# VARIASI RASIO SAMPEL TERHADAP SILIKA GEL PADA PEMISAHAN STEROID DAN TRITERPENOID FRAKSI PETROLEUM ETER MIKROALGA *Chlorella* sp. DENGAN KROMATOGRAFI KOLOM BASAH

**SKRIPSI**

**Oleh:**
**ROIKHATUL IYANI**
**NIM. 13630011**

**JURUSAN KIMIA**
**FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI**
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI**
**MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**
**2017**

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# VARIASI RASIO SAMPEL TERHADAP SILIKA GEL PADA PEMISAHAN STEROID DAN TRITERPENOID FRAKSI PETROLEUM ETER MIKROALGA *Chlorella* sp. DENGAN KROMATOGRAFI KOLOM BASAH

**SKRIPSI**

**Oleh:**
**ROIKHATUL IYANI**
**NIM. 13630011**

**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**
**2017**



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

**VARIASI RASIO SAMPEL TERHADAP SILIKA GEL PADA PEMISAHAN STEROID DAN TRITERPENOID FRAKSI PETROLEUM ETER MIKROALGA *Chlorella* sp. DENGAN KROMATOGRAFI KOLOM BASAH**

**SKRIPSI**

**Oleh:**
**ROIKHATUL IYANI**
**NIM. 13630011**

**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji**
**Tanggal: 29 September 2017**

| Pembimbing I | Pembimbing II |
|---|---|
| A. Ghanaim Fasya, M.Si | Akyunul Jannah, S.Si, M.P |
| NIP. 19820616 200604 1 002 | NIP. 19750410 200501 2 009 |

**Mengetahui,**
**Ketua Jurusan Kimia**

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



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

**VARIASI RASIO SAMPEL TERHADAP SILIKA GEL PADA PEMISAHAN STEROID DAN TRITERPENOID FRAKSI PETROLEUM ETER MIKROALGA *Chlorella* sp. DENGAN KROMATOGRAFI KOLOM BASAH**

**SKRIPSI**

**Oleh:**
**ROIKHATUL IYANI**
**NIM. 13630011**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi**
**dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan**
**untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**
**Tanggal: 29 September 2017**

| | | |
|---|---|---|
| **Penguji Utama** | **: Suci Amalia, M.Sc**<br>**NIP. 19821101 200901 2 007** | (.....) |
| **Ketua Penguji** | **: Dewi Yuliani, M.Si**<br>**NIDT. 19880711 20160801 2 067** | (.....) |
| **Sekretaris Penguji** | **: A. Ghanaim Fasya, M.Si**<br>**NIP. 19820616 200604 1 002** | (.....) |
| **Anggota Penguji** | **: Akyunul Jannah, S.Si, M.P**<br>**NIP. 19750410 200501 2 009** | (.....) |

**Mengesahkan,**
**Ketua Jurusan Kimia**

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



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

"من جد وجد"

"اَلْأَجْرُ عَلَى قَدْرِ التَّعَبِ"

**Where there is a will, there is a way..**

**That's true!**

**Alhamdulillah…**

**I dedicate this thesis for my parents (H. Khusnul & Hj. Rikhannah) and my beloved husband "Azubair"..**

**And for my sisters Ria & Putri, I'm sure you can do this also..**

**Especially for my child, you'd to keep struggle more than mum.. ☺**



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

| | |
|---|---|
| Nama | : Roikhatul Iyani |
| NIM | : 13630011 |
| Jurusan | : Kimia |
| Fakultas | : Sains dan Teknologi |
| Judul Penelitian | : Variasi Rasio Sampel terhadap Silika Gel pada Pemisahan Steroid dan Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Kromatografi Kolom Basah |

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 untuk mempertanggungjawabkan serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 4 Oktober 2017
Yang membuat pernyataan,

Roikhatul Iyani
NIM. 13630011



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## KATA PENGANTAR

بسم الله الرحمن الرحيم

Segala puji bagi Allah SWT, Tuhan semesta alam yang tiada hentinya merurunkan rahmat untuk semua makhlukNya, memberikan jalan dan kemudahan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Sholawat dan salam senantiasa tercurahkan kepada baginda Nabi Muhammad SAW yang syafaatnya selalu kita harapkan. Kesempatan kali ini penulis menyajikan skripsi tentang Variasi Rasio Sampel terhadap SIlika Gel pada Pemisahan Steroid dan Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Kromatografi Kolom Basah.

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini, khususnya kepada:

1. Bapak Prof. Dr. H. Abd. Haris, M. Ag. selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si selaku dosen pembimbing, Ibu Dewi Yuliani, M.Si selaku dosen konsultan, dan Ibu Akyunul Jannah, S.Si, M.P selaku dosen pembimbing agama yang telah memberikan bimbingan, motivasi serta arahan kepada penulis dalam penyelesaian penulisan skripsi.
4. Seluruh dosen jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu, pengetahuan serta pengalaman sebagai pedoman untuk melakukan penelitian ini.



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

5. Kedua orang tua yang telah membesarkan dan mendidik dengan seluruh kasih sayang, kesabaran, dan doa serta cinta yang tulus ikhlas kepada penulis semenjak kecil, selalu memberikan dukungan dan doa yang senantiasa mengalir. Semoga Allah SWT selalu menyayangi kalian dan mempermudah urusan kalian.

6. Suamiku "Azubair" yang telah memberi kesempatan untuk melanjutkan studi. Terimakasih atas dukungan dan doanya yang senantiasa menjadi cambuk semangat agar segera menyelesaikan skripsi ini. Terimakasih kesabarannya yang sudah lama menunggu.

7. Rekan-rekan penelitian saya, Eva Rahmawati, Choirun Nisa, Ainur, semoga bermanfaat ilmunya. Semangat selalu..

8. Rekan-rekan Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, khususnya Kimia A 2013 yang selalu bisa menghibur di sela-sela sibuknya aktifitas, yang memberikan pengalaman dan kesan yang tak akan pernah terlupakan.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan, karenanya komentar dan saran yang membangun penulis harapkan dari pembaca. Semoga skripsi ini dapat memberikan kontribusi positif serta bermanfaat bagi kita semua, Amin

Malang, 4 Oktober 2017

Penulis



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## DAFTAR ISI

**HALAMAN JUDUL** ..... **i**
**LEMBAR PERSETUJUAN** ..... **ii**
**LEMBAR PENGESAHAN** ..... **iii**
**LEMBAR PERSEMBAHAN** ..... **iv**
**LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN** ..... **v**
**KATA PENGANTAR** ..... **vi**
**DAFTAR ISI** ..... **viii**
**DAFTAR GAMBAR** ..... **x**
**DAFTAR TABEL** ..... **xi**
**DAFTAR LAMPIRAN** ..... **xii**
**ABSTRAK** ..... **xiii**

**BAB 1 PENDAHULUAN**
1.1 Latar Belakang ..... 1
1.2 Rumusan Masalah ..... 5
1.3 Tujuan Penelitian ..... 6
1.4 Batasan Masalah ..... 6
1.5 Manfaat Penelitian ..... 7

**BAB II TINJAUAN PUSTAKA**
2.1 Mikroalga *Chlorella* sp. ..... 8
2.2 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga *Chlorella* sp. ..... 12
2.2.1 Ekstraksi Maserasi ..... 12
2.2.2 Hidrolisis dan Partisi ..... 12
2.3 Senyawa Steroid ..... 13
2.4 Senyawa Triterpenoid ..... 15
2.5 Pemisahan Senyawa Steroid dan Triterpenoid Menggunakan Kromatografi Kolom Basah ..... 16
2.6 Identifikasi Steroid dan Triterpenoid Menggunakan Instrumen Spektrofotometer UV-Vis, FT-IR, dan LC-APCI-MS ..... 17
2.6.1 Spektrofotometer UV-Vis ..... 17
2.6.2 Spektrofotometer Inframerah (FTIR) ..... 18
2.6.3 LC-APCI-MS ..... 20

**BAB III METODE PENELITIAN**
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian ..... 22
3.2 Alat dan Bahan ..... 22
3.2.1 Alat ..... 22
3.2.2 Bahan ..... 22
3.3 Tahapan Penelitian ..... 23
3.4 Cara Kerja ..... 23
3.4.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella* sp ..... 23
3.4.2 Pemanenan Biomassa ..... 24
3.4.3 Penentuan Kadar Air Mikroalga *Chlorella* sp. ..... 24
3.4.4 Ekstraksi Maserasi Biomassa *Chlorella* sp ..... 25



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

3.4.5 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol Mikroalga *Chlorella sp*. 25
3.4.6 Uji Fitokimia Senyawa Steroid dan Triterpenoid ..... 25
3.4.7 Identifikasi Isolat *Chlorella* sp. Fraksi Petroleum Eter dengan LC-APCI- MS ..... 26
3.4.8 Pemisahan Senyawa Steroid dan Triterpenoid dari *Chlorella* sp. dengan Kromatografi Kolom Basah ..... 27
3.4.9 Monitoring dengan KLTA ..... 27
3.4.10 Identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR ..... 28
3.5 Analisis Data ..... 28

**BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**
4.1 Kultivasi dan Pemanenan *Chlorella* sp. ..... 30
4.2 Analisis Kadar Air ..... 30
4.3 Maserasi, Hidrolisis, dan Partisi ..... 30
4.4 Uji Fitokimia Senyawa Steroid dan Triterpenoid dengan Pereaksi Lieberman-Burchard (LB) ..... 31
4.5 Pemisahan Senyawa Steroid dan Triterpenoid dengan Kromatografi Kolom Basah dan Monitoring dengan KLTA ..... 32
4.6 Interpretasi LC-APCI-MS, UV-Vis, dan IR ..... 36
4.7 Manfaat Senyawa Steroid dan Triterpenoid dalam Perspektif Islam ..... 44

**BAB V PENUTUP**
5.1 Penutup ..... 48
5.2 Saran ..... 49

**DAFTAR PUSTAKA** ..... 50
**LAMPIRAN** ..... 56



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# DAFTAR GAMBAR


| | | |
|---|---|---|
| Gambar 2.1 | Dugaan Mekanisme Hidrolisis dari phenyl-β-D-glucopyranoside (Lawoko, 2009)…….. | 13 |
| Gambar 2.2 | Struktur dasar golongan senyawa steroid…….. | 14 |
| Gambar 2.3 | Struktur steroid (a) β-sitosterol; (b) stigmasterol …….. | 15 |
| Gambar 2.4 | (a) Skualena (struktur dasar triterpenoid);(b) eritrodiol (triterpenoid siklik)……. | 15 |
| Gambar 2.5 | (a) Asam oleanolic; (b) Asam ursolat……. | 16 |
| Gambar 2.6 | (a) Struktur pori molekul fase diam (b) Perpindahan massa antara fase diam dan fase gerak. Fase diam mempunyai pusat adsorpsi C yang akan menarik molekul-molekul di sekitarnya (Rohman, 2009)……. | 17 |
| Gambar 4.1 | Dugaan mekanisme hidrolisis steroid dengan glukosa……... | 31 |
| Gambar 4.2 | Reaksi penetralan HCl dengan natrium bikarbonat (Mardiyah, 2012)…… | 31 |
| Gambar 4.3 | Uji fitokimia steroid dan triterpenoid, (a) sebelum di-tambahkan reagen LB;(b) setelah ditambahkan reagen LB… | 32 |
| Gambar 4.4 | Hasil identifikasi LC-APCI-MS dari isolat *Chlorella* sp. fraksi petroleum eter……... | 37 |
| Gambar 4.5 | Struktur ion prekusor dan ion produk dari campesterol (Mo, Dong, Hurst, & Breemen, 2013)……... | 39 |
| Gambar 4.6 | Spektra UV-Vis senyawa steroid dibandingkan dengan literatur…… | 42 |
| Gambar 4.7 | Spektra IR senyawa steroid fraksi B2 mikroalga *Chlorella* sp. fraksi petroleum eter……. | 40 |
| Gambar 4.8 | Struktur steroid (a) Campesterol; (b) Stigmasterol; (c) β-sitosterol…….. | 41 |
| Gambar 4.9 | Senyawa steroid yang mengikat gugus ester 12α-hydoxy-5β- cholestane-3α-yl benzoate (Friedman, Alex, Dov, & Meir, 2007)……. | 41 |
| Gambar 4.10 | Spektra UV-Vis senyawa triterpenoid dibandingkan dengan literatur…….. | 42 |
| Gambar 4.11 | Spektra IR senyawa triterpenoid fraksi B7 mikroalga *Chlorella* sp. fraksi petroleum eter……. | 42 |
| Gambar 4.12 | Gugus fungsi pada eritrodiol…….. | 44 |




CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# DAFTAR TABEL


Tabel 2.1 Serapan yang muncul saat identifikasi steroid dengan FTIR, perbandingan antara penelitian Aisya *et al*. (2012) dan Mukharromah & Suyatno (2014)..... 19

Tabel 2.2 Serapan yang muncul saat identifikasi triterpenoid dengan FTIR, perbandingan antara penelitian Ismarti (2011) dan Suryani (2011)…….. 20

Tabel 2.3 Data spektra LC-APCI-MS senyawa triterpenoid yang terdapat pada ekstrak kulit beras hitam…….. 21

Tabel 4.1 Hasil monitoring senyawa steroid dan triterpenoid dengan perbandingan sampel dan silika 1:200…….. 33

Tabel 4.2 Hasil monitoring senyawa steroid dan triterpenoid dengan perbandingan sampel dan silika 1:150…….. 34

Tabel 4.3 Hasil monitoring senyawa steroid dan triterpenoid dengan perbandingan sampel dan silika 1:100…….. 35

Tabel 4.4 Data spektra massa dari streoid dan triterpenoid yang teridentifikasi oleh LC-APCI-MS…… 38

Tabel 4.5 Interpretasi Spektra IR Senyawa Steroid…… 40

Tabel 4.6 Interpretasi Spektra IR Senyawa Triterpenoid…… 43




CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## DAFTAR LAMPIRAN


| | | |
|---|---|---|
| Lampiran 1 | Diagram alir penelitian……..... | 56 |
| Lampiran 2 | Diagram alir……..... | 57 |
| Lampiran 3 | Perhitungan, Pembuatan Reagen dan Larutan……..... | 62 |
| Lampiran 4 | Dokumentasi penelitian……. | 68 |
| Lampiran 5 | Spektra LC-APCI-MS……..... | 74 |
| Lampiran 6 | Spektra UV-Vis……. | 75 |
| Lampiran 7 | Spektra IR……. | 77 |




CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# ABSTRAK

Iyani, R. 2017. Variasi Rasio Sampel terhadap Silika Gel pada Pemisahan Steroid dan Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Akyunul Jannah, S.Si, M.P; Konsultan: Dewi Yuliani, M.Si

Kata Kunci: *Chlorella* sp., Steroid, Triterpenoid, LC-APCI-MS, UV-Vis, FTIR

Steroid dan triterpenoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella* sp. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil pemisahan terbaik dari steroid dan triterpenoid menggunakan kromatografi kolom basah dengan memvariasikan jumlah sampel terhadap silika gel. Sampel kering *Chlorella* sp. diekstraksi maserasi dengan pelarut metanol. Ekstrak pekat hasil maserasi dihidrolisis dengan HCl 2 N lalu dipartisi dengan pelarut petroleum eter. Ekstrak hasil partisi diidentifikasi dengan LC-APCI-MS dan dipisahkan dengan kromatografi kolom basah menggunakan jumlah sampel berbeda dengan variasi 1:200, 1:150, dan 1:100. Monitoring dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fraksi dengan senyawa tunggal steroid dan triterpenoid dari variasi terbaik diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR. Berdasarkan identifikasi dengan LC-APCI-MS jenis steroid yang terkandung dalam isolat hasil partisi fraksi petroleum eter yaitu β-sitosterol, stigmasterol dan campesterol sedangkan untuk jenis triterpenoid yaitu eritrodiol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rasio 1:150 merupakan variasi terbaik yang diperoleh dua fraksi triterpenoid dan satu fraksi steroid. Berdasarkan spektra UV-Vis didapatkan panjang gelombang 204 dan 205 nm untuk steroid sedangkan triterpenoid 202 dan 205 nm. Spektra IR dari steroid menunjukkan adanya serapan –OH, $-CH_3$, $-CH_2-$, C=C, C=O ester, C−O ester, $-(CH_2)_2$ dan $-CH(CH_3)_2$ sedangkan triterpenoid menunjukkan serapan –OH, $-CH_3$, C=C, C=O ester, C−O ester, C−O−C ester, $-CH(CH_3)_2$ dan C−O alkohol sekunder.



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# ABSTRACT

Iyani, R. 2017. Variations in the Ratio of Samples Against Silica Gel on Steroid and Triterpenoid Separation from Petroleum Ether Fraction Microalgae *Chlorella* sp. by Wet Column Chromatography. *Thesis*. Chemistry Department, Sains and Technology Faculty, Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Supervisor II: Akyunul Jannah, S.Si, M.P; Consultant: Dewi Yuliani, M.Si

Key Words: *Chlorella* sp., Steroid, Triterpenoid, LC-APCI-MS, UV-Vis, FTIR

Steroid and triterpenoid are secondary metabolites contained in microalgae *Chlorella* sp. The objective of this research is to know the result of the best separation of steroid and triterpenoid using wet column chromatography by varying the amount of samples against silica gel. Dry sample of *Chlorella* sp. was extracted by maceration using methanol solvent. The concentrated extract was hydrolyzed by 2 N HCl and partitioned by petroleum ether. The extract was identified by LC-APCI-MS and separated by wet column chromatography using different of amount samples with the variations of 1:200, 1:150, and 1:100. Monitoring was conducted by Thin Layer Chromatography (TLC). Single fraction from the best variation identified by spectrophotometer UV-Vis and FT-IR. The identification by LC-APCI-MS showed that the types of steroid contained in isolates of petroleum ether fraction i.e., β-sitosterol, stigmasterol, and campesterol as for type triterpenoid i.e., eritrodiol. This study showed that ratio1:150 was the best variation which obtained two fractions of triterpenoid and one fraction of steroid. According to UV-Vis spectra, the wavelength obtained were 204 and 205 for steroid while 202 and 205 for triterpenoid. Infrared spectra of steroid showed the presence of –OH, $-CH_3$, $-CH_2-$, C=C, C=O esther, C−O esther, $-(CH_2)_2$ and $-CH(CH_3)_2$ while infrared spectra of triterpenoid showed the presence of –OH, $-CH_3$, C=C, C=O esther, C−O esther, C−O−C esther, $-CH(CH_3)_2$ and C−O for secondary alcohol.



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## مُسْتَخْلِصُ الْبَحْثِ

الإيَانِ، ر.، ٢٠١٧، الإخْتِلَافَاتُ فِي عَدَدِ الْعَيَّنَاتِ ضِدِّ هُلَامِ السِّيْلِيْكَا فِي فَصْلِ السِّتِيْرُوِيْدِ وَالتِّرْفِيْنُوِيْدِ لِفِئَةِ بَتْرُوْلِ الأَثِيْرِ مِنَ الطُّحَالَبِ الْمُجْهَرِيَّةِ *Chlorella* sp. بِطَرِيْقِ اللَّوْنِي العَمُوْدِ الرَّطْبِ. بَحْثُ الْعِلْمِ. الشعبة الكمياء، كلية العلوم و التكنولوجية، الجامعة الحكومية الإسلامية مولنا مالك ابراهيم بمالانج. مشرف الأول: احمد غنائم فشا، الماجستير ؛ مشرفة الثانية: أعين الجنة، الماجستير؛ المستشارة: دوي جولياني، الماجستير

الكلمة الرئيسية: الستيرويد، الترفينويدد،LC-APCI-MS، UV-Vis، FTIR

---

السِّتِيْرُوِيْدُ وَالتِّرْفِيْنُوِيْدُ هُمَا الإِيْضَاتُ الثَّانَوِيَّةُ الوَارِدَتَانِ فِي الطُّحَالَبِ الْمُجْهَرِيَّةِ *Chlorella* sp.

وَهَدَفُ هَذَا الْبَحْثِ هو لِمَعْرِفَةِ النَّتَائِجِ مِنْ أَفْضَلِ الْفَصْلِ مِنَ السِّتِيْرُوِيْدِ وَالتِّرْفِيْنُوِيْدِ بِطَرِيْقِ اللَّوْنِي العَمُوْدِ الرَّطْبِ بِإِخْتِلَافَاتِ عَدَدِ العَيَّنَاتِ ضِدِّ هِلَامُ السِّيْلِيْكَا مَعَ الإِخْتِلَافَاتِ مِنْ ١:٢٠٠ ؛ ١:١٥٠ ؛ و ١:١٠٠.تُسْتَخْرَجُ الْعَيَّنَاتُ الْمُجَفَّفَةُ بِالتَّجْيِلِ مَعَ المِيْثَانُوْلِ.وَ تَمَّ التَّحَلُّلُ الْمَائِيّ مِنَ الْمُسْتَخْرَجِ الْمُكَثَّفِ مِنَ النَّتَائِجِ التَّبْجِيْلِ مَعَ ٢ ن HCl ثُمَّ تَقْسِيْمُهَا مَعَ الْمُسِيْلِ بَتْرُوْل الأَثِيْرِ.يُحَدَّدُ الْمُسْتَخْرَجُ مِنَ النَّتَائِجِ التَّقْسِيْمِ بِ LC-APCI-MS-وَ يُفَصَّلُ بِطَرِيْقِ اللَّوْنِي العَمُوْدِ بِاسْتِخْدَامِ عَدَدِ مِنَ العَيَّنَاتِ الْمُخْتَلِفَةِ. رُصِدَتْ النَّتَائِجُ مِنْ ذَلِكَ ٱلْفَصْلِ عَلَى كُلِّ اخْتِلَافَاتِ بِاسْتِخْدَامِ اللَّوْنِي الطَّبَقَى الرَّقِيْقِ التَّحْلِيْلِيَّةِ. وَالْفِئَةُ مِنْ الْمُرَكَّبِ ٱلْوَاحِدِ مِنْ جُزْءِ السِّتِيْرُوِيْدِ وَالتِّرْفِيْنُوِيْدِ مِنْ أَفْضَلِ ٱلإِخْتِلَافَاتِ يُحَدَّدُ بِمِقْيَاسِ الطَّيْفُ الضَّوْئِي لِلْاَشِعَّةِ فَوْقَ ٱلْبَنَفْسَجِيَّةِ وَٱلْاَشِعَّةِ تَحْتَ الْحَمْرَاءِ. وَأُظْهِرَتْ نَتَائِجُ التَّحْدِيْدِ بِ LC-APCI-MS- اَنَّ أَنْوَاعَ السِّتِيْرُوِيْدِ الْوَارِدَةِ فِي الفِئَةِ بَتْرَوْلِ الأَثِيْرِ هى بِيْتَا-سِيْتُوْسِتِيْرُوْلُ ،وَ سِتِيغْمَاسِتِرُول ، وَكَامِبِيسِتِرُول ، اَمَّا اَنْوَاعُ التِّرْفِيْنُوِيْدِ هِيَ أَرِيْثُرُودِيُولُ. وَ اَشَارَ هَذَا ٱلْبَحْثُ اَنَّ ١:١٥٠ هَي اَفْضَلِ الإِخْتِلَافَاتِ الَّتِي تَمَّ الْحُصُوْلُ عَلَيْهَا عَلَى الفِئَتَيْنِ مِنَ السِّتِيْرُوِيد والفِئَةِ الوَاحِدَةِ مِنَ التِّرْفِيْنُوِيْدِ. التَّعَرُّفُ عَلَى مِقْيَاسِ الطَّيْفِ الضَّوْئِي لِلْاَشِعَّةِ فَوْقَ البَنَفْسَجِيَّةِ مُقَابَلَ الْمَوْجَةِ الَّتِي تَمَّ ٱلْحُصُوْلُ عَلَيْهَا ٢٠٤ و ٢٠٥ نانومِتْرٍ للسِّتِيْرُوِيْدِ فِي حِيْنَ ٢٠٢ و ٢٠٥ نانومِتْرٍ للتِّرْفِيْنُوِيْدِ. اَشَارَتْ تَعَرُّفُ السِّتِيْرُوِيْدِ عَلَى ٱلْاَشِعَّةِ تَحْتَ الْحَمْرَاءِ عَلَى امْتِصَاصِ -OH، $-CH_3$، $-CH_2-$، C=C، C=O esther، C=O esther، $-(CH_2)_2$، C–O esther، و$-CH(CH_3)_2$. وَ اَشَارَتْ تَعَرُّفُ التِّرْفِيْنُوِيْدِ عَلَى ٱلْاَشِعَّةِ تَحْتَ الْحَمْرَاءِ عَلَى امْتِصَاصِ -OH، $-CH_3$ ، C=C، C=O esther، C–O esther، C–O–C esther، $-CH(CH_3)_2$، C–O، لِلْكَحُوْلِ الثَّانَوِيّ.



