



Artikel Penelitian

## Pemisahan Senyawa Aktif Fraksi Petroleum Eter dan Etil Asetat Hasil Hidrolisis Ekstrak Etanol *Hydrilla verticillata* dari Ranu Grati Pasuruan

Suci Amalia\*, Ahmad Ghanaim Fasya, Faiqatul Hasanah, Dewi Yuliani

Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Indonesia, 65144

**INFO ARTIKEL****Riwayat Artikel**

Diterima 27 September 2018

Direvisi 12 Oktober 2018

Tersedia online 30 Desember 2018

\* Email penulis korespondensi:

amel\_kimiaa@kim.uin-malang.ac.id

**ABSTRAK**

*Hydrilla verticillata* is one of water plants that has some bioactivities. The presence of secondary metabolites in *H. verticillata* is responsible for the bioactivity. The purpose of this study was to determine and separate bioactive compounds from fraction of petroleum ether (PE) and ethyl acetate (EA) as a result of hydrolysis of *H. verticillata* ethanol extract. *H. verticillata* was extracted by maceration method using ethanol solvent, hydrolyzed with hydrochloric acid and partitioned respectively with petroleum ether and ethyl acetate. Crude ethanol extract, PE and EA fraction were identified their secondary metabolites. The phytochemical test results showed *H. verticillata* ethanol extract containing alkaloid compounds, flavonoids, tannins, saponins, triterpenoids, and steroids. PE fraction contained steroids and terpenoids, while EA fraction contained flavonoids, steroids, and triterpenoids. Analytical thin layer chromatography analysis showed n-hexane : ethyl acetate (4:1) eluent as the best mobile phase for separating steroids. The preparative thin layer chromatography analysis of *H. verticillata* fraction using n-hexane : ethyl acetate (8:2) as mobile phase produced 17 and 14 spots of PE and EA fractions, respectively.

Keywords: *Hydrilla verticillata*, thin layer chromatography, phytochemicals

*Hydrilla verticillata* merupakan salah satu tanaman air yang banyak memiliki bioaktivitas. Adanya metabolit sekunder pada *H. verticillata* yang bertanggung jawab terhadap bioaktivitas ini. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui dan memisahkan senyawa aktif dari fraksi petroleum eter (PE) dan etil asetat (EA) hasil hidrolisis ekstrak etanol *H. verticillata*. Ekstrak diperoleh dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol, dihidrolisis dengan asam klorida dan dipartisi masing-masing dengan petroleum eter dan etil asetat. Ekstrak kasar etanol, fraksi PE dan EA diuji kandungan metabolit sekundernya. Hasil uji fitokimia menunjukkan ekstrak etanol *H. verticillata* mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, triterpenoid, dan steroid. Fraksi PE mengandung steroid dan terpenoid, sedangkan fraksi EA mengandung flavonoid, steroid, dan triterpenoid. Hasil analisis KLTA menunjukkan eluen n-heksana : etil asetat (4:1) sebagai fasa gerak terbaik untuk memisahkan steroid. Hasil analisis KLTP fraksi *H. verticillata* menggunakan perbandingan fasa gerak n-heksana : etil asetat (8:2) menghasilkan spot fraksi PE dan EA berturut-turut sebanyak 17 dan 14 spot.

Kata Kunci: *Hydrilla verticillata*, kromatografi lapis tipis, uji fitokimia

## 1. Pendahuluan

*Hydrilla verticillata* adalah tumbuhan air yang ditemukan pada ekosistem danau [1]. Tumbuhan ini telah banyak dimanfaatkan untuk berbagai produk di beberapa negara. Di India dan Amerika, pemanfaatan metabolit primer *H. verticillata* diantaranya sebagai suplemen [2], pupuk organik [3, 4], fitoremediasi pada pengolahan limbah [5, 6], makanan ikan, dan bahan kemasan kepiting [3]. Kandungan senyawa metabolit sekunder pada *H. verticillata* juga dimanfaatkan sebagai antitumor [7], antikonvulsan [8], antimalaria [9], antimikroba [10], dan antioksidan [11].

