

**VARIASI DIAMETER KOLOM PADA PEMISAHAN STEROID DAN
TRITERPENOID FRAKSI PETROLEUM ETER MIKROALGA *Chlorella*
sp. DENGAN KROMATOGRAFI KOLOM**

SKRIPSI

Oleh:
AINUR ROFIQOH
NIM. 13630056



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

**VARIASI DIAMETER KOLOM PADA PEMISAHAN STEROID DAN
TRITERPENOID FRAKSI PETROLEUM ETER MIKROALGA *Chlorella*
sp. DENGAN KROMATOGRAFI KOLOM**

SKRIPSI

Oleh:
AINUR ROFIQOH
NIM. 13630056

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**

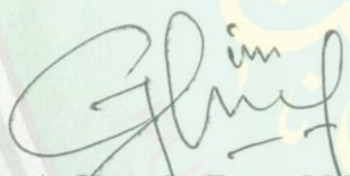
**VARIASI DIAMETER KOLOM PADA PEMISAHAN STEROID DAN
TRITERPENOID FRAKSI PETROLEUM ETER MIKROALGA *Chlorella*
sp. DENGAN KROMATOGRAFI KOLOM**

SKRIPSI

Oleh:
AINUR ROFIQOH
NIM. 13630056

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal 20 Juni 2019

Pembimbing I


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

Pembimbing II


Oky Bagas Prasetyo, M.PdI
NIDT. 19890113 20180201 1 244

**Mengetahui,
Ketua Jurusan**




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

**VARIASI DIAMETER KOLOM PADA PEMISAHAN STEROID DAN
TRITERPENOID FRAKSI PETROLEUM ETER MIKROALGA *Chlorella*
sp. DENGAN KROMATOGRAFI KOLOM**

SKRIPSI

oleh:
AINUR ROFIQOH
NIM. 13630056

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 21 Juni 2019

Penguji Utama	: Elok Kamilah Hayati, M.Si NIP. 19790620 200604 2 002	(.....)
Ketua Penguji	: Dewi Yuliani, M.Si NIDT. 19880711 20160801 2 067	(.....)
Sekretaris Penguji	: A. Ghanaime Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	(.....)
Anggota Penguji	: Oky Bagas Prasetyo, M.PdI NIDT. 19890113 20180201 1 244	(.....)

Mengesahkan,
Ketua Jurusan



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

PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ainur Rofiqoh

NIM : 13630056

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Variasi Diameter Kolom pada Pemisahan Steroid dan Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Kromatografi Kolom

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 kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima saksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 21 Juni 2019

Yang membuat pernyataan,



Ainur Rofiqoh
NIM. 13630056

Halaman Persembahan

بسم الله الرحمن الرحيم

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف الأنبياء والمرسلين سيدنا محمد وعلى آله وصحبه
اجمعين. أقدم هذه الكتابة لأبي و أمي ، لأنهم أعطوني إعانة و دعاء ، أقول شكرا كثيرا إليهم .

- ❖ Thank you to my beloved brother, my sister in law and my future nephew.
Thank you for all of your supports and prays, and thank you to all of my family.
- ❖ Thank you to my girls' squad (Mbak coupenk, Dek Noenk dan Ayu).
- ❖ Thank you to my sisters squad (Zahrotun Nisa' dan Zakiyatul Fikriyah).
- ❖ Thank you to my blue house girls (Robik, Dedew, Ikilah dan Talitha)
- ❖ 우리 엑소 오빠들에게 김민석 오빠, 김준면 오빠, 레이 오빠, 변백현 오빠,
김종대 오빠, 박찬열 오빠, 도경수 오빠, 김종인 오빠, 오세훈 오빠 그리고
슈퍼주니어 조규현 오빠 너무 감사드립니다.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis haturkan kepada Allah SWT yang telah memberikan taufiq dan hidayahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Variasi Diameter kolom Pada Pemisahan Steroid dan Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Kromatografi Kolom”. Sholawat serta salam, tidak lupa penulis ucapkan kepada Nabi besar Muhammad SAW yang telah menunjukkan jalan kebenaran melalui ajaran agama Islam.

Penyusunan skripsi ini penulis susun dengan harapan apa yang telah dituliskan dapat memberi informasi terhadap masyarakat khususnya dalam bidang sains dan farmasi serta untuk memenuhi tugas akhir dalam menyelesaikan program Strata Satu (S1) Sarjana Sains jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari peran dan dukungan serta bimbingan dan arahan dari segenap pihak terkait. Dalam kesempatan ini, penulis menyampaikan rasa hormat dan ucapan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Abdul Haris, M.Ag. selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si selaku dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ahmad Ghanaïm Fasya, M.Si selaku dosen pembimbing, yang telah meluangkan waktu untuk membimbing, memotivasi, mengarahkan dan memberikan masukan dalam penyusunan skripsi ini.
5. Dewi Yuliani, M.Si selaku dosen konsultan, yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan arahan dan bimbingan dalam menyelesaikan skripsi.
6. Oky Bagas Prasetyo, M.PdI sebagai dosen pembimbing agama yang telah memberikan arahan dan bimbingan dalam penyelesaian penulisan skripsi.
7. Jalaludin Suyudi dan Rahma Zubaida selaku orang tua yang senantiasa memberikan dukungan, motivasi dan doa.

8. Seluruh Dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu, pengetahuan, pengalaman, wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
9. Seluruh staf laboratorium dan staf administrasi Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang atas bantuan dan arahnya selama proses penelitian dan penyusunan skripsi.
10. Teman-teman Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, yang telah memberi motivasi, informasi, dan masukannya pada penulis.
11. Kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah ikut memberikan bantuan dan motivasi selama penyusunan skripsi ini.

Akhirnya dengan memohon ridho Allah SWT, semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan balasan kepada semua pihak yang telah membantu hingga selesainya skripsi ini. Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, saran dan kritik dari berbagai pihak sangat diharapkan demi terwujudnya karya yang lebih baik untuk masa yang akan datang dan bisa memberikan manfaat bagi kita semua. *Aamiin ya Robbal 'aalamiin.*

Malang, 21 Juni 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
مستخلص البحث	xv
 BAB I PENDAHULUAN	
1. 1 Latar Belakang	1
1. 2 Rumusan Masalah	4
1. 3 Tujuan	5
1. 4 Batasan Masalah	5
1. 5 Manfaat	6
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	7
2.2 Manfaat dan Kandungan Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.....	7
2.3 Steroid	8
2.4 Triterpenoid.....	9
2.5 Ekstraksi Komponen Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	10
2.6 Hidrolisis dan Partisi	11
2.7 Kromatografi Kolom.....	12
 BAB III METODOLOGI	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	14
3.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	14
3.2.1 Alat	14
3.2.2 Bahan.....	14
3.3 Tahapan Penelitian	15
3.4 Cara Kerja	15
3.4.1 Kultivasi dan Pemanenan Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	15
3.4.2 Penentuan Kadar Air	16
3.4.3 Ekstraksi Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	16
3.4.4 Uji Steroid dan Triterpenoid	17
3.4.5 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom	17
3.4.6 Monitoring dengan KLT dan Uji Lieberman Burchad.....	18
3.4.7 Analisis Data	18

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Kultivasi dan Pemanenan Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	19
4.2	Penentuan Kadar Air	19
4.3	Ekstraksi Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	20
4.4	Uji Steroid dan Triterpenoid	21
4.5	Pemisahan dengan Kromatografi Kolom dan Monitoring KLT	22
4.5.1	Kromatografi Kolom Diameter 1cm	22
4.5.2	Kromatografi Kolom Diameter 1,5 cm	24
4.5.3	Kromatografi Kolom Diameter 2 cm	25
4.5.4	Penentuan Diameter Kolom Terbaik	27
4.6	Integrasi Penelitian dengan Islam	28

BAB V PENUTUP

5.1	Kesimpulan	31
5.2	Saran	31

DAFTAR PUSTAKA	32
LAMPIRAN.....	37

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Kerangka Dasar Steroid	9
Gambar 2.2	Senyawa Triterpenoid	10
Gambar 4.1	Hasil Uji Reagen Lieberman-Burchard	21
Gambar 4.2	Hasil Monitoring Diameter Kolom 1 cm	23
Gambar 4.3	Hasil Monitoring Diameter Kolom 1,5 cm	24
Gambar 4.4	Hasil Monitoring Diameter Kolom 2 cm	27



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Hasil Monitoring Diameter Kolom 1 cm.....	23
Tabel 4.2 Hasil Monitoring Diameter Kolom 1,5 cm.....	25
Tabel 4.3 Hasil Monitoring Diameter Kolom 2 cm.....	26
Tabel 4.4 Data Fraksi Tunggal Masing-Masing Kolom.....	27



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian	37
Lampiran 2. Diagram Alir	38
Lampiran 3. Perhitungan, Pembuatan Reagen dan Larutan	42
Lampiran 4. Uji Kadar Air	45
Lampiran 5. Perhitungan Rendemen	46
Lampiran 6. Monitoring Hasil Isolasi	47
Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian	49



ABSTRAK

Rofiqoh, Ainur. 2019. **Variasi Diameter Kolom pada Pemisahan Steroid dan Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Kromatografi Kolom.** Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Oky Bagus Prasetyo, M.Pd.I; Konsultan: Dewi Yuliani, M.Si

Kata Kunci: Diameter kolom, steroid, triterpenoid, *chlorella* sp., kromatografi kolom

Senyawa steroid dan triterpenoid diisolasi dari mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan kromatografi kolom dengan variasi diameter kolom. *Chlorella* sp. dikultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (4%) dan dipanen pada hari kesepuluh menggunakan metode sentrifugasi. Tahapan isolasi steroid dan triterpenoid mikroalga *Chlorella* sp. berupa ekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol p.a, hidrolisis menggunakan HCl 2 N, partisi dengan petroleum eter dan pemisahan menggunakan kromatografi kolom. Hasil rendemen ekstraksi maserasi sebesar 23,79% dan rendemen partisi sebesar 55,06%. Variasi diameter kolom yang digunakan adalah 1 cm, 1,5 cm dan 2 cm. Hasil pemisahan dimonitoring menggunakan KLT. Hasil monitoring menunjukkan kolom berdiameter 1 cm menghasilkan 1 fraksi steroid (R_f 0,69) dan 2 fraksi triterpenoid (R_f 0,50 dan 0,33). Kolom berdiameter 1,5 cm menghasilkan 1 fraksi steroid (R_f 0,44) dan 3 fraksi triterpenoid (R_f 0,30; 0,21 dan 0,14). Kolom diameter 2 cm menghasilkan fraksi terbanyak dengan 2 fraksi steroid (R_f 0,94 dan 0,56) dan 3 fraksi triterpenoid (R_f 0,44; 0,26 dan 0,19).

ABSTRACT

Rofiqoh, Ainur. 2019. **The Variation of Column Diameter in Steroid and Trirerpenoid Separations from Petroleum Ether Fraction of *Chlorella* sp. using Column Chromatography**. Thesis. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Supervisor II: Oky Bagas Prasetyo, M.Pd.I; Consultant: Dewi Yuliani, M.Si

Keywords: Column diameter, steroid, triterpenoid, *chlorella* sp., column chromatography

Steroid and triterpenoid compounds were isolated from microalgae *Chlorella* sp. using chromatography column with the varied diameter column. *Chlorella* sp. was cultivated in a Medium Extract of Sprout (4%) and harvested in the 10th day applying a centrifuge. There are several steps to isolate steroid and triterpenoid. They are macerations with methanol p.a, hydrolysis using HCl 2N, partition with petroleum ether and separation using column chromatography. The yield of maceration was 23.79% while the partition yield was 55.06%. The variations of column diameter used in this research were 1 cm, 1.5 cm, and 2 cm. The separation products were monitored by the use of TLC. The result of monitoring by TLC using diameter column 1 cm showed that there were 1 fraction of steroid (Rf 0.69) and 2 fractions of triterpenoid (Rf 0.50 and 0.33). The separation using diameter column 1.5 cm obtained 1 steroid fraction (Rf 0.44) and 3 triterpenoid fractions (Rf 0.30, 0.21, and 0.14). The best separation was shown in diameter column 2 cm obtaining 2 steroid fractions (Rf 0.94 and 0.56) and 3 triterpenoid fractions (Rf 0.44, 0.26, and 0.19).

مستخلص البحث

الرفيقة، عين. ٢٠١٩. الاختلاف في قطر العمود على فصل جزء الستيريود والتريترفينويد ببتروال الأثير من الطحالب الصغيرة شلوريا بفصل كروماتوغرافي العمود. رسالة البحث. قسم الكيمياء كلية العلوم والتكنولوجيا جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: أحمد غنائم فشا الماجستير، المشرف الثاني: أكي بقس برستي، والمستشارة: ديوي يولياني الماجستير.

الكلمات الأساسية: قطر العمود، الستيريود، التريترفينويد، شلوريا، فصل كروماتوغرافي العمود.

كان الستيريود و التريترفينويد معزولا من الطحالب الصغيرة شلوريا بفصل كروماتوغرافي العمود باختلاف قطر العمود. تزرع شلوريا في مقتطف برعم الفاصوليا (٤ %) و تحصد في اليوم العاشر باستخدام طريقة طرد المركزي. يتكون عزل الستيريود والتريترفينويد من عدة مراحل، وهي: استخراج النقاة بمذيب الميثانول و تحليل المائي باستخدام حمض الهيدروكلوريك ٢ ن و التقسيم ببتروال الأثير و فصل المركبات باستخدام العمود اللوني.