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# BAB I

# PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Hewan dan tumbuhan merupakan makhluk selain manusia yang diciptakan Allah SWT di bumi. Mereka hidup berdampingan dengan manusia dan membentuk suatu ekosistem yang teratur. Tumbuhan secara khusus dijelaskan Allah SWT dalam beberapa firmannya sebab tumbuhan merupakan sumber makanan utama bagi manusia dan hewan. Sebagaimana firman Allah SWT dalam Q.S. al-An'am ayat 99.

وَهُوَ ٱلَّذِىٓ أَنزَلَ مِنَ ٱلسَّمَآءِ مَآءً فَأَخۡرَجۡنَا بِهِۦ نَبَاتَ كُلِّ شَىۡءٍ فَأَخۡرَجۡنَا مِنۡهُ خَضِرٗا نُّخۡرِجُ مِنۡهُ
حَبّٗا مُّتَرَاكِبٗا وَمِنَ ٱلنَّخۡلِ مِن طَلۡعِهَا قِنۡوَانٞ دَانِيَةٞ وَجَنَّٰتٖ مِّنۡ أَعۡنَابٖ وَٱلزَّيۡتُونَ وَٱلرُّمَّانَ
مُشۡتَبِهًا وَغَيۡرَ مُتَشَٰبِهٍۗ ٱنظُرُوٓاْ إِلَىٰ ثَمَرِهِۦٓ إِذَآ أَثۡمَرَ وَيَنۡعِهِۦٓۚ إِنَّ فِي ذَٰلِكُمۡ لَأٓيَٰتٖ لِّقَوۡمٖ يُؤۡمِنُونَ

۹۹

"*Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan, maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau, Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang kurma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah, dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman" (Q.S. al-An'am:99)*

Q.S. al An'am ayat 99 tersebut menerangkan kepada manusia bagaimana Allah SWT menumbuhkan segala macam tumbuhan dari air yang diturunkanNya dari langit. Allah SWT bahkan menyebut secara jelas bahwasanya tumbuhan yang Dia ciptakan ada berbagai macam dengan menyebutkan kata (كل). Sebagian jenis



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

tumbuhan juga dijelaskan oleh Allah SWT yaitu tumbuhan menjalar dan tumbuhan yang berbuah. Allah SWT mengakhiri ayat ini dengan perintah untuk memerhatikan proses kematangan dari buah tersebut. Demikian dijelaskan oleh (Quthb, 2002) dalam kitab Tafsir Fi Zhilalil Quran bahwa Allah tidak memerintahkan "makanlah ketika sudah berbuah!" karena konteks yang dibicarakan di sini adalah untuk mentadabburi tanda-tanda kekuasaan Allah dan keagungan ciptaan-Nya dalam lingkup kehidupan. Manusia sebagai makhluk yang diberi kelebihan berupa akal sudah seharusnya memikirkan tentang keagungan ciptaan Allah SWT.

Tumbuhan yang memiliki nilai manfaat tidak hanya berasal dari tumbuhan tingkat tinggi, tumbuhan tingkat rendah juga memiliki nilai guna yang bisa dimanfaatkan dalam berbagai bidang. Mikroalga merupakan organisme fotosintetik yang hidup di perairan laut maupun tawar yang bertindak sebagai produsen alami ekosistem perairan yang mampu menghasikan energi. Mikroalga mampu memproduksi berbagai jenis bahan pakan alami yang dapat diperbaharui (Chisti, 2007). Terdapat beberapa jenis mikroalga, salah satu jenis yang dikenal adalah dari kelompok *Chlorophyta*.

*Chlorella* sp. merupakan mikroalga dari kelompok *Chlorophyta* yang dewasa ini sering dikaji manfaatnya. *Chlorella* sp. merupakan alga hijau bersel tunggal yang bersifat non motil yang berperan sebagai produsen primer pada rantai makanan akuatik. *Chlorella* sp. memiliki klorofil dan pigmen lain sehingga organisme tersebut dapat melakukan fotosintesis (Pelezar & Chan, 1988). Penelitian tentang *Chlorella* sp. telah banyak dilakukan terutama dalam bidang kesehatan dan ekstraksi senyawa aktif yang dikandungnya. Bariyyah, Fasya,

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Abidin, & Hanapi (2013) mengekstrak senyawa aktif dari *Chlorella* sp. dan hasil identifikasi golongan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak kasar *Chlorella* sp. dalam ekstrak metanol mengandung steroid, tanin, dan asam askorbat. Hidayah (2015) mengekstrak senyawa aktif dalam ekstrak *Chlorella* sp. menunjukkan bahwa dalam fraksi petroleum eter terkandung senyawa steroid dan senyawa yang diduga triterpenoid.

Pemisahan steroid dan triterpenoid dapat dilakukan menggunakan metode ekstraksi maserasi. Keuntungan utama metode ekstraksi maserasi yaitu tidak menggunakan pemanasan sehingga senyawa yang akan diekstrak tidak terurai atau rusak (Heinrich, Barnes, Gibbons, & Williamson, 2004). Bariyyah *et al*., (2013) mengekstrak *Chlorella* sp. dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan variasi pelarut, yaitu metanol (polar) dan etil asetat (semi polar). Hasil penelitian menunjukkan bahwa randemen ekstrak metanol sebesar 7,001% lebih besar dibandingkan randemen ekstrak etil asetat sebesar 3,673%. Golongan alkohol cocok digunakan sebagai pelarut untuk pemisahan senyawa organik bahan alam karena dapat melarutkan senyawa metabolit sekunder (Lenny, 2006b). Metanol dipilih karena memiliki titik didih yang relatif rendah (64,7$^{o}$C) sehingga mudah diuapkan pada suhu rendah.

Pemisahan yang lebih spesifik dilakukan dengan cara hidrolisis dan partisi. Hidrolisis dilakukan untuk memutus ikatan glikosida antara senyawa steroid dan triterpenoid dengan gugus gula yang ada di alam. Partisi dilakukan mengunakan pelarut nonpolar sesuai dengan target senyawa steroid dan triterpenoid yang bersifat cenderung nonpolar. Pelarut yang dapat mengekstrak steroid dan triterpenoid adalah petroleum eter. Hidayah (2015) dan Handoko (2016)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

menggunakan pelarut petroleum eter dalam mengekstrak senyawa steroid pada mikroalaga *Chlorella* sp. Randemen partisi dari ekstrak pekat metanol yang didapatkan masing-masing sebesar 78,05 dan 50,62%. Setiyawan (2015) mengunakan pelarut petroleum eter dalam mengekstrak senyawa triterpenoid pada alga merah *Euchema spinosum* dan mendapatkan randemen partisi sebesar 4,90%. Imamah (2015) dan Susetyo (2015) menggunakan pelarut etil asetat dalam mengekstrak senyawa steroid pada mikroalga *Chlorella* sp. dan alga merah *Euchema spinosum* mendapatkan randemen partisi dari ekstrak pekat metanol berturut-turut sebesar 49,32 dan 4,78%. Pelarut petroleum eter dipilih pada penelitian ini karena mampu mengekstrak steroid dan triterpenoid dengan nilai randemen yang besar dibanding pelarut etil asetat.

Senyawa steroid dan triterpenoid diisolasi lebih lanjut menggunakan metode kromatografi kolom. Safitri (2016) mengisolasi steroid dari mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan perbandingan metode pembuatan fasa diam cara kering dan basah. Hasil kromatografi kolom pembuatan fasa diam cara basah lebih banyak menghasilkan fraksi murni senyawa steroid dan triterpenoid dibanding kromatografi kolom pembuatan fasa diam cara kering. Eluen yang digunakan untuk mengisolasi senyawa steroid dan triterpenoid merujuk pada penelitian Hidayah (2015) yang menggunakan eluen terbaik campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 4:1. Hidayah (2015) mendapatkan 12 spot pemisahan dengan kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) dengan satu spot merupakan senyawa steroid sedangkan tiga spot diduga sebagai senyawa triterpenoid.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Pemilihan perbandingan komposisi fasa diam dan sampel juga mempengaruhi keoptimalan pemisahan dengan kromatografi kolom basah. Handoko (2016) menggunakan perbandingan sampel dan fasa diam silika gel yaitu 1:200 dalam mengisolasi steroid pada *Chlorella* sp. mendapatkan 1 fraksi murni senyawa steroid dan 4 fraksi senyawa triterpenoid. Sholikah (2016) menggunakan perbandingan sampel dan silika gel yaitu 1:100 dalam mengisolasi steroid pada alga merah (*Eucheuma spinosum*) metode kromatografi kolom basah. Hasil penelitian Sholikah (2016) didapatkan 5 fraksi steroid dan 2 fraksi triterpenoid.

Penelitian ini menggunakan variasi rasio sampel terhadap silika gel yaitu 1:200, 1:150, dan 1:100 untuk mengetahui hasil pemisahan terbaik dari rasio tersebut pada pemisahan senyawa steroid dan triterpenoid *Chlorella* sp. Rasio terbaik ditunjukkan dari ketepatan pemisahan yang mampu memisahkan senyawa murni dengan hasil spot tungal. Fraksi hasil kromatografi kolom basah dimonitoring dengan KLTA. Identifikasi menggunakan instrumen *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-APCI-MS), Spektrofotometer UV-Vis, dan Spetrofotometer Infrared (FT-IR).

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pola pemisahan steroid dan triterpenoid fraksi petroleum eter dari mikroalga *Chlorella* sp. dengan metode kromatografi kolom basah dengan variasi sampel terhadap silika gel 1:200. 1:150, dan 1:100?

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

2. Apa jenis steroid dan triterpenoid yang terdapat dalam isolat *Chlorella* sp. fraksi petroleum eter berdasarkan identifikasi dengan LC-APCI-MS?
3. Bagaimana hasil identifikasi senyawa steroid dan triterpenoid dengan Spetrofotometer UV-Vis dan FT-IR hasil dari pemisahan terbaik?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui pola pemisahan steroid dan triterpenoid fraksi petroleum eter dari mikroalga *Chlorella* sp. dengan metode kromatografi kolom basah dengan variasi sampel terhadap silika gel 1:200. 1:150, dan 1:100.
2. Untuk mengetahui jenis steroid dan triterpenoid yang terdapat dalam isolat *Chlorella* sp. fraksi petroleum eter berdasarkan identifikasi dengan LC-APCI-MS.
3. Untuk mengidentifikasi senyawa steroid dan triterpenoid dengan Spetrofotometer UV-Vis dan FT-IR dari hasil pemisahan terbaik.

### 1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Isolat mikroalga *Chlorella* sp. yang digunakan berasal dari budidaya di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Kultivasi *Chlorella* sp. dilakukan dalam medium ekstrak tauge (MET) 4%.
3. Ekstraksi steroid dan triterpenoid dari *Chlorella* sp. dilakukan dengan ekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

4. Partisi *Chlorella* sp. menggunakan pelarut petroleum eter (PE).
5. Pengisian kolom menggunakan cara basah dengan ukuran kolom 1,5 cm dan eluen yang digunakan adalah n-heksana:etil asetat yaitu 4:1.
6. Variasi sampel terhadap silika gel (fase diam) yang digunakan adalah 1:200, 1:150, dan 1:00.
7. Identifikasi senyawa steroid dan triterpenoid menggunakan instrumen Spetrofotometer UV-Vis, FT-IR dan LC-APCI-MS.

## 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini antara lain:

1. Memberikan informasi tentang perbandingan terbaik sampel terhadap fase diam (silika gel) yang dapat digunakan untuk mengisolasi senyawa steroid dan triterpenoid dari mikroalga *Chlorella* sp. dengan kromatografi kolom basah.
2. Memberikan informasi tentang jenis senyawa steroid dan triterpenoid yang terdapat dalam fraksi petroleum eter dan fraksi tunggal hasil pemisahan dengan kromatografi kolom basah.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# BAB II

# TINJAUAN PUSTAKA

## 2.1 Mikroalga *Chlorella* sp.

Allah SWT menciptakan berbagai jenis makhluk di bumi dengan setiap karakteristiknya. Seluruh ciptaan Allah SWT membentuk suatu sistem yang teratur di muka bumi dengan seimbang. Tidak ada satupun dari makhluk ciptaan Allah SWT yang tidak memiliki nilai manfaat. Mereka secara tidak langsung diciptakan agar manusia berfikir serta mempelajari *sunnatullah* dalam rangka mendekatkan diri pada Sang Khaliq. Berulang kali Allah SWT memerintahkan kepada manusia untuk melihat, berfikir, mempelajari, dan mengambil hikmah dari setiap ciptaan Allah SWT yang ada di bumi maupun di langit. Tumbuhan sebagai salah satu makhluk Allah SWT juga memiliki berbagai nilai guna dan manfaat jika manusia berkeinginan mempelajarinya. Allah SWT berfirman dalam Q.S. asy-Syu'ara ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا۟ إِلَى ٱلْأَرْضِ كَمْ أَنۢبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ۝٧

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

Kata زَوْج memiliki arti "macam, jenis", dalam hal ini diartikan sebagai macam atau jenis tumbuhan, sedangkan كَرِيْم memiliki arti "yang mulia, terpuji, banyak manfaatnya". Gabungan dari زَوْجٍ كَرِيْمٍ ditafsiri sebagai berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang banyak manfaatnya (Al-Maraghiy, 1989a). Tumbuhan yang terdiri dari berbagai jenis tersebut ditumbuhkan oleh Allah SWT di bumi.



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Setiap tumbuhan memiliki bentuk, warna, dan manfaat yang beragam yang membuktikan kekuasaan Allah SWT (Al-Maraghiy, 1989a). Allah SWT juga menyebut kalimat زَوْجٍ كَرِيْمٍ dalam Surat Luqman ayat 10:

خَلَقَ ٱلسَّمَٰوَٰتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۖ وَأَلْقَىٰ فِى ٱلْأَرْضِ رَوَٰسِىَ أَن تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِن كُلِّ دَآبَّةٍ ۚ
وَأَنزَلْنَا مِنَ ٱلسَّمَآءِ مَآءً فَأَنۢبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿١٠﴾

"*Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang. Dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik.*"

Q.S. Luqman ayat 10 tersebut menerangkan tanda-tanda kekuasaan Allah SWT mulai dari langit yang tidak bertiang hingga kekuasaan Allah SWT yang ada di bumi berupa berbagai jenis tumbuhan yang memiliki manfaat. Adanya pengulangan kalimat ini menunjukkan bahwa Allah SWT telah memberi isyarat dengan jelas tentang tanda-tanda kekuasaanNya dan memerintahkan kepada manusia untuk melihat dan memikirkan tentang tanda-tanda tersebut. Satu pokok bahasan yang lebih khusus yaitu tanda-tanda kekuasaanNya berupa berbagai macam tumbuhan yang memiliki manfaat. Salah satu tumbuhan yang memiliki manfaat besar bagi manusia adalah tumbuhan tingkat rendah mikroalga *Chlorella* sp.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Allah SWT berfirman dalam Q.S. al-An'am ayat 99:

وَهُوَ ٱلَّذِىٓ أَنزَلَ مِنَ ٱلسَّمَآءِ مَآءً فَأَخۡرَجۡنَا بِهِۦ نَبَاتَ كُلِّ شَىۡءٍ فَأَخۡرَجۡنَا مِنۡهُ خَضِرًا نُّخۡرِجُ مِنۡهُ
حَبًّا مُّتَرَاكِبًا وَمِنَ ٱلنَّخۡلِ مِن طَلۡعِهَا قِنۡوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّٰتٍ مِّنۡ أَعۡنَابٍ وَٱلزَّيۡتُونَ وَٱلرُّمَّانَ
مُشۡتَبِهًا وَغَيۡرَ مُتَشَٰبِهٍۗ ٱنظُرُوٓاْ إِلَىٰ ثَمَرِهِۦٓ إِذَآ أَثۡمَرَ وَيَنۡعِهِۦٓۚ إِنَّ فِى ذَٰلِكُمۡ لَأٓيَٰتٍ لِّقَوۡمٍ يُؤۡمِنُونَ

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

Q.S. al-An'am ayat 99 tersebut lebih rinci menerangkan tentang macam-macam tumbuhan yang diciptakan Allah SWT. Dalam ayat tersebut Allah SWT menyebut kata أَخْرَجْنَا yang artinya "kami keluarkan". Kata أَخْرَجَ berasal dari kata إِخْرَاجْ seolah mengandung pengertian bahwa Allah mengeluarkan semua bahan pembentuk makhluk hidup dari dalam tanah (Faqih, 2006). *Chlorella* sp. yang merupakan tumbuhan dengan habitatnya di air, Wirosaputro (1998) menjelaskan bahwa telah terjadi perubahan di bumi pada abad ke-15 hingga abad ke-20. Menurut Wirosaputro (1998), sekitar abad ke-20, jumlah unsur hara mineral yang ada di bumi mengalami penurunan sekitar 45,5% dari jumlah awalnya (terhitung sejak abad ke-15). Hilangnya unsur mineral tersebut terjadi karena proses alami, seperti terbawa oleh banjir, gletser, angin dan peristiwa alam lainnya. Unsur hara mineral tersebut bergerak menuju perairan (danau, rawa dan laut). Sebagian besar unsur hara mineral menumpuk dalam laut. Dengan kondisi alam tersebut,

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

*Chlorella* sp. yang merupakan komoditas pangan yang hidup di perairan memiliki kandungan gizi yang lebih lengkap dan memiliki nilai guna yang lebih besar. Allah SWT juga menyebutkan kata خَضِرًا dalam Q.S. al-An'am:99 yang memiliki arti "hijau pekat" (Al-Maraghiy, 1989c). *Chlorella* sp. merupakan tumbuhan yang memiliki warna hijau pekat karena 2,8% dari kandungan gizi umum di dalamnya merupakan klorofil (Wirosaputro, 1998)

*Chlorella* sp. merupakan mikroalga yang berasal dari kelompok *Chlorophyta* atau alga hijau. *Chlorella* sp. mengandung klorofil sehingga dapat melakukan proses fotosintesis. *Chlorella* sp. termasuk tumbuhan air bersel satu, hidup menyendiri atau berkelompok, serta berperan sebagai produsen primer pada rantai makanan akuatik. *Chlorella* sp. termasuk tumbuhan tingkat rendah yaitu tidak mempunyai akar, batang dan daun (Amaliah, 2013);(Pelezar & Chan, 1988);(Chalid, Amini, & Lestari, 2010);(Wirosaputro, 2002). Menurut Bold & Wyne (1988) klasifikasi *Chlorella* sp. adalah:

| | |
|---|---|
| Divisi | : Chlorophyta |
| Kelas | : Chlorophyceae |
| Ordo | : Chlorococcales |
| Famili | : Oocystaceae |
| Genus | : Chlorella |
| Spesies | : *Chlorella* sp. |

Habitat *Chlorella* sp. adalah air tawar, air payau, dan air asin, tetapi mayoritas hidup di air tawar. Organisme tersebut dapat juga tumbuh pada tanah yang basah, batuan yang basah, dan pada ranting tumbuhan hidup. Beberapa spesies *Chlorella* sp. hidup bersimbiosis dengan protozoa, hidra, sponge, atau mikroorganisme yang lain.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## 2.2 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga *Chlorella* sp.

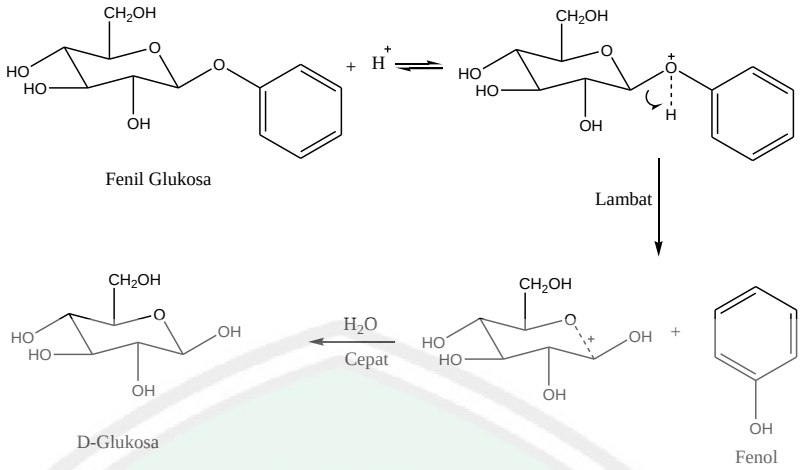
### 2.2.1 Ekstraksi Maserasi

Ektrasksi maserasi digunakan dalam penelitian ini untuk mengekstrak senyawa steroid dan triterpenoid dari mikroalga *Chlorella* sp. Prinsip maserasi yaitu proses difusi pelarut ke dalam dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel sehingga larutan yang terpekat akan terdesak ke luar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar dan di dalam sel. Proses penyaringan dengan maserasi perlu dilakukan pengadukan untuk meratakan konsentrasi di luar serbuk. Pengadukan tersebut berdampak pada tetap terjaganya derajat perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan di dalam sel dengan larutan di luar sel (Lenny, 2006b).

### 2.2.2 Hidrolisis dan Partisi

Reaksi hidrolisis dilakukan untuk memutus ikatan glikosida pada senyawa organik yang berada pada bentuk glikosidanya. Hidrolisis merupakan merupakan reaksi antara senyawa dan air dengan membentuk reaksi kesetimbangan. Air ikut bereaksi sekaligus sebagai medium reaksi, sedangkan senyawanya dapat berupa senyawa anorganik maupun senyawa organik (Mulyono, 2006). Reaksi hidrolisis membutuhkan katalisator karena reaksi dengan air berlangsung sangat lambat (Nihlati, Rohman, & Hertiani, 2008). Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis menurut Lawoko, Deshpande, & Heiningen (2009) ditunjukkan pada (Gambar 2.1).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG




**Gambar 2.1** Dugaan Mekanisme Hidrolisis dari phenyl-β-D-glucopyranoside (Lawoko, 2009)

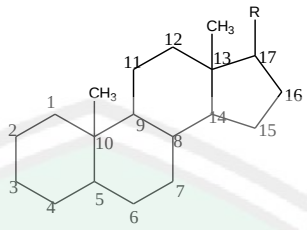
Proses partisi didasarkan pada prinsip ekstraksi cair-cair. Ekstraksi cair-cair merupakan teknik pemisahan zat-zat terlarut antara dua cairan yang tidak dapat bercampur (Septiandari, 2016). Proses partisi pada penelitian ini menggunakan fraksi petroleum eter. Pemilihan fraksi petroleum eter didasarkan pada penelitian Hidayah (2015) dan Handoko (2016) yang mengekstrak senyawa steroid pada mikroalga *Chlorella* sp. Randemen partisi dari ekstrak pekat metanol yang didapatkan masing-masing sebesar 78,05 dan 50,62%. Setiyawan (2015) mengunakan pelarut petroleum eter dalam mengekstrak senyawa triterpenoid pada alga merah *Euchema spinosum* dan mendapatkan randemen partisi sebesar 4,90%.

