

**UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI
KOLOM FRAKSI ETIL ASETAT MIKROALGA *Chlorella* sp.**

SKRIPSI

Oleh:
BA'ITSATUL MAJIDAH
NIM. 14630068



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2019**

**UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI
KOLOM FRAKSI ETIL ASETAT MIKROALGA *Chlorella* sp.**

SKRIPSI

Oleh:
BA'ITSATUL MAJIDAH
NIM. 14630068

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
2019**

**UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI
KOLOM FRAKSI ETIL ASETAT MIKROALGA *Chlorella* sp.**

SKRIPSI

Oleh:
BA'ITSATUL MAJIDAH
NIM. 14630068

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 10 Desember 2018

Pembimbing I


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

Pembimbing II


Romaidi, M.Si, D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

**Mengetahui,
Ketua Jurusan**



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

**UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI
KOLOM FRAKSI ETIL ASETAT MIKROALGA *Chlorella* sp.**

SKRIPSI

Oleh:
BA'ITSATUL MAJIDAH
NIM. 14630068

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 10 Desember 2018**

Penguji Utama : Akyunul Jannah, S.Si, M.P
NIP. 19750410 20050 2 009

(.....)

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

(.....)

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

(.....)

Anggota Penguji : Romaidi, M.Si, D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

(.....)

**Mengetahui,
Ketua Jurusan**



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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ba'itsatul Majidah
NIM : 14630068
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella* sp.

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

Malang, 20 Desember 2018

Yang membuat pernyataan,



Ba'itsatul Majidah
NIM. 14630068

MOTTO

TERUSLAH BERJALAN SAYANG...
ALLAH YANG MENGATUR DAN MENGURUS SEMUANYA

^_^



الحمد لله رب العالمين
اللهم صل على سيدنا محمد و علي ال سيدنا محمد

Saya persembahkan tulisan ini untuk :

Kedua orang tua (Bapak Mustakim dan Ibu Ibtidaiyah yang telah membimbing, mendukung, dan mendoakan saya.

Kedua saudara saya (Ahmad Habibul Wahid dan Falahul Muchtadin) yang sering menanyakan perjalanan skripsi saya sehingga lebih termotivasi untuk segera menyelesaikan skripsi.

Bapak Ibu Dosen yang telah membimbing selama kuliah di UIN Malang

Mbak Mas Laboran yang sudah seperti keluarga saya sendiri

Saudara/i *Family Love* yang selalu memberikan semangat dan menghibur saya terkait tugas akhir

Teman-teman *Chemist '14* khususnya tim *organik research* dan *Chemist Lovers* yang sering membantu proses penelitian maupun proses daftar sidang dan sebagainya.

Terima kasih untuk segalanya, semoga Allah memberikan keberkahan atas semua kerja keras yang kita lakukan. Semoga keinginan-keinginan kita semua bisa terwujud dan kita semua sukses, Aamiin ..

KATA PENGANTAR



Segala puji bagi Allah SWT karena atas rahmat, taufiq dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan laporan hasil penelitian yang berjudul “**Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella* sp.**”. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Nabi besar Muhammad SAW yang menjadi suri tauladan bagi kita semua. Penulis menyadari bahwa penyusunan laporan hasil penelitian ini tidak akan terwujud tanpa adanya bantuan dan dorongan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua yang telah memberikan dukungan baik spiritual maupun materiil.
2. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si, Bapak Ahmad Hanapi, M.Si dan Bapak Romaidi, M.Si, D.Sc selaku dosen pembimbing dan konsultan, karena atas bimbingan dan pengarahan yang diberikan, penulisan laporan hasil penelitian ini dapat terselesaikan.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si, selaku Ketua Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Seluruh Dosen pengajar kimia yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat bagi penulis.
5. Seluruh Laboran dan Staff Administrasi Jurusan Kimia yang telah membantu dalam proses penelitian.
6. Saudara-saudari *Family Love* yang selalu memberikan dukungan terhadap proses ini.
7. Teman-teman mahasiswa angkatan 2014 terutama *Team Organic Reaserch* yang telah banyak membantu penulis dan memberikan dukungan dalam menyusun laporan hasil penelitian.
8. Semua pihak yang telah membantu.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan laporan hasil penelitian ini baik dalam teknik penyajian materi maupun pembahasan. Demi kesempurnaan proposal penelitian ini, saran dan kritik yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Semoga laporan hasil penelitian ini bermanfaat dan dapat menambah ilmu pengetahuan bagi para pembaca.

Malang, Januari 2019

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
LEMBAR ORISINALITAS	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
المخلص	xvi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Batasan Masalah.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	6
BAB II KAJIAN PUSTAKA	
2.1 Pemanfaatan Mikroalga dalam Perspektif Islam	7
2.2 Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.....	8
2.2.1 Fase-Fase Pertumbuhan Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.....	10
2.2.2 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella</i> sp dalam Medium Ekstrak Tauge...	10
2.3 Ekstraksi Komponen Aktif <i>Chlorella</i> sp	11
2.3.1 Ekstraksi Maserasi	11
2.3.2 Hidrolisis dan Partisi.....	11
2.3.3 Steroid	12
2.4 Pemisahan Senyawa Steroid.....	13
2.4.1 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis.....	13
2.4.2 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom.....	14
2.5 Uji Toksisitas Senyawa Aktif Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	15
2.5.1 Morfologi Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach.....	15
2.5.2 Uji Toksisitas terhadap Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach dengan Metode BSLT	16
2.6 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.....	17
2.7 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan Spektrofotometer FT-IR	18
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	20
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	20
3.2.1 Alat.....	20
3.2.2 Bahan	20

3.3	Rancangan Penelitian	20
3.4	Tahapan Penelitian	21
3.5	Cara Kerja.....	22
3.5.1	Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	22
3.5.1.1	Sterilisasi Alat	22
3.5.1.2	Pembuatan Medium Ekstrak Tauge	22
3.5.1.3	Kultivasi <i>Chlorella sp.</i> dalam Medium Ekstrak Tauge 4%	23
3.5.1.4	Pemanenan Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp</i>	23
3.5.2	Ekstraksi Komponen Aktif.....	23
3.5.2.1	Ekstraksi Maserasi Mikroalga <i>Chlorella sp</i>	23
3.5.2.2	Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp</i>	24
3.5.2.3	Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp</i>	24
3.5.3	Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom Basah ...	24
3.5.4	Monitoring dengan KLT-A	25
3.5.5	Uji Toksisitas Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp</i> terhadap Larva Udang <i>Artemia Salina</i> Leach	25
3.5.5.1	Penetasan Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach.....	25
3.5.5.2	Uji Toksisitas.....	26
3.5.6	Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis	27
3.5.7	Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer FTIR	27
3.5.8	Analisis Data	27
 BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Kultivasi dan Pemanenan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	29
4.2	Ekstraksi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	29
4.2.1	Ekstraksi Maserasi	29
4.2.2	Hidrolisis dan Partisi.....	31
4.3	Pemisahan Steroid <i>Chlorella sp.</i> dengan Kromatografi Kolom Basah dan Monitoring KLTA	32
4.4	Uji Toksisitas Isolat Steroid dengan Metode BSLT.....	34
4.5	Identifikasi Isolat dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	35
4.6	Identifikasi Isolat dengan menggunakan Spektrofotometer FTIR	37
4.7	Relevansi Hasil Penelitian dengan Perspektif Islam	42
 BAB V PENUTUP		
5.1	Kesimpulan.....	45
5.2	Saran	45
 DAFTAR PUSTAKA		
LAMPIRAN		
		46
		51

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Kurva Pertumbuhan Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	11
Gambar 2.2 Spektra senyawa steroid hasil isolasi mikroalga <i>chlorella</i> sp. fraksi petroleum eter	20
Gambar 4.1 Spektra UV-Vis isolat steroid fraksi A	37
Gambar 4.2 Spektra IR isolat steroid fraksi A	38
Gambar 4.3 Spektra UV-Vis Isolat steroid fraksi D	39
Gambar 4.4 Spektra IR isolat steroid fraksi D	40
Gambar 4.5 Spektra UV-Vis Isolat steroid fraksi F	41
Gambar 4.6 Spektra IR isolat steroid fraksi F	42



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Nilai LC ₅₀ ekstrak berpotensi sebagai senyawa bioaktif	19
Tabel 4.1 Pengelompokan fraksi hasil isolasi menggunakan kromatografi kolom.....	34
Tabel 4.2 Nilai LC ₅₀ hasil isolat steroid.....	36
Tabel 4.3 Interpretasi spektra IR isolat steroid fraksi A	38
Tabel 4.4 Interpretasi spektra IR isolat steroid fraksi D	40
Tabel 4.5 Interpretasi spektra IR isolat steroid fraksi F	42



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Diagram alir penelitian	51
Lampiran 2 Skema Kerja	52
Lampiran 3 Perhitungan, pembuatan reagen dan larutan.....	57
Lampiran 4 Perhitungan Uji Toksisitas.....	61
Lampiran 5 Dokumentasi Penelitian.....	64



ABSTRAK

Majidah, B. 2018. **Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi Etil Asetat Mikrolalga *Chlorella* sp.** Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Romaidi, M.Si, D.Sc; Konsultan: Ahmad Hanapi, M.Sc
Kata Kunci: *Chlorella* sp., steroid, toksisitas, UV-Vis, FTIR

Steroid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella* sp. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil pemisahan senyawa steroid fraksi etil asetat menggunakan kromatografi kolom basah dengan variasi gradien eluen n-heksana dan etil asetat. Sampel kering *Chlorella* sp. diekstraksi maserasi dengan pelarut metanol. Ekstrak pekat hasil maserasi dihidrolisis dengan HCl 2N dan dipartisi dengan pelarut etil asetat. Senyawa steroid pada pelarut etil asetat dipisahkan dengan kromatografi kolom basah dengan perbandingan eluen n-heksana:etil asetat (95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30). Monitoring dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Isolat tunggal steroid diuji toksisitasnya menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* dengan parameter nilai LC_{50} . Identifikasi senyawa aktif dilakukan dengan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. Pemisahan senyawa steroid dengan kromatografi kolom fraksi etil asetat menghasilkan 3 fraksi steroid. Tiga fraksi steroid diuji toksisitasnya menghasilkan nilai LC_{50} secara berturut-turut sebesar 5,26; 8,03; dan 5,34 ppm. Identifikasi fraksi tunggal steroid menggunakan Spektrofotometer UV-Vis menghasilkan serapan maksimum pada panjang gelombang 276 nm. Sedangkan identifikasi dengan FTIR menunjukkan gugus fungsi $-OH$, $-CH_2-$, $-(CH_2)_2$, $C=C$ tidak terkonjugasi dan $-CH(CH_3)_2$.

ABSTRACT

Majidah, B. 2018. **Toxicity Test of Steroids Isolate from Column Chromatography in Microalgae *Chlorella* sp. Ethyl Acetate Fraction.** Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Supervisor II: Romaidi, M.Si, D.Sc; Consultan: Ahmad Hanapi, M.Sc

Keywords: *Chlorella* sp., steroids, toxicity, UV-Vis, FTIR

Steroid is one of the secondary metabolite compounds contained in microalgae *Chlorella* sp. This research aims to know the results of steroid compounds separation in ethyl acetate fraction using wet column chromatography with variation of eluent gradient. Dry sample of *Chlorella* sp. was extracted by maceration extraction with methanol solvent. The concentrated extract was hydrolyzed by HCl 2N and partitioned with ethyl acetate solvent. The steroid compound was separated with wet column chromatography by eluent that comparison of n-hexane: ethyl acetate (95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30). Monitoring is done by Thin Layer Chromatography (TLC). The single steroid fraction was toxicity tested using *Brine Shrimp Lethality Test* with LC₅₀ values of parameters. The identification of active compounds is carried out by UV-Vis Spectrophotometer and FTIR. Separation of steroids compounds by column chromatography in ethyl acetate fraction obtained 3 fraction of steroid. The result of toxicity test by three isolates result LC₅₀ values respectively was 5,26; 8,03; and 5,34 ppm. Identification of steroids isolate fraction using spectrophotometer UV-Vis showed maximum wavelength in 276 nm. Based on FTIR analysis of steroids isolate fraction showing that the compound have functional groups of –OH, –CH₂–, –(CH₂)₂, C=C not conjugated, and –CH(CH₃)₂.

الملخص

المجيدة, باعثة ٢٠١٨. اختبار السمية في عزل الستيرويد ينتج من العمود اللوني جزء من إيثيل أسيتات في طحالب *Chlorella sp.* المقالة. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية، بمالانج. المؤدب الأول: أحمد غنائم فشى الماجستير؛ المؤدب الثاني: الدكتور رميدي الماجستير؛ المستشار: أحمد حنفي الماجستير.

كلمات البحث : *Chlorella sp.*، الستيرويد، السمية، الطيفي للأشعة فوق البنفسجية، تحويل فورية الأشعة تحت الحمراء

الستيرويد هو أحد من مركبات المستقبلات الثانوية الموجودة في طحالب *Chlorella sp.* الهدف من هذه البحث لتدريك نتائج فصل مركبات الستيرويد جزء من أتيل أسيتات باستخدام العمود اللوني الرطب بتغيرات تدرجات التداخل. تستخرج عينة جافة من *Chlorella sp.* نقاعة بالميثانول. تحلل مقتطف المركز بإيثيل أسيتات. فصل مقتطف الأقسام بواسطة العمود اللوني الرطب مع نسبة التداخل إيثيل أسيتات : ن-هيكسانا ٩٥:٥؛ ٩٠:١٠؛ ٨٥:١٥؛ ٨٠:٢٠؛ ٧٥:٢٥؛ ٧٠:٣٠). تم المراقبة بواسطة كروماتوغرافيا طبقة رقيقة (TLC). تم اختبار السمية لنتائج العزلة المنفردة باستخدام طريقة اختبار جاذبية الروبيان المالح (*Brine Shrimp Lethality Test*) مع معلمة القيمة من LC_{50} . تحديد المركبات النشطة باستخدام مقياس الطيفي للأشعة فوق البنفسجية وتحويل فورية الأشعة تحت الحمراء. فصل مركبات الستيرويد باستخدام العمود اللوني جزء من إيثيل أسيتات ينتج ٣ أجزاء الستيرويد و ١ جزء تريترينويد. أنتجت اختبار السمية لثلاثة أجزاء الستيرويد قيمة LC_{50} على التوالي من ٥.٢٦؛ ٨.٠٣ و ٥,٣٤ جزءًا من المليون (ppm). تحديد جزء الستيرويد باستخدام مقياس الطيفي للأشعة فوق البنفسجية أنتجت أقصى امتصاص في الطول الموجي ٢٧٦ نانومتر. في حين أن تحديد مقياس الطيف الضوئي تحويل فورية الأشعة تحت الحمراء يظهر مجموعات الوظيفية من $-OH$ ، $-CH_2-$ ، $-(CH_2)_2$ ، $C=C$ غير مقترن و $-CH(CH_3)_2$.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Allah berfirman dalam Qur'an Surah an Nahl ayat 14:

وَهُوَ الَّذِي سَخَّرَ الْبَحْرَ لِتَأْكُلُوا مِنْهُ لَحْمًا طَرِيًّا وَ تَسْتَخْرِجُوا مِنْهُ حِلْيَةً تَلْبَسُونَهَا وَ تَرَى الْفُلْكَ مَوَاجِرَ
فِيهِ وَ لَتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ وَ لَعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ

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

Kata *لَتَبْتَغُوا* memiliki arti “untuk mencari”. Sedangkan *مِنْ فَضْلِهِ* menunjukkan arti “dari karunia atau keutamaan”. Apabila digabungkan dari *لَتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ* ditafsirkan sebagai perintah Allah kepada manusia untuk mencari keutamaan-keutamaan yang terdapat di dalam lautan dan mengambil manfaat darinya (Al-Qurtubi, 2008). Sedangkan menurut Shihab (2012), Allah SWT menundukkan lautan agar manusia mencari rezeki yang telah dikaruniakan-Nya dengan cara berniaga atau cara-cara lainnya. Salah satu karunia Allah yang memiliki keutamaan adalah mikroalga *Chlorella* sp. *Chlorella* sp. hidup sebagai plankton dalam air tawar, air laut, kulit pohon dan tembok yang basah.

Chlorella sp. merupakan mikroalga bersel satu yang memiliki kandungan 51 – 58 % protein, 12 – 26 % karbohidrat, 2 – 22 % lemak, dan 4 – 5 % asam nukleat (Kawaroe 2010). Anggraeni, dkk (2014) melakukan uji aktivitas

antioksidan terhadap ekstrak metanol *Chlorella* sp. fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter dan n-heksana menghasilkan nilai EC_{50} secara berturut-turut sebesar 1.334; 332,7; 182; 27,26, dan 173,7 ppm. Kemudian dilakukan uji fitokimia yang menghasilkan bahwa dalam masing-masing ekstrak terkandung senyawa steroid dan asam askorbat. Sedangkan Rahmawati (2016) melaporkan hasil isolat steroid memiliki nilai EC_{50} 73,82 ppm. Uji toksisitas terhadap isolat steroid *Chlorella* sp. fraksi petroleum eter dilakukan oleh Millati (2016) diperoleh LC_{50} 19,68 ppm. Berdasarkan kandungan dan manfaat *Chlorella* sp., maka perlu dilakukan pembudidayaan dan isolasi agar *Chlorella* sp. dapat dimanfaatkan secara massal dan berkelanjutan.

Salah satu metode untuk isolasi senyawa steroid dari *Chlorella* sp. adalah kromatografi kolom basah. Handoko (2016) memisahkan steroid fraksi petroleum eter dari *Chlorella* sp. dengan kromatografi kolom basah dan kering menunjukkan bahwa metode basah menghasilkan fraksi murni yang lebih banyak. Ukuran kolom yang digunakan merujuk pada penelitian Sakdiyah (2017) yang menggunakan kolom dengan panjang 50 cm dan diameter 1 cm. Sedangkan perbandingan rasio sampel dan silika gel adalah 1:150 yang menghasilkan 1 fraksi steroid dan 2 fraksi triterpenoid (Iyani, 2017). Variasi laju alir dalam memisahkan steroid *Chlorella* sp. dilakukan oleh Rahmawati (2017) yang melaporkan laju alir terbaik adalah 1,5 mL/menit memperoleh 1 fraksi steroid dan 2 fraksi triterpenoid.