كان العائد من استخراج النقاة ٢٣,٧٩ % وكان العائد من التقسيم ببتروال الأثير ٥٥,٠٦ %. وكان الاختلاف في قطر العمود هو ١ و ١,٥ و ٢ سنتيمتر. تتم مراقبة نتائج فصل المركبات باستخدام كروماتوغرافي رقيقة اللون. أظهرت نتائج المراقبة أنّ العمود بقطر ١ سنتيمتر انتاج الواحد من جزء الستيريود (بعامل الاحتفاظ ٠,٦٩) و اثنين من جزء التريترفينويد (بعامل الاحتفاظ ٠,٥٠ و ٠,٣٣). و العمود بقطر ١,٥ سنتيمتر انتاج الواحد من جزء الستيريود (بعامل الاحتفاظ ٠,٤٤) و ثلاث من جزء التريترفينويد (بعامل الاحتفاظ ٠,٣٠ و ٠,٢١ و ٠,١٤). و العمود بقطر ٢ سنتيمتر انتاج اكثر الجزء هو اثنان من جزء الستيريود (بعامل الاحتفاظ ٠,٩٤ و ٠,٥٦) و ثلاث من جزء التريترفينويد (بعامل الاحتفاظ ٠,٤٤ و ٠,٢٦ و ٠,١٩).

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tumbuhan merupakan salah satu ciptaan Allah SWT yang memiliki beragam manfaat. Allah SWT memerintahkan manusia yang memiliki akal dan pikiran untuk selalu berfikir agar mendapatkan pelajaran. Sebagaimana yang terkandung dalam surat az Zumar ayat 21:



Artinya: "Apakah engkau tidak memperhatikan, bahwa Allah menurunkan air dari langit, lalu diaturnya menjadi sumber-sumber air di bumi, kemudian dengan air itu ditumbuhkan-Nya tanam-tanaman yang bermacam-macam warnanya, kemudian menjadi kering, lalu engkau melihatnya kekuning-kuningan, kemudian dijadikan-Nya hancur berderai-derai. Sungguh, pada yang demikian itu terdapat pelajaran bagi orang-orang yang mempunyai akal sehat"

Berdasarkan Tafsir Jalalain (2007) dalam ayat tersebut terdapat peringatan bagi orang yang mempunyai akal dan mengambil pelajaran darinya. Ayat di atas menjelaskan bahwa Allah SWT menganjurkan manusia sebagai makhluk yang berakal untuk mempelajari tumbuhan. Tumbuhan mempunyai berbagai manfaat salah satunya adalah mikroalga *Chlorella* sp. Mikroalga *Chlorella* sp. dapat digunakan sebagai sumber produksi pigmen fotosintesis yang digunakan sebagai *dye-sensitized solar cells* (Nurachman, dkk., 2015), sebagai sumber produksi bioetanol (Jehlee, dkk., 2017) dan sebagai biodiesel (Ho, dkk.,

2017). Mikroalga *Chlorella* sp. juga mengandung beberapa senyawa aktif yang bermanfaat sebagai antioksidan (Bariyyah, dkk., 2013; Anggraeni, dkk., 2014) dan sebagai antibakteri (Setyaningsih, dkk., 1999; Wenno, dkk., 2010; Fasya dkk., 2013; Khamidah dkk., 2014; Kumalasari dkk., 2014). Senyawa aktif yang dapat diisolasi dari mikroalga *Chlorella* sp. adalah steroid dan triterpenoid (Handoko, 2016).

Isolasi senyawa steroid dan triterpenoid dilakukan dalam empat tahap yaitu maserasi, pemisahan, pemurnian dan identifikasi. Maserasi merupakan proses perendaman dengan pelarut terpilih yang mudah dilakukan dan cenderung memiliki rendemen tinggi (Saifudin, 2014). Pelarut yang digunakan pada proses maserasi adalah metanol. Penelitian Fasya, dkk. (2016) menunjukkan bahwa ekstrak metanol *Chlorella* sp. menghasilkan rendemen 21,89% yang merupakan rendemen yang cukup tinggi.

Ekstrak kasar metanol *Chlorella* sp. hasil maserasi berupa senyawa steroid dan triterpenoid dalam bentuk glikosida, sehingga perlu dihidrolisis dengan asam kuat yaitu asam klorida (HCl) (Fasya, dkk., 2013; Fasya, dkk., 2016). Menurut Nihlati, dkk. (2008) penggunaan asam klorida (HCl) tidak berbahaya karena akan membentuk garam. Pemisahan lanjutan setelah proses hidrolisis adalah partisi. Partisi dilakukan untuk memisahkan komponen gula (glikon) dan metabolit sekunder (aglikon). Anggraeni, dkk. (2014) melakukan partisi bertingkat pada ekstrak *Chlorella* sp. dan partisi terbaik menggunakan petroleum eter dengan rendemen 8,1854%.

Pemisahan lanjutan dilakukan untuk mendapatkan senyawa steroid dan triterpenoid yang lebih murni. Kolom kromatografi merupakan salah satu metode

yang dapat digunakan dalam proses pemurnian steroid dan triterpenoid dan menghasilkan banyak isolat (Septiandari, 2016). Menurut Handoko (2016) penggunaan kromatografi kolom basah lebih baik dalam isolasi steroid dan triterpenoid *Chlorella* sp. dari pada metode kering. Penggunaan metode basah menghasilkan 1 fraksi murni steroid dan 4 fraksi murni triterpenoid, sedangkan pada metode kering dihasilkan masing-masing satu fraksi untuk senyawa steroid dan triterpenoid (Handoko, 2016).

Kondeti, dkk. (2014) menyatakan bahwa terdapat beberapa cara agar pemisahan menggunakan kromatografi kolom lebih optimal yaitu dengan mengatur ukuran partikel fase diam, komposisi fase gerak dan ukuran kolom. Pemilihan fase diam yang sesuai penting dilakukan untuk menghindari adanya reaksi dalam kolom. Fase diam yang banyak digunakan pada pemisahan senyawa steroid dan triterpenoid adalah silika gel. Silika gel banyak digunakan dalam pemisahan bahan alam. Handoko (2016) melakukan isolasi steroid dan triterpenoid *Chlorella* sp. menggunakan perbandingan sampel dan silika 1:200 menghasilkan 1 fraksi steroid dan 4 fraksi triterpenoid.

Pemilihan fase gerak pada kromatografi kolom juga penting untuk meminimalisir kekurangan dari pemisahan kromatografi kolom. Pemilihan fase gerak disesuaikan dengan senyawa yang akan dipisahkan. Fase gerak juga berhubungan dengan laju alir, sesuai dengan teori laju bahwa laju alir yang optimum akan dapat meningkatkan nilai efisiensi kolom (N). Menurut Hidayah (2015) eluen terbaik untuk pemisahan steroid pada *Chlorella* sp. menggunakan kromatografi lapis tipis adalah campuran n-heksana dan etil asetat (4:1). Menurut

Nisa' (2017) penggunaan eluen terbaik untuk pemisahan steroid dan triterpenoid adalah campuran n-heksana dan etil asetat (9:1).

Variasi ukuran kolom juga diketahui dapat mempengaruhi hasil isolasi steroid. Kondeti, dkk. (2014) menyatakan bahwa efisiensi kolom tergantung pada diameter dan panjang adsorben pada kolom. Pemisahan menggunakan jumlah adsorben yang sama dan kolom berdiameter berbeda akan menghasilkan jumlah plate yang berbeda. Berdasarkan teori plate diketahui bahwa banyaknya lapisan plate (N) yang terbentuk dapat mempengaruhi hasil pemisahan. Kromatografi kolom dapat dilakukan menggunakan kolom dengan ukuran 1-3 cm (Atun 2014), sehingga variasi diameter kolom yang digunakan pada penelitian ini adalah 1; 1,5 dan 2 cm.

Berdasarkan acuan di atas, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh diameter kolom terhadap pemisahan steroid dan triterpenoid *Chlorella* sp. menggunakan kolom kromatografi basah. Proses maserasi dilakukan dengan pelarut metanol dan HCl 2N untuk proses hidrolisis. Pemisahan steroid dan triterpenoid dilanjutkan dengan proses partisi dengan petroleum eter. Proses pemurnian dilakukan menggunakan kolom kromatografi kolom basah dengan variasi diameter kolom. Fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom dianalisis menggunakan KLT

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana hasil pemisahan steroid dan triterpenoid fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan kromatografi kolom diameter 1 cm?

2. Bagaimana hasil pemisahan steroid dan triterpenoid fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella* sp. dengan kromatografi kolom diameter 1,5 cm?
3. Bagaimana hasil pemisahan steroid dan triterpenoid fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan kromatografi kolom diameter 2 cm?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui hasil pemisahan steroid dan triterpenoid fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan kromatografi kolom dengan diameter berukuran 1, 1,5 dan 2 cm.

1.4 Batasan Masalah

1. Isolat mikroalga *Chlorella* sp. yang digunakan merupakan hasil dari budi daya di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Kultivasi mikroalga *Chlorella* sp. dilakukan dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%.
3. Pemanenan mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan metode sentrifugasi.
4. Ekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol p.a
5. Fraksinasi menggunakan pelarut petroleum eter.
6. Isolasi steroid dengan kromatografi basah menggunakan eluen n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 9:1.
7. Perbandingan silika gel dan sampel adalah 1:200.
8. Monitoring dengan KLT menggunakan eluen n-heksana dan dengan perbandingan 4:1.

1.5 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai acuan pemanfaatan mikroalga *Chlorella* sp. Penelitian ini dapat memberikan informasi cara memisahkan steroid dan triterpenoid pada *Chlorella* sp. menggunakan kromatografi kolom dan dapat digunakan sebagai acuan informasi diameter terbaik untuk menghasilkan steroid dan triterpenoid terbanyak.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga *Chlorella* sp.

Mikroalga *Chlorella* sp. merupakan salah satu jenis mikroalga *Chlorophyta*. Singh dan Saxena (2015) menyatakan bahwa rata-rata ukuran mikroalga adalah 5-50 μm dengan morfologi yang sederhana. Nilai densitas sel *Chlorella* sp. maksimum mencapai 16×10^6 sel/ml pada kondisi murni (Shah, 2003). *Chlorella* sp. banyak digunakan sebagai pakan ternak, suplemen, biodiesel, penghasil komponen bioaktif bahan farmasi dan kedokteran. *Chlorella* sp. mengandung berbagai sumber nutrisi seperti protein, vitamin, mineral, karbohidrat, klorofil (Steenblock, 2000). Klasifikasi *Chlorella* sp. (Bold dan Wynne, 1985) adalah sebagai berikut:

Divisi	: Chlorophyta
Kelas	: Chlorophyceae
Ordo	: Chlorococcales
Famili	: Oocystaceae
Genus	: Chlorella
Spesies	: <i>Chlorella</i> sp.

2.2 Manfaat dan Kandungan Mikroalga *Chlorella* sp.

Chlorella sp. merupakan salah mikroalga golongan *Chlorophyta* yang terdiri dari komponen-komponen penting seperti protein, klorofil, karbohidrat, dan lipid (Costrad, dkk., 2012). Menurut Wenno, dkk. (2010), *Chlorella* sp. dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*, *S. aureus*, *A. hydrophyla* dan *P. aeruginosa* dengan diameter zona hambat yaitu 1,3 cm, 2,7 cm, 2,9 cm dan 1,9 cm. Khamidah, dkk. (2014) melakukan uji aktivitas ekstrak metanol *Chlorella* sp.

terhadap *E. coli* dengan konsentrasi 20% dan hasil zona hambat terbesar yaitu 16,5 mm dan terhadap *S. aureus* dengan konsentrasi 25% zona hambat terbesar adalah 13,1 mm.

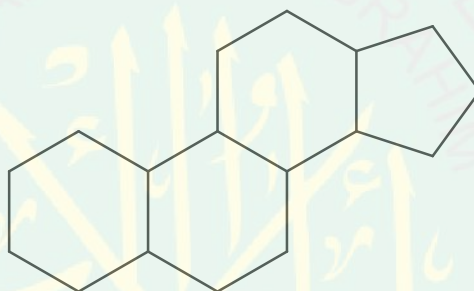
Mikroalga *Chlorella* sp. dapat digunakan sebagai antioksidan. Penelitian Bariyyah, dkk. (2013) menunjukkan bahwa ekstrak metanol *Chlorella* sp. memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai EC_{50} sebesar 18,610 ppm dan ekstrak etil asetat mempunyai nilai aktivitas antioksidan EC_{50} adalah 27,320 ppm. Anggraeni, dkk. (2014) melakukan uji aktivitas antioksidan terhadap hasil hidrolisis ekstrak metanol *Chlorella* sp. menggunakan fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter dan n-heksana dengan nilai EC_{50} berturut-turut 1,333, 332,7, 182,0, 27,26 dan 173,7 ppm.

Chlorella sp. mengandung beberapa senyawa aktif yang bermanfaat seperti steroid dan triterpenoid. Khamidah, dkk. (2014) hasil identifikasi menunjukkan bahwa ekstrak metanol *Chlorella* sp. mengandung senyawa steroid dan triterpenoid. Anggraeni, dkk. (2014) hasil uji fitokimia *Chlorella* sp. fraksi n-heksana, fraksi petroleum eter, kloroform dan etil asetat menunjukkan hasil positif terhadap senyawa steroid. Handoko (2016) memisahkan senyawa steroid dan triterpenoid pada *Chlorella* sp. menggunakan kromatografi kolom basah.

2.3 Steroid

Steroid merupakan salah satu kelas utama lipid yang memiliki struktur yang berbeda dari kelas-kelas lipid yang lain yang terdiri dari tiga cincin sikloheksana dan satu siklopentana dalam sistem cincin yang menyatu (Gambar 2.1). Saleh (2007) melakukan isolasi steroid yang berupa fitosterol dari akar

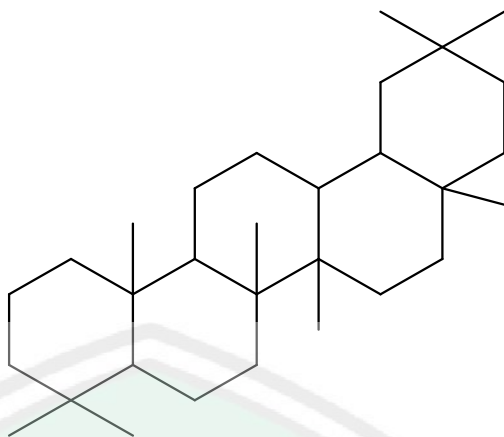
tanaman cendana (*Santalum album* Linn) menggunakan kromatografi kolom dan diidentifikasi menggunakan spektrofotometer inframerah. Steroid dapat diekstrak dari rumput laut *Eucheuma denticullaurtum* menggunakan pelarut metanol yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Wiyanto, dkk., 2010). Krisna, dkk. (2014) mengekstrak steroid dari daun bayam dan menguji aktivitas antioksidan terhadap difenilpikril hidrazil (DPPH) dengan nilai IC_{50} sebesar 4 ppm. Steroid juga dapat diekstrak dari tanaman tingkat rendah seperti *Chlorella* sp. Chaidir, dkk. (2017) melakukan uji fitokimia terhadap ekstrak metanol *Chlorella* sp. dengan hasil positif terhadap steroid.



