

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

**SKRIPSI**

Oleh:  
**MAHSUNAH**  
**NIM. 14630065**



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

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

**SKRIPSI**

Oleh:  
**MAHSUNAH**  
**NIM. 14630065**

**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 AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID  
HASIL KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI ETIL ASETAT  
MIKROALGA *Chlorella sp.***

**SKRIPSI**

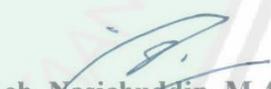
Oleh:  
**MAHSUNAH**  
NIM. 14630065

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji  
Tanggal: 17 Juni 2019

Pembimbing I

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

Pembimbing II

  
Ach. Nasichuddin, M.A  
NIP. 19730705 200003 1 002



Mengetahui,  
Ketua Jurusan

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

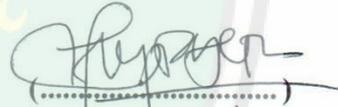
**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID  
HASIL KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI ETIL ASETAT  
MIKROALGA *Chlorella sp.***

SKRIPSI

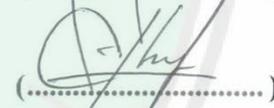
Oleh:  
**MAHSUNAH**  
NIM. 14630065

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 17 Juni 2019

Penguji Utama : Dr. Anton Prasetyo, M.Si  
NIP. 19770925 200604 1 003



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



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



Anggota Penguji : Ach. Nasichuddin, M.A  
NIP. 19730705 200003 1 002



Mengesahkan,  
Ketua Jurusan

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

## PERSEMBAHAN

Karya ini saya persembahkan untuk:

Ayah, Ibu, Kak Zam, Mbak Him, Kak Li, Mbak Yah, Dek Ewik, dan seluruh anggota keluarga Bani Hasyim.

Motto: من جد وجد

Sifat patuh dan rendah hati yang dibarengi dengan sedikit ilmu itu lebih baik daripada sifat licik dan sombong yang dibarengi dengan banyaknya ilmu.

~Sayyid Muhammad bin Alawy al-Maliki al-Hasani~



## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Mahsunah

NIM : 14630065

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Uji Aktivitas Antioksidan 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 di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggungjawabkan serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 22 Juni 2019

Yang membuat pernyataan,



  
Mahsunah  
NIM. 14630065

## KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan kesempatan untuk menyelesaikan skripsi **Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.*** ini. Sholawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW yang telah menunjukkan kepada kita *ad-din al-haq*, yakni agama Islam.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan laporan penelitian ini, khususnya kepada:

1. Ayah dan ibu yang dengan tulus ikhlas senantiasa memberikan aliran doa dan semangat kepada penulis, serta dukungan dan motivasi yang selalu ada agar penulis terus maju dan bersungguh-sungguh.
2. Saudara serta keluarga yang selalu mendoakan, mendukung, dan memberikan bantuan dalam bentuk apapun.
3. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si selaku Pembimbing I, Bapak Ach. Nasichuddin, M.A selaku Pembimbing II, Bapak A. Hanapi, M.Sc selaku konsultan, dan Bapak Dr. Anton Prasetyo, M.Si selaku penguji. Terima kasih atas bimbingan, nasehat, saran, motivasi, dan kesabarannya selama ini.
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Seluruh dosen di Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
6. Seluruh staff maupun laboran di Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

7. Rekan-rekan penelitian saya di Tim Organik 2014, khususnya Tim *Marine* dan adik-adik angkatan Tim Organik 2015, khususnya tim *Chlorella sp.* 2015. Terima kasih untuk bantuan, hiburan, motivasi, saran, dan kesediannya untuk mempersilakan penulis berkonsultasi. Semoga mendapat ilmu yang bermanfaat dan dimudahkan langkah selanjutnya dalam menggapai mimpi masing-masing.
8. Teman-teman Kimia angkatan 2014, khususnya Kimia kelas C. Terima kasih untuk canda, tawa, dan kebersamaannya selama ini. Semoga kelak dapat bertemu kembali dengan membawa kesuksesan masing-masing.
9. Teman-teman seperjuangan dan keluarga penulis di MSAA. Terima kasih untuk semangat, *support*, dan bantuannya selama ini. Semoga diberkahi dan dipermudah jalannya baik bagi yang masih berada dalam pengabdian maupun tidak.
10. Seluruh pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu. Penulis mengucapkan *jazakumullahu ahsana al-jaza'*.

Skripsi yang penulis susun ini masih jauh dari kata sempurna. Kritik dan saran yang membangun diharapkan untuk perbaikan di masa mendatang. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi semua, khususnya bagi penulis sendiri.