## 2.3 Senyawa Steroid

Steroid merupakan golongan senyawa terpenoid yang berasal dari jalur mevalonat (Saifuddin, 2012) (Gambar 2.2). Steroid tersusun dari isopren-isopren dari rantai panjang hidrokarbon yang menyebabkan sifatnya non-polar. Steroid terdiri dari tiga sikloheksana dan satu pentaheksana. Beberapa senyawa steroid

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

mengandung gugus –OH yang sering disebut dengan sterol, sehingga sifatnya cenderung lebih polar (Robinson, 1995).

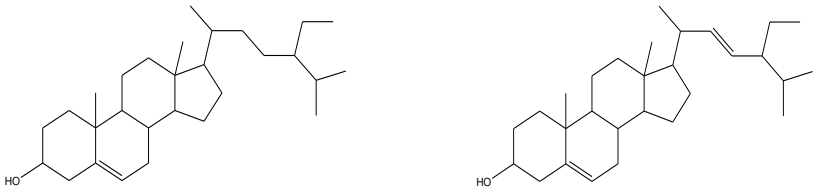



**Gambar 2.2** Struktur dasar golongan senyawa steroid

Senyawa steroid pada umumnya memiliki kelompok metil pada karbon C-10 dan C-13 dan rantai samping alkil pada karbon C-17 (Gambar 2.2). Ditinjau dari segi struktur molekul, perbedaan antara berbagai kelompok steroid ditentukan oleh jenis subtituen $R_1$, $R_2$, dan $R_3$ yang terikat pada kerangka dasar karbon (Lenny, 2006). Senyawa steroid dapat diuji dengan metode Lieberman-Burchard yaitu menggunakan asam asetat anhidrat dan asam sulfat. Hasil positif pada steroid ditunjukkan dengan berubahnya larutan menjadi warna biru hingga hijau (Robinson, 1995).

Suryati (2011) telah mengisolasi steroid dari daun tumbuhan tabat barito (*Ficus deltoideus* Jack). Hasil elusidasi struktur berdasarkan IR, H-NMR, C-NMR 1 D dan 2 D, dan MS menunjukkan adanya senyawa steroid β-sitosterol yang strukturnya ditunjukkan oleh Gambar 2.3 (a). Etika & Suryelita (2014) mengisolasi steroid dari daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). Hasil elusidasi struktur berdasarkan H-NMR dan C-NMR menunjukkan adanya senyawa steroid stigmasterol yang strukturnya ditunjukkan pada Gambar 2.3 (b).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

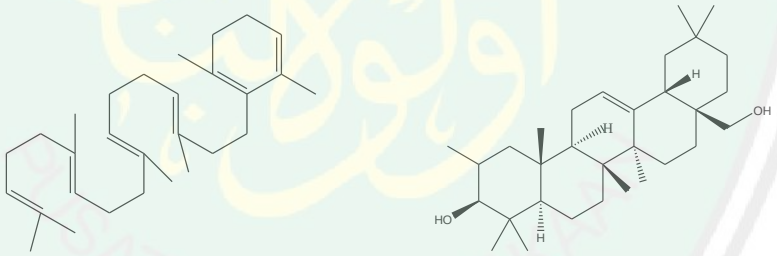


(a) (b)

**Gambar 2.3** Struktur steroid (a) β-sitosterol; (b) stigmasterol

## 2.4 Senyawa Triterpenoid

Triterpenoid adalah senyawa yang tersusun dari 6 satuan kerangka isopren (C5) dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon $C_{30}$ asiklik yaitu skualena (Saifuddin, 2012) (Gambar 2.4 (a)). Contoh senyawa triterpenoid siklik yaitu eritrodiol (Gambar 2.4 (b)). Pereaksi yang umumnya digunakan untuk mendeteksi triterpenoid adalah Lieberman-Burchard yang menghasilkan warna violet (Harborne, 1987).

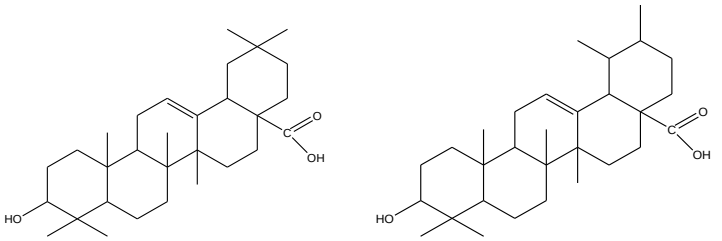


(a) (b)

**Gambar 2.4** (a) Skualena (struktur dasar triterpenoid);(b) eritrodiol (triterpenoid siklik)

Ibrahim, El-Gengaihi, & Motawe (2011) mengisolasi senyawa triterpenoid dari kulit *Salvadora persica* dari fraksi petroleum eter. Elusidasi struktur menunjukkan terdapat dua jenis senyawa triterpenoid. Senyawa triterpenoid yang dimaksud yaitu asam oleanolic dan asam ursolat (Gambar 2.5).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG




(a) (b)

**Gambar 2.5** (a) Asam oleanolic; (b) Asam ursolat

## 2.5 Pemisahan Senyawa Steroid dan Triterpenoid Menggunakan Kromatografi Kolom Basah

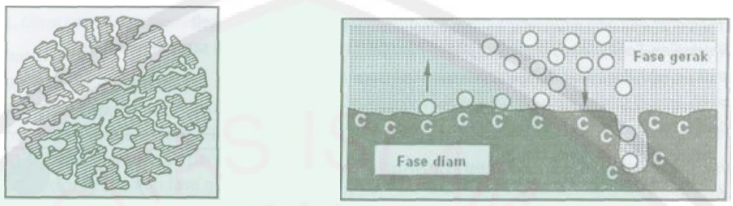
Kromatografi kolom dengan pembuatan fasa diam cara basah dilakukan dengan cara mencampur silika gel yang telah diaktivasi dengan eluen yang akan digunakan hingga menjadi campuran homogen dan tidak terbentuk gelembung udara. Bubur silika yang terbentuk dimasukkan ke dalam kolom dan dimampatkan dengan mengetok hingga didapatkan fasa diam yang rapat. Fasa diam dijaga agar selalu terendam eluen (tidak kering) agar tidak terjadi retakan (Kusmiyati, Aznam, & Handayani, 2011).

Silika gel merupakan fase diam yang sering digunakan dalam proses kromatografi karena luas permukaannya yang besar dikarenakan ukuran partikel yang kecil. Penelitian ini menggunakan fase diam silika gel G-60 (0,063 – 0,200 mm). Permukaan silika gel tersebut mengandung gugus silanol yang mengandung hidroksil. Hidroksil tersebut merupakan pusat aktif dan mampu membentuk ikatan hidrogen yang kuat dengan senyawa polar yang terkandung pada sampel yang akan dipisahkan (Noviyanti, 2010).

Sampel yang melewati kolom akan berinteraksi dengan fase diam dan fase gerak. Fase diam memiliki struktur berpori (Gambar 2.6). Sampel yang melewati

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

permukaan fase diam akan teradsorbsi sehingga tertahan untuk sementara waktu. Sebagian ada yang teradsorbsi dalam pori-pori tersebut sehingga tertahan lebih lama dari yang lainnya. Perpindahan massa tersebut membutuhkan waktu sehingga mempengaruhi pemisahan senyawa dalam kolom (Rohman, 2009).




(a) (b)

**Gambar 2.6** (a) Struktur pori molekul fase diam (b) Perpindahan massa antara fase diam dan fase gerak. Fase diam mempunyai pusat adsorpsi C yang akan menarik molekul-molekul di sekitarnya (Rohman, 2009)

## 2.6 Identifikasi Steroid dan Triterpenoid Menggunakan Instrumen Spektrofotometer UV-Vis, FT-IR, dan LC-APCI-MS

### 2.6.1 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis merupakan instrumen yang memiliki kegunaan utama untuk mengidentifikasi jumlah ikatan rangkap/konjugasi aromatik. Penyerapan sinar UV-Vis oleh suatu molekul akan menyebabkan transisi di antara tingkat energi elektronik dari molekul. Transisi tersebut dapat terjadi antar orbital ikatan atau orbital anti ikatan. Panjang gelombang sinar yang diserap sebanding dengan perbedaan tingkat energi orbital ($\Delta E$). Terdapat 4 tipe transisi elektronik pada molekul, yaitu (Panji, 2012): $\sigma \rightarrow \sigma^*$ (alkana), $\pi \rightarrow \pi^*$ (alkena, senyawa karbonil, alkuna), n $\rightarrow \sigma^*$ (oksigen, nitrogen, sulfur, halogen), dan n $\rightarrow \pi^*$ (senyawa karbonil)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Etika & Suryelita (2014) mengekstrak steroid dari daun mengkudu (*Morinda citrifolia L.*). Identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan panjang gelombang maksimum senyawa steroid tersebut 203 nm. Hasil tersebut menunjukkan adanya transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ dari ikatan rangkap tak terkonjugasi. Fasya (2016) mengekstrak steroid dari mikroalga *Chlorella* sp. Identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan panjang gelombang senyawa steroid yaitu 204 nm pada fraksi etil asetat dan 276 nm pada fraksi petroleum eter. Mulyani, Arifin, & Nurdin (2013) mengekstrak triterpenoid dari daun srikaya (*Annona squamosa* L). Identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan panjang gelombang triterpenoid yaitu 205,6 nm yang menunjukkan adanya transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$.

### 2.6.2 Spektrofotometer Inframerah (FTIR)

FTIR merupakan suatu instrumen yang digunakan untuk mendeteksi gugus fungsi suatu senyawa dengan tingkat energi yang digunakan berada dalam rentang inframerah. Energi yang dimanfaatkan yaitu berupa energi vibrasi molekul yang berupa vibrasi *stretching* (ulur) dan *bending* (tekuk). Adsorpsi energi pada daerah inframerah akan menyebabkan perubahan pada vibrasi molekul. Ketika suatu senyawa berinteraksi dengan radiasi IR, maka akan terjadi vibrasi ikatan-ikatan kovalen pada senyawa tersebut. Hal ini yang dijadikan dasar untuk mengidentifikasi gugus fungsi pada suatu senyawa. Setiap gugus fungsi mempunyai tipe ikatan yang berbeda sehingga setiap gugus fungsi mempunyai serapan IR yang khas (Hidayah, 2015).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Aisya, Purba, & Sitorus (2012) mengisolasi steroid dari kulit batang tumbuhan andong (*Cordyline fructicosa* [L] A, Cheval). Mukharromah & Suyatno (2014) mengisolasi senyawa steroid dari kulit batang bakau merah (*Rhizophora stylosa*). Identifikasi senyawa steroid dilakukan menggunakan FTIR. Interpretasi serapan gugus fungsi yang muncul pada spektra IR perbandingan dari hasil kedua penelitian tersebut ditunjukkan pada Tabel 2.1.

**Tabel 2.1** Serapan yang muncul saat identifikasi steroid dengan FTIR, perbandingan antara penelitian Aisya *et al*. (2012) dan Mukharromah & Suyatno (2014)

| Jenis vibrasi | Bilangan gelombang ($cm^{-1}$) | |
|---|---|---|
| | Aisya, Purba, & Sitorus (2012) | Mukharromah & Suyatno (2014) |
| CH $sp^3$ | 2926,19 | 2943,57 |
| O-H | 3456,33 | 3432,45 |
| Ulur C-O | 1201,32 | 1113,49 dan 1045,70 |
| Alkohol sekunder (-CH–OH) | 1273,35 | 1244,35 |
| Alkena (=C-H) | 3056,42 | - |
| Tekukan =C-H | 977,32 | 960,32 |
| Tekuk C-H alkil | 1463,11 dan 1356,76 | 1457 dan 1374,42 |

Ismarti (2011) mengisolasi senyawa triterpenoid dari kulit batang meranti merah (*Shorea singkawang* (Miq).Miq). Suryani (2011) mengisolasi senyawa triterpenoid dari ekstrak kulit batang tumbuhan kecapi (*Sandoricum koetjape* Merr). Identifikasi senyawa triterpenoid dilakukan menggunakan FTIR. Interpretasi serapan gugus fungsi yang muncul pada spektra IR perbandingan antara Ismarti (2011) dan Suryani (2011) ditunjukkan pada Tabel 2.2.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

**Tabel 2.2** Serapan yang muncul saat identifikasi triterpenoid dengan FTIR, perbandingan antara penelitian Ismarti (2011) dan Suryani (2011)

| Jenis vibrasi | Bilangan gelombang ($cm^{-1}$) | |
|---|---|---|
| | Ismarti (2011) | Suryani (2011) |
| OH | 3426 | 3453 |
| C-H ulur/alifatik | 2928 | 2930 |
| C=C, aromatik | 1633 | - |
| $C(CH_3)_2$, geminal dimetil | 1374 | 1384 |
| C=O, karbonil (ester) | 1730 | - |
| C=O, karbonil (asam karboksilat) | - | 1691 |
| C-H, lentur | 1456 | - |
| C-O, ester | 1263,15 | - |
| C-O | 1066, 1025 | - |
| $CH_2$ | - | 1454 |
| C=C-H, aromatik | 709, 620 | - |

### 2.6.3 LC-APCI-MS

Dua komponen dalam instrumen LC-MS yang merupakan kunci dalam proses operasi adalah sumber ion, yang menghasilkan ion, dan pengurai massa (*mass analyzer*) yang memisahkan ion. Komponen tersebut mempunyai berbagai jenis yang akan disesuaikan dengan kepolaran senyawa serta kekurangan dan kelebihan masing-masing. LC-APCI-MS merupakan jenis LC-MS yang sumber ionnya menggunakan teknik ionisasi kimia pada tekanan atmosfer (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*). Teknik APCI biasanya digunakan untuk menganalisis senyawa nonpolar (Hewlett, 2001).

Suttiarporn *et al*. (2015) menganalisis kandungan steroid dan triterpenoid pada ekstrak kulit beras hitam menggunakan LC- APCI-MS mode positif. Hasil penelitian menunjukkan terdapat 7 jenis senyawa steroid dan 4 jenis senyawa

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

triterpenoid dalam ekstrak tersebut. Data spektra massa senyawa steroid dan triterpenoid tersebut ditunjukkan pada Tabel 2.3.

**Tabel 2.3** Data spektra LC-APCI-MS senyawa triterpenoid yang terdapat pada ekstrak kulit beras hitam

| Senyawa | Rumus Molekul | Berat molekul | Ion fragmen terbesar (*m/z*) |
|---|---|---|---|
| **Steroid** | | | |
| 24-Methylene-ergosta-5-en-3β-ol | $C_{28}H_{46}O$ | 398 | 381 $[M-H_2O+H]^+$ |
| 24-Methylene-ergosta-7-en-3β-ol | $C_{28}H_{46}O$ | 398 | 381 $[M-H_2O+H]^+$, 399 $[M+H]^+$ |
| Fukosterol | $C_{29}H_{48}O$ | 412 | 395 $[M-H_2O+H]^+$ |
| Gramisterol | $C_{29}H_{48}O$ | 412 | 395 $[M-H_2O+H]^+$ |
| Campesterol | $C_{28}H_{48}O$ | 400 | 383 $[M-H_2O+H]^+$ |
| Stigmasterol | $C_{29}H_{48}O$ | 412 | 395 $[M-H_2O+H]^+$ |
| B-Sitosterol | $C_{29}H_{50}O$ | 414 | 397 $[M-H_2O+H]^+$ |
| **Triterpenoid** | | | |
| Sikloeucalenol | $C_{30}H_{50}O$ | 426 | 409 $[M-H_2O+H]^+$, 427 $[M+H]^+$ |
| Lupenon | $C_{30}H_{48}O$ | 424 | Tidak dapat ditentukan (produk minor) |
| Lupeol | $C_{30}H_{50}O$ | 426 | Tidak dapat ditentukan (produk minor) |
| 24-metilensikloartanol | $C_{301}H_{52}O$ | 440 | 423 $[M-H_2O+H]^+$, 441 $[M+H]^+$ |

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# BAB III

# METODE PENELITIAN

## 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Organik Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Desember 2016 – Mei 2017.

## 3.2 Alat dan Bahan

### 3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat gelas seperti gelas kimia, gelas ukur, Erlenmeyer, botol vial. Proses pemanenan sampel menggunakan *sentrifuge* dan neraca analitik. Peralatan lainnya yaitu oven, cawan porselen, desikator, *shaker*, corong *Buchner*, *rotary evaporator*, *hot plate*, aluminium foil, plat KLT, dan kolom. Identifikasi senyawa menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (*Merk* Varian Cary 50), FT-IR (*Merk* Varian 1000 FT-IR Scimitar Series) dan LC-APCI-MS (*Merk* ACCELA *type* 1250).

### 3.2.2 Bahan

Isolat mikroalga *Chlorella* sp. merupakan bahan utama sebagai sampel penelitian. Bahan untuk reagen Lieberman-Burchard yaitu kloroform, $H_2SO_4$ 97%, asam asetat anhidrat. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah tauge kacang hijau, akuades, metanol *p.a*, HCl 2 N, petroleum eter p.a, n-heksana *p.a*, etil asetat *p.a*, dan natrium bikarbonat.



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## 3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan-tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini sebagai berikut:

1. Kultivasi mikroalga *Chlorella* sp.
2. Pemanenan biomassa *Chlorella* sp.
3. Analisis kadar air sampel kering
4. Ekstraksi maserasi biomassa *Chlorella* sp. dengan pelarut metanol
5. Hidrolisis ekstrak pekat metanol *Chlorella* sp. dan partisi menggunakan pelarut petroleum eter
6. Identifikasi fraksi PE dengan LC-APCI-MS
7. Pemisahan steroid dan triterpenoid *Chlorella* sp. dengan metode kromatografi kolom basah
8. Monitoring hasil kromatografi kolom basah dengan KLT analitik
9. Identifikasi senyawa steroid dan triterpenoid dari fraksi dengan spot tunggal menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR
10. Analisa data

## 3.4 Cara Kerja

### 3.4.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella* sp. (Prihantini, Putri, & Yuniati, 2005;Hidayah, 2015)

Sebanyak 100 gram tauge direbus dalam 500 mL akuades mendidih selama ±1 jam (hingga warna tauge menjadi pucat). Sebanyak 36 mL ekstrak tauge tersebut dilarutkan ke dalam 864 mL akuades dalam Erlenmeyer 1000 mL sehingga diperoleh MET 4% (v/v) dengan volum total 900 mL. Sebanyak 150 mL isolat *Chlorella* sp. diinokulasi ke dalam masing-masing 900 mL MET 4% dalam

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Erlenmeyer 1000 mL. Isolat *Chlorella* sp. ditempatkan pada rak yang telah dilengkapi dengan pencahayaan menggunakan lampu TL.36 watt (intensitas cahaya 1000 – 4000 lux) dan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap selama 10 hari.

### 3.4.2 Pemanenan Biomassa *Chlorella* sp. (Imamah, 2015)

Pemanenan biomassa *Chlorella* sp. dilakukan pada hari ke-10 yaitu pada fase akhir stasioner. Pemanenan dilakukan dengan pemisahan menggunakan *sentrifuge* dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Biomassa *Chlorella* sp. dipisahkan dari filtratnya kemudian ditimbang. Hasil penimbangan dicatat sebagai berat basah. Biomassa kemudian dikeringkan pada suhu kamar lalu ditimbang. Hasil penimbangan dicatat sebagai berat kering.

### 3.4.3 Penentuan Kadar Air Mikroalga *Chlorella* sp. (AOAC, 1984)

Cawan yang akan digunakan dipanaskan terlebih dulu dalam oven pada suhu 100–105 $^{o}$C selama 15 menit lalu disimpan dalam desikator selama 10 menit. Cawan ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama hingga diperoleh berat cawan yang konstan. Biomassa *Chlorella* sp. ditimbang 0,5 gram (sampel kering) dimasukkan dalam cawan yang telah diketahui berat konstannya, kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 100–105$^{o}$C selama 30 menit. Selanjutnya didinginkan dalam desikator, ditimbang, dan dioven kembali selama 30 menit. Perlakuan tersebut diulangi hingga diperoleh berat konstan. Kadar air sampel biomassa *Chlorella* sp. dihitung menggunakan Persamaan 3.1 (AOAC, 1984) :

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

dengan a yaitu berat cawan kosong, b yaitu berat cawan + sampel sebelum dikeringkan, dan c yaitu berat cawan + sampel setelah dikeringkan.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

### 3.4.4 Ekstraksi Maserasi Biomassa *Chlorella* sp. (Bariyyah *et al*., 2013)

Biomassa *Chlorella* sp. dimaserasi dalam gelas kimia 500 mL dengan pelarut metanol dengan perbandingan sampel dan pelarut 1:10 (b/v) (15 gram:150 mL) selama ±24 jam. Permukaan gelas kimia ditutup dengan aluminium foil. Maserasi dilakukan dengan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama ±24 jam dalam suhu ruang. Filtrat dan residu kemudian dipisahkan dengan cara penyaringan menggunakan corong *Buchner*. Residu yang didapat dimaserasi kembali dengan metanol hingga 5 kali pengulangan. Filtrat yang didapat pada setiap maserasi dikumpulkan menjadi satu kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Kemudian ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang dan dihitung nilai rendemen maserasinya menggunakan Persamaan 3.2 (Khopkar, 2003):

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kasar yang diperoleh}}{\text{berat sampel yang diekstrak}} \times 100\ \% \quad \text{.....} (3.2)$$

### 3.4.5 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. (Bariyyah *et al*., 2013)

Sebanyak 3,5 gram ekstrak pekat metanol dihidrolisis dengan 7 mL HCl 2 N (katalis), diaduk dengan strirer selama 1 jam. Kemudian ditambahkan natrium bikarbonat hingga pH-nya netral. Hasil hidrolisis kemudian dipartisi dengan pelarut petroleum eter sebanyak 15 mL. Lapisan atas yang terbentuk dipartisi lagi hingga 5 kali pengulangan. Kemudian hasil partisi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Rendemen partisi dihitung menggunakan Persamaan 3.2.

### 3.4.6 Uji Fitokimia Senyawa Steroid dan Triterpenoid (Setyowati, Ariani, Mulyani, & Rahmawati, 2014)

Isolat hasil partisi ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dengan pelarutnya hingga 1 mL. Kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Ditambahkan 0,5 mL kloroform, 0,5 mL asam asetat anhidrat dan 2 mL $H_2SO_4$ pekat. Diamati perubahan yang terjadi. Jika warna larutan menjadi hijau kebiruan maka isolat positif mengandung steroid. Jika terbentuk cincin maka isolat positif mengandung triterpenoid.

### 3.4.7 Identifikasi Isolat *Chlorella* sp. Fraksi Petroleum Eter dengan LC-APCI- MS

Fraksi petroleum eter diidentifikasi dengan LC-APCI-MS dengan spesifikasi dan kondisi alat sebagai berikut.