Pemilihan variasi eluen juga berpengaruh terhadap keoptimalan pemisahan menggunakan kromatografi kolom basah. Mawarti (2017) menggunakan perbandingan eluen n-heksana:etil asetat (18:2) dalam memisahkan steroid pada Alga merah (*Eucheuma spinosum*) mendapatkan 1 fraksi murni steroid dan 2

fraksi triterpenoid. Nisa' (2017) menggunakan eluen n-heksana:etil asetat (9:1) dalam memisahkan steroid *Chlorella* sp. mendapatkan 1 fraksi steroid dan 3 fraksi triterpenoid. Luki (2017) melakukan isolasi steroid Alga merah (*Eucheuma spinosum*) dengan variasi gradien eluen n-heksana:etil asetat (90:10; 80:20; 70:30; 60:40) mendapatkan 2 fraksi steroid pada eluen (90:10 dan 80:20). Variasi gradien eluen bertujuan untuk memaksimalkan pemisahan senyawa karena terdapat perubahan kepolaran fase gerak sehingga diperoleh senyawa yang lebih murni (Sherikar, 2013).

Pemisahan senyawa steroid yang telah dilakukan dengan kromatografi kolom kemudian diuji aktivitas toksiknya. Salah satu metode uji toksisitas adalah metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dimana tingkat toksisitas senyawa ditentukan dengan nilai LC_{50} (Atta-ur-Rahman, dkk, 2001). Hewan uji yang digunakan adalah larva udang *Artemia salina* Leach. Metode BSLT dilakukan dengan penetasan larva udang, pembuatan larutan uji dan proses pengujian. Data yang diperoleh kemudian dianalisis probit menggunakan program MINITAB14 (Abdillah, dkk, 2013). Syofiyah (2016) melaporkan isolat steroid mikroalga *Chlorella* sp. hasil KLTP pada fraksi etil asetat memiliki nilai LC_{50} sebesar 14,9625 ppm.

Beberapa peneliti sebelumnya telah mengidentifikasi steroid menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR. Laili (2016) mengidentifikasi steroid ekstrak metanol alga merah dengan Spektrofotometer UV-Vis diperoleh λ_{max} 202,0 nm yang diduga sebagai steroid β -sitosterol. Sedangkan Iyani (2017) mengidentifikasi isolat steroid *Chlorella* sp. memperoleh panjang gelombang maksimum isolat pada 204 dan 205 nm. Kemudian identifikasi dengan FTIR pada

isolat steroid *Chlorella* sp. dilakukan oleh Handoko (2016) menghasilkan adanya serapan C=C, C=O, C-OH tersier, -OH, dan gemina dimetil yang diduga steroid fitosterol. Penelitian yang sama dilakukan oleh Iyani (2017) menghasilkan adanya serapan -OH, -CH₃, -CH₂-, C=C non konjugasi, -(CH₂)₂, dan -CH(CH₃)₂.

Berdasarkan latar belakang tersebut, akan dilakukan pemisahan senyawa steroid *Chlorella* sp. dari fraksi etil asetat menggunakan kromatografi kolom dengan variasi gradien eluen n-heksana dan etil asetat untuk mengoptimalkan pemisahan senyawa. Fraksi hasil kromatografi kolom dimonitoring dengan KLTA. Noda hijau kebiruan yang menunjukkan senyawa steroid diuji toksisitasnya menggunakan metode BSLT dan diidentifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana hasil pemisahan senyawa steroid fraksi etil asetat menggunakan kromatografi kolom dengan variasi gradien eluen?
2. Berapa tingkat toksisitas isolat steroid fraksi etil asetat dari mikroalga *Chlorella* sp.?
3. Bagaimana hasil identifikasi senyawa steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui hasil pemisahan senyawa steroid fraksi etil asetat menggunakan kromatografi kolom dengan variasi gradien eluen
2. Untuk mengetahui tingkat toksisitas senyawa steroid fraksi etil asetat dari mikroalga *Chlorella* sp.
3. Untuk mengetahui hasil identifikasi gugus fungsi dan λ_{\max} senyawa steroid fraksi etil asetat.

1.4 Batasan Masalah

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. dalam medium ekstrak taube (MET) 4%
3. Ekstraksi steroid dari *Chlorella* sp. dilakukan dengan ekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol
4. Partisi *Chlorella* sp. menggunakan pelarut etil asetat
5. Isolasi steroid menggunakan kromatografi kolom basah dengan ukuran diameter kolom 1 cm dan eluen n-heksana:etil asetat.
6. Perbandingan eluen antara n-heksana dan etil asetat adalah 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25 ; 70:30.
7. Uji toksisitas dengan metode BSLT
8. Identifikasi gugus fungsi senyawa steroid menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai hasil pemisahan senyawa steroid mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan kromatografi kolom dengan variasi gradien eluen dan tingkat toksisitasnya terhadap *Artemia salina* Leach. Selain itu dapat memberikan informasi mengenai identifikasi gugus fungsi dan λ_{\max} senyawa steroid pada fraksi etil asetat.



BAB II

KAJIAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga *Chlorella* sp.

Al Qur'an merupakan salah satu mukjizat yang diberikan oleh Allah kepada Nabi Muhammad untuk dijadikan sebagai pedoman hidup umat manusia. Dalam beberapa ayat, Al Qur'an memberikan petunjuk tentang alam semesta. Alam semesta terbentang sangat luas, memiliki pergerakan yang teratur, dan tertata rapi dalam setiap urusannya. Isyarat-isyarat tersebut menunjukkan bukti atas kekuasaan Allah yang tidak terbatas. Fiman Allah dalam Qur'an Surah ad-Dukhan ayat 38-39 :

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا لَاعِبِينَ (٣٨) مَا خَلَقْنَاهُمَا إِلَّا بِالْحَقِّ وَلَكِنَّ أَكْثَرَهُمْ لَا يَعْلَمُونَ (٣٩)

“Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada diantara keduanya dengan bermain-main. Kami tidak menciptakan keduanya melainkan dengan haq, tetapi kebanyakan mereka tidak mengetahui.”

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah tidak menciptakan langit dan bumi serta apa saja yang ada di antara keduanya tanpa mengandung hikmah (Shihab, 2012). Setiap kehidupan yang ada di bumi dan segala kejadian di langit terdapat ketentuan-ketentuan yang berlaku baginya. Salah satu ciptaan Allah yang memiliki hikmah adalah diciptakannya organisme berukuran kecil seperti mikroalga. Berbagai spesies mikroalga yang terdapat di seluruh muka bumi ini merupakan tanda-tanda kekuasaan Allah yang dapat dijadikan sebagai bahan pemikiran dalam rangka mengagumi kekuasaan dan kebesaran Allah SWT.

Mikroalga merupakan tumbuhan renik yang berukuran mikroskopik yang tergolong dalam kelas alga dan hidup sebagai koloni maupun sel tunggal di seluruh perairan tawar maupun laut. Morfologi mikroalga berbentuk uniseluler atau multiseluler tetapi belum ada pembagian fungsi organ yang jelas pada sel-sel komponennya. Hal tersebut yang membedakan mikroalga dari tumbuhan tingkat tinggi (Mega, 2016).

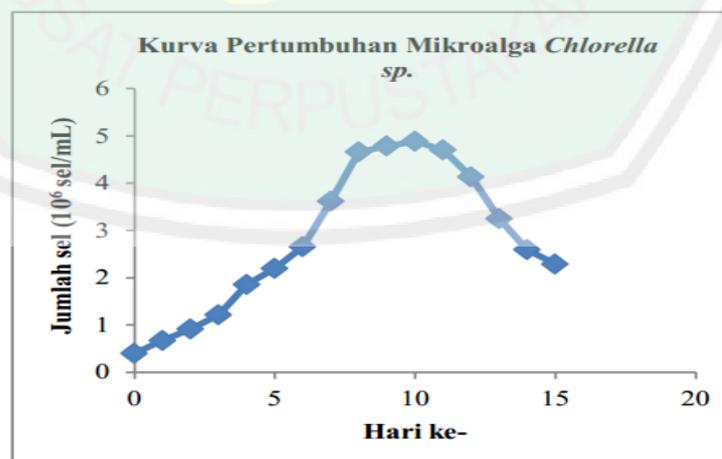
Beberapa penelitian yang telah dilakukan membuktikan bahwa mikroalga memiliki beraneka fungsi dan manfaat. Menurut Santhosh, dkk., (2016), mikroalga dapat dijadikan sebagai produsen makanan, suplemen makanan, bahan kimia, dan bahan baku biofuel. Selain itu mikroalga dapat digunakan sebagai antioksidan, pewarna makanan, dan antimutagenik (Hosikian, dkk., 2010). Manfaat lain dari mikroalga adalah sebagai agen pengolahan limbah minyak palem dan menurunkan kadar CO₂ sehingga berperan dalam mengurangi efek *global warming* (Hariz dan Takriff, 2017).

Salah satu jenis mikroalga yang memiliki banyak manfaat adalah *Chlorella* sp. *Chlorella* sp. merupakan jenis mikroalga bersel tunggal yang masuk pada kelas *Chlorophyceae* (ganggang hijau). Sel-sel alga hijau memiliki kloroplas yang mengandung klorofil-a serta karotenoid. Pada kloroplas terdapat perinoid yang mengandung protein tinggi (Protein Sel Tunggal atau PST) (Octaviani, 2014). Selain itu, dalam sel *Chlorella* sp. terkandung 50% protein, lemak dan vitamin A, B, D, E, K (Sachlan, 1982). Sel *Chlorella* sp. berbentuk bulat dengan kloroplas menyerupai mangkuk. Klasifikasi *Chlorella* sp. menurut Bold dan Wynne (1985) adalah sebagai berikut:

Divisi : Chlorophyta
 Kelas : Chlorophyceae
 Ordo : Chlorococcales
 Family : Oocystaseae
 Genus : *Chlorella*
 Spesies : *Chlorella* sp.

2.1.1 Fase-Fase Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella* sp.

Pertumbuhan *Chlorella* sp. pada kultur terbuka dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya: cahaya, temperatur, tekanan osmosis, pH, air, salinitas, kandungan oksigen, dan aerasi (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Cahaya dibutuhkan sebagai sumber energi untuk fotosintesis. Kisaran temperatur optimal bagi pertumbuhan *Chlorella* sp. berada pada rentang suhu 25 – 30⁰ C. Peningkatan temperatur hingga batas tertentu akan merangsang aktivitas molekul, meningkatnya laju difusi dan laju fotosintesis (Sachlan, 1982). Sedangkan pH yang sesuai untuk pertumbuhan *Chlorella* sp. berkisar antara 4,5-9,3 (Prabowo, 2009). Selama pertumbuhannya mikroalga mengalami beberapa fase pertumbuhan, yaitu fase log atau eksponensial, fase penurunan laju pertumbuhan, fase stationer, dan fase kematian sesuai gambar berikut (Fasya, dkk., 2013) :



Gambar 2.1 Kurva Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella* sp (Fasya, dkk., 2013)

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

Media kultur merupakan salah satu faktor yang penting untuk pemanfaatan mikroalga. Media kultur mengandung makronutrien dan mikronutrien yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroalga. Komposisi nutrien yang lengkap dan konsentrasi nutrien yang tepat menentukan produksi biomassa dan kandungan gizi mikroalga (Setyaningsih, 1999). Medium Ekstrak Tauge dapat digunakan sebagai media alami bagi pertumbuhan mikroalga khususnya tauge kacang hijau karena mudah diperoleh, ekonomis, dan tidak menghasilkan senyawa yang berefek toksik. Tauge kacang hijau mengandung makronutrien, mikronutrien (persen kandungan), vitamin, asam amino, serta gula yang dibutuhkan bagi pertumbuhan mikroalga (Richmond, 1986). Kandungan nutrisi yang terdapat dalam 100 gram tauge kacang hijau dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi dan kandungan tauge kacang hijau per 100 gram bahan

Zat gizi	Satuan	Kandungan
Protein	g	8,47
Lemak	g	4,45
Karbohidrat	g	6,53
Serat	g	0,8
Gula	g	0,52
Kalsium	g	0,05
Kalium	g	0,35
Fosfor	g	0,13

Sumber: Tim Kesehatan Asgar (2015)

Prihantini, dkk (2007) mengkultivasi mikroalga dengan variasi konsentrasi MET. Hasil penelitian menunjukkan bahwa MET dengan konsentrasi 4% memperoleh kerapatan sel tertinggi yaitu $3,98 \times 10^6$ sel/mL. Sedangkan Fasya, dkk (2013) menentukan kelimpahan sel *Chlorella* sp. dalam medium ekstrak tauge pada tiap fase pertumbuhan diperoleh kelimpahan sel $1,8 \times 10^6$ sel/mL pada hari ke-4; $4,6 \times 10^6$ sel/mL pada hari ke-8; $4,8 \times 10^6$ sel/mL pada hari ke-10, dan

$4,7 \times 10^6$ sel/mL pada hari ke-11 sehingga pemanenan dilakukan pada hari ke-10 yang merupakan nilai kelimpahan sel tertinggi.

2.2 Ekstraksi Komponen Aktif *Chlorella* sp.

2.2.1 Ekstraksi Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi yang paling banyak digunakan (Agoes, 2007). Prinsip maserasi adalah pengikatan atau pelarutan zat aktif berdasarkan sifat kelarutannya dalam suatu pelarut (*like dissolve like*). Maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Mukhriani, 2014). Pelarut yang digunakan adalah metanol karena mudah menguap dan sering digunakan untuk melarutkan senyawa metabolit sekunder (Lenny, 2006). Selain itu Yudha (2008) melakukan ekstraksi mikroalga *Dunaliella* sp. dengan variasi pelarut, etil asetat, n-heksana, dan metanol. Randemen tertinggi diperoleh dari ekstrak metanol yang menghasilkan randemen 2,59 %. Sedangkan ekstrak etil asetat dan n-heksana menghasilkan randemen berturut-turut sebesar 1,94 % dan 1,29 %.

2.2.2 Hidrolisis dan Partisi

Hidrolisis merupakan reaksi antara suatu senyawa dengan air yang bertujuan untuk menguraikan suatu senyawa. Hidrolisis berperan memutus ikatan glikosida pada senyawa organik. Glikosida adalah senyawa yang merupakan gabungan bagian gula (glikon) yang sifatnya polar dan bagian bukan gula (aglikon) yang sifatnya polar, semipolar maupun nonpolar. Senyawa metabolit sekunder termasuk dalam senyawa aglikon sehingga dengan memutus ikatan glikosidanya akan menyebabkan senyawa tersebut bersifat lebih polar (Saifudin, 2014).

Menurut Handoko (2006) reaksi hidrolisis dengan air berlangsung sangat lambat sehingga memerlukan bantuan katalisator. HCl yang merupakan asam kuat dapat digunakan sebagai katalisator karena dapat melepaskan proton (H^+) secara sempurna di dalam air.

Partisi dilakukan untuk proses ekstraksi lebih lanjut dengan tujuan memperoleh ekstrak yang optimum sesuai dengan pelarut yang digunakan. Prinsip metode ini adalah pemisahan berdasarkan perbedaan distribusi suatu zat terhadap dua fase pelarut yang tidak saling bercampur karena memiliki tingkat kepolaran yang berbeda. Jika senyawa yang dipisahkan adalah senyawa polar, maka partisi dilakukan dengan menggunakan pelarut non polar dengan tujuan senyawa-senyawa nonpolar akan terdistribusi ke dalam fasa organik sehingga didapatkan ekstrak yang maksimum (Yazid, 2005).

2.3.3 Steroid

Steroid adalah lipid triterpenoid yang dicirikan dengan empat ring karbon yang menyatu satu sama lain "*four fused ring*" yang setiap ringnya tersusun dengan pola 6-6-6-5 (Sudarma, 2014). Menurut Lehninger (1982) steroid merupakan molekul kompleks yang larut di dalam lemak dengan empat cincin yang saling tergabung. Berdasarkan sumbernya, steroid diklasifikasikan menjadi tiga, yaitu pada hewan, tanaman, dan jamur. Pada hewan vertebrata, steroid dapat berupa kolesterol dan hormon (seks, cortico, dan anabolik). Pada serangga steroid berupa ecdysteron. Sedangkan pada tanaman dan jamur, steroid berbentuk phytosterol yang merupakan alkohol steroid dan phytokimia bahan alam yang bentuknya seperti bubuk warna putih dengan bau yang khas, tidak larut dalam alkohol dan air (Sudarma, 2014).

Steroid termasuk produk metabolit sekunder turunan triterpenoid sehingga biosintesisnya merupakan transformasi asam asetat melalui asam mevalonat dan skualen menjadi lanosterol dan sikloartenol (Sudarma, 2014). Tata nama steroid secara sistematis didasarkan pada konformasinya, apakah cis atau trans. Berdasarkan hasil penelitian, steroid dapat dimanfaatkan sebagai obat sehingga isolasi steroid banyak dilakukan oleh para ahli. Selain sebagai obat, steroid juga bermanfaat sebagai hormon hewan maupun tumbuhan yang berguna demi kelangsungan hidup organisme tersebut (Sudarma, 2014).

2.3 Pemisahan Senyawa Steroid

2.3.1 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis adalah salah satu metode pemisahan yang berdasarkan pada perbedaan distribusi molekul-molekul komponen diantara dua fase yang memiliki kepolaran yang berbeda (Hendayana, 2006). Fase diam yang digunakan, meliputi lapisan tipis silika gel, aluminium oksida, atau selulosa sebagai fase diam yang dilapiskan pada logam, kaca atau gelas. Sedangkan fase geraknya berupa pelarut campuran yang ditempatkan dalam bejana pengembang. Millati (2016) memisahkan steroid fraksi petroleum eter *Chlorella* sp. dengan KLTP menghasilkan 15 spot dengan 1 spot diduga steroid. Sedangkan Anggraeni, dkk (2014) mengidentifikasi steroid fraksi petroleum eter dengan KLTA menunjukkan ekstrak *Chlorella* sp. mengandung steroid dan asam askorbat.