Malang, 21 Juni 2019

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>LEMBAR PERSETUJUAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>1</b>
<b>LEMBAR PERSEMBAHAN .....</b>	<b>iv</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN .....</b>	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR .....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>viii</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xv</b>
<b>المُلخَص .....</b>	<b>xvi</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	6
1.3 Tujuan Penelitian .....	7
1.4 Batasan Masalah .....	7
1.5 Manfaat Penelitian .....	8
<b>BAB II STUDI PUSTAKA .....</b>	<b>9</b>
2.1 Tumbuhan dalam Al-Qur'an .....	9
2.2 Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	12
2.2 Steroid .....	14
2.3 Isolasi Senyawa Steroid .....	16
2.4 Kromatografi Kolom Cara Basah .....	18
2.5 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH .....	21
2.6 Identifikasi Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis .....	22
2.7 Identifikasi Steroid Menggunakan FTIR .....	23
2.8 Identifikasi Jenis Steroid Menggunakan LC-MS/MS .....	25
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>27</b>
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	27
3.2 Alat dan Bahan .....	27
3.2.1 Alat .....	27
3.2.2 Bahan .....	27
3.3 Tahapan Penelitian .....	27
3.4 Pelaksanaan Penelitian .....	28
3.4.1 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam Medium Ekstrak Tauge 4% .....	28
3.4.2 Pemanenan Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	29
3.4.3 Ekstraksi Maserasi Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	29
3.4.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	30

3.4.5 Uji Fitokimia Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat.....	30
3.4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom Basah.....	31
3.4.7 Monitoring Senyawa Steroid Secara KLTA.....	32
3.4.8 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH.....	32
3.4.9 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis.....	33
3.4.10 Identifikasi Senyawa Steroid dengan FTIR.....	33
3.4.11 Identifikasi Jenis Senyawa Steroid dengan LC-MS/MS .....	33
3.5 Analisis Data .....	34
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>35</b>
4.1 Kultivasi dan Pemanenan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	35
4.2 Isolasi Senyawa Steroid.....	35
4.3 Uji Fitokimia Fraksi Etil Asetat .....	37
4.4 Pemisahan Senyawa Steroid Menggunakan Kromatografi Kolom Basah dan Monitoring dengan KLTA.....	38
4.5 Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid .....	42
4.6 Identifikasi Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.....	43
4.7 Identifikasi Steroid Menggunakan FTIR.....	44
4.8 Identifikasi Steroid Menggunakan LC-MS/MS .....	46
4.8 Pemanfaatan Mikroalga Sebagai Antioksidan dalam Perspektif Islam.....	50
<b>BAB V PENUTUP .....</b>	<b>51</b>
5.1 Kesimpulan.....	51
5.2 Saran .....	52
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>53</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>60</b>

## LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian.....	60
Lampiran 2. Diagram Alir.....	61
Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Reagen .....	68
Lampiran 4. Perhitungan Randemen.....	72
Lampiran 5. Perhitungan Nilai $R_f$ Hasil Monitoring KLTA .....	74
Lampiran 6. Data Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid.....	76
Lampiran 7. Data Absorbansi dan Spektra UV-Vis.....	80
Lampiran 8. Spektrum FTIR.....	83
Lampiran 9. Spektra Massa LC-MS/MS.....	84
Lampiran 10. Ilustrasi Hasil Monitoring KLTA .....	86
Lampiran 11. Dokumentasi.....	91