Gambar 2.1 Kerangka dasar steroid (Sumbono, 2016)

2.4 Triterpenoid

Harborne (1996) menyatakan bahwa senyawa triterpenoid merupakan senyawa yang terdiri dari enam satuan isoprene yang diturunkan dari hidroksi karbon C_{30} asiklik dan berbentuk siklik yang sangat rumit (Gambar 2.2). Kristanti, dkk. (2008) menyebutkan bahwa triterpenoid dapat ditemukan pada jaringan tumbuhan dalam bentuk bebas dan terdapat pula dalam bentuk glikosidanya.



Gambar 2.2 Senyawa triterpenoid (Robinson, 1996)

Triterpenoid dapat diisolasi dari beberapa spesies tanaman obat dan memiliki aktivitas biologis (Widiyati, 2005). Gunawan, dkk. (2008) mengisolasi dan identifikasi senyawa triterpenoid antibakteri pada herba meniran (*Phyllanthus niruri* Linn) menggunakan Kromatografi Gas – Spektroskopi Massa. Hasil uji fitokimia triterpenoid menggunakan pereaksi Lieberman-Burchard ditunjukkan dengan adanya perubahan warna dari kuning menjadi ungu muda. Hasil pemisahan triterpenoid dari fraksi petroleum eter *Chlorella* sp. menggunakan kromatografi kolom basah menghasilkan 4 fraksi murni triterpenoid (Handoko, 2016).

2.5 Ekstraksi Komponen Mikroalga *Chlorella* sp.

Ekstraksi maserasi merupakan proses perendaman dengan pelarut terpilih yang mudah dilakukan dan cenderung memiliki rendemen tinggi (Saifudin, 2014). Penelitian ini dilakukan menggunakan proses ekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol. Pelarut merupakan hal penting dalam ekstraksi maserasi. Pemilihan pelarut didasarkan pada sifat kepolaran senyawa yang akan diekstrak.

Pelarut yang biasa digunakan berupa pelarut air dan pelarut organik (Saifudin, 2014). Khamidah, dkk. (2014) ekstraksi maserasi *Chlorella* sp. menggunakan pelarut metanol memiliki nilai rendemen sebesar 7,001 %. Anggraeni, dkk. (2014) menggunakan pelarut yang sama menghasilkan rendemen sebesar 13,6069 %. Fasya, dkk. (2016) memiliki rendemen yang lebih besar yaitu 21,89 %.

Ekstraksi maserasi yang berulang atau disebut dengan remaserasi perlu dilakukan agar komponen aktif yang diinginkan dapat terekstrak sempurna (Atun, 2014). Senyawa steroid dan triterpenoid yang dihasilkan dari proses remaserasi masih berupa glikosida steroid dan glikosida triterpenoid (Bogoriani, 2004). Glikosida steroid dan glikosida triterpenoid adalah steroid dan triterpenoid memiliki ikatan glikosida. Pemutusan gugus glikosida perlu dilakukan agar didapat steroid dan triterpenoid tunggal.

2.6 Hidrolisis dan Partisi

Hidrolisis merupakan proses pemutusan ikatan glikosida yang terjadi melalui reaksi yang menggunakan air sehingga membentuk senyawa yang lebih sederhana (Adhiatama, dkk., 2012). Hidrolisis dilakukan untuk memutuskan ikatan glikosida pada steroid dan triterpenoid. Reaksi hidrolisis ini memerlukan bantuan katalisator untuk mempercepat reaksi karena reaksi dengan air dapat berjalan sangat lambat (Nihlati, dkk., 2008). Katalis yang biasa digunakan berupa katalis asam kuat seperti asam klorida dan asam sulfat (Setyadi, 2007).

Hasil hidrolisis dipartisi menggunakan pelarut petroleum eter. Hasil partisi Anggraeni, dkk. (2014) menunjukkan bahwa pelarut n-heksana dan petroleum eter memiliki rendemen 45,6132 % dan 8,1854%. Hasil partisi menggunakan pelarut

petroleum eter memiliki kemampuan antioksidan terbesar pada konsentrasi 30 ppm dengan persen aktivitas sebesar 64,8839%. Fasya, dkk. (2016) juga melakukan partisi terhadap ekstrak *Chlorella* sp. menggunakan pelarut petroleum eter dengan hasil rendemen yang lebih besar yaitu 50,63%.

2.7 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan salah satu metode untuk memurnikan senyawa kimia dari senyawa campuran (Kondeti, dkk., 2014). Prinsip dasar yang digunakan pada kromatografi kolom didasarkan pada prinsip adsorpsi. Menurut Khopkar (2003) efisiensi kolom dapat dijelaskan dengan teori plate (N). Teori plate menggambarkan bahwa kolom terdiri dari beberapa lapisan plat. Semakin besar nilai N maka pemisahan yang dihasilkan semakin baik. Jumlah plat (N) dan tinggi plat (H) digunakan untuk menjelaskan efisiensi kolom. Tinggi plat teoritis (HETP = *Height Equivalent to a Theoretical Plate*) berhubungan dengan panjang kolom (L) dan dinyatakan dalam Persamaan 2.1:

$$HETP = L/N \dots\dots\dots (2.1)$$

Nilai HETP dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu difusi Eddy (A), difusi longitudinal (B) dan transfer massa (C) sesuai dengan persamaan van Deemter pada Persamaan 2.2:

$$H = A + B/\mu + C \cdot \mu \dots\dots\dots (2.2)$$

Kondeti, dkk. (2014) mengungkapkan bahwa terdapat beberapa cara untuk meminimalisir kekurangan dari pemisahan kromatografi kolom yaitu dengan mengatur komposisi fasa gerak, ukuran partikel fasa stasioner, ukuran kolom. Imamah (2015) menunjukkan bahwa eluen terbaik hasil KLT analitik untuk

ekstrak metanol *Chlorella* sp. adalah pelarut campuran antara n-heksana dan etil asetat dengan rasio 4:1. Menurut Atun (2014) silika gel yang biasa digunakan memiliki ukuran 200 – 400 mesh.

Pemilihan ukuran kolom untuk pemisahan kromatografi merupakan hal yang perlu diperhatikan. Menurut Atun (2014), diameter kolom yang digunakan adalah 1 – 3 cm. Penelitian yang membahas tentang pengaruh dari ukuran kolom kromatografi belum banyak dilakukan. variasi ukuran kolom dapat menentukan kolom terbaik untuk pemisahan. Menurut Kondeti, dkk. (2014) pemisahan menggunakan diameter 1 cm akan menghasilkan pemisahan yang lebih baik dari pada menggunakan 2 cm.

Preparasi kromatografi kolom umumnya memiliki dua cara yaitu cara kering (*the dry method*) dan cara basah (*the wet method*) (Kondeti, dkk., 2014). Pada penelitian ini digunakan menggunakan kromatografi kolom basah. Penelitian yang dilakukan oleh Handoko (2016) menunjukkan bahwa penggunaan cara basah menghasilkan pemisahan yang lebih baik pada pemisahan ekstrak *Chlorella* sp. yaitu didapat 1 fraksi steroid murni dan 4 fraksi murni triterpenoid. Pemisahan menggunakan cara kering menghasilkan fraksi murni yang lebih sedikit yaitu satu fraksi steroid dan satu fraksi triterpenoid.

Hasil isolat kromatografi kolom basah diuji tingkat kemurnian steroid dan triterpenoid menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Plat hasil KLT diamati di bawah sinar UV dan diuji menggunakan reagen Liberman-Burchard (LB). Hasil pengujian triterpenoid membentuk warna merah (Rumondang, dkk., 2013) dan steroid membentuk warna hijau (Ismarti, 2011).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia dan Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada Maret-Desember 2018.

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada proses kultivasi dan pemanenan adalah seperangkat alat gelas, *centrifuge* dan neraca analitik. Proses penentuan kadar air dan ekstraksi menggunakan desikator, cawan porselen, oven, *shaker*, *rotary evaporator*, hot plate, dan aluminium foil. Alat-alat pada proses pemisahan dengan kromatografi kolom dan monitoring adalah seperangkat alat gelas, resin kolom, plat KLT.

3.6.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada proses kultivasi adalah isolat *Chlorella* sp., ekstrak taugé dan aquadest. Proses ekstraksi menggunakan metanol p.a, petroleum eter p.a, asam klorida 2 N dan NaHCO₃. Uji steroid dan triterpenoid menggunakan kloroform, asam anhidrida dan asam sulfat. Proses pemisahan dengan kromatografi kolom dan proses monitoring menggunakan n-heksana, etil asetat, plat *silica gel* F₂₅₄, *silica gel* 60 dan *glass wool*.

3.7 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Kultivasi dan pemanenan biomassa *Chlorella* sp.;
2. Analisis kadar air sampel kering;
3. Ekstraksi biomassa *Chlorella* sp. dengan pelarut metanol;
4. Uji steroid dan triterpenoid;
5. Pemisahan senyawa aktif steroid dengan metode kromatografi kolom basah dengan menggunakan variasi diameter kolom 1; 1,5 dan 2 cm;
6. Monitoring dengan KLT dengan eluen n-heksana dan etil asetat (4:1);
7. Analisa data.

3.8 Cara Kerja

3.8.1 Kultivasi dan Pemanenan Mikroalga *Chlorella* sp.

Isolat *Chlorella* sp. sebanyak 200 mL ditambahkan ke dalam botol berisi 1000 mL MET 4%. Botol tersebut didiamkan selama 10 hari dalam rak kultivasi yang dilengkapi dengan lampu neon TL. 36 Watt (Prihantini, dkk., 2014). Pemanenan *Chlorella* sp. dilakukan dengan cara memisahkan biomassa *Chlorella* sp. dari filtrat pada fasa stasioner. Pemisahan biomassa menggunakan metode sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Endapan hasil sentrifugasi ditimbang dan didapatkan sampel basah *Chlorella* sp. Air yang terdapat pada sampel basah dibiarkan menguap pada suhu kamar sehingga didapat sampel kering (Anggraeni, dkk., 2014).

3.8.2 Penentuan Kadar Air (AOAC, 1984)

Cawan dipanaskan dalam oven selama 15 menit pada suhu 100 – 105 °C. Cawan kemudian dimasukkan dalam desikator selama 10 menit lalu ditimbang hingga beratnya konstan. Biomassa *Chlorella* sp. ditimbang sebanyak 0,5 gram dalam cawan dan dikeringkan dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama 15 menit. Cawan yang berisi sampel dimasukkan dalam desikator kurang lebih 10 menit dan ditimbang hingga berat konstan. Kadar air sampel biomassa *Chlorella* sp. dihitung menggunakan rumus (AOAC, 1984) Persamaan 3.1:

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

a merupakan berat cawan kosong, b adalah berat sampel dalam cawan sebelum dikeringkan dan c adalah berat sampel dalam cawan setelah dikeringkan dalam satuan berat gram (g).

3.8.3 Ekstraksi Mikroalga *Chlorella* sp.

Ekstraksi *Chlorella* sp. dilakukan dengan cara maserasi menggunakan metanol p.a (98%) dengan perbandingan 1:5. Sampel kering dimaserasi dan diletakkan pada *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama ±24 jam pada suhu kamar. Residu yang didapat dipisahkan dari filtrat dengan cara disaring dan dimaserasi kembali hingga 5 kali proses ekstraksi. Filtrat hasil ekstraksi dari 5 proses tersebut dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vacuum* (Barriyah, dkk., 2013). Ekstrak pekat yang dihasilkan ditimbang dan dihitung rendemen menggunakan Persamaan 3.2 (Khopkar, 2003):

$$\text{Rendemen} = \frac{a}{b} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.2)$$

a adalah berat ekstrak kasar yang diperoleh dalam satuan gram (g) dan b merupakan berat sampel yang diekstrak dalam satuan gram (g).

Ekstrak pekat metanol 3 gram dihidrolisis dengan menggunakan 6 mL HCl 2 N dengan perbandingan 1:2. Ekstrak pekat hasil hidrolisis dipanaskan dan distirer di atas *hot plate*. Natrium bikarbonat ditambahkan ke dalam ekstrak pekat hingga pH netral. Ekstrak pekat dipartisi menggunakan pelarut petroleum eter sebanyak 15 mL, partisi dilakukan hingga 5 kali. Fraksi organik yang didapatkan pada proses partisi kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan dialiri gas N₂. Ekstrak *Chlorella* sp. yang didapat dihitung rendemennya (Anggraeni, dkk., 2014).

3.8.4 Uji Steroid dan Triterpenoid

Ekstrak hasil partisi dengan petroleum eter mikroalga *Chlorella* sp. sebanyak 1 mg dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan dengan 0,5 mL asam anhidrida dan 1 mL larutan asam sulfat pekat pada dinding tabung reaksi. Terbentuknya senyawa steroid ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan pada campuran tersebut, sedangkan senyawa triterpenoid ditandai dengan terbentuknya cincin kecokelatan atau violet pada pembatas kedua larutan (Khoiriyah, dkk., 2014).