2.3.2 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom Basah

Isolasi senyawa steroid dari hasil partisi dilakukan dengan metode kromatografi kolom basah. Prinsip dasar metode ini adalah pemisahan komponen

berdasarkan interaksinya terhadap fase diam dan fase gerak. Kromatografi kolom memanfaatkan sifat kepolaran molekul untuk memisahkan senyawa. Perbedaan kepolaran inilah yang menimbulkan hasil yang bervariasi sesuai dengan pergerakan molekul saat melewati kolom dimana terjadi pemisahan secara efektif senyawa satu dengan senyawa yang lain (Yazid, 2005).

Kromatografi kolom basah menggunakan fase diam berupa silika gel yang dicampurkan dengan eluen sebelum dimasukkan ke dalam kolom kromatografi. Handoko (2016) memisahkan steroid fraksi petroleum eter dengan kromatografi kolom basah dan kering. Pada kolom basah diperoleh 1 fraksi steroid dengan 4 fraksi triterpenoid dan pada kolom kering dihasilkan 1 fraksi steroid dengan 1 fraksi triterpenoid.

2.4 Uji Toksisitas Senyawa Aktif Larva Udang *Artemia salina* Leach

2.4.1 Morfologi Larva Udang *Artemia salina* Leach

Artemia adalah sejenis udang yang hidup secara planktonik di perairan laut yang kadar garamnya berkisar antara 15-300 per mil dan suhunya berkisar antara 26-31⁰C serta nilai pH antara 7,3-8,4. Keistimewaan *Artemia* sebagai plankton adalah memiliki toleransi (kemampuan beradaptasi dan mempertahankan diri) pada kisaran kadar garam yang sangat luas. Bahkan pada daerah yang tidak mampu dihuni oleh organisme lain karena kadar garamnya yang sangat tinggi (Fathiyawati, 2008). *Artemia salina* Leach bersifat fototaksis positif yang berarti menyukai cahaya, di alam hal tersebut dibuktikan dengan adanya gerakan tubuh menuju ke permukaan karena sinar matahari sebagai sumber cahaya secara alami, dimana akan selalu di permukaan saat siang hari dan

tenggelam pada malam hari. Intensitas cahaya yang terlalu tinggi dapat pula mengakibatkan respon fototaksis negatif sehingga ia akan menjauhi cahaya (Emslie, 2003).

Artemia salina Leach dewasa memiliki panjang tubuh sekitar 8-10 mm. Tubuhnya memanjang minimal terdiri dari 20 segmen yang dilengkapi 10 pasang *phyllopodia* pipih, yakni bagian tubuh yang menyerupai daun yang bergerak dengan ritme teratur. Telur *Artemia salina* Leach berbentuk bulat berlekuk dalam keadaan kering dan bulat penuh dalam keadaan basah. Warna telur coklat yang diselubungi oleh cangkang yang tebal dan kuat untuk melindungi embrio terhadap pengaruh kekeringan, benturan keras, sinar ultraviolet dan mempermudah pengapungan (Opinion, 2008).

2.4.2 Uji Toksisitas terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach dengan Metode BSLT

Uji toksisitas merupakan salah satu teknik uji *in vivo*, yaitu pengamatan atau percobaan yang dilakukan pada jaringan hidup organisme secara keseluruhan pada lingkungan yang terkontrol. Uji toksisitas digunakan sebagai penapisan awal terhadap senyawa aktif yang terkandung dalam suatu ekstrak. Menurut Meyer, dkk, (1982) metode ini relatif cepat, murah, sederhana, jumlah organisme banyak dan memenuhi kebutuhan validasi statistik dengan sampel yang sedikit. Secara umum senyawa yang bersifat sitotoksik akan menunjukkan sifat toksiknya terhadap *Artemia salina* Leach. *Artemia salina* Leach dilaporkan mampu menentukan toksisitas dengan konsentrasi yang menyebabkan 50% anggota populasi hewan uji mati (LC₅₀) terhadap senyawa yang telah dilaporkan sebagai racun dan ekstrak tanaman.

Tahapan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) di antaranya: penetasan telur *Artemia salina* Leach, pembuatan larutan uji dan proses pengujian. Penetasan telur dilakukan dengan memasukkan telur *Artemia salina* Leach ke dalam air laut sambil diaerasi. Larva udang *Artemia salina* Leach sangat peka terhadap lingkungannya dan berkembang pesat menyerupai sel kanker. Dengan dilakukan uji senyawa terhadap *Artemia salina* Leach diharapkan senyawa tersebut menyebabkan kematian hewan uji melalui proses difusi dan transpor aktif. Senyawa ini menghambat daya makan *Artemia salina* Leach dengan berperan sebagai racun perut yang menyerang sistem pencernaan dengan mengganggu reseptor perasa pada mulut *Artemia salina* Leach sehingga larva tidak mampu mengenali makanannya dan menyebabkan larva mati kelaparan (Widyastuti, 2008).

Menurut Cahyono (2004) sifat toksik suatu senyawa dapat ditentukan dengan mengetahui jumlah kematian larva *Artemia salina* Leach menggunakan parameter *Lethal Concentration 50* (LC₅₀). LC₅₀ merupakan konsentrasi suatu zat yang dinyatakan dalam miligram zat per meter kubik media uji (*part per million* atau ppm) yang mampu menyebabkan kematian 50 % pada hewan uji dalam waktu tertentu. Suatu zat dapat dikatakan bersifat toksik jika harga LC₅₀ < 1000 µL/mL (Fathiyawati, 2008). Tingkatan toksik senyawa akan menunjukkan kemampuan aktivitasnya sebagai antitumor. Menurut Meyer, dkk (1982) penentuan potensi bioaktif dilakukan dengan membandingkan nilai LC₅₀ suatu ekstrak sampel dengan ketentuan sebagai berikut:

Tabel 2.1 Nilai LC₅₀ ekstrak berpotensi sebagai senyawa bioaktif

LC ₅₀ (ppm)	Potensi
< 30	Antitumor atau antikanker
30 – 200	Antibakteri
200 > x < 1.000	Pestisida

2.6 Identifikasi Steroid dengan Spektrofotometer UV –Vis

Spektrometri merupakan metode pengukuran yang didasarkan pada interaksi radiasi elektromagnetik dengan materi berupa molekul. Akibat dari interaksi ini menyebabkan energi diserap dan dipancarkan oleh molekul dan dihubungkan pada konsentrasi analit dalam larutan. Prinsip dasar dari spektrofotometer UV-Vis adalah ketika molekul menyerap radiasi UV atau *visible* dengan panjang gelombang tertentu, maka elektron akan mengalami transisi atau tereksitasi dari tingkat energi yang lebih rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi dan sifatnya karakteristik pada tiap senyawa. Penyerapan cahaya dari sumber radiasi oleh molekul dapat terjadi apabila energi radiasi yang dipancarkan pada atom analit besarnya tepat sama dengan perbedaan tingkat energi transisi elektronnya (Rudi, dkk., 2004).

Molekul-molekul yang memerlukan lebih banyak energi untuk promosi elektron akan menyerap sinar pada panjang gelombang yang lebih pendek. Sedangkan molekul yang memerlukan energi lebih sedikit akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih panjang. Senyawa yang menyerap cahaya dalam daerah tampak mempunyai elektron yang lebih mudah ditransisikan (Herliani, 2008). Etika dan Suryelita (2014) melaporkan bahwa isolat steroid daun mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) pada fraksi n-heksana memiliki panjang gelombang maksimum 203 nm. Sedangkan Iyani (2017) mengidentifikasi bahwa

isolat steroid *Chlorella* sp. fraksi petroleum eter memiliki panjang gelombang maksimum 204 nm.

2.7 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan FTIR

Identifikasi menggunakan FT-IR akan memberikan informasi mengenai gugus fungsi yang terdapat pada struktur steroid. Steroid yang diidentifikasi dengan FT-IR akan memberikan serapan yang khas untuk gugus fungsi OH, C-O alcohol, C=C, dan CH₃. Hasil identifikasi steroid akan dinyatakan berhasil jika gugus fungsi yang telah disebutkan menimbulkan serapan pada daerahnya masing-masing (Mulyani, dkk., 2013).



Gambar 2.2 Spektra senyawa steroid hasil isolasi mikroalga *Chlorella* sp. fraksi petroleum eter (Millati, 2016).

Hasil spektra inframerah berdasarkan Gambar 2.2 menunjukkan adanya pita serapan yang melebar pada 3490,631 cm⁻¹ diduga sebagai serapan ulur (stretching) dari gugus hidroksil O-H (3200-3550) cm⁻¹. Serapan pada 2928,549 cm⁻¹ merupakan serapan ulur (stretching) C-H alifatik dari sp³ atau C-H dari metilen (CH₂), dugaan ini diperkuat dengan adanya serapan pada bilangan gelombang 1460,875 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya tekukan C-H dari CH₂ dan

serapan $2861,110\text{ cm}^{-1}$ yang diduga sebagai gugus metil (CH_3). Kemudian adanya serapan pada $1384,048\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya tekukan CH_3 alifatik. Adanya vibrasi C-H tekuk pada spektra inframerah mengindikasikan adanya gugus gem dimetil yang lazim ditemukan pada senyawa terpenoid dan steroid. Kemudian pada serapan $1644,113\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya uluran (stretching) C=C alkena non konjugasi ($1620\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$). Hal ini diperkuat dengan serapan pada bilangan gelombang $791,542\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya tekukan =C-H ($650\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$) dan adanya rentangan C=O pada serapan $1738,426\text{ cm}^{-1}$ serta serapan $1120,859\text{ cm}^{-1}$ yang diduga sebagai serapan dari gugus C-OH sekunder (Millati, 2016).



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik dan Bioteknologi Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Januari-Juli 2018.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, *autoclave*, neraca analitik, hot plate, plat KLTA, desikator, *shaker*, *rotary evaporator*, aluminium foil, *sentrifuge*, kolom, spektrofotometer infra merah, spektrofotometer UV-Vis.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat mikroalga *Chlorella sp.*, tauge kacang hijau, metanol p.a, HCl 2 N, natrium bikarbonat, n-heksana, etil asetat, akuades, silika gel, aseton, larva udang *Artemia salina Leach*, dimetil sulfoksida, KBr.

3.3 Rancangan Penelitian

Sebelum dilakukan pengujian secara eksperimental di laboratorium, terlebih dahulu dilakukan kultivasi. Isolat mikroalga *Chlorella sp.* diambil 150 mL, kemudian dikultivasi dalam 864 mL akuades yang ditambah dengan 36 mL

medium ekstrak tauge (MET) 4% (Prihantini, dkk., 2005). Pemanenan dilakukan pada fase stasioner yaitu pada hari ke-10. Biomassa hasil pemanenan disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Kemudian biomassa *Chlorella sp.* dikeringkan pada suhu ruang (25-30°C) selama \pm 12 jam. Selanjutnya dilakukan analisis kadar air terhadap biomassa *Chlorella sp.* sebelum dan sesudah dikeringkan. Biomassa kering tersebut lalu dimaserasi dengan pelarut metanol dengan perbandingan 1:5 (b/v) selama \pm 24 jam. Selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator vacuum*. Kemudian ditimbang hasil ekstrak kasar *Chlorella sp.*

Ekstrak kasar *Chlorella sp.* dihidrolisis dengan katalis asam HCL 2 N dan dipartisi dengan pelarut etil asetat. Kemudian senyawa steroid pada sampel dipisahkan dengan kromatografi kolom basah menggunakan variasi gradien eluen n-heksana dengan etil asetat (95:5 ; 90:10 ; 85:15 ; 80:20 ; 75:25 ; 70:30). Hasil steroid yang didapat dari kromatografi kolom diuji toksisitasnya dengan metode BSLT. Kemudian diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.*
2. Pemanenan biomassa *Chlorella sp.*
3. Ekstraksi maserasi biomassa *Chlorella sp.* dengan pelarut methanol.
4. Hidrolisis ekstrak pekat metanol *Chlorella sp.*
5. Partisi ekstrak pekat metanol *Chlorella sp.*

6. Pemisahan senyawa aktif steroid dengan metode kromatografi kolom basah menggunakan variasi gradien eluen n-heksana dan etil asetat (95:5 ; 90:10 ; 85:15 ; 80:20 ; 75:25 ; 70:30).
7. Monitoring dengan KLTA.
8. Uji toksisitas dengan metode BSLT.
9. Identifikasi isolat steroid dengan spektrofotometer UV-Vis dan FT-IR.
10. Analisis data.

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

3.5.1.1 Sterilisasi Alat

Peralatan yang akan digunakan untuk kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* lebih dahulu dicuci bersih dengan air panas untuk mematikan bakteri yang mungkin terdapat pada peralatan agar tidak mengganggu proses pertumbuhan *Chlorella sp.*

3.5.1.2 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge

Medium Ekstrak Tauge (MET) dibuat dengan 100 gram kecambah direbus dalam 500 mL akuades yang mendidih. Proses pendidihan dilakukan hingga warna tauge menjadi pucat dan layu. Kemudian dipisahkan dengan filtratnya. MET dibuat dalam konsentrasi 4% yang dibuat dengan melarutkan 36 mL filtrat hasil rebusan tauge dalam 864 mL aquades sehingga didapatkan sebanyak 900 mL MET 4% dalam erlenmeyer 1000 mL. Pembuatan medium ekstrak tauge ditunjukkan dengan gambar 1 pada lampiran dokumentasi.

3.5.1.3 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge 4%

Sebanyak 150 mL isolat *Chlorella sp.* ditambahkan dengan 900 mL MET 4% yang berada dalam erlenmeyer 1000 mL. Kemudian botol diletakkan dalam rak kultivasi yang telah dilengkapi dengan lampu neon TL 36 watt lalu dидiamkan selama 10 hari.

3.5.1.4 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Pemanenan *Chlorella sp.* dilakukan pada hari ke-10 yang merupakan fase stasioner. Dilakukan dekantasi untuk memisahkan isolat *Chlorella sp.* dengan media MET 4%. Isolat yang didapat kemudian dilakukan *sentrifuge* pada 5000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Endapan *Chlorella sp.* ditimbang dan didapatkan sampel basah *Chlorella sp.* Kemudian sampel dimasukkan dalam satu wadah dan didinginkan pada suhu kamar hingga kering. Sampel dikerok lalu ditimbang sehingga didapatkan sampel kering *Chlorella sp.*

3.5.2 Ekstraksi Komponen Aktif

3.5.2.1 Ekstraksi Maserasi Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstraksi maserasi *Chlorella sp.* dilakukan menggunakan pelarut metanol p.a (98%). Sampel kering yang didapat ditimbang. Kemudian diambil pelarut dimana perbandingan sampel dan pelarut adalah 1:5. Sampel kering dimasukkan dalam beaker glass 300 mL dan ditambahkan pelarut. Kemudian dimaserasi dengan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama ± 24 jam pada suhu kamar. Selanjutnya sampel disaring untuk memisahkan antara residu dengan filtrat. Residu diambil untuk dimaserasi kembali hingga 5 kali proses ekstraksi. Filtrat yang didapatkan pada setiap 1 kali ekstraksi kemudian dijadikan satu dan dihilangkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator vacuum* sehingga

diperoleh ekstrak pekat *Chlorella sp.* Ekstrak pekat yang didapatkan kemudian ditimbang dan dihitung randemennya (Khopkar, 2003):

$$\text{Randemen} = \frac{\text{berat ekstrak kasar yang diperoleh}}{\text{berat sampel yang diekstrak}} \times 100 \%$$

3.5.2.2 Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp*

Hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp* dilakukan dengan menambahkan 3,75 mL HCl 2 N dalam 0,7587 gram ekstrak pekat metanol dan distirrer selama 1 jam pada suhu ruang. Kemudian dinetralkan pH dengan menambahkan Natrium Bikarbonat.

3.5.2.3 Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp*

Partisi hasil hidrolisis dilakukan dengan pelarut etil asetat. Ditambahkan pelarut etil asetat ke dalam ekstrak kemudian dikocok dan didiamkan sehingga terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan organik dan lapisan air. Kedua lapisan kemudian dipisahkan. Lapisan air dipartisi kembali sampai proses 5 kali partisi. Ekstrak hasil partisi dikumpulkan dan dihilangkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator vacuum*. Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian ditimbang dan dihitung randemennya.

3.5.3 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom Basah

Ditimbang silika gel sebanyak 10 gram kemudian diaktivasi dalam oven pada suhu 105°C selama 1 jam. Silika gel dibuat *slurry* (dibuburkan) dengan dicampurkan eluen n-heksana dan etil asetat perbandingan 95:5 sebanyak 20 mL. Kemudian diaduk dengan stirer selama 1 jam. Selanjutnya dimasukkan ke dalam kolom berdiameter 1 cm (Sakdiyah, 2017) dan panjang 50 cm (Mubarokah, 2017). Setelah itu ditutup bagian atas dan bawah kolom dengan plastik wrap. Kemudian didiamkan selama 24 jam. Setelah itu dikeluarkan eluen sampai $\pm 0,5$ cm di atas

permukaan silika gel. Selanjutnya dilarutkan sampel 0,067 gr dalam 1 mL eluen n-heksana dan etil asetat (95:5) dan dimasukkan dalam kolom (Iyani, 2017). Kemudian ditaburkan silika gel teraktivasi di atas permukaan sampel. Dibuat eluen untuk fase gerak n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan (95:5 ; 90:10 ; 85:15 ; 80:20 ; 75:25 ; 70:30) sebanyak 100 mL per eluen. Kemudian dimasukkan eluen dalam kolom secara bertahap. Kran dibuka dan tetesannya ditampung dalam botol vial yang telah diberi nomor dengan laju alir elusi 1,5 mL/menit (Rahmawati, 2017). Dilakukan penggantian botol vial setiap 2 mL hingga tetesan berakhir.

3.5.4 Monitoring dengan KLT-A

Hasil fraksi yang ditampung dalam botol vial dimonitoring dengan KLT-A.