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Kerangka dasar senyawa steroid .....	15
Gambar 2.2 Strukur senyawa (a) fitosterol, (b) kolesterol, dan (c) <i>cholestane</i> ....	16
Gambar 2.3 Dugaan reaksi hidrolisis ikatan glikosida.....	17
Gambar 2.4 Mekanisme penghambatan radikal DPPH.....	21
Gambar 2.5 Spektrum IR senyawa steroid.....	24
Gambar 4.1 Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis pada steroid .....	36
Gambar 4.2 Reaksi penetralan HCl oleh NaHCO <sub>3</sub> (Mardiyah, 2012) .....	36
Gambar 4.3 Spektrum UV-Vis isolat steroid K1 .....	43
Gambar 4.4 Spektrum IR isolat steroid K1 .....	45
Gambar 4.5 Spektra massa fraksi etil asetat dengan senyawa steroid jenis (a) $\beta$ -sitosterol, (b) Kampesterol, dan (c) Stigmasterol.....	47
Gambar 4.6 Spektra massa isolat steroid K1 dengan senyawa steroid jenis stigmasterol .....	47
Gambar 4.7 Pemecahan ion prekursor menjadi ion produk pada kampesterol (Mo, dkk., 2013).....	48
Gambar 4.8 Pemecahan ion prekursor menjadi ion produk pada $\beta$ -sitosterol (Mo, dkk., 2013).....	48
Gambar 4.9 Dugaan pemecahan ion prekursor menjadi ion produk pada stigmasterol .....	49
Gambar L.6.1 Grafik aktivitas antioksidan isolat steroid K1.....	79
Gambar L.10.1.1 (a) Monitoring vial 2-76, (b) Monitoring vial 80-156, (c) Monitoring vial 158-234, dan (d) Monitoring vial 236-306 .....	86
Gambar L.10.1.2 (a) Ilustrasi vial 2-58, (b) Ilustrasi vial 60-116, (c) Ilustrasi vial 118-174, (d) Ilustrasi vial 176-232, (e) Ilustrasi vial 234-290, dan (f) Ilustrasi vial 292-306 .....	88
Gambar L.10.2.1 (a) Monitoring vial 2-76, (b) Monitoring vial 80-156, (c) Monitoring vial 158-234, dan (d) Monitoring vial 236-268 .....	89
Gambar L.10.2.2 (a) Ilustrasi vial 2-58, (b) Ilustrasi vial 60-116, (c) Ilustrasi vial 118-174, (d) Ilustrasi vial 176-232, (e) Ilustrasi vial 234-268 .....	90
Gambar L.11.1 (a) Tauge, (b) Perebusan tauge, dan (c) MET 4% yang telah ditambah isolat <i>Chlorella sp.</i> .....	91
Gambar L.11.2 (a) Biomassa sebelum <i>disentrifuge</i> , (b) Biomassa setelah <i>disentrifuge</i> , (c) Pengumpulan biomassa, (d) Pengeringan biomassa, dan (e) Biomassa setelah dikeringkan.....	91
Gambar L.11.3 (a) Pengadukan dengan <i>shaker</i> , (b) Penyaringan sampel ekstraksi, (c) Filtrat <i>Chlorella sp.</i> , (d) Pemekatan ekstrak, dan (e) Ekstrak kasar hasil maserasi .....	91
Gambar L.11.4 (a) Hidrolisis dengan HCl 2 N, (b) Partisi dengan etil asetat, dan (c) Fraksi etil asetat .....	92
Gambar L.11.5 (a) Fraksi etil asetat sebelum ditambah reagen LB dan (b) Fraksi etil asetat setelah ditambah reagen LB .....	92

Gambar L.11.6 (a) Preparasi kolom, (b) Elusi, dan (c) Pengelompokan fraksi berdasarkan hasil monitoring KLTA .....92  
Gambar L.11.7 (a) Preparasi sampel dan (b) Sampel setelah ditambah DPPH .... 93



## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Data spektra massa dari steroid yang teridentifikasi oleh LC-APCI-MS .....	26
Tabel 4.1 Hasil monitoring senyawa steroid dengan perbandingan silika dan sampel 1:200 .....	39
Tabel 4.2 Hasil monitoring senyawa steroid dengan perbandingan silika dan sampel 1:150 .....	40
Tabel 4.3 Interpretasi spektra IR isolat steroid K1 .....	45
Tabel 4.4 Interpretasi spektra massa fraksi etil asetat .....	49
Tabel 4.5 Interpretasi spektra massa isolat steroid K1 .....	49
Tabel L.4.1 Randemen hasil pengeringan biomassa basah <i>Chlorella sp.</i> .....	72
Tabel L.4.2 Randemen hasil maserasi biomassa kering <i>Chlorella sp.</i> .....	72
Tabel L.4.3 Randemen hasil hidrolisis dan partisi ekstrak kasar <i>Chlorella sp.</i> .....	73
Tabel L.5.1 Perhitungan $R_f$ untuk monitoring perbandingan 1:200 .....	74
Tabel L.5.2 Perhitungan $R_f$ untuk monitoring perbandingan 1:150 .....	75
Tabel L.6.1 Nilai % inhibisi dari masing-masing konsentrasi isolat .....	77

## ABSTRAK

**Mahsunah. 2019. Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.* Laporan Hasil Penelitian.** Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Ach. Nasichuddin, M.A; Konsultan: Ahmad Hanapi, M.Sc

---

**Kata kunci:** *Chlorella sp.*, steroid, kromatografi kolom, antioksidan, UV-Vis, FTIR, LC-MS/MS

*Chlorella sp.* termasuk dalam spesies mikroalga dari kelompok *Chlorophyta* yang mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder, salah satunya steroid. Senyawa steroid mempunyai potensi untuk dimanfaatkan sebagai antioksidan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui hasil pemisahan steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan kromatografi kolom gradien eluen, aktivitas antioksidan steroid terhadap DPPH, dan hasil identifikasinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR, dan LC-MS/MS. *Chlorella sp.* dikultivasi dalam MET 4% dan pemanenan dilakukan pada hari ke-10. Ekstraksi *Chlorella sp.* dilakukan dengan metode maserasi menggunakan metanol dan dipartisi dengan etil asetat. Fraksi yang didapat dipisahkan untuk diambil steroidnya menggunakan kromatografi kolom gradien eluen. Aktivitas antioksidan diuji dengan metode DPPH. Panjang gelombang maksimum steroid diukur dengan spektrofotometer UV-Vis dan monitoring jenis ikatan antar atom dan gugus fungsinya dilakukan menggunakan FTIR. Identifikasi jenis senyawa steroid dilakukan menggunakan LC-MS/MS.

