumbuhan laut yang tidak dapat dibedakan antara akar, daun, dan batang, sehingga seluruh tubuhnya disebut thallus. Berdasarkan kandungan pigmennya, rumput laut (alga) dibedakan menjadi alga hijau (*Chlorophyceae*), alga coklat (*Phaeophyceae*) dan alga merah (*Rhodophyceae*).

Alga merah (*Rhodophyceae*) merupakan jenis rumput laut yang banyak dimanfaatkan karena mengandung agar-agar, keraginan, porpiran maupun fulcelaran. Alga merah (*Rhodophyceae*) memiliki jumlah terbesar di perairan Indonesia. Hutomo dan Moosa (2005) menyatakan bahwa alga yang tersebar di seluruh wilayah perairan Indonesia meliputi 452 jenis alga merah

(*Rhodophyceae*), 196 jenis alga hijau (*Chlorophyceae*) dan 134 jenis alga coklat (*Phaeophyceae*).

Salah satu jenis Alga merah (*Rhodopiceae*) yang banyak dibudidayakan di Indonesia yaitu jenis *Eucheuma spinosum* (Diantariani, dkk., 2008). *Eucheuma spinosum* memiliki banyak manfaat diantaranya sumber keraginan, antioksidan, dan antibakteri. Penelitian yang dilakukan oleh Kasim (2013) tentang perolehan rendemen keraginan dari *Eucheuma spinosum* dan diperoleh rendemen tertinggi yaitu 32,07 %. Hijaz dkk. (2009) melakukan penelitian uji aktivitas antioksidan dalam alga merah jenis *Eucheuma spinosum* dan diperoleh aktivitas antioksidan ekstrak kasar *Eucheuma spinosum* pada 750 ppm sebesar 83,37 %. Penelitian yang dilakukan oleh Omar dkk. (2007) tentang efektifitas alga merah *Eucheuma spinosum* sebagai antibakteri patogen pada organisme budidaya pesisir dan manusia, daya hambat terbesar diperoleh pada ekstrak metanol dengan konsentrasi 40 %.

Penelitian yang dilakukan oleh Siregar dkk. (2012), identifikasi fitokimia pada 12 ekstrak rumput laut menggunakan pelarut etil asetat, n-heksan dan metanol, hasil uji fitokimia pada 12 ekstrak rumput laut menunjukkan bahwa senyawa yang dominan adalah golongan steroid. Anam dkk. (2105) menyatakan bahwa ekstrak metanol dan petroleum eter pada alga merah (*Eucheuma sipnosum*) mengandung senyawa steroid. Dari tumbuhan alga laut telah berhasil diisolasi beberapa senyawa steroid diantaranya kolest-5-ene-3 $\beta$ -ol (kolesterol), kolesta-4,6-diene-3 $\beta$ -ol, dan kolest-4-en-3-one (Swantara dan Parwata, 2011).

Senyawa steroid merupakan salah satu senyawa bioaktif yang penting dalam alga merah (*Eucheuma spinosum*). Senyawa steroid dapat menghambat

pertumbuhan bakteri dengan cara menghambat sintesis protein dan menyebabkan perubahan komponen penyusun sel bakteri tersebut. Wikanta dkk. (2005) melakukan penelitian uji sitotoksisitas ekstrak alga merah *Rhodomenia palmate* dan menyatakan bahwa steroid memiliki aktivitas sitotoksik yang dapat menghambat sel tumor. Penelitian yang dilakukan oleh Swantara dan Parwata (2011) tentang kajian senyawa antioksidan pada rumput laut sekitar Bali dihasilkan bahwa senyawa yang paling aktif bersifat antioksidan yaitu senyawa steroid jenis kolesterol dan kolesta-4,6-diene-3 $\beta$ -ol dengan persentase keaktifan sebesar 90,09 %. Swantara dkk. (2009) melakukan penelitian tentang identifikasi senyawa antiradikal bebas pada rumput laut *Sargassum ringgoldianum*, salah satu senyawa yang paling aktif sebagai antiradikal bebas yaitu senyawa steroid (3 $\beta$ -bromokolest-5-ena) dengan persentase peredaman sebesar 62,77 % pada menit ke-5 dan 92,19% pada menit ke-60.

Metode ekstraksi yang banyak digunakan untuk mengekstrak senyawa aktif adalah metode maserasi dengan pelarut metanol. Menurut Kristanti (2008) pelarut metanol merupakan pelarut universal, yang bersifat mampu melarutkan hampir semua komponen baik yang bersifat non polar, semi polar dan polar. Penelitian yang dilakukan oleh Lailiyah dkk. (2014) dimana serbuk alga coklat jenis *S. cristaefolium* direndam dalam pelarut metanol dan n-heksan selama 24 jam, hasil rendemen menunjukkan bahwa ekstrak tertinggi didapatkan pada pelarut metanol yaitu sebesar 5,524 %. Setelah 24 jam filtrat dipisahkan dari ampasnya dengan cara penyaringan. Setelah proses maserasi dilanjutkan dengan proses hidrolisis dan partisi.

Hidrolisis adalah reaksi yang terjadi antara suatu senyawa dan air dengan membentuk reaksi kesetimbangan (Mulyono, 2006). Reaksi hidrolisis dengan menggunakan air berlangsung sangat lambat sehingga memerlukan bantuan katalisator seperti asam. Asih (2009) menyatakan bahwa untuk memisahkan antara senyawa metabolit sekunder (aglikon) dengan gula (glikon) hasil ekstrak kasar metanol dilakukan dengan cara hidrolisis menggunakan HCl 2 N selama 2-3jam. Proses partisi dilakukan menggunakan pelarut petroleum eter, penggunaan fraksi petroleum eter berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Mardiyah dkk., 2012) dan (Kholidiyah dkk., 2013) diperoleh fraksi terbaik ada pada fraksi petroleum eter.

Proses pemisahan senyawa steroid, ekstrak hasil partisi dari pelarut petroleum eter alga merah (*Eucheuma spinosum*) dielusi dengan kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) menggunakan eluen terbaik yang diperoleh dari hasil KLTA. Penelitian terdahulu (Sinulingga, 2011) melakukan isolasi dan karakterisasi senyawa steroid dari akar tanaman ekor naga dan dapat dipisahkan dengan baik menggunakan n-heksana dan etil asetat dengan berbagai perbandingan. Halimah (2010) mengelusi ekstrak kloroform tanaman anting-anting yang dipisahkan dengan eluen n-heksana : etil asetat (7:3) menghasilkan 4 noda berwarna hijau terang, hijau kekuningan dan hijau kecoklatan. Ningsih dkk. (2015) melakukan pemisahan dan identifikasi senyawa steroid pada fraksi n-heksana Alga merah menggunakan berbagai macam eluen dan menghasilkan pemisahan yang baik pada eluen n-heksana dan etil asetat (17:3).

Hasil isolat KLTP yang diduga mengandung senyawa steroid dilakukan pengerokan dan diuji aktivitas antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang

dapat menghambat radikal bebas, sehingga antioksidan dapat menghambat berbagai penyakit yang berhubungan dengan radikal bebas seperti karsinogenesis, kardiovaskuler dan penuaan. Menurut Hernani (2005) kegunaan utama antioksidan adalah untuk menghentikan atau memutus reaksi berantai dan radikal bebas yang terdapat dalam tubuh. Antioksidan alami secara toksikologi lebih aman untuk dikonsumsi daripada antioksidan sintesis (Madhavi, *et al.*, 1996).

Salah satu metode yang banyak digunakan dalam uji aktivitas antioksidan yaitu metode DPPH. Metode ini merupakan suatu metode yang didasarkan pada perubahan warna yang cepat (perubahan warna dari ungu menjadi kuning) dan sangat efektif untuk menentukan aktivitas antioksidan. Metode DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel. Metode DPPH juga merupakan metode yang tidak terbatas untuk mengukur komponen yang larut dalam pelarut yang digunakan dalam analisa (dapat mengukur aktivitas total antioksidan baik dalam pelarut polar maupun non polar) (Hafid, 2003).

Elusidasi struktur senyawa steroid dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Spektrofotometer UV-Vis umum digunakan untuk identifikasi senyawa karena kepekaannya cukup tinggi dan relatif mudah dilakukan. Menurut Day dan Underwood (2002) spektrofotometer UV-Vis memiliki kemampuan untuk mengukur jumlah ikatan rangkap atau konjugasi aromatik dalam suatu molekul.

Penelitian mengenai penangkapan radikal bebas oleh suatu senyawa antioksidan perlu dilakukan mengingat efek negatif yang dapat ditimbulkan oleh suatu radikal bebas jika berada di dalam tubuh. Elusidasi struktur senyawa steroid

juga perlu dilakukan untuk mengetahui struktur senyawa steroid yang terdapat dalam alga merah (*Eucheuma spinosum*). Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian mengenai uji aktivitas antioksidan dan identifikasi menggunakan spektrofotometer uv-vis senyawa steroid fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah (*Eucheuma spinosum*) penting untuk dilakukan.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas antioksidan senyawa steroid fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol Alga merah (*Eucheuma spinosum*) ?
2. Bagaimana hasil identifikasi senyawa steroid fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol Alga merah (*Eucheuma spinosum*) menggunakan UV-Vis ?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk :

1. Mengetahui aktivitas antioksidan senyawa steroid fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol Alga merah (*Eucheuma spinosum*).
2. Mengetahui hasil identifikasi senyawa steroid fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol Alga merah (*Eucheuma spinosum*) menggunakan UV-Vis.

## 1.4 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan dalam penelitian merupakan makroalga jenis Alga merah (*Eucheuma spinosum*) yang berasal dari pantai Jumiang Pamekasan Madura.

2. Alga merah diekstraksi dengan metode maserasi dan difraksinasi menggunakan petroleum eter.
3. Identifikasi senyawa steroid hasil fraksinasi petroleum eter dilakukan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH.

### **1.5 Manfaat Penelitian**

1. Untuk memberikan pengetahuan mengenai senyawa metabolit sekunder yang ada dalam alga merah. salah satu senyawanya merupakan senyawa steroid yang biasanya digunakan untuk senyawa obat.
2. Untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada senyawa steroid.
3. Untuk memberikan pengetahuan mengenai senyawa steroid yang terdapat dalam alga merah.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Alga Merah (*Eucheuma spinosum*)

Alga merah merupakan salah satu hasil perikanan yang penting di Indonesia dan memiliki nilai ekonomi yang tinggi karena mengandung keraginan dan agar. Alga merah memiliki pigmen fikoeretrin (*phycoerethrin*) dan fikosianin (*phycocyanin*) yang struktur dasarnya pirol dan berprotein. Fikoeretrin adalah pigmen yang berwarna merah cerah dan memancarkan warna oranye, sedangkan fikosianin berwarna biru yang memancarkan warna merah tua (Atmadja, 2007).

*Eucheuma spinosum* merupakan salah satu jenis alga merah yang dapat menyediakan sumber daya alam dalam jumlah yang melimpah dan mudah dibudidayakan. Menurut (Hidayat, 2006) Genus ini memiliki *thallus* berwarna kuning kecoklatan sampai merah keunguan, berbentuk agak pipih dan bercabang tidak beraturan. Percabangan yang terjadi adalah dua (*dichotome*) atau tiga (*trichotome*) buah.

Allah SWT berfirman dalam al-Quran surat az-Zumar (39) : 21:

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَسَلَكَهُ يَنْبِيعٌ فِي الْأَرْضِ ثُمَّ يُخْرِجُ بِهِ زَرْعًا مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ ثُمَّ يَهِيَجُ فِتْرَتَهُ مُصْفَرًّا ثُمَّ يَجْعَلُهُ حُطَمًا ۚ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَذِكْرَى لِأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿٢١﴾

“Apakah kamu tidak memperhatikan, bahwa Sesungguhnya Allah menurunkan air dari langit, Maka diaturnya menjadi sumber-sumber air di bumi kemudian ditumbuhkan-Nya dengan air itu tanam-tanaman yang bermacam-macam warnanya, lalu menjadi kering lalu kamu melihatnya kekuning-kuningan, kemudian dijadikan-Nya hancur berderai-derai. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat pelajaran bagi orang-orang yang mempunyai akal.” (Qs. az-Zumar (39):21).

Lafadz زُرْعاً مُخْتَلِفاً أَلْوَانُهُ memiliki arti tanaman yang bermacam-macam warnanya. Lafadz ini menunjukkan kepada jenis, yakni tumbuhan yang bermacam-macam warnanya yaitu merah, kuning, biru, hijau dan putih (Qurthubi, 2009). Alga merah jenis *Eucheuma spinosum* merupakan salah satu jenis tanaman yang memiliki warna merah.

Ciri khusus secara morfologis, jenis ini berduri-duri yang tumbuh berderet melingkari *thallus* dengan interval yang bervariasi. Percabangan berlawanan atau berselang-seling dan timbul teratur pada deretan duri antar ruas dan merupakan perpanjangan dari duri tersebut. Ujung percabangan mudah melekat pada substrat seperti ditunjukkan pada Gambar 2.1 (Anggadiredja, dkk., 2006).



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

*Eucheuma spinosum* mempunyai taksonomi sebagai berikut (Anggadiredja, dkk., 2006) :

Diviso : Rhodophyta  
 Kelas : Rhodophyceae  
 Bangsa : Gigartinales  
 Suku : Solierisceae  
 Marga : *Eucheuma*  
 Jenis : *Eucheuma spinosum*

*Eucheuma spinosum* tumbuh melekat pada rata-rata terumbu karang, batu karang, batuan, benda keras dan cangkang kerang (*epilitic*). *Eucheuma spinosum* memerlukan sinar matahari untuk proses fotosintesis sehingga hanya hidup pada lapisan *fitik* (permukaan atas laut) dan arena pertumbuhannya membutuhkan salinitas 28 – 33 per mil (Anggadiredja, dkk., 2005).

## 2.2 Kandungan dan Manfaat *Eucheuma spinosum*

Allah SWT menciptakan lautan beserta kekayaan yang terkandung di dalamnya tidak semata-mata untuk disia-siakan, karena setiap ciptaan Allah SWT memiliki manfaat tersendiri. Sebagaimana firman Allah SWT dalam al-Quran surat al-Maidah (5) : 96:

أَحْلَلْ لَكُمْ صَيْدَ الْبَحْرِ وَطَعَامَهُ، مَتَّعًا لَكُمْ وَلِلسَّيَّارَةِ وَحُرِّمَ عَلَيْكُمْ صَيْدَ الْبَرِّ مَا  
 دُمْتُمْ حُرْمًا وَاتَّقُوا اللَّهَ الَّذِي إِلَيْهِ تُحْشُرُونَ ﴿٩٦﴾

“Dihalalkan bagimu binatang buruan laut dan makanan (yang berasal) dari laut sebagai makanan yang lezat bagimu, dan bagi orang-orang yang dalam perjalanan; dan diharamkan atasmu (menangkap) binatang buruan darat, selama kamu dalam ihram. dan bertakwalah kepada Allah yang kepada-Nyalah kamu akan dikumpulkan” (QS. al-Maidah (5):96).

Lafadz وَطَعَامَهُ memiliki arti makanan (yang berasal) dari laut yaitu berbagai jenis tumbuhan yang ada di dalam laut, dan berbagai hal lainnya (Qurthubi, 2009).

Ayat di atas menjelaskan tentang manfaat kekayaan laut yang dapat dijadikan sebagai bahan makanan seperti ikan, kerang, teripang, kerang, dan rumput laut (alga). Alga merupakan kekayaan laut yang banyak dibudidayakan karena mengandung metabolit sekunder yang dapat dimanfaatkan di berbagai bidang terutama di bidang kesehatan.

Biota laut umumnya mengandung senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid dan lain-lain. Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang umumnya mempunyai kemampuan bioaktivitas dan berfungsi sebagai pelindung hewan laut tersebut dari gangguan hama penyakit untuk hewan itu sendiri atau lingkungannya (Lenny, 2006).

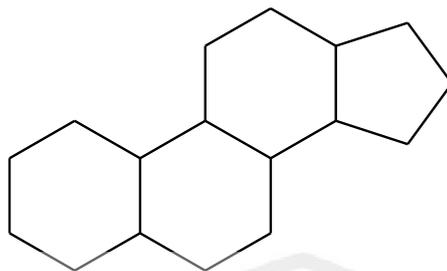
Berdasarkan hasil uji fitokimia pada penelitian yang dilakukan oleh Siregar, dkk. (2012) alga merah jenis *Eucheuma spinosum* pada ekstrak n-heksana, etil asetat, dan methanol menunjukkan adanya senyawa alkaloid dan steroid. Golongan senyawa alkaloid dan steroid yang terdapat pada ekstrak kasar rumput laut menunjukkan senyawa aktif antibakteri. Komposisi nilai nutrisi alga merah *Eucheuma* sp. adalah sebagai berikut:

**Tabel 2.1 komposisi nilai nutrisi alga merah *Eucheuma spinosum* (Resy, 2009)**

Komponen	Jumlah
Kadar air (%)	12,90
Karbohidrat (%)	5,12
Protein (%)	0,13
Lemak (%)	13,38
Serat kasar (%)	1,39
Abu (%)	14,21
Mineral : Ca (ppm)	58,82-
Fe (ppm)	0,0108
Cu (ppm)	0,768
Pb (ppm)	-
Vitamin B1 (Thiamin)(mg/100g)	0,21
Vitamin B2 (Riboflavin)(mg/100g)	2,26
Vitamin C (mg/100g)	43,00
Karaginan (%)	65,75

### 2.3 Senyawa Steroid

Steroid merupakan salah satu senyawa bioaktif dalam alga merah *Eucheuma spinosum* yang salah satu manfaatnya dapat dijadikan sebagai antioksidan. Steroid ini termasuk kelompok senyawa bahan alam yang kebanyakan strukturnya terdiri atas 17 atom karbon dengan membentuk struktur dasar 1,2-siklopentenoperhidrofenantren. Molekul steroid relatif datar/planar, terdapat dua kelompok besar steroid berdasarkan konfigurasi cincin-cincinnya (Kristanti, dkk., 2008):



1,2-siklopentenoperhidrofenantren

**Gambar 2.2 Struktur Dasar Steroid (Kristanti, dkk., 2008)**

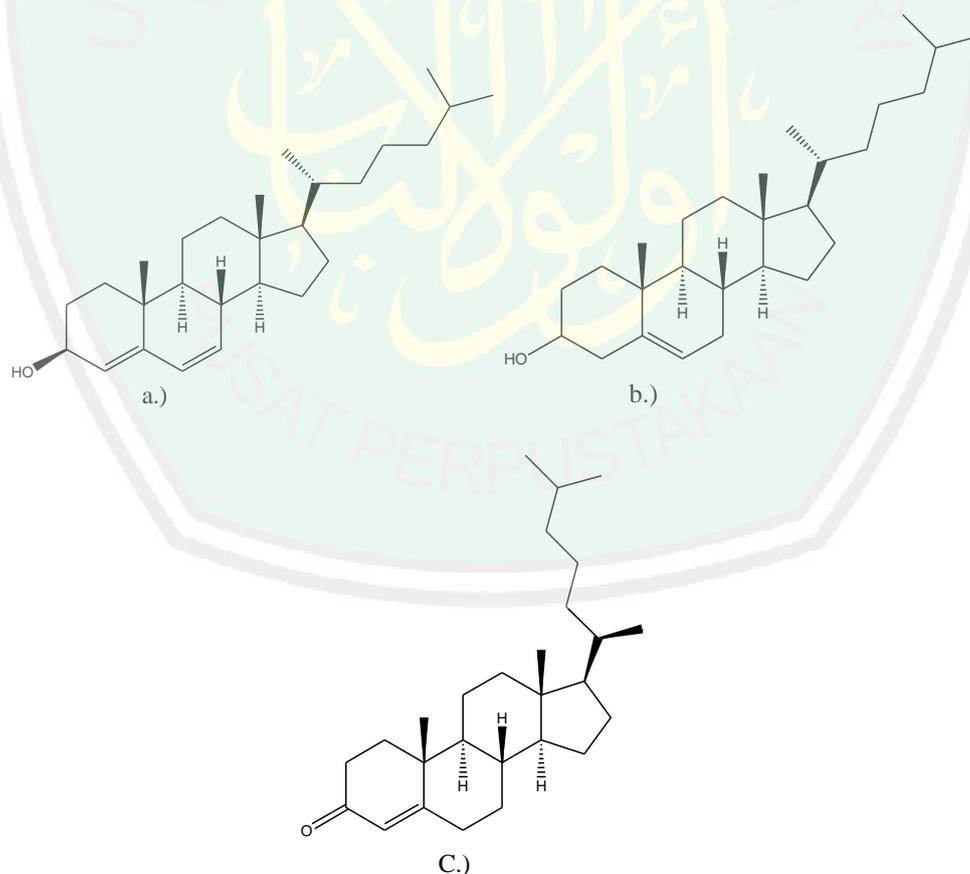
Steroid atau sterol adalah triterpenoid biasanya larut dalam pelarut yang kurang polar. Semua sterol diduga hanya ada pada binatang, namun sekarang telah diketahui bahwa sterol juga terdapat pada tumbuhan (fitosterol). Fitosterol ini berbeda secara struktural dengan sterol binatang. Perbedaannya terutama pada substitusi gugus metil dan etil (Febriany, 2004).