Monitoring pertama dilakukan pada setiap persepuluh jarak botol vial. Ditotolkan setiap fraksi sebanyak 10 totolan dengan jarak tiap totolan 0,5 cm. Eluen yang digunakan yaitu pelarut n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 17:3 (Mardaneni, 2017). Noda-noda yang terbentuk pada plat KLT diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Fraksi yang memiliki noda hampir sama digabungkan dalam satu fraksi.

3.5.5 Uji Toksisitas Isolat Steroid terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach

3.5.5.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina* Leach

Penetasan larva udang *Artemia salina* Leach dilakukan dengan 250 mL air laut yang dimasukkan dalam botol penetasan. Dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina* Leach. Kemudian diaerasi dan diberi pencahayaan. Telur akan menetas

dalam waktu \pm 24 jam dan siap digunakan sebagai target uji toksisitas pada umur 48 jam.

3.5.5.2 Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan pada isolat steroid hasil kromatografi kolom basah dengan variasi konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm. Masing-masing konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Kontrol yang digunakan adalah kontrol pelarut dan kontrol DMSO. Dibuat larutan stok 140 ppm isolat steroid dengan cara ditimbang 0,7 mg isolat steroid dan dilarutkan dengan pelarut yang sesuai sebanyak 5 mL.

Dipipet larutan stok 140 ppm sebanyak 35,71 μ L, 71,4 μ L, 107,1 μ L, 142,8 μ L, dan 178,5 μ L. Kemudian dimasukkan ke dalam botol vial dan diuapkan pelarutnya hingga kering. Dibuat larutan ragi dengan melarutkan 3 mg dalam 5 mL air laut. Setetes larutan ragi roti dan 50 μ L dimetil sulfoksida ditambahkan dalam vial yang berisi isolat kemudian dikocok sampai ekstrak larut sempurna.

Dimasukan 10 ekor larva udang *Artemia salina Leach* dan ditandabatkan dengan air laut hingga 5 mL. Uji toksisitas dilakukan dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Diletakkan vial-vial di bawah lampu pijar selama 24 jam dan dihitung jumlah larva udang yang mati.

Kontrol yang digunakan dalam penelitian ada 2, yaitu kontrol DMSO dan kontrol pelarut. Kontrol DMSO dibuat dengan cara dimasukkan 50 μ L dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti, dan 2 mL air laut kemudian dikocok. Dimasukan 10 ekor larva udang *Artemia salina Leach*. Kemudian ditandabatkan hingga 5 mL. Sedangkan kontrol pelarut dibuat dengan 130 μ L pelarut dimasukkan ke dalam botol vial dan diuapkan. Kemudian ditambahkan setetes

larutan ragi dan 2 mL air laut dan dikocok. Dimasukan 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach. Kemudian ditandabatkan 5 mL. Vial-vial diletakkan di bawah lampu pijar selama 24 jam. Dihitung jumlah larva udang *Artemia salina* Leach yang mati pada masing-masing kontrol.

3.5.6 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis

Hasil isolat steroid dari kromatografi dilarutkan dengan etanol hingga 4 mL. Kemudian dimasukkan ke dalam kuvet dan dianalisis dengan Spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 200-800 nm untuk mengetahui panjang gelombang maksimum yang diserap oleh sampel.

3.5.7 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer Infra Merah

Spot-spot yang dihasilkan pada setiap fraksi yang diduga merupakan fraksi steroid dijadikan dalam satu wadah lalu ditambahkan sedikit pelarut n-heksana dan disimpan dalam desikator hingga pelarutnya menguap. Selanjutnya dilakukan identifikasi dengan spektrofotometer inframerah dengan bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} .

3.5.8 Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dengan memperhatikan jumlah fraksi yang mampu memisahkan satu spot yang diduga adalah senyawa steroid. Semakin banyak fraksi yang memisahkan satu spot berarti perbandingan eluen n-heksana dengan etil asetat yang digunakan merupakan perbandingan terbaik untuk memisahkan senyawa steroid dengan kromatografi kolom basah. Fraksi steroid secara kasat mata memberikan warna hijau saat dilakukan KLTA. Identifikasi steroid dilakukan dengan spektrofotometer inframerah dengan memperhatikan serapan khas yang dimiliki steroid dan spektrofotometer UV-Vis untuk

mengetahui panjang gelombang maksimum. Sedangkan uji toksisitas pada larva udang *Artemia salina* Leach dilakukan menggunakan analisis probit dengan MINITAB14 yang memiliki tingkat kepercayaan 95%.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Kultivasi dan Pemanenan Mikroalga *Chlorella* sp.

Kultivasi dilakukan untuk menumbuhkan kembali mikroalga *Chlorella* sp. Mikroalga dikultivasi dalam medium pertumbuhan berupa medium ekstrak taugé dengan konsentrasi 4%. Selama proses kultivasi, kultur *Chlorella* sp. yang awalnya berwarna hijau kekuningan mengalami perubahan menjadi hijau tua. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah sel mikroalga *Chlorella* sp. mengalami peningkatan. Perubahan warna kultur mikroalga *Chlorella* sp. selama kultivasi ditunjukkan pada Gambar 4.2 dalam Lampiran 4.

Pemanenan bertujuan untuk memisahkan biomassa *Chlorella* sp. dari filtratnya pada hari ke-10 ketika jumlah sel *Chlorella* sp mencapai jumlah maksimum (Fasya, dkk., 2013). Pemanenan dilakukan menggunakan sentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Hasil yang diperoleh berupa biomassa *Chlorella* sp. berwarna hijau tua dan mengandung air. Pengeringan biomassa *Chlorella* sp. dilakukan selama 2 – 3 hari pada suhu ruang untuk mengurangi kadar air yang terkandung dalam sampel. Biomassa *Chlorella* sp. kering berwarna hijau tua diperoleh sebesar 6,03 g (Lampiran 3.3).

4.2. Ekstraksi Mikroalga *Chlorella* sp.

4.2.1. Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi bertujuan untuk memisahkan senyawa aktif yang terkandung dalam sampel mikroalga *Chlorella* sp. Metode yang digunakan adalah maserasi

karena prosesnya sederhana, mudah, dan tidak menggunakan suhu tinggi karena dikhawatirkan dapat merusak senyawa aktif mikroalga *Chlorella* sp. (Millati, 2016). Ekstraksi maserasi dilakukan dengan pelarut metanol karena senyawa steroid yang terkandung di alam umumnya bersifat polar akibat berikatan dengan gugus gula. Hal ini sesuai dengan prinsip ekstraksi yaitu *like dissolve like* dimana senyawa akan larut dalam pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang sama.

Proses maserasi dilakukan dengan perendaman sampel mikroalga *Chlorella* sp. dalam metanol dengan perbandingan 1:5. Sampel mikroalga *Chlorella* sp. kering sebanyak 6,03 g diekstraksi maserasi dengan 30 mL metanol. Selama proses perendaman terjadi proses difusi karena terdapat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel. Larutan dengan konsentrasi rendah akan terdesak ke luar dan digantikan dengan pelarut yang memiliki konsentrasi lebih tinggi. Metanol masuk ke dalam sel-sel *Chlorella* sp. dan menembus dinding selnya sehingga sitoplasma dalam sel akan keluar dan terlarut dalam metanol. Ekstraksi maserasi dilakukan sebanyak lima kali pengulangan untuk mengoptimalkan penarikan senyawa. Ekstrak metanol yang diperoleh berwarna hijau pekat seberat 0,75 g dengan randemen sebesar 12,43 % (Lampiran 3.4). Hasil yang diperoleh berbeda dengan penelitian Bariyyah (2013) yang memperoleh ekstrak metanol *Chlorella* sp. dengan randemen 7 % dan hampir sama dengan penelitian Imamah (2015) yang memperoleh randemen sebesar 13,07 %. Hal ini dikarenakan proses maserasi yang dilakukan lebih banyak, yaitu lima kali sehingga randemen hasil ekstraksi lebih tinggi dibandingkan penelitian sebelumnya.

4.2.2 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol

Hidrolisis bertujuan untuk memutus ikatan glikosida antara senyawa steroid dengan gugus gula. Proses hidrolisis dilakukan pada suhu ruang dengan penambahan HCl 2N yang berfungsi sebagai katalis asam yang akan terionisasi sempurna. Semakin banyak proton H^+ yang dilepas dalam air, maka gugus gula akan semakin mudah terlepas. Hasil hidrolisis kemudian dinetralkan untuk menghentikan reaksi dengan penambahan basa lemah $NaHCO_3$. Hal ini dikarenakan natrium bikarbonat memiliki 3 atom C sehingga dapat mempercepat berhentinya reaksi hidrolisis. Reaksi hidrolisis dihentikan karena bersifat *reversible* sehingga ikatan glikosida antara gugus gula dan senyawa steroid tidak terbentuk kembali.

Senyawa steroid hasil hidrolisis dipisahkan melalui metode partisi. Partisi bertujuan untuk memisahkan senyawa steroid yang terdistribusi ke dalam fase semi polar sehingga digunakan pelarut etil asetat. Hasil partisi menunjukkan terbentuknya dua lapisan yang berbeda sifat yaitu lapisan atas (fase organik) dan lapisan bawah (fase air). Fase organik mengekstrak senyawa-senyawa semi polar seperti metabolit sekunder yang diindikasikan telah terputus ikatannya dengan senyawa gula. Sedangkan fase air mengekstrak senyawa gula dan garam hasil hidrolisis serta sisa-sisa H_2O . Hal ini sesuai dengan prinsip partisi yaitu pemisahan berdasarkan perbedaan distribusi zat terhadap dua fase pelarut yang tidak saling bercampur.

Fase organik yang diperoleh berupa larutan berwarna hijau kehitaman. Sedangkan fase air berwarna hijau muda. Partisi dilakukan sebanyak 5 kali untuk memaksimalkan pemisahan senyawa. Hasil partisi dipisahkan dari pelarutnya

menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh hasil partisi pada fraksi etil asetat sebesar 0,22 g dengan randemen 29,55 % (Lampiran 3.5).

4.3 Pemisahan Senyawa Steroid *Chlorella* sp. dengan Kromatografi Kolom

Basah dan Monitoring KLTA

Hasil partisi pada fraksi etil asetat selanjutnya dipisahkan dengan kromatografi kolom basah. Pemisahan ini bertujuan untuk memurnikan senyawa steroid yang terkandung dalam sampel. Kolom yang digunakan memiliki diameter 1 cm dan panjang 50 cm. Fasa diam berupa silika gel dan fasa gerak berupa eluen n-heksana:etil asetat. Proses pemisahan senyawa steroid dilakukan dengan variasi gradien eluen untuk menambahkan kekuatan fase gerak selama proses pemisahan sehingga mengoptimalkan proses pemisahan. Gradien eluen yang digunakan adalah n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan (95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30).

Pemisahan dengan kromatografi kolom dilakukan dengan laju alir elusi 1,5 mL/menit (Rahmawati, 2017). Eluat hasil kromatografi kolom dimonitoring dengan KLTA dan dideteksi di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Vial yang memiliki profil pemisahan yang sama (jumlah noda, R_f, dan warna noda) digabungkan dalam satu fraksi.

Hasil pemisahan diperoleh 11 fraksi yang mengandung 4 kelompok fraksi tunggal, yaitu 3 fraksi steroid dan 1 fraksi triterpenoid (Tabel 4.1). Rahmawati (2017) memisahkan steroid dengan kromatografi kolom menggunakan eluen n-heksana:etil asetat (4:1) mendapatkan 1 fraksi steroid dan 2 fraksi triterpenoid. Pemisahan steroid dari *Chlorella* sp. menggunakan kromatografi kolom juga

dilakukan oleh Nisa' (2017) dengan eluen n-heksana:etil asetat (9:1) memperoleh 1 fraksi steroid dan 3 fraksi triterpenoid. Sedangkan Iyani (2017) melakukan identifikasi hasil partisi fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan LC-MS menghasilkan 3 senyawa steroid dan 1 senyawa triterpenoid sehingga dari hasil penelitian yang dilakukan dimungkinkan bahwa isolat fraksi A, fraksi D, dan fraksi F secara berturut-turut merupakan senyawa β -sitosterol, stigmasterol, dan campesterol. Sedangkan untuk fraksi triterpenoid diduga merupakan senyawa eritrodiol. Data hasil monitoring KLTA ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Pengelompokan fraksi hasil isolasi menggunakan kromatografi kolom

Fraksi	Vial ke-	Σ noda	Warna Noda	Senyawa	Keterangan	Nilai Rf	Berat Fraksi (mg)
A	1-8	1	Biru	Steroid	Tunggal	0,71	0,7
B	9-18	3	Biru	Steroid	Campuran	0,71	2,4
			Hijau	Steroid		0,42	
			Hijau	Steroid		0,38	
C	19-26	0	-	-	Kosong	-	-
D	27-35	1	Hijau	Steroid	Tunggal	0,42	0,8
E	36-61	0	-	-	Kosong	-	1,2
F	62-78	1	Hijau	Steroid	Tunggal	0,37	0,7
G	79-105	0	-	-	Kosong	-	1,5
H	106-120	1	Merah	Triterpenoid	Tunggal	0,21	1,1
I	121-159	2	Merah	Triterpenoid	Campuran	0,21	2,8
			Merah	Triterpenoid		0,12	
J	160-188	3	Merah	Triterpenoid	Campuran	0,21	1,8
			Merah	Triterpenoid		0,12	
			Merah	Triterpenoid		0,06	
K	189-305	2	Merah	Triterpenoid	Campuran	0,12	11,8
			Merah	Triterpenoid		0,06	

Berdasarkan hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa pemisahan menggunakan kromatografi kolom dengan variasi gradien eluen menghasilkan pemisahan fraksi steroid yang lebih banyak dari penelitian Iyani (2017) yang

menggunakan metode isokratik memperoleh 1 fraksi tunggal steroid dan 2 fraksi tunggal triterpenoid. Saat eluen dialirkan, senyawa terbawa oleh eluen sesuai dengan kepolaran. Eluen yang digunakan bertahap, dimulai dari eluen yang kurang polar menuju eluen yang lebih polar. Senyawa yang nilai kepolarannya rendah akan bermigrasi terlebih dahulu. Selain itu, fase diam yang digunakan adalah silika gel yang bersifat polar yang menyebabkan senyawa yang cenderung polar tertahan lebih lama di dalam kolom. Masing-masing senyawa dalam komponen mempunyai kecepatan yang berbeda-beda dalam melewati kolom. Hal ini menyebabkan senyawa yang bermigrasi terlebih dahulu memiliki nilai R_f yang lebih tinggi. Isolat senyawa steroid diuji toksisitasnya dengan metode BSLT dan dilakukan identifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

4.4 Uji Toksisitas Isolat Steroid dengan Metode BSLT

Uji toksisitas bertujuan untuk mengetahui tingkat merusaknya suatu zat jika dipaparkan terhadap organisme. Uji toksisitas dilakukan pada isolat steroid tunggal hasil kromatografi kolom. Tiap sampel uji dibuat dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm serta kontrol DMSO dan kontrol pelarut. Penambahan DMSO bertujuan untuk melarutkan hasil isolat dalam air laut karena memiliki ujung hidrofilik dan ujung hidrofobik. Ujung hidrofilik berupa gugus $S=O$ yang bersifat polar. Sedangkan ujung hidrofobik berupa dua alkil ($-CH_3$) yang bersifat kurang polar. Sepuluh larva udang *Artemia salina* Leach digunakan sebagai hewan uji dalam tiap konsentrasi. Masing-masing konsentrasi dilakukan 3 kali ulangan dan nilai rata-rata dari 3 ulangan dinyatakan sebagai banyaknya larva yang mati

(Tianandasari dan Rasidah, 2017). Hasil uji toksisitas isolat steroid A, steroid D, dan steroid F disajikan dalam Tabel 4.2 (Lampiran 6.1).

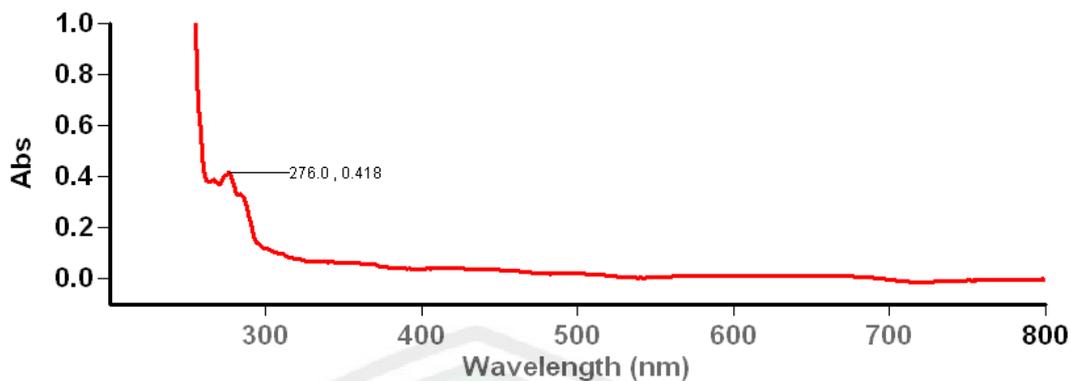
Tabel 4.2 Nilai LC_{50} hasil isolat steroid

Isolat Steroid	LC_{50} (ppm)
Fraksi A	5,26
Fraksi D	8,03
Fraksi F	5,34

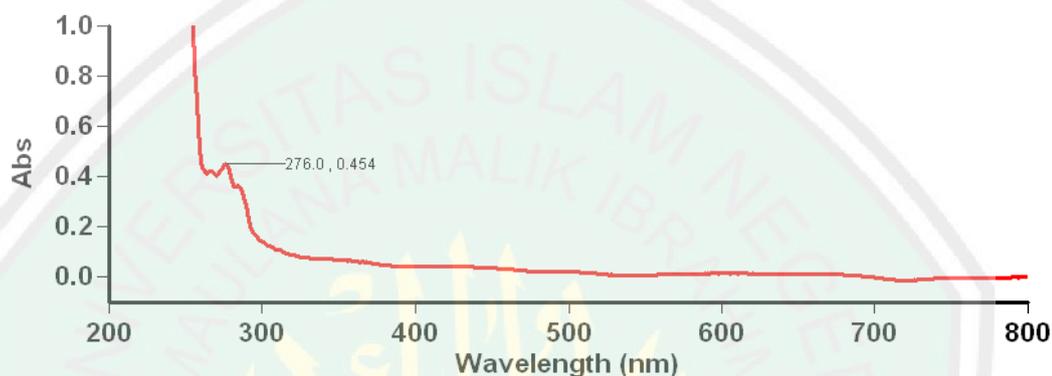
Berdasarkan Tabel 4.2, nilai LC_{50} dari fraksi A, fraksi D, dan fraksi F menunjukkan nilai <10 ppm. Berdasarkan penelitian Shofiyah (2016) nilai LC_{50} dari ekstrak metanol, fraksi etil asetat, dan isolat steroid *Chlorella sp.* hasil KLT menghasilkan nilai LC_{50} berturut-turut sebesar 36,42; 24,50; dan 14,96 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa hasil isolat steroid yang dipisahkan dengan kromatografi kolom menghasilkan senyawa steroid yang lebih toksik karena lebih murni. Menurut Meyer, dkk., (1982) suatu senyawa digolongkan toksik apabila nilai LC_{50} di antara 30 – 200 ppm. Sedangkan nilai LC_{50} <30 ppm, menunjukkan senyawa sangat toksik dan berpotensi sebagai antitumor atau antikanker. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, menunjukkan bahwa hasil isolat steroid berpotensi sebagai antitumor atau antikanker.