Hasil penelitian menunjukkan pemisahan steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan kromatografi kolom gradien eluen menghasilkan 4 fraksi tunggal, 1 fraksi steroid dan 3 fraksi triterpenoid. Uji aktivitas antioksidan isolat steroid menghasilkan nilai  $IC_{50}$  989.539 ppm. Spektrum UV-Vis menghasilkan panjang gelombang maksimum pada 275,0; 222,0; 205,0; dan 202,0 nm. Identifikasi dengan FTIR menghasilkan serapan gugus O-H, -CH<sub>2</sub>-, C=C(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> sebagai representasi dari *exo-cyclic double bond*, C=C, geminal dimetil, dan C-O untuk alkohol sekunder. Identifikasi menggunakan LC-MS/MS pada fraksi etil asetat menghasilkan jenis senyawa steroid berupa kampesterol,  $\beta$ -sitosterol, dan stigmasterol dengan kelimpahan terbanyak berupa kampesterol, sedangkan identifikasi pada isolat hasil kromatografi kolom menghasilkan jenis senyawa steroid berupa stigmasterol.

## ABSTRACT

**Mahsunah. 2019. Antioxidant Activity Test of Steroid Isolate Obtained from Column Chromatography of Ethyl Acetate Fraction in Microalgae *Chlorella sp.* Report of Research Result.** Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Supervisor II: Ach. Nasichuddin, M.A; Consultant: Ahmad Hanapi, M.Sc

---

**Key words:** *Chlorella sp.*, steroid, column chromatography, antioxidant, UV-Vis, FTIR, LC-MS/MS

*Chlorella sp.* included in the species of microalgae from the *Chlorophyta* group which contains various secondary metabolites, one of them is steroids. Steroid compounds have the potential to be used as antioxidants. The purpose of this research was to determine the results of the separation of steroid of ethyl acetate fraction in microalgae *Chlorella sp.* using gradient eluent column chromatography, antioxidant activity of steroid on DPPH, and identification results using UV-Vis spectrophotometer, FTIR, and LC-MS/MS. *Chlorella sp.* cultivated in MET 4% and harvesting was done on the 10th day. Extraction of *Chlorella sp.* done by maceration method using methanol and partitioned with ethyl acetate. The obtained fraction was separated to take steroids using eluent gradient column. Antioxidant activity was tested by DPPH method. The maximum wavelength of steroids was measured by UV-Vis spectrophotometer and monitoring of the types of bonds between atoms and their functional groups using FTIR. The identification of the type of steroids using LC-MS/MS.

The results showed the separation of steroid ethyl acetate fraction in microalgae *Chlorella sp.* using gradient eluent column chromatography produced 4 single fractions, 1 steroid fraction and 3 triterpenoid fractions. Antioxidant activity test of steroid isolate produced IC<sub>50</sub> 989.539 ppm. The spectra of UV-Vis produce the maximum wavelength at 275,0; 222,0; 205,0; and 202,0 nm. Identification with FTIR produces the band absorption of O–H group, –CH<sub>2</sub>–, C=C(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> as representations of exocyclic double bond, C=C, geminal dimethyl, and C–O for secondary alcohols. Identification using LC-MS/MS on ethyl acetate fraction produced steroid compounds such as campesterol, β-sitosterol, and stigmasterol with the highest abundance in the form of campesterol, while identification of column chromatography isolate produced the type of steroid compounds stigmasterol.

## الملخص

محسونة. ٢٠١٩. اختبار نشاط المضادات للأوكسدة في عزل الستيريود ينتج من العمود اللوني لجزء الإيثيل أسيتات في طحالب الصغيرة *Chlorella sp.* تقرير نتائج البحث. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك ابراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المؤدب الأول: أحمد غنائم فشى الماجستير؛ المؤدب الثاني: أحمد ناصح الدين الماجستير؛ المستشار: أحمد حنفي الماجستير.