Sumber-sumber steroid di alam dapat berasal dari tumbuhan (fitosterol), dari hewan (zoosterol), dari fungi (mikosterol) dan dari organisme laut (marinesterol). Steroid yang berasal dari tumbuhan misalnya  $\beta$ -sitosterol yang biasanya terdapat pada serum lemak, stigmasterol dan kompesterol yang umumnya terdapat dalam minyak kedelai. Sedangkan steroid yang berasal dari hewan misalnya kolesterol yang umumnya terdapat dalam otak, sumsum tulang belakang dan hati, progesteron yang terdapat dalam indung telur dan sekitar kelenjar susu. Contoh steroid yang berasal dari fungi yaitu ergosterol yang terdapat di khamir dan membran jamur, dan contoh steroid yang berasal dari organisme laut yaitu spongesterol, fukosterol pada alga coklat, dan desmosterol pada alga merah (Vembriarto, 2013).

Isolasi dan identifikasi senyawa steroid dari beberapa jenis rumput laut telah berhasil dilakukan. Swantara, dkk (2009) melakukan isolasi dan identifikasi pada

rumpun laut *Sargassum ringgoldianum*. Pemisahan dan pemurniannya dilakukan dengan cara partisi, kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom. Hasil identifikasi dengan kromatografi gas-spektroskopi massa terhadap fraksi B menunjukkan bahwa senyawa-senyawa yang terkandung dalam fraksi B berasal dari golongan ester dan steroid.

Swantara dan Parwata (2011) juga telah berhasil mengisolasi senyawa steroid pada rumput laut dari pantai sekitar Bali. Identifikasi senyawa menggunakan kromatografi gas spektroskopi massa, senyawa steroid yang berhasil diidentifikasi yaitu kolesta-4,6-diene-3 $\beta$ -ol, kolest-5-ene-3 $\beta$ -ol (kolesterol), dan kolest-4-en-3-one. Rumus strukturnya dapat dilihat pada gambar 2.3.



**Gambar 2.3 (a) kolesta-4,6-diene-3 $\beta$ -ol, (b) kolest-5-ene-3 $\beta$ -ol (kolesterol), (c) kolest-4-en-3-one (Swantara dan Parwata, 2011)**

## **2.4 Ekstraksi Steroid**

### **2.4.1 Prinsip Ekstraksi**

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu komponen yang diinginkan dalam suatu campuran, biasanya digunakan pelarut tapi juga dapat dengan cara mekanis (pemerasan). Pemisahan terjadi atas dasar kemampuan kelarutan yang berbeda dari komponen-komponen yang terdapat di dalam campuran. Secara umum, ekstraksi senyawa metabolit sekunder dari seluruh bagian tumbuhan, seperti bunga, buah, daun, kulit batang, dan akar dapat menggunakan maserasi metanol (Arifin, 1986).

Metode ekstraksi yang dipilih untuk digunakan dalam suatu penelitian fitokimia tentu sangat bergantung pada tekstur dan kandungan air yang diekstraksi. Metode ekstraksi berguna untuk melarutkan senyawa-senyawa yang terdapat dalam jaringan tanaman kedalam pelarut yang dipakai untuk proses ekstraksi tersebut. Alkohol merupakan pelarut universal yang baik untuk ekstraksi semua golongan senyawa metabolit sekunder. Untuk mengisolasi suatu senyawa dari tanaman, keberhasilan ekstraksi dengan alkohol berkaitan langsung dengan seberapa jauh klorofil tertarik oleh pelarut tersebut (Kristanti, dkk.,2008).

### **2.4.2 Maserasi**

Maserasi merupakan proses ekstraksi yang cukup terkenal dan paling sederhana. Maserasi adalah proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruang. Proses maserasi ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dengan perendaman

sampel tumbuhan akan mengalami pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut (Lenny, 2006).

Pemilihan pelarut dalam proses maserasi sangat penting karena akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metanol. Menurut (Kristanti, dkk., 2008) pelarut metanol merupakan pelarut universal, selain itu dikhawatirkan steroid masih terikat dengan gugus gula sehingga menggunakan pelarut semipolar atau polar.

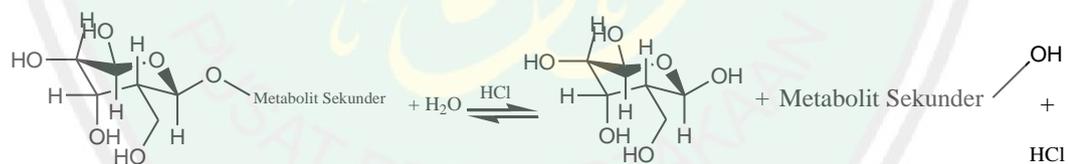
Lailiyah dkk. (2014) melakukan maserasi pada alga coklat *Sargassum cristaefolium* menggunakan pelarut metanol dan n-heksana dan direndam selama 24 jam, hasil rendemen menunjukkan bahwa ektrask teringgi didapatkan pada pelarut metanol yaitu sebesar 5,524% sedangkan pada pelarut n-heksana hanya 1,002%. Mardiyah dkk. (2014) juga melakukan ekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol selama 24 jam dengan 5 kali pengulangan, diperoleh rendemen sebesar 16,25%.

## 2.5 Hidrolisis Asam

Hidrolisis merupakan suatu reaksi yang terjadi antara air dengan suatu senyawa hingga membentuk reaksi kesetimbangan (Mulyono, 2006). Hidrolisis dilakukan untuk memutuskan ikatan glikosida pada senyawa organik. Glikosida merupakan senyawa yang terdiri dari gabungan bagian gula (glikon) yang bersifat polar dan bagian bukan gula (aglikon) yang bersifat polar, semipolar maupun non polar (senyawa metabolit sekunder) (Gunawan, 2008).

Perubahan struktur suatu senyawa ke bentuk glikosidanya menyebabkan senyawa tersebut mengalami perubahan sifat fisika, kimia dan aktivitas biologi. Apabila suatu senyawa terdapat banyak ikatan glikosidanya maka senyawa tersebut akan cenderung bersifat polar, sehingga pada proses ekstraksi akan lebih terekstrak pada pelarut-pelarut polar. Senyawa yang terikat dengan ikatan glikosidanya, akan sulit dipisahkan menggunakan KLT karena akan cenderung tertahan pada fase diamnya (Saifudin, 2006).

Reaksi hidrolisis menggunakan air berlangsung sangat lambat sehingga memerlukan bantuan katalisator. Katalisator yang sering digunakan dalam industri adalah asam klorida (HCl) karena akan terbentuk garam NaCl yang tidak berbahaya (Setiyawan, 2015). Asih (2009) menyatakan bahwa untuk memisahkan antara senyawa metabolit sekunder (aglikon) dengan gula (glikon) hasil ekstrak kasar metanol dilakukan dengan cara hidrolisis menggunakan HCl 2 N selama 2-3 jam. Dugaan reaksi yang terjadi pada saat proses hidrolisis sebagai berikut:



**Gambar 2.4** Dugaan reaksi hidrolisis ikatan *O*-glikosida (Mardiyah, 2012)

Berikut adalah reaksi penetralan antara asam klorida dan natrium bikarbonat:



**Gambar 2.5** Reaksi antara HCl dan natrium bikarbonat (Mardiyah, 2012)

## 2.6 Ekstraksi Cair-cair (Partisi)

Ekstraksi cair-cair berhubungan dengan distribusi suatu zat terlarut (solute) diantara dua fase cair yang tidak saling campur. Teknik ekstraksi cair-cair ini memanfaatkan perbedaan kelarutan dari suatu substansi dalam dua pelarut yang

tidak saling campur. Seperti ekstraksi padat-cair, ekstraksi cair-cair terdiri dari sedikitnya dua tahap, yaitu pencampuran secara intensif bahan ekstraksi dengan pelarut dan pemisahan kedua fase cair sesempurna mungkin. Syarat agar pemisahan analit dapat dilakukan dengan baik yaitu (Afriyanti, 2013):

1. Kedua campuran tidak saling campur.
2. Analitnya lebih larut dalam pelarut pengekstraknya dari pada dalam pelarut asalnya.

Steroid merupakan golongan senyawa yang sebagian besar bersifat nonpolar, sehingga ekstraksinya juga menggunakan pelarut non-polar. Petroleum eter merupakan campuran dari hidrokarbon cair yang mudah menguap. Septiyaningsih (2010) menyatakan bahwa pelarut petroleum eter dapat mengisolasi senyawa yang bersifat non polar yaitu lemak dan asam lemak tinggi, seperti steroid dan triterpenoid, dan karatenoid. Petroleum eter akan melarutkan senyawa-senyawa yang bersifat kurang polar pada selubung sel dan dinding sel seperti lemak-lemak, terpenoid, klorofil dan steroid (Oktavia, 2009).

Proses partisi dilakukan menggunakan pelarut petroleum eter, penggunaan fraksi petroleum eter berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Mardiyah dkk., 2012) dan (Kholidiyah dkk.,2013) diperoleh fraksi terbaik ada pada fraksi petroleum eter. Mardiyah dkk. (2012) mengekstrak alga merah *Eucheuma spinosum* menggunakan pelarut metanol. Hasil maserasi dihidrolisis menggunakan HCl sebanyak 5 gram kemudian dipartisi menggunakan pelarut petroleum eter. Hasil partisi dipekatkan dan menghasilkan rendemen yang cukup besar yaitu 10,62%.

## 2.7 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Uji fitokimia merupakan uji kualitatif golongan senyawa aktif pada suatu sampel baik pada tumbuhan maupun pada hewan. Uji ini membantu memberikan gambaran tentang golongan senyawa aktif berupa metabolit sekunder di dalamnya. Metode yang digunakan secara umum metodenya merupakan reaksi pengujian warna (spot test) dengan suatu pereaksi warna dan pemisahannya (Kristanti, dkk., 2008).

Uji fitokimia dari fraksi petroleum eter hasil ekstrak metanol alga merah *Eucheuma spinosum* menunjukkan adanya senyawa steroid (Kholidiyah dkk., 2013). Penelitian yang dilakukan oleh Afif (2013), ekstrak alga merah *Eucheuma spinosum* fraksi n-heksana mengalami reaksi positif pada uji steroid. Ningsih dkk. (2015) melakukan uji fitokimia senyawa steroid ekstrak alga merah *Eucheuma spinosum* fraksi n-heksana menunjukkan adanya senyawa steroid ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan.

Uji fitokimia senyawa steroid dilakukan dengan penambahan kloroform, asam asetat anhidrat dan  $H_2SO_4$  pada dinding tabung reaksi. Adanya senyawa steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kebiruan (Zamroni, 2011). Uji deteksi steroid dan triterpenoid yang banyak digunakan adalah dengan menggunakan pereaksi Lieberman-Burchard (asam-asetat anhidrat- $H_2SO_4$  pekat) yang dengan triterpena dan sterol memberikan warna hijau-bir (Harbone, 1996).

## 2.8 Pemisahan Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)

Kromatografi lapis tipis analitik (KLTA) dilakukan untuk mengetahui eluen terbaik. Pemisahan senyawa steroid dengan KLTA menggunakan 2 variasi eluen yaitu n-heksana dan etil asetat dengan berbagai perbandingan. Campuran 2 pelarut

organik lebih banyak dipilih karena daya elusi campuran pelarut ini mudah diatur sedemikian rupa sehingga dapat terjadi secara optimal (Rohman dan Gandjar, 2007). Pemisahan yang baik ditandai dengan banyaknya noda yang dihasilkan, noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak antara noda yang satu dengan yang lainnya jelas (Harbone, 1987).

Ningsih dkk. (2015) melakukan pemisahan senyawa steroid menggunakan KLTA pada alga merah *Eucheuma spinosum* hasil hidrolisis ekstrak metanol dengan eluen n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 9:1, 17:3, 8:2, 7:3, dan 6:4. Hasil pemisahan terbaik terdapat pada perbandingan 17:3 yang ditandai dengan jumlah noda yang dihasilkan paling banyak yaitu 9 noda, noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak antara noda yang satu dengan yang lainnya jelas.

## **2.9 Pemisahan Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)**

Kromatografi merupakan salah satu metode untuk teknik pemisahan tertentu. Pada teknik kromatografi ini menggunakan dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Pemisahan- pemisahan ini bergantung pada gerakan relatif dari dua fase ini. Prinsip dari pemisahan adalah adanya perbedaan sifat fisik dan kimiawi dari senyawa yaitu kecenderungan molekul untuk melarut dalam cairan, kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan serbuk halus (Sastrohamidjojo, 2005).

Kromatografi lapis tipis (KLT) berdasarkan tujuannya dibedakan menjadi 2 yaitu untuk tujuan analitik dan untuk tujuan preparatif. KLT analitik digunakan untuk menganalisa senyawa organik dalam jumlah kecil. Sedangkan KLT preparatif digunakan untuk memisahkan campuran senyawa dari sampel dalam

jumlah besar berdasarkan fraksinya, selanjutnya fraksi tersebut dikumpulkan menjadi satu dan digunakan untuk analisa berikutnya (Sastrohamidjojo, 2005).

Analisis preparatif ditujukan untuk memisahkan analit dalam jumlah yang banyak dan senyawa yang telah dipisahkan ini dianalisis lebih lanjut, misalkan dengan spektrofotometri atau dengan teknik kromatografi lain. Pada KLT preparatif ini, sampel ditotolkan dalam lempeng dengan lapisan yang besar lalu dideteksi. bercak yang mengandung analit yang diinginkan selanjutnya dikerok dan dilakukan analisis lebih lanjut (Rohman, 2007).

Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Sinulingga (2011) tentang isolasi dan karakterisasi senyawa steroid dari akar tanaman ekor naga dan dapat dipisahkan dengan baik menggunakan n-heksan dan etil asetat dengan berbagai perbandingan. Halimah (2010) mengelusi ekstrak kloroform tanaman anting-anting yang dipisahkan dengan eluen n-heksan : etil asetat (7:3) menghasilkan 4 noda berwarna hijau terang, hijau kekuningan dan hijau kecoklatan, hal ini menandakan adanya senyawa steroid. Ningsih dkk. (2015) juga melakukan penelitian tentang pemisahan dan identifikasi senyawa steroid pada fraksi n-heksan alga merah menggunakan berbagai macam eluen dan menghasilkan pemisahan terbaik pada eluen n-heksan dan etil asetat (17:3).

Untuk identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah dari lapisan tipis menggunakan Rf. Harga Rf untuk senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga Rf standart. Harga Rf dapat dihitung dengan rumus berikut (Sastrohamidjojo, 2005):

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

## 2.10 Antioksidan

Menurut Dainith (2005), antioksidan didefinisikan sebagai zat atau bahan yang menghambat proses oksidasi. Antioksidan adalah molekul yang menetralkan radikal bebas dengan cara menerima atau memberikan elektron untuk mengeliminasi kondisi tidak berpasangan. Ini berarti antioksidan menjadi radikal pada proses netralisasi molekul radikal bebas. Tetapi radikal antioksidan lebih tidak reaktif dari pada radikal bebas yang akan dinetralisasi. Radikal antioksidan ini dapat dinetralkan oleh antioksidan lain dan atau dengan mekanisme lain yang menghentikan radikal (Best, 2006).

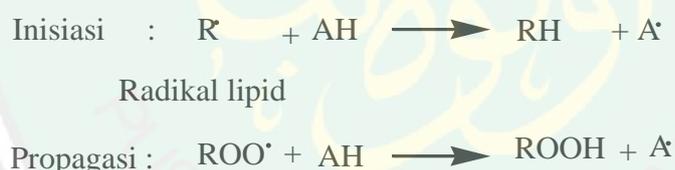
Fungsi Antioksidan digunakan untuk melindungi komponen-komponen makanan yang bersifat tidak jenuh (mempunyai ikatan rangkap), terutama lemak dan minyak. Meskipun demikian antioksidan dapat pula digunakan untuk melindungi komponen-komponen lain seperti vitamin dan pigmen, yang juga banyak mengandung ikatan rangkap di dalam strukturnya. Antioksidan efektif dalam mengurangi ketengikan oksidatif dan polimerisasi tetapi tidak mempengaruhi hidrolisis. Penggunaan antioksidan secara berlebihan menyebabkan lemah otot, mual-mual, pusing, dan kehilangan kesadaran, sedangkan penggunaan dosis rendah secara terus-menerus menyebabkan tumor, kandung kemih, kanker sekitar lambung dan kanker paru-paru (Cahyadi, 2006).

### 2.10.1 Mekanisme Antioksidan

Menurut Gordon (1990), antioksidan mempunyai dua fungsi berdasarkan mekanisme kerjanya. Pertama, fungsi utama antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan (AH) yang memiliki fungsi tersebut disebut antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke

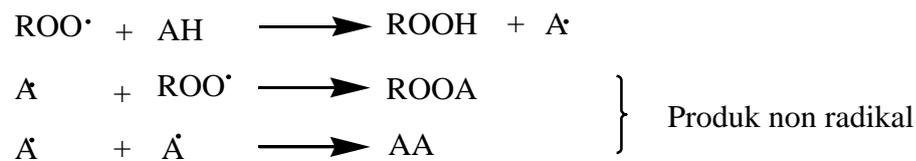
radikal lipida ( $R^\cdot$ ,  $ROO^\cdot$ ) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara hasil reaksi radikal antioksidan ( $A^\cdot$ ) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding dengan radikal lipid. Fungsi kedua antioksidan merupakan antioksidan sekunder, yaitu berfungsi untuk memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme di luar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi dengan perubahan radikal lipida ke bentuk yang lebih stabil.

Pada konsentrasi rendah penambahan antioksidan (AH) primer pada lipid dapat menghambat atau mencegah reaksi autooksidasi lemak dan minyak. Penambahan tersebut dapat menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi (Gambar 2.6). Radikal-radikal antioksidan ( $A^\cdot$ ) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipid lain membentuk radikal lipid baru (Gordon, 1990).



**Gambar 2.6 Reaksi Penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipid (Gordon, 1990)**

Interaksi antara radikal-radikal antioksidan dapat membentuk produk non radikal (Hamilton dkk., 1994). Autooksidasi dapat dihambat dengan menambahkan antioksidan (AH) dalam konsentrasi rendah yang dapat berasal dari penginterferensian rantai propagasi atau inisiasi.



**Gambar 2.7** Reaksi penghambatan antioksidan antar radikal antioksidan (Hamilton dkk., 1994)

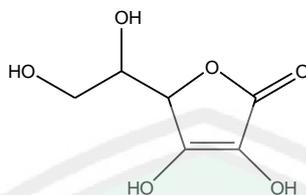
Fungsi antioksidan digunakan untuk melindungi komponen-komponen makanan yang bersifat tidak jenuh (mempunyai ikatan rangkap), terutama lemak dan minyak. Meskipun demikian antioksidan dapat pula digunakan untuk melindungi komponen-komponen lain seperti vitamin dan pigmen, yang juga banyak mengandung ikatan rangkap si dalam strukturnya. Antioksidan efektif dapat mengurangi ketengikan oksidatif dan polimerisasi tetapi tidak mempengaruhi hidrolisis (Cahyadi, 2006).

### 2.10.2 Antioksidan Alami dan Sintetik

Berdasarkan sumbernya, antioksidan dibagi dalam dua kelompok, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Antioksidan alami merupakan antioksidan yang diperoleh dari hasil ekstrak bahan alami. Antioksidan alami dalam makanan dapat berasal dari (a) senyawa antioksidan yang sudah ada dari satu atau dua komponen makanan, (b) senyawa antioksidan yang terbentuk dari reaksi-reaksi selama proses pengolahan, (c) senyawa antioksidan yang diisolasi.

Vitamin C (asam askorbat) merupakan salah satu contoh antioksidan alami yang berfungsi untuk mengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi. Namun vitamin C bersifat tidak stabil bila terkena cahaya dan pada suhu tinggi mudah mengalami kerusakan. Vitamin C adalah kristal padat, berwarna putih, tidak berbau, mencair pada suhu 190 – 192 °C, mudah larut dalam air, etil

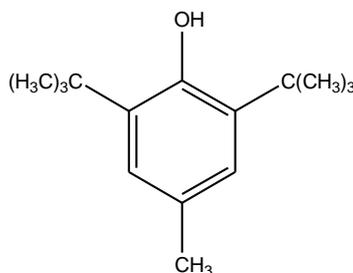
alkohol dan gliserol (Cahyadi, 2006). Struktur kimia asam askorbat dapat dilihat pada Gambar 2.6.



**Gambar 2.8 Struktur kimia asam askorbat (Cahyadi, 2006)**

Antioksidan sintetik merupakan antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesis reaksi kimia. Diantara beberapa contoh antioksidan sintetik yang diijinkan untuk makanan, ada empat antioksidan yang penggunaannya meluas dan menyebar di seluruh dunia, yaitu Butil Hidroksi Anisol (BHA), Butil Hidroksi Toluen (BHT), propil galat, Tert-Butil Hidoksi Quinon (TBHQ) dan tokoferol. Antioksidan tersebut merupakan antioksidan alami yang telah diproduksi secara sintesis untuk tujuan komersial (Trilaksani, 2003).