**Kondisi LC**

| | |
|---|---|
| Spesifikasi | : HPLC *merk* ACCELA *type* 1250, buatan *Thermo Scientific* yang terdiri dari *degasser vacuum*, pompa *quartener*, *autosampler thermostatik* |
| Kolom | : *hypersil gold* (50 mm x 2,1 mm x 1,9 µm) (30$^o$C) |
| Fase Gerak A | : 0,1% asam format dalam metanol |
| Fase Gerak B | : isopropanol |
| Pengaturan eluen | : Gradien linier 70% (A) : 0% (B) sampai 0% (A) : 30% (B) |
| Laju alir | : 300 µL/menit |
| *Run Time* | : 5 menit |
| Sampel yang diinjeksikan | : 5 µL |

**Spektrometri Massa**

| | |
|---|---|
| Spesifikasi | : menggunakan MS/MS triple Q (Quadrupole) Merk TSQ QUANTUM ACCES MAX dari *Thermo Finningan* |
| Sumber Ionisasi | : APCI, dikendalikan oleh software TSQ Tune dengan mode positif |

**Kondisi ion APCI**

| | |
|---|---|
| Arus | : 4 µA |
| Suhu penguapan | : 250$^o$C |
| Suhu kapiler | : 300$^o$C |
| *Sheat gas pressure* | : 45 arbitary unit |
| *Aux gas pressure* | : 15 arbitary unit |

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

### 3.4.8 Pemisahan Senyawa Steroid dan Triterpenoid dari *Chlorella* sp. Dengan Kromatografi Kolom Basah (Kusmiyati *et al*., 2011)

Silika gel (fase diam) ditimbang sebanyak 10 gram (dilakukan 3 kali penimbangan). Fase gerak yang digunakan yaitu n-heksana dan etil asetat (4:1), dibuat sebanyak kurang lebih 400 mL. Aktifasi silika gel dilakukan dalam oven pada suhu 110$^{o}$C selama 2 jam. Silika gel yang telah diaktifasi dimasukkan ke dalam gelas kimia dan ditambahkan eluen n-heksana:etil asetat (4:1) sebanyak 20 mL lalu diaduk dengan stirer hingga tidak ada gelembung udara. Bubur silika kemudian diisikan pada kolom yang sudah disiapkan. Seluruh rongga yang ada di kolom ditutup dengan plastik *wrap* sehingga tidak ada rongga udara. Kolom dijenuhkan selama semalam.

Sampel ekstrak *Chlorella* sp. fraksi petroleum eter ditimbang sebanyak 0,05 gram (perbandingan 1:200), 0,067 gram (perbandingan 1:150) dan 0,1 gram (perbandingan 1:100) lalu ditambahkan sedikit eluen (1 mL). Eluen dikeluarkan dari kolom hingga tersisa ±2,5 cm dari permukaan silika gel. Sampel dimasukkan ke dalam kolom yang sudah dijenuhkan lalu ditamahkan eluen kembali. Kran dibuka hingga eluen mengalir dan ditampung dalam botol vial setiap 2 mL (laju alir 2 mL/menit).

### 3.4.9 Monitoring dengan KLTA (Mardiyah, Fasya, & Fauziyah, 2014)

Vial-vial hasil kromatografi kolom dianalisis dengan KLTA dengan cara per-lima jarak antara botol vial ditotolkan ke plat KLT sebanyak 10 totolan. Jarak setiap totolan yaitu 0,5 cm. Eluen n-heksana dan etil asetat (4:1) digunakan sebagai fase geraknya. Plat KLT dimasukkan ke dalam bejana pengembang yang berisi eluen yang telah dijenuhkan. Fraksi yang memiliki jumlah noda yang sama,

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

warna dan Rf yang sama dikelompokkan dalam satu fraksi yang besar. Noda pada plat KLT disinari di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Fraksi-fraksi yang didapat kemudian diuapkan pelarutnya dan dihitung randemen setiap fraksi. Fraksi yang menghasilkan spot tunggal steroid dan triterpenoid dari hasil pemisahan terbaik diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR. Jika dalam pemisahan terbaik terdapat dua atau lebih fraksi tunggal untuk setiap jenis senyawa (steroid dan triterpenoid), maka fraksi yang dipilih yaitu yang nilai randemennya besar.

### 3.4.10 Identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR

**a. Spektofotometer UV-Vis**

Fraksi yang akan diuji dilarutkan dalam 10 mL etanol 96%. Pada vial yang lain dibuat blanko dari pelarut etanol sebanyak 10 mL. Larutan blanko dimasukkan dalam kuvet lalu diletakkan dalam tempat sampel. Dilakukan proses *auto zero*. Sampel yang akan diuji dimasukkan dalam kuvet lainnya lalu dimasukkan dalam tempat sampel. Sampel diukur panjang gelombang maksimumnya.

**b. FT-IR**

Fraksi yang mengandung senyawa target diuapkan pelarutnya. Ditambahkan serbuk KBr pada wadah sampel lalu diratakan. Serbuk KBr dibuat pellet. Pellet KBr diletakan pada tempat sampel. Tempat sampel dimasukan dalam intrumen FTIR, kemudian diidentifikasi hasil spektranya.

## 3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dengan memperhatikan pola pemisahan kromatografi kolom dari variasi rasio sampel dan silika gel yang

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

digunakan. Pola pemisahan diketahui dengan memonitoring vial-vial yang berisi senyawa yang telah dipisahkan, dengan metode KLTA. Pemisahan terbaik didefinisikan sebagai pemisahan yang mampu memisahkan banyak senyawa murni dengan spot tunggal atau tidak campuran. Identifikasi lebih lanjut digunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis, FT-IR dan LC-APCI-MS.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# BAB IV

# HASIL DAN PEMBAHASAN

## 4.1 Kultivasi dan Pemanenan *Chlorella* sp.

Kultivasi yang dilakukan di dalam medium ekstrak tauge (MET) 4% menghasilkan koloni *Chlorella* sp. yang mengalami perubahan warna dari hijau muda menjadi hijau pekat setiap harinya. Perubahan warna tersebut mengindikasikan bertambah banyaknya sel *Chlorella* sp yang telah tumbuh. Pemanenan dilakukan pada hari ke-10 saat jumlah sel *Chlorella* sp. mencapai jumlah maksimum. Hasil pemanenan berupa isolat basah yang berwarna hijau tua dengan berat kering 15,6430 g (Lampiran 4.).

## 4.2 Analisis Kadar Air

Kadar air maksimum yang disyaratkan untuk bisa dilakukan ekstraksi yaitu sebesar 11% (Setyaningsih, Nurmillah, & Windarwati, 2007). Berdasarkan perhitungan diperoleh kadar air pada sampel kering *Chlorella* sp. yaitu 10,26%. Nilai tersebut tidak jauh berbeda dengan penelitian sebelumnya. Kadar air pada penelitian Khamidah (2013), Zahro' (2014), Sa'adah (2015) dan Handoko (2016) pada sampel kering mikroalga *Chlorella* sp. berturut-turut adalah 10,899; 9,457; 9,73; dan 10,25%.

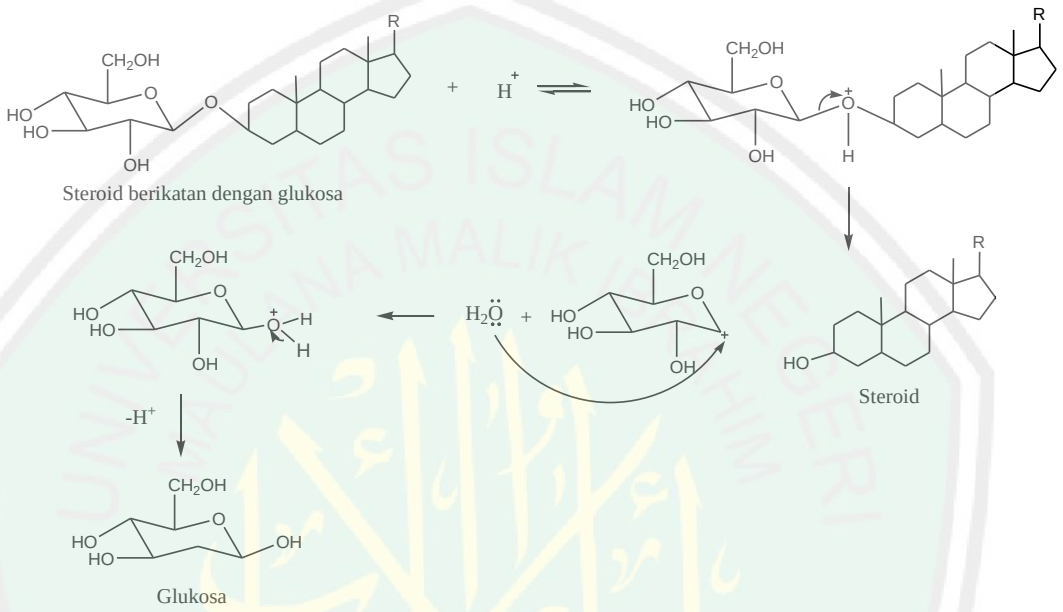
## 4.3 Ekstraksi *Chlorella* sp.

Ekstrak hasil maserasi berwarna hijau kecoklatan. Rendemen dari ekstrak tersebut yaitu 23,79%. Ekstrak pekat hasil maserasi dihidrolisis menggunakan



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

katalis HCl 2 N. Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis ditunjukkan pada Gambar 4.1. Reaksi hidrolisis dihentikan dengan menambahkan basa $NaHCO_3$ (Gambar 4.2). Ekstrak hasil hidrolisis dipartisi menggunakan pelarut petroleum eter dan didapatkan rendemen partisi sebesar 55,06%.




**Gambar 4.1** Dugaan mekanisme hidrolisis steroid dengan glukosa

$$HCl_{(l)} + NaHCO_{3(s)} \rightarrow NaCl_{(s)} + CO_{2(g)} + H_2O_{(aq)}$$

**Gambar 4.2** Reaksi penetralan HCl dengan natrium bikarbonat (Mardiyah, 2012)

## 4.4 Uji Fitokimia Senyawa Steroid dan Triterpenoid

Uji fitokimia senyawa steroid dan triterpenoid dilakukan dengan penambahan pereaksi Lieberman-Burchard. Hasil uji fitokimia menunjukkan positif terhadap steroid yang ditunjukkan dengan warna larutan menjadi hijau kebiruan. Cincin coklat pada batas larutan juga terbentuk yang menandakan positif terhadap triterpenoid (Gambar 4.3).

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

(a) (b)

**Gambar 4.3** Uji fitokimia steroid dan triterpenoid, (a) sebelum ditambahkan reagen LB; (b) setelah ditambahkan reagen LB

Prinsip reaksi dalam uji steroid dan triterpenoid menggunakan reagen Lieberman-Burchard adalah kondensasi atau pelepasan $H_2O$ dan penggabungan dengan karbokation. Reaksi tersebut diawali dengan proses asetilasi gugus hidroksil oleh asam asetat anhidrat. Gugus asetil yang merupakan gugus pergi yang baik akan lepas sehingga terbentuk ikatan rangkap. Kemudian terjadi pelepasan gugus hidrogen beserta elektronnya yang mengakibatkan ikatan rangkap berpindah. Senyawa ini mengalami resonansi yang bertindak sebagai elektrofil atau karbokation. Serangan karbokation menyebabkan adisi elektrofilik dan diikuti dengan pelepasan hidrogen. Kemudian gugus hidrogen beserta elektronnya dilepas sehingga senyawa mengalami perpanjangan konjugasi yang menyebabkan munculnya cincin coklat (Siadi, 2012).

### 4.5 Pemisahan Senyawa Steroid dan Triterpenoid dengan Kromatografi Kolom Basah dan Monitoring dengan KLTA

Pemisahan dengan kromatografi kolom basah menghasilkan vial-vial yang berisi 2 mL eluat yang berjumlah 216, 201, dan 201 untuk setiap rasio 1:200, 1:150 dan 1:100. Warna eluat pada vial penampung berbeda dalam setiap jangka

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

vial tertentu. Secara umum, eluat mengalami perubahan berwarna dari bening, kuning, hijau, kuning, hingga kekuningan hingga mencapai vial terakhir.

Eluat yang ditampung dalam botol vial dimonitoring dengan KLTA. Vial yang memiliki profil pemisahan yang sama (jumlah spot, Rf, dan warna spot) dikelompokkan dalam satu fraksi. Pemisahan yang mampu menghasilkan spot tunggal steroid dan triterpenoid ditentukan sebagai pola pemisahan terbaik. Hasil monitoring dari perbandingan sampel terhadap silika gel 1:200; 1:150; dan 1:100 berturut-turut ditunjukkan pada Tabel 4.1; 4.2; dan 4.3.

**Tabel 4.1**Hasil monitoring senyawa steroid dan triterpenoid dengan perbandingan sampel dan silika 1:200

| Fraksi | Vial ke- | Σ spot | Warna spot | Senyawa | Keterangan | Berat (g) & randemen | Rf |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A1 | 1-15 | 0 | - | - | Kosong | - | - |
| A2 | 16 | 3 | Merah | Triterpenoid | Campuran | 0,0005 | 0,25 |
| | | | Merah | Triterpenoid | | (1%) | 0,60 |
| | | | Hijau | Steroid | | | 0,84 |
| A3 | 17-33 | 2 | Merah | Triterpenoid | Campuran | 0,0071 | 0,25 |
| | | | Merah | Triterpenoid | | (14,2%) | 0,61 |
| A4 | 34-80 | 3 | Merah | Triterpenoid | Campuran | 0,0080 | 0,25 |
| | | | Merah | Triterpenoid | | (16%) | 0,41 |
| | | | Merah | Triterpenoid | | | 0,56 |
| A5 | 81-84 | 2 | Merah | Triterpenoid | Campuran | 0,0011 | 0,16 |
| | | | Merah | Triterpenoid | | (2,2%) | 0,28 |
| A6 | 85-94 | 2 | Merah | Triterpenoid | Campuran | 0,0011 | 0,16 |
| | | | Merah | Triterpenoid | | (2,2%) | 0,25 |
| A7 | 95-99 | 2 | Merah | Triterpenoid | Campuran | 0,0008 | 0,28 |
| | | | Merah | Triterpenoid | | (1,6%) | 0,41 |
| A8 | 100-120 | 3 | Merah | Triterpenoid | Campuran | 0,0015 | 0,08 |
| | | | Merah | Triterpenoid | | (3%) | 0,23 |
| | | | Merah | Triterpenoid | | | 0,26 |
| A9 | 121-134 | 2 | Merah | Triterpenoid | Campuran | 0,0014 | 0,08 |
| | | | Merah | Triterpenoid | | (2,8%) | 0,23 |
| **A10** | **135-175** | **1** | **Merah** | **Triterpenoid** | **Tunggal** | **0,0034 (6,8%)** | **0,08** |
| A11 | 176-216 | 0 | - | - | Kosong | - | - |

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Hasil pemisahan pada Tabel 4.1 didapatkan 11 fraksi (A1-A11) yang mengandung 1 fraksi senyawa tunggal triterpenoid (A10). Hasil pemisahan pada Tabel 4.2 didapatkan 8 fraksi (B1-B8) yang mengandung 2 fraksi senyawa tunggal triterpenoid (B6 dan B7) dan 1 fraksi senyawa tunggal steroid (B2). Hasil pemisahan pada Tabel 4.3 didapatkan 9 fraksi (C1-C9) yang mengandung 2 fraksi senyawa tunggal triterpenoid (C6 dan C8). Berdasarkan Tabel 4.1, 4.2, 4.3, disimpulkan bahwa pemisahan dengan rasio 1:150 (Tabel 4.2) merupakan pemisahan terbaik yang mampu menghasilkan paling banyak fraksi senyawa tunggal. Pada pemisahan dengan rasio 1:150 digunakan jumlah sampel sebanyak 0,067 gram.

**Tabel 4.2**Hasil monitoring senyawa steroid dan triterpenoid dengan perbandingan sampel dan silika gel 1:150

| Fraksi | Vial ke- | Σ spot | Warna spot | Senyawa | Keterangan | Berat (g) & randemen | Rf |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| B1 | 1-13 | 0 | - | - | Kosong | 0,005 (7,46%) | - |
| **B2** | **14-16** | **1** | **Hijau** | **Steroid** | **Tunggal** | **0,0021 (3,13%)** | **0,70** |
| B3 | 17-24 | 3 | Merah<br>Merah<br>Hijau | Triterpenoid<br>Triterpenoid<br>Steroid | Campuran | 0,0035 (5,22%) | 0,45<br>0,51<br>0,70 |
| B4 | 25-44 | 3 | Merah<br>Merah<br>Merah | Triterpenoid<br>Triterpenoid<br>Triterpenoid | Campuran | 0,0069 (10,29%) | 0,32<br>0,45<br>0,51 |
| B5 | 45-64 | 3 | Merah<br>Merah<br>Merah | Triterpenoid<br>Triterpenoid<br>Triterpenoid | Campuran | 0,0032 (4,77%) | 0,18<br>0,32<br>0,45 |
| **B6** | **65-78** | **1** | **Merah** | **Triterpenoid** | **Tunggal** | **0,002 (2,98%)** | **0,18** |
| **B7** | **79-170** | **1** | **Merah** | **Triterpenoid** | **Tunggal** | **0,0201 (30%)** | **0,07** |
| B8 | 171-201 | 0 | - | - | Kosong | 0,0073 (10,89%) | - |

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Banyak sedikitnya sampel yang dimasukkan ke dalam kolom berpengaruh terhadap interaksi sampel terhadap fase diam dan fase gerak. Prinsip dari kromatografi kolom yaitu adsorpsi-desorpsi di antara fase diam dan fase gerak. Fase diam memiliki struktur berpori (Gambar 2.6). Sampel yang melewati permukaan fase diam akan teradsorbsi sehingga tertahan untuk sementara waktu. Sebagian ada yang teradsorbsi dalam pori-pori tersebut sehingga tertahan lebih lama dari yang lainnya (Rohman, 2009).

**Tabel 4.3**Hasil monitoring senyawa steroid dan triterpenoid dengan perbandingan sampel dan silika 1:100

| Fraksi | Vial ke- | Σ spot | Warna spot | Senyawa | Keterangan | Berat (g) & randemen | Rf |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C1 | 1-15 | 0 | - | - | Kosong | 0,0102 (10,2%) | - |
| C2 | 16-24 | 2 | Merah<br>Hijau | Triterpenoid<br>Steroid | Campuran | 0,0036 (3,6%) | 0,55<br>0,85 |
| C3 | 25-34 | 3 | Merah<br>Merah<br>Hijau | Triterpenoid<br>Triterpenoid<br>Steroid | Campuran | 0,0068 (6,8%) | 0,39<br>0,55<br>0,85 |
| C4 | 35-49 | 2 | Merah<br>Merah | Triterpenoid<br>Triterpenoid | Campuran | 0,0062 (6,2%) | 0,39<br>0,55 |
| C5 | 50-79 | 2 | Merah<br>Merah | Triterpenoid<br>Triterpenoid | Campuran | 0,0116 (11,6%) | 0,23<br>0,39 |
| **C6** | **80-95** | **1** | **Merah** | **Triterpenoid** | **Tunggal** | **0,0035 (3,5%)** | **0,23** |
| C7 | 96-115 | 2 | Merah<br>Merah | Triterpenoid<br>Triterpenoid | Campuran | 0,0057 (5,7%) | 0,08<br>0,16 |
| **C8** | **116-190** | **1** | **Merah** | **Triterpenoid** | **Tunggal** | **0,0061 (6,1%)** | **0,08** |
| C9 | 191-201 | 0 | - | - | Kosong | 0,0031 (3,1%) | - |

Sampel yang terlalu sedikit mengakibatkan sebagian besar sampel akan terjerat dalam pori fase diam sehingga membutuhkan waktu yang relatif lebih lama untuk keluar dari pori tersebut. Di sisi lain, eluen akan terus mengalir

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

menuju dasar kolom dengan interaksi yang minim dengan sampel. Interaksi yang minim dengan fase gerak dan sampel yang terjerat terlalu lama dalam pori fase diam mengakibatkan penumpukan senyawa yang terjadi di vial-vial terakhir. Pemisahan yang menghasilkan senyawa tunggal menjadi sulit diharapkan sehingga pemisahan pada rasio 1:200 menjadi kurang optimal.

Jika sampel terlalu banyak maka sebagian ada yang teradsorpsi dalam pori-pori fase diam. Ketika seluruh permukaan fase diam sudah tertutupi oleh sampel, sisa sampel yang lainnya memiliki peluang yang kecil untuk berinteraksi dengan fase diam secara optimal. Kondisi tersebut mengakibatkan pemisahan yang menghasilkan senyawa tunggal menjadi sulit terjadi sehingga pemisahan pada rasio 1:100 menjadi kurang optimal.

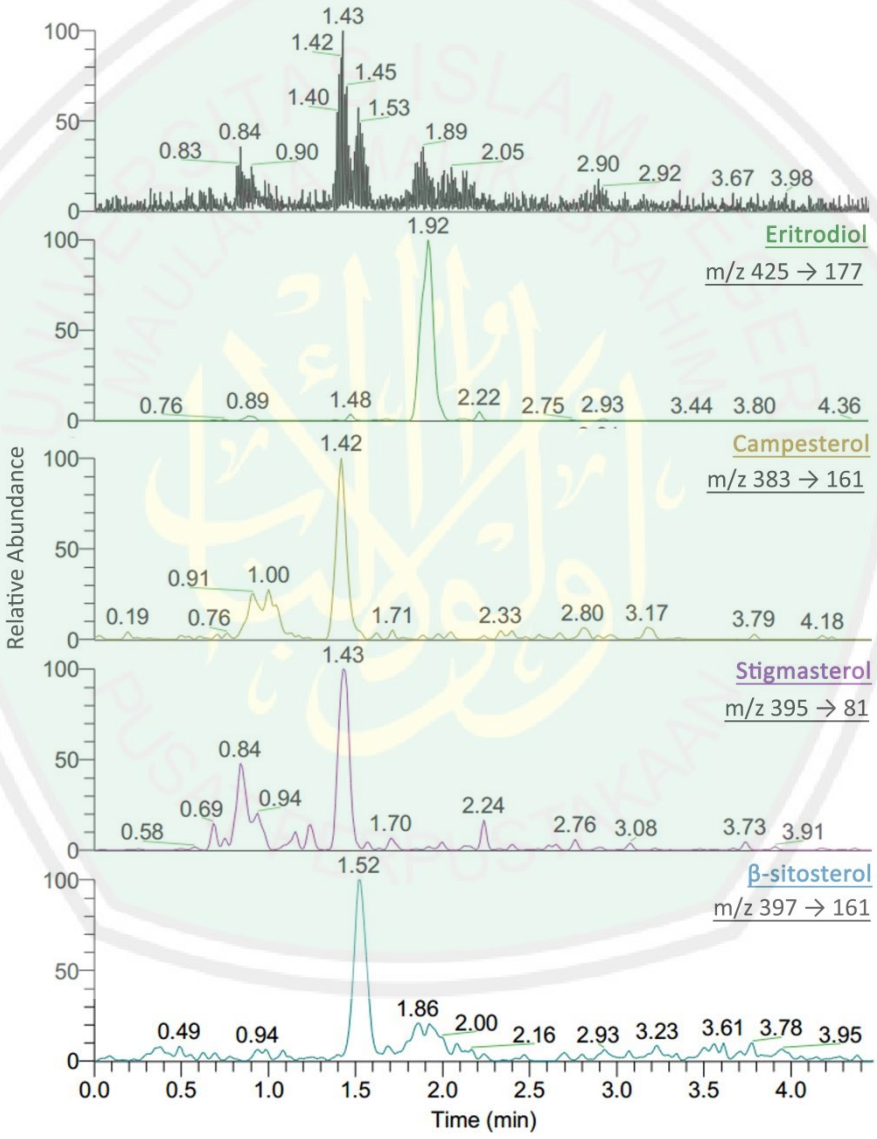
### 4.6 Interpretasi LC-APCI-MS, UV-Vis, dan IR

Isolat hasil partisi diidentifikasi menggunakan LC-APCI-MS untuk mengetahui jenis senyawa steroid dan triterpenoid yang terkandung dalam *Chlorella* sp. fraksi petroleum eter. Jenis senyawa steroid yang ditargetkan yaitu stigmasterol, campesterol dan β-sitosterol. Jenis senyawa triterpenoid yang ditargetkan yaitu asam ursolic, eritrodiol dan friedelin.

Hasil identifikasi menunjukkan positif terkandung β-sitosterol, stigmasterol, dan campesterol untuk jenis steroid sedangkan untuk triterpenoid positif terdapat eritrodiol. Asam ursolic dan friedelin berada di bawah limit deteksi. Berdasarkan pada kondisi kromatografi yang ada, waktu retensi dari ketiga jenis streoid yang terbaca yaitu: 1,42 menit untuk campesterol, 1,43 menit untuk stigmasterol dan 1,52 menit untuk β-sitosterol sedangkan untuk triterpenoid

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

jenis eritrodiol yaitu 1,92 menit. Luas puncak setiap senyawa menandakan kelimpahannya pada sampel yang dianalisis. Berdasarkan Gambar 4.4, puncak yang paling luas dimiliki oleh stigmasterol, selanjutnya berturut-turut yaitu campesterol, β-sitosterol, dan eritrodiol, sehingga kelimpahan senyawa dari yang tertinggi hingga terendah yaitu stigmasterol>campesterol>β-sitosterol>eritrodiol.