كلمات المفتاحية: *Chlorella sp.*، الستيريود، العمود اللوني، نشاط المضادات للأوكسدة، الأشعة فوق البنفسجية، تحويل فورية الأشعة تحت الحمراء، LC-MS/MS

*Chlorella sp.* هو من أنواع الطحالب الصغيرة من مجموعة *Chlorophyta* الذي يحتوي على مختلف مركبات المستقبلات الثانوية، واحد منها هو الستيريود. مركبات الستيريود لديها القدرة على استخدامها كمضادات للأوكسدة. وكان الأهداف من هذا البحث هي اكتشاف نتائج فصل الستيريود لجزء الإيثيل أسيتات في طحالب الصغيرة *Chlorella sp.* باستخدام العمود اللوني بتدرجات التداخل، نشاط المضادات للأوكسدة لستيريود على DPPH، ونتائج تحديده باستخدام الأشعة فوق البنفسجية الطيفية، و تحويل فورية الأشعة تحت الحمراء و LC-MS/MS. *Chlorella sp.* زرع في ٤% MET. كان الحصاد في اليوم العاشر. استخراج *Chlorella sp.* تم بواسطة طريقة النقاة باستخدام الميثانول وقسم بالإيثيل أسيتات. حصول الجزء فصل لأخذ الستيريود باستخدام العمود اللوني بتدرجات. تم اختبار نشاط مضادات للأوكسدة بواسطة طريقة DPPH. تم قياس الطول الموجي الأقصى لستيريود باستخدام الأشعة فوق البنفسجية الطيفية ومراقبة أنواع الروابط بين الذرات ومجموعاتها الوظيفية باستخدام تحويل فورية الأشعة تحت الحمراء. تحديد أنواع مركبات الستيريود باستخدام LC-MS/MS.

النتائج في فصل الستيريود لجزء الإيثيل أسيتات في طحالب الصغيرة *Chlorella sp.* باستخدام العمود اللوني بتدرجات التداخل أظهرت على نتائج ٤ الأجزاء الوحيدة، ١ جزء الستيريود و ٣ أجزاء التريترينويد. أنتج اختبار نشاط المضادات للأوكسدة في عزل الستيريود  $IC_{50}$  ٩٨٩٥٣٩ جزء في المليون. وأطياف الأشعة فوق البنفسجية تنتج الطول الموجي الأقصى عند ٢٧٥,٠؛ ٢٢٢,٠؛ ٢٠٥,٠؛ ٢٠٢,٠ نانومتر. التحديد باستخدام تحويل فورية الأشعة تحت الحمراء ينتج مجموعات O-H، -C=O، -C=C(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>، CH<sub>2</sub>- كتمثيل للرابطة المزدوجة الخارجية الدورية، C=C، ثنائي ميثيل الأحجار، - و C-O للكحول الثانوي. التحديد باستخدام LC-MS/MS على جزء إيثيل أسيتات أنتج مركبات الستيريود مثل كامبيستيرون، ب-سيتوستيرون، و ستيجماسترون مع أعلى وفرة في شكل كامبيستيرون، في حين أن تحديد عزل العمود اللوني ينتج مركبات الستيريود ستيجماسترون.

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya dan bersifat reaktif (Darmawan dan Artanti, 2006). Adanya elektron yang tidak berpasangan menyebabkan radikal bebas tidak stabil. Untuk mencapai kestabilan, elektron tidak berpasangan akan mencari pasangan elektron di sekitarnya. Radikal bebas dapat menyerang dan mengoksidasi makromolekul pembentuk sel, yaitu asam nukleat, protein, lipid, dan *deoxyribonucleic acid* (DNA), sehingga memicu penyakit degeneratif (Uppu, dkk., 2010). Pada penelitian lebih lanjut telah diteliti bahwa sekitar 40 penyakit mencakup aterosklerosis, hipertensi, iskemik, alzheimer, parkinson, kanker, dan peradangan disebabkan oleh radikal bebas (Sayuti dan Yenrina, 2015).

Radikal bebas cenderung mengadakan reaksi berantai yang apabila terjadi di dalam tubuh akan dapat menimbulkan kerusakan-kerusakan yang berlanjut dan terus-menerus. Tubuh manusia memiliki sistem pertahanan endogen terhadap serangan radikal bebas terutama terjadi melalui peristiwa metabolisme sel normal dan peradangan. Jumlah radikal bebas dapat mengalami peningkatan yang diakibatkan faktor stress, radiasi, asap rokok, dan polusi lingkungan menyebabkan sistem pertahanan tubuh yang ada tidak memadai, sehingga tubuh memerlukan tambahan antioksidan dari luar yang dapat melindungi dari serangan radikal bebas (Wahdaningsih, dkk., 2011).

Antioksidan merupakan zat yang dapat menunda, memperlambat, dan mencegah terjadinya proses oksidasi (Tamat, 2007). Senyawa antioksidan dapat menghambat reaksi radikal bebas dalam tubuh (Diniatik, 2016), memiliki kemampuan mendonorkan elektron, dan dapat berfungsi sebagai agen pereduksi (Vaya dan Aviram, 2001). Meydani (2000) menyatakan bahwa antioksidan yang dikonsumsi dalam jumlah tertentu dapat menurunkan resiko penyakit kardiovaskuler, meningkatkan status imun, dan menghambat timbulnya penyakit degeneratif akibat penuaan.