4.5 Identifikasi Isolat dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

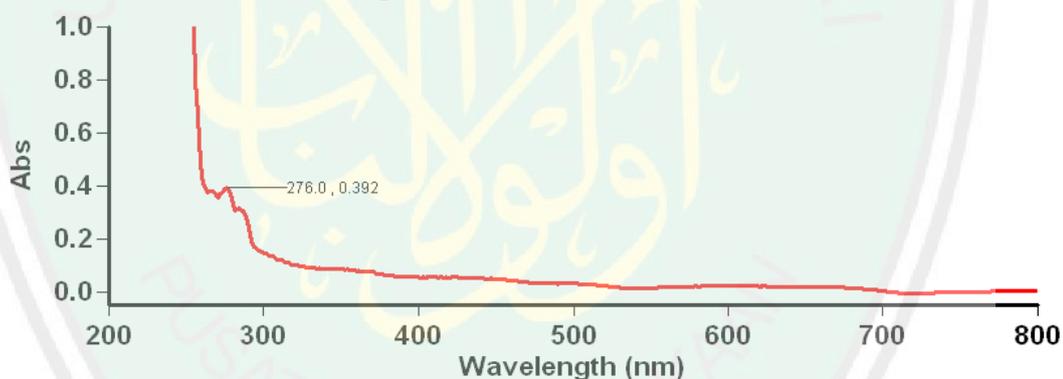
Isolat steroid hasil pemisahan kromatografi kolom basah diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui panjang gelombang maksimumnya. Spektrum hasil kromatografi kolom menunjukkan serapan maksimum yang dapat dilihat pada Gambar 4.1, 4.2, dan 4.3.



Gambar 4.1 Spektra UV-Vis isolat steroid fraksi A



Gambar 4.2 Spektra UV-Vis isolat steroid fraksi D



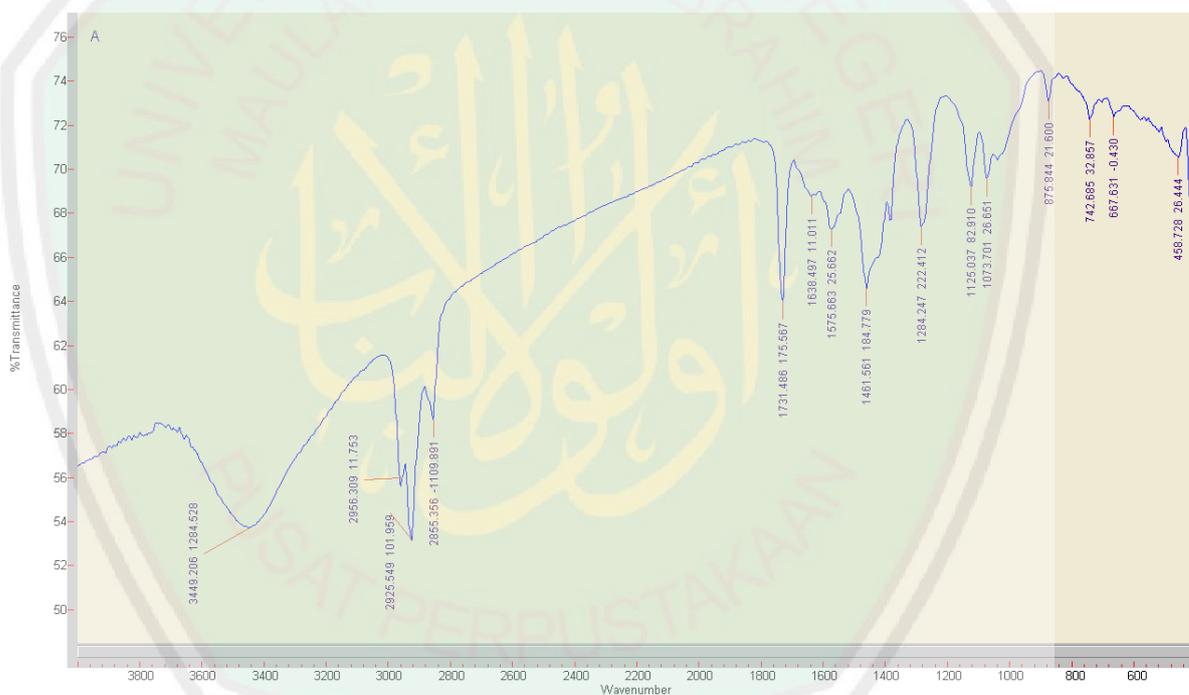
Gambar 4.3 Spektra UV-Vis isolat steroid fraksi F

Berdasarkan spektra UV-Vis untuk isolat steroid fraksi A, fraksi D, dan fraksi F diperoleh serapan maksimum pada panjang gelombang 276 nm. Panjang gelombang tersebut menunjukkan adanya transisi elektron $n \rightarrow \pi^*$ yang merupakan serapan untuk senyawa yang memiliki kromofor berupa ikatan rangkap C=C. Hal ini sesuai dengan penelitian Rahmawati (2016) yang memperoleh panjang gelombang maksimum steroid dari *Chlorella* sp. adalah 276

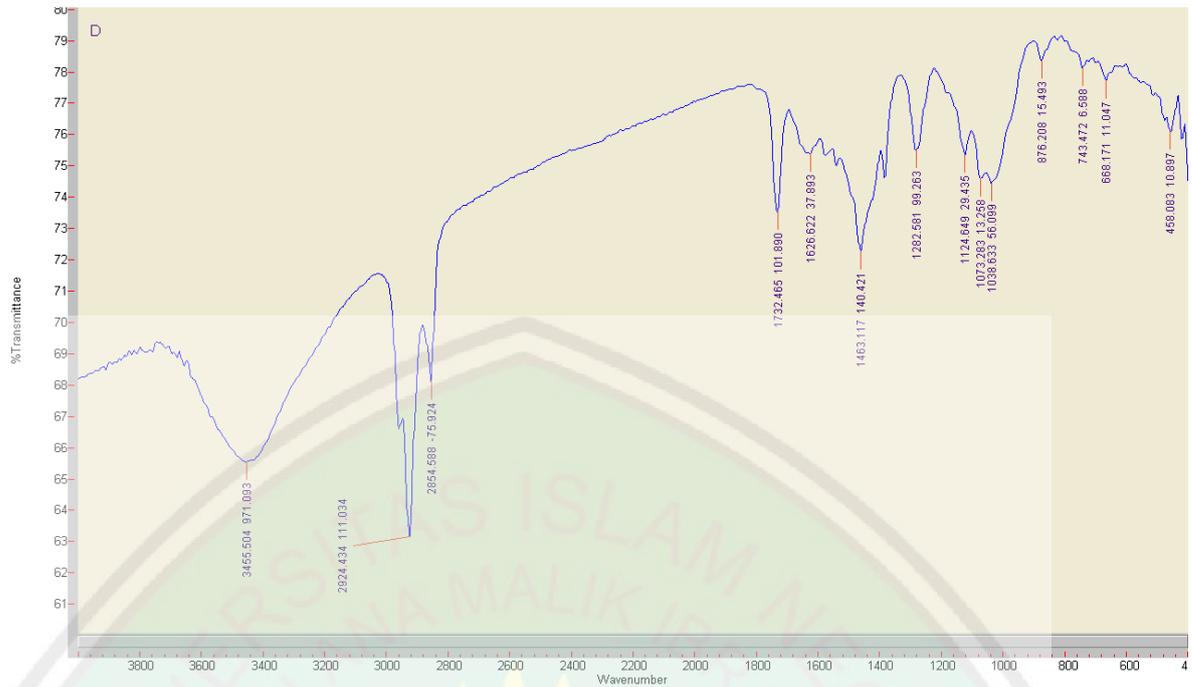
nm. Selain itu, Amalyah (2015) mengidentifikasi steroid dari kulit batang tumbuhan nyiri batu memperoleh panjang gelombang maksimum pada 275,20 nm yang menunjukkan transisi elektron $n \rightarrow \pi^*$.

4.6 Identifikasi Isolat dengan menggunakan Spektrofotometer FTIR

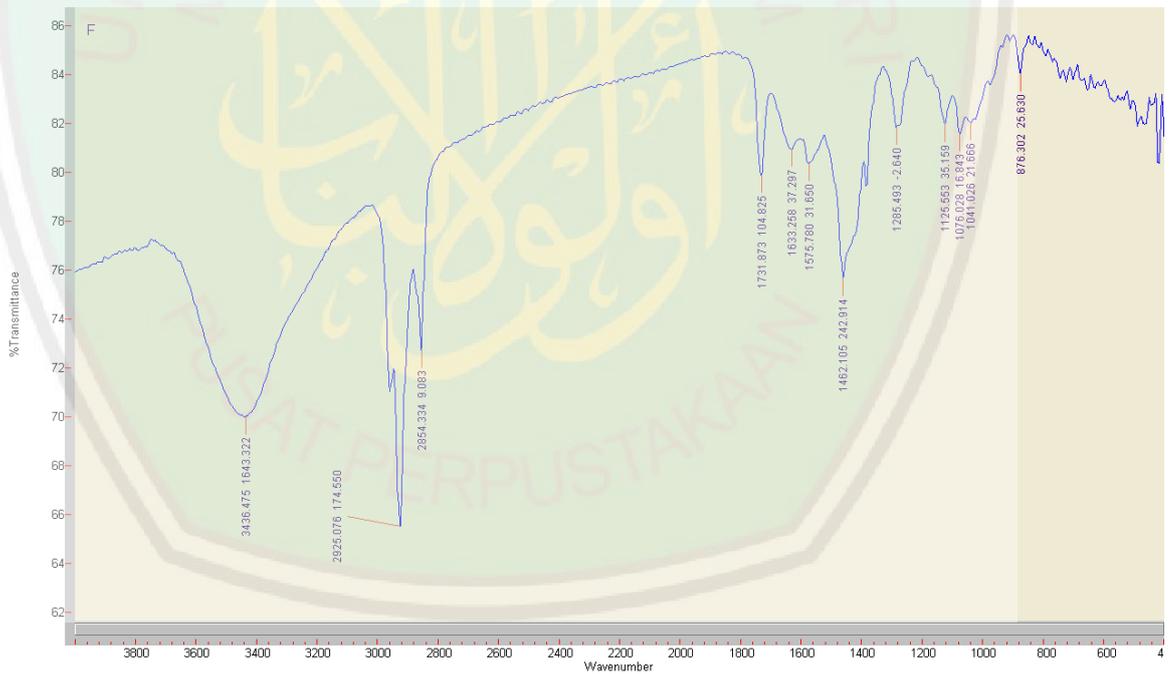
Isolat tunggal steroid fraksi A, fraksi D, dan fraksi F diidentifikasi menggunakan instrumen FTIR. Instrumen FTIR mengidentifikasi gugus fungsi suatu senyawa berdasarkan interaksi antara radiasi IR dengan senyawa yang menyebabkan terjadinya vibrasi molekuler.



Gambar 4.4 Spektra IR isolat steroid fraksi A



Gambar 4.5 Spektra IR isolat steroid fraksi D



Gambar 4.6 Spektra IR isolat steroid fraksi F

Tabel 4.3 Interpretasi spektra IR senyawa steroid fraksi A

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Range Pustaka (Socrates, 1994)
O-H <i>stretch</i>	3449	3600-3450
-CH ₃ , <i>stretchasy</i>	2956	2975-2950
-CH ₂ - <i>stretchasy</i>	2925	2940-2915
-CH ₂ - <i>stretch sym</i>	2855	2870-2840
C=C(CH ₂) _n (<i>exocyclic double bonds</i>)	1731	1780-1730
C=C <i>stretch</i>	1638	1680-1620
-CH ₂ <i>bend (scissoring)</i>	1461	1480-1440
-CH(CH ₃) ₂ <i>stretch</i>	1380	1395-1365
-CH ₃ <i>bend (twisting)</i>	1284	1300-1200
C-O alkohol tersier	1125	1205-1125
C-O alkohol sekunder	1073	1100-1050
=C-H siklik <i>bend</i>	875	995-650
-(CH ₂) ₂ , <i>rocking</i>	742	720-750

Tabel 4.4 Interpretasi spektra IR isolat steroid fraksi D

Jenis vibrasi	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Range Pustaka (Socrates, 1994)
-OH <i>stretch</i>	3455	3600-3450
-CH ₂ - <i>stretch asy</i>	2924	2940-2915
-CH ₂ - <i>stretch sym</i>	2854	2870-2840
C=C(CH ₂) _n (<i>exocyclic double bonds</i>)	1732	1780-1730
C=C <i>stretch</i>	1626	1680-1620
-CH ₂ <i>bend (scissoring)</i>	1463	1480-1440
-CH(CH ₃) ₂ <i>stretch</i>	1375	1395-1365
-CH ₃ <i>bend (twisting)</i>	1282	1300-1200
C-O alkohol tersier	1124	1205-1125
C-O alkohol sekunder	1073	1100-1050
C-O alkohol primer	1038	1050-1000
=C-H siklik (<i>bend</i>)	876	995-650

Tabel 4.5 Interpretasi spektra IR isolat steroid fraksi F

Jenis Vibrasi	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Range Pustaka (Socrates, 1994)
-OH <i>stretch</i>	3436	3600-3450
-CH ₂ <i>stretch asy</i>	2925	2940-2915
-CH ₂ - <i>stretch sym</i>	2854	2870-2840
C=C(CH ₂) _n (<i>exocyclic double bonds</i>)	1731	1780-1730
C=C <i>stretch</i>	1633	1750-1725
-CH ₂ <i>bend (scissoring)</i>	1462	1480-1440
-CH(CH ₃) ₂ <i>stretch</i>	1368	1395-1365
C-O alkohol tersier	1125	1205-1125
C-O alkohol sekunder	1076	1100-1050
C-O alkohol primer	1041	1050-1000
=C-H <i>bend</i>	876	995-650

Hasil analisis serapan FTIR pada fraksi A menunjukkan adanya serapan gugus hidroksil pada bilangan gelombang 3449 cm⁻¹ dan diperkuat dengan serapan gugus alkohol pada bilangan gelombang 1125 dan 1073 cm⁻¹. Selain itu terdapat serapan geminal dimetil pada bilangan gelombang 1461 dan 1380 cm⁻¹ yang merupakan serapan khas senyawa steroid. Hasil serapan yang muncul sesuai dengan penelitian Iyani (2017) yang mengidentifikasi isolat steroid *Chlorella* sp. menunjukkan serapan gugus OH pada 3467 cm⁻¹ kemudian gugus CH₃ asimetri pada bilangan gelombang 2955 cm⁻¹ dan gugus geminal dimetil pada 1465 dan 1384 cm⁻¹. Hasil tersebut menunjukkan adanya senyawa campesterol, stigmasterol, β-sitosterol yang diperkuat dengan data LC-MS.

Berdasarkan hasil serapan FTIR, isolat steroid fraksi D memiliki serapan – OH pada bilangan gelombang 3455 cm⁻¹. Serapan gugus C=C *stretching* pada bilangan gelombang 1626 cm⁻¹. Gugus geminal dimetil yang merupakan serapan khas senyawa steroid muncul pada 1463 cm⁻¹ dan 1375 cm⁻¹. Etika dan Suryelita (2014) menganalisis senyawa steroid dari daun mengkudu menunjukkan serapan

gugus OH, C=C non konjugasi, dan geminal dimetil pada bilangan gelombang 3445 cm^{-1} , 1626 cm^{-1} , 1457 cm^{-1} dan 1376 cm^{-1} . Hasil analisis tersebut diperkuat dengan data $^1\text{H-RMI}$ dan $^{13}\text{C-RMI}$ menunjukkan senyawa hasil isolasi adalah stigmasterol.

Hasil serapan pola FTIR pada bahwa isolat steroid fraksi F menunjukkan serapan gugus -OH pada bilangan gelombang 3436 cm^{-1} . Kemudian muncul serapan C=C non konjugasi pada bilangan gelombang 1633 cm^{-1} . Serapan dari gugus geminal dimetil muncul pada bilangan gelombang 1462 dan tumbuhan paku *Christella arida* menunjukkan serapan gugus OH, C=C non konjugasi, dan 1368 cm^{-1} . Hasil serapan tersebut sesuai dengan Aprelia dan Suyatno (2013) yang mengidentifikasi steroid dari geminal dimetil pada bilangan gelombang 3375, 1625, 1460, dan 1382 cm^{-1} . Hasil serapan menunjukkan adanya senyawa kampesterol dan β -sitosterol yang diperkuat dengan data GC-MS.