**Gambar 4.4** Hasil identifikasi LC-APCI-MS dari isolat *Chlorella* sp. fraksi petroleum eter

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

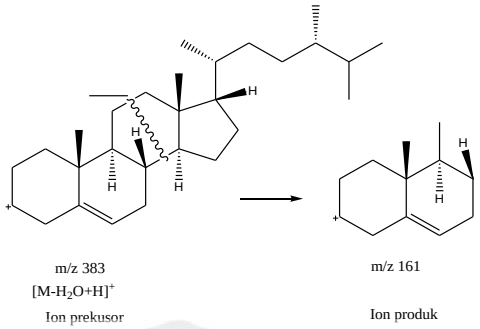
**Tabel 4.4** Data spektra massa dari streoid dan triterpenoid yang teridentifikasi oleh LC-APCI-MS

| Senyawa | Waktu Retensi (menit) | Massa molekul | Hasil penelitian | | Literatur | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | $[M+H-H_2O]^+$ Ion prekusor (m/z) | Ion produk (m/z) | $[M+H-H_2O]^+$ Ion prekusor (m/z) | Ion produk (m/z) |
| **Steroid** | | | | | | |
| Campesterol | 1,42 | 414 | 383 | 161 | 382,8*** | 160,8** * |
| Stigmasterol | 1,43 | 412 | 395 | 81 | 395,4** | 81,1** |
| β-sitosterol | 1,52 | 414 | 397 | 161 | 397* | 161* |
| **Triterpenoid** | | | | | | |
| Eritrodiol | 1,92 | 442 | 425 | 177 | 425,4*** | 177,0** * |
| Asam ursolic | - | 460 | (di bawah batas deteksi) | - | 439,4*** | 191,0** * |
| Friedelin | - | 430 | (di bawah batas deteksi) | - | 409,1*** | 109,1** * |

Keterangan: * (Mo, Dong, Hurst, & Breemen, 2013)
** (Fu & Joseph, 2012)
*** (Gobo, Viana, & Lameira, 2016)

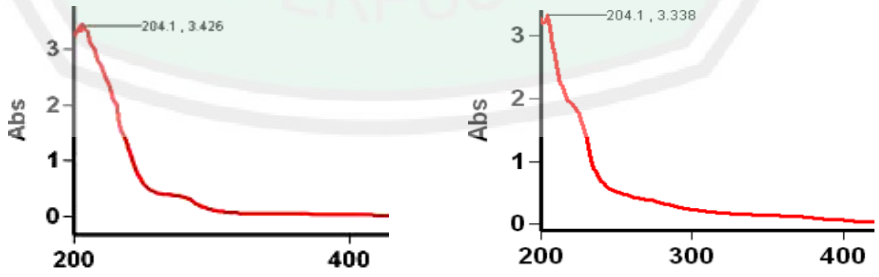
Ion yang terdeteksi oleh MS mode positif selalu dalam bentuk $[M-H_2O+H]^+$ yang disebut *precursor ion* (ion perintis). Ion $[M-H_2O+H]^+$ merupakan *base peak* dari spectra APCI mode positif yang menerangkan terlepasnya molekul air dari senyawa target yang telah terprotonasi (Mo et al., 2013). Ion prekusor terpecah menjadi ion produk yang nilai m/z nya lebih kecil. Ion produk yang ditargetkan telah dipilih sebelumnya berdasarkan literatur yang telah diketahui. Nilai m/z ion prekusor dan ion induk dari setiap jenis steroid dan triterpenoid ditunjukkan pada Tabel 4.4. Proses pemecahan ion prekusor campesterol menjadi ion produk ditunjukkan pada Gambar 4.5.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG




**Gambar 4.5** Struktur ion prekusor dan ion produk dari campesterol (Mo, Dong, Hurst, & Breemen, 2013)

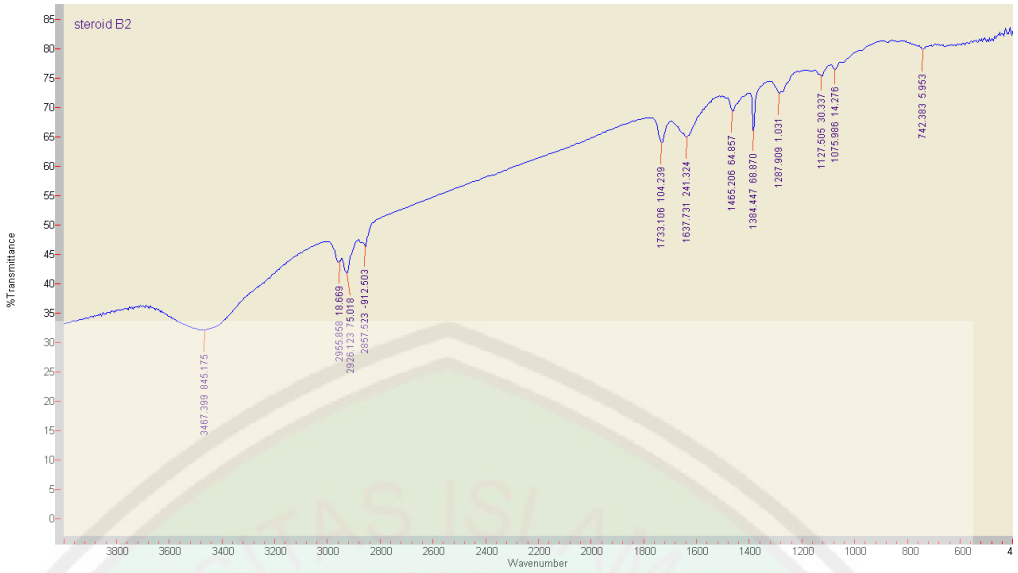
Fraksi steroid B2 dan fraksi triterpenoid B7 diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR. Berdasarkan spektra UV-Vis untuk fraksi B2 diperoleh panjang gelombang dari isolat steroid yaitu 204 dan 205 nm (Gambar 4.6 (a)). Panjang gelombang tersebut menunjukkan adanya transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ yang merupakan serapan untuk senyawa yang memiliki kromofor berupa ikatan rangkap yang tak terkonjugasi. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Fasya (2016) dimana diperoleh panjang gelombang steroid dari *Chlorella* sp. yaitu 204 nm yang menunjukkan adanya ikatan C=C tidak terkonjugasi (Gambar 4.6 (b)).




(a) steroid dalam *Chlorella* sp. (b) steroid (Fasya, 2016)

**Gambar 4.6** Spektra UV-Vis senyawa steroid dibandingkan dengan literatur

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG




**Gambar 4.7** Spektra IR senyawa steroid fraksi B2 mikroalga *Chlorella* sp. fraksi petroleum eter

Spektra IR dari senyawa steroid fraksi B2 ditunjukkan pada Gambar 4.7. Berdasarkan Gambar 4.7, terdapat serapan –OH (3467 $cm^{-1}$), $-CH_3$ (2955 $cm^{-1}$), $-CH_2-$ asiklik (2926 dan 2857 $cm^{-1}$) dan ikatan C=C (1637 $cm^{-1}$). Gugus fungsi penting lainnya yaitu gugus karbonil C=O untuk ester (1733 $cm^{-1}$) yang didukung dengan serapan C–O ester (1287 $cm^{-1}$). Gugus geminal dimetil yang merupakan serapan khas untuk senyawa steroid muncul pada 1465 dan 1384 $cm^{-1}$ (Tabel 4.5).

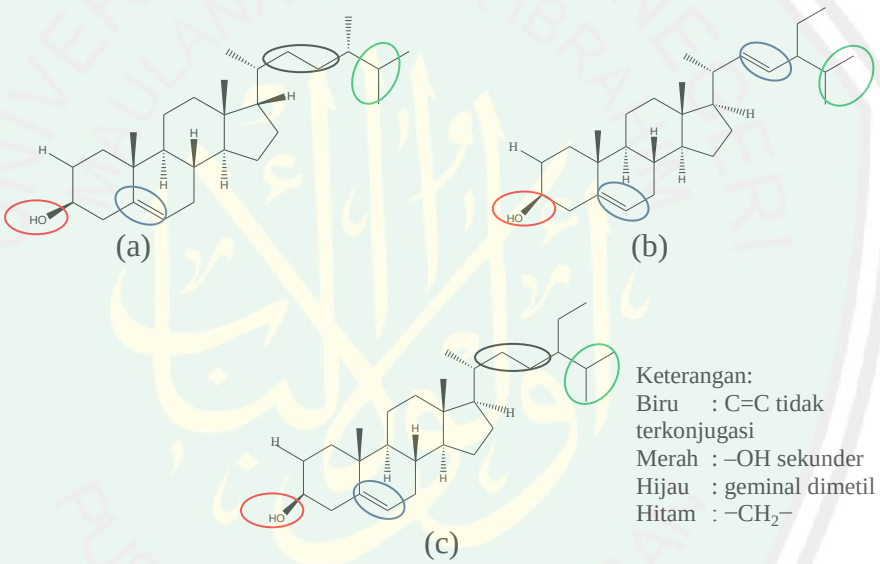
**Tabel 4.5** Interpretasi spektra IR senyawa steroid fraksi B2

| Gugus fungsi | Bilangan gelombang ($cm^{-1}$) | Socrates (1994) ($cm^{-1}$) |
|---|---|---|
| −OH, ulur | 3467 | 3600-3450 |
| $-CH_3$, asimetri | 2955 | 2975-2950 |
| $-CH_2-$ asiklik, asimetri | 2926 | 2940-2915 |
| $-CH_2-$ asiklik, simetri | 2857 | 2870-2840 |
| C=O, ester | 1733 | 1750-1725 |
| C=C terisolasi | 1637 | 1680-1620 |
| $-CH(CH_3)_2$ (geminal dimetil) | 1465 dan 1384 | 1454 dan 1384* |
| C−O ester (ulur) | 1287 | 1300-1100 |
| $-(CH_2)_2$, rocking | 742 | 745-735 |

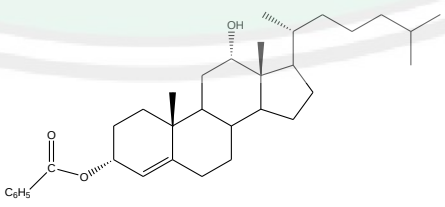
Keterangan: * Suryani (2011)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Jika digabungkan dengan spektra UV-Vis yang menunjukkan adanya ikatan C=C tidak terkonjugasi dan hasil LC-APCI-MS pada isolat hasil partisi yang menunjukkan steroid jenis campesterol, stigmasterol, dan β-sitosterol, maka pada fraksi B2 diduga terkandung ketiga jenis senyawa tersebut. Hal ini karena ketiganya masing-masing memiliki gugus –OH, $–CH_3$, $–CH_2–$, $–(CH_2)_2$, C=C tidak terkonjugasi, dan $–CH(CH_3)_2$ (Gambar 4.8). Gugus ester yang muncul pada spektra IR diduga serapan steroid jenis lain yang memiliki gugus ester sebagai contoh yang ditunjukkan pada Gambar 4.9.




**Gambar 4.8** Struktur steroid (a) Campesterol; (b) Stigmasterol; (c) β-sitosterol



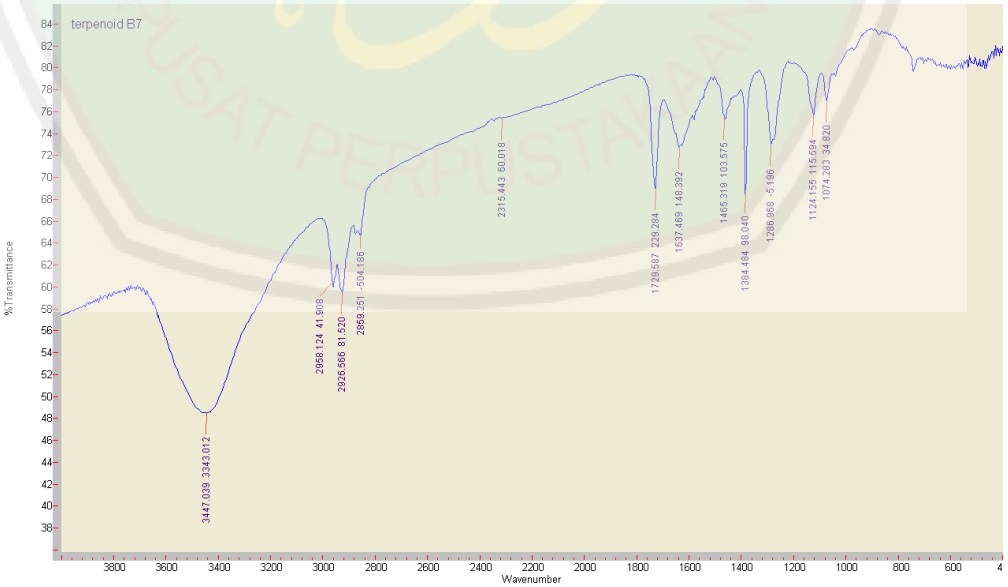
**Gambar 4.9** Senyawa steroid yang mengikat gugus ester 12α-hydoxy-5β-cholestane-3α-yl benzoate (Friedman, Alex, Dov, & Meir, 2007)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Hasil identifikasi triterpenoid fraksi B7 dengan spektrofotometer UV-Vis diperoleh panjang gelombang pada 202 dan 205 nm (Gambar 4.10 (a)). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Mulyani, Arifin, & Nurdin (2013) yang diperoleh panjang gelombang triterpenoid dari daun srikaya (*Annona squamosa* L) yaitu 205,6 nm (Gambar 4.10 (b)). Panjang gelombang tersebut menunjukkan adanya transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ yang merupakan serapan spektra UV khas untuk senyawa triterpenoid yang memiliki kromofor berupa ikatan rangkap yang tak terkonjugasi.

(a) triterpenoid dalam *Chlorella* sp. (b) triterpenoid (Mulyani *et al*., 2013)

**Gambar 4.10** Spektra UV-Vis senyawa triterpenoid dibandingkan dengan literatur




**Gambar 4.11** Spektra IR senyawa triterpenoid fraksi B7 mikroalga *Chlorella* sp. fraksi petroleum eter

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Spektra IR dari senyawa triterpenoid fraksi B7 ditunjukkan pada Gambar 4.11. Berdasarkan Gambar 4.11, terdapat serapan gugus –OH (3447 $cm^{-1}$), $-CH_3$ (2958 $cm^{-1}$), $-CH_2-$ asiklik (2926 dan 2859$cm^{-1}$) dan ikatan C=C (1637 $cm^{-1}$). Gugus fungsi penting lainnya yaitu gugus karbonil C=O untuk ester (1729 $cm^{-1}$) yang didukung dengan serapan C−O ester (1286 $cm^{-1}$) dan serapan C−O−C (1074 $cm^{-1}$). Serapan C−O untuk alkohol sekunder muncul pada 1124 $cm^{-1}$. Gugus geminal dimetil yang merupakan serapan khas senyawa triterpenoid muncul pada 1465 dan 1384 $cm^{-1}$ (Tabel 4.6).

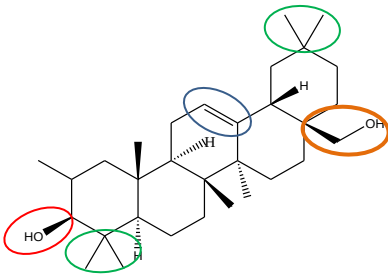
Jika digabungkan dengan spektra UV-Vis yang menunjukkan adanya ikatan C=C tidak terkonjugasi, dan hasil LC-MS pada isolat hasil partisi yang menunjukkan adanya triterpenoid jenis eritrodiol, maka pada fraksi B7 tidak terkandung triterpenoid jenis eritrodiol. Hal ini karena eritrodiol selain memiliki –OH sekunder juga memiliki –OH primer (Gambar 4.12) sedangkan spektra IR yang muncul tidak menunjukkan serapan C–O untuk alkohol primer pada daerah 1350-1260 $cm^{-1}$ (Socrates, 1994). Serapan ester yang muncul dimungkinkan berasal dari jenis triterpenoid yang memiliki gugus ester.

**Tabel 4.6** Interpretasi spektra IR senyawa triterpenoid fraksi B7

| Gugus Fungsi | Bilangan gelombang ($cm^{-1}$) | Socrates (1994) ($cm^{-1}$) |
|---|---|---|
| −OH, ulur | 3447 | 3600-3450 |
| $-CH_3$, asimetri | 2958 | 2975-2950 |
| $-CH_2-$ asiklik, asimetri | 2926 | 2940-2915 |
| $-CH_2-$ asiklik, simetri | 2859 | 2870-2840 |
| C=O ester | 1729 | 1750-1725 |
| C=C terisolasi | 1637 | 1680-1620 |
| $-CH(CH_3)_2$ (geminal dimetil) | 1465 dan 1384 | 1454 dan 1384* |
| C−O ester | 1286 | 1300-1100 |
| C−O, ulur (alkohol sekunder) | 1124 | 1125-1085 |
| C−O−C simetris (ester) | 1074 | 1160-1050 |

Keterangan: * Suryani (2011)

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG




Keterangan:
Biru : C=C tidak terkonjugasi
Merah : –OH sekunder
Hijau : geminal dimetil
Coklat : OH primer

**Gambar 4.12** Gugus fungsi pada eritrodiol

## 4.7 Manfaat Senyawa Steroid dan Triterpenoid dalam Perspektif Islam

Allah SWT telah menciptakan seluruh alam meliputi langit, bumi dan segala sesuatu yang berada di antara keduanya dengan penciptaan yang sempurna, rumit dan tersistem. Dibalik kerumitan ciptaan Allah SWT, terdapat suatu pola yang teratur yang bisa dipelajari. Sesungguhnya seluruh ciptaan Allah SWT, baik suatu yang besar maupun dalam ukuran mikro, pasti memiliki hikmah dan manfaat masing-masing. Sebagaimana firman Allah SWT berfiman dalam Q.S. al-Mukminun: 115:

أَفَحَسِبْتُمْ أَنَّمَا خَلَقْنَٰكُمْ عَبَثًا وَأَنَّكُمْ إِلَيْنَا لَا تُرْجَعُونَ ﴿١١٥﴾

*"Maka apakah kamu mengira, bahwa sesungguhnya Kami menciptakan kamu secara main-main (saja), dan bahwa kamu tidak akan dikembalikan kepada Kami?"*

Allah menjawab dalam firmannya yang lain Q.S. Shad: 27 yang secara tegas memberi jawaban bahwasanya tidak ada satupun ciptaan Allah yang sia-sia.

وَمَا خَلَقْنَا ٱلسَّمَآءَ وَٱلْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَٰطِلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ ٱلَّذِينَ كَفَرُوا۟ ۚ فَوَيْلٌ لِّلَّذِينَ كَفَرُوا۟ مِنَ ٱلنَّارِ ﴿٢٧﴾

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

*"Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya tanpa hikmah. Yang demikian itu adalah anggapan orang-orang kafir, maka celakalah orang-orang kafir itu karena mereka akan masuk neraka."*

Penelitian mengenai isolasi steroid dan triterpenoid merupakan salah satu bentuk *tadabbur* akan fenomena alam yang diciptakan Allah SWT. Steroid dan triterpenoid memiliki ukuran yang jauh lebih kecil daripada *Chlorella* sp. itu sendiri. Sesuatu yang lebih kecil disebutkan Allah SWT dalam Q.S. Yunus ayat 61:

وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُوا۟ مِنْهُ مِن قُرْءَانٍ وَلَا تَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا كُنَّا عَلَيْكُمْ شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ ۚ وَمَا يَعْزُبُ عَن رَّبِّكَ مِن مِّثْقَالِ ذَرَّةٍ فِى ٱلْأَرْضِ وَلَا فِى ٱلسَّمَآءِ وَلَآ أَصْغَرَ مِن ذَٰلِكَ وَلَآ أَكْبَرَ إِلَّا فِى كِتَٰبٍ مُّبِينٍ ﴿٦١﴾

*"Kamu tidak berada dalam suatu keadaan dan tidak membaca suatu ayat dari Al Qur'an dan kamu tidak mengerjakan suatu pekerjaan, melainkan Kami menjadi saksi atasmu di waktu kamu melakukannya. Tidak luput dari pengetahuan Tuhanmu biarpun sebesar zarrah (atom) di bumi ataupun di langit. Tidak ada yang lebih kecil dan tidak (pula) yang lebih besar dari itu, melainkan (semua tercatat) dalam kitab yang nyata (Lauh Mahfuzh)."*

Kitab Tafsir Ibnu Katsir (2001) menerangkan bahwa tidak ada sesuatu yang tersembunyi dari pengetahuan Allah SWT, barang sebesar atom yang ada di langit dan di bumi, bahkan yang lebih kecil atau lebih besar dari itu, semuanya tidak luput dari pengetahuanNya. Kata ذرة diartikan sebagai atom, اصغر berartikan "lebih kecil" sedangkan اكبر berartikan "lebih besar", dalam hal ini dibandingkan dengan ذرة. Steroid dan triterpenoid merupakan suatu molekul atau sekumpulan atom yang membentuk struktur tertentu. Dari segi ukuran, steroid dan triterpenoid lebih besar daripada atom, namun lebih kecil dibandingkan sel *Chlorella* sp. Allah SWT Maha Mengetahui segala sesuatu. Segala bentuk ciptaan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Allah SWT, dari yang terkecil hingga terbesar, semuanya memiliki nilai manfaat tertentu.

Senyawa steroid dan triterpenoid yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella* sp. dapat dipisahkan dengan metode kromatrografi kolom. Kromatografi kolom perlu untuk dilakukan percobaan-percobaan agar tercapai kondisi optimum dalam mengekstrak suatu senyawa. Salah satu faktor yang berpengaruh yaitu jumlah sampel dan fase diam yang digunakan. Berdasarkan penelitian ini didapatkan bahwa pemisahan terbaik yaitu ketika digunakan sampel dan fase diam dengan rasio 1:150.

Identifikasi senyawa dilakukan menggunakan beberapa instrumen, yaitu spektrofotometer UV-Vis, FT-IR, dan LC-APCI-MS. Hasil menunjukkan bahwa beberapa jenis senyawa steroid terkandung dalam fraksi steroid B2 diduga merupakan stigmasterol, campesterol, β-sitosterol dan steroid jenis lain yang memiliki gugus ester (muncul serapan gugus –OH, $-CH_3$, $-CH_2-$, C=C, C=O ester, C−O ester dan $-CH(CH_3)_2$). Sedangkan pada fraksi triterpenoid B7 diduga dari triterpenoid yang memiliki gugus ester (muncul serapan –OH, $-CH_3$, $-CH_2-$, C=C, C=O ester, C−O ester, C−O−C ester, $-CH(CH_3)_2$ dan C−O alkohol sekunder).