Senyawa antioksidan dapat berupa senyawa alami maupun senyawa sintetik. Pada saat ini senyawa antioksidan sintesis sudah mulai ditinggalkan karena memiliki sifat karsinogenik (Lisdawati dan Broto, 2006). Oleh karena itu, diperlukan adanya antioksidan alami sebagai pengganti antioksidan sintetik. Salah satu bahan alami yang dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan yaitu mikroalga yang mempunyai kandungan senyawa aktif (Anggraeni, dkk., 2014).

Mikroalga merupakan mata rantai awal dalam suatu ekosistem perairan yang menghasilkan energi. Salah satu jenis mikroalga yang sering dimanfaatkan adalah *Chlorella sp.* (Setyaningsih, 1999). Asam lemak hasil hidrolisis minyak (Kumalasari, 2014) dan ekstrak metanol dari tiap fase pertumbuhan (Fasya, dkk., 2013) mikroalga *Chlorella sp.* dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri. Ekstrak kasar (Bariyyah, dkk., 2013), fraksi (Anggraeni, dkk., 2014), dan hasil KLTP (Dinasti, 2016) dari mikroalga *Chlorella sp.* dapat berfungsi sebagai antioksidan. Menurut Li, dkk. (2008) mikroalga memiliki kemampuan pertumbuhan yang cepat dan produktivitas yang tinggi. Mikroalga dapat menghasilkan biomassa 50 kali lebih besar dibandingkan tumbuhan yang lebih tinggi lainnya. Mereka

memiliki tingkat pertumbuhan yang tinggi dan efisiensi fotosintesis karena struktur sederhana mereka.

Mikroalga *Chlorella sp.* juga diketahui mengandung senyawa bioaktif steroid. Hasil identifikasi golongan senyawa dalam ekstrak kasar mikroalga *Chlorella sp.* dengan pelarut metanol yang dilakukan oleh Anggareni (2014) menunjukkan bahwa ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* mengandung senyawa steroid, tanin, dan asam askorbat. Steroid berpotensi sebagai obat, di antaranya kardiotonik, kontraseptif, dan antiinflamasi (Lin, 2010). Senyawa golongan steroid digunakan luas dalam dunia pengobatan dan kontrasepsi antara lain: androgen merupakan hormon steroid yang dapat menstimulasi organ seksual jantan, estrogen dapat menstimulasi organ seksual betina, adrenokortikoid dapat mencegah peradangan dan rematik (Nogrady, 1992). Digitoksin merupakan senyawa steroid yang dapat memacu kerja jantung, contoh lain seperti kortison, kortisol dan prednison digunakan untuk mengobati peradangan karena alergi atau encok (*rheumatoid arthritis*) dan noretinodrel digunakan untuk menekan ovulasi sebagai metode pembatasan kelahiran (Etika dan Suryelita 2014).

Pemanfaatan steroid dari mikroalga secara tersirat dapat ditemukan dalam firmanNya:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ (٧) إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً وَمَا كَانَ أَكْثَرُهُمْ

مُؤْمِنِينَ (٨)

*“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik? Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat suatu tanda kekuasaan Allah, dan kebanyakan mereka tidak beriman” (Q. S. asy-Syu'ara' (42): 7-8)”*

Ayat di atas secara tidak langsung memerintahkan agar manusia mengamati tumbuhan yang telah diciptakan oleh Allah SWT karena di dalamnya terdapat tanda kebesaran Allah SWT. Dengan memanfaatkan tumbuh-tumbuhan tersebut dalam sebuah penelitian berarti secara tidak langsung juga telah melaksanakan perintah Allah SWT dengan berusaha mentadabburi kebesaran Allah SWT melalui pengkajian terhadap ayat kauniyah-Nya. Quthb (2004) membuat penafsiran untuk ayat ketujuh surat asy-Syu'ara' bahwa tumbuh-tumbuhan itu mulia dengan segala kehidupan yang bersumber dari Allah SWT. Hal ini mengisyaratkan kepada jiwa untuk menerima dan merespon ciptaan Allah SWT dengan sikap memuliakan, memerhatikan, dan memerhitungkannya bukan menghina, melalaikan, dan meremehkannya.