Eksplorasi *H. verticillata* di danau-danau Indonesia belum banyak dilakukan. Ranu Grati, Pasuruan adalah salah satu danau yang dengan jumlah populasi *H. verticillata* yang melimpah berdasarkan observasi. Selain itu, *H. verticillata* belum banyak juga dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *H. verticillata* banyak mengandung metabolit sekunder. Hasil skrining fitokimia *H. verticillata* ekstrak etanol mengandung senyawa alkaloid, triterpenoid, flavonoid dan saponin [10]. Hafiz [12] menyebutkan bahwa ekstrak metanol *H. verticillata* mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, triterpenoid, saponin, tanin, triterpenoid, dan steroid.

Isolasi senyawa metabolit sekunder merupakan salah satu tahapan penting sebelum proses pemisahan. Ekstraksi senyawa bahan alam banyak dilakukan dengan maserasi dengan pelarut polar [13]. Pemisahan metabolit sekunder dibantu dengan reaksi hidrolisis untuk memutus ikatan glikosida dan proses partisi untuk memisahkan metabolit sekunder berdasarkan sifat kepolaran yang berbeda [14]. Pada penelitian ini akan dilakukan pemisahan fraksi petroleum eter dan etil asetat *H. verticillata* yang berasal dari Ranu Grati Pasuruan.

## 2. Bahan dan Metode

### 2.1. Bahan

Sampel penelitian ini adalah *Hydrilla verticillata* dari danau Ranu Grati, Pasuruan. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96% (Merck), petroleum eter 96% (Merck), dan etil asetat 96% (Merck). Uji fitokimia menggunakan HCl 1 N, reagen Mayer dan Dragendorff, HCl 2% (b/b), HCl pekat, metanol 50% (v/v), serbuk logam Mg, FeCl<sub>3</sub> 1% (b/v), gelatin, kloroform, asam asetat anhidrat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, diklorometana, dan pereaksi Liberman-Burchard.

### 2.2. Preparasi Sampel

Pengambilan *H. verticillata* dilakukan di permukaan Danau Ranu. Sampel basah dimasukkan ke dalam wadah plastik untuk dilakukan uji taksonomi. Biomassa *H. verticillata* dikeringkan di bawah sinar matahari sampai kering. Biomassa kering dihaluskan dengan ukuran 90 mesh sehingga diperoleh serbuk *H. verticillata* sebagai sampel. Analisis kadar air sampel menggunakan metode thermogravimetri berdasarkan AOAC [15].

### 2.3. Ekstraksi Senyawa Aktif

Sebanyak 100 g sampel dimaserasi menggunakan 300 mL pelarut etanol selama 24 jam. Pengocokan dilakukan dengan *shaker* selama 3 jam dengan kecepatan 1200 rpm dan disaring. Residu hasil maserasi dilarutkan kembali menggunakan pelarut yang sama sebanyak 3 kali pengulangan. Lima gram ekstrak etanol pekat dihidrolisis selama 1 jam dengan penambahan 10 mL asam klorida 2 N sambil diaduk. Selanjutnya ditambahkan larutan NaHCO<sub>3</sub> jenuh hingga netral, kemudian dipartisi dengan petroleum eter sebanyak 3 kali. Proses partisi dilakukan juga dengan pelarut etil asetat. Hasil partisi digunakan untuk identifikasi golongan senyawa aktif *H. verticillata*.

### 2.4. Uji Fitokimia

#### 2.4.1. Uji Alkaloid

Ekstrak ditambah 0,5 mL HCl 2% dimasukkan dalam tabung reaksi 1 dan 2. Tabung 1 ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorff dan adanya alkaloid ditunjukkan dengan endapan jingga. Ekstrak pada tabung 2 ditambahkan 2-3 tetes reagen Mayer dan adanya alkaloid ditunjukkan endapan kekuning-kuningan.

#### 2.4.2. Uji Flavonoid

Ekstrak dilarutkan dalam 1-2 mL metanol panas 50%. Kemudian ditambah logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat. Warna merah, kuning atau jingga pada larutan menunjukkan adanya flavonoid.

#### 2.4.3. Uji Saponin

Ekstrak ditambah air (1:1) sambil dikocok selama 1 menit dan apabila terbentuk busa ditambahkan HCl 1 N. Saponin ditunjukkan dengan busa yang terbentuk dapat bertahan selama 10 menit dengan ketinggian 1-3 cm.