Steroid dan triterpenoid memiliki berbagai manfaat yang dapat dieksplorasi lebih lanjut, terutama manfaat dalam bidang kesehatan dan pengobatan. Senyawa steroid bersifat toksik dengan nilai $LC_{50}$ sebesar 88,20 ppm (Ilyas & Novianty, 2009). Steroid dalam *Chlorella* sp. sangat berpotensi sebagai antikanker dengan nilai $LC_{50}$ yang rendah yaitu 19,68 ppm (Fasya, 2016). Selain sebagai antikanker, steroid murni juga berpotensi sebagai antioksidan kuat dengan

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

nilai $EC_{50}$ sebesar 77,78 ppm (Fasya, 2016). Senyawa triterpenoid juga bermanfaat sebagai antikanker dengan nilai $LC_{50}$ sebesar 54,74 ppm (Nurhidayah, Minarti, Pratama, & Imran, 2006) dan sebagai antioksidan dengan nilai $IC_{50}$ sebesar 74,48 ppm (Rahim, 2012). Demikian Allah SWT menciptakan segala sesuatu tanpa sia-sia. Manusia yang memiliki kelebihan berupa akal sepatutnya mempelajarinya.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# BAB V

# PENUTUP

## 5.1 Kesimpulan

1. Pemisahan terbaik steroid dan triterpenoid diperoleh pada rasio sampel terhadap silika gel 1:150 yang menghasilkan 1 fraksi steroid dan 2 fraksi triterpenoid.
2. Identifikasi ekstrak hasil partisi fraksi petroleum eter dengan LC-APCI-MS didapatkan steroid jenis β-sitosterol, stigmasterol, dan campesterol, sedangkan untuk triterpenoid didapatkan jenis eritrodiol. Kelimpahan terbanyak yaitu stigmasterol.
3. Identifikasi fraksi B2 steroid dengan spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR didapatkan panjang gelombang 204 dan 205 nm dan serapan gugus –OH, $-CH_3$, $-CH_2-$, C=C, C=O ester, C−O ester, $-(CH_2)_2$ dan $-CH(CH_3)_2$. Serapan tersebut diduga serapan campesterol, stigmasterol, β-sitosterol dan steroid yang memiliki gugus ester. Identifikasi triterpenoid fraksi B7 diperoleh panjang gelombang 202 dan 205 nm, gugus –OH, $-CH_3$, $-CH_2-$, C=C, C=O ester, C−O ester, C−O−C ester, $-CH(CH_3)_2$ dan C−O alkohol sekunder. Serapan tersebut diduga serapan triterpenoid yang mengandung gugus ester.

## 5.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya diharapkan untuk:

1. Melakukan identifikasi fraksi steroid dan triterpenoid dari hasil pemisahan dengan kromatografi kolom menggunakan LC-APCI-MS, dengan memilih



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

senyawa target dari golongan steroid dan triterpenoid yang memiliki gugus ester.

2. Melakukan uji aktivitas antioksidan dan antitoksik terhadap fraksi murni steroid dan triterpenoid
3. Melakukan pengulangan pada setiap variasi agar diperoleh hasil yang lebih signifikan dan pola yang tetap.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# DAFTAR PUSTAKA


Aisya, A., Purba, R., & Sitorus, S. (2012). Isolasi dan identifikasi senyawa Steroid dari kulit batang tumbuhan andong (*Cordyline fructicosa* [L] A. Cheval). *Jurnal Kimia Mulawarman*, *9*(2).

Al-Maraghiy, A. M. (1989a). *Terjemah tafsir al-maraghi* 19. In *Juz 19*. Semarang: CV Tohaputra.

Al-Maraghiy, A. M. (1989b). *Terjemah tafsir al-maraghi* 21. In *Juz 21*. Semarang: CV Tohaputra.

Al-Maraghiy, A. M. (1989c). *Terjemah tafsir al-maraghi* 7. In *Juz 7*. Semarang: CV Tohaputra.

Amaliah, S. (2013). Uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* dan identifikasi golongan senyawa aktif ekstrak kasar mikroalga *Chlorella* sp. hasil kultivasi dalam media ekstrak tauge (MET). *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim.

AOAC. (1984). *Official methods of analysis of the association of official analytical chemist*. Washington DC: Association of Official Analytical Chemist.

Bariyyah, S. K., Fasya, A. G., Abidin, M., & Hanapi, A. (2013). Uji aktivitas antioksidan terhadap dpph dan identifikasi golongan senyawa aktif ekstrak kasar mikroalga *Chlorella* sp . hasil kultivasi dalam medium ekstrak tauge. *ALCHEMY Journal of Chemistry*, *2*(3), 195–204.

Bold, H. C., & Wyne, M. J. (1988). *Introduction of the algae, second edition*. New York: Prentice Hall Mc. Engelwood Cliffs.

Cañabate-Díaz, B., Segura Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Belmonte Vega, A., Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J. L., & Duran Martos, J. (2007). Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food Chemistry*, *102*(3), 593–598. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.038

Chalid, S. Y., Amini, S., & Lestari, S. D. (2010). Kultivasi *Chlorella* sp. pada media tumbuh yang diperkaya dengan pupuk anorganik dan soil extract. *Valensi*, *1*(6), 298–304. Retrieved from http://journal.uinjkt.ac.id/index.php/valensi/article/view/242

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, *25*, 294–306. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.02.001

Etika, S. B., & Suryelita. (2014). Isolasi steroid dari daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *EKSAKTA*, *1*, 60–65.




CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Faqih, A. K., & Tim Ulama. (2006). *Tafsir nurul quran, sebuah tafsir sederhana menuju cahaya al-quran*. In *Jilid 19*. Jakarta: Al-Huda.

Fasya, A. G. (2016). Potensi antikanker dan antioksidan serta identifikasi isolat steroid mikroalga *Chlorella* sp. *Laporan Penelitian Kompetitif Individual*. UIN Maulana Malik Ibrahim, Malang.

Friedman, D., Alex, B., Dov, T., & Meir, E. (2007). *Steroid kit foamable composition and uses thereof*. https://doi.org/WO 2007012977

Fu, R., & Joseph, M. (2012). LC/ELSD and LC/MS/MS of cholesterol and related sterols on a poroshell 120 column. *Application Note*.

Gobo, L. A., Viana, C., & Lameira, A. (2016). A liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometric (LC-APPI-MS / MS) method for the determination of triterpenoids in medicinal plant extracts. *Journal of Mass Spectrometry*, (51), 558–565. https://doi.org/10.1002/jms.3783

Handoko, S. (2016). Pemisahan senyawa steroid fraksi petroleum eter (pe) mikroalga *Chlorella* sp. dengan metode kromatografi kolom pembuatan fasa diam cara basah dan kering. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim.

Harborne, J. B. (1987). *Metode fitokimia penuntun cara modern menganalisis tumbuhan*. Bandung: ITB.

Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., & Williamson, E. (2004). *Fundamental of pharmacognosy and phytotherapy*. Hungary: Elsevier.

Hewlett, P. (2001). Basics of LC/MS. *Agilent Technologies*, 1–36. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Hidayah, H. (2015). Pemisahan senyawa steroid pada fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga chlorella sp. menggunakan kromatografi lapis tipis (klt) dan identifikasinya menggunakan FTIR. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim.

Ibnu Katsir, diterjemah oleh: M. A. G. (2001). *Tafsir Ibnu Katsir jilid 1*. Jakarta: Pustaka Imam asy-Syafi'i.

Ibrahim, A. Y., El-Gengaihi, S. E., & Motawe, H. M. (2011). Phytocemical and cytotoxicity investigation of salvadora persica bark extract. *JASMR*, *6*(2), 127–133.

Ilyas, A., & Novianty, I. (2009). Senyawa golongan steroid dari ekstrak n - heksana kulit batang kayu bitti (*Vitex cofassus*) dan uji toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach. *Jurnal Chimica et Natura Acta*, *3*(3), 120–124.

Imamah, N. (2015). Pemisahan senyawa steroid fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan kromatografi lapis

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

tipis (KLT) dan identifikasinya menggunakan spektrofotometer FTIR. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim

Ismarti. (2011). Isolasi triterpenoid dan uji antioksidan dari fraksi etil asetat kulit batang meranti merah *(Shorea singkawang (Miq).Miq). Artikel*. Universitas Andalas, Padang.

Khamidah, U. (2013). Uji aktivitas antibakteri terhadap escherichia coli dan staphylococcus aureus ekstrak mikroalga *Chlorella* sp. hasil kultivasi dalam medium ekstrak tauge. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Khopkar, S. M. (2003). *Konsep dasar kimia analitik*. Jakarta: UI Press.

Kusmiyati, Aznam, N., & Handayani, S. (2011). Isolasi dan identifikasi zat aktif ekstrak metanol rimpang kunyit putih (*Curcuma mangga* Val) fraksi etil asetat. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, *1*(2), 1–10.

Lawoko, M., Deshpande, S., & Heiningen, A. R. P. Van. (2009). Pre-hydrolysis of the phenyl glycosidic bond in a model compound. *Lenzinger Berichte*, *87*, 77–87.

Lenny, S. (2006a). Senyawa terpenoida dan steroida. *Karya Ilmiah*, Departemen Kimia, Universitas Sumatera Utara.

Lenny, S. (2006b). Uji bioaktifitas kandungan kimia utama puding merah dengan metode *Brine Shirmp*. *Skripsi*. Universitas Sumatera Utara.

Mardiyah, U. (2012). Ekstraksi, uji aktivitas terhadap 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (dpph) dan identifikasi golongan senyawa aktif alga merah *Eucheuma spinosum* dari perairan banyuwangi. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim.

Mardiyah, U., Fasya, A. G., & Fauziyah. (2014). Ekstraksi, uji aktivitas antioksidan dan identifikasi golongan senyawa aktif alga merah *Eucheuma spinosum* dari perairan Banyuwangi. *ALCHEMY Journal of Chemistry*, *3*(1), 39–46.

Mo, S., Dong, L., Hurst, W. J., & Breemen, R. B. Van. (2013). Quantitative analysis of phytosterols in edible oils using APCI liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Lipids*, (48), 949–956. https://doi.org/10.1007/s11745-013-3813-3

Mukharromah, R. R., & Suyatno. (2014). Senyawa metabolit sekunder dari ekstrak diklorometana kulit batang bakau merah (*Rhizophora stylosa*). *Journal of Chemistry*, *3*(3), 154–158.

Mulyani, M., Arifin, B., & Nurdin, H. (2013). Uji antioksidan dan isolasi senyawa metabolit sekunder dari daun sikaya (*Annona squamosa* L). *Jurnal Kimia Unand*, *2*(1), 6–12.

Mulyono. (2006). *Kamus kimia*. Jakarta: PT Bumi Aksara.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Nihlati, I., Rohman, A., & Hertiani, T. (2008). [*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schlecth] dengan metode penangkapan radikal DPPH. *Comparative and General Pharmacology*.

Noviyanti, L. (2010). *Modifikasi teknik kromatografi kolom untuk pemisahan trigliserida dari ekstrak buah merah (Pandanus conoideus* Lamk.*)*. Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Nurhidayah, Minarti, Pratama, A., & Imran. (2006). *Uji aktivitas senyawa turunan terpenoid, steroid dan fenolik dari ekstrak jaringan kayu batang tumbuhan ndokulo (Kleinhovia hospita l.) terhadap pertumbuhan sel kanker (Leukemia P-388)*, 1–4.

Panji, T. (2012). *Teknik spektroskopi untuk elusidasi struktur molekul*. Yogyakarta: Graha Ilmu.

Pelezar, M. J., & Chan, E. C. S. (1988). *Dasar-dasar mikrobiologi jilid 2*. Jakarta: UI Press.

Prihantini, N. B., Putri, B., & Yuniati, R. (2005). Pertumbuhan *Chlorella* sp . dalam medium ekstrak tauge (MET) dengan variasi pH awal. *Makara Sains*, *9*(1), 1–6.

Quthb, S. (2002). *Tafsir fi zhilalil quran jilid 4*. Jakarta: Gema Insani Press.

Rahim, A. (2012). *Uji aktivitas antioksidan dengan metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) dan uji terpenoid terhadap ekstrak Acanthaster*. Universitas Indonesia.

Robinson, T. (1995). *Kandungan organik tumbuhan tinggi*. Bandung: ITB.

Rohman, A. (2009). *Kromatografi untuk analisis obat*. Yogyakarta: Graha ILmu.

Sa'adah, A. (2015). Pemisahan Senyawa Aktif Ekstrak Etil Asetat Mikroalga Chlorella sp. Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasi Menggunakan FTIR. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Safitri, D. A. (2016). Pemisahan senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga chlorella sp. menggunakan kromatografi kolom cara basah dan kering. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim.

Saifuddin, A. (2012). *Senyawa alam metabolit sekunder: teori, konsep, dan teknik pemurnian*. Yogyakarta: Deepublish CV Budi Utama.

Septiandari, N. (2016). Isolasi senyawa triterpenoid dari fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah (Eucheuma spinosum) menggunakan metode kromatografi kolom. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim.

Setiyawan, M. I. (2015). Isolasi senyawa triterpenoid fraksi petroleum eter alga

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

merah (*Eucheuma spinosum*) hasil hidrolisis ekstrak metanol dan identifikasinya menggunakan FTIR. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim.

Setyaningsih, D., Nurmillah, O. Y., & Windarwati, S. (2007). *Kajian aktivitas antioksidan dan antimikroba ekstrak biji, kulit buah, batang dan daun tanaman jarak pagar (Jatropha curcas L.)*. Bandung.

Setyowati, W. A. E., Ariani, S. R. D., Mulyani, B., & Rahmawati, C. P. (2014). Skrining fitokimia dan identifikasi komponen utama ekstrak mrtanol kulit durian (*Durio zibethinus* Murr.) varietas petruk. In *Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia VI* (pp. 271–280). Surakarta.

Sholikah, A. N. L. (2016). Isolasi senyawa steroid dari fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol alga merah (eucheuma spinosum) menggunakan metode kromatografi kolom. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim.

Siadi, K. (2012). Ekstrak bungkil biji jarak pagar (*Jatropha curcas*) sebagai biopetisida yang efektif dengan penambahan larutan NaCl. *Jurnal MIPA*, *35*(1).

Socrates. (1994). *Infrared characteristic group frequencies tables and charts* (Second Edition). New York: John Wiley and Sons Inc.

Subandi, M. (2010). *Mikrobiologi perkembangan, kajian, dan pengamatan dalam perspektif islam*. (P. Latifah, Ed.). Bandung: PT Remaja Rosdakarya.

Suryani, E. (2011). Isolasi dan elusidasi struktur senyawa triterpenoid dari ekstrak etil asetat kulit batang tumbuhan kecapi *(Sandoricum koetjape Merr)*. *Artikel*. Universitas Andalas, Padang.

Suryati. (2011). Elusidasi struktur steroid dari daun tabat barito (*Ficus deltoideus* Jack). *Poli Rekayasa*, *6*(2), 148–153.

Susetyo, E. (2015). Isolasi golongan triterpenoid fraksi etil asetat alga merah (*Eucheuma spinosum*) hasil ekstrak metanol dan identifikasinya menggunakan FTIR. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim.

Suttiarporn, P., Chumpolsri, W., Mahatheeranont, S., Luangkamin, S., Teepsawang, S., & Leardkamolkarn, V. (2015). Structures of phytosterols and triterpenoids with potential anti-cancer activity in bran of black non-glutinous rice. *Nutrients*, *7*, 1672–1687. https://doi.org/10.3390/nu7031672

Wirosaputro, S. (1998). *Chlorella makanan kesehatan global alami buku i*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.

Wirosaputro, S. (2002). *Chlorella makanan kesehatan global alami buku II*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

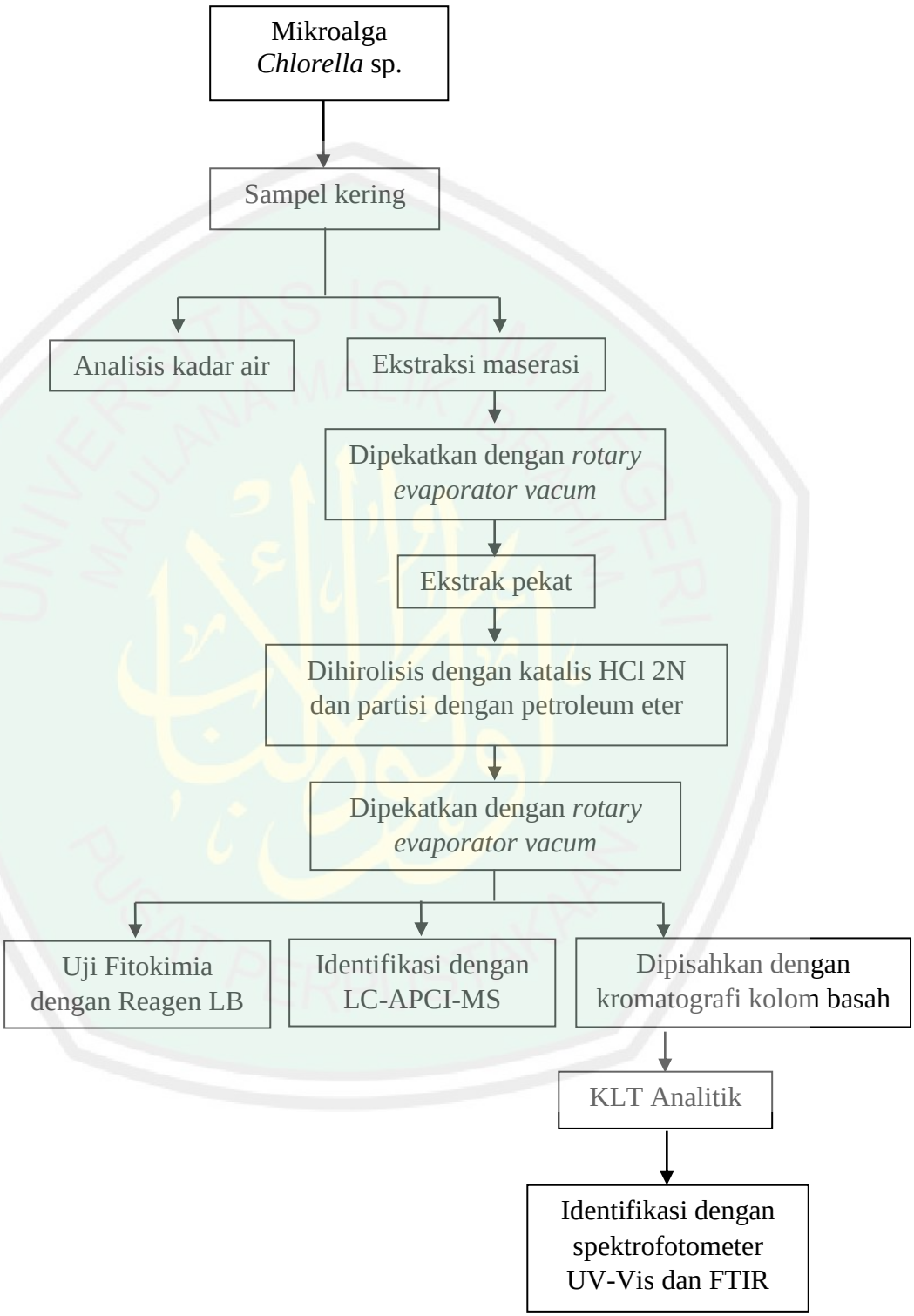
CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Zahro', A. K. (2014). Uji toksisitas minyak dan asam lemak mikroalga *Chlorella sp.* terhadap larva udang *Artemia salina*. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## LAMPIRAN

**Lampiran 1. Diagram alir penelitian**



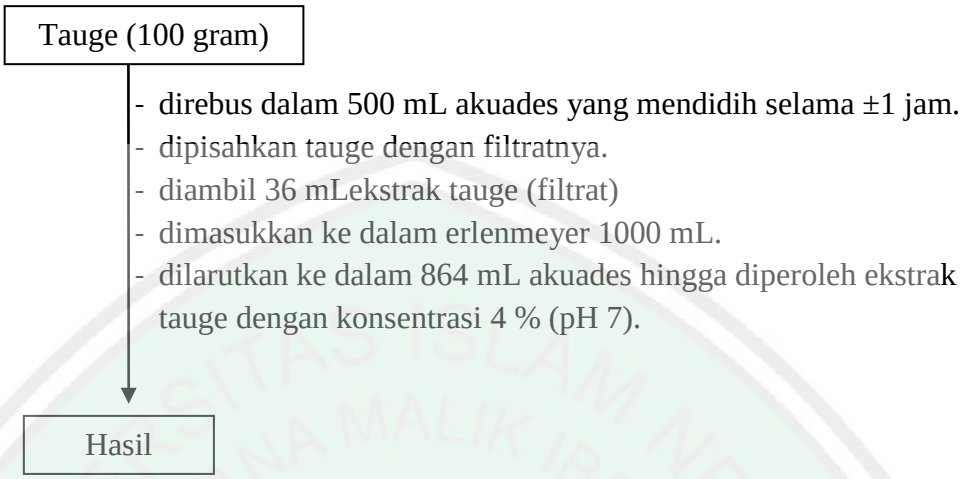



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

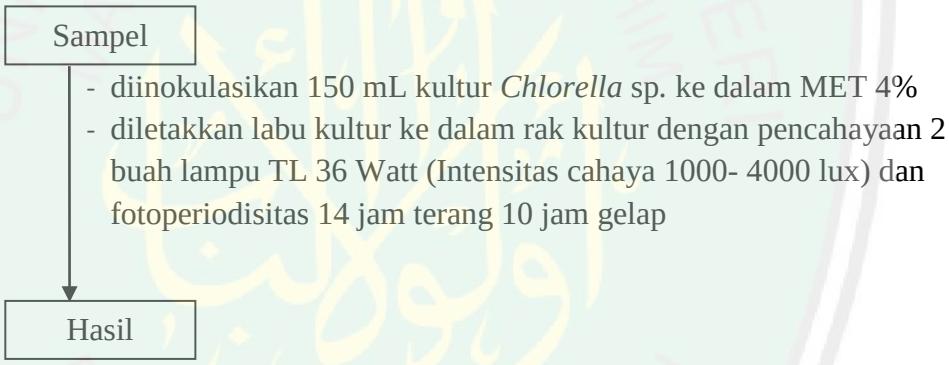
**Lampiran 2. Diagram alir**

**L.2.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.***

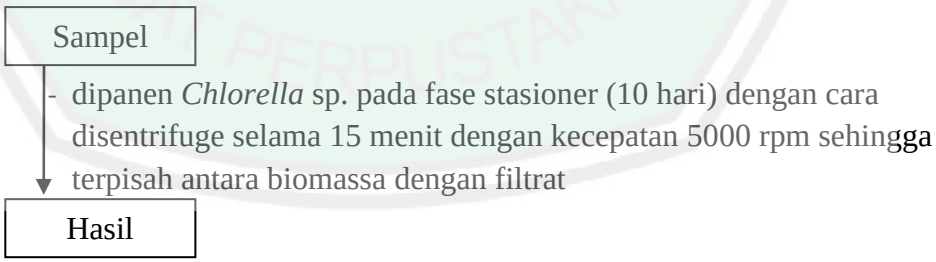
**L.2.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)**




**L.2.1.2 Kultivasi *Chlorella* sp. dalam Medium Ekstrak Tauge**




**L.2.1.3 Pemanenan Mikroalga *Chlorella* sp.**




CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

**L.2.2 Penentuan Kadar Air Secara Thermogravimetri (AOAC, 1984)**

Sampel *Chlorella* sp.