3.8.5 Pemisahan Senyawa Steroid dan Triterpenoid dengan Kromatografi

Kolom Basah

Silika gel ditimbang sebanyak 10 gram dan diaktivasi dalam oven pada suhu 100 °C selama 2 jam. Silika gel yang telah diaktivasi dibuat *slurry* dengan cara dicampurkan dengan campuran n-heksana dan etil asetat (4:1) sebanyak 20 mL, kemudian dimasukkan ke dalam kolom berdiameter 1 cm. Campuran fasa gerak dimasukkan dalam kolom kromatografi secara terus-menerus (Kusmiyati, dkk., 2011).

Sampel sebanyak 0,05 gram dicampurkan dengan eluen 1 mL. Campuran sampel dan eluen dimasukkan ke dalam kolom menggunakan pipet. Kran kolom dibuka tanpa mengatur laju alirnya dan dibiarkan menetes sedikit demi sedikit sebanyak 2 mL pada tiap botol vial. Eluen ditambahkan ke dalam kolom secara terus-menerus hingga vial terakhir. Langkah yang sama diulangi dengan menggunakan kolom berdiameter 1,5 dan 2 cm.

3.8.6 Monitoring dengan KLT dan Uji Lieberman Burchad (Kristanti, dkk., 2008)

Fraksi-fraksi yang ditampung dalam botol vial dilakukan monitoring menggunakan KLT dengan cara ditotolkan setiap fraksi sebanyak 15 totolan dengan jarak setiap totolan adalah 0,5 cm. Monitoring dilakukan tiap 2 vial dari vial pertama hingga terakhir. Plat KLT terlebih dahulu diaktivasi dalam oven selama 30 menit pada suhu 60 – 80 °C. Eluen yang digunakan sama dengan eluen pada kromatografi kolom yaitu campuran n-heksana dan etil asetat (4:1). Plat KLT dimasukkan dalam bejana pengembang dan ditunggu hingga eluen mencapai batas atas. Spot-spot yang terbentuk pada plat KLT diamati di bawah sinar UV 254 nm. Fraksi yang memiliki noda yang hampir sama dijadikan dalam satu fraksi yang besar.

3.8.7 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan cara deskriptif yaitu dengan memperhatikan jumlah fraksi yang mampu memisahkan spot yang diduga senyawa steroid ataupun triterpenoid. Senyawa steroid memberikan warna hijau pada plat KLT, sedangkan senyawa triterpenoid memberikan warna merah.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kultivasi dan Pemanenan Mikroalga *Chlorella* sp.

Kultivasi Mikroalga *Chlorella* sp. bertujuan untuk menumbuhkan kembali sel *Chlorella* sp. dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%. Pertumbuhan sel *Chlorella* sp. terjadi selama sepuluh hari yang ditandai dengan perubahan warna dari hijau terang menjadi hijau gelap. Pemanenan *Chlorella* sp. dilakukan pada hari ke-10 dengan metode sentrifugasi. Menurut Fasya, dkk. (2013) kelimpahan sel *Chlorella* sp. terjadi pada hari ke-10 yang merupakan fase stasioner. Hasil pemanenan *Chlorella* sp. diperoleh sebanyak 15,6430 gram yang berupa sampel kering. Penyimpanan sampel dalam bentuk kering bertujuan untuk mengurangi kadar air dan juga mencegah pertumbuhan jamur pada sampel.

4.2 Penentuan Kadar Air

Kadar air mikroalga *Chlorella* sp. ditentukan menggunakan metode *thermogravimetry*. Kadar air diketahui dari hasil berat sampel sebelum dan setelah dipanaskan. Kandungan air yang tinggi dapat mempengaruhi konsentrasi dan kepolaran pelarut pada proses ekstraksi. Tingginya kadar air pada sampel juga mempengaruhi masa penyimpanan sampel, Menurut Winarno (1997) sampel kering dengan kadar air kurang dari 10% cukup aman untuk mencegah pertumbuhan mikroba pada sampel. Kadar air sampel mikroalga *Chlorella* sp. adalah 8,29%. Hasil kadar air tersebut lebih baik dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Fasya, dkk (2016) yaitu sebesar 10,48%.

4.3 Ekstraksi Mikroalga *Chlorella* sp.

Ekstraksi mikroalga *Chlorella* sp. bertujuan untuk memisahkan steroid dan triterpenoid. Pemisahan pertama dilakukan menggunakan metode maserasi. Ekstraksi maserasi bertujuan untuk memisahkan senyawa aktif pada *Chlorella* sp. menggunakan pelarut metanol. Proses maserasi dilakukan berulang hingga 5 kali pengulangan untuk mendapatkan hasil yang maksimal. Ekstrak metanol yang didapat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vacuum*. Ekstrak metanol pekat yang diperoleh sebanyak 3,7222 gram dari berat 15,6430 gram berat sebelum maserasi, sehingga diperoleh rendemen sebesar 23,79%. Hasil rendemen yang diperoleh lebih besar dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Handoko (2016) dan Imamah (2015) dengan hasil rendemen 21,8926% dan 13,07%. Hal tersebut dikarenakan pengulangan maserasi yang lebih banyak dan nilai kadar air yang lebih rendah.

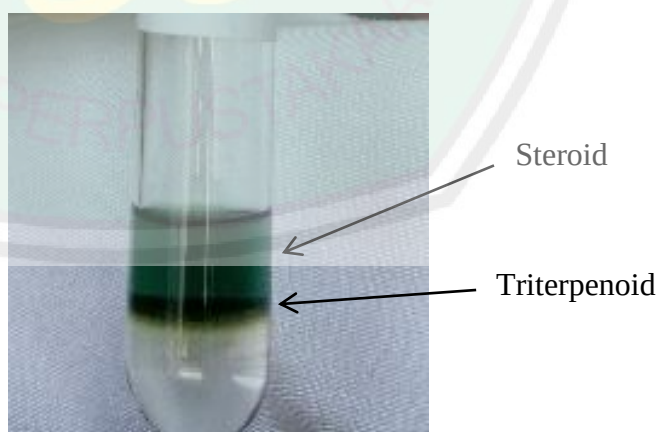
Senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak metanol *Chlorella* sp. berupa senyawa aktif yang terikat dengan gugus glikosida. Pemutusan ikatan glikosida perlu dilakukan untuk mendapatkan senyawa bebas dari steroid dan triterpenoid. Pemutusan ikatan glikosida dilakukan dengan reaksi hidrolisis dengan menambahkan HCl 2N pada ekstrak metanol. Reaksi hidrolisis merupakan reaksi *reversible* (bolak-balik) sehingga perlu ditambahkan natrium bikarbonat untuk menghentikan reaksi dengan menetralkan menggunakan basa.

Proses pemisahan dilanjutkan untuk memisahkan steroid dan triterpenoid dari gugus glikosida menggunakan metode partisi. Partisi dilakukan menggunakan pelarut petroleum eter karena memiliki sifat kepolaran yang sama dengan senyawa steroid dan triterpenoid. Partisi menghasilkan dua lapisan yang berupa

lapisan organik dan lapisan air. Senyawa steroid dan triterpenoid akan tersubstitusi ke dalam lapisan organik. Lapisan organik tersebut dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vacuum* dan menghasilkan rendemen sebesar 55,06%. Hasil partisi lebih besar dari hasil penelitian Rahmawati (2017) sebesar 22,72%.

4.4 Uji Steroid dan Triterpenoid

Identifikasi menggunakan reagen Lieberman-Burchard (LB) dilakukan untuk mengetahui adanya senyawa steroid dan triterpenoid pada fraksi pertoleum eter. Menurut Kristanti, dkk. (2008) reagen LB merupakan reagen spesifik yang digunakan untuk mendeteksi senyawa dari golongan steroid dan triterpenoid. Penambahan reagen LB dapat menyebabkan perubahan warna yang dikarenakan senyawa steroid dan triterpenoid mengalami dehidrasi setelah penambahan asam kuat (Robinson, 1996). Hasil penelitian menunjukkan hasil positif terhadap steroid dilihat dari terbentuknya larutan berwarna hijau dan positif triterpenoid dilihat dari terbentuknya cincin kecoklatan yang ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil uji menggunakan reagen Lieberman-Burchard

4.5 Pemisahan Senyawa Steroid - Triterpenoid dengan Kromatografi Kolom Basah dan Monitoring menggunakan KLT

Pemisahan kromatografi kolom dilakukan menggunakan tiga kolom dengan ukuran diameter yang berbeda yaitu 1, 1,5 dan 2 cm. Pemisahan menggunakan variasi diameter kolom untuk mengetahui adanya pengaruh terhadap pemisahan steroid dan triterpenoid pada *Chlorella* sp. Hasil pemisahan ditampung dalam vial setiap 2 ml. Senyawa steroid akan lebih dulu terpisah karena steroid lebih terikat dengan fase gerak, sedangkan triterpenoid lebih terikat terhadap fase diam sehingga lebih lama tertahan dalam kolom.

4.5.1 Kromatografi Kolom Diameter 1 cm

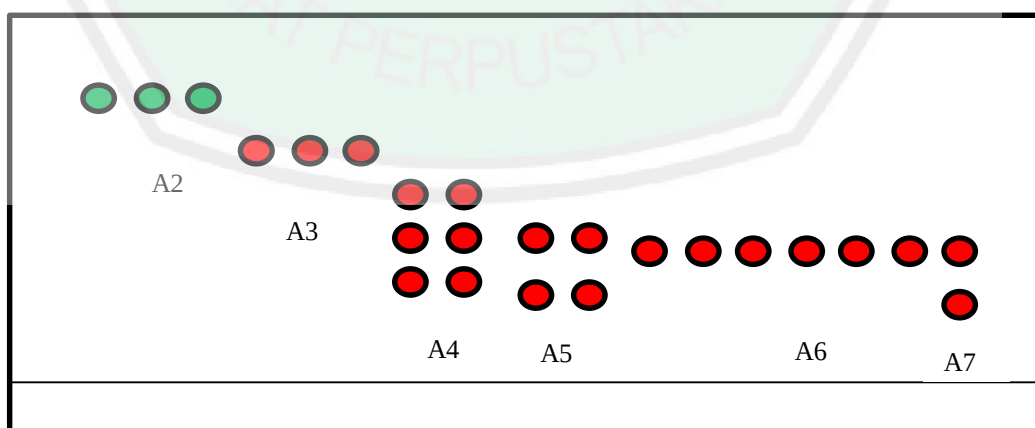
Pemisahan steroid dan triterpenoid *Chlorella* sp. menggunakan kromatografi kolom dengan diameter 1 cm menghasilkan 225 vial. Vial-vial hasil pemisahan kromatografi kolom diidentifikasi menggunakan KLT Analitik. Identifikasi menggunakan KLT dilakukan untuk mengetahui pola pemisahannya. Hasil monitoring menunjukkan adanya spot-spot tunggal dan campuran. Vial-vial yang memiliki jumlah spot, warna spot dan nilai R_f yang sama dikelompokkan dalam fraksi besar (Kusmiyati, dkk., 2011). Hasil monitoring yang menunjukkan warna hijau diduga merupakan senyawa steroid dan spot warna merah merupakan triterpenoid (Saleh, 2007).

Berdasarkan hasil monitoring menggunakan kolom berdiameter 1 cm dihasilkan sebanyak 8 fraksi besar. Dari kedelapan fraksi tersebut terdapat 1 fraksi yang diduga steroid dan 2 fraksi yang diduga triterpenoid. Fraksi A1 tidak menunjukkan adanya pemisahan, hal tersebut diduga karena larutan yang tertampung pada vial masih berupa campuran eluen. Fraksi A2 menunjukkan spot

warna hijau yang diduga steroid dengan nilai R_f 0,69. Steroid memiliki rata-rata nilai R_f yang lebih besar dari pada triterpenoid karena eluen yang digunakan cenderung non polar sehingga senyawa steroid terlebih dulu terpisahkan. Senyawa triterpenoid ditunjukkan pada 2 fraksi yaitu pada fraksi A3 dan fraksi A6 yang memiliki spot tunggal dan berwarna merah memiliki nilai R_f masing-masing 0,50 dan 0,33. Hasil monitoring menggunakan kolom berdiameter 1 cm ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil monitoring kolom d=1

Fraksi	Vial	Jumlah spot	Warna	R_f	Dugaan senyawa
A1	1-18	-	-	-	-
A2	19-44	1	Hijau	0,69	Steroid
A3	45-79	1	Merah	0,50	Triterpenoid
A4	80-91	3	Merah	0,44	Campuran
			Merah	0,33	
			Merah	0,19	
A5	92-111	2	Merah	0,33	Campuran
			Merah	0,14	
A6	112-197	1	Merah	0,33	Triterpenoid
A7	198-219	2	Merah	0,33	Campuran
			Merah	0,19	
A8	220-225	-	-	-	-

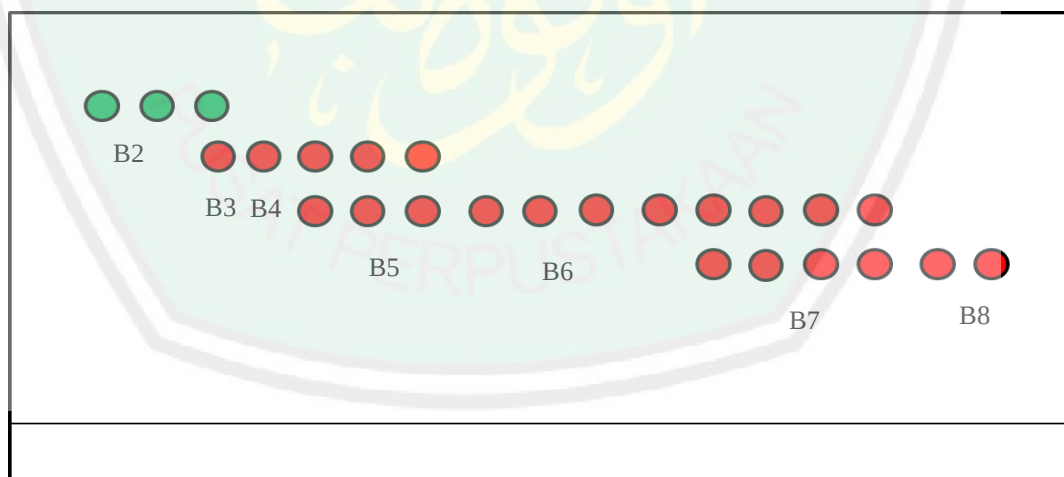


Gambar 4.2 Hasil monitoring menggunakan KLT dengan diameter kolom 1cm

Fraksi-fraksi yang lain masih berupa senyawa campuran dan diduga merupakan senyawa campuran karena ketiganya memiliki jumlah spot lebih dari satu. Hasil monitoring diilustrasikan pada Gambar 4.2 dengan spot warna hijau berupa steroid dan merah berupa triterpenoid.