Pemanfaatan mikroalga *Chlorella sp.* dapat dilakukan dengan mengekstrak senyawa steroid yang terdapat di dalamnya. Ekstraksi steroid dari mikroalga *Chlorella sp.* dapat dilakukan dengan maserasi menggunakan pelarut metanol (Fasya, dkk., 2016). Metode maserasi dipilih karena metode ini aman digunakan dan dapat mengantisipasi senyawa yang rentan panas (Handoko, 2016). Kandungan steroid dengan struktur glikosida yang terdapat dalam mikroalga akan terlarut dalam metanol karena secara teoritis umumnya senyawa polar akan larut pada senyawa polar, begitupun sebaliknya. Pertimbangan lain menggunakan metanol adalah karena metanol mempunyai titik didih yang rendah yaitu 65 °C, sehingga mudah untuk dipisahkan dari ekstrak (Sulastry dan Kurniawati, 2010).

Ekstrak hasil maserasi dengan metanol dipartisi dan dihidrolisis menggunakan asam klorida sebagai katalis. Hidrolisis ditujukan untuk memisah senyawa yang diekstrak dari senyawa-senyawa campuran. Steroid bisa terdapat

dalam bentuk glikosida (Harborne, 1987). Penelitian aktivitas antioksidan terhadap mikroalga *Eucheuma spinosum* dengan metode 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan sampel yang telah dihidrolisis adalah lebih besar dibandingkan sebelum dihidrolisis dengan nilai  $EC_{50}$  sebesar 12,65 mg/L untuk ekstrak yang telah dihidrolisis dan dipartisi menggunakan petroleum eter, sedangkan sebelum dihidrolisis (ekstrak metanol) menghasilkan nilai sebesar 22,13 mg/L (Mardiyah, 2012).

Isolasi steroid dilakukan menggunakan kromatografi kolom cara basah. Eluen untuk fase geraknya merupakan perbandingan antara *n*-heksana dan etil asetat yang dibuat sistem gradien dengan variasi beberapa eluen. Menurut Handoko (2016) dalam penelitiannya bahwa ekstraksi steroid dari mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan kromatografi kolom cara basah lebih baik dibanding cara kering karena menghasilkan fraksi murni lebih banyak, yakni 4 fraksi murni triterpenoid dan 1 fraksi murni steroid. Isolat steroid fraksi etil asetat yang telah dipisahkan dengan kromatografi kolom basah dimonitoring menggunakan kromatografi lapis tipis analitik (KLTA). Eluen untuk identifikasi steroid berupa *n*-heksana:etil asetat (17:3) (Mardaneni, 2017).

Hasil pemisahan KLTA diuji aktivitas antioksidannya. Cara yang cepat, mudah, dan tidak terlalu mahal adalah dengan mengukur aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH (Erawati, 2012). DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil, sehingga apabila digunakan sebagai pereaksi dalam uji penangkapan radikal bebas cukup dilarutkan dan bila disimpan dalam keadaan kering dengan kondisi penyimpanan yang baik dapat stabil selama bertahun-tahun (Vanselow, 2007; Tristantini, 2016).

Pengujian antioksidan tersebut didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Krisna, dkk. (2014) bahwa isolat steroid yang terdapat pada daun gayam dapat digunakan sebagai antioksidan kuat karena memberikan nilai  $IC_{50}$  sebesar 4 ppm. Nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh Dinasti (2016) dari hasil kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* sebesar 77,78 ppm dimana termasuk golongan antioksidan yang kuat. Diharapkan aktivitas antioksidan senyawa steroid hasil isolasi dari mikroalga *Chlorella sp.* yang telah dipisahkan menggunakan kromatografi kolom basah dengan variasi gradien eluen fraksi etil asetat akan mempunyai aktivitas yang tinggi sebagai senyawa antioksidan. Isolat steroid diidentifikasi dengan spektrofotometer *ultraviolet-visible* (UV-Vis) untuk mengetahui panjang gelombang maksimum senyawa steroid, *fourier transform infra red* (FTIR) untuk mengetahui jenis ikatan antar atom dan gugus fungsinya, dan *liquid chromatography-mass spectrometer/mass spectrometer* (LC-MS/MS) untuk mengetahui jenis senyawa steroidnya.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana hasil pemisahan steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan kromatografi kolom gradien eluen?
2. Bagaimana aktivitas antioksidan isolat steroid hasil dari kromatografi kolom fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* terhadap DPPH?
3. Bagaimana hasil identifikasi isolat steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR, dan LC-MS/MS?