- dipanaskan cawan dalam oven pada suhu 100 – 105 $^{o}$C sekitar 15 menit
- disimpan cawan dalam desikator sekitar 10 menit
- ditimbang hingga diperoleh berat konstan
- ditimbang sampel sebanyak 5 gram
- dimasukkan dalam cawan porselen
- dikeringkan dengan oven pada suhu 100-105 $^{o}$C sekitar ±15 menit
- didinginkan dalam desikator sekitar ±10 menit
- ditimbang
- diulangi hingga diperoleh berat konstan
- dihitung kadar air dengan rumus :

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

keterangan:

a = bobot cawan kosong

b = bobot sampel + cawan sebelum dikeringkan

c = bobot cawan + sampel setelah dikeringkan

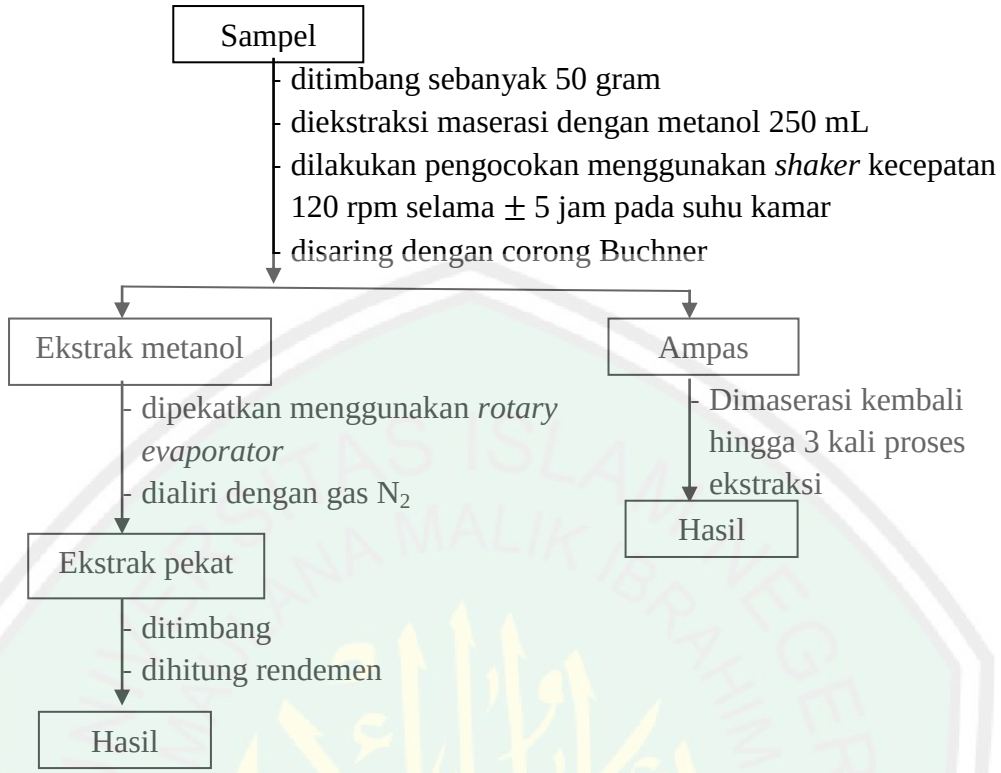
Faktor koreksi = $\frac{100}{100 - \%\ kadar\ air}$

% Kadar air terkoreksi = Kadar air – Faktor koreksi

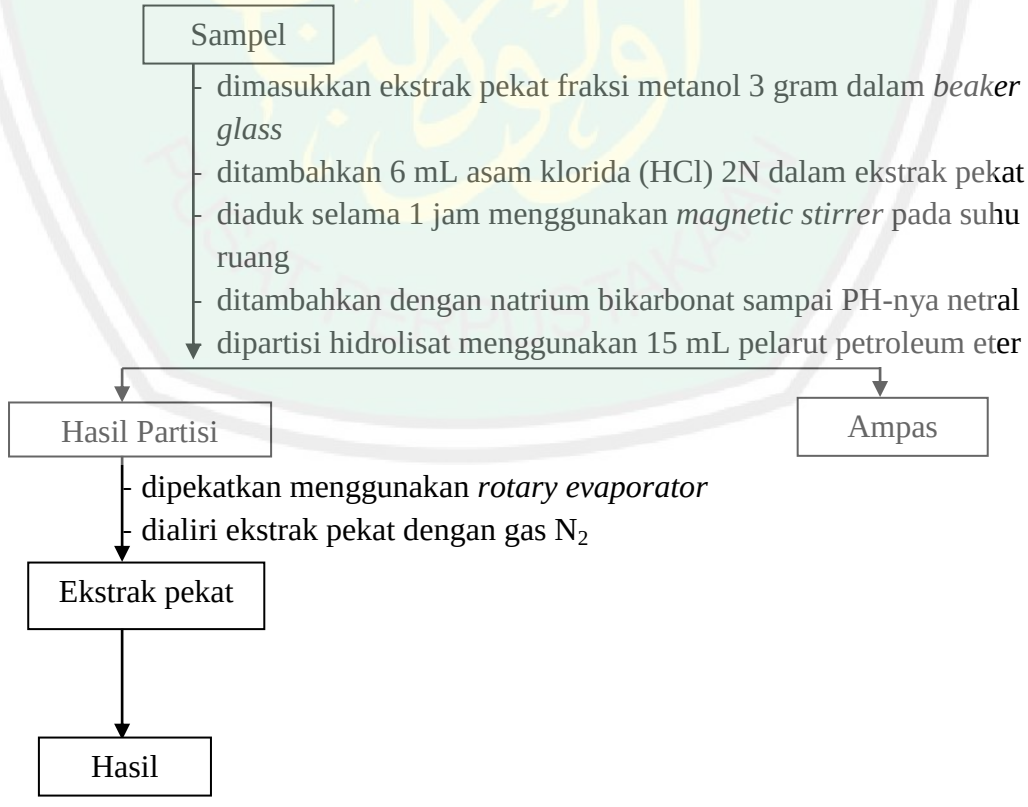
Hasil

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

### L.2.3 Ekstraksi Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Maserasi

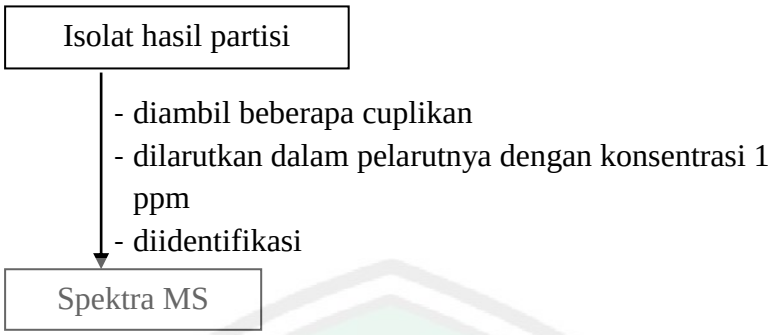



### L.2.4 Hidrolisis Dan Ekstraksi Cair-Cair (Partisi) Ekstrak Pekat Metanol

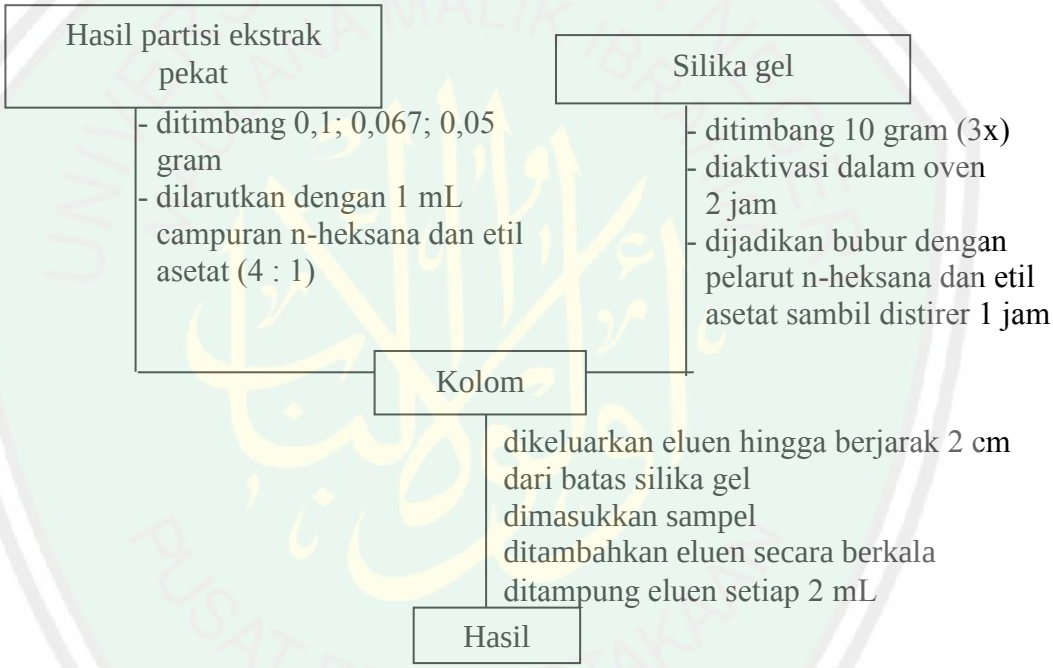



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

### L.2.5 Identifikasi Isolat Hasil Partisi dengan LC-APCI-MS

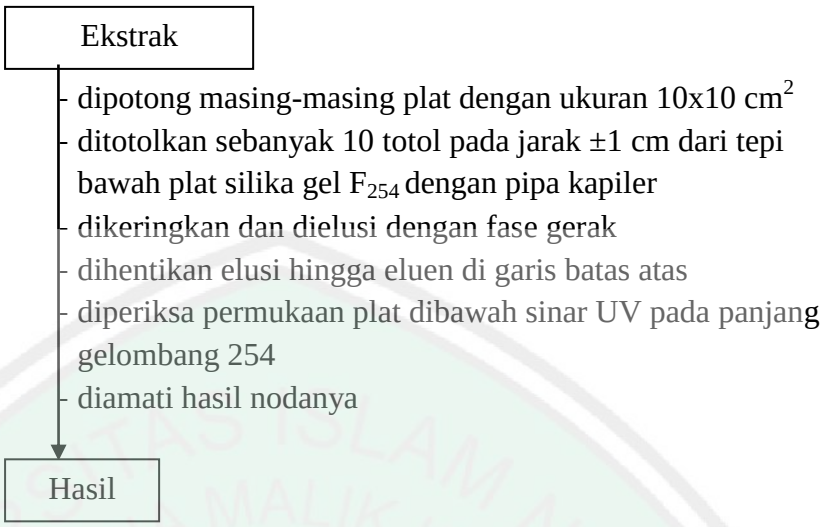



### L.2.6 Pemisahan Senyawa Steroid dan Triterpenoid *Chlorella* sp. dengan Kromatografi Kolom Basah

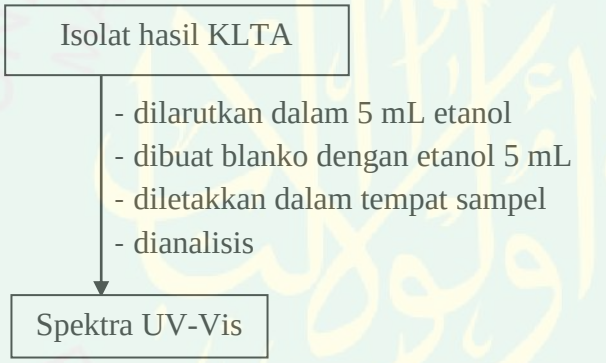



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

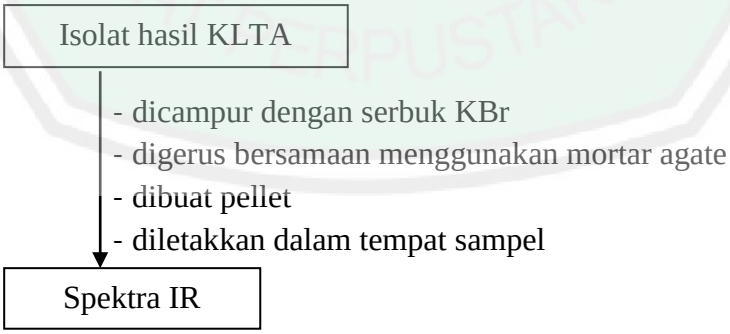
**L.2.6 Monitoring Senyawa Steroid dan Triterpenoid dengan KLT Analitik (Bawa, 2007)**




**L.2.7 Identifikasi Senyawa Steroid dan Triterpenoid dengan Spektrofotometer UV-Vis**




**L.2.7 Identifikasi Senyawa Steroid dan Triterpenoid dengan FT-IR**




CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## Lampiran 3. Perhitungan, Pembuatan Reagen dan Larutan

### L.3.1 Kultivasi *Chlorella* sp. dalam MET 4%

Ketentuan = $\frac{\text{10 ml isolat } Chlorella \text{ sp}}{\text{60 ml MET 4 \%}} = \text{Volume total 70 mL}$

a. Kultivasi dalam Erlenmeyer 1000 mL dengan Memaksimalkan Daya Tampung Erlenmeyer

$\frac{10}{60} = \frac{x}{900 \text{ ml MET 4 \%}}$

60x = 9000 mL

$x = \frac{900 \text{ ml}}{6} = 150 \text{ mL Isolat } Chlorella \text{ sp.}$

Volume total = Isolat *Chlorella* sp. + MET 4 %

= 150 mL + 900 mL

= 1050 mL

b. Pembuatan MET 4 % sebanyak 900 mL

MET = (aquades + ekstrak tauge)

MET 4 % = $\frac{4}{100}$ x 900 mL

= 36 mL ekstrak tauge

Volume Aquades = MET 4 % - (Volume ekstrak tauge)

= 900 mL – 36 mL

= 864 mL

c. Kultivasi dalam Botol 1500 mL dengan Memaksimalkan Daya Tampung Botol

$\frac{10}{60} = \frac{x}{1200 \text{ ml MET 40 \%}}$

60x = 1200 mL

$x = \frac{1200 \text{ ml}}{6} = 200 \text{ mL Isolat } Chlorella\ sp$

Volume total = Isolat *Chlorella* sp.+ MET 4 %

= 200 mL + 1200 mL

= 1400 mL

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

d. Pembuatan MET 4 % sebanyak 1200 mL

MET = (aquades + ekstrak tauge)

MET 4 % = $\frac{4}{100}$ x 1200 mL

= 48 mL ekstrak tauge

Volume Aquades = MET 4 % - (Volume ekstrak tauge)

= 1200 mL – 48 mL

= 1152 mL

**L.3.2 Pembuatan larutan HCl 2 N**

BJ HCl pekat = 1,19 g/mL = 1190 g/L

BM HCl = 36, 42 g/mol

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

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

Mol = $\frac{\text{gram HCl}}{\text{BM HCl}}$

= $\frac{37\ gram}{36{,}42\ g/mol}$

= 1,0159 mol

Volume larutan = $\frac{m}{\rho}$

= $\frac{100\ g}{1{,}19\ g/mL}$ = 84,033 mL = 0,084 L

Molaritas = $\frac{mol}{V}$ = $\frac{1{,}0159\ mol}{0{,}084\ L}$ = 12,094 mol/L

Normalitas HCl = n x Molaritas HCl

= 1 x 12,094 mol/L

= 12,094 N

$N_1$ x $V_1$ = $N_2$ x $V_2$

12,094 N x $V_1$ = 2 N x 20 mL

$V_1$ = 3,3 mL

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Cara pembuatannya adalah diambil larutan HCl pekat 37 % sebanyak 3,3 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 20 mL yang berisi ±10 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

### L.3.3 Pembuatan larutan $NaHCO_3$

Sebanyak 5 gram natrium bikarbonat dilarutkan dengan akuades dalam gelas kimia. Kemudian dimasukkan dalam labu takar 100 mL, ditambah aquades sampai tanda batas lalu dihomogenkan.

### L.3.4 Pembuatan reagen Lieberman-Burchard

- Asam sulfat pekat = 2 mL
- Anhidrida asetat = 0,5 mL
- Kloroform = 0,5 mL

Isolat hasil partisi ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dengan pelarutnya hingga 1 mL. Kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi. Ditambahkan 0,5 mL kloroform, 0,5 mL asam asetat anhidrat dan 2 mL $H_2SO_4$ pekat.

### L.3.5 Data Pengukuran Kadar Air

| Ulangan cawan | Berat cawan kosong (gram) | | | | | | Rata-Rata Berat Konstan (gram) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Sebelum dioven | U1 | U2 | U3 | U4 | U5 | |
| A1 | 55,388 | 55,388 | 55,383 | 55,381 | 55,380 | 55,384 | 55,383 |
| A2 | 54,706 | 54,706 | 54,702 | 54,700 | 54,700 | 54,701 | 54,701 |
| A3 | 65,449 | 65,440 | 65,442 | 65,441 | 65,444 | 65,444 | 65,442 |

| Ulangan cawan | Berat cawan + sampel (gram) | | | | | | Rata-Rata Berat Konstan (gram) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Sebelum dioven | U1 | U2 | U3 | U4 | U5 | |
| A1 | 55,484 | 55,475 | 55,476 | 55,474 | 55,476 | 55,471 | 55,474 |
| A2 | 54,801 | 54,793 | 54,792 | 54,792 | 54,791 | 54,790 | 54,791 |
| A3 | 65,544 | 65,536 | 65,537 | 65,531 | 65,531 | 65,534 | 65,533 |

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

Keterangan: U = Ulangan

Kadar air = $\frac{\text{(berat cawan+sampel sebelum dikeringkan)}-\text{(berat cawan+sampel setelah dikeringkan)}}{\text{(berat cawan+sampel sebelum dikeringkan)}-\text{berat cawan kosong}}$ x 100%

1. Kadar air ulangan ke-1 (A1)

   Kadar air = $\frac{(55{,}484-55{,}474)\ g}{(55{,}484-55{,}383)\ g}$ x 100%

   = $\frac{0{,}01\ g}{0{,}10\ g}$ x 100%

   = 10,00 %

2. Kadar air ulangan ke-2 (A2)

   Kadar air = $\frac{(54{,}801-54{,}791)\ g}{(54{,}801-54{,}701)\ g}$ x 100%

   = $\frac{0{,}01\ g}{0{,}10\ g}$ x 100%

   = 10,00%

3. Kadar air ulangan ke-3 (A3)

   Kadar air = $\frac{(65{,}544-65{,}533)\ g}{(65{,}544-65{,}442)\ g}$ x 100%

   = $\frac{0{,}011\ g}{0{,}102\ g}$ x 100%

   = 10,78%

Kadar air rata-rata sampel *Chlorella* sp. yaitu:

| A1 (%) | A2 (%) | A3 (%) | Rata-rata (%) |
|---|---|---|---|
| 10,00 | 10,00 | 10,78 | 10,26 |

**L.3.6 Rendemen Hasil Maserasi**

| Sampel | Berat wadah (g) | Berat wadah + sampel (gram) | Berat sampel (gram) |
|---|---|---|---|
| Kering | 1,1390 | 16,782 | 15,6430 |
| Eksrak pekat | 64,5696 | 68,2918 | 3,7222 |

Rendemen = $\frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel kering}}$ x 100%

= $\frac{3{,}2222\ \text{gram}}{15{,}6430\ \text{gram}}$ x 100%

= 23,79 %

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

### L.3.7 Rendemen Hasil Hidrolisis dan Partisi

| Ekstrak pekat metanol yang dihidrolisis (g) | Berat wadah (g) | Berat wadah + ekstrak PE pekat (g) | Berat ekstrak pekat PE (g) |
|---|---|---|---|
| 3,7222 | 64,5691 | 66,6188 | 2,0497 |

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak pekat PE}}{\text{berat ekstrak metanol yang dihidrolisis}} \times 100\%$$
$$= \frac{2{,}0497\ \text{gram}}{3{,}7222\ \text{gram}} \times 100\%$$
$$= 55{,}06\%$$

### L.3.8 Perhitungan Nilai Rf Hasil Monitoring

#### 1. Monitoring Perbandingan 1:200

| Fraksi | Vial | Rf | Fraksi | Vial | Rf |
|---|---|---|---|---|---|
| **A1** | **1-15** | Kosong | **A7** | **95-99** | $\frac{2{,}2\ cm}{8\ cm} = 0{,}28$<br>$\frac{3{,}3\ cm}{8\ cm} = 0{,}41$ |
| **A2** | **16** | $\frac{2\ cm}{8\ cm} = 0{,}25$<br>$\frac{4{,}8\ cm}{8\ cm} = 0{,}60$<br>$\frac{6{,}7\ cm}{8\ cm} = 0{,}84$ | **A8** | **100-120** | $\frac{0{,}6\ cm}{8\ cm} = 0{,}08$<br>$\frac{1{,}8\ cm}{8\ cm} = 0{,}23$<br>$\frac{2{,}1\ cm}{8\ cm} = 0{,}26$ |
| **A3** | **17-33** | $\frac{2\ cm}{8\ cm} = 0{,}25$<br>$\frac{4{,}9\ cm}{8\ cm} = 0{,}61$ | **A9** | **121-134** | $\frac{0{,}6\ cm}{8\ cm} = 0{,}08$<br>$\frac{1{,}8\ cm}{8\ cm} = 0{,}23$ |
| **A4** | **34-80** | $\frac{2\ cm}{8\ cm} = 0{,}25$<br>$\frac{3{,}3\ cm}{8\ cm} = 0{,}41$<br>$\frac{4{,}5\ cm}{8\ cm} = 0{,}56$ | **A10** | **135-175** | $\frac{0{,}6\ cm}{8\ cm} = 0{,}08$ |
| **A5** | **81-84** | $\frac{1{,}3\ cm}{8\ cm} = 0{,}16$<br>$\frac{2{,}2\ cm}{8\ cm} = 0{,}28$ | **A11** | **176-216** | Kosong |
| **A6** | **85-94** | $\frac{1{,}3\ cm}{8\ cm} = 0{,}16$<br>$\frac{2\ cm}{8\ cm} = 0{,}25$ | | | |

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

**2. Monitoring Perbandingan 1:150**

| Fraksi | Vial | Rf | Fraksi | Vial | Rf |
|---|---|---|---|---|---|
| **B1** | **1-13** | Kosong | **B5** | **45-64** | $\frac{1,5\ cm}{8\ cm} = 0,19$<br>$\frac{2,6\ cm}{8\ cm} = 0,32$<br>$\frac{3,6\ cm}{8\ cm} = 0,45$ |
| **B2** | **14-16** | $\frac{5,6\ cm}{8\ cm} = 0,70$ | **B6** | **65-78** | $\frac{2,6\ cm}{8\ cm} = 0,32$ |
| **B3** | **17-24** | $\frac{3,6\ cm}{8\ cm} = 0,45$<br>$\frac{4,1\ cm}{8\ cm} = 0,51$<br>$\frac{5,6\ cm}{8\ cm} = 0,70$ | **B7** | **79-170** | $\frac{0,6\ cm}{8\ cm} = 0,07$ |
| **B4** | **25-44** | $\frac{2,6\ cm}{8\ cm} = 0,32$<br>$\frac{3,6\ cm}{8\ cm} = 0,45$<br>$\frac{4,1\ cm}{8\ cm} = 0,51$ | **B8** | **171-201** | Kosong |

**3. Monitoring Perbandingan 1:100**

| Fraksi | Vial | Rf | Fraksi | Vial | Rf |
|---|---|---|---|---|---|
| **C1** | **1-15** | Kosong | **C6** | **80-95** | $\frac{1,9\ cm}{8\ cm} = 0,23$ |
| **C2** | **16-24** | $\frac{4,4\ cm}{8\ cm} = 0,55$<br>$\frac{6,8\ cm}{8\ cm} = 0,85$ | **C7** | **96-115** | $\frac{0,7\ cm}{8\ cm} = 0,08$<br>$\frac{1,3\ cm}{8\ cm} = 0,16$ |
| **C3** | **25-34** | $\frac{3,1\ cm}{8\ cm} = 0,39$<br>$\frac{4,4\ cm}{8\ cm} = 0,55$<br>$\frac{6,8\ cm}{8\ cm} = 0,85$ | **C8** | **116-190** | $\frac{0,7\ cm}{8\ cm} = 0,08$ |
| **C4** | **35-49** | $\frac{3,1\ cm}{8\ cm} = 0,39$<br>$\frac{4,4\ cm}{8\ cm} = 0,55$ | **C9** | **191-201** | kosong |
| **C5** | **50-79** | $\frac{1,9\ cm}{8\ cm} = 0,23$<br>$\frac{3,1cm}{8\ cm} = 0,39$ | | | |

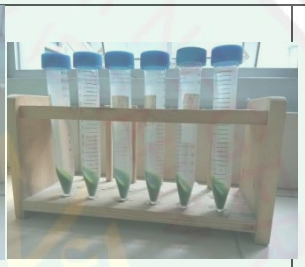
CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## Lampiran 4 Dokumentasi Penelitian