Berdasarkan hasil analisis FTIR dari isolat steroid fraksi A, fraksi D, dan fraksi F, diperoleh bahwa ketiga isolat tersebut memiliki serapan berbeda pada jumlah gugus alkohol yang terkandung dalam senyawa. Isolat steroid fraksi A menunjukkan pita serapan C-OH tersier dan sekunder pada 1125 dan 1073 cm^{-1} . Sedangkan isolat steroid fraksi D dan fraksi F memiliki pita serapan C-OH tersier, sekunder, dan primer pada bilangan gelombang 1124 , 1073 , 1038 cm^{-1} dan 1125 , 1076 , 1041 cm^{-1} . Hal ini menunjukkan bahwa isolat steroid fraksi A bersifat kurang polar apabila dibandingkan dengan steroid fraksi D dan fraksi F sehingga menyebabkan fraksi A melewati kolom terlebih dahulu. Sedangkan steroid fraksi D dan fraksi F lebih polar sehingga tertahan lebih lama di dalam kolom.

4.6 Relevansi Hasil Penelitian dengan Perspektif Islam

Allah SWT menciptakan manusia sebagai khalifah di bumi. Khalifah mempunyai tugas untuk memelihara, memikirkan dan mengkaji ciptaan Allah SWT yang terdapat di bumi. Salah satu peran mahasiswa kimia sebagai khalifah adalah memikirkan hasil ciptaan Allah SWT dengan melakukan penelitian. Hal ini sesuai dengan firman Allah SWT dalam Qur'an Surah an Nahl ayat 14 yang memerintahkan manusia untuk mencari keutamaan atau manfaat dari ciptaan Allah SWT yang terdapat dalam lautan.

Mikroalga *Chlorella* sp. atau ganggang hijau memiliki manfaat sebagai obat antitumor atau antikanker. Berdasarkan hasil penelitian, menunjukkan bahwa senyawa steroid yang terkandung dalam *Chlorella* sp. memiliki nilai LC₅₀ kurang dari 30 ppm sehingga dapat digunakan sebagai obat antitumor atau antikanker. Pemanfaatan mikroalga *Chlorella* sp. sebagai obat merupakan salah satu bentuk usaha untuk memperoleh kesembuhan dari Allah SWT. Hal ini sesuai dengan Hadits yang diriwayatkan oleh Imam Bukhari:

عَنْ أَبِي هُرَيْرَةَ رَضِيَ اللَّهُ عَنْهُ عَنِ النَّبِيِّ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ قَالَ : مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً. رَوَاهُ أَبُو خَرِي

Diriwayatkan dari Abu Hurairah r.a bahwa Nabi SAW pernah bersabda: "Tidaklah Allah menurunkan penyakit kecuali Dia juga menurunkan penawarnya." (HR. Al-Bukhari).

Pencarian obat dari berbagai macam penyakit dapat ditemukan dengan mempelajari ilmu pengetahuan. Dari ilmu pengetahuan ini kita dapat mengetahui dan menyadari kebesaran Allah SWT yang telah menciptakan langit dan bumi.

Salah satunya adalah penciptaan mikroalga *Chlorella* sp. yang dapat digunakan sebagai obat. Namun manusia harus sadar bahwa kesembuhan atas suatu penyakit sesungguhnya bersumber dari Allah SWT. Sebagaimana firman Allah SWT dalam Qur'an Surah asy Syu'ara ayat 80:

وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ

“Dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan aku.”

Penelitian tentang kandungan *Chlorella* sp. yang memiliki banyak manfaat menjadikan manusia menyadari dan berfikir bahwa dalam penciptaan langit dan bumi terdapat berbagai macam hikmah dan bukti kekuasaan Allah SWT. Dengan melihat dan mengetahui tanda-tanda kekuasaan Allah SWT yang begitu besar, sepatutnya manusia senantiasa bersyukur kepada Allah SWT atas segala nikmat yang telah Allah SWT berikan. Sesuai dengan lafadz terakhir dari surah an Nahl ayat 14, yaitu lafadz *وَلَعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ* yang menjelaskan bahwa Allah SWT menginginkan agar manusia selalu bersyukur setelah mengetahui rahasia atau hikmah yang terdapat dalam ciptaan Allah SWT. Oleh karena itu, manusia akan termotivasi untuk terus menggali dan mengkaji ilmu melalui berbagai macam penelitian terhadap sumber daya alam. Selain itu, Allah berfirman dalam Qur'an Surah Ibrahim ayat 7 :

وَإِذْ تَأَذَّنَ رَبُّكُمْ لَئِن شَكَرْتُمْ لَأَزِيدَنَّكُمْ وَلَئِن كَفَرْتُمْ إِنَّ عَذَابِي لَشَدِيدٌ

Dan (ingatlah) ketika Tuhanmu memaklumkan, “Sesungguhnya jika kamu bersyukur, niscaya Aku akan menambah (nikmat) kepadamu, tetapi jika kamu mengingkari (nikmat-Ku), maka pasti azab-Ku sangat berat.”

Ayat tersebut menjelaskan apabila manusia bersyukur terhadap nikmat-nikmat yang Allah SWT berikan, maka nikmat tersebut akan ditambah oleh Allah SWT. Kemudian jika manusia mengingkari atau mengeluh atas nikmat yang Allah SWT berikan, maka Allah SWT akan mencabut nikmat tersebut dan menyiksa mereka. Melalui ayat ini Allah SWT memerintahkan agar manusia senantiasa bersyukur terhadap karunia yang diberikan oleh Allah. Semakin banyak kita bersyukur, maka nikmat yang kita peroleh akan semakin bertambah.

Implementasi syukur kepada karunia Allah SWT dapat juga dilakukan dengan tafakur, yaitu memikirkan nikmat-nikmat yang telah diberikan Allah SWT. Berfikir tentang nikmat Allah SWT dapat dilakukan melalui penelitian-penelitian terhadap hasil ciptaan Allah SWT. Melalui hal tersebut, pengetahuan kita akan bertambah sehingga semakin bersyukur dan cinta kepada Allah SWT atas semua yang telah diberikan Allah SWT.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan disimpulkan bahwa:

1. Isolasi senyawa steroid mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan kromatografi kolom basah dengan gradien eluen menghasilkan 3 fraksi tunggal steroid.
2. Hasil uji toksisitas dari isolat steroid A, steroid D, dan steroid F dengan metode BSLT memperoleh nilai LC_{50} secara berturut-turut sebesar 5,26; 8,03; dan 5,34 ppm.
3. Identifikasi spektrofotometer UV-Vis isolat steroid menghasilkan panjang gelombang maksimum dari ketiga isolat steroid adalah 276 nm. Sedangkan identifikasi spektrofotometer FTIR dari ketiga isolat menunjukkan gugus fungsi $-OH$, $-CH_2-$, $-(CH_2)_2$, $C=C$ tidak terkonjugasi dan $-CH(CH_3)_2$.

5.2 Saran

Perlu adanya identifikasi lebih lanjut terhadap hasil isolasi steroid dengan menggunakan LC-MS/MS untuk mengetahui senyawa golongan steroid yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella* sp dan uji aktivitas antikanker terhadap hasil isolat.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdillah, F., Raya, I., & Ahmad, A. 2013. *Pengujian Daya Antioksidan dan Sifat Toksisitas Ekstrak Co(II) Turunan Klorofil*. Makassar: Universitas Hasanuddin.
- Agoes, G. 2007. *Teknologi Bahan Alam*. Bandung: ITB Press.
- Aisyah, A., Purba, R., & Sitorus, S. 2012. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid dari Kulit Batang Tumbuhan Andong (*Cordyline fruticosa [L] A, Cheval*). *Jurnal Kimia Mulawarman*, 9(2): 87-90.
- Al-Qarni, A. 2007. *Tafsir Muyassar*. Terjemahan tim Qisthi Press. Jakarta: Qisthi Press.
- Al-Qurthubi, S.I. 2008. *Tafsir Al-Qurthubi*. Terjemahan Rosadi, S., Fathurrahman, Hotib, A., (Kadir, M.I., Ed). Jakarta: Pustaka Azzam.
- Amalyah, R., & Hidajati, N. 2015. Isolasi Metabolit Sekunder dan Uji Aktivitas Insektisida Ekstrak n-Heksana Kulit Batang Tumbuhan Nyiri Batu (*Xylocarpus moluccenciss*). *UNESA Journal of Chemistry*, 4(1): 25-30.
- Anggraeni, O.N., Fasya, A.G., Abidin, M., & Hanapi, A. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp*. *Alchemy*, 3(2): 173 – 188.
- Aprelia, F., & Suyatno. 2013. Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etil Asetat Tumbuhan Paku *Christella arida* dan Uji Pendahuluan Sebagai Antikanker. *UNESA Journal of Chemistry*, 2(3): 94-99.
- Ash-Shiddieqy, T.M.H. 2000. *Tafsir Al-Qur'anul Majid An-Nuur*. Semarang: Pustaka Rizki Putra.
- Ath-Thabari, A.J.M. 2008. *Tafsir Ath-Thabari*. Terjemahan Affandi A., Sarbeni B., dan Somad A., (M.S. Akbar, Ed.). Jakarta: Pustaka Azzam.
- Atta-ur-Rahman, Choudhary, M.I., & Thomson, W.J. 2001. *Bioassay Technique For Drug Development*. Singapore: Harwaord Academy Publisher.
- 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*, 2(3): 150-204.
- Bishopa, G.J., & Koncz, C. 2002. Brassinosteroids and Plant Steroid Hormone Signaling. *The Plant Cell*. 110: 97–110.

- Bold, H.C., & Wynne, M.J. 1985. *Introduction to the Algae*. New Jersey: Prentice Hall, Inc.
- Cahyono, A.B. 2004. *Keselamatan Kerja Bahan Kimia di Industri*. Yogyakarta: UGM Press.
- Etika, S.B., & Suryelita. 2014. *Isolasi Steroid dari Daun Mengkudu (Morinda citrifolia L.)*. Padang: Universitas Negeri Padang.
- Fasya, A.G., Khamidah, U., Amaliyah, S., Bariyyah, S.K., & Romaidi. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp* hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge Pada Tiap Fase Pertumbuhan. *Alchemy*, 2(3): 162-169.
- Khamidah, U. 2013. Uji Aktifitas Antibakteri terhadap *Escherechia coli* dan *Stertococcus aureus*. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Fathiyawati, 2008. Uji Toksisitas Ekstrak Daun Ficus recemosa L terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Skripsi*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Handoko, S. 2016. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Peroleum Eter Mikroalga *Chlorella sp* dengan Metode Kromatografi Kolom Pembuatan Fasa Diam Cara Basah dan Cara Kering. *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hendayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan: Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung: Remaja Rosdakarya.
- Herliani, A. 2008. *Spektrofotometri*. Bandung: Universitas Padjajaran.
- Ilyas, A., Novianty, I., & Irmayanti. 2015. Senyawa Golongan Steroid Dari Ekstrak n-Heksana Kulit Batang Kayu Bitti (*Vitex cofassus*) dan Uji Toksisitas Terhadap *Artemia salina* Leach. *Chimica et Natura Acta*, 3(3): 119-123.
- Imamah, N. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp*. Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dan Identifikasinya Menggunakan Spektrofotometer FTIR. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Isnansetyo, A., & Kurniastuty. 1995. *Teknik Kultur Phitoplankton dan Zooplankton pakan Alami untuk Pembenihan Organisme Laut*. Yogyakarta: Kanisius.
- Iyani, R. 2017. Variasi Rasio Sampel terhadap Silikia Gel pada Pemisahan Steroid dan Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella sp*. dengan

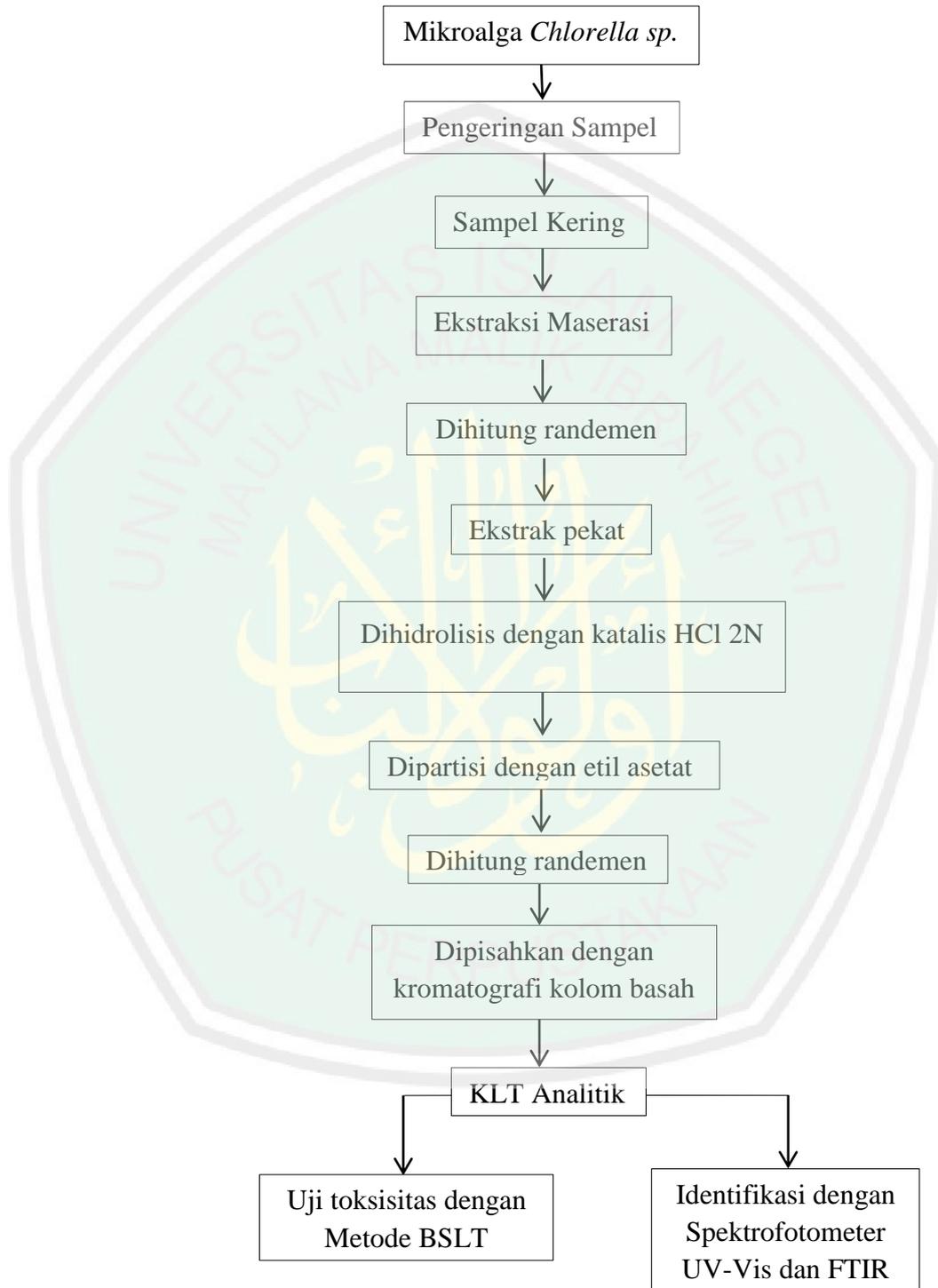
- Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Kawaroe, M. 2008. *Mikroalga sebagai Bahan Baku Biofuel*. Bogor: Surfactant and Bioenergy Research Center Lembaga Pengabdian Pada Masyarakat, Institut Pertanian Bogor.
- Khamidah, U. 2013. Uji Aktifitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp* hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge terhadap *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Laili, R. 2016. Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*). *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Lehninger. 1982. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: Erlangga.
- Lenny, S. 2006. Senyawa Terpenoid dan Steroid. *Karya Ilmiah*. Medan: Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara.
- Luki, C.E. 2017. Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi Petroleum Eter Makroalga *Eucheuma cottonii*. *Laporan Penelitian Kompetitif*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Lukman, A. 2008. *Mekanisme dan Regulasi Hormon Glukokortikoid pada Manusia*. Jambi: Program Studi Pendidikan Biologi Universitas Jambi.
- Mardaneni, I. 2017. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid Alga Merah (*Eucheuma cottoni*) Fraksi Etil Asetat Perairan Wongsorejo-Banyuwangi dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan LC-MS/MS. *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Mawarti, 2017. Variasi Komposisi Eluen pada Pemisahan Senyawa Steroid dan Triterpenoid Fraksi Etil Asetat Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) Menggunakan Kromatografi Kolom. *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Nichols, D.E., & McLaughlin, J.L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plants Constituents. *Plant Medica*, 45: 31-34.
- Millati, N. 2016. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella sp*. *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Mubarokah, F.A. 2017. Variasi Diameter Kolom pada Isolasi Steroid dan Triterpenoid Alga Merah *Eucheuma cottoni* Metode Kromatografi Kolom. *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*, 7(2): 361-367.
- Mulyani, M., Arifin, B., & Nurdin, H. 2013. Uji Antioksidan dan Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Daun Srikaya (*Annona squamosa L*). *Jurnal Kimia*. Universitas Andalas.
- Octaviani, N. 2014. *Khasiat Ajaib Ganggang Hijau Sembuhkan Kanker*. Jakarta Timur: Padi.
- Prabowo, D.A. 2009. *Optimasi Pengembangan Media untuk Pertumbuhan Chlorella sp pada Skala Laboratorium*. Bandung: IPB.
- Prihantini, N.B., Berta, P. & Ratna, Y. 2005. Pertumbuhan *Chlorella sp* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan Variasi pH Awal. *Jurnal Makara Sains*, 9(1): 1-10.
- Prihantini, N.B., Damayanti, D. & Ratna, Y. 2007. Pengaruh Konsentrasi Medium Ekstrak Tauge (MET) Terhadap Pertumbuhan *Scenedesmus* Isolat Subang. *Jurnal Makara Sains*, 11(1): 1-9.
- Rahmawati, E. 2017. Variasi Laju Alir Elusi pada Pemisahan Steroid dan Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella sp*. dengan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Rahmawati, L.M. 2016. Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Senyawa Steroid Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella sp* Menggunakan UV-Vis. *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Richmond, A.E. 1986. Microalgae Culture. *CFC Critical Review in Biotechnology*, 4(4): 368-438.
- Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Rudi, L., Suratno, W., & Paundanan, J. 2004. Perbandingan Penentuan Surfaktan Anionik dengan Spektrofotometer UV-Vis Menggunakan Pengompleks Malasit Hijau dan Metilen Biru. *Jurnal Kimia Lingkungan*, 6(1): 58-61.
- Sachlan, M. 1982. *Planktonologi*. Semarang: Universitas Diponegoro.