### 1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui hasil pemisahan steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan kromatografi kolom gradien eluen
2. Mengetahui aktivitas antioksidan isolat steroid hasil dari kromatografi kolom fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* terhadap DPPH
3. Mengetahui hasil identifikasi isolat steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR, dan LC-MS/MS

### 1.4 Batasan Masalah

1. Bahan yang digunakan berupa mikroalga *Chlorella sp.* yang diperoleh dari Laboratorium Biokimia dan Fisiologi Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan pelarut metanol
3. Hidrolisis ekstrak metanol menggunakan HCl 2 N
4. Partisi menggunakan pelarut etil asetat
5. Pemisahan isolat steroid menggunakan kromatografi kolom basah (diameter kolom 1 cm) dengan fase diam berupa silika gel dan fase gerak dibuat dengan sistem gradien eluen berupa perbandingan *n*-heksana dan etil asetat 95:5; 90:10; 85:25; 80:20; 75:25, dan 70:30 sebanyak 600 mL dan perbandingan antara silika dengan sampel sebesar 1:200 dan 1:150
6. Monitoring hasil isolat menggunakan KLTA dengan eluen berupa perbandingan *n*-heksana dan etil asetat 17:3.
7. Uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH

8. Identifikasi senyawa steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR, dan LC-MS/MS

### 1.5 Manfaat Penelitian

1. Manfaat teoritis: memberikan informasi ilmiah mengenai potensi dan pemanfaatan mikroalga *Chlorella sp.*
2. Manfaat metodologis: sebagai referensi untuk penelitian selanjutnya dan sebagai acuan metodologi, khususnya mengenai isolasi senyawa steroid fraksi etil asetat menggunakan kromatografi kolom basah dengan gradien eluen dan aktivitas antioksidan isolatnya terhadap DPPH
3. Manfaat aplikatif adalah sebagai landasan ilmiah penggunaan mikroalga *Chlorella sp.* sebagai obat dalam upaya pemanfaatannya dalam kesehatan dan industri farmasi.

## BAB II

### STUDI PUSTAKA

#### 2.1 Tumbuhan dalam Al-Qur'an

Terdapat beberapa tumbuhan yang disebut dalam al-Qur'an. Meski di dalam ayatnya tidak disertai dengan penjelasan ataupun uraian yang detail mengenai informasi mengenai tumbuhan tersebut, beberapa penelitian hasil dari perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi berhasil menemukan banyak manfaat dari beberapa jenis tumbuhan yang disebut dalam al-Qur'an. Salah satu ayat yang menyebutkan beberapa jenis tumbuhan adalah surat al-An'am ayat 99:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرِجُ مِنْهُ حَبًّا  
 مُتَرَكَبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ  
 مُتَشَابِهٍ <sup>قُلْ</sup> انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ <sup>ۚ</sup> إِنَّ فِي ذَلِكَُمْ لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ (٩٩)

*“Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman” (Q.S. Al-An'am (6): 99).*

Menurut Shihab (2001) ayat tentang tumbuh-tumbuhan ini menerangkan proses penciptaan buah yang tumbuh dan berkembang melalui beberapa fase, hingga sampai pada fase kematangan. Pada saat mencapai fase kematangan itu, suatu jenis buah mengandung komposisi zat gula, minyak, protein, berbagai zat

karbohidrat dan zat tepung. Semua itu terbentuk atas bantuan cahaya matahari yang masuk melalui klorofil yang pada umumnya terdapat pada bagian pohon yang berwarna hijau, terutama pada daun. Kemajuan ilmu pengetahuan telah dapat membuktikan kemahaesaan Allah SWT. Di dunia kedokteran ditemukan bahwa klorofil, ketika diasimilasi oleh tubuh manusia, bercampur dengan sel-sel manusia. Percampuran itu kemudian memberikan tenaga dan kekuatan melawan bermacam bakteri penyakit. Dengan demikian, ia berfungsi sebagai benteng pertahanan tubuh dari serangan segala macam penyakit.

Salah satu jenis tumbuhan penghasil buah yang disebutkan dalam ayat tersebut ialah kurma dan anggur. Dalam kitab hadits *Shahih Al-Bukhari* diriwayatkan dari sahabat Sa'ad bin Abi Waqash, dari Nabi SAW, beliau bersabda:

مَنْ تَصَبَّحَ بِسَبْعِ تَمْرَاتٍ عَجْوَةً، لَمْ يَضُرَّهُ ذَلِكَ الْيَوْمَ سُومٌ وَلَا سِحْرٌ (رواه البخاري)

“Barangsiapa mengonsumsi tujuh butir Kurma Ajwa pada pagi hari, maka pada hari itu ia tidak akan terkena racun maupun sihir” (H.R. Al-Bukhari).

Imam Muslim juga meriwayatkan hadis tentang keutamaan kurma Ajwah dalam kitab *Shahih Muslim* yang berasal dari Aisyah (*Shahih Muslim* Juz 10) (Dalil, 2016). Kurma mengandung asam salisilat yang bersifat anti pembekuan darah, anti inflamasi, dan menghilangkan rasa nyeri. Kandungan kaliumnya yang menyetabilkan denyut jantung, mengaktifkan kontraksi otot jantung, sekaligus mengatur tekanan darah, bermanfaat