4.5.2 Kromatografi Kolom Diameter 1,5 cm

Pemisahan steroid dan triterpenoid *Chlorella* sp. menggunakan kolom kromatografi dengan diameter 1,5 cm menghasilkan 205 vial. Hasil pemisahan kromatografi kolom diidentifikasi dengan cara yang sama seperti pada hasil pemisahan kolom berdiameter 1 cm. Hasil identifikasi menunjukkan terdapat 9 fraksi besar dengan 4 fraksi berupa senyawa tunggal dan 5 fraksi berupa senyawa campuran. Sama halnya pada pemisahan menggunakan kolom berdiameter 1 cm, hasil pemisahan kolom diameter 1,5 cm pada fraksi pertama tidak menunjukkan adanya pemisahan. Hasil KLT tersebut seperti yang terlihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Hasil monitoring menggunakan KLT dengan diameter kolom 1,5 cm

Senyawa steroid ditunjukkan pada fraksi B2 dengan spot tunggal dan berwarna hijau. Fraksi B3 menunjukkan adanya dua senyawa berbeda yang

ditandai dengan dua spot berwarna hijau dan merah. Spot fraksi B4 hingga fraksi B8 berwarna merah yang diduga triterpenoid namun yang memiliki spot tunggal hanya fraksi B4, B6 dan B8 yang diduga triterpenoid, sedangkan fraksi yang lain masih berupa campuran.

Senyawa steroid ditemukan pada fraksi B2 memiliki nilai Rf sebesar 0,44. Senyawa triterpenoid terlihat pada tiga fraksi yaitu B4, B6 dan B8. Fraksi B4 memiliki nilai Rf 0,30. Fraksi B6 memiliki nilai Rf sebesar 0,21 dan fraksi B8 memiliki nilai Rf 0,14. Ketiga triterpenoid memiliki nilai Rf yang berbeda hal tersebut diduga karena triterpenoid yang berhasil dipisahkan memiliki struktur yang berbeda. Data hasil monitoring ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil monitoring kolom d=1,5

Fraksi	Vial	Jumlah spot	Warna	Rf	Dugaan senyawa
B1	1-22	-	-	-	-
B2	23-38	1	Hijau	0,44	Steroid
B3	39-42	2	Hijau Merah	0,44 0,30	Campuran
B4	43-55	1	Merah	0,30	Triterpenoid
B5	56-99	2	Merah Merah	0,30 0,21	Campuran
B6	100-134	1	Merah	0,21	Triterpenoid
B7	135-180	2	Merah Merah	0,21 0,14	Campuran
B8	181-199	1	Merah	0,14	Triterpenoid
B9	200-205	-	-	-	-

4.5.3 Kromatografi Kolom Diameter 2 cm

Pemisahan steroid dan triterpenoid *Chlorella* sp. menggunakan kolom kromatografi dengan diameter 2 cm menghasilkan 227 vial dengan 8 fraksi. Fraksi yang dihasilkan berupa 2 fraksi diduga steroid dan 3 fraksi triterpenoid. Hasil monitoring menunjukkan adanya senyawa yang diduga steroid pada fraksi

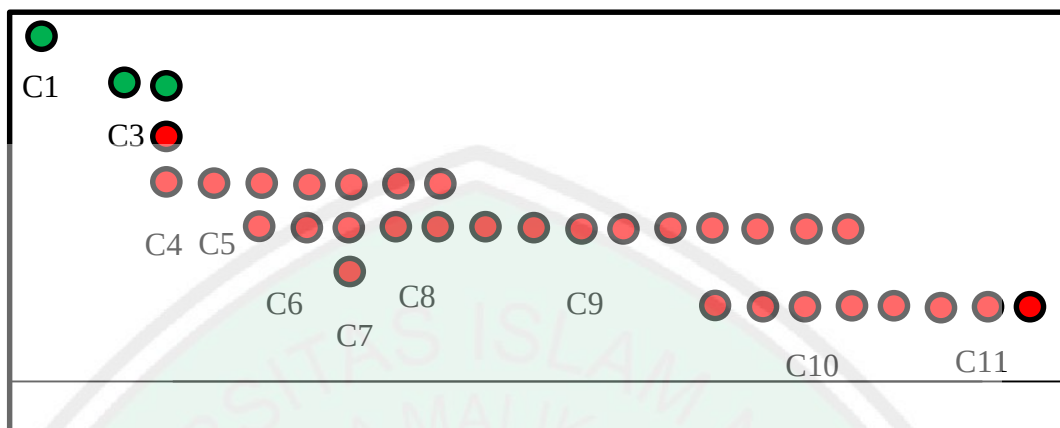
pertama (C1) dengan nilai Rf 0,94, berbeda dengan hasil menggunakan kolom 1 cm dan 1,5 cm. Fraksi kedua (C2) tidak menunjukkan adanya spot yang terpisah yang dimungkinkan masih berupa eluen. Fraksi yang diduga steroid terlihat kembali pada fraksi C3 dengan nilai Rf 0,56. Fraksi C5, C9 dan C11 menunjukkan adanya senyawa triterpenoid dengan nilai Rf 0,44, 0,26 dan 0,19. Fraksi-fraksi yang lain masih berupa campuran. Tabel 4.3 menunjukkan hasil monitoring KLT menggunakan ukuran kolom 2cm.

Tabel 4.3 Hasil monitoring kolom d=2 cm

Fraksi	Vial	Jumlah spot	Warna	Rf	Dugaan senyawa
C1	1-2	1	Hijau	0,94	Steroid
C2	3-13	0	-	-	-
C3	14-31	1	Hijau	0,56	Steroid
C4	32-37	3	Hijau	0,58	Campuran
			Merah	0,50	
			Merah	0,38	
C5	38-41	1	Merah	0,44	Triterpenoid
C6	42-64	2	Merah	0,38	Campuran
			Merah	0,18	
C7	65-72	3	Merah	0,38	Campuran
			Merah	0,29	
			Merah	0,16	
C8	73-98	2	Merah	0,38	Campuran
			Merah	0,29	
C9	99-148	1	Merah	0,26	Triterpenoid
C10	149-187	2	Merah	0,30	Campuran
			Merah	0,19	
C11	188-221	1	Merah	0,19	Triterpenoid
C12	222-227	-	-	-	-

Fraksi C1 dan C3 menunjukkan warna hijau yang diduga senyawa steroid. Fraksi C4 menunjukkan warna hijau dan warna merah dengan nilai Rf yang berbeda sehingga masih berupa senyawa campuran. Senyawa triterpenoid ditunjukkan dengan warna merah terlihat dari fraksi C4 hingga fraksi C11, akan

tetapi yang memiliki spot tunggal hanya 3 fraksi yaitu C4, C9 dan C11. Data tersebut seperti pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Hasil monitoring menggunakan KLT dengan diameter kolom 2 cm

4.5.4 Penentuan Diameter Kolom Terbaik

Diameter kolom terbaik dapat ditunjukkan dengan banyaknya jumlah spot tunggal yang diperoleh dan banyaknya jumlah vial tiap fraksi. Tabel 4.4 menunjukkan jumlah fraksi tunggal yang dihasilkan tiap diameter kolom.

Tabel 4.4 Data fraksi tunggal masing-masing kolom

Diameter Kolom	Σ Spot Tunggal	Warna (UV)	Rf	Senyawa
1 cm	3	Hijau	0,69	Steroid
		Merah	0,50	Triterpenoid
		Merah	0,33	Triterpenoid
1,5 cm	4	Hijau	0,44	Steroid
		Merah	0,30	Triterpenoid
		Merah	0,21	Triterpenoid
		Merah	0,14	Triterpenoid
2 cm	5	Hijau	0,94	Steroid
		Hijau	0,56	Steroid
		Merah	0,44	Triterpenoid
		Merah	0,26	Triterpenoid
		Merah	0,19	Triterpenoid

Berdasarkan teori HETP yang merupakan teori efisiensi kolom, diameter kolom dapat mempengaruhi efisiensi kolom. Efisiensi kolom yang baik dapat dicapai apabila nilai HETP minimum. Berdasarkan teori tersebut efisiensi kolom dapat diperoleh dengan memperkecil diameter kolom, mengatur suhu dan kecepatan fasa gerak. Penggunaan kolom berdiameter 1 cm menghasilkan 3 fraksi tunggal yang lebih sedikit daripada kolom diameter 1,5 cm dan 2 cm. Penggunaan kolom diameter 1 cm seharusnya dapat menghasilkan pemisahan yang lebih baik karena diameter yang digunakan merupakan diameter terkecil, akan tetapi penggunaan diameter yang lebih kecil mengakibatkan kecepatan fase gerak menurun. Pemisahan pada kromatografi kolom tanpa mengatur laju alir pemisahan, sehingga mengakibatkan laju alir yang berbeda-beda. Rata-rata laju alir pada penggunaan diameter 1 cm adalah 0,7 ml/menit. Laju alir yang terlalu lambat dapat mengakibatkan nilai difusi longitudinal menjadi besar sehingga nilai HETP juga meningkat.

Penggunaan kolom berdiameter 1,5 cm juga tidak lebih baik dari pada penggunaan kolom diameter 2 cm. Kolom diameter 1,5 cm menghasilkan 4 fraksi sedangkan kolom diameter 2 cm menghasilkan 5 fraksi. Rata-rata laju alir pada kolom diameter 1,5 cm adalah 1 mL/menit sedangkan rata-rata penggunaan diameter 2 cm adalah 1,5 mL/menit.

4.6 Integrasi Penelitian dengan Islam

Allah SWT menciptakan alam semesta beserta isinya dengan hikmah-hikmah tertentu. Semua ciptaan Allah SWT yang ada di dunia ini memiliki berbagai manfaat. Salah satu ciptaan Allah SWT yang bisa kita ambil manfaatnya

adalah tumbuhan. Hal-hal yang membahas tentang tumbuhan juga disebutkan dalam al-Qur'an dengan penggunaan kata yang berbeda. Sebagaimana firman Allah SWT dalam surah Luqman ayat 10:

خَلَقَ السَّمَاوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۖ وَأَلْقَىٰ فِي الْأَرْضِ رَوَاسِيَ أَن تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِن كُلِّ دَابَّةٍ ۗ وَأَنزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

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

Kata tumbuhan pada ayat di atas menggunakan kata “زَوْجٍ كَرِيمٍ” menunjukkan arti tumbuhan-tumbuhan yang baik yaitu subur dan bermanfaat (Shihab, 2002). Tumbuhan-tumbuhan diciptakan Allah SWT dalam berbagai bentuk dan ukuran, dari tumbuhan berukuran mikro hingga yang berukuran makro. Tumbuhan berukuran mikro juga dapat diambil manfaatnya seperti mikroalga *Chlorella sp.*

Allah SWT berfirman dalam surat al Furqan ayat 2:

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُنْ لَهُ شَرِيكٌ فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا

“Yang kepunyaan-Nya-lah kerajaan langit dan bumi, dan Dia tidak mempunyai anak, dan tidak ada sekutu bagiNya dalam kekuasaan(Nya), dan dia telah menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya”

Kata “فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا” dalam tafsir Al-Mishbah menunjukkan bahwa Allah SWT memberikan ukuran dan aturan yang sangat cermat kepada masing-masing secara sistematis (Shihab, 2002). Setiap makhluk mengandung unsur-unsur dan

membentuk senyawa-senyawa yang sesuai dengan manfaatnya. Mikroalga *Chlorella* sp. mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder seperti steroid dan triterpenoid yang dapat digunakan dalam bidang farmatologi. Pemisahan senyawa steroid dan triterpenoid dapat dimaksimalkan dengan penelitian.

Allah SWT berfirman dalam surat al Kahfi ayat 30:

إِنَّ الَّذِينَ آمَنُوا وَعَمِلُوا الصَّالِحَاتِ إِنَّا لَا نُضِيعُ أَجْرَ مَنْ أَحْسَنَ عَمَلًا

“Sesungguhnya mereka yang beriman dan beramal saleh, tentulah Kami tidak akan menyia-nyiakan pahala orang-orang yang mengerjakan amalan(nya) dengan yang baik.”

Berdasarkan tafsir Al-muyassar karangan Hikmat Basyir (2012) orang-orang yang beramal saleh adalah orang-orang yang telah berbuat kebajikan. Amal saleh merupakan perbuatan baik dan benar yang sesuai dengan sunnatullah. Sunnatullah dibagi menjadi dua yaitu sunnah Allah SWT yang diwahyukan dan yang tidak diwahyukan (bin Aziz Al-Zindani, dkk., 1997). Salah satu sunnah Allah SWT yang tidak dapat diwahyukan dapat dipelajari manusia dengan cara memperhatikan alam dan melakukan eksperimen. Penelitian merupakan bentuk amalan saleh dari sunnatullah yang tidak diwahyukan. Penelitian dapat menghadirkan ilmu pengetahuan dan teknologi yang bermanfaat.