#### 2.4.4. Uji Tanin

Uji tanin dapat dilakukan dengan FeCl<sub>3</sub> 1% dan larutan gelatin. Uji dengan FeCl<sub>3</sub> dilakukan dengan memasukkan 3 tetes larutan FeCl<sub>3</sub> 1% pada ekstrak. Warna hijau kehitaman atau biru tinta menunjukkan adanya tanin. Uji dengan larutan gelatin dilakukan pada 2 mg ekstrak kasar yang ditambahkan dengan larutan gelatin. Endapan putih menunjukkan adanya tanin.

#### 2.4.5. Uji Triterpenoid dan Steroid

Ekstrak ditambahkan 0,5 mL kloroform dan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Larutan ditambahkan dengan 1-2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut, sedangkan steroid ditunjukkan dengan warna hijau kebiruan pada larutan.

### 2.5. Pemisahan Senyawa Aktif Hasil Partisi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

#### 2.5.1. Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)

Sebanyak 0,01 g sampel (fraksi PE dan EA) dilarutkan dalam 2,5 mL diklorometana (setara dengan 4000 ppm), kemudian ditotolkan ± 1 cm dari bawah plat silika gel F<sub>254</sub> ukuran 1x10 cm<sup>2</sup>. Selanjutnya, plat dikeringkan dan dielusi dengan eluen yang sesuai. Pengembang (fasa gerak) untuk golongan senyawa steroid adalah n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 9:1; 8:2; 7:3; dan 6:4. Noda-noda pada permukaan plat diamati menggunakan sinar UV, kemudian ditentukan nilai R<sub>f</sub> (*retention factor*) masing-masing noda. Eluen terbaik ditentukan dari banyaknya noda yang terpisah. Noda disemprot dengan reagen Liebermann-Burchard, dimana spot yang diduga senyawa steroid ditentukan dari warna noda yang tampak di bawah lampu UV. Eluen yang terbaik selanjutnya digunakan untuk KLTP.

#### 2.5.2. Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Ekstrak pekat 0,01 g dilarutkan dalam 2,5 mL diklorometana (setara dengan 4000 ppm), kemudian ekstrak ini ditotolkan pada plat silika gel GF<sub>254</sub> ukuran 20x10 cm<sup>2</sup>. Selanjutnya, plat silika dielusi dengan eluen terbaik dari hasil analisis KLTA. Noda hasil pemisahan diamati dan dihitung R<sub>f</sub> noda. Setelah itu, R<sub>f</sub> yang diperoleh dibandingkan dengan R<sub>f</sub> hasil analisis KLTA. Spot yang diduga merupakan senyawa steroid dikerok dan dilarutkan dalam petroleum eter untuk selanjutnya disentrifugasi. Pelarut dalam supernatan yang diperoleh diuapkan dengan gas N<sub>2</sub> hingga diperoleh isolat pekat. Hasil isolat dari KLTP dicek dengan KLTA menggunakan eluen yang terbaik hasil KLTP.

## 3. Hasil dan Pembahasan

### 3.1. Pengambilan dan Preparasi Sampel

Teknik pengambilan sampel dilakukan dengan pertimbangan secara subjektif [16]. Sampel yang diambil adalah seluruh bagian tumbuhan utuh yang berada di permukaan air dimana jarak antara permukaan dengan dasar air ±2 m. Hasil pengamatan menunjukkan 3 titik pertumbuhan *H. verticillata* yang melimpah. Hasil uji taksonomi yang dilakukan di Laboratorium Taksonomi Universitas Brawijaya menunjukkan bahwa tumbuhan yang diambil dari Danau Ranu Grati termasuk dalam genus *Hydrilla* dan spesies *Hydrilla verticillata* (L.f) Royle.

Preparasi sampel dimaksudkan untuk mempermudah proses ekstraksi. Hasil penghalusan dari sampel basah 8 Kg diperoleh serbuk halus sebanyak 1 Kg. Kadar air *H. verticillata* basah dan kering masing-masing sebesar 91,68 dan 8,22%. Kandungan air yang tinggi dapat mempersulit pelarut untuk mengekstrak senyawa aktif yang terdapat pada sampel. Gugus hidrogen pada air dapat membentuk ikatan hidrogen dengan pelarut sehingga air dalam sampel akan terikat oleh pelarut [17]. Kadar air maksimum yang disyaratkan agar proses ekstraksi dapat berlangsung maksimal yaitu 10% [18].