- Saifudin, A. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian*. Yogyakarta: Deepublish.
- Sakdiyah, H. 2017. Pemisahan Senyawa Triterpenoid dan Steroid Fraksi Etil Asetat Alga Merah *Eucheuma spinosum* Menggunakan Kromatografi Kolom Basah dengan Variasi Ukuran Kolom. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Salempa, P. 2014. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder ekstrak n-Heksana Daun Tumbuhan Maja (Aegle marmelos Linn.)*. Makassar: Universitas Negeri Makassar.
- Setyaningsih, I. 1999. *Pemisahan Senyawa Bioaktif dari Beberapa Jenis Mikroalga dan Aplikasinya pada Bahan Pangan*. Bogor: Fakultas Perikanan IPB.
- Sherikar, O.D. 2013. *The Difference between Isocratic Flow and Gradient Flow* (online).(https://www.google.co.id/amp/s/www.researchgate.net/post/what_is_difference_between_Isocratic_flow_and_gradiet_flow/amp?espv=1), diakses 15 Januari 2017.
- Shihab, M.Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah: Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati.
- Simersky R., Nova, O., Morris, D.A., Pouzar, V., & Strnad M. 2009. Identification and Quantification of Several Mammalian SteroidHormones in Plants by UPLC-MS/MS. *J Plant Growth Regulation*, 28: 125–136.
- Sudarma, I.M. 2014. *Kimia Bahan Alam*. Mataram: FMIPA Press.
- Sudarmojo, A.H. 2013. *History of Earth*. Yogyakarta: Bunyan.
- Syofiyah, M. 2016. Uji Toksisitas Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Metode BSLT dan Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer FTIR. *Skripsi*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Widyastuti, S. 2008. Uji Toksisitas Ekstrak Daun Iprih (*Ficus Glabella Blume*) terhadap *Artemia salina Leach* dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Skripsi*. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Yazid, E. 2005. *Kimia Fisika untuk Paramedis*. Yogyakarta: Andi.
- Yudha, A.P. 2008. Senyawa Antibakteri dari Mikroalga pada Umur Panen yang Berbeda. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.

LAMPIRAN

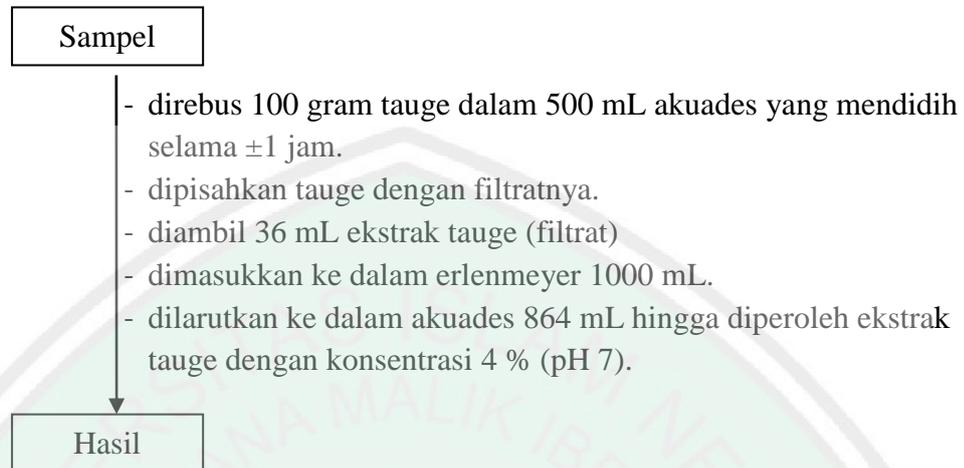
Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian



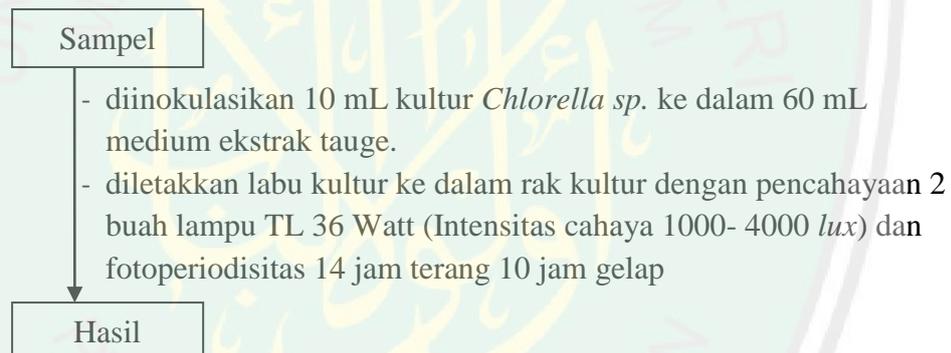
Lampiran 2. Skema Kerja

L.2.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

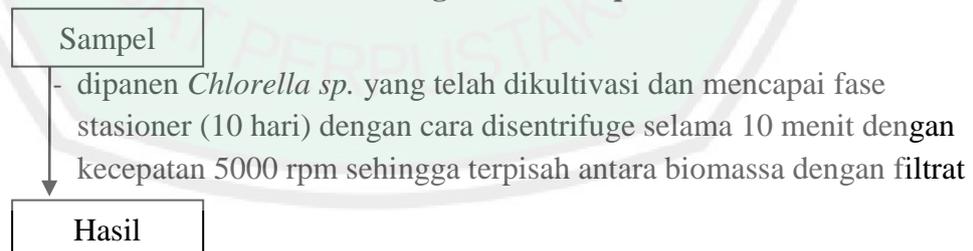
L.2.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %



L.2.1.2 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %



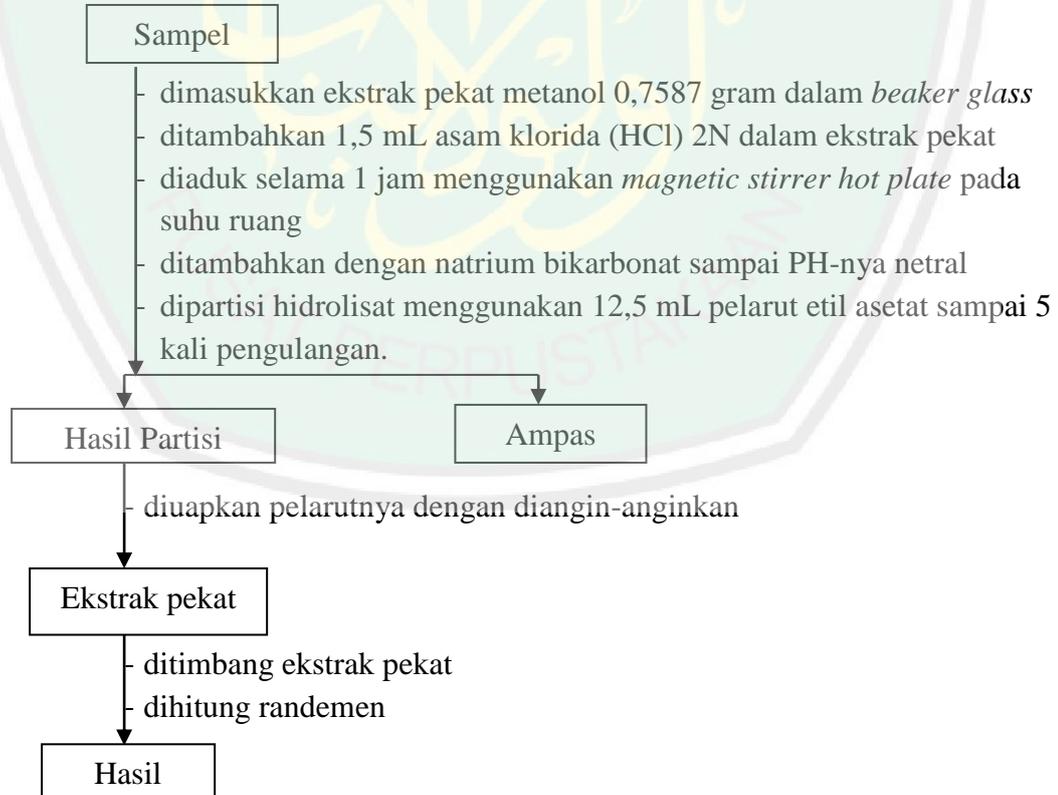
L.2.1.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*



L.2.2 Ekstraksi Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Maserasi



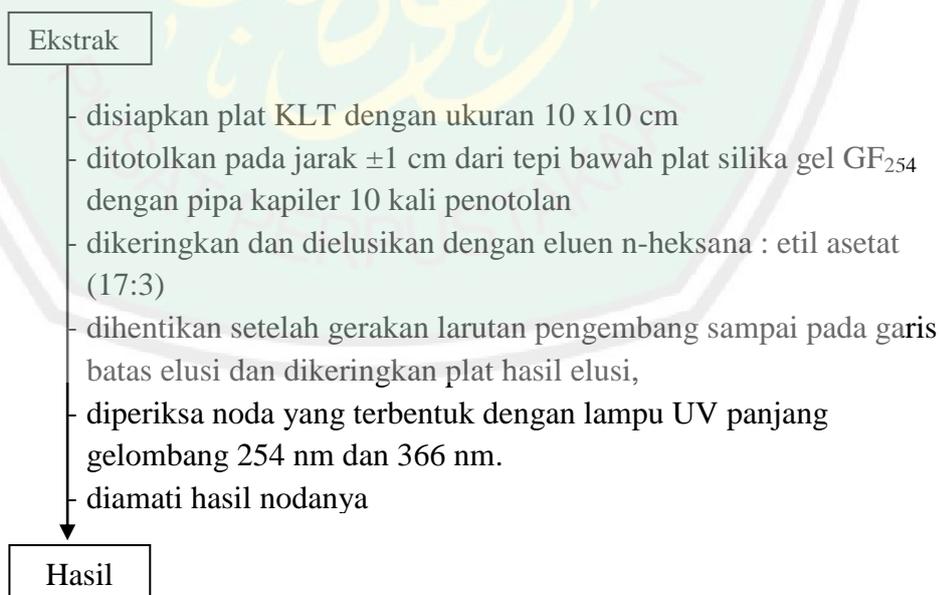
L.2.3 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*



L.2.4 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom



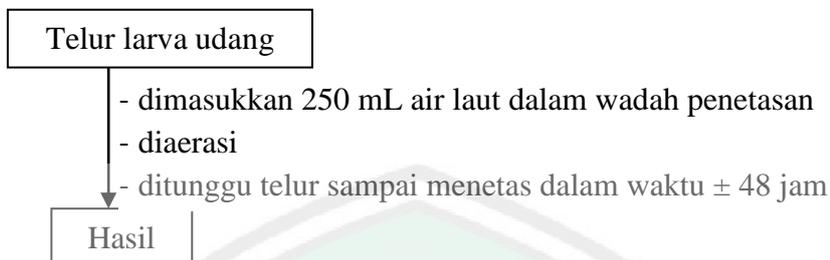
L.2.5 Monitoring Senyawa Steroid dengan KLTA



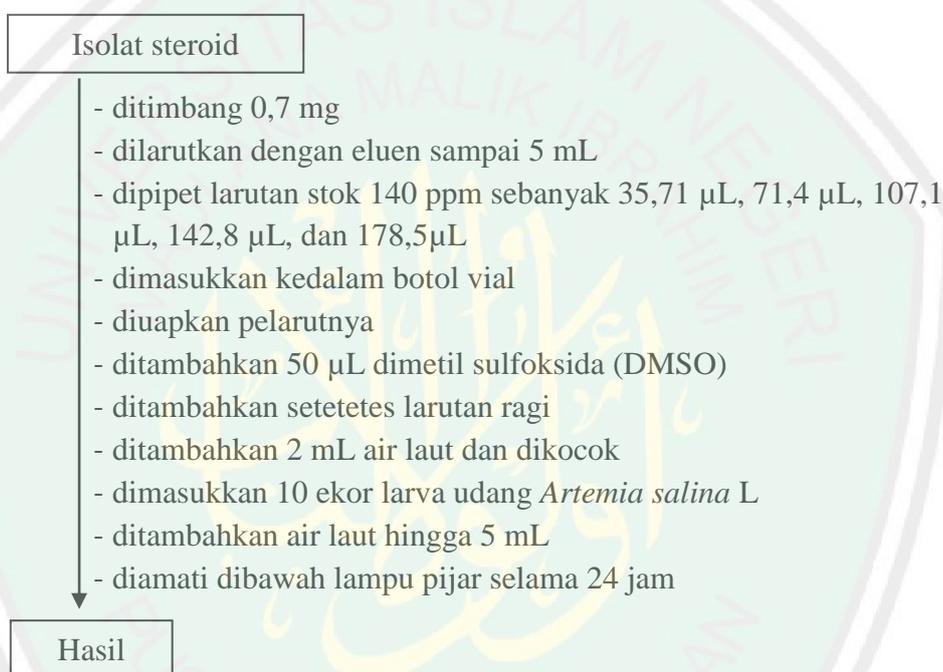
L.2.6 Uji Toksisitas Senyawa Steroid terhadap Larva Udang *Artemia salina*

Leach

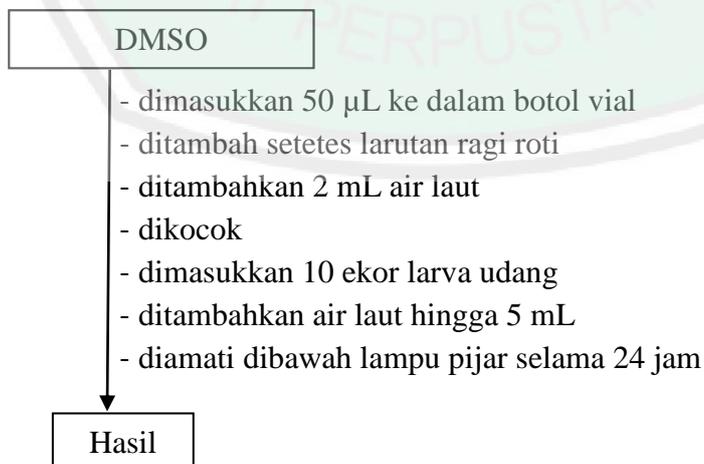
L.2.6.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina* Leach

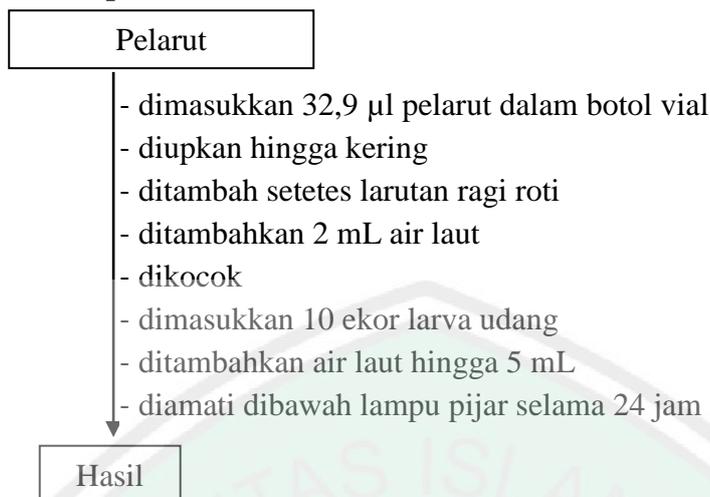
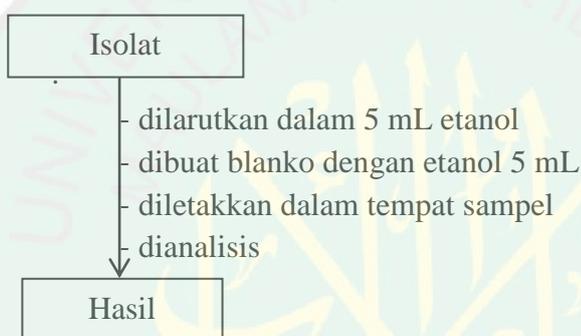
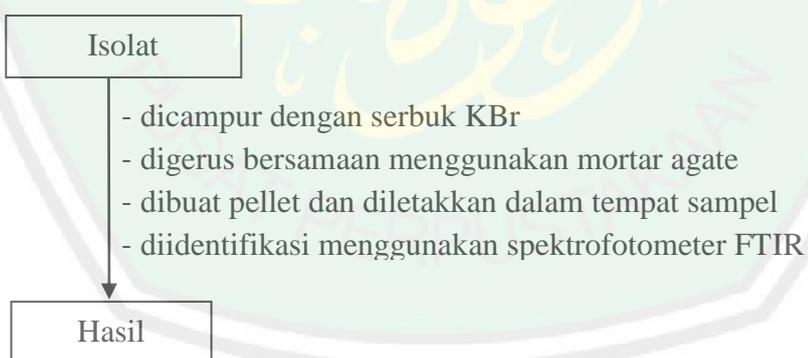


L.2.6.2 Uji Toksisitas



a. Kontrol DMSO



b. Kontrol pelarut**L. 2.8 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis****L.2.9 Identifikasi Golongan Senyawa Steroid dengan FTIR**

Lampiran 3. Perhitungan, Pembuatan Reagen dan Larutan

L.3.1 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam MET

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

- a. Kultivasi dalam Erlenmeyer 1000 ml dengan memaksimalkan daya tampung erlenmeyer

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

$$60x = 9000 \text{ mL}$$

$$x = \frac{9000 \text{ ml}}{60} = 150 \text{ mL Isolat } \textit{Chlorella sp.}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume total} &= \text{Isolat } \textit{Chlorella sp.} + \text{MET 4\%} \\ &= 150 \text{ mL} + 900 \text{ mL} \\ &= 1050 \text{ mL} \end{aligned}$$