Penelitian ini diharapkan bisa digunakan sebagai bahan acuan pemanfaatan *Chlorella* sp. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui variasi diameter kolom terbaik pada pemisahan steroid dan triterpenoid. Pada penelitian ini diketahui bahwa penggunaan kolom diameter 2 cm menghasilkan pemisahan terbaik dengan 2 fraksi steroid dan 3 fraksi triterpenoid.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan:

1. Pemisahan steroid dan triterpenoid menggunakan kolom berdiameter 1 cm menghasilkan 8 fraksi dengan rata-rata laju alir 0,7 mL/menit. Fraksi yang dihasilkan berupa 1 fraksi steroid (R_f 0,69) dan 2 fraksi triterpenoid (R_f 0,50 dan 0,33).
2. Pemisahan menggunakan kolom berdiameter 1,5 cm dengan rata-rata laju alir 1 mL/menit menghasilkan 9 fraksi, satu fraksi diduga merupakan fraksi steroid (R_f 0,44) dan 3 fraksi triterpenoid (R_f 0,30; 0,21 dan 0,14).
3. Pemisahan menggunakan kolom berdiameter 2 cm dengan rata-rata laju alir 1,5 mL/menit menghasilkan 12 fraksi, dua fraksi steroid (R_f 0,9375 dan 0,5625) dan tiga fraksi triterpenoid (R_f 0,4375; 0,2625 dan 0,1875). Pemisahan terbaik adalah dengan menggunakan kolom berdiameter 2 cm dengan hasil fraksi dengan spot tunggal yang lebih banyak.

5.2 Saran

Diperlukan identifikasi senyawa steroid dan triterpenoid lebih lanjut dengan:

1. Menyeragamkan laju alir pemisahan dan tinggi fasa diam dengan mengatur jumlah fasa diam.
2. Menggunakan LCMS dan uji aktivitas steroid dan triterpenoid hasil pemisahan menggunakan kromatografi kolom.

DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC] Association of Analytical Chemist. 1984. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. Inc.* Washington DC.
- Adhiatama, I., Zainudin, M. dan Rokhati, N. 2012. Hidrolisis Kitosan menggunakan Katalis Asam Klorida. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. 1(1): 245-251.
- Al-Mahalli, Imam Jalaluddin dan as-Suyuti. 2007. *Tafsir Jalalain*. Terjemahan oleh Bahrin Abubakar. Bandung: Sinar Baru Algensindo.
- Anggraeni, O. N., Fasya, G. A., Abidin, M. dan 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.
- Atun, S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Konversi Cagar Budaya Borobudur*. 8(2): 53-61.
- Bariyyah, S. K., Fasya, G. A., Abidin, M dan 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.
- Basyir, Hikmat, dkk. 2012. *Tafsir al-Muyassar*. Terjemahan oleh Izzudin Karimi, Ahmad Shaikhu, Habiburrahim. Surakarta: Pustaka An Naba.
- Bin Aziz Al-Zindani, dkk. 1997. *Mukjizat Al-Qur'an dan As-Sunah tentang IPTEK*. Jakarta: GEMA Insani Press.
- Bogoriani, N. W. 2008. Isolasi dan Identifikasi Glikosida Steroid dari Daun Andong (*Cordyline terminalis* Kunth). *Jurnal Kimia*. 2(1): 40-44.
- Bold dan Wynne. 1985. *Introduction to the Algae Structure and Reproduction* Pentice –Hall, Inc. Englewood Cliff.
- Chaidir, Z., Syafrizayanti dan Putri, M. 2017. Isolation and Identification of Microalgal from Harau Valley Payakumbuh West Sumatra as One Agent Producing Compound Antibacterial. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Science*. 8(3): 1950-1957.
- Costrad, G. S., Machado, R. R., Barbarino, E., Martino, R. C. dan Lourenco, S.O. 2012. Chemical Composition of Five Marine Microalgae that Occur on the Brazilian Coast. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*. 4(9): 191-201.

- Fasya, A. G., dkk. 2016. Ekstraksi, Hidrolisis dan Partisi Metabolit Sekunder dari Mikroalga *Chlorella* sp. *ALCHEMY: Journal of Chemistry*. 5(1): 5-9.
- Fasya, A. G., Khamidah, U., Amaliyah, S., Bariyyah, S. K. dan Romaidi. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) pada tiap Fase Pertumbuhan. *ALCHEMY*. 2(3): 162-169.
- Gunawan, I. W. G., Gede, B., dan Sutrisnayati, N. L. 2008. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpenoid yang Aktif Antibakteri pada Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn). *Jurnal Kimia*. 2(1): 31-39.
- Handoko, S. 2016. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella* sp. Dengan Menggunakan Metode Kromatografi Kolom Fasa Diam Basah dan Kering *skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Harborne, J. B. 1996. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan Edisi II*. Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata dan Imam Sudiro. Bandung: ITB.
- Hidayah, H. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid pada Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. Menggunakan KLT dan Identifikasinya Menggunakan FTIR. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ho, S-H., Chiu, S-Y., Kao, C-Y., Chen, T-Y., Chang, Y-B., Chang, J-S., Lin, C-S. 2017. Ferrofluid-assisted rapid and directional harvesting of marine microalgae *Chlorella* sp. used for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 244: 1337-1340.
- Ibnu Katsir. 2007. *Tafsir Ibnu Katsir*. Bogor : Pustaka Imam Asy-Syafi'i
- Imamah, N. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasinya Menggunakan Spektrofotometer FTIR *skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ismarti. 2011. Isolasi Triterpenoid dan Uji Aantioksidan dari Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Meranti Merah (*Shorea singkawang* (Miq).Miq) [tesis]. Padang: Pascasarjana Universitas Andalas.
- Jehlee, A., Khongkliang, P., Suksong, W., Rodjaroen, S., Waewsak, J., Reungsang, A., O-Thong, S. 2017. Biohythane Production from *Chlorella* sp. Biomass by Two-Stage Thermophilic Solid-State Anaerobic Digestion. *International Journal of Hydrogen Energy*. 30: 1-9.

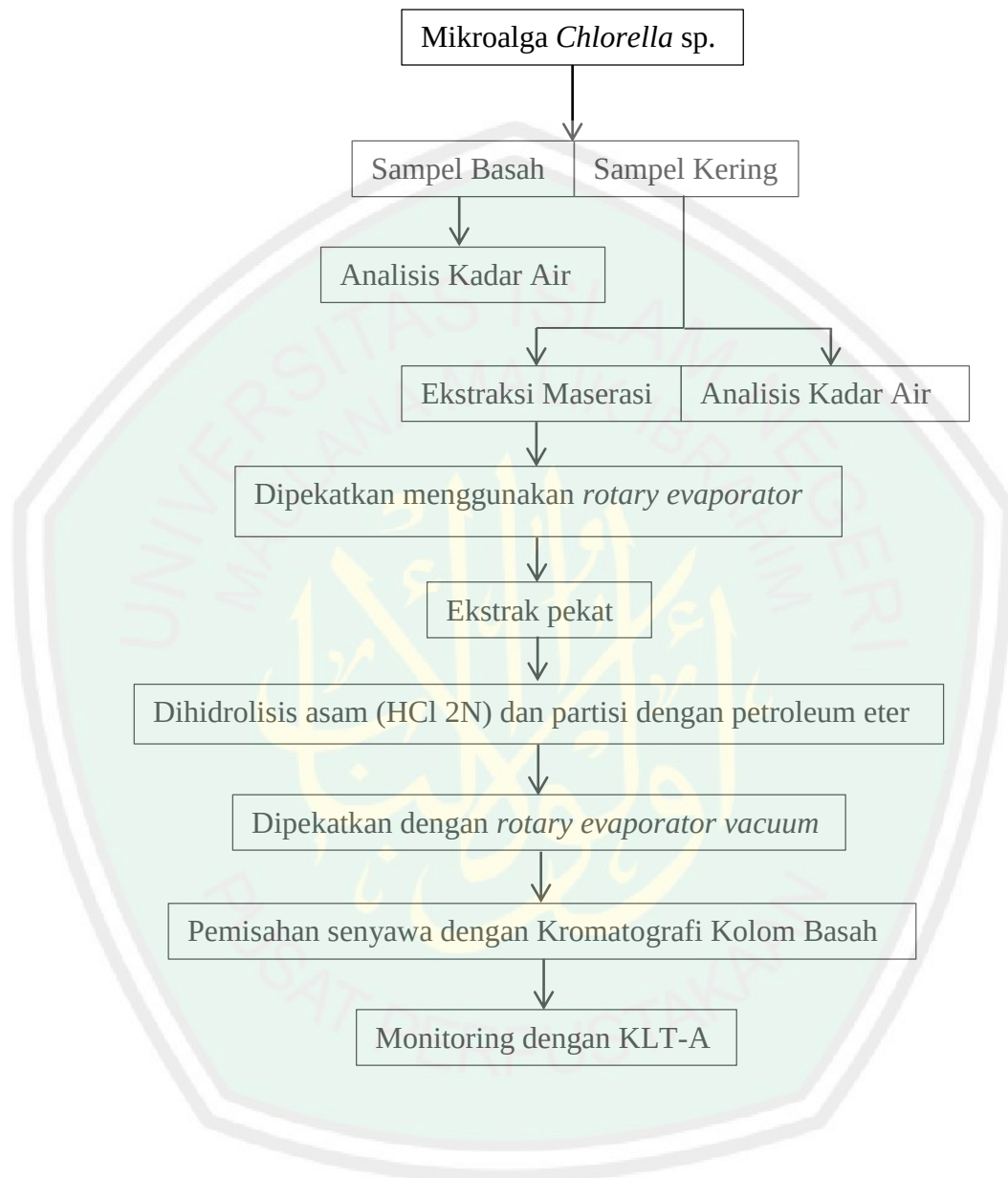
- Khamidah, U., Fasya, G. A., dan Romaidi. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. pada Fase Stasioner Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET). *ALCHEMY*. 3(1): 1-7.
- Khoiriyah, S., Hanapi, A. dan Fasya, G. A. 2014. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat, Kloroform dan Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga Coklat *Sargassum Vulgare* dari Pantai Kapong Pamekasan Madura. *ALCHEMY*. 3(2): 133-144.
- Khopkar, S. M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Terjemahan oleh Saptohardjo, A. Jakarta: UI Press.
- Kondeti, R. R., Mulpuri K. S. and Meruga B. 2014. Advancements in column chromatography: A review. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2(9): 1375-1383.
- Krisna, I G. A. P. S. A., Santi, S. R dan Rustini, N. L. 2014. Senyawa Steroid pada Daun Gayam (*Inocarpus Fagiferus* Fosb) dan Aktivitasnya sebagai Antioksidan terhadap Difenilpikril Hidrazil (DPPH). *Jurnal Kimia*. 8(2): 251-256.
- Kristanti, A. N., Nanik, S. A., Mulyadi, T dan Bambang, K. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Kumalasari, D., Fasya, A. G., Adi, T. K. dan Maunatin, A. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Mikroalga *Chlorella* sp. *ALCHEMY*. 3(2): 163-172.
- Kusmiyati, Aznam N. dan Handayani S. 2011. Isolation and Identification of Active Compound Methanol Extract of *Curcuma mangga* Val Rhizomes of Ethyl Acetate Fraction. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. 1(2): 1-10.
- Nihlati, I., Abdul, R. dan Triana, H. 2008. Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* (roxb) Schlechth) dengan Metode Penangkapan Radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) *skripsi*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Nisa', Zahrotun. 2017. Variasi Eluen pada Pemisahan Steroid dan Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Kromatografi Kolom. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Nurachman, dkk. 2015. Tropical Marine *Chlorella* sp. PP1 as a Source of Photosynthetic Pigments for Dye-Sensitized Solar Cells. *Algal Research*. 10: 25-32.

- Prihantini, N. B., Damayanti, D dan Yuniati, R. 2007. Pengaruh Konsentrasi Medium Ekstrak Tauge (Met) Terhadap Pertumbuhan *Scenedesmus* Isolat Subang. *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. *skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Mulana Malik Ibrahim Malang.
- Robinson, T. 1996. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Terjemahan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Rumondang, M., Kusrini, D. dan Fachriyah, E. 2013. Isolasi, Identifikasi dan Uji Antibakteri Senyawa Steroid dan Triterpenoid dari Ekstrak n-Heksana Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.). *Chem Info*. 1(1): 156-164.
- Saifudin, Aziz. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder: Teori, Konsep dan Teknik Pemurnian*. Edisi Pertama. Yogyakarta: Deepublish.
- Saleh. C. 2007. Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Steroid dari Akar Tumbuhan Cendana (*Santalum album* Linn) [disertasi]. Sumatera: Program Doktor Ilmu Kimia Sekolah Pascasarjana Universitas Sumatera Utara.
- Septiandari, N. 2016. Isolasi Senyawa Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) Menggunakan Metode Kromatografi Kolom Cara Kering dan Basah *skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Mulana Malik Ibrahim Malang.
- Setyadi, M. 2007. Hidrolisis Pentosan menjadi Furfural dengan Katalisator Asam Sulfat untuk Meningkatkan Kualitas Bahan Bakar Mesin Diesel. *Prosiding PPI – PDIPTN*. <http://digilib.batan.go.id/ppin/katalog/file/0216-3128-2007-2-159.pdf>
- Setyaningsih, I., Linawati, Trianti, R., dan Ibrahim, B. 1999. Ekstraksi dan Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Chlorella* sp. *Buletin THP*. 6(1).
- Shah, M. M. R., Alam, M. J. dan Mia, M. Y. 2003. *Chlorella* sp.: Isolation, Pure Culture and Small Scale Culture in Brackish-water. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res*. 38: 165-174.
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an Vol. 7 dan 10*. Jakarta: Penerbit Lentera Hati.

- Singh, J. dan Saxena, C. 2015. A Introduction to Microalgae: Diversity and Significance. Dalam Se-Kwon Kim, *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances* [page 11 – 24]. United State of America: Academic Press.
- Steenblock, D. 2000. *Chlorella – Makanan Sehat Alami*. Yogyakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Stuart, B. 2004. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. England: John Wiley and Sons Ltd.
- Suseno, J. E. dan Firdausi, K. S. 2008. Rancang Bangun Spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infrared*) untuk Penentuan Kualitas Susu Sapi. *Berkala Fisika*. 11(1): 23-28.
- Wenno, M. R., Purbosari N dan Thenu J. L. 2010. Ekstraksi Senyawa Antibakteri dari *Chlorella* sp. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*. 10(2): 131-137.
- Widiyati, E. 2005. Penentuan Adanya Senyawa *Triterpenoid* dan Uji Aktivitas Biologis pada Beberapa Spesies Tanaman Obat Tradisional Masyarakat Pedesaan Bengkulu. *Jurnal Gradien*. 2(1): 116-122.
- Winarno, F.G. 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Wiyanto, D. B. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut *Kappaphycus Alvarezii* dan *Eucheuma Denticullatum* Terhadap Bakteri *Aeromonas Hydrophila* dan *Vibrio Harveyii*. *Jurnal Kelautan*. 3(1): 1-17.