### 3.2. Ekstraksi Senyawa Aktif

Ekstraksi menggunakan pelarut etanol, dan hasil partisi menggunakan pelarut petroleum eter dan etil asetat. Hasil rendemen dari masing-masing ekstrak ditunjukkan pada **Tabel 1** dimana fraksi etil asetat hasil partisi dari ekstrak etanol memiliki rendemen tertinggi. Hal ini dimungkinkan karena *H. verticillata* banyak mengandung senyawa semipolar. Umumnya senyawa aktif di alam masih dalam bentuk glikosidanya (terikat pada gugus gula) sehingga akan terekstrak pada pelarut polar.

**Tabel 1.** Hasil Rendemen Ekstrak *H. verticillata*

Sampel	Rendemen (%) (b/b)
Ekstrak kasar: Etanol	12,72
Fraksi: Petroleum eter	30,27
Fraksi: Etil asetat	38,80

### 3.3. Uji Fitokimia

Hasil uji fitokimia menunjukkan ekstrak etanol mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid dan triterpenoid. Fraksi petroleum eter (PE) mengandung steroid dan triterpenoid. Fraksi etil asetat (EA) mengandung flavonoid, steroid dan triterpenoid.

### 3.4. Pemisahan Senyawa Aktif dengan KLT

Pada hasil KLTA yang diperoleh eluen terbaik untuk pemisahan senyawa steroid adalah n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 4:1. Spot yang dihasilkan dari fraksi PE dan EA berturut-turut 8 dan 7 spot (**Tabel 2** dan **3**). Pada fraksi PE diperoleh 3 isolat yang berwarna hijau atau biru yang diduga kuat merupakan senyawa steroid yaitu isolat dengan Rf = 0,443; 0,860 dan 0,949. Pada fraksi EA diperoleh dua isolat yang diduga steroid yaitu isolat dengan Rf = 0,397 dan 0,538 yang masing-masing berwarna hijau.

**Tabel 2.** Hasil Pemisahan KLTA Fraksi Petroleum Eter (PE) *H. verticillata*

Eluen	Jumlah noda	Warna	Rf	Dugaan senyawa
n-Heksana : etil asetat (9:1)	8	Merah	0,102	-
		Merah	0,179	-
		Biru keunguan	0,230	-
		Hijau	0,294	Steroid
		Merah	0,371	-
		Biru	0,435	-
		Hijau	0,512	Steroid
		Biru	0,576	-
n-Heksana : etil asetat (8:2)	8	Orange	0,250	-
		Biru	0,354	-
		Hijau	0,443	Steroid
		Merah muda	0,518	-
		Merah	0,569	-
		Merah	0,607	-
		Hijau	0,860	Steroid
		Hijau	0,949	Steroid
n-Heksana : etil asetat (7:3)	6	Merah	0,518	-
		Merah keunguan	0,594	-
		Merah	0,683	-
		Merah	0,734	-
		Merah	0,797	-
		Hijau terang	0,936	Steroid
		Merah	0,518	-
n-Heksana : etil asetat (6:4)	9	Merah	0,487	-
		Merah	0,537	-
		Merah tua	0,600	-
		Merah	0,670	-
		Merah	0,737	-
		Merah	0,787	-
		Merah kehitaman	0,850	-
		Merah	0,912	-
		Hijau	0,962	Steroid

Untuk memperoleh senyawa aktif yang terkandung pada masing-masing fraksi PE dan EA dilakukan pemisahan menggunakan KLTP untuk mengisolasi senyawa steroid *H. verticillata* dari campuran senyawa metabolit sekunder. Hasil analisis KLTP menggunakan perbandingan eluen n-heksana : etil asetat (8:2) pada fraksi PE dihasilkan 17 spot dengan 4 spot yang diduga senyawa steroid, yaitu isolat dengan Rf = 0,505 berwarna biru keunguan, Rf = 0,627 berwarna hijau kebiruan, Rf = 0,780 berwarna biru keunguan dan Rf = 0,880 hijau kebiruan. Adapun fraksi EA menghasilkan 14 spot dengan 4 spot yang diduga senyawa steroid, yaitu isolat dengan Rf = 0,122 berwarna biru, Rf = 0,867 berwarna biru, Rf = 0,939 berwarna hijau kebiruan dan Rf = 0,983 berwarna biru.

**Tabel 3.** Hasil Pemisahan KLTA Fraksi Etil Asetat (EA) *H. verticillata*

Eluen	Jumlah noda	Warna	Rf	Dugaan senyawa
n-Heksana : etil asetat (9:1)	9	Merah	0,064	-
		Merah	0,090	-
		Merah tua	0,129	-
		Merah	0,168	-
		Merah	0,207	-
		Merah kehitaman	0,298	-
		Merah	0,337	-
		Hijau	0,558	Steroid
		Hijau	0,610	Steroid
n-Heksana : etil asetat (8:2)	7	Merah	0,051	-
		Merah	0,089	-
		Merah	0,153	-
		Merah kehitaman	0,236	-
		Merah	0,282	-
		Hijau	0,397	Steroid
		Hijau	0,538	Steroid
n-Heksana : etil asetat (7:3)	10	Merah	0,303	-
		Merah	0,392	-
		Merah	0,430	-
		Merah	0,531	-
		Merah	0,582	-
		Merah keunguan	0,607	-
		Merah keunguan	0,687	-
		Merah kehitaman	0,734	-
		Merah	0,797	-
		Hijau	0,949	Steroid
n-Heksana : etil asetat (6:4)	9	Merah	0,375	-
		Merah	0,450	-
		Merah	0,487	-
		Merah kehitaman	0,575	-
		Merah	0,650	-
		Merah	0,712	-
		Merah	0,775	-
		Merah kehitaman	0,825	-
		Hijau	0,875	Steroid

**Tabel 4.** Hasil Pemisahan KLTP Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter (PE) *H. verticillata*

No.	Nilai Rf	Warna	Dugaan senyawa
1.	0,010	Orange	-
2.	0,030	Merah keunguan	-
3.	0,050	Merah muda	-
4.	0,060	Orange	-
5.	0,080	Merah muda	-
6.	0,105	Merah muda	-
7.	0,140	Merah muda	-
8.	0,172	Merah muda	-
9.	0,222	Merah tua	-
10.	0,255	Merah muda	-
11.	0,377	Merah muda	-
12.	0,405	Merah	-
13.	0,483	Merah	-
14.	0,505	Biru keunguan	Steroid
15.	0,627	Hijau kebiruan	Steroid
16.	0,780	Biru keunguan	Steroid
17.	0,880	Hijau kebiruan	Steroid

**Tabel 5.** Hasil Pemisahan KLTP Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat (EA) *H. verticillata*

No.	Nilai Rf	Warna	Dugaan senyawa
1.	0,078	Merah keunguan	-
2.	0,122	Biru	-
3.	0,172	Merah keunguan	-
4.	0,256	Orange	-
5.	0,283	Merah keunguan	-
6.	0,422	Merah muda	-
7.	0,489	Merah muda menyala	-
8.	0,550	Merah muda menyala	-
9.	0,633	Merah tua	-
10.	0,667	Merah muda	-
11.	0,767	Merah tua	-
12.	0,867	Biru	-
13.	0,939	Hijau kebiruan	-
14.	0,983	Biru	Steroid

#### 4. Kesimpulan

Rendemen yang diperoleh pada filtrat PE dan EA dari *H. verticillata* masing-masing sebesar 30,27 dan 38,80%. Hasil pengujian fitokimia ekstrak metanol *H. verticillata* menunjukkan kandungan senyawa alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid, saponin dan tanin. Hasil analisis KLTA menunjukkan eluen n-heksana : etil asetat (4:1) sebagai fasa gerak terbaik untuk memisahkan steroid. Hasil analisis KLTP dari *H. verticillata* menggunakan perbandingan fasa gerak n-heksana : etil asetat (8:2) dengan spot yang dihasilkan dari fraksi PE dan EA berturut-turut sebanyak 17 dan 14 spot.

#### Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada penyelenggara bantuan penelitian pengembangan program studi Lembaga Penelitian Pengabdian Masyarakat (LP2M) UIN Maulana Malik Ibrahim Malang atas dana penelitian dan semua pihak yang telah membantu penelitian ini.

#### Daftar Pustaka

- [1] F. Goltenboth, K. H. Timotius, P. P. Milan, & J. Margraf, *Ekologi Asia Tenggara*. Jakarta: Salemba Teknika, 2012.
- [2] Lotus Superfoods, "Give Your Energy and Mood a Major Boost with This Powerful Green Superfood," *lotussuperfoods.com*. [Online]. Available: <http://www.lotussuperfoods.com/hydrilla-verticillata-green-superfood-powder>. [Accessed 17 Februari 2019].
- [3] M. K. Misra, A. Panda, & D. Sahu, "Survey of Useful Wetland Plants of South Odisha," *Indian Journal of Traditional Knowledge*, vol. 11, no. 4, pp. 658–666, 2012.
- [4] M. N. Tanor, "*Hydrilla verticillata* Sebagai Sumber Hara pada Sistem Budidaya Kacang Tanah," *Eugenia*, vol. 10, no.1, pp. 92-101, 2004.
- [5] A. Anis, "Penurunan Kadar n-Total dan p-Total pada Limbah Cair Tahu dengan Metode Fitoremediasi Aliran Batch dan Kontinyu Menggunakan Tanaman *Hydrilla verticillata*," *Jurnal Spektra*, vol. 9, no. 18, pp. 9-14, 2011.
- [6] J. Silalahi, "Analisis Kualitas Air dan Hubungannya dengan Keanekaragaman Vegetasi Akuatik di Perairan Balige Danau Toba," Tesis, Universitas Sumatera Utara, Medan, 2010.
- [7] H. Araki, M. Inoue, & T. Kato, "Total Synthesis and Absolute Configuration of Otteliones A and B, Novel and Potent Antitumor Agents from a Freshwater Plant," *Organic Letters*, vol. 5, no. 21, pp. 3903-3906, 2003.
- [8] B. Das, D. Pal, & A. Haldar, "Pharmacognostical and Physiochemical Study of the Aquatic Weed *Hydrilla verticillata* (L.F.) Royle Known as Nutrient Power House," *International Journal of Research in Pharmacy and Science*, vol. 5, no. 1, pp. 1–6, 2015.
- [9] S.W. Annie, R. Raveen, M. G. Paulraj, T. Samuel, & S. Arivoli, "Screening of *Hydrilla verticillata* (L.F.) Royle (Hydrocharitaceae) Crude Leaf Extracts for Larvicidal Efficacy against the Filarial Vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae)," *International Journal of Entomology Research*, vol. 1, no. 3, pp. 43-48, 2016.
- [10] P. Prabha & J. Rajkumar, "Phytochemical Screening and Bioactive Potential of *Hydrilla verticillata*," *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, vol. 7, no. 3, pp. 1809-1815, 2015.
- [11] D. K. Pal & S. B. Nimse, "Little Known Uses of Common Aquatic Plant, *Hydrilla verticillata* (Linn . f .) Royle," *Asian Journal of Chemistry*, vol. 5, no. 2, pp. 108-111, 2006.

- [12] M. N. Hafiz, "Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Metanol, Kloroform dan n-Heksana *Hydrilla verticillata* (L.f) Royle dari Dana Ranu Kab. Pasuruan terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach," Skripsi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang, 2016.
- [13] A. N. Kristanti, S. N. Aminah, M. Tanjung, & B. Kurniadi, *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press, 2008.
- [14] S. Handoko, "Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter (PE) Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Metode Kromatografi Kolom Pembuatan Fasa Diam Cara Basah dan Kering," Skripsi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang, 2016.
- [15] AOAC, *Official Method of Analysis 11<sup>th</sup> Edition*. Washington DC: Association of Official Analytical Chemist, 1984.
- [16] S. Hadi, *Metodologi Penelitian Jilid 3*. Yogyakarta: Andi Press, 2004.
- [17] J. B. Harborne, *Metode Fitokimia Terbitan ke II*. Bandung: ITB Press, 1987.
- [18] F. G. Winarno, *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: Gramedia Pustaka, 1997.