- b. Pembuatan MET 4% sebanyak 900 ml

$$\text{MET} = (\text{aquades} + \text{ekstrak tauge})$$

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

$$= 36 \text{ mL ekstrak tauge}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume Aquades} &= \text{MET 4\%} - (\text{Volume ekstrak tauge}) \\ &= 900 \text{ mL} - 36 \text{ mL} \\ &= 864 \text{ mL} \end{aligned}$$

L.3.2 Pembuatan larutan HCl 2 N

$$\text{BJ HCl pekat} = 1,19 \text{ g/mL} = 1190 \text{ g/L}$$

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

$$\text{BM HCl} = 36,42 \text{ g/mol}$$

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

$$\text{Normalitas HCl} = n \times \text{Molaritas HCl}$$

$$= 1 \times \frac{37\% \times \text{BJ HCl}}{\text{BM HCl pekat}}$$

$$= \frac{37\% \times 1190 \text{ g/L}}{36,42 \text{ g/mol}} = 12,09 \text{ N}$$

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

$$12,09 \text{ N} \times V_1 = 2 \text{ N} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 16,54 \text{ mL} = 16,5 \text{ mL}$$

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

L.3.3 Data Hasil Pengeringan Isolat Mikroalga *Chlorella sp.*

No	Berat botol kosong (g)	Berat Botol + <i>Chlorella sp.</i> basah (g)	Berat <i>Chlorella sp.</i> basah (g)	Berat <i>Chlorella sp.</i> kering (g)	Randemen (%)
1.	42,390	100,76	58,37	0,77	0,6768
2.	42,390	138,97	96,58	1,29	
3.	42,420	260,86	218,44	1,73	
4.	42,390	559,99	517,6	2,24	
Total			890,99	6,03	

$$\begin{aligned} \text{Randemen} &= \frac{\text{Berat kering}}{\text{Berat basah}} \times 100 \% \\ &= \frac{6,03 \text{ gr}}{890,99 \text{ gr}} \times 100 \% \\ &= 0,006768 \times 100 \% \\ &= 0,6768 \% \end{aligned}$$

L.3.4 Randemen Hasil Maserasi

Sampel kering (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + ekstrak metanol pekat (g)	Berat ekstrak metanol pekat (g)
6,03	62,7052	63,4639	0,7587

$$\begin{aligned} \text{Randemen} &= \frac{\text{berat ekstrak metanol pekat}}{\text{berat sampel kering}} \times 100\% \\ &= \frac{0,7587}{6,03} \times 100\% \\ &= 12,43\% \end{aligned}$$

L.3.5 Randemen Hasil Hidrolisis dan Partisi

Ekstrak pekat yang dihidrolisis (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + ekstrak EA pekat (g)	Berat ekstrak EA pekat (g)
0,7587	82,1135	82,2371	0,2242

$$\begin{aligned} \text{Randemen} &= \frac{\text{berat ekstrak EA pekat}}{\text{berat ekstrak metanol pekat}} \times 100\% \\ &= \frac{0,2242}{0,7587} \times 100\% \\ &= 29,5505\% \end{aligned}$$

L.3.6 Perhitungan Nilai Rf Hasil Monitoring

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

Fraksi	Vial	Rf	Fraksi	Vial	Rf
A	1-8	$\frac{5,7}{8} = 0,7125$	G	79-105	Kosong
B	9-18	$\frac{5,7}{8} = 0,7125$ $\frac{3,4}{8} = 0,425$ $\frac{3,1}{8} = 0,3875$	H	106-120	$\frac{1,7}{8} = 0,2125$
C	19-26	Kosong	I	121-159	$\frac{1,7}{8} = 0,2125$ $\frac{1}{8} = 0,125$
D	27-35	$\frac{3,4}{8} = 0,425$	J	160-188	$\frac{1,7}{8} = 0,2125$ $\frac{1}{8} = 0,125$ $\frac{0,5}{8} = 0,0625$
E	36-61	Kosong	K	189-305	$\frac{1}{8} = 0,125$ $\frac{0,5}{8} = 0,0625$
F	62-78	$\frac{3}{8} = 0,375$			

L.3.3 Pembuatan Larutan Senyawa Steroid untuk uji toksisitas

L.3.3.1 Pembuatan Larutan Stok 140 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm} &= \frac{\text{mg}}{\text{L}} \\ \text{ppm} &= \frac{0,7 \text{ mg}}{0,005 \text{ L}} \\ \text{mg} &= 140 \text{ mg} \end{aligned}$$

Cara pembuatan larutan stok adalah dengan diambil 0,7 mg isolat steroid mikroalga *Chlorella sp.* Kemudian dilarutkan dengan eluen etil asetat dan ditandabatkan dalam labu takar 5 mL.

L.3.4.2 Pembuatan larutan steroid 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm

a. 1 ppm

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 140 \text{ ppm} \times V_1 &= 1 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,03571 \text{ mL} = 35,71 \mu\text{L} \end{aligned}$$

b. 2 ppm

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 140 \text{ ppm} \times V_1 &= 2 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,0714 \text{ mL} = 71,4 \mu\text{L} \end{aligned}$$

c. 3 ppm

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 140 \text{ ppm} \times V_1 &= 3 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,1071 \text{ mL} = 107,1 \mu\text{L} \end{aligned}$$

d. 4 ppm

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 140 \text{ ppm} \times V_1 &= 4 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,1428 \text{ mL} = 142,8 \mu\text{L} \end{aligned}$$

e. 5 ppm

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 140 \text{ ppm} \times V_1 &= 5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,1785 \text{ mL} = 178,5 \mu\text{L} \end{aligned}$$

Lampiran 4. Perhitungan Uji Toksisitas

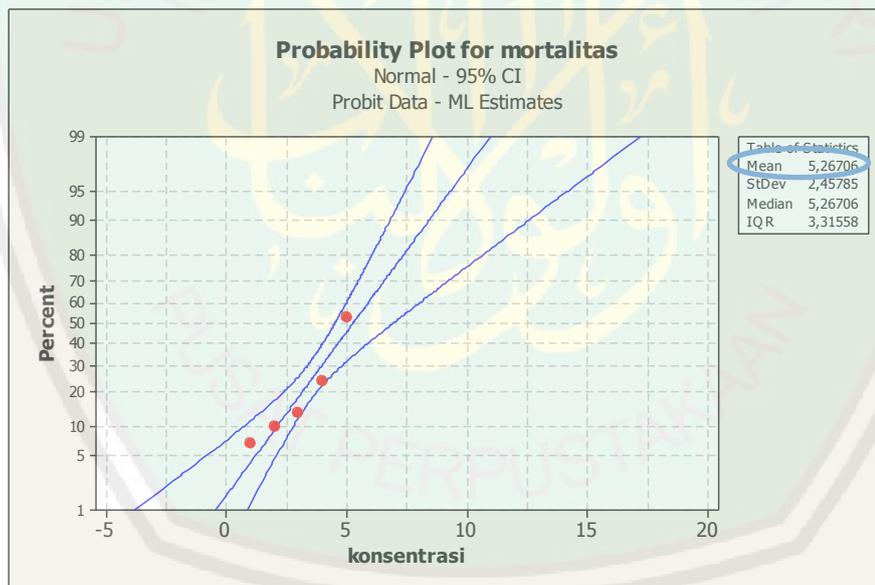
$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{Mean}}{\text{Jumlah larva uji (10 ekor)}} \times 100\%$$

$$\text{Mortalitas} = \% \text{ Mortalitas} \times \text{Jumlah hewan uji}$$

L.4.1 Hasil Uji Toksisitas Isolat Steroid Fraksi A mikroalga *Chlorella sp.*

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati (ekor)				Mortalitas
	I	II	III	Rata-rata	
0*	0	0	0	0	0
0**	0	0	0	0	0
1	1	1	0	0,6	1,8
2	1	1	1	1	3
3	2	1	1	1,3	3,9
4	2	2	3	2,3	6,9
5	3	6	7	5,3	15,9

Keterangan: * : Kontrol Pelarut
 **: Kontrol DMSO

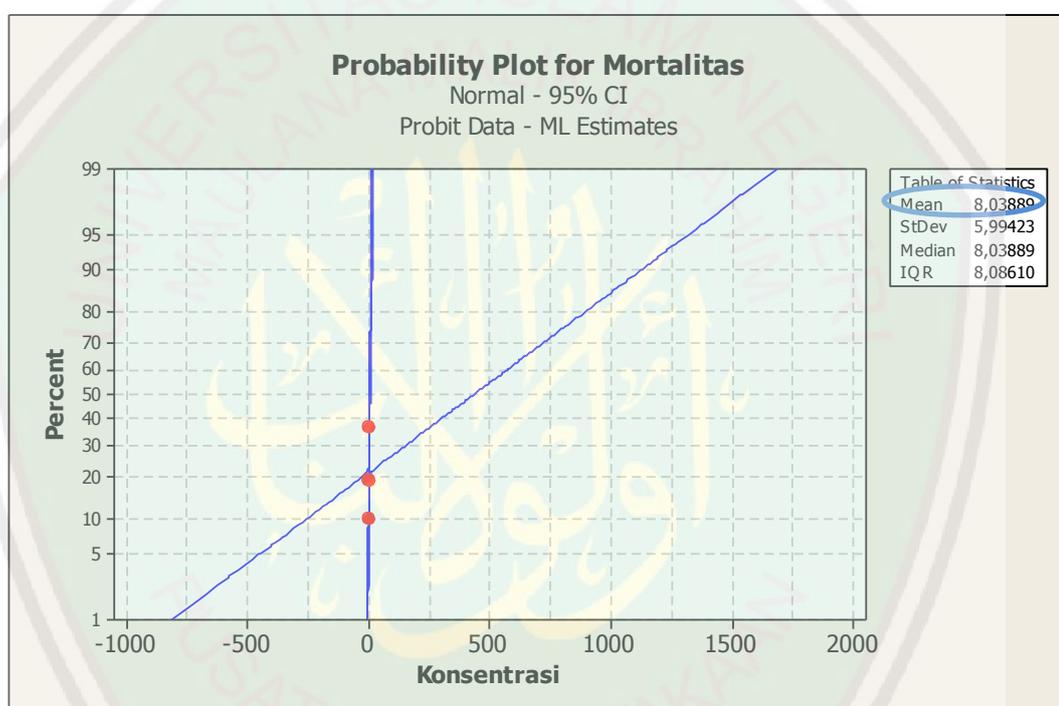


L.4.2 Hasil Uji Toksisitas Isolat Steroid Fraksi D mikroalga *Chlorella sp.*

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati (ekor)				Mortalitas
	I	II	III	Rata-rata	
0*	0	0	0	0	0
0**	0	0	0	0	0
1	0	2	1	1	3
2	3	1	2	2	6
3	1	2	4	2,3	6,9
4	2	1	1	1,3	3,9
5	2	3	6	3,6	10,8

Keterangan: * : Kontrol Pelarut

** : Kontrol DMSO

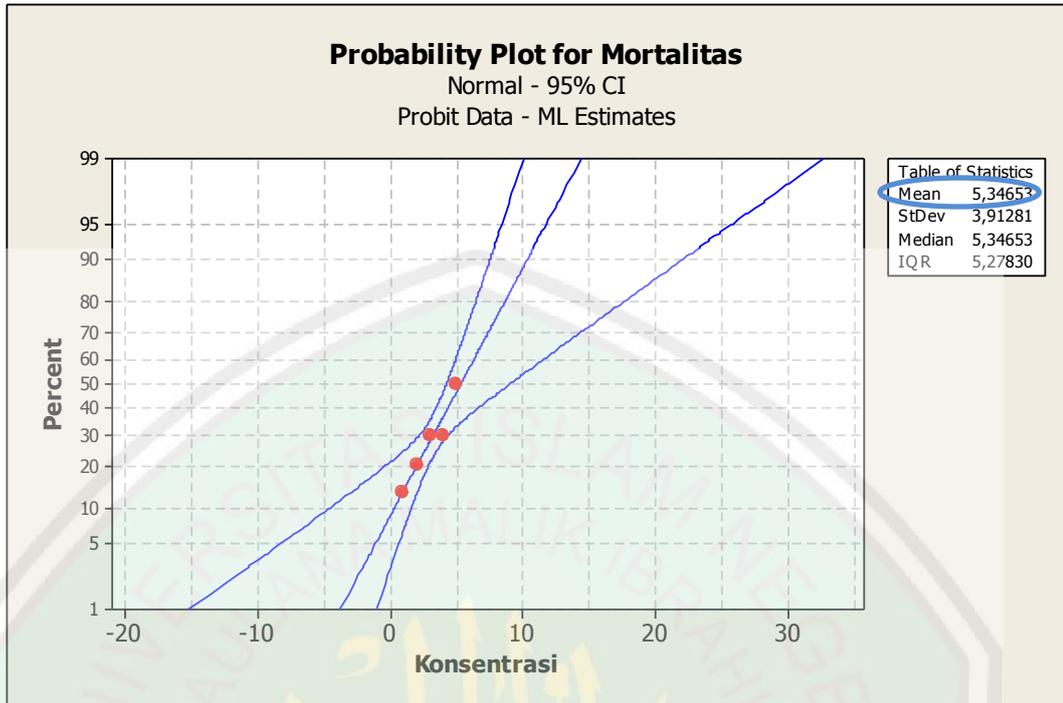


L.4.3 Hasil Uji Toksisitas Isolat Steroid Fraksi F mikroalga *Chlorella sp.*

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati (ekor)				Mortalitas
	I	II	III	Rata-rata	
0*	0	0	0	0	0
0**	0	0	0	0	0
1	2	2	0	1,3	3,9
2	3	1	2	2	6
3	3	3	3	3	9
4	4	1	4	3	9
5	3	5	7	5	15

Keterangan: * : Kontrol Pelarut

** : Kontrol DMSO



Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian

L.5.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge 4%



Tauge



Perebusan tauge



Ekstrak tauge pekat



Medium ekstrak tauge 4%

L.5.2 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*



L.5.3 Pemanenan Biomassa *Chlorella sp.*

Biomassa *Chlorella sp.*

Biomassa sebelum disentrifuge

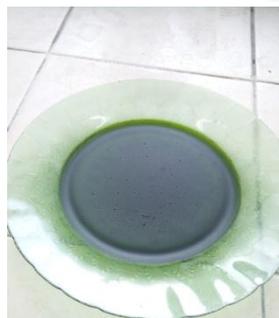


Biomassa setelah disentrifuge



Biomassa hasil sentrifuge setelah dikumpulkan

L.5.4 Preparasi Biomassa *Chlorella sp.*



Pengeringan Biomassa



Biomassa kering setelah dikumpulkan

L.5.5 Ekstraksi Maserasi



Biomassa *Chlorella* sp. sebelum dishaker



Penyaringan dengan corong *buchner*



Ekstrak metanol *Chlorella* sp

L.5.6 Hidrolisis



Hidrolisis dengan HCl 2 N



Penetralan dengan NaHCO_3

L.5.7 Partisi



Partisi ekstrak hasil hidrolisis



Hasil pemisahan fraksi organik



Fraksi etil asetat

L.5.8 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom Basah



Proses pembuatan bubuk silika



Preparasi fase diam

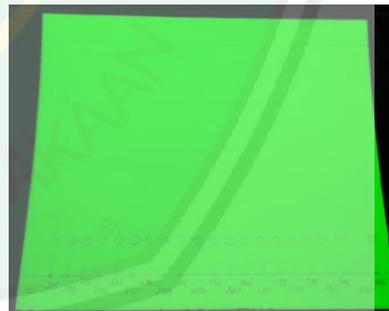
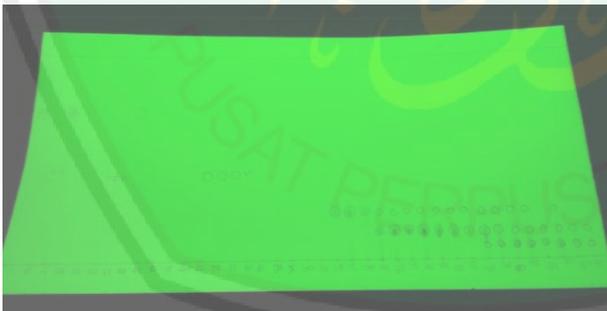


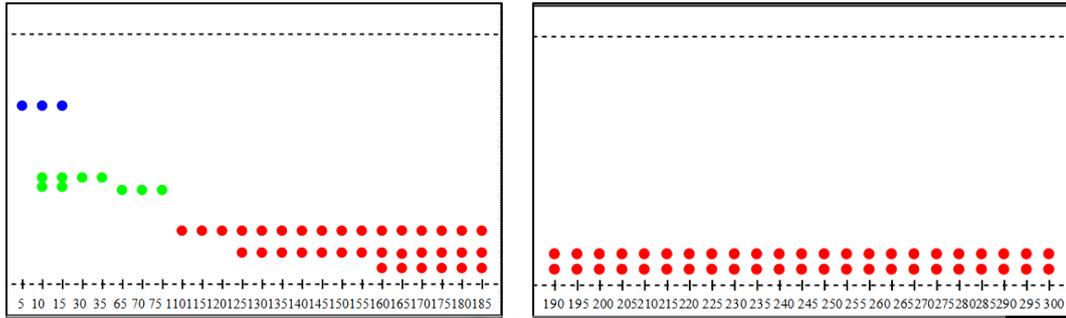
Proses elusi



Vial-vial hasil penampungan

L.5.9 Monitoring Hasil Pemisahan





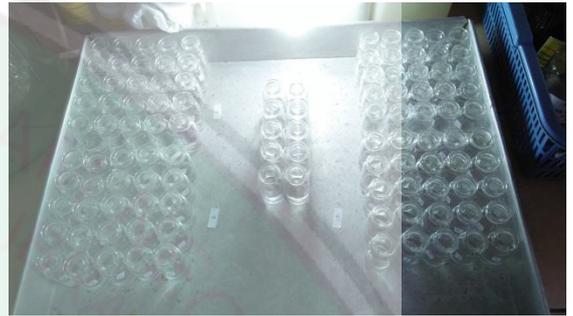
L.5.10 Uji Toksisitas



Penetasan Larva



Preparasi isolat steroid



Uji Toksisitas isolat steroid