LAMPIRAN

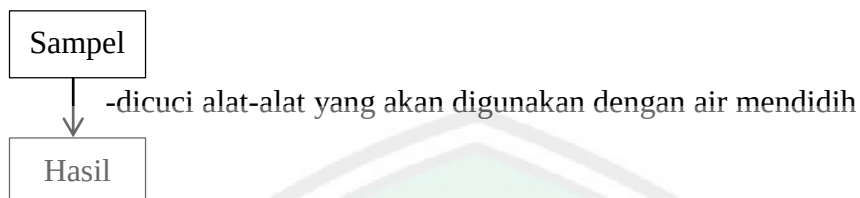
Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian



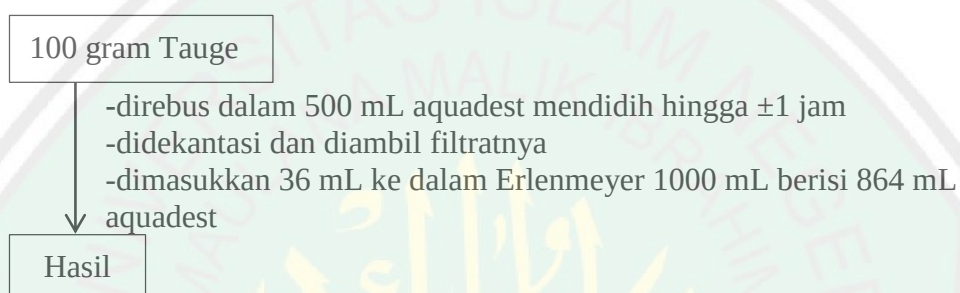
Lampiran 2. Diagram Alir

L.2.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella* sp.

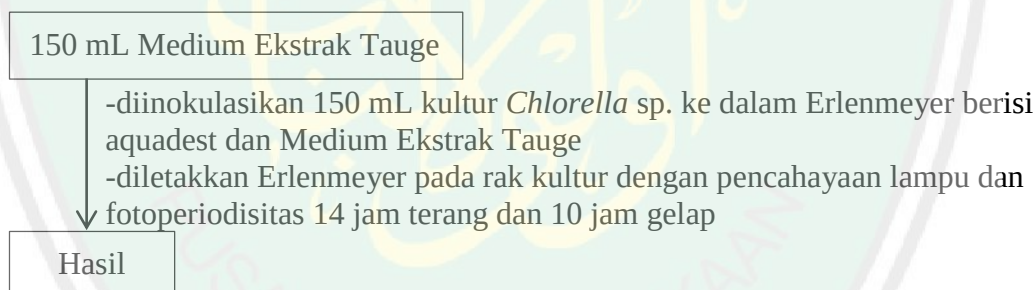
L.2.1.1 Sterilisasi Alat



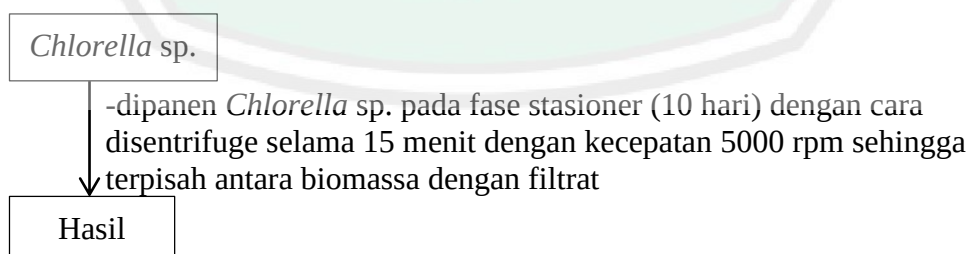
L.2.1.2 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%



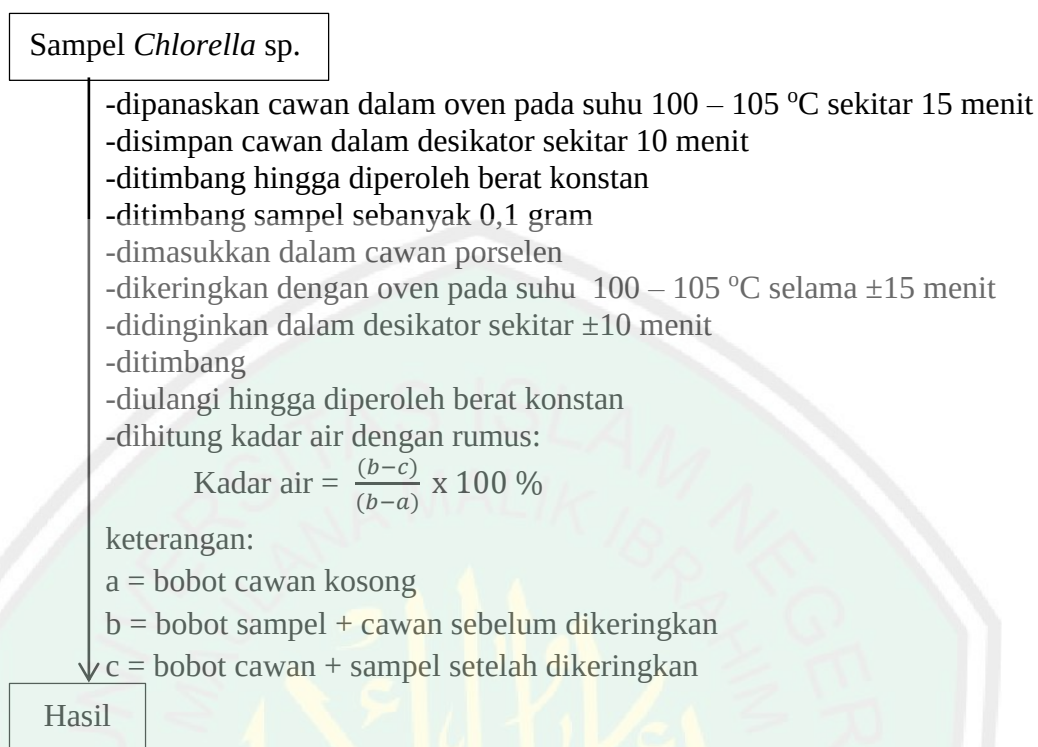
L.2.1.3 Kultivasi *Chlorella* sp. dalam Medium Ekstrak Tauge



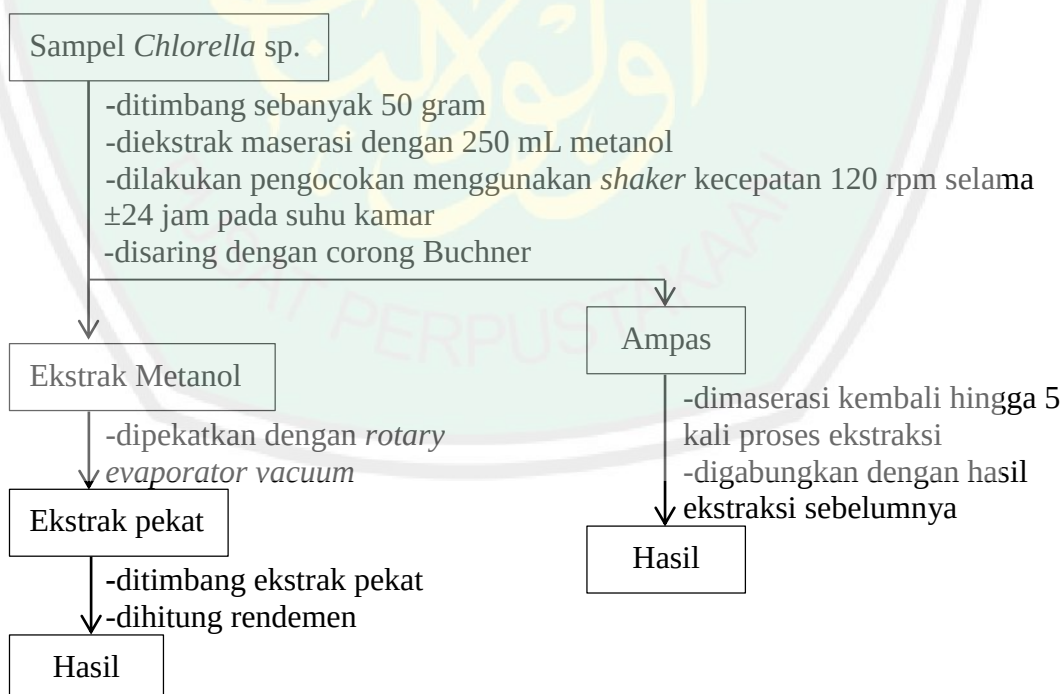
L.2.1.4 Pemanenan Mikroalga *Chlorella* sp.



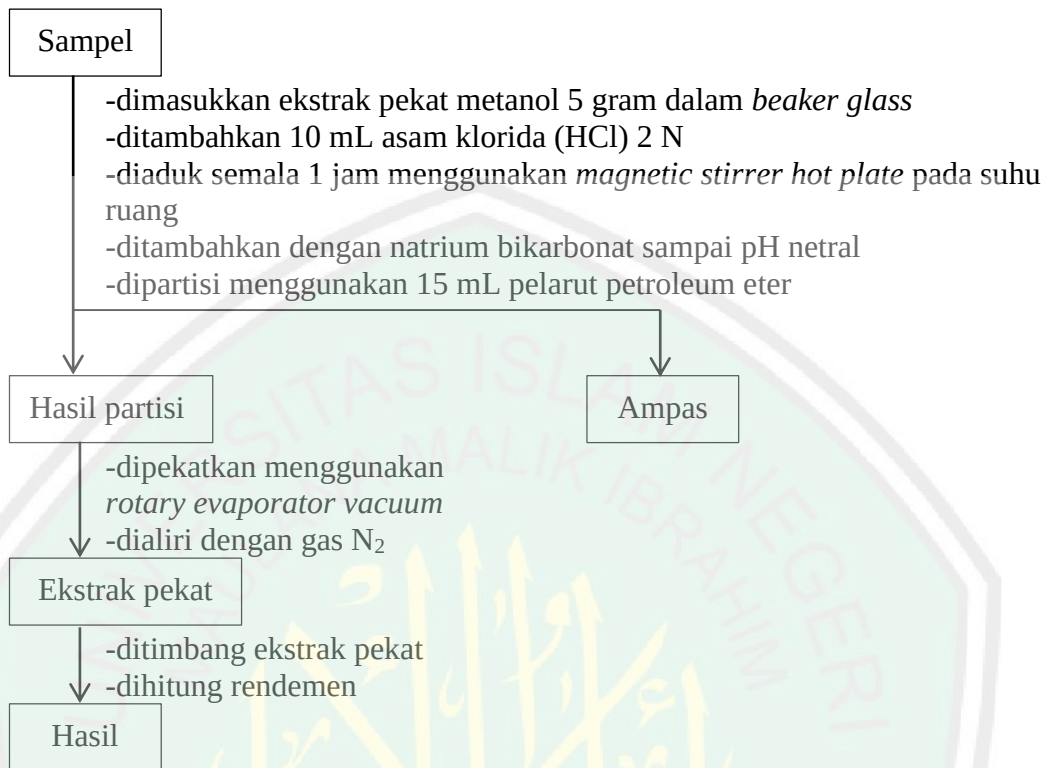
L.2.2 Penentuan Kadar Air Secara Termogravimetri



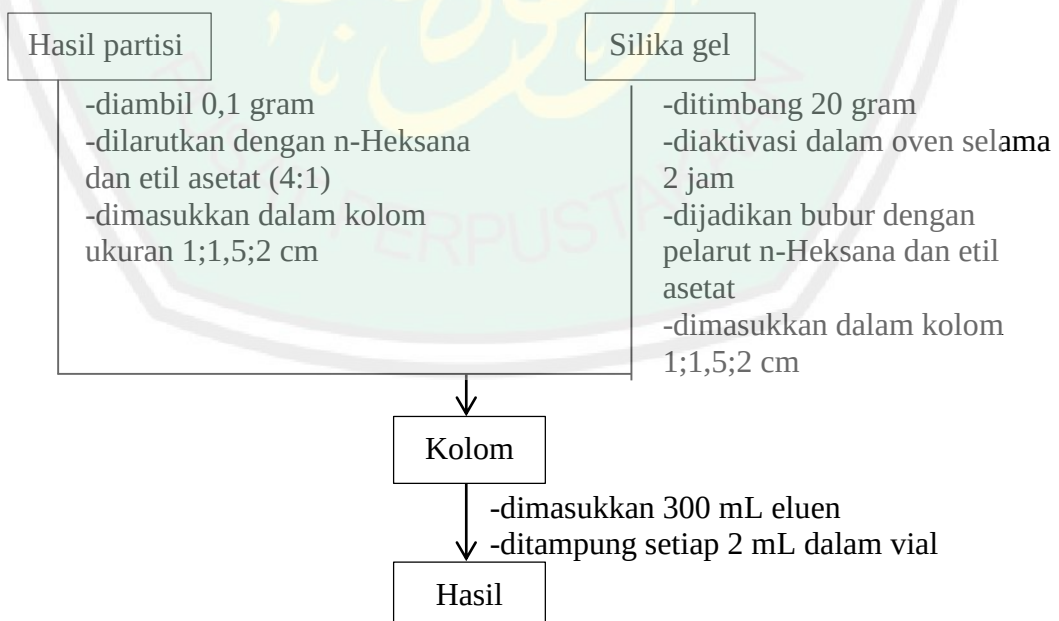
L.2.3 Ekstraksi Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Maserasi