### L.4.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | |
| Tauge | Perebusan tauge | Ekstrak tauge | MET 4% |

### L.4.2 Pemanenan Biomassa *Chlorella* sp.

| | | | |
|---|---|---|---|
| | |  | |
| Pengumpulan biomassa *Chlorella* sp. | Biomassa sebelum di*sentrifuge* | Biomassa setelah di*sentrifuge* | Pengumpulan biomassa yang telah di*sentrifuge* |

### L.4.4 Preparasi Biomassa Mikroalga *Chlorella* sp.

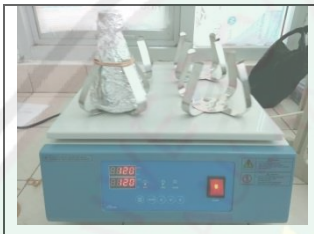
| | |
|---|---|
| | |
| Biomassa *Chlorella* sp. yang dikeringanginkan | Biomassa kering |

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

### L.4.5 Analisis Kadar Air

| | |
|---|---|
| | |
| Cawan kosong dalam desikator | Cawan berisi sampel dalam desikator |

### L.4.6 Ekstraksi Maserasi

| | | |
|---|---|---|
|  | | |
| Pengadukan dengan shaker | Penyaringan ekstrak dengan corong *buchner* | Ekstrak matanol mikroalga *Chlorella* sp. |

### L.4.7 Hidrolisis

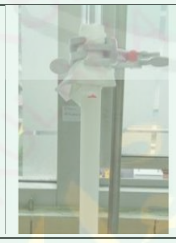
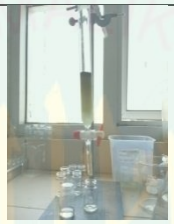
| | |
|---|---|
| | |
| Hidrolisis dengan HCl 2 N | Penetralan hingga pH 7 |

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

### L.4.8 Partisi

| | |
|---|---|
| | |
| Proses partisi ekstrak hasil hidrolisis | Pemisahan fase organic dengan fase air |

### L.4.9 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom Basah

| | | | |
|---|---|---|---|
| |  |  | |
| Pembuatan bubur silika | Preparasi fase diam | Proses elusi | Vial-vial penampungan |

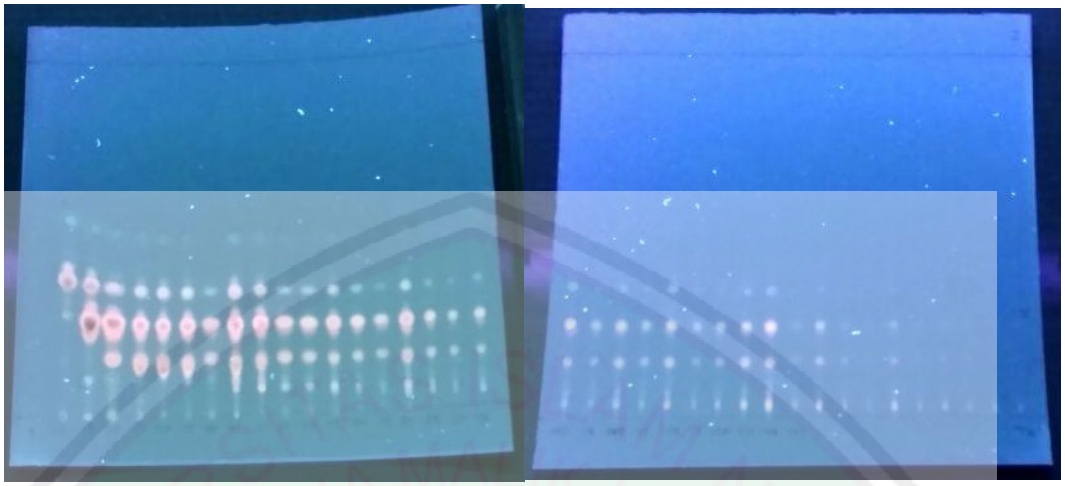
### L.4.10 Pengelompokan Fraksi

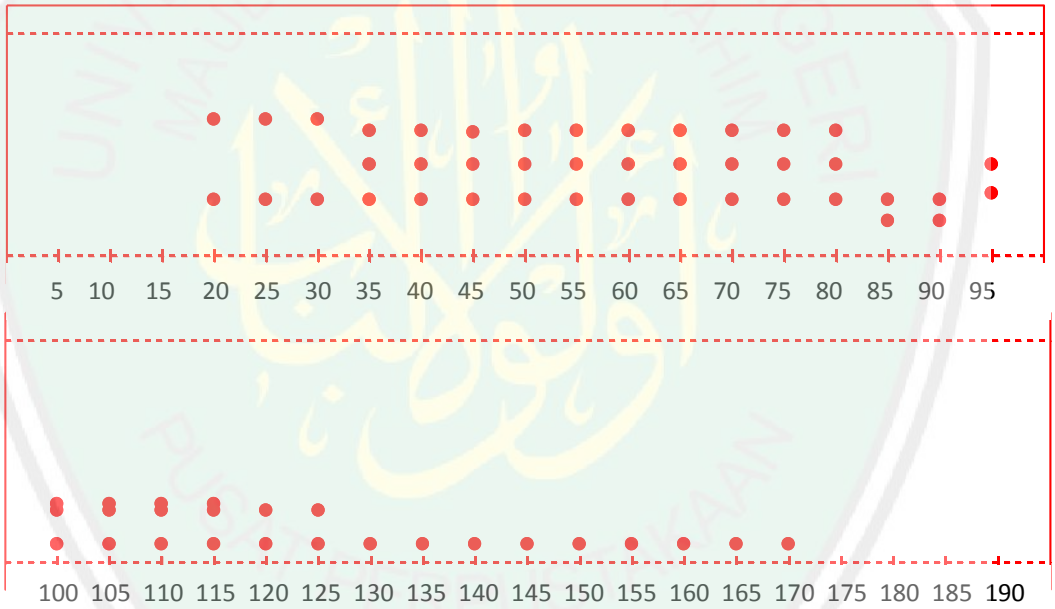
| |
|---|
| |
| Pengelompokan fraksi-fraksi |

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## L.4.11 Monitoring Hasil Pemisahan

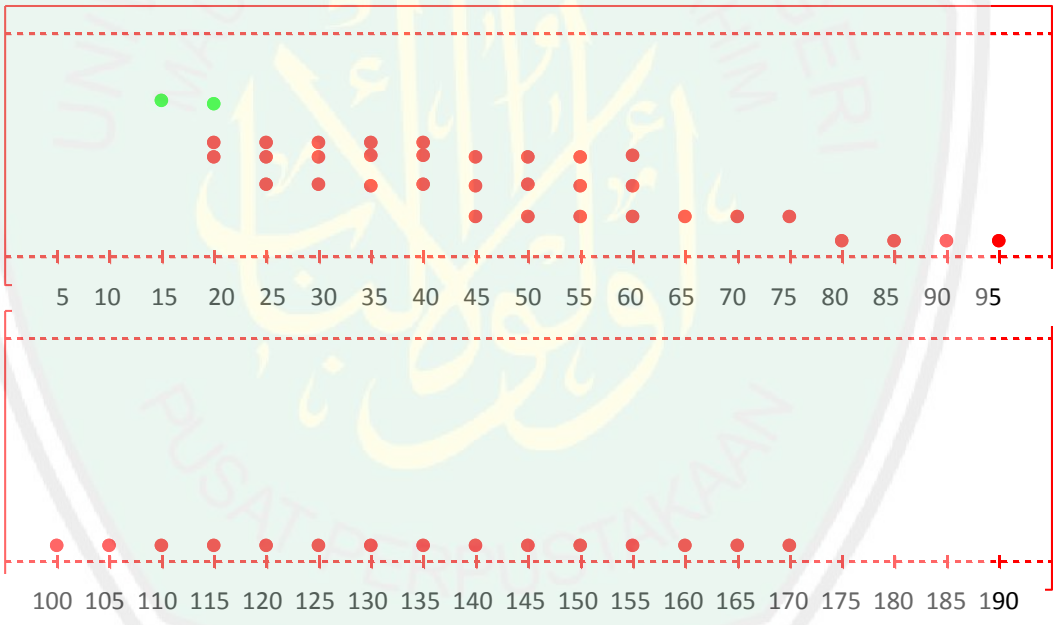
### A. Monitoring Perbandingan 1:200





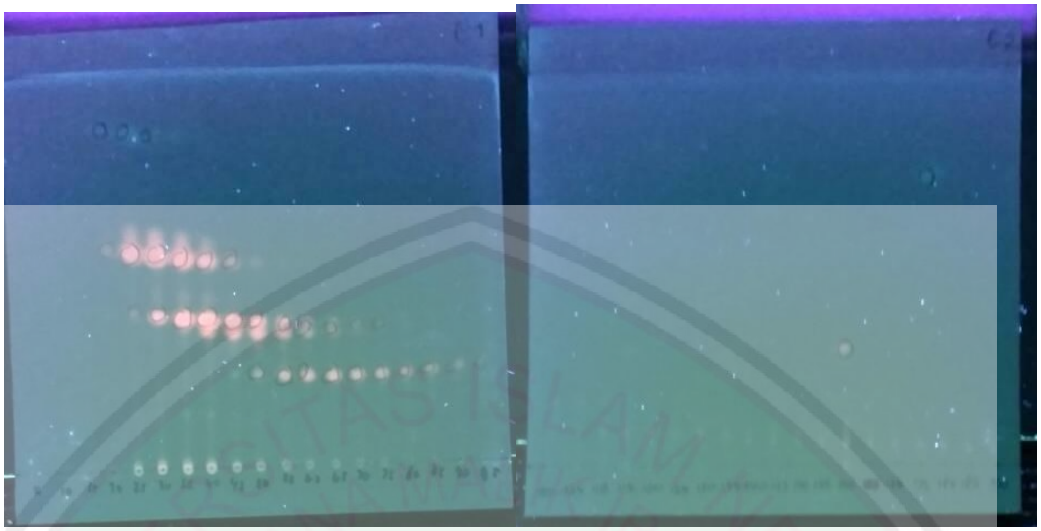

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

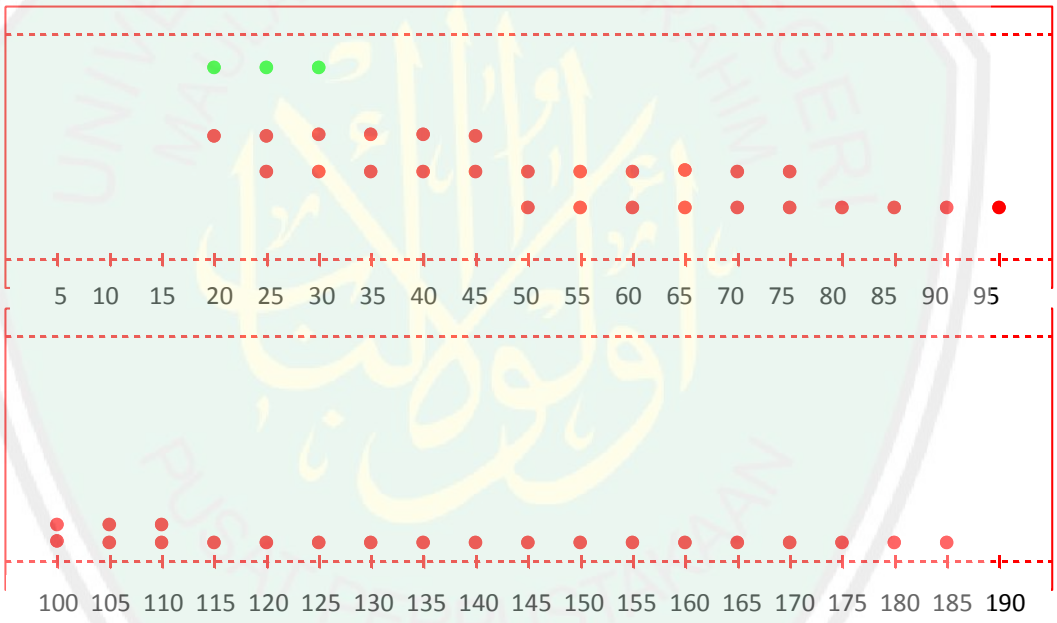
**B. Monitoring Perbandingan 1:150**




CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

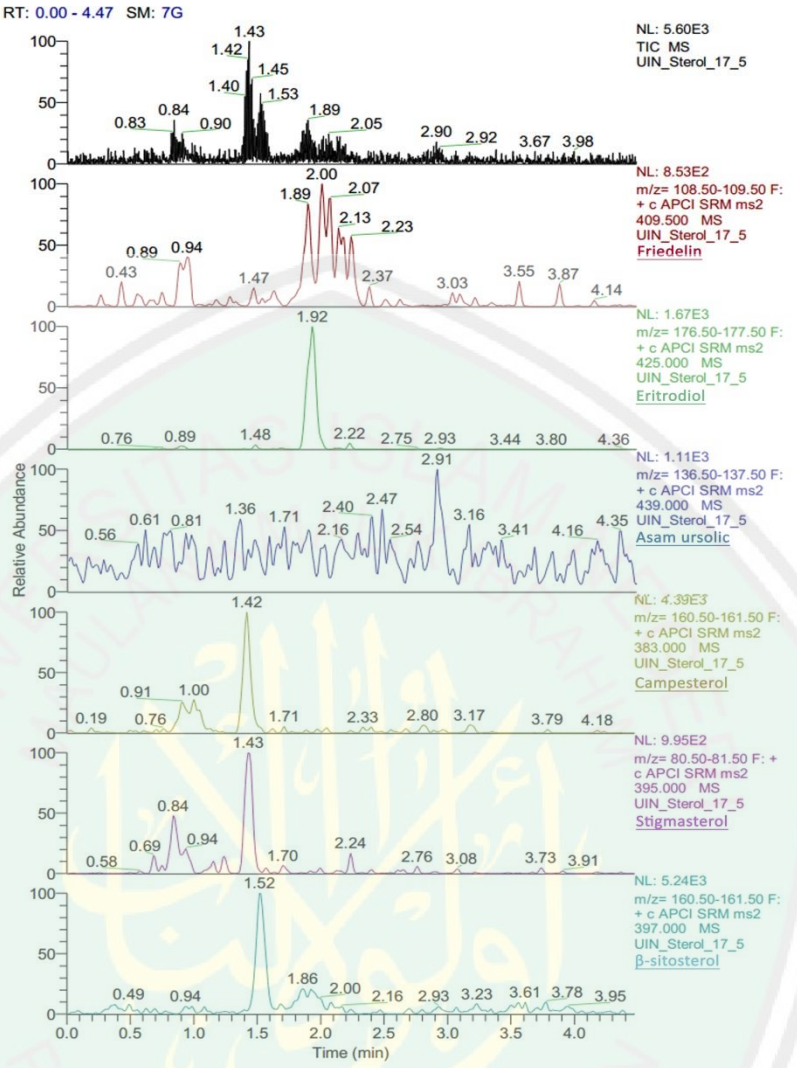
**C. Monitoring Perbandingan 1:100**






CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

## Lampiran 5 Spektra LC-APCI-MS

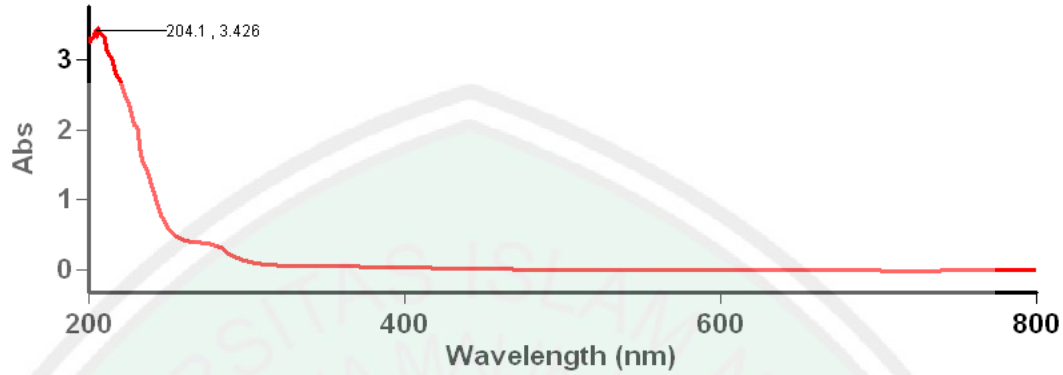



CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

**Lampiran 6 Spektra UV-Vis**

# Lamdha Maks Isolat Steroid

Tanggal Analisa : 05 Juni 2017




## Scan Analysis Report

```
Report Time : Mon 05 Jun 02:20:57 PM 2017
Method:
Batch: D:\Iyani\Lamdha Maks Steroid (05-06-2017).DSW
Software version: 3.00(339)
Operator: Rika
```

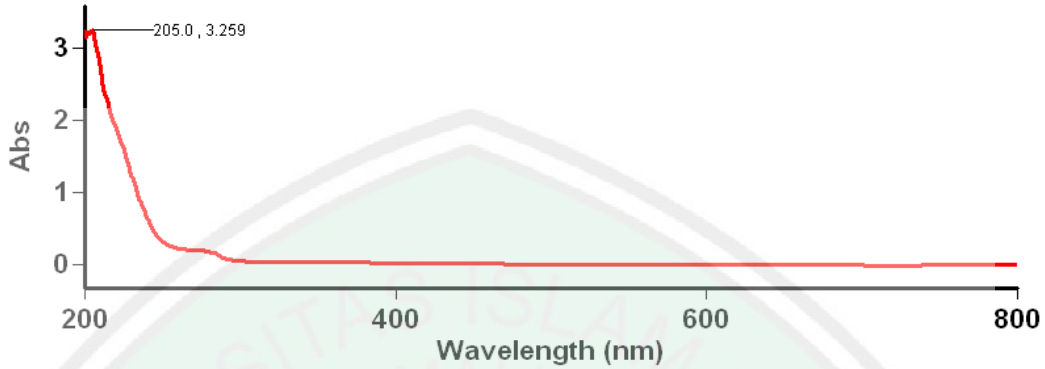
### Sample Name: Steroid

```
Collection Time                 6/5/2017 2:21:36 PM

Peak Table
Peak Style                      Peaks
Peak Threshold                  0.0100
Range                           800.0nm to 200.0nm

Wavelength (nm)       Abs
_____________________________
     670.0            0.009
     205.9            3.455
     204.1            3.426
```

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

# Lamdha Maks Isolat Triterpen

Tanggal Analisa : 05 Juni 2017




## Scan Analysis Report

Report Time : Mon 05 Jun 02:23:50 PM 2017
Method:
Batch: D:\Iyani\Lamdha Maks Triterpen (05-06-2017).DSW
Software version: 3.00(339)
Operator: Rika

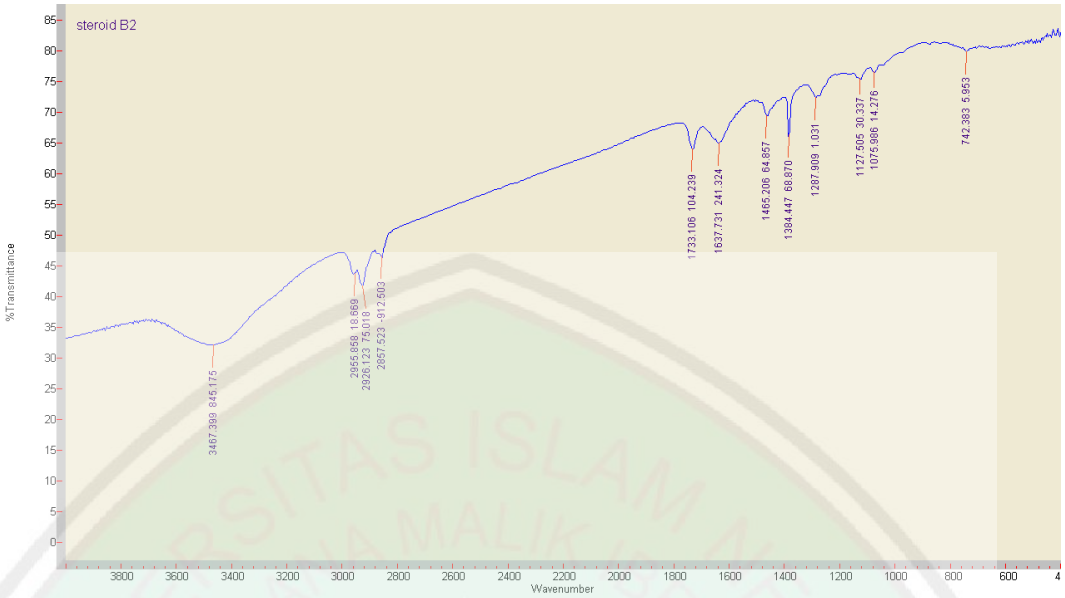
### Sample Name: Triterpen

| | |
|---|---|
| Collection Time | 6/5/2017 2:24:24 PM |
| Peak Table | |
| Peak Style | Peaks |
| Peak Threshold | 0.0100 |
| Range | 800.0nm to 200.0nm |

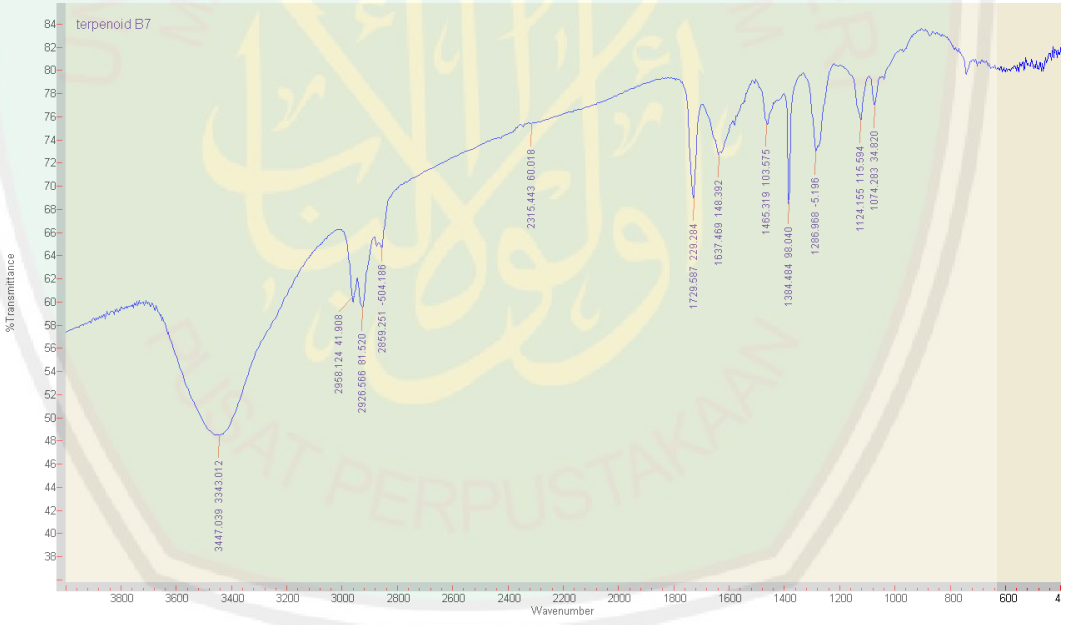
| Wavelength (nm) | Abs |
|---|---|
| 632.9 | 0.005 |
| 205.0 | 3.259 |
| 202.0 | 3.225 |

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG

**Lampiran 7 Spektra IR**




Spektra IR senyawa steroid mikroalga *Chlorella* sp. fraksi petroleum eter




Spektra IR senyawa triterpenoid mikroalga *Chlorella* sp. fraksi petroleum eter

CENTRAL LIBRARY OF MAULANA MALIK IBRAHIM STATE ISLAMIC UNIVERSITY OF MALANG