BHT sebagai salah satu antioksidan sintetik mempunyai kelarutan yang baik dalam lemak dan minyak, tetapi tidak larut dalam air. Antioksidan BHT mempunyai rumus kimia  $C_{15}H_{24}O$ , berat molekul 220,36, titik lebur  $69 - 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sinergis dengan BHA dan galat (Hamilton, *et.al.*, 1994). Adapun struktur dari BHT (Cahyadi, 2006):

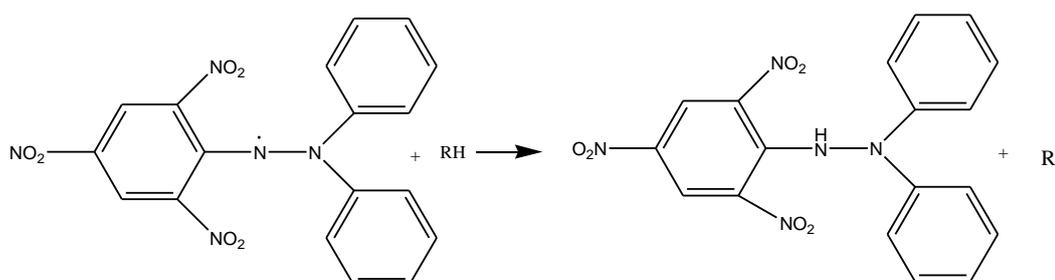


**Gambar 2.9 Struktur kimia BHT (Butyl Hydroxy Toluen) (Cahyadi, 2006)**

## 2.11 Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrasil) digunakan secara luas untuk menguji kemampuan senyawa yang berperan sebagai pendonor elektron atau hidrogen. Beberapa metode lain terbatas mengukur komponen yang larut dalam pelarut yang digunakan dalam analisa. Metode DPPH mengukur semua komponen antioksidan, baik yang larut dalam lemak maupun dalam air. Selain itu, metode DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel. Senyawa ini mempunyai ciri-ciri padatnya berwarna ungu kehitaman, larut dalam pelarut DMF atau etanol/metanol, titik didih 127-129°C, panjang gelombang maksimal sebesar 517 nm, berat molekul 394,3 g/mol, rumus molekul  $C_{18}H_{12}N_5O_6$  (Prakash, 2001).

Radikal bebas DPPH yang memiliki elektron tidak berpasangan memberikan warna ungu dan menghasilkan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 517 nm. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, larutan akan berubah warna dari ungu tua menjadi kuning terang. Perubahan ini dapat diukur dengan stoikiometri sesuai dengan jumlah elektron atau atom hidrogen yang ditangkap oleh molekul DPPH akibat adanya zat antioksidan. Reaksi antara antioksidan dengan molekul DPPH yaitu sebagai berikut (Prakash, 2001):



**Gambar 2.10** Reaksi antara antioksidan dengan molekul DPPH (Prakash, 2001)

Aktivitas antioksidan dapat dinyatakan dengan satuan % aktivitas. Nilai ini diperoleh dengan rumus (Molyneux, 2003):

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100\% \dots\dots\dots (2.2)$$

Keterangan :  $A_0$  = Absorbansi kontrol

$A_1$  = Absorbansi DPPH sisa yang tidak bereaksi dengan sampel

Dalam metode DPPH ini terdapat parameter  $EC_{50}$ . Parameter  $EC_{50}$  merupakan parameter yang menunjukkan konsentrasi ekstrak uji yang mampu menangkap radikal bebas sebanyak 50% yang diperoleh dari persamaan regresi. Semakin kecil  $EC_{50}$  suatu senyawa uji maka senyawa tersebut semakin efektif sebagai penangkal radikal bebas (Rohman dan Riyanto, 2005).

Uji aktivitas antioksidan golongan senyawa aktif alga merah (*Eucheuma spinosum*) terhadap DPPH menggunakan berbagai fraksi yaitu fraksi 1-butanol, etil asetat, kloroform, petroleum eter dan n-heksan telah dilakukan oleh Mardiyah dkk. (2012), nilai  $EC_{50}$  terkecil ada pada fraksi petroleum eter yaitu sebesar 12,65 mg/L. Nilai  $EC_{50}$  paling kecil menandakan aktivitas antioksidan yang paling tinggi. Secara spesifik, ketentuan kekuatan antioksidan ditunjukkan pada Tabel 2.2 :

**Tabel 2.2 Ketentuan Kekuatan Antioksidan**

Nilai $EC_{50}$	Kekuatan
< 50 ppm	Sangat kuat
50 – 100 ppm	Kuat
100 – 150 ppm	Sedang
150 – 200 ppm	Lemah
>200 ppm	Sangat lemah

Sumber: Hidajat (2005)

Swantara dkk. (2009) melakukan penelitian tentang identifikasi senyawa antiradikal bebas pada rumput laut *Sargassum ringgoldianum*, ekstraksi metabolitnya dilakukan dengan cara maserasi sedangkan pemisahan dan pemurniannya dilakukan dengan partisi, kromatografi lapis tipis, dan kromatografi kolom. Fraksi yang paling aktif sebagai antiradikal bebas yaitu fraksi B dengan persentase peredaman sebesar 62,77% pada menit ke-5 dan 92,19% pada menit ke-60, fraksi B selanjutnya diidentifikasi menggunakan paduan kromatografi gas-spektroskopi massa sehingga teridentifikasi enam senyawa, salah satunya senyawa steroid yaitu  $3\beta$ -bromokolest-5-ena.

Swantara dan parwata (2011) telah melakukan penelitian tentang kajian senyawa antioksidan pada rumput laut dari pantai sekitar Bali. Rumput laut yang digunakan yaitu *Exophylum wentii* dan *Gracilia coronopifolia*, ekstraksi kedua rumput laut tersebut menggunakan cara maserasi sedangkan pemisahan dan pemurniannya dengan cara partisi cair-cair dan metode kromatografi kolom. Isolat aktif hasil pemurnian kedua sampel tersebut menunjukkan aktivitas antioksidan, yaitu berturut-turut sebesar 90,09% dan 90,72% pada menit ke-60. Kedua isolat yang diperoleh diidentifikasi menggunakan paduan kromatografi gas-spektroskopi massa, pada isolat *E. wentii* dan *G. coronopifolia* masing-masing teridentifikasi enam senyawa, salah satu senyawa yang teridentifikasi yaitu senyawa steroid (kolesta-4,6-diene- $3\beta$ -ol ; kolest-5-en- $3\beta$ -ol (kolesterol) ; dan kolest-4-en-3-one).

## 2.12 Identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis

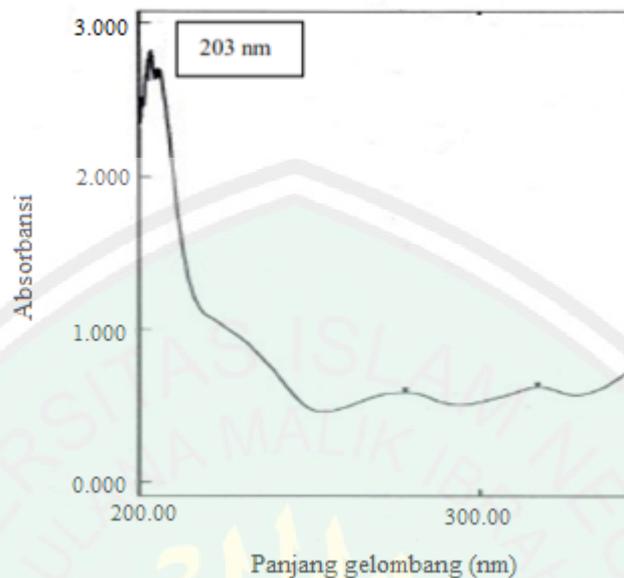
Prinsip dari spektrofotometer UV-Vis adalah adanya transisi elektronik suatu molekul yang disebabkan oleh peristiwa absorpsi energi berupa radiasi elektromagnetik pada frekuensi yang sesuai oleh molekul tersebut (Rohman,

2007). Absorpsi radiasi oleh sampel diukur oleh detektor pada berbagai panjang gelombang dan diinformasikan ke perekam untuk menghasilkan spektrum. Spektrum ini akan memberikan informasi penting untuk identifikasi adanya gugus kromofor (Hendayana, 2006).

Penerapan Spektrofotometer ultraviolet dan cahaya tampak (UV-Vis) kebanyakan diterapkan pada senyawa organik yang didasarkan pada transisi  $n-\pi^*$  ataupun  $\pi-\pi^*$  dan karenanya memerlukan kehadiran gugus kromofor dalam molekul itu. Transisi ini terjadi dalam daerah spektrum (sekitar 200 hingga 700 nm) yang praktis digunakan dalam eksperimen (Day and Underwood, 1999).

Oliveira dkk. (2015) melakukan penelitian tentang aktivitas biologi dari ekstrak rumput laut *Padina biorgesenni* dan *Sargassum stenophyllum*, senyawa metabolit sekundernya diidentifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Senyawa yang berhasil diidentifikasi diantaranya Flavonoid, Karotenoid dan Steroid. Senyawa Steroid berada pada panjang gelombang 290 – 310 nm yang merupakan jenis fukosterol.

Penelitian yang dilakukan oleh Aprelia dan Suyatno, 2013 tentang senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan paku *Christella arida* ekstrak etil asetat, menghasilkan senyawa steroid yang ditunjukkan pada panjang gelombang 203 nm. Spektrum UV-Vis senyawa steroid yaitu sebagai berikut:

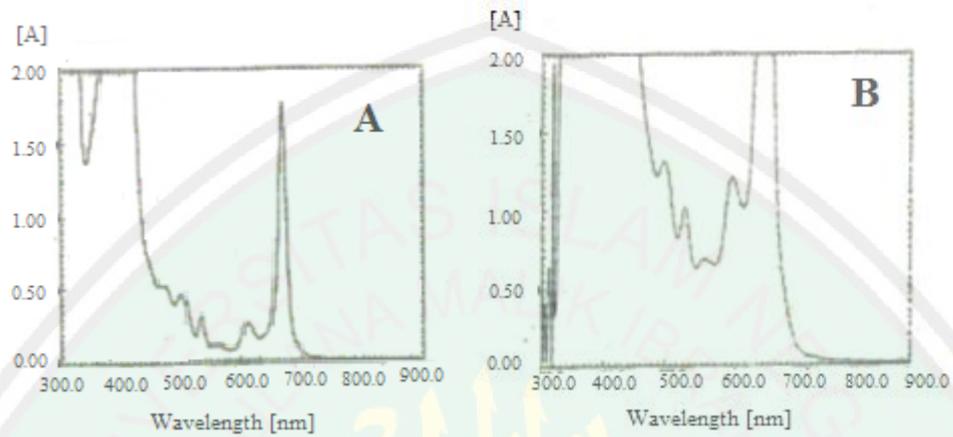


**Gambar 2.11** Spektrum UV-Vis isolat tumbuhan paku *Christella arida* (Aprelia dan Suyatno, 2013)

Dast dan Srinivast (1992) berhasil mengisolasi beberapa senyawa steroid dari alga merah *Gracilaria edulis*, identifikasi senyawa steroid menggunakan instrumentasi Spektrofotometer UV-Vis dan  $^1\text{H}$  NMR. Senyawa steroid yang berhasil diisolasi yaitu  $3\beta$ -hydroxyporiferast-5-en-7-one; poriferast-5-en- $3\beta,7\alpha$ -diol; poriferasta-3,5-dien-7-one. Pada Senyawa  $3\beta$ -hydroxyporiferast-5-en-7-one diperoleh panjang gelombang maksimum 238 nm dan pada poriferasta-3,5-dien-7-one diperoleh panjang gelombang maksimum 278 nm.

Johnson dkk. (2012) melakukan uji fitokimia pada alga *Laurencia obtusa*, diekstraksi pada pelarut petroleum eter, benzena, kloroform, aseton, etanol dan aqueous. Hasil uji fitokimia pada berbagai ekstrak yang hanya positif senyawa steroid yaitu pada ekstrak Petroleum eter dan ekstrak benzena.

Spektra UV-Vis pada ekstrak Petroleum eter dan ekstrak benzena ditunjukkan pada gambar 2.12:



**Gambar 2.12** Spektrum UV-Vis *Laurencia obtusa* ekstrak petroleum eter (A), ekstrak benzena (B)

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Pelaksanaan penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari – Juli 2016 di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, saringan 60-90 mesh, gunting, oven, erlenmeyer, cawan porselen, desikator, gelas arloji, spatula, neraca analitik, *shaker*, pipet tetes, lemari asap, bola hisap, pisau, kertas saring, corong *buchner vacuum*, inkubator, *rotary evaporator vacuum*, corong pisah, *hot plate*, *stirrer*, botol larutan, bejana pengembang, aluminium foil, corong pisah dan Spektrofotometer UV-Vis.

##### 3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini alga merah (*Euचेuma spinosum*) yang berasal dari pantai Jumiang Pamekasan Madura, metanol p.a 99,9%, *petroleum eter* p. a, akuades, gas nitrogen, reagen LB, HCl 2 N, n-heksana p.a 99%, etil asetat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98%, kloroform, asam asetat anhidrat, NaHCO<sub>3</sub> jenuh dan DPPH.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian experimental di laboratorium. Sampel yang diambil adalah Alga merah, kemudian sampel dikeringkan tanpa menggunakan pemanasan matahari. Sampel yang telah dikeringkan ditentukan kadar airnya, kemudian dimaserasi menggunakan pelarut metanol. Hasil dari maserasi dipisahkan menggunakan rotary evaporator kemudian dihidrolisis menggunakan HCl dan difraksinasi menggunakan petroleum eter. Hasil dari fraksinasi kemudian dipisahkan menggunakan KLT preparatif, hasil dari KLT preparatif yang berupa steroid dikerok dan diuji aktivitas antioksidannya dengan berbagai variasi konsentrasi untuk mengetahui tingkat potensi antioksidan, melalui nilai  $EC_{50}$  dan identifikasi senyawa steroid menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis. Penelitian ini bersifat statistik dimana rancangan percobaan dalam penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktor tunggal yaitu variasi konsentrasi isolat (C) yang terdiri dari 3 level:

$$C1 = 15 \text{ ppm}$$

$$C2 = 20 \text{ ppm}$$

$$C3 = 25 \text{ ppm}$$

Penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

### 3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan langkah sebagai berikut:

1. Preparasi sampel
2. Penentuan Kadar air
3. Ekstraksi sampel
4. Hidrolisis dan Ekstraksi cair-cair (partisi) Ekstrak pekat metanol

5. Uji Fitokimia Senyawa Steroid
6. Pemisahan steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)
7. Pemisahan senyawa Steroid dengan KLT Preparatif
8. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH
9. Senyawa hasil pemisahan dianalisis menggunakan Spektrofotometer UV-Vis
10. Analisis data

### 3.5 Cara kerja

#### 3.5.1 Preparasi alga merah (*Eucheuma spinosum*)

Alga merah *Eucheuma spinosum* sebanyak 30 Kg dicuci dengan air sampai bersih kemudian diiris kecil-kecil dan dikeringkan tanpa menggunakan pemanasan matahari. Setelah proses pengeringan alga merah dihaluskan sampai menjadi serbuk dengan ukuran 60-90 mesh. Selanjutnya dikeringkan menggunakan oven pada suhu 38 °C.

#### 3.5.2 Penentuan kadar air (AOAC, 1984)

Pada penentuan kadar air, disiapkan cawan porselen terlebih dahulu, lalu dipanaskan dalam oven pada suhu 100-105 °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. Setelah itu, sebanyak 2,5 gram sampel dimasukkan dalam cawan porselen, kemudian dimasukkan dalam oven dan dikeringkan pada suhu 100-105 °C selama  $\pm 15$ , kemudian sampel disimpan dalam desikator sekitar 10 menit dan ditimbang, sampel tersebut dipanaskan kembali dalam oven 15 menit, didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi sampai berat konstan. Kadar air dapat dihitung menggunakan persamaan:

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

Dimana: a=Bobot cawan kosong

b= bobot sampel + cawan sebelum dikeringkan

c= bobot cawan + sampel setelah dikeringkan

### 3.5.3 Ekstraksi alga merah (*Eucheuma spinosum*) (Anam, dkk., 2015)

Sampel yang sudah dihaluskan selanjutnya dilakukan ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol 99,9%. Ekstraksi dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali karena diasumsikan bahwa kandungan senyawa aktif dalam tanaman sudah banyak yang terekstrak. Sampel yang sudah berupa serbuk ditimbang sebanyak 150 gram dan direndam dalam pelarut metanol 900 mL di dalam erlenmeyer, diaduk menggunakan shaker dengan kecepatan 120 rpm (*rotations per minute*) selama 3 jam. Kemudian disaring dan ampas yang diperoleh direndam lagi dalam pelarut sampai 3 kali pengulangan atau diperoleh filtrat yang cukup bening. Ekstraksi secara maserasi dilakukan pada suhu kamar. Ketiga filtrat yang diperoleh digabung menjadi satu kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator vakum. Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian ditimbang dan dihitung rendemennya menggunakan persamaan:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Sampel}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (3.2)$$

### 3.5.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol dengan Pelarut

#### Petroleum Eter (Setiyawan, dkk., 2015)

Ekstrak pekat methanol sebanyak 5 gram dimasukkan kedalam *beaker glass*, kemudian dihidrolisis dengan menambahkan 10 ml asam klorida (HCl) 2N kedalam ekstrak pekat. Hidrolisis dilakukan selama 1 jam menggunakan *magnetic stirrer hot plate* pada suhu ruang (Tensiska, dkk., 2007). Hidrolisat yang

diperoleh ditambahkan dengan natrium bikarbonat sampai pH nya netral, lalu hidrolisat dipartisi menggunakan 25 mL petroleum eter. Fasa air dipartisi dengan petroleum eter sebanyak 3 kali pengulangan. Fasa organik yang diperoleh digabung menjadi satu dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*, ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemennya.

### 3.5.5 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Ekstrak alga merah (*Eucheuma spinosum*) dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform lalu ditambah 0,5 mL asam asetat anhidrat. Campuran ini kemudian ditambah dengan 1 – 2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% pada dinding tabung tersebut. Terbentuknya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya senyawa steroid (Indrayani, dkk., 2006).

### 3.5.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)

Pemisahan dengan KLTA menggunakan plat silika gel GF<sub>254</sub> dengan ukuran 1 x 10 cm<sup>2</sup>. Plat diaktifkan dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100 °C selama 30 menit. Ekstrak sampel ditotolkan pada jarak ± 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler kemudian dikeringkan. Plat dielusi dengan fase gerak n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan volume 4:1, 4,25:0,75 dan 4,5:0,5. Setelah gerakan fase gerak sampai pada garis batas, elusi dihentikan. Noda-noda pada permukaan plat diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm, kemudian diamati masing-masing hasil nodanya.

### 3.5.7 Pemisahan senyawa Steroid dengan KLT Preparatif (Bawa, 2009)

Pada pemisahan dengan KLTP digunakan plat silika gel GF<sub>254</sub> dengan ukuran 10 x 20 cm<sup>2</sup>. Ekstrak pekat hasil ekstraksi ditotolkan sepanjang plat pada

jarak 1 cm dari garis bawah dan 1 cm dari garis tepi dengan pipa kapiler, kemudian dikeringkan dan dielusi sejauh 18 cm dengan menggunakan eluen yang memberikan pemisahan terbaik pada KLTA yaitu n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17:3. Setelah gerakan larutan pengembang sampai pada garis batas, elusi dihentikan. Plat hasil elusi dikeringkan. Noda yang terbentuk diamati dengan lampu UV panjang gelombang maksimum 366 nm. Plat hasil KLTP dipotong bagian tepinya dengan ukuran 2x20 cm<sup>2</sup> dan disemprot dengan reagen Liberman Burchad (LB), spot yang menunjukkan senyawa steroid akan menghasilkan warna hijau.

Noda yang diduga merupakan senyawa golongan steroid dikerok kemudian dilarutkan dalam pelarut petroleum eter selanjutnya disentrifuge untuk mengendapkan silikanya. Masing-masing supernatan yang diperoleh diuapkan pelarutnya hingga habis menguap sehingga diperoleh isolat pekat dari masing-masing noda.

### **3.5.8 Uji aktivitas antioksidan menggunakan DPPH**

#### **3.5.8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum**

Larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1,5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 4,5 mL etanol lalu didiamkan  $\pm$  10 menit. Kemudian dimasukkan kedalam kuvet. Dicari  $\lambda_{maks}$  larutan dan dicatat hasil pengukuran  $\lambda_{maks}$  untuk digunakan pada tahap selanjutnya (Rahayu, *et al.*, 2010).

#### **3.5.8.2 Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan**

Dibuat Larutan ekstrak 200 ppm sebanyak 50 mL kemudian diambil sebanyak 4,5 mL. Ditambahkan 0,2 mM larutan DPPH sebanyak 1,5 mL, lalu diinkubasi, dan dicari waktu kestabilan pada rentang waktu 5-120 menit dengan

interval 5 menit. Sampel diukur pada  $\lambda_{\text{maks}}$  dan waktu kestabilan yang telah didapatkan.

### 3.5.8.3 Pengukuran Potensi Antioksidan Pada Sampel

- a) Absorbansi kontrol: Larutan DPPH dengan konsentrasi 0,2 mM sebanyak 1,5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan pelarut yang digunakan pada ekstrak sebanyak 4,5 mL, kemudian ditutup tabung reaksi dengan tissue, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama waktu kestabilan yang telah didapatkan pada tahap sebelumnya, setelah itu larutan dimasukkan ke dalam kuvet hingga penuh dan diukur absorbansinya dengan  $\lambda_{\text{maks}}$  yang telah didapatkan.
- b) Sampel dilarutkan dalam pelarut metanol dengan konsentrasi 15, 20 dan 25 ppm. Disiapkan tabung reaksi untuk masing-masing konsentrasi, kemudian tiap-tiap tabung reaksi diisi dengan 4,5 mL ekstrak dan ditambahkan DPPH sebanyak 1,5 mL (perbandingan larutan DPPH : ekstrak yang dilarutkan dengan konsentrasi tertentu 1:3). Perlakuan tersebut diulang sebanyak tiga kali. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37 °C pada waktu kestabilan yang didapatkan pada tahap sebelumnya, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet sampai penuh untuk mengukur absorbansinya pada  $\lambda_{\text{maks}}$  yang telah didapatkan. Data absorbansi yang diperoleh pada tiap konsentrasi masing-masing ekstrak dihitung nilai % aktivitas antioksidannya. Nilai tersebut diperoleh dengan persamaan :

$$\% \text{ aktivitas antioksidan} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \dots\dots\dots (3.3)$$

Keterangan:  $A_0$  = Absorbansi kontrol

$A_1$  = Absorbansi DPPH sisa yang tidak bereaksi dengan sampel

Setelah didapatkan % aktivitas antioksidan, selanjutnya masing-masing ekstrak dihitung nilai  $EC_{50}$  nya dengan memperoleh persamaan regresi non linear menggunakan program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing dose-response data*”.

- c) Perbandingan asam askorbat (Vitamin C) dan BHT: diperlakukan seperti sampel akan tetapi sampel diganti dengan larutan asam askorbat (vitamin C) dan BHT.

### 3.5.9 Senyawa hasil pemisahan dianalisis menggunakan Spektrofotometer

#### UV-Vis (Anam, dkk., 2015)

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

### 3.6 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan menghitung persen (%) aktivitas antioksidan yang diperoleh dari data absorbansi dari masing-masing konsentrasi. Setelah didapatkan data persen (%) aktivitas antioksidan pada masing-masing absorbansi sampel dan perbandingan, kemudian dilakukan perhitungan nilai  $EC_{50}$  dengan menggunakan persamaan regresi non linear yang menyatakan hubungan antara log konsentrasi dengan persen (%) aktivitas

antioksidan. Kemudian dibandingkan nilai  $EC_{50}$  yang diperoleh, yang memiliki nilai  $EC_{50}$  paling rendah menunjukkan kemampuan aktivitas antioksidan paling baik. Data yang diperoleh pada identifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis berupa spektrum dan panjang gelombang maksimum. Analisis data dilakukan dengan deskriptif dengan memperhatikan spektrum dan panjang gelombang maksimum yang diperoleh.





## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alga merah jenis *Eucheuma spinosum* yang diperoleh dari pantai Jumiang Pamekasan Madura. Pencucian sampel bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada alga. Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air yang terkandung dalam sampel dan juga untuk mempermudah proses penyimpanan. Proses pengeringan sampel dilakukan dengan cara dianginkan pada suhu ruang, hal ini bertujuan untuk menghindari kerusakan atau hilangnya senyawa aktif yang diinginkan.

Pembuatan serbuk sampel bertujuan untuk memperbesar luas permukaan pada sampel. Semakin kecil bentuk sampel maka luas permukaannya akan semakin besar sehingga kontak yang terjadi antara sampel dengan pelarut akan semakin besar. Hal ini sesuai dengan pernyataan Voight (1995) bahwa sampel dalam bentuk serbuk dengan tingkat kehalusan yang tinggi, kemungkinan terjadinya pemecahan sel-sel akan semakin besar sehingga memudahkan pelarut mengambil kandungan yang terdapat dalam sampel.

#### 4.2 Penentuan Kadar Air

Penentuan kadar air bertujuan untuk mengetahui kandungan air yang terdapat dalam sampel alga merah *Eucheuma spinosum*. Analisis kadar air penting dilakukan karena akan mempengaruhi konsentrasi pelarut yang digunakan pada saat maserasi. Jika kadar air pada sampel tinggi maka konsentrasi pelarut akan semakin rendah karena bercampur dengan kadar air yang terdapat pada sampel.

Jika kadar air dalam sampel rendah dapat mempermudah proses penarikan zat aktif dalam sampel karena pelarut mudah menembus dinding sel sampel tanpa adanya gangguan dari molekul air.

Kadar air juga sangat berpengaruh terhadap daya simpan sampel karena berkaitan dengan aktivitas mikrobiologi selama sampel tersebut disimpan. Kadar air dalam sampel harus seminimal mungkin agar dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Apabila kadar air dalam sampel tinggi maka sampel akan lembab sehingga akan mudah ditumbuhi jamur, terjadi kerusakan akibat degradasi oleh mikroorganisme dan penguraian oleh enzim.

Hasil analisis kadar air sampel kering alga merah *Euclima spinosum* yaitu sebesar 8,02 %. Kadar air pada alga kering menghasilkan nilai yang cukup baik. Cahyono dkk. (2011) menyatakan jika kadar air bahan lebih besar dari 10 % maka akan tumbuh mikroorganisme dan mempengaruhi reaksi enzimatik sehingga mempercepat pembusukan sampel. Menurut Puspita (2009) jika kadar air yang terkandung dalam sampel kurang dari 10 % maka kestabilan optimum bahan akan dapat tercapai dan pertumbuhan mikroba dapat dikurangi.

#### **4.3 Ekstraksi Alga Merah *Euclima spinosum***

Ekstraksi bertujuan untuk memisahkan suatu komponen yang diinginkan dalam suatu campuran. Ekstraksi alga merah *Euclima spinosum* menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol. Prinsip utama proses maserasi yaitu mengekstrak senyawa aktif (metabolit sekunder) yang terdapat dalam sampel berdasarkan sifat kelarutannya dalam suatu pelarut. Pada saat maserasi terjadi proses difusi, dimana larutan yang memiliki konsentrasi tinggi akan terdesak keluar. Pelarut metanol yang memiliki konsentrasi lebih tinggi akan masuk ke

dalam sel *Eucheuma spinosum* melewati dinding sel, sehingga isi sel akan larut dalam pelarut sehingga larutan di dalam sel lebih tinggi dari pada larutan di luar sel dan terjadi proses difusi (Medicafarma, 2006).

Proses ekstraksi maserasi dilakukan hingga menghasilkan filtrat yang lebih bening. Perubahan warna filtrat yang diperoleh dari hasil maserasi dengan pelarut metanol mulai dari warna hijau pekat menjadi hijau bening yang dapat diasumsikan bahwa senyawa aktif dalam sampel telah terekstrak dengan maksimal dalam pelarut metanol.

Filtrat hasil maserasi dipisahkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* untuk memperoleh kembali pelarut dan ekstrak pekatnya. Proses pemekatan digunakan pompa vacuum yang membuat tekanan dalam *vacuum rotary evaporator* lebih rendah, sehingga pelarut akan mendidih pada suhu yang lebih rendah dari titik didihnya dan akan diperoleh kembali pelarut dalam bentuk cair. Alat ini sering digunakan dalam proses penguapan pelarut dikarenakan memberikan keuntungan terhadap hasil ekstrak karena ekstrak yang dihasilkan tidak akan mengalami kerusakan akibat panas dari titik didihnya. Penguapan pelarut dihentikan ketika ekstrak dirasa cukup pekat.

Ekstrak metanol alga merah (*Eucheuma spinosum*) yang awalnya larutan berwarna hijau dan diperoleh ekstrak pekat berwarna hijau tua pekat karena pelarutnya telah mengalami penguapan. Rendemen yang dihasilkan dari ekstrak pekat metanol alga merah *Eucheuma spinosum* yaitu sebesar 3,193 %. Hasil rendemen yang diperoleh dalam penelitian ini lebih kecil dibandingkan dengan penelitian Afif (2013) yaitu sebesar 16,99 %. Perbedaan rendemen tersebut disebabkan karena adanya perbedaan kadar air kering dari sampel yaitu pada

penelitian Afif (2013) sebesar 4,74 % sedangkan pada penelitian ini sebesar 8,02 %. Kadar air dapat mempengaruhi proses ekstraksi, karena apabila kadar air dalam sampel tinggi maka konsentrasi pelarut yang digunakan pada proses ekstraksi akan kecil karena tercampur dengan air yang terkandung dalam sampel sehingga proses ekstraksi kurang maksimal.

#### **4.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Peekat Metanol dengan Pelarut Petroleum Eter**

Hidrolisis merupakan reaksi yang terjadi antara air dengan suatu senyawa hingga membentuk reaksi kesetimbangan. Reaksi hidrolisis menggunakan air berlangsung sangat lambat sehingga memerlukan suatu katalis asam seperti HCl. Hidrolisis dengan katalis HCl dilakukan untuk memutuskan ikatan glikosida antara senyawa metabolit sekunder (aglikon) dengan gula (glikon) karena kebanyakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat di alam masih berikatan dengan gula membentuk ikatan glikosida.

Proses hidrolisis pada penelitian ini menggunakan *magnetic stirrer* dengan bantuan katalis asam yaitu HCl 2 N. Pengadukan dengan *magnetic stirrer* bertujuan agar proses hidrolisis dapat terjadi secara menyeluruh dan lebih maksimal. Konsentrasi HCl dapat mempengaruhi hasil hidrolisis, hal ini merujuk pada penelitian Tasic *et.al* (2009) tentang produksi bioetanol dari umbi kentang yang dihidrolisis menggunakan HCl dengan dua variasi konsentrasi yaitu HCl 2 N dan HCl 1 N. Hasil menunjukkan bahwa laju reaksi pada HCl 2 N lebih cepat dibandingkan HCl 1 N dengan nilai berturut-turut yaitu  $0,052 \text{ min}^{-1}$  dan  $0,036 \text{ min}^{-1}$  dan nilai gula reduksi yang dihasilkan berturut-turut sebesar 109 g/L dan 100 g/L. Laju reaksi mempengaruhi hasil hidrolisis karena semakin besar

kecepatan laju reaksi maka semakin banyak pula gula yang terhidrolisis. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa HCl 2 N lebih baik digunakan sebagai katalisator pada proses hidrolisis dibandingkan HCl 1 N.

Reaksi hidrolisis merupakan reaksi reversible (bolak-balik), sehingga apabila tidak dihentikan maka akan terbentuk ikatan glikosida kembali. Pada penelitian ini dilakukan penambahan natrium bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) yang berfungsi untuk menetralkan dan untuk menghentikan reaksi hidrolisis. Pengecekan kenetralan larutan dapat dilakukan menggunakan pH universal sampai menunjukkan pH 7 dan dapat diamati pada perubahan fisik larutan yaitu sampai gelembung gas  $\text{CO}_2$  pada larutan menghilang. Reaksi penetralan yang terjadi saat penambahan natrium bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) jenuh ditunjukkan pada gambar 4.1.



**Gambar 4.1 Reaksi penetralan asam dengan  $\text{NaHCO}_3$**

Hidrolisat yang diperoleh kemudian dipartisi menggunakan pelarut petroleum eter. Metabolit sekunder golongan senyawa steroid bersifat non-polar sehingga dapat larut dalam pelarut organik seperti petroleum eter. Ekstraksi cair-cair (partisi) bertujuan untuk memisahkan metabolit sekunder yang telah terlepas ikatannya dari gugus gula akibat proses hidrolisis. Proses partisi perlu didiamkan sampai terjadi pemisahan yang sempurna dan terbentuk dua lapisan fase cair. Komponen kimia akan terpisah ke dalam dua fase tersebut sesuai dengan tingkat kepolarannya.

Hasil partisi menunjukkan terbentuknya dua lapisan yang tidak saling campur yaitu fase air yang bersifat polar dan fase organik yang bersifat semi polar atau non polar. Proses partisi dilakukan dengan tiga kali pengulangan sampai lapisan bawah berwarna bening. Fase air (polar) mengekstrak komponen gula (glikon) sedangkan fase organik (petroleum eter) mengekstrak metabolit sekunder (aglikon) yang telah terpisah dengan komponen gulanya. Fraksi petroleum eter berada di atas karena densitas petroleum eter lebih kecil dari pada air yaitu 0,77 g/mL sedangkan densitas air yaitu 1 g/mL.

Ekstrak hasil partisi kemudian dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator*. Warna ekstrak pekat hasil partisi berwarna hijau tua pekat. Nilai rendemen fraksi petroleum eter hasil hidolisis ekstrak metanol alga merah *Eucheuma spinosum* pada penelitian ini yaitu sebesar 14,072 %.

#### 4.5 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan golongan senyawa aktif yang terdapat dalam sampel alga merah *Eucheuma spinosum* dengan penambahan reagen. Reagen yang digunakan pada uji fitokimia senyawa steroid yaitu reagen Lieberman-Burchad. Uji Reagen Lieberman-Burchad merupakan uji reagen spesifik yang digunakan pada senyawa steroid dan triterpenoid.

Pereaksi Lieberman-Burchad merupakan campuran antara anhidrida asetat dan  $H_2SO_4$  pekat. Siadi (2012) menyatakan bahwa ketika ditetesi  $H_2SO_4$  pekat melalui dinding tabung reaksi, maka  $H_2SO_4$  akan bereaksi dengan anhidrida asetat sehingga akan mengalami proses asetilasi yaitu terbentuknya karbokation pada atom C anhidrida asetat. Karbokation yang terbentuk akan bereaksi dengan atom O pada gugus  $-OH$  yang ada pada senyawa steroid, reaksi yang terjadi

merupakan reaksi esterifikasi yaitu pembentukan senyawa ester pada senyawa steroid dengan anhidrida asetat. Terjadi pelepasan gugus hidrogen dan elektronnya yang mengakibatkan ikatan rangkap berpindah. Senyawa steroid mengalami resonansi dan bertindak sebagai karbokation. Serangan karbokation menyebabkan adisi elektrofilik diikuti pelepasan hidrogen, akibatnya senyawa mengalami perpanjangan konjugasi yang ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kebiruan.

Hasil uji fitokimia pada alga merah *Eucheuma spinosum* fraksi petroleum eter menunjukkan adanya golongan senyawa aktif steroid yang ditandai dengan warna hijau kebiruan (Lampiran 8 Gambar 7). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Ningsih dkk (2015) dan Kholidiyah dkk (2013) bahwa pada ekstrak alga merah *Eucheuma spinosum* fraksi n-heksana dan fraksi petroleum eter menunjukkan adanya senyawa steroid. Astuti, dkk (2014) menyatakan bahwa uji kualitatif senyawa steroid menggunakan pereaksi Lieberman-Burchard menghasilkan warna hijau kebiruan.

#### **4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)**

Pemisahan senyawa steroid dalam alga merah *Eucheuma spinosum* dilakukan dengan metode KLT. KLT merupakan metode pemisahan suatu senyawa berdasarkan perbedaan distribusi dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Kromatografi lapis tipis analitik (KLTA) ini digunakan untuk mencari eluen terbaik dalam pemisahan senyawa steroid. Eluen yang baik ditandai dengan banyaknya noda yang muncul, noda yang terbentuk tidak berekor dan jarak antara noda yang satu dengan yang lainnya jelas.

Noda yang dihasilkan diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. Pada sinar UV 366 nm, noda akan berfluoresensi dan lempeng akan berwarna gelap. Penampakan warna pada panjang gelombang tersebut disebabkan adanya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh auksokrom yang terdapat pada noda tersebut. Fluoresensi cahaya yang tampak merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi dan kemudian kembali sambil melepaskan energi (Sudjadi, 1988 dalam Zahro, 2011).

Pemisahan senyawa steroid menggunakan KLTA digunakan eluen n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 8:2, 9:1 dan 17:3 dengan jumlah volume 5 mL. Ketiga eluen n-heksana : etil asetat memiliki tingkat kepolaran yang berbeda yaitu  $8:2 > 17:3 > 9:1$ . Kepolaran eluen tersebut berpengaruh terhadap hasil noda yang terbentuk. Pemisahan yang dihasilkan dari ketiga eluen tersebut noda yang terbentuk tampak jelas, pada eluen n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 8:2 dan 9:1 hanya mampu memisahkan 5 senyawa. Sedangkan pada perbandingan 17:3 mampu memisahkan sebanyak 8 senyawa (Lampiran 8 Gambar 11, 12 dan 13).

Campuran eluen n-heksana : etil asetat (17:3) memiliki sifat kepolaran yang berbeda, dimana etil asetat bersifat semi polar sedangkan n-heksana bersifat non polar. Akan tetapi, karena perbandingan n-heksana lebih besar dibandingkan etil asetat, maka campuran eluen ini cenderung bersifat non polar. Senyawa dengan Rf yang rendah lebih terdistribusi pada fase diamnya sedangkan nilai Rf yang tinggi

lebih terdistribusi pada fase geraknya. Fase diam dalam penelitian ini yaitu silika yang bersifat polar dan fase geraknya berupa eluen yang bersifat non-polar.

Adanya senyawa steroid ditandai dengan perubahan warna biru hijau ketika disemprot pereaksi Lieberman-Burchad, sedangkan warna merah menunjukkan senyawa triterpenoid (Krisyuninda dalam Harborne, 1987). Setelah disemprot reagen Lieberman-Burchad, noda akan menunjukkan warna ungu (violet) yang menyatakan positif triterpenoid (Listiani, 2005). Hasil uji KLTA fraksi petroleum eter pada panjang gelombang 366 nm ditunjukkan pada Tabel 4.1:

**Tabel 4.1 Hasil uji KLTA fraksi petroleum eter dibawah sinar UV 366 nm**

No	Eluen	Banyaknya noda	Warna	Nilai Rf	Dugaan Senyawa
1	n-heksana : etil asetat (8:2)	5	Ungu	0,375	Triterpenoid
			Merah	0,625	Triterpenoid
			Merah	0,812	Triterpenoid
			Biru	0,925	Steroid
			Biru	0,975	Steroid
2	n-heksana : etil asetat (17:3)	8	Ungu	0,096	Triterpenoid
			Merah	0,165	Triterpenoid
			Merah	0,344	Triterpenoid
			Merah	0,551	Triterpenoid
			Merah	0,613	Triterpenoid
			Biru	0,668	Steroid
			Biru	0,813	Steroid
Hijau	0,910	Steroid			
3	n-heksana : etil asetat (9:1)	5	Merah	0,131	Triterpenoid
			Merah	0,263	Triterpenoid
			Biru	0,394	Steroid
			Biru	0,526	Steroid
			Hijau	0,684	Steroid

Berdasarkan Tabel 4.1 pada eluen n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 8:2 menghasilkan 2 spot senyawa steroid. Pada perbandingan 17:3 dan 9:1 menghasilkan 3 spot senyawa steroid, akan tetapi pada perbandingan 9:1

spot yang terpisah hanya sampai pada jarak 5,2 cm sedangkan pada perbandingan 17:3 dapat menempuh jarak yang lebih panjang yaitu mencapai 6,6 cm. Perbandingan 17:3 digunakan untuk proses KLTP karena pada proses KLTP digunakan ukuran plat KLT yang lebih panjang dan diharapkan akan menghasilkan proses pemisahan yang lebih baik.

#### 4.7 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Pemisahan senyawa steroid dengan KLT analitik kemudian dilanjutkan dengan KLT preparatif. Ukuran plat yang digunakan pada proses pemisahan menggunakan KLT preparatif yaitu 10 x 20 cm. Eluen yang digunakan pada KLT preparatif menggunakan eluen terbaik yang dihasilkan pada KLT analitik yaitu n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17 : 3. Hasil pemisahan menggunakan KLT preparatif terbentuk 8 noda yang ditunjukkan pada Tabel 4.2.

**Tabel 4.2 Hasil Pemisahan Senyawa steroid menggunakan KLT Preparatif**

Noda	Nilai Rf	Warna Noda	Senyawa
1	0,088	Ungu	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

Jumlah noda yang dihasilkan pada KLT preparatif sama dengan KLT analitik yaitu 8 noda, akan tetapi terdapat perbedaan nilai Rf. Setiyawan (2015) menyatakan bahwa adanya perbedaan nilai Rf dari hasil pemisahan KLT analitik

dan KLT preparatif dimungkinkan karena faktor lingkungan yang mempengaruhi kejenuhan eluen dan konsentrasi ekstrak yang digunakan pada masing-masing KLT.

Noda yang menunjukkan senyawa steroid terdapat 3 noda yaitu noda 5, 6 dan 7. Ningsih dkk (2015) melakukan penelitian tentang isolasi senyawa steroid pada alga merah *Eucheuma spinosum* menghasilkan tiga noda berwarna hijau yang menunjukkan senyawa steroid. Penelitian Nafisah dkk (2014) menyatakan bahwa adanya senyawa steroid menggunakan pereaksi Liebermann-Burchad ditunjukkan dengan warna biru dan hijau. Noda-noda yang positif tersebut kemudian dikerok dan dilakukan uji aktivitas antioksidan.

#### **4.8 Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)**

##### **4.8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum**

Pengujian antioksidan menggunakan metode DPPH diawali dengan penentuan panjang gelombang maksimum. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk mengetahui panjang gelombang yang memiliki serapan tertinggi. Pengukuran sampel harus dilakukan pada panjang gelombang maksimum agar kepekaannya lebih maksimal dan meminimalkan kesalahan (Rohman dan Gandjar, 2007).

Radikal DPPH memiliki warna komplementer ungu dan menghasilkan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 515 – 520 nm menggunakan pelarut etanol (Prakash, 2001). Kuntorini (2010) Wulansari (2011) dan Soebagio (2007) telah melaporkan bahwa larutan DPPH memiliki panjang gelombang maksimum sebesar 515 nm, 516 nm dan 519 nm. Hasil penentuan panjang

gelombang maksimum DPPH 0,2 mM diperoleh sebesar 515,0 nm . Hal tersebut sesuai dengan penelitian Wikanta dkk. (2007) melakukan pengujian antioksidan pada alga hijau *Ulva reticulata* pada panjang gelombang maksimum larutan DPPH 515 nm. Hasil spektra UV-Vis larutan DPPH ditunjukkan pada Gambar 4.2.



**Gambar 4.2 Hasil spektra UV-Vis larutan DPPH**

#### 4.8.2 Pengukuran Potensi Antioksidan Sampel

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan pada Fraksi petroluem eter alga merah *Eucheuma spinosum* dan isolat steroid hasil KLTP. Pengukuran aktivitas antioksidan ini menggunakan kontrol yaitu larutan DPPH 0,2 mM. Arindah (2010) menyatakan bahwa larutan DPPH kontrol digunakan untuk memberikan pembandingan pada saat pengukuran kapasitas antioksidan pada sampel. Larutan kontrol juga berfungsi untuk mengetahui absorbansi radikal DPPH sebelum direduksi oleh sampel. Selisih absorbansi kontrol dengan absorbansi sampel yang telah direduksi DPPH merupakan sisa radikal DPPH yang terbaca pada Spektrofotometer UV-Vis.

Fraksi petroleum eter alga merah *Eucheuma spinosum* mengalami perubahan warna setelah diinkubasi. Perubahan warna yang terjadi yaitu dari warna ungu tua

menjadi ungu muda, hal ini menandakan bahwa fraksi petroleum eter memiliki kemampuan antioksidan yang kecil. Perubahan warna pada isolat mengalami yaitu dari warna ungu menjadi ungu yang lebih muda. Menurut Prakash (2001) pengurangan intensitas warna berhubungan dengan jumlah elektron DPPH yang menangkap elektron hidrogen dari senyawa antioksidan. Pengurangan intensitas warna mengindikasikan peningkatan kemampuan antioksidan untuk menangkap radikal bebas.

Salah satu parameter yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan yaitu persen (%) aktivitas antioksidan. Persen aktivitas antioksidan menunjukkan kemampuan suatu senyawa antioksidan dalam menghambat radikal bebas dalam bentuk persen. Persen (%) aktivitas antioksidan menunjukkan banyaknya atom hidrogen dari senyawa antioksidan yang menangkap radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (Rahayu dkk., 2010).

Parameter untuk mengetahui kemampuan antioksidan dalam sampel selain persen (%) aktivitas antioksidan yaitu nilai  $EC_{50}$  yaitu dengan mengolah nilai persen aktivitas antioksidan. Semakin kecil nilai  $EC_{50}$  berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan suatu sampel. Secara spesifik, suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat jika nilai  $EC_{50}$  bernilai kurang dari 50 ppm, kuat jika bernilai 50 – 100 ppm, sedang jika bernilai 100 – 150 ppm, dan lemah jika bernilai 150 – 200 ppm (Mardawati, dkk., 2008). Data nilai  $E_{50}$  ditunjukkan pada Tabel 4.3.

**Tabel 4.3 Nilai EC<sub>50</sub> aktivitas antioksidan dan pembanding**

No	Sampel	EC <sub>50</sub> (ppm)
1	Fraksi petroleum eter	248,1
2	Isolat 5	123,5
3	Isolat 6	94,98
4	Isolat 7	104,6
5	Asam askorbat (Vitamin C)	0,2098
6	BHT	12,26

Pengujian antioksidan ini dibandingkan dengan antioksidan asam askorbat dan BHT. Penggunaan pembanding ini bertujuan untuk mengetahui seberapa kuat potensi antioksidan dalam sampel jika dibandingkan dengan antioksidan sintetik yang sudah sering dipakai yaitu asam askorbat dan BHT. Pembanding asam askorbat dan BHT memiliki potensi antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan isolat steroid dan fraksi petroleum eter yaitu dengan nilai EC<sub>50</sub> masing-masing sebesar 0,2098 ppm dan 12,26 ppm.

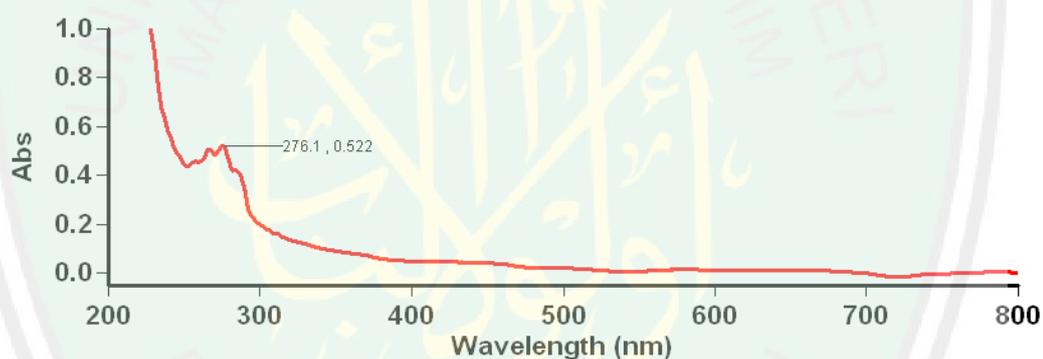
Berdasarkan Tabel 4.3 menunjukkan bahwa fraksi petroleum eter memiliki aktivitas antioksidan yang lebih lemah yaitu dengan nilai EC<sub>50</sub> 248,1 ppm. Sedangkan pada isolat steroid hasil pemisahan menggunakan KLTP, memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik yang ditunjukkan dengan nilai EC<sub>50</sub> yang lebih rendah yaitu 123,5 ppm, 94,98 ppm dan 104,6 ppm. Fraksi petroleum eter masih merupakan campuran dari berbagai senyawa, sehingga diduga adanya efek antagonis dari salah satu senyawa dalam fraksi tersebut. Efek antagonis dapat menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan dalam fraksi petroleum eter yang ditunjukkan dengan nilai EC<sub>50</sub> yang lebih besar dibandingkan isolat steroid.

Semakin kecil nilai EC<sub>50</sub> maka aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh suatu bahan semakin kuat. Berdasarkan hasil penelitian isolat 6 memiliki aktivitas antioksidan yang paling kuat dengan nilai EC<sub>50</sub> 94,98 ppm. Pada isolat 5 dan

isolat 7 memiliki aktivitas antioksidan sedang yang ditunjukkan dengan nilai  $EC_{50}$  diantara 100 – 150 ppm.

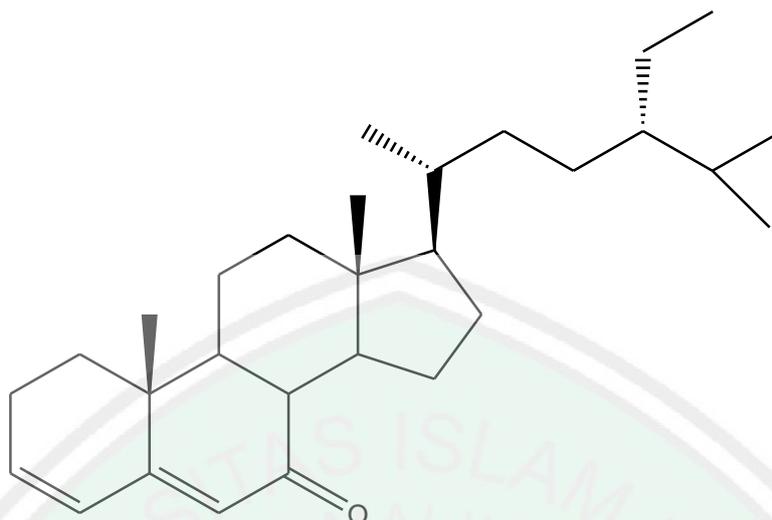
#### 4.9 Identifikasi Spektrofotometer UV-Vis Isolat 5

Isolat yang menunjukkan senyawa steroid dilakukan identifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Prinsip dari Spektrofotometer UV-Vis yaitu interaksi antara radiasi elektromagnetik dengan molekul yang menyebabkan terjadinya transisi elektronik. Hasil spektrum UV-Vis isolat 5 ditunjukkan dalam Gambar berikut:



**Gambar 4.3 Hasil spektrum UV-Vis isolat kelima steroid**

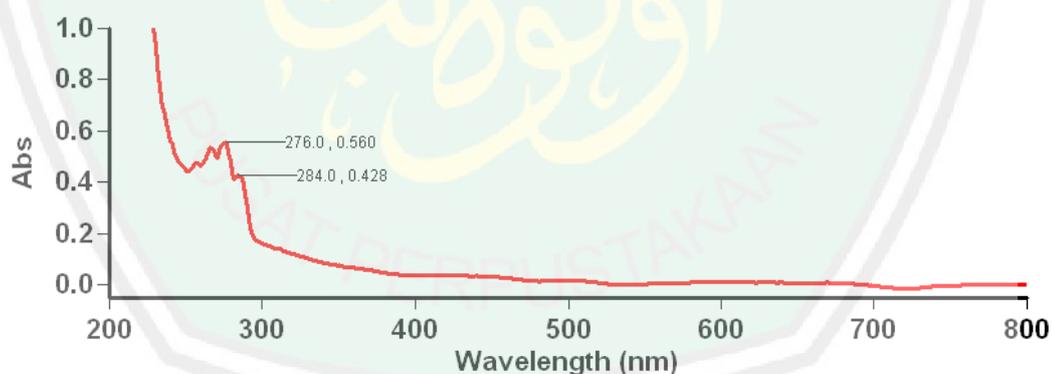
Berdasarkan Gambar 4.3 menunjukkan adanya serapan maksimum pada panjang gelombang 276,1 nm diduga diakibatkan oleh adanya transisi elektron dari  $\pi \rightarrow \pi^*$ , yang disebabkan adanya golongan senyawa yang memiliki cincin aromatis seperti ikatan C=C terkonjugasi. Hal ini sesuai dengan penelitian Dast dan Srinivast (1992) identifikasi senyawa steroid dari alga merah *Gracilaria edulis* menghasilkan panjang gelombang maksimum 278 nm yang menunjukkan senyawa poriferasta-3,5-dien-7-one, ditunjukkan pada Gambar 4.4:



Gambar 4.4 Poriferasta-3,5-dien-7-one (Dast dan Srinivast, 1992)

#### 4.10 Identifikasi Spektrofotometer Uv-vis Isolat 6

Hasil pengukuran menggunakan Spektrofotometer Uv-vis isolat 6 menunjukkan 2 puncak serapan maksimum seperti disajikan pada Gambar 4.4.



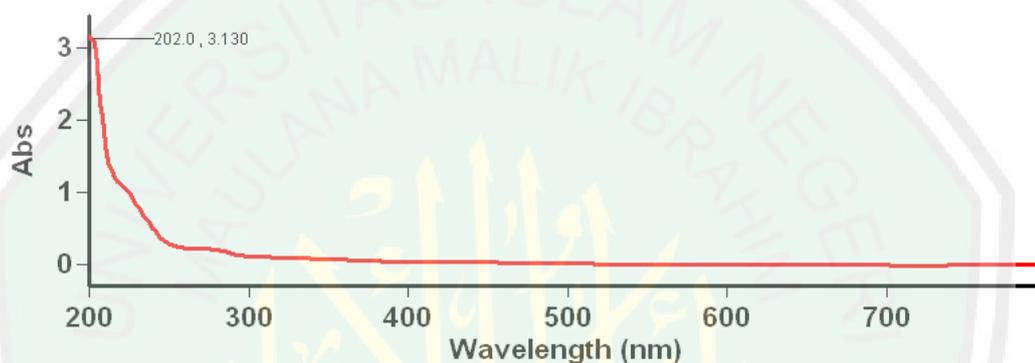
Gambar 4.5 Hasil spektrum UV-Vis isolat keenam steroid

Spektrum UV-Vis isolat keenam (Gambar 4.4) menunjukkan dua puncak serapan yaitu pada panjang gelombang 276,0 nm dan 284,0 nm berarti senyawa steroid hasil isolasi ini memiliki ikatan rangkap terkonjugasi. Hal ini sesuai dengan penelitian Susilawati dkk. (2010) melakukan isolasi dan identifikasi

senyawa steroid dari daun rimbang memberikan serapan pada panjang gelombang 271 nm dan 281 nm memiliki ikatan rangkap yang terkonjugasi.

#### 4.11 Identifikasi Spektrofotometer Uv-vis Isolat 7

Identifikasi dengan Spektrofotometer Uv-vis Isolat 7 menghasilkan serapan pada panjang gelombang 202,0 nm yang disajikan pada Gambar 4.6.



**Gambar 4.6 Hasil spektrum UV-Vis isolat ketujuh steroid**

Berdasarkan Gambar 4.6 menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 202,0 nm. Pola spektra yang dihasilkan mempunyai kemiripan dengan penelitian Aprelia dan Suyatno (2013) (Gambar 2.11), yang melakukan identifikasi senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan paku *Christella arida* menunjukkan adanya senyawa steroid  $\beta$ -Sitosterol pada panjang gelombang maksimum 203 nm. Hal ini menandakan bahwa terdapat ikatan C=C tidak terkonjugasi.

#### 4.12 Potensi Alga Merah *Eucheuma spinosum* dalam Perspektif Islam

Penelitian tentang potensi Alga merah *Eucheuma spinosum* sebagai tanaman obat yang telah dilakukan merupakan salah satu bentuk ibadah kepada Allah SWT yang berupa kepatuhan manusia dalam menjalankan perintahNya. Salah satu

perintah Allah SWT kepada manusia yaitu menuntut ilmu dan mengamati fenomena alam yang terjadi. Fenomena alam merupakan gambaran akan kebesaran dan kekuasaan Allah SWT atas segala yang telah Dia ciptakan sehingga manusia dapat menemukan kekuasaan dan kebesaran Allah dalam setiap ciptaanNya. Allah SWT berfirman:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَأَخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾  
 الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ  
 وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطِيلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

“*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal, (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha suci Engkau, Maka peliharalah Kami dari siksa neraka"* (QS. Ali Imran: 190 – 191).

Surat Ali Imran ayat 190 – 191 di atas memerintahkan manusia untuk melihat, merenung, dan mengambil kesimpulan pada tanda-tanda ke-Tuhanan. Pada ayat ini Allah SWT menyebutkan *لآيت لأول الألباب* “*Terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal.*” Inilah salah satu fungsi akal yang diberikan kepada seluruh manusia, yaitu agar mereka dapat menggunakan akal tersebut merenungi tanda-tanda kekuasaan Allah SWT (Qurthubi, 2009). Ayat tersebut juga menjelaskan bahwa segala sesuatu yang diciptakan Allah tidak ada yang sia-sia, yang artinya Allah menciptakan segala sesuatu dengan manfaat yang terkandung di dalamnya. Salah satu tumbuhan ciptaan Allah SWT yang memiliki manfaat adalah alga merah *Eucheuma spinosum*.

Allah SWT menyebutkan dalam ayat lain bahwa Dia menciptakan laut dan menundukkannya serta menumbuhkan berbagai jenis tumbuhan untuk kepentingan manusia. Firman Allah SWT yang juga menjelaskan berbagai potensi kekayaan laut terdapat dalam surat an-Nahl (16):14:

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

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

Makna dari lafadz سَخَّرَ الْبَحْرَ menerangkan bahwa Allah SWT telah menundukkan laut sebagai sumber daya alam yang tidak ternilai harganya. Allah SWT menundukkan laut untuk dimanfaatkan oleh manusia (Asy-Syanqithi, 2007). Firman Allah SWT, لَتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ *“Dan supaya kamu mencari (keuntungan) dari karunia-Nya”*, maksudnya bahwa manusia dianjurkan memanfaatkan laut agar mendapatkan keuntungan dari kekayaan laut (Qurthubi, 2009). Manusia dapat dapat memperoleh rezeki dengan cara memanfaatkan sumber daya laut untuk keperluan mereka dan dikembangkan untuk kemaslahatan manusia.

Salah satu manfaat tumbuhan laut yang selama ini banyak dikenal dan dikembangkan adalah manfaatnya sebagai obat. Tumbuhan laut dapat digunakan untuk mengobati penyakit-penyakit yang diderita oleh manusia sebagai pengganti obat sintetik. Obat kimia telah banyak diketahui mengandung efek samping yang dapat membahayakan kehidupan manusia sehingga kajian tentang potensi

tanaman sebagai obat banyak dikembangkan di negara-negara di seluruh dunia termasuk Indonesia. Menjaga kesehatan merupakan salah satu anjuran Islam sebagaimana sabda Rasulullah SAW:

قَالَ رَسُولُ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ لِرَجُلٍ وَهُوَ يَعِظُهُ : "إِغْتَنِمْ خَمْسًا قَبْلَ  
خَمْسٍ : شَبَابَكَ قَبْلَ هَرَمِكَ, وَصِحَّتَكَ قَبْلَ سَقَمِكَ, وَغِنَاكَ قَبْلَ فَقْرِكَ,  
وَفِرَاغَكَ قَبْلَ شُغْلِكَ, وَحَيَاتَكَ قَبْلَ مَوْتِكَ" (رَوَاهُ الْحَاكِمُ فِي الْمُسْتَدْرِكِ وَ هَذَا  
حَدِيثٌ صَحِيحٌ عَلَى شَرْطِ الشَّيْخَانِ وَمَمْ يُخْرِجَاهُ)

“Rasulullah SAW bersabda, seraya menasehati seseorang: Jagalah olehmu lima perkara sebelum datang lima perkara yang lainnya, jaga masa mudamu sebelum masa tuamu, jaga sehatmu sebelum sakitmu, jaga kayamu sebelum miskinmu, jaga waktu luangmu sebelum sibukmu, dan jaga hidupmu sebelum matimu” (HR. Al-Hakim, hadits ini shahih menurut Bukhari-Muslim, no. 1077).

Salah satu sumber daya laut yang dimiliki Indonesia yang diketahui memiliki potensi sebagai tanaman obat dan belum banyak dimanfaatkan adalah alga (rumput laut). Omar dkk. (2007) menjelaskan bahwa alga merah jenis *Euclima spinosum* dapat digunakan sebagai antibakteri patogen. Senyawa steroid yang terdapat dalam alga merah *Rhodomenia palmate* memiliki aktivitas sitotoksik yang dapat menghambat sel tumor (Wikanta dkk., 2005). Alga merah jenis *Euclima spinosum* dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan (Hijaz dkk., 2009).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa steroid dalam alga merah *Euclima spinosum* memiliki potensi antioksidan yang tinggi dengan nilai EC<sub>50</sub> 94,98 ppm sehingga memungkinkan untuk diaplikasikan sebagai obat. Kapasitas antioksidan tersebut tergolong kuat karena memiliki nilai EC<sub>50</sub> diantara 50 – 100 ppm. Petunjuk untuk menggunakan obat yang sesuai telah dianjurkan oleh Rasulullah SAW, sebagaimana sabdanya:

قَالَ رَسُولُ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ  
بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ (رَوَاهُ مُسْلِمٌ)

“Rasulullah SAW bersabda: Setiap penyakit ada obatnya. Apabila ditemukan obat yang tepat untuk suatu penyakit, maka sembuhlah si penderita atas izin Allah Azza Wa Jalla” (HR. Muslim no. 1473).

Hadits di atas menjelaskan bahwa setiap penyakit pasti ada obatnya. Apabila telah ditemukan obat yang sesuai untuk suatu penyakit, maka orang yang menderita penyakit tersebut akan sembuh atas izin Allah SWT. Tugas manusia adalah mencari obat yang sesuai untuk penyakit tersebut. Penelitian mengenai uji aktivitas antioksidan senyawa steroid pada alga merah *Euclima spinosum* ini merupakan salah satu bentuk usaha mengamalkan perintah Rasulullah SAW yaitu mencari obat yang sesuai untuk suatu penyakit.

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh, maka dapat diketahui bahwa tumbuhan laut alga merah *Euclima spinosum* ternyata menyimpan manfaat sebagai tanaman obat. Hal ini menunjukkan akan kebenaran ayat-ayat al-Quran yang menjelaskan bahwa apa yang diciptakan oleh Allah SWT di alam ini tidak ada yang sia-sia. Segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah SWT baik di laut maupun di darat, pasti mengandung manfaat dan jika dikembangkan akan memberikan kemaslahatan bagi kehidupan manusia.

## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil uji aktivitas antioksidan dan identifikasi senyawa steroid fraksi petroleum eter alga merah *Eucheuma spinosum* dapat disimpulkan bahwa:

1. Aktivitas antioksidan fraksi petroleum eter alga merah *Eucheuma spinosum* menghasilkan nilai EC<sub>50</sub> sebesar 248,1 ppm sedangkan isolat kelima, keenam dan ketujuh secara berturut-turut menghasilkan nilai EC<sub>50</sub> sebesar 123,5 ppm, 94,98 ppm dan 104,6 ppm.
2. Hasil identifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis senyawa steroid petroleum eter alga merah *Eucheuma spinosum* pada isolat kelima menghasilkan satu puncak serapan yaitu dengan panjang gelombang maksimum sebesar 276,1 nm. Isolat keenam menghasilkan dua puncak serapan yaitu pada panjang gelombang maksimum 276,0 nm dan 284,0 nm sedangkan isolat ketujuh menghasilkan satu puncak serapan yaitu pada panjang gelombang maksimum 202,0 nm.

#### 5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai metode pemisahan senyawa steroid pada alga merah *Eucheuma spinosum* agar dihasilkan isolat yang lebih banyak sehingga dapat dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan berbagai variasi konsentrasi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afif, S. 2013. Ekstraksi, Uji Toksisitas dengan Metode BSLT dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Alga Merah *Euचेuma spinosum* dari Perairan Sumenep Madura. *Skripsi*. UIN Malang
- Afriyanti, L. 2013. *Ekstraksi Pelarut Distribusi Asam Etanoat Diantara Dietil Eter dan Air*. Malang : Universitas Negeri Malang
- Anam, K., Fasya, A.G., Abtokhi, A., Amalia, S. 2015. Isolasi Senyawa Triterpenoid dari Alga Merah (*Euचेuma cottonii*) Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Analisisnya Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Anggadiredja, J., Irawati, S., dan Kusmiyati. 2006. *Rumput Laut : Pembudidayaan, Pengolahan, dan Pemasaran Komoditas perikanan Potensial*, Jakarta : Penebar Swadaya
- AOAC. 1984. Official Methods of Analisis the Association of Official Analytical Chemist, Inc. Washington DC. Association of Official Analytical Chemists
- Aprelia, F., dan Suyatno. 2013. Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etil Asetat Tumbuhan Paku *Christella arida* dan Uji Pendahuluan Sebagai Antikanker. *UNESA Journal of Chemistry* Vol.2
- Arifin A, Prof. Dr. Sjamsul. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam*. Jakarta : Karunika Universitas Terbuka
- Arindah, D. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Golongan Senyawa Antioksidan pada Daging Buah Pepino (*Solonum muricatum Aiton*) yang Berpotensi Sebagai Antioksidan. *Skripsi*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim
- Asih, I.A.R.A. 2009. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Isoflavon Dari Kacang Kedelai (*Glycine max*). *Jurnal Kimia*. Vol.3, No.1:33-40
- Aslan, L. M. 2005. *Budidaya Rumput Laut*. Yogyakarta : Kanisius
- Atmadja, 2007, *Apa Rumput Laut Sebenarnya?*, Semarang : Divisi Penelitian dan Pengembangan Rumput Laut UNDIP, [www. rumputlaut.org](http://www.rumputlaut.org). Diakses pada 10 Mei 2015
- Bawa, I.G.A.G. 2009. Isolasi dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif dari Daging Buah Pare (*Momordica charantia L*). *Jurnal Kimia*. Vol.3, No.2:117-124

- Best, B. 2006. General AntiOxidant Actions. [www.benbest.com/nutrceut/AntiOxidants.html](http://www.benbest.com/nutrceut/AntiOxidants.html). Tanggal akses 12 Mei 2015
- Cahyadi, W. 2006. *Analisis dan Aspek Kesehatan Bahan Tambahan Makanan*, Jakarta : Penerbit Bumi Aksara
- Cahyono, B., Huda, M.D.K., Limantara, L. 2011. Pengaruh Proses Pengeringan Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* ROXB) Terhadap Kandungan dan Komposisi Kurkuminoid. *Reaktor*, Vol. 13 No. 3, Hal. 165 – 171
- Dast, B., and Srinivas, K.V.N.S. 1992. Minor C29-Steroids from The Marine Red Algae, *Gracilaria Edulis*. *Phytochemistry*, Vol.31, No.7
- Day, R.A. A.L. Underwood. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Jakarta : Erlangga
- Diantriani, N.P., Sudiarta, I W., Etlantiani, N.K. 2008. Proses Biosorpsi dan Desorpsi Ion Cr(VI) pada Biosorben Rumput laut *Eucheuma spinosum*. *Jurnal Kimia* 2 (1): 45-52
- Febriany, S. 2004. *Pengaruh Beberapa Ekstrak Tunggal Bangle dan Gabungannya yang Berpotensi Meningkatkan Aktivitas Enzim Lipase Secara In Vitro*. Skripsi tidak diterbitkan. Bogor: Fakultas MIPA IPB
- Gordon, M.H. 1990. *The Mechanism of Antioxidants Action in Vitro*. Di dalam: B.J.F. Hudson, editor. *Food Antioxidants*. Londong: Elsvier Applied Science
- Gunawan, I.W.G., Gede B., dan Sutrisnayati. 2008. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpenoid yang Aktif Antibakteril Pada Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn). *Jurnal Kimia*: 31 – 39 ISSN 1907 – 9850
- Hafid, A. F. 2003. *Aktivitas Antiradikal Bebas DPPH Fraksi Metanol Fagraea auricula dan Fagraea ceilanica*, Majalah Farmasi Airlangga, III (1); 3439
- Halimah, N. 2010. Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* Linn) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Hamilton, R.J. and Allen, J.C. 1994. *Randicity in Foods*. Lomdon: Blackie Academic and Professional.
- Harbone, J.B. 1987. *Metoda Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Terbitan ke-2. Terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung: ITB

- Hendayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung: PT. Remaja Rosdakarya
- Hernani dan R. Nurdjanah. 2009. *Aspek Pengeringan dalam Mempertahankan Kandungan Metabolit Sekunder pada Tanaman Obat*. Perkembangan Teknologi TRO 21 (2) : 33-39
- Hidajat, B. 2005. Penggunaan Antioksidan Pada Anak. *Artikel Kimia*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
- Hidayat, A. 2006. *Budidaya Rumput Laut*. Surabaya: Penerbit Usaha Nasional
- Hijaz, M.N., Jannah, A., Barizi, A. 2009. Uji Aktivitas Antioksidan Karaginan Dalam Alga Merah Jenis *Euचेuma spinosum* dan *Gracillaria verrucosa*. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hutomo, M and MK Moosa. 2005. Indonesian Coastal and Marine Biodiversity: *Present Journal of Marine Sciences* 14(1):88-97
- Indrayani, L., Soetjipto, H. dan Sihasale, L. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Berk. Penel. Hayati*:12 (57-61)
- Johnson, M., Janakiraman N. Babu A. 2012. Phytochemical Studies on *Laurencia Obtusa* (Hudson) Lamourux. *International Journal of Biomedical and Advance Research*. India: Department of Plant Biology and plant Biotechnology, St. Xavier's College (Autonomous), Tamil Nadu India
- Kasim, S. 2013. Pengaruh Konsentrasi Natrium Hidroksida Terhadap Rendaman Karaginan yang Diperoleh Dari Rumput Laut Jenis *Euचेuma spinosum* Asal Kota Bau-Bau. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. Vol. 17 No. 1. Hlm. 1-8
- Kholidiyah, M., Fasya, A.G., Nashichuddin, A., Rachmawati, A. 2013. Uji Toksisitas Ekstrak Rumput Laut Jenis *Euचेuma spinosum* Perairan Madura Terhadap Larva Udang (*Artemia Salina*) Menggunakan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lathality Test*). *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Kristanti, A.N, Nanik, S. A., Mulyadi, T., Bambang, K. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press
- Kuntorini, E.V., Maria, D.W. 2010. Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bulbus Bawang Dayak (*Eleutherine americana* Merr). *Jurnal Sains dan Terapan Kimia*. Kalimantan: Universitas Lambung Mangkurat. 4(1): 15 – 22

- Lailah, N. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan dan Fitokimia Fraksi Etil Asetat, Kloroform, dan n-Heksana Ekstrak Metanol Alga Coklat *Sargassum cristaefolium*. Skripsi tidak diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Lailiyah, A., Adi, T. K., Hakim, A., Yusnawan, E. 2014. Kapasitas Antioksidan dari Kandungan Total Senyawa Fenolik Ekstrak Kasar Alga Coklat *Sargassum cristaefolium* dari Pantai Sumenep Madura. *Alchemy*. Vol. 3, No.1, hal 18-30
- Lenny, S. 2006. *Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida dan Alkaloida*. Karya Ilmiah Tidak Diterbitkan. Medan : MIPA Universitas Sumatera Utara
- Listiani, L., I. Fidrianny, dan Sukrasno. 2005. Telaah Kandungan Kimia Daun Kucai (*Allium schoenoprasum* L., Liliaceae). Skripsi Farmasi ITB. Bandung: Penerbit ITB
- Madhavi, D.L, S. S. Dhespande and D. K Salunke. 1996. *Food Antioxidant Technological, Toxicological and Health Perspectives*, Marcel Dekker Inc. New York
- Mardawati, E. 2008. *Kajian Aktivitas Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* L) Dalam Rangka Pemanfaatn Limbah Kulit Manggis di Kecamatan Puspahiang Kabupaten Tasikmalaya*. Laporan Akhir Penelitian. Bandung: Jurusan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Industri Pertanian Universitas Padjajaran
- Mardiyah, U., Fasya, A.G., Fauziah, B., Amalia, S. 2012. Ekstraksi, Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Euclima spinosum* dari Perairan Banyuwangi. Skripsi tidak diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Mark, H.F. 2013. *Encyclopedia Of Polymer Science and Technology, Concise*. John Wiley and Sons. ISBN 0470073691, 9780470073698
- Medicafarma. 2006. *Ekstraksi*. <http://medicafarma.blogspot.com>. Diakses tanggal 17 Juni 2016
- Molyneux, P. 2003. *The Use Of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH), For Estimating Antioxidant Activity*. Songklanakarin J. Sci. Technol., 2004, 26(2) : 211-219. [www.sjst.psu.ac.th/journal/26-2.pdf/07DPPH.pdf](http://www.sjst.psu.ac.th/journal/26-2.pdf/07DPPH.pdf), Diakses tanggal 10 Mei 2015
- Mulyono. 2006. *Kamus Kimia*. Jakarta: Bumi Aksara

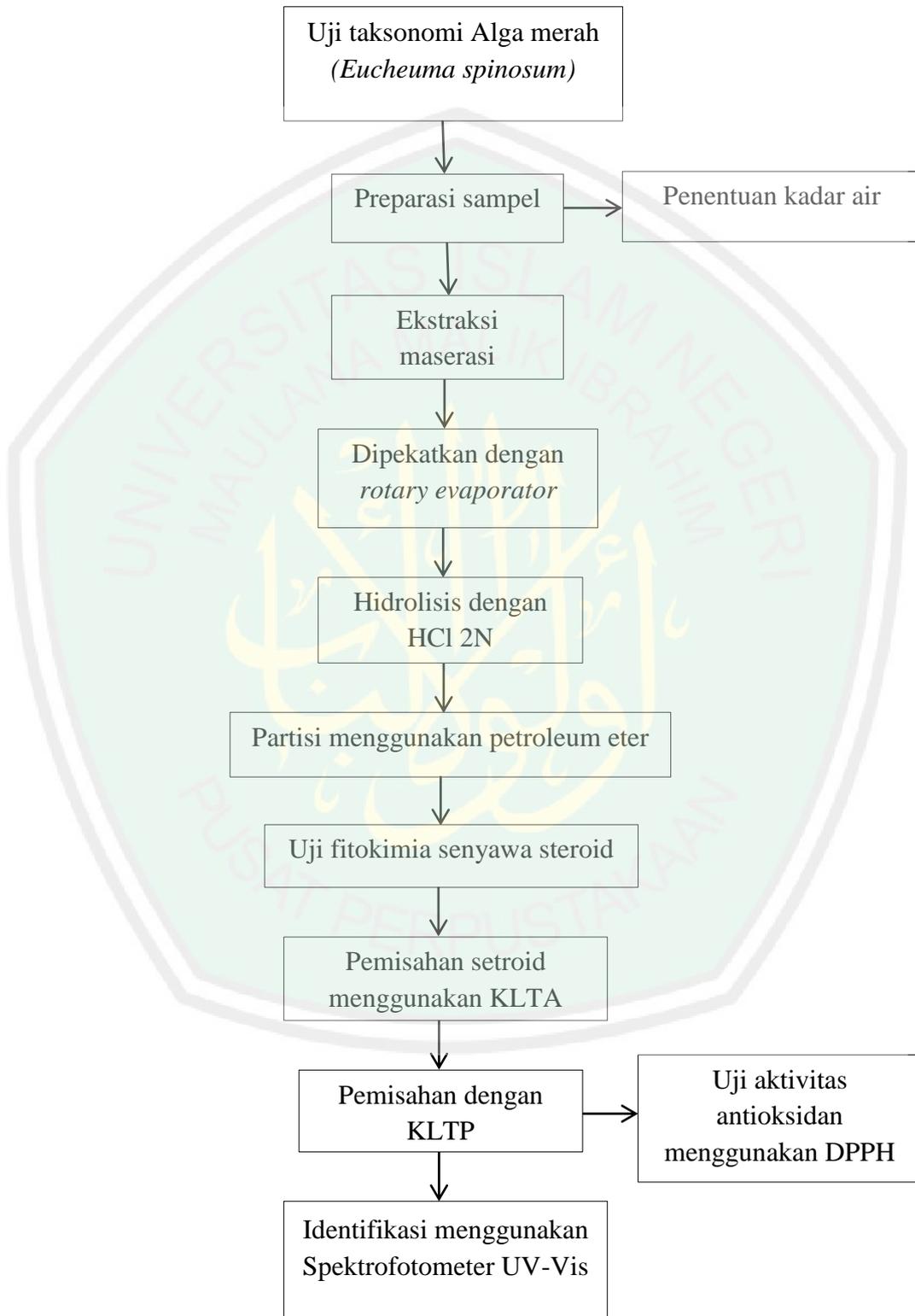
- Nafisah, M., Tukiran, Suyatno, Hidayati, N. 2014. Phytochemical Screening Test on Hexane, Chloroform and Methanol Extracts Of Patikan Kebo (*Euphorbiae hirtae*). Prosiding Seminar Nasional Kimia, ISBN : 978-602-0951-00-3
- Ningsih, E.M.A., Fasya, A. G., Adi, T. K., Hanapi, A. 2015. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid pada Fraksi n-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*). *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Oktavia, D.R. 2009. Uji Aktivita Penangkap Radikal Ekstrak Petroleum Eter, Etil Asetat, dan Etanol Daun Binahong (*Anredera Corfolia (Tenore) Steen*) dengan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrasil). *Skripsi*. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Oliveira, N.M., Meira, C.I.C., Aguiar, R.M., De Oliveira, D.M., Moura, C.W.N, Filho, S.A.V. 2015. Biological Activities of Extracts from *Padina biorgesenni* and *Sargassum stenophyllum*, Seaweeds Naturally Found In Baia De Todos Os Santos, Brazil. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 7
- Omar, S.B.A. Muslimin, L., Fattah, A. 2007. *Efektifitas Alga Merah Eucheuma spinosum Sebagai Anti Bakteri Patogen Pada Organisme Budidaya Pesisir Dan Manusia*. Makassar: Universitas Hasanuddin
- Prakash, A. Rigelhof, F., Miller, E. 2001. *Medallion laboratories: analytical progress, Antioxidant Activity*, [www.terranostrachocolate.com/files/Comparative\\_and\\_General\\_Antioxidant\\_Information.pdf](http://www.terranostrachocolate.com/files/Comparative_and_General_Antioxidant_Information.pdf), Tanggal akses 10 Mei 2015
- Puspita, M.D.A. 2009. Pengoptimuman Fase Gerak KLT Menggunakan Desain Campuran Untuk Pemisahan Komponen Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri*). *Skripsi*. Bogor: Fakultas MIPA IPB
- Qurthubi, Syaikh Imam. 2009. *Tafsir Al-Qurthubi* (1). Jakarta : Pustaka Azzam
- Rahayu, D.S., Dewi, K., dan Enny, F. 2010. Penentuan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun Ketapang (*Terminalia catappa L*) dengan Metode 1,1 difenil 2 pikrilhidrazil (DPPH). *Skripsi* Diterbitkan. Semarang: Jurusan Kimi FMIPA Universitas Diponegoro
- Resy, R. 2009. *Efek Rumput Laut Eucheuma sp. Terhadap Kadar Glukosa Darah dan Jumlah Monosit pada Tikus Wistar yang diikduksi Aloksan*. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro
- Rohman, A., Riyanto. 2005. *Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Mengkudu (Morinda Citrifolia L)*, *J. Agritech*. Vol, 25 No 3;131-136

- Rohman, Abdul. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar
- Rohman, A. dan Gandjar, I. G. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Saifuddin, A., Suparti, Fuad, Anang dan Da'I, M. 2006. *Biotransformasi Kurkumin Melalui Kultur Suspensi Sel Daun Catharanthus roseus [L] G.Don Berbunga Merah*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah
- Sastrohamidjojo. 2005. *Kromatografi*. Yogyakarta : UGM Press
- Septiyaningsih, D. 2010. *Isolasi dan Identifikasi Komponen Utama Ekstrak Biji Buah Merah (Pandanus conoideus Lamk)*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret
- Setiyawan, M. I., Ningsih, R., Syarifah, U., Adi, T. K. 2015. Isolasi Senyawa Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol dan Identifikasi Menggunakan FT-IR. *Skripsi* tidak diterbitkan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Sinulingga, S. E. 2011. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Steroid atau Triterpenoid dari Akar Tanaman Ekor Naga (*Rhaphidophora pinnata Schott*). *Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Sumatra Utara*. Sumatra Utara
- Siregar, A. F., Agus, S., Delianis, P. 2012. Potensi Antibakteri Ekstrak Rumput Laut terhadap Bakteri Penyakit Kulit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus Epidermidis*, dan *Micrococcus luteus*. *Jurnal Of Marine Research* Volume 1 Nomor 2 Halaman 152-160
- Soebagio, B., Taofik, R., Kurniawati, S.A. 2007. Formulasi Gel Antioksidan dari Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava L*) dengan Menggunakan Aqupec HV-505. *Makalah Kongres Ilmiah*. Bandung: Fakultas Farmasi Universitas Padjajaran
- Soenardjo, N. 2011. Aplikasi Budidaya Rumput Laut *Eucheuma cottoni* (Weber Van Bosse) dengan Metode jaring Lepas Dasar (Net Bag) Model Cidaun. *Buletin Oseanografi Marina*, Vol.1 36-44
- Susilawati, Indriati, H., Limra, W. 2010. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid dari Daun Rimbang (Solanum torvum)*. Riau: Jurusan PMIPA FKIP Universitas Riau Pekanbaru
- Swantara, I.M.D., Parwata, I.M.O.A. 2011. *Kajian Senyawa Antioksidan Pada Rumput Laut Dari Pantai Sekitar Bali*. Bali: Universitas Udayana

- Swantara, I.M.D., Putra, A.A.B., Udayana, I.P. 2009. Identifikasi Senyawa Antiradikal Bebas Pada Rumput Laut *Sargassum ringgoldianum*. *Jurnal kimia*. Vol 6 (1): 23-28
- Syanqithi. 2007. *Tafsir Adhwa'ul Bayan*. Penerjemah Fathurazi. Jakarta: Pustaka Azzam
- Tasic, *et.al.* 2009. *The Acid Hydrolysis of Potato Tuber Mash in Bioetanol Production*. *Biochemical Engineering Journal* 43 (208-211)
- Tensiska, Marsetio dan Yudiastuti, S.O.N. 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 Ath-Thabari (1)*. Jakarta: Pustaka Azzam
- Trilaksani, W. 2003. Antioksidan: Jenis, sumber, Mekanisme Kerja dan Peran Terhadap Kesehatan. <http://rudycr-tripod.com/sem2-023/wini-trilaksani.htm>. Diakses 15 November 2015
- Vembriarto, Jeffry. 2013. *Kimia Steroid*. Malang: Universitas Negeri Malang
- Voight, R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Diterjemahkan oleh Soedani Noerono Soewandhi, Apt. Yogyakarta: UGM Press
- Wikanta, T., Januar, H.I., dan Nursid, M. 2005. Uji Aktivitas Antioksidan, Toksisitas, dan Sitotoksitas Ekstrak Alga Merah *Rhodomenia palmate*. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*. Vol. 11 No. 4 hal 41-49
- Wulansari, D., Chairul. 2011. Penapisan Aktivitas Antioksidan dan Beberapa Tumbuhan Obat Indonesia Menggunakan Radikal 2,2-Diphenyl-1 Picrylhydrazyl (DPPH). *Majalah Obat Tradisional*. Bogor: Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi-LIPI
- Yunus. 2009. Daya Hambat Ekstrak Metanol Rumput laut (*Euclima spinosum*) Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophilia*. *Jurnal Kelautan*. Vol. 2 No. 2 Hal. 16 – 22
- Zahro. 2011. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Triterpenoid Ekstrak n-heksana Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica Linn*) Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
- Zamroni, M. 2011. Uji Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Aktif Tanaman Anting-Anting (*Acalypha Indica L*). *Skripsi*. UIN Malang

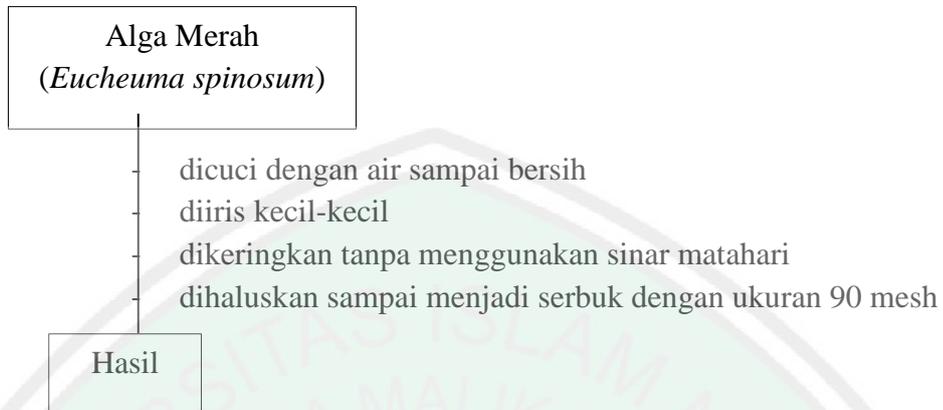
## LAMPIRAN

## Lampiran 1 Rancangan Penelitian

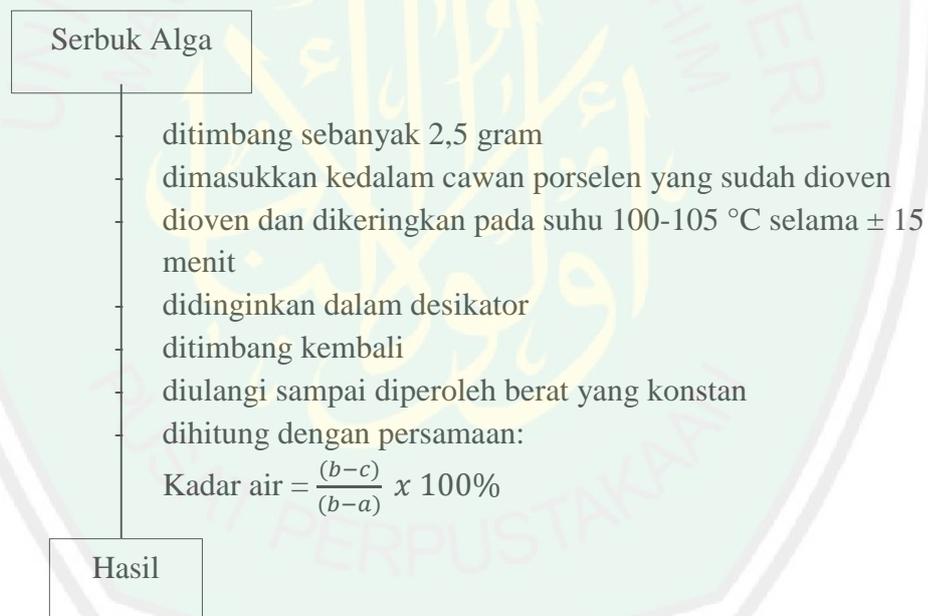


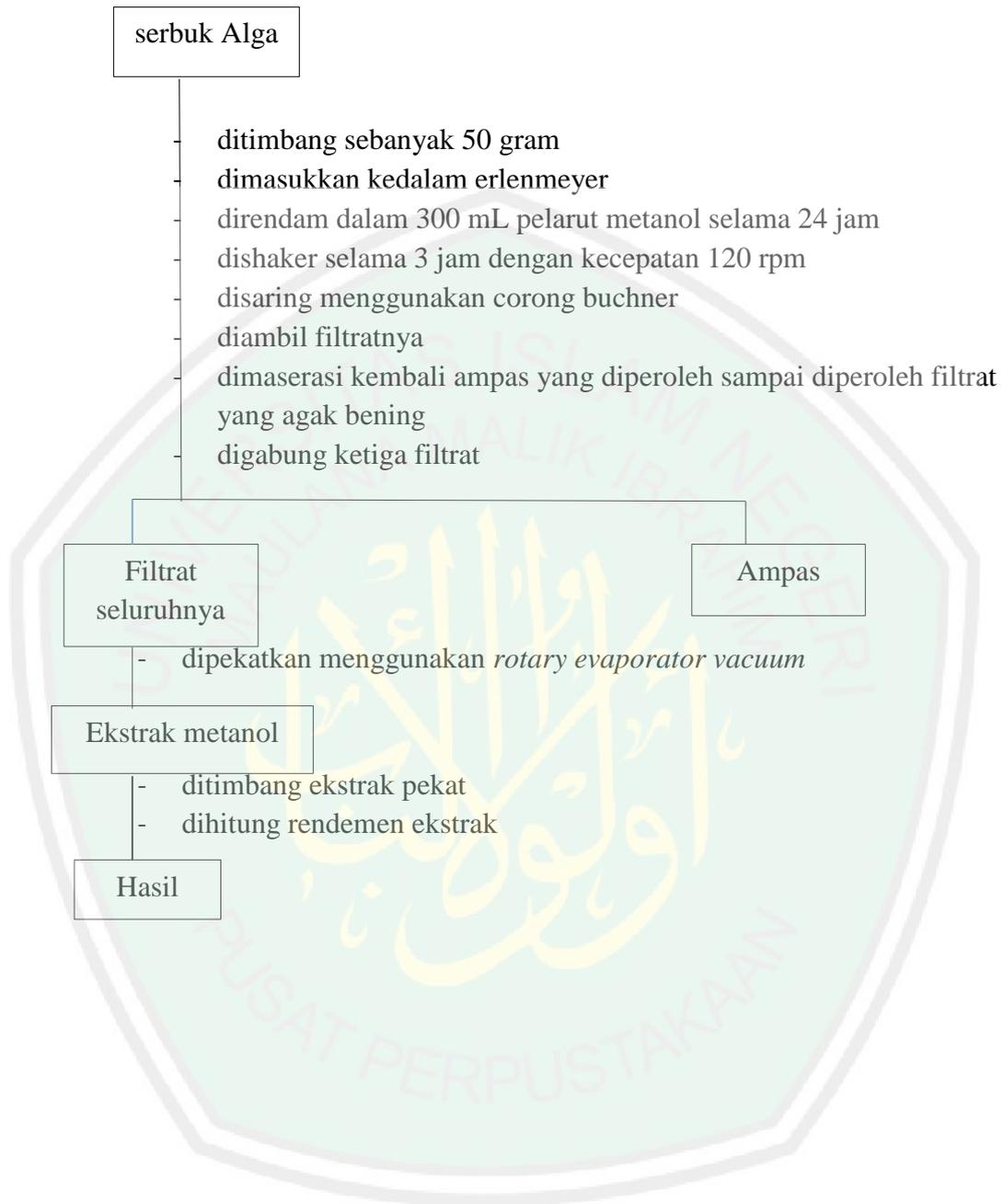
## Lampiran 2 Diagram Alir

### 1. Preparasi Alga Merah (*Eucheuma spinosum*)



### 2. Penentuan Kadar Air



3. Ekstraksi Alga Merah (*Eucheuma spinosum*)

## 4. Hidrolisis dan ekstraksi cair-cair ekstrak pekat metanol

Ekstrak pekat metanol

- ditimbang sebanyak 2,5 gram dan dimasukkan ke beaker glass
- ditambahkan 5 mL asam klorida (HCl) 2 N
- dihidrolisis selama 1 jam menggunakan magnetik stirer hot plate pada suhu ruang

Hidrolisat

- ditambahkan natrium bikarbonat sampai pHnya netral
- dipartisi menggunakan 12,5 mL petroleum eter dengan dua kali pengulangan

Ekstrak

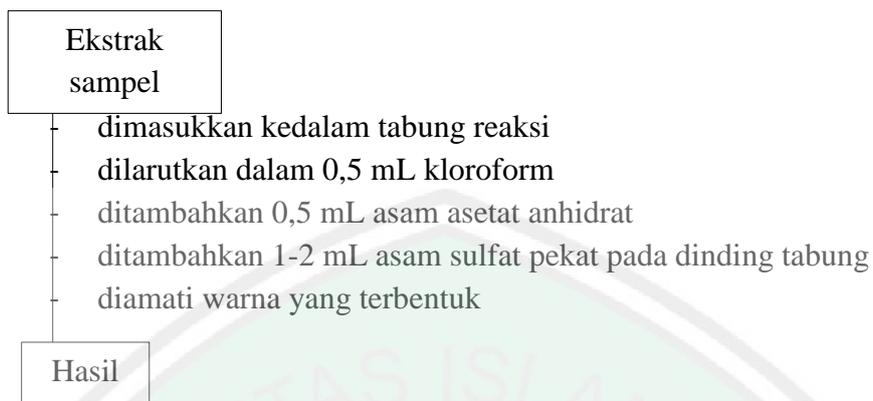
- dipekatkan menggunakan rotary evaporator vakum
- dialiri gas N<sub>2</sub>

Ekstrak pekat

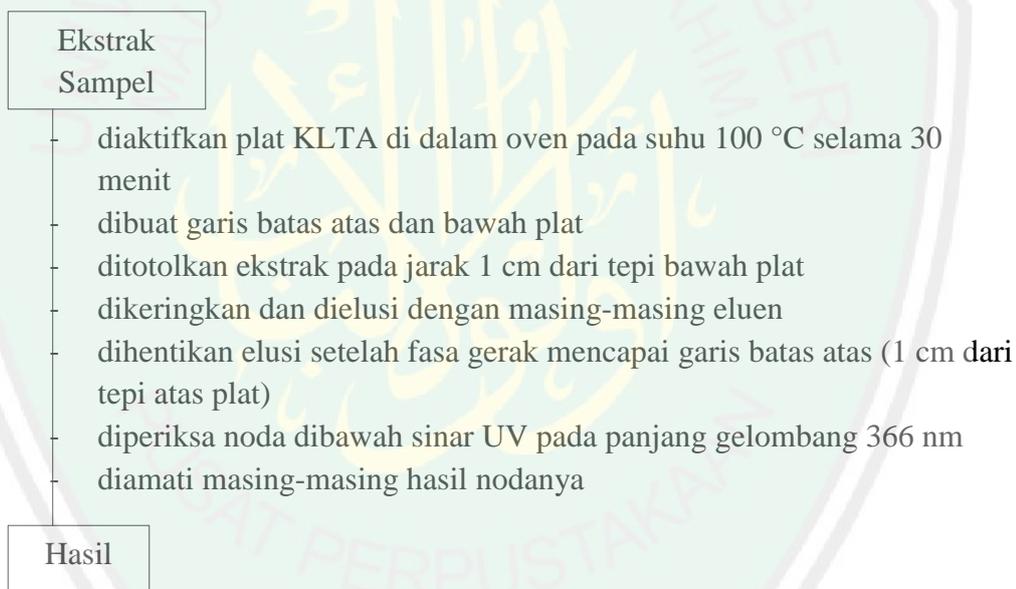
- ditimbang
- dihitung rendemennya

Hasil

## 5. Uji Fitokimia Senyawa Steroid



## 6. Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)



## 7. Pemisahan senyawa steroid dengan KLT Preparatif



## 8. Uji aktivitas antioksidan menggunakan DPPH

## a. Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan DPPH  
0.2 mM

diambil sebanyak 1,5 mL  
dimasukkan kedalam tabung reaksi  
ditambahkan 4,5 mL etanol  
didiamkan selama  $\pm$  10 menit  
dimasukkan kedalam kuvet  
dicari  $\lambda_{\text{maks}}$

Hasil

## b. Penentuan waktu kestabilan

Larutan ekstrak  
30 ppm

diambil sebanyak 4,5 mL  
dimasukkan kedalam kuvet  
ditambahkan 0,2 mM larutan DPPH sebanyak 1,5 mL  
diinkubasi  
dicari waktu kestabilan pada rentang waktu 5 – 120 menit dengan interval 5 menit menggunakan spektronik 20 pada  $\lambda_{\text{maks}}$  yang telah didapatkan

Hasil

## c. Pengukuran potensi antioksidan pada sampel

## o Absorbansi kontrol

Larutan DPPH  
0,2 mM

diambil sebanyak 1,5 mL  
dimasukkan kedalam tabung reaksi  
ditambahkan pelarut yang digunakan pada ekstrak sebanyak 4,5 mL  
ditutup tabung reaksi dengan tissue  
diinkubasi pada suhu 37 °C selama waktu kestabilan yang telah didapatkan pada tahap sebelumnya  
dimasukkan larutan kedalam kuvet  
diukur absorbansinya dengan  $\lambda_{\text{maks}}$  yang telah didapatkan

Hasil

o Pengukuran Sampel

Sampel dengan konsentrasi  
15, 20 dan 25 ppm

— disiapkan tabung reaksi untuk masing-masing konsentrasi  
 — diisi masing-masing tabung reaksi dengan 4,5 mL ekstrak  
 — ditambahkan DPPH sebanyak 1,5 mL  
 — diulang sebanyak 3 kali  
 — diinkubasi pada suhu 37 °C pada waktu kestabilan yang telah  
 — didapatkan pada tahap sebelumnya  
 — dimasukkan kedalam kuvet  
 — diukur absorbansinya pada  $\lambda_{maks}$  yang telah didapatkan

Nilai  
absorbansi

— dihitung nilai % aktivitas antioksidan  
 — dihitung nilai EC<sub>50</sub>

Hasil

9. Identifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Sampel  
murni

— diambil sebanyak 2 mL  
 — dimasukkan kedalam kuvet hingga sepertiganya  
 — dianalisis pada panjang gelombang 200-800 nm

Hasil

### Lampiran 3 Pembuatan Larutan dan Reagen

#### 1. Pembuatan Larutan HCl 2N

$$\text{BJ HCl pekat} = 1,19 \text{ g/mL}$$

$$\text{Konsentrasi} = 37\%$$

$$\text{BM HCl} = 36,5 \text{ g/mol}$$

$$n = 1 \text{ (jumlah mol ion H}^+\text{)}$$

$$\begin{aligned} \text{Normalitas HCl} &= n \times \text{Molaritas HCl} \\ &= 1 \times \frac{37\% \times \text{BJ HCl} \times 10}{\text{BM HCl pekat}} \end{aligned}$$

$$\text{BM HCl pekat}$$

$$= \frac{37\% \times 11,90 \text{ g/mL}}{36,5 \text{ g/mol}}$$

$$36,5 \text{ g/mol}$$

$$= 12,06 \text{ N}$$

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$12,06 \text{ N} \times V_1 = 2 \text{ N} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 16,6 \text{ mL}$$

Adapun prosedur pembuatannya adalah diambil larutan HCl 37% sebanyak 16,6 mL. dimasukkan kedalam labu takar 100 mL yang telah terisi akuades 15 mL. kemudian ditambahkan akuades hingga tanda batas dan dihomogenkan.

#### 2. Pembuatan Larutan NaHCO<sub>3</sub> Jenuh

Kelarutan NaHCO<sub>3</sub> sebesar 9,99 gr dalam 100 mL aquades. Sehingga untuk membuat larutan NaHCO<sub>3</sub> jenuh digunakan NaHCO<sub>3</sub> dengan berat > 9,99 gr (sampai terdapat endapan padatan yang tidak larut). Lalu disaring larutan tersebut untuk memisahkan residu dan filtrat sehingga didapatkan larutan NaHCO<sub>3</sub> jenuh.

### 3. Pembuatan Reagen Liberman Burchard

Reagen liberman burchard dibuat dengan cara dipipet sebanyak 5 mL asam asetat anhidrat dan 5 mL asam sulfat konsentrat, kemudian ditambahkan secara hati-hati melalui dindingnya ke dalam 50 mL etanol *p.a* dalam keadaan dingin (Wagner, 2001).

### 4. Pembuatan Larutan DPPH 0,2 mM

DPPH 0,2 mM dalam etanol *p.a* (96%)

Mr DPPH ( $C_{15}H_{12}N_5O_6$ ) = 394,33 gr/mol = 394,33 mg/mmol

$$M = \frac{\text{Mol (Zat terlarut)}}{\text{Liter Larutan}}$$

$$\text{Mol DPPH} = 25 \text{ mL} \times 0,2 \text{ mM}$$

$$= 25 \text{ mL} \times \frac{0,2 \text{ M}}{1000}$$

$$= 0,005 \text{ mmol}$$

$$\text{mg DPPH} = 0,005 \text{ mmol} \times \text{Mr DPPH}$$

$$= 0,005 \text{ mmol} \times 394,33 \text{ mg/mmol}$$

$$= 1,97165 \text{ mg}$$

### 5. Pembuatan Larutan stok 50 ppm dalam 20 mL pelarut

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

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

$$= 1 \text{ mg}$$

Jadi untuk membuat 20 mL larutan stok 50 ppm diperlukan bahan sebanyak 1 mg.

**6. Pembuatan Larutan sampel 15 ppm**

$$V_1.M_1 = V_2.M_2$$

$$5 \text{ mL} \cdot 15 \text{ ppm} = V_2 \cdot 50 \text{ ppm}$$

$$V_2 = \frac{5 \text{ mL} \times 15 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}}$$
$$= 1,5 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 5 mL larutan sampel 15 ppm diperlukan larutan stok 50 ppm sebanyak 1,5 mL.

**7. Pembuatan Larutan sampel 20 ppm**

$$V_1.M_1 = V_2.M_2$$

$$5 \text{ mL} \cdot 20 \text{ ppm} = V_2 \cdot 50 \text{ ppm}$$

$$V_2 = \frac{5 \text{ mL} \times 20 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}}$$
$$= 2 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 5 mL larutan sampel 20 ppm diperlukan larutan stok 50 ppm sebanyak 2 mL.

**8. Pembuatan Larutan Sampel 25 ppm**

$$V_1.M_1 = V_2.M_2$$

$$5 \text{ mL} \cdot 25 \text{ ppm} = V_2 \cdot 50 \text{ ppm}$$

$$V_2 = \frac{5 \text{ mL} \times 25 \text{ ppm}}{50 \text{ ppm}}$$

$$= 2,5 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 5 mL larutan sampel 25 ppm diperlukan larutan stok 50 ppm sebanyak 2,5 mL.



#### Lampiran 4 Hasil Pengukuran Uji Kadar Air Alga Merah *Eucheuma spinosum*

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

Keterangan: a = berat cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dioven

c = berat cawan + sampel setelah dioven

#### ➤ Data Pengukuran Kadar Air Sampel Alga Merah *Eucheuma spinosum* Kering

##### 1. Pengukuran Berat Cawan Sampai Konstan

Ulangan	Berat Cawan Kosong (g)		
	Cawan 1	Cawan 2	Cawan 3
Ulangan 1	34,556	29,214	24,917
Ulangan 2	34,556	29,214	24,917
Ulangan 3	34,557	29,214	24,917

##### 2. Pengukuran Berat Cawan + Sampel Alga Merah *Eucheuma spinosum* Kering Sampai Konstan

Ulangan	Berat cawan kosong (g) + sampel kering		
	Cawan 1	Cawan 2	Cawan 3
Sebelum dioven	37,058	31,716	27,417
Ulangan 1	36,858	31,518	27,213
Ulangan 2	36,859	31,517	27,213
Ulangan 3	36,859	31,515	27,214
Ulangan 4	36,859	31,515	27,215

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

$$= \frac{37,058 - 36,859}{37,058 - 34,557} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,199}{2,501} \times 100 \%$$

$$= 7,95 \%$$

$$\begin{aligned}
 \text{b. Kadar air cawan 2} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \\
 &= \frac{31,716-31,515}{31,716-29,214} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,201}{2,502} \times 100 \% \\
 &= 8,03 \%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{c. Kadar air cawan 3} &= \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \\
 &= \frac{27,417-27,215}{27,417-24,917} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,202}{2,5} \times 100 \% \\
 &= 8,08 \%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{➤ Kadar air rata-rata} &= \frac{7,95 \% + 8,03 \% + 8,08 \%}{3} \\
 &= \frac{24,06 \%}{3} \\
 &= 8,02 \%
 \end{aligned}$$

## Lampiran 5 Hasil Rendemen

### 5.1 Hasil Rendemen Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma spinosum*

Berat sampel serbuk = 450 g

Berat ekstrak pekat = 14,372 g

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel serbuk}} \times 100 \%$$

$$= \frac{14,372}{450} \times 100 \%$$

$$= 3,193 \%$$

### 5.2 Hasil Rendemen Ekstrak Hasil Partisi dengan Petroleum eter Alga Merah *Eucheuma spinosum*

Berat ekstrak metanol yang dipartisi = 12,5 g

Berat ekstrak hasil partisi = 1,759 g

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak hasil partisi}}{\text{Berat ekstrak metanol}} \times 100 \%$$

$$= \frac{1,759}{12,5} \times 100 \%$$

$$= 14,072 \%$$

## Lampiran 6 Perhitungan nilai Rf

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh noda}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

### 1. Hasil nilai Rf KLT analitik

#### a. Eluen 1 = n-Heksana : etil asetat (17:3)

$$\text{Rf noda 1} = \frac{0,7 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,096$$

$$\text{Rf noda 5} = \frac{4,45 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,613$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{1,2 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,165$$

$$\text{Rf noda 6} = \frac{4,85 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,668$$

$$\text{Rf noda 3} = \frac{2,5 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,344$$

$$\text{Rf noda 7} = \frac{5,9 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,813$$

$$\text{Rf noda 4} = \frac{4 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,551$$

$$\text{Rf noda 8} = \frac{6,6 \text{ cm}}{7,25 \text{ cm}} = 0,910$$

#### b. Eluen 2 = n-Heksana : etil asetat (9:1)

$$\text{Rf noda 1} = \frac{1 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,131$$

$$\text{Rf noda 4} = \frac{4 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,526$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{2 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,263$$

$$\text{Rf noda 5} = \frac{5,2 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,684$$

$$\text{Rf noda 3} = \frac{3 \text{ cm}}{7,6 \text{ cm}} = 0,394$$

#### c. Eluen 3 = n-Heksana : etil asetat (8:2)

$$\text{Rf noda 1} = \frac{3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,375$$

$$\text{Rf noda 4} = \frac{7,4 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,925$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{5 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,625$$

$$\text{Rf noda 5} = \frac{7,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,975$$

$$\text{Rf noda 3} = \frac{6,5 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,8123$$

**2. Hasil nilai Rf KLT Preparatif**

➤ **Eluen terbaik dari hasil KLT analitik = n-Heksana : etil asetat (17:3)**

$$\text{Rf noda 1} = \frac{1,6 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,088$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{2,2 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,122$$

$$\text{Rf noda 3} = \frac{4,8 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,266$$

$$\text{Rf noda 4} = \frac{8 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,444$$

$$\text{Rf noda 5} = \frac{9,5 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,527$$

$$\text{Rf noda 6} = \frac{11,4 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,633$$

$$\text{Rf noda 7} = \frac{12,5 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,694$$

$$\text{Rf noda 8} = \frac{14,3 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,794$$

## Lampiran 7 Pengujian Aktivitas Antioksidan

### ➤ Fraksi Petroleum eter

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	% Antioksidan
1	0,5846	0,5601	4,1909
5	0,5829	0,5042	13,5014
25	0,5338	0,4611	13,6193
50	0,5330	0,4450	16,5103
100	0,5331	0,4409	17,2950
150	0,5332	0,4035	24,3248
200	0,5340	0,2266	57,5655

### Persamaan untuk menghitung nilai EC<sub>50</sub>

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope})})$$

$$Y = 0,0 + (100 - 0,0) / (1 + 10^{(2,395 - x) * 1,156})$$

Comparison of Fits

Can't calculate  
LogEC<sub>50</sub> different for each data set

Null hypothesis

Alternative hypothesis

P value

Conclusion (alpha = 0.05)

LogEC<sub>50</sub> same for all data sets

Models have the same DF  
LogEC<sub>50</sub> different for each data set

Preferred model

F (DFn, DFd)

LogEC<sub>50</sub> different for each data set

Best-fit values

Bottom = 0,0

Top = 100,0

LogEC<sub>50</sub> 2,395

HillSlope 1,156

EC<sub>50</sub> 248,1

Span = 100,0

Std. Error

LogEC<sub>50</sub> 0,1675

HillSlope 0,5672

95% Confidence Intervals

LogEC<sub>50</sub> 1,964 to 2,825

HillSlope -0,3024 to 2,614

EC<sub>50</sub> 92,07 to 668,6

Goodness of Fit

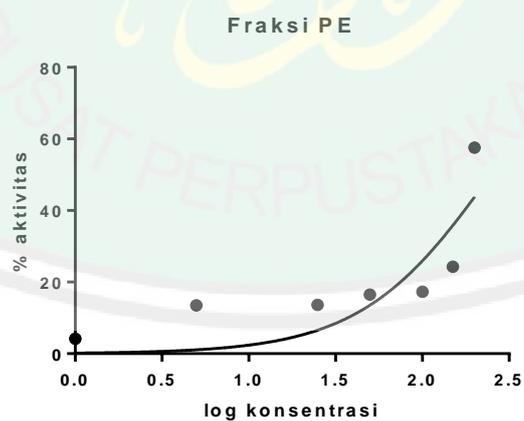
Degrees of Freedom 5

R square 0,6476

Absolute Sum of Squares 625,6

Sy.x 11,19

Constraints		
Bottom	Bottom = 0,0	
Top	Top = 100,0	
LogEC50 same for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0,0	
Top	= 100,0	
LogEC50	2,395	2,395
HillSlope	1,156	
EC50	248,1	248,1
Span	= 100,0	
Std. Error		
LogEC50	0,1675	0,1675
HillSlope	0,5672	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	1,964 to 2,825	1,964 to 2,825
HillSlope	-0,3024 to 2,614	
EC50	92,07 to 668,6	92,07 to 668,6
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		5
R square	0,6476	0,6476
Absolute Sum of Squares	625,6	625,6
Sy.x		11,19
Constraints		
Bottom	Bottom = 0,0	
Top	Top = 100,0	
LogEC50	LogEC50 is shared	
Number of points		
Analyzed		7



**Grafik Aktivitas Antioksidan Fraksi PE**

➤ Isolat 5

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	% Antioksidan
15	0,2402	0,2353	2,0399
20	0,2409	0,2346	2,6151
25	0,2427	0,2314	4,6559

**Persamaan untuk menghitung nilai EC<sub>50</sub>**

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{HillSlope})})$$

$$Y = 0,0 + (100 - 0,0) / (1 + 10^{(2,092 - x) * 1,909})$$

Comparison of Fits

Can't calculate

LogEC50 different for each data set

Null hypothesis

set

Alternative hypothesis

LogEC50 same for all data sets

P value

Conclusion (alpha = 0.05)

Models have the same DF  
LogEC50 different for each data set

Preferred model

set

F (DFn, DFd)

LogEC50 different for each data set

Best-fit values

Bottom = 0,0

Top = 100,0

LogEC50 = 2,092

HillSlope = 1,909

EC50 = 123,5

Span = 100,0

Std. Error

LogEC50 = 0,2198

HillSlope = 0,5616

95% Confidence Intervals

LogEC50 -0,7016 to 4,885

HillSlope -5,227 to 9,045

EC50 0,1988 to 76740

Goodness of Fit

Degrees of Freedom = 1

R square = 0,9331

Absolute Sum of Squares = 0,2529

Sy.x = 0,5029

Constraints

Bottom = 0,0

Top = 100,0

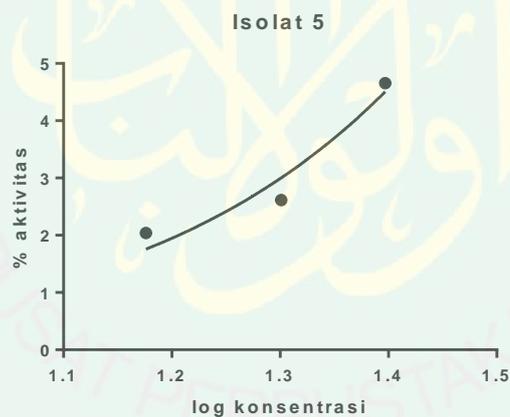
LogEC50 same for all data sets

Best-fit values

Bottom = 0,0

Top = 100,0

LogEC50	2,092	2,092
HillSlope	1,909	
EC50	123,5	123,5
Span	= 100,0	
Std. Error		
LogEC50	0,2198	0,2198
HillSlope	0,5616	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	-0,7016 to 4,885	-0,7016 to 4,885
HillSlope	-5,227 to 9,045	
EC50	0,1988 to 76740	0,1988 to 76740
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		1
R square	0,9331	0,9331
Absolute Sum of Squares	0,2529	0,2529
Sy.x		0,5029
Constraints		
Bottom	Bottom = 0,0	
Top	Top = 100,0	
LogEC50	LogEC50 is shared	
Number of points Analyzed		3



**Grafik Aktivitas Antioksidan Isolat 5**

➤ **Isolat 6**

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	% Antioksidan
15	0,4298	0,4288	0,2326
20	0,4302	0,4252	1,1622
25	0,4309	0,4231	1,8101

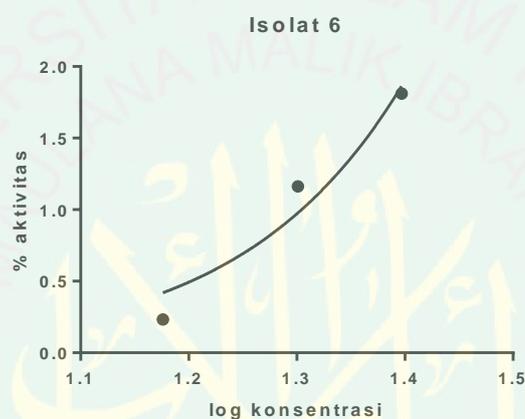
### Persamaan untuk menghitung nilai EC<sub>50</sub>

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{HillSlope}))}$$

$$Y = 0,0 + (100 - 0,0) / (1 + 10^{(1,978 - x) * 2,964})$$

Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		LogEC50 different for each data set
Alternative hypothesis		LogEC50 same for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		LogEC50 different for each data set
F (DFn, DFd)		
LogEC50 different for each data set		
Best-fit values		
Bottom	= 0,0	
Top	= 100,0	
LogEC50	1,978	
HillSlope	2,964	
EC50	94,98	
Span	= 100,0	
Std. Error		
LogEC50	0,2073	
HillSlope	1,004	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	-0,6565 to 4,612	
HillSlope	-9,797 to 15,73	
EC50	0,2206 to 40898	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	1	
R square	0,9429	
Absolute Sum of Squares	0,07185	
Sy.x	0,2681	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0,0	
Top	Top = 100,0	
LogEC50 same for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0,0	
Top	= 100,0	
LogEC50	1,978	1,978
HillSlope	2,964	
EC50	94,98	94,98
Span	= 100,0	
Std. Error		
LogEC50	0,2073	0,2073
HillSlope	1,004	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	-0,6565 to 4,612	-0,6565 to 4,612
HillSlope	-9,797 to 15,73	

EC50	0,2206 to 40898	0,2206 to 40898
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		1
R square	0,9429	0,9429
Absolute Sum of Squares	0,07185	0,07185
Sy.x		0,2681
Constraints		
Bottom	Bottom = 0,0	
Top	Top = 100,0	
LogEC50	LogEC50 is shared	
Number of points		
Analyzed	3	



**Grafik Aktivitas Antioksidan Isolat 6**

➤ **Isolat 7**

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	% Antioksidan
5	0,4413	0,4275	3,1271
10	0,4412	0,4090	7,2982
15	0,4423	0,3965	10,3549

**Persamaan untuk menghitung nilai EC<sub>50</sub>**

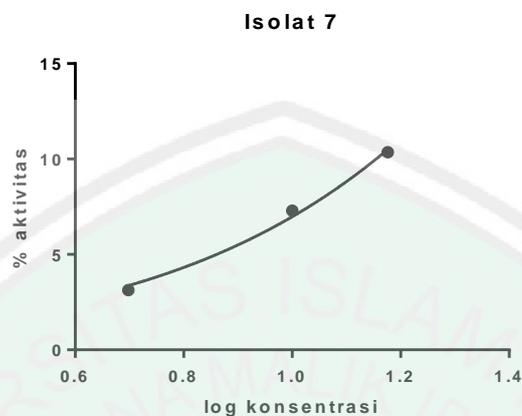
$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{HillSlope})})$$

$$Y = 0,0 + (100 - 0,0) / (1 + 10^{(2,020 - x) \cdot 1,103})$$

Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		LogEC50 different for each data set
Alternative hypothesis		LogEC50 same for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		LogEC50 different for each data set
F (DFn, DFd)		
LogEC50 different for each data set		
Best-fit values		
Bottom	= 0,0	
Top	= 100,0	
LogEC50	2,020	
HillSlope	1,103	
EC50	104,6	
Span	= 100,0	
Std. Error		
LogEC50	0,09730	
HillSlope	0,1140	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	0,7833 to 3,256	
HillSlope	-0,3448 to 2,552	
EC50	6,071 to 1803	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	1	
R square	0,9932	
Absolute Sum of Squares	0,1803	
Sy.x	0,4246	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0,0	
Top	Top = 100,0	
LogEC50 same for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0,0	
Top	= 100,0	
LogEC50	2,020	2,020
HillSlope	1,103	
EC50	104,6	104,6
Span	= 100,0	
Std. Error		
LogEC50	0,09730	0,09730
HillSlope	0,1140	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	0,7833 to 3,256	0,7833 to 3,256
HillSlope	-0,3448 to 2,552	
EC50	6,071 to 1803	6,071 to 1803
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		1
R square	0,9932	0,9932
Absolute Sum of Squares	0,1803	0,1803
Sy.x		0,4246
Constraints		
Bottom	Bottom = 0,0	
Top	Top = 100,0	
LogEC50	LogEC50 is shared	

Number of points  
Analyzed

3



**Grafik Aktivitas Antioksidan Isolat 7**

➤ **Asam askorbat**

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	% Antioksidan
5	0,4699	0,0496	89,4446
10	0,4696	0,0304	93,5264
15	0,4701	0,0222	95,2776
20	0,4690	0,0214	95,4371
25	0,4688	0,0194	95,8618

**Persamaan untuk menghitung nilai EC<sub>50</sub>**

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope})})$$

$$Y = 0,0 + (100 - 0,0) / (1 + 10^{(-0,6782 - x) * 0,6800})$$

**Comparison of Fits**

Null hypothesis

Alternative hypothesis

P value

Conclusion (alpha = 0.05)

Preferred model

F (DFn, DFd)

LogEC<sub>50</sub> different for each data set

Best-fit values

Bottom

= 0,0

Top

= 100,0

LogEC<sub>50</sub>

-0,6782

Can't calculate

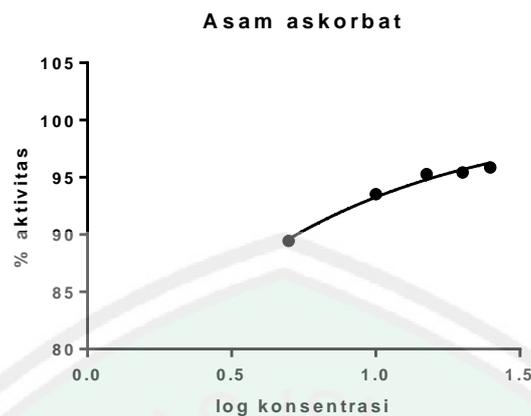
LogEC<sub>50</sub> different for each data set

LogEC<sub>50</sub> same for all data sets

Models have the same DF

LogEC<sub>50</sub> different for each data set

HillSlope	0,6800	
EC50	0,2098	
Span	= 100,0	
Std. Error		
LogEC50	0,1317	
HillSlope	0,05481	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	-1,097 to -0,2592	
HillSlope	0,5055 to 0,8544	
EC50	0,07995 to 0,5505	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	
R square	0,9805	
Absolute Sum of Squares	0,5490	
Sy.x	0,4278	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0,0	
Top	Top = 100,0	
LogEC50 same for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0,0	
Top	= 100,0	
LogEC50	-0,6782	-0,6782
HillSlope	0,6800	
EC50	0,2098	0,2098
Span	= 100,0	
Std. Error		
LogEC50	0,1317	0,1317
HillSlope	0,05481	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	-1,097 to -0,2592	-1,097 to -0,2592
HillSlope	0,5055 to 0,8544	
EC50	0,07995 to 0,5505	0,07995 to 0,5505
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R square	0,9805	0,9805
Absolute Sum of Squares	0,5490	0,5490
Sy.x		0,4278
Constraints		
Bottom	Bottom = 0,0	
Top	Top = 100,0	
LogEC50	LogEC50 is shared	
Number of points		
Analyzed	5	



**Grafik Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat**

➤ **BHT**

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	% Antioksidan
5	0,5119	0,3503	31,5687
10	0,5117	0,2702	47,1956
15	0,5111	0,2544	50,2250
20	0,5105	0,2025	60,3330
25	0,5099	0,1630	67,8564

**Persamaan untuk menghitung nilai EC<sub>50</sub>**

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$$

$$Y = 0,0 + (100 - 0,0) / (1 + 10^{(1,089 - x) * 0,8849})$$

Comparison of Fits

Null hypothesis

Alternative hypothesis

P value

Conclusion (alpha = 0.05)

Preferred model

F (DFn, DFd)

LogEC<sub>50</sub> different for each data set

Best-fit values

Bottom

= 0,0

Top

= 100,0

LogEC<sub>50</sub>

1,089

HillSlope

0,8849

EC<sub>50</sub>

12,26

Span

= 100,0

Std. Error

Can't calculate

LogEC<sub>50</sub> different for each data set

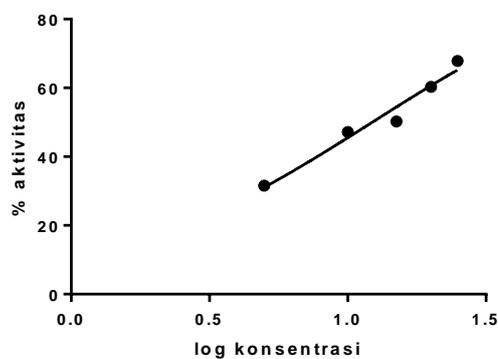
LogEC<sub>50</sub> same for all data sets

Models have the same DF

LogEC<sub>50</sub> different for each data set

LogEC50	0,02879	
HillSlope	0,1081	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	0,9970 to 1,180	
HillSlope	0,5410 to 1,229	
EC50	9,930 to 15,14	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	
R square	0,9633	
Absolute Sum of Squares	27,97	
Sy.x	3,053	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0,0	
Top	Top = 100,0	
LogEC50 same for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0,0	
Top	= 100,0	
LogEC50	1,089	1,089
HillSlope	0,8849	
EC50	12,26	12,26
Span	= 100,0	
Std. Error		
LogEC50	0,02879	0,02879
HillSlope	0,1081	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	0,9970 to 1,180	0,9970 to 1,180
HillSlope	0,5410 to 1,229	
EC50	9,930 to 15,14	9,930 to 15,14
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R square	0,9633	0,9633
Absolute Sum of Squares	27,97	27,97
Sy.x		3,053
Constraints		
Bottom	Bottom = 0,0	
Top	Top = 100,0	
LogEC50	LogEC50 is shared	
Number of points		
Analyzed	5	

BHT



Grafik Aktivitas Antioksidan BHT

## Lampiran 8 Dokumentasi



Gambar 1. Analisis kadar air kering



Gambar 2. Maserasi ke 1



Gambar 3. Maserasi ke 3



Gambar 4. Pemekatan dengan *vacuum rotary evaporator*



Gambar 5. Penyaringan dengan corong *Buchner*



Gambar 6. Ekstrak metanol *Eucheuma spinosum*



Gambar 7. Uji fitokimia



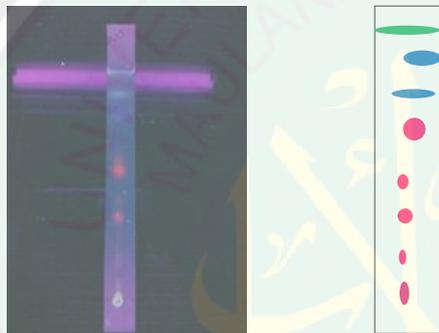
Gambar 8. Penambahan  $\text{NaHCO}_3$



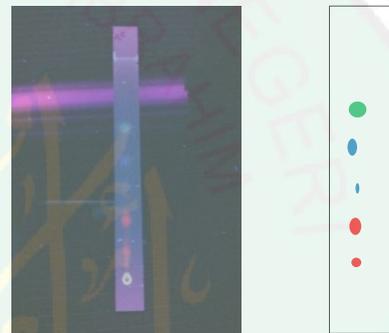
Gambar 9. Partisi



Gambar 10. Fraksi PE



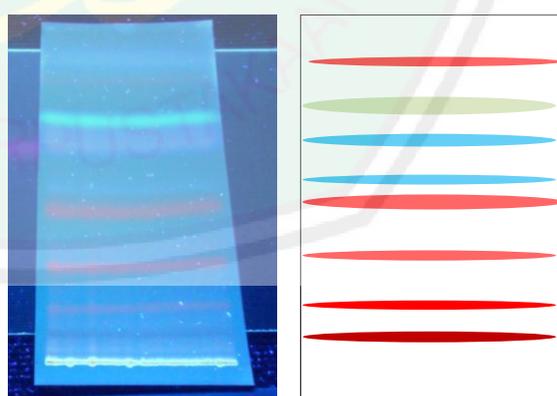
Gambar 11. KLTA eluen n-Heksana:etil asetat (17:3)



Gambar 12. KLTA eluen n-Heksana:etil asetat (9:1)



Gambar 13. KLTA eluen n-Heksana:etil asetat (8:2)



Gambar 14. KLTP eluen n-Heksana:etil asetat (17:3)



Gambar 15. Uji antioksidan BHT



Gambar 16. Uji antioksidan Asam Askorbat



Gambar 17. Uji antioksidan Fraksi PE



Gambar 18. Uji antioksidan Isolat 5



Gambar 19. Uji antioksidan Isolat 6



Gambar 20. Uji antioksidan Isolat 7