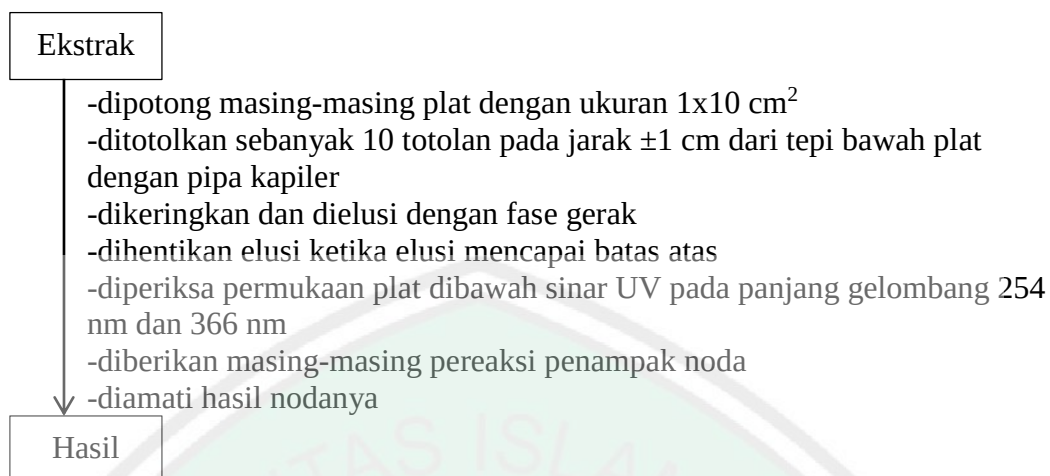
L.2.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol



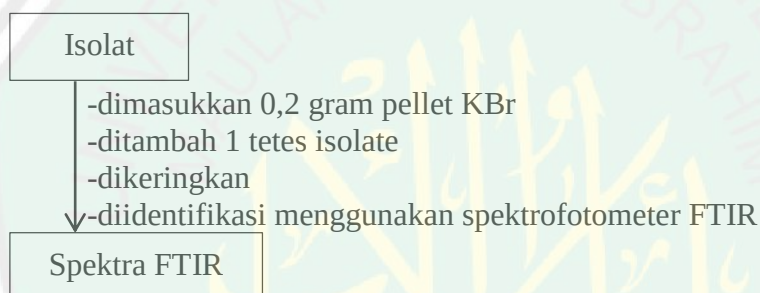
L.2.5 Pemisahan Senyawa Steroid *Chlorella* sp. dengan Kromatografi Kolom Basah



L.2.6 Monitoring Senyawa Steroid dengan KLT Analitik



L.2.7 Analisis menggunakan FTIR



Lampiran 3. Perhitungan, Pembuatan Reagen dan Larutan

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

Ketentuan = Perbandingan isolat *Chlorella* sp. dan MET 4% adalah 1:6

a. Pemaksimalan daya tampung erlenmeyer 1050 mL

- 10 ml isolat *Chlorella* sp. + 60 ml MET 4% = 70 ml
- Volume isolat *Chlorella* sp. = $\frac{1}{7} \times 1050 \text{ mL} = 150 \text{ mL}$
- Volume MET 4% = $\frac{6}{7} \times 1050 \text{ mL} = 900 \text{ mL}$

b. Pembuatan MET 4 % sebanyak 900 mL

- MET = ekstrak tauge + aquadest (4:100)
- Volume ekstrak tauge = $\frac{4}{100} \times 900 \text{ mL} = 36 \text{ mL}$
- Volume aquadest = $\frac{96}{100} \times 900 \text{ mL} = 864 \text{ mL}$

c. Pemaksimalan daya tampung botol 1400 mL

- Volume isolat *Chlorella* sp = $\frac{1}{7} \times 1400 \text{ mL} = 200 \text{ mL}$
- Volume MET 4% = $\frac{6}{7} \times 1400 \text{ mL} = 1200 \text{ mL}$

d. Pembuatan MET 4 % sebanyak 1200 mL

- Volume ekstrak tauge = $\frac{4}{100} \times 1200 \text{ mL} = 48 \text{ mL}$
- Volume aquadest = $\frac{96}{100} \times 1200 \text{ mL} = 1152 \text{ mL}$

L.3.2 Pembuatan larutan HCl 2 M

Berat Jenis HCl pekat = 1,267 g/mL

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

Berat Molekular HCl = 36,5 g/mol

$$\begin{aligned}\text{Mol HCl} &= \frac{\text{massa}}{Mr} = \frac{37 \text{ g}}{36,5 \text{ g/mol}} \\ &= 1,014 \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\text{Konversi ke mL} \rightarrow \frac{\text{berat larutan}}{BJ \text{ HCl pekat}} = \frac{100 \text{ g}}{1,267 \text{ g/mL}} = 78,9 \text{ mL} = 0,0789 \text{ L}$$

$$M = \frac{\text{mol}}{L} = \frac{1,014 \text{ mol}}{0,0789 \text{ L}} = 12,85 \text{ M}$$

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

$$12,85 \text{ M} \cdot V_1 = 2 \text{ M} \cdot 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 15,6 \text{ mL}$$

Pembuatan larutan HCL 2M dilakukan dengan memasukkan sebanyak 15,6 mL larutan HCL pekat 37% ke dalam labu ukur 100 mL yang berisi 15 mL aquadest, kemudian ditambahkan aquadest hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.3 Pembuatan larutan NaHCO_3 jenuh

Kelarutan NaHCO_3 sebesar 9,9 gram dalam 100 mL aquadest. Pembuatan larutan NaHCO_3 jenuh dilakukan dengan cara ditimbang NaHCO_3 dengan berat > 9,9 gram (sampai terdapat endapan padatan yang tidak larut). Larutan tersebut kemudian disaring untuk memisahkan residu dan filtrat sehingga didapatkan larutan NaHCO_3 jenuh

L.3.4 Pembuatan reagen Lieberman-Burchard

Reagen Lieberman-Burchard dibuat dengan cara dipipet 0,5 mL kloroform ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0,5 mL anhidrida asetat dan 1-2 mL asam sulfat.

L.3.5 Pembuatan Eluen n-heksana : etil asetat (9:1)

Eluen yang dibutuhkan pada kolom kromatografi adalah 500 mL.

- Volume n-heksana = $\frac{9}{10} \times 500 \text{ mL} = 450 \text{ mL}$
- Volume etil asetat = $\frac{1}{10} \times 500 \text{ mL} = 50 \text{ mL}$



Lampiran 4. Uji Kadar Air

a. Berat Cawan Kosong

Cawan	Sebelum dioven	U1	U2	U3	U4	U5	Rata-rata berat konstan
1	55,388	55,388	55,383	55,381	55,380	55,382	55,383
2	58,557	58,577	58,573	58,572	58,574	58,571	58,573
3	52,996	52,995	55,990	52,990	52,990	52,993	52,992

b. Berat Cawan + Sampel

Cawan	Sebelum dioven	U1	U2	U3	U4	U5	Rata-rata berat konstan
1	55,484	55,475	55,476	55,472	55,475	55,473	55,474
2	58,671	58,669	58,666	58,664	58,667	58,669	58,667
3	53,093	53,082	53,081	53,082	53,081	53,083	53,082

1. Kadar Air Cawan 1

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

a = berat rata-rata cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dioven

c = berat rata-rata cawan + sampel setelah dioven

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{55,484-55,474}{55,484-55,383} \times 100\% \\ &= 9,90\% \end{aligned}$$

2. Kadar Air Cawan 2

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{b-c}{b-a} \times 100\% \\ &= \frac{58,671-58,667}{58,671-58,573} \times 100\% \\ &= 4,08\% \end{aligned}$$

3. Kadar Air Cawan 3

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{b-c}{b-a} \times 100\% \\ &= \frac{53,093-53,082}{53,093-52,992} \times 100\% \\ &= 10,89\% \end{aligned}$$

Rata-rata Kadar Air

Kadar air C1	Kadar air C2	Kadar air C3	Jumlah	Rata-rata
9,90%	4,08%	10,89%	24,87	8,29

Lampiran 5. Perhitungan Rendemen

1. Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp.

Berat sampel = 15,6430 gram

Berat ekstrak pekat metanol = 3,7222 gram

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak pekat metanol}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{3,7222 \text{ g}}{15,6430 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 23,79\%$$

2. Ekstrak dan Fraksi Petroleum Eter

Berat ekstrak metanol = 3,7222 gram

Berat fraksi yang diperoleh = 2,0497 gram

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak pekat metanol}}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{2,0497 \text{ g}}{3,7222 \text{ g}} \times 100\%$$

$$= 55,06\%$$

Lampiran 6. Hasil Monitoring

1. Nilai Rf Hasil Monitoring Diameter Kolom 1 cm

$$Rf = \frac{\text{jarak spot (cm)}}{\text{jarak tempuh (cm)}}$$

Jarak tempuh = 8 cm

Fraksi	Jarak Spot	Rf	Jumlah Vial
1-18	-	-	18
19-44	5.5	0.6875	26
45-79	4	0.5000	35
80-91	3.5	0.4375	12
	2.6	0.3250	
	1.5	0.1875	
92-111	2.6	0.3250	20
	1.1	0.3250	
112-197	2.5	0.3250	86
198-219	2.5	0.3250	22
	1.5	0.1875	

2. Nilai Rf Hasil Monitoring Diameter Kolom 1,5 cm

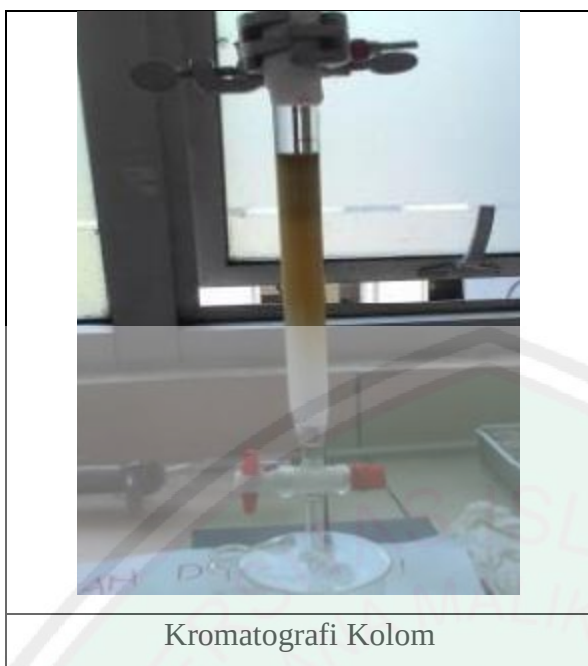
Fraksi	Jarak Spot	Rf	Jumlah Vial
1-22	-	-	-
23-28	3.5	0.4375	16
39-42	3.5	0.4375	4
	2.4	0.3000	
43-55	2.4	0.3000	13
56-99	2.4	0.3000	44
	1.7	0.2125	
100-134	1.7	0.2125	35
135-180	1.7	0.2125	46
	1.1	0.1375	
181-199	1.1	0.1375	19

3. Nilai Rf Hasil Monitoring Diameter Kolom 2 cm

Fraksi	Jarak Spot	Rf	Jumlah Vial
1-2	7.5	0.9375	2
3-13	-	-	11
14-31	4.5	0.5625	18
32-37	4.6	0.5750	6
	4.0	0.5000	
	3.0	0.3750	
38-41	3.5	0.4375	4
42-64	3.0	0.3750	23
	1.4	0.1750	
65-72	3.0	0.3750	8
	2.3	0.2875	
	1.3	0.1625	
73-98	3.0	0.3750	26
	2.3	0.2875	
99-148	2.1	0.2625	50
149-187	2.4	0.3000	39
	1.5	0.1875	
188-221	1.5	0.1875	34

Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian

	
Kultivasi <i>Chlorella</i> sp.	Pemanenan <i>Chlorella</i> sp.
	
<i>Chlorella</i> sp. setelah Proses Sentrifugasi	Pengeringan Sampel
	
Maserasi <i>Chlorella</i> sp. dengan Metanol	Partisi dengan Petroleum Eter

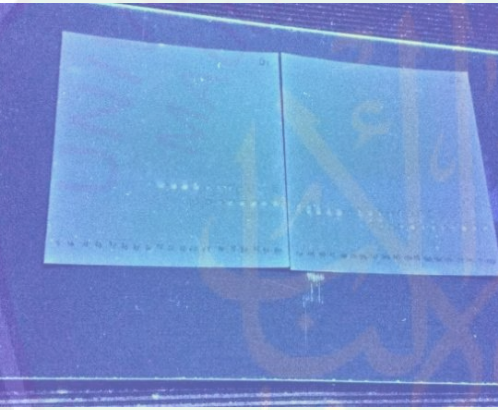


L.7.1 Hasil Monitoring Kolom diameter 1 cm

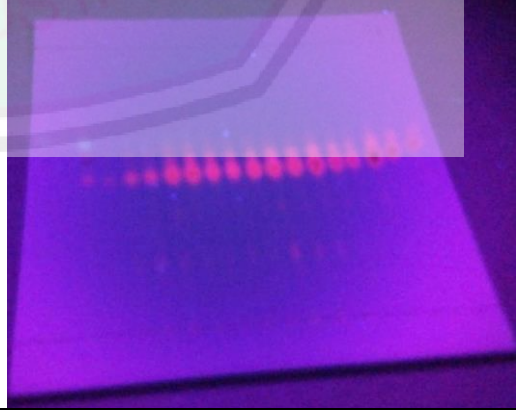
Monitoring vial 1-33	Monitoring vial 35-71
Monitoring vial 73-109	Monitoring vial 111-147

	
Monitoring vial 149-185	Monitoring vial 187-221

L.7.2 Hasil Monitoring Kolom diameter 1,5 cm

	
Monitoring vial 5-205	Monitoring ulangan

L.7.3 Hasil Monitoring Kolom diameter 2 cm

	
Monitoring vial 1-37	Monitoring vial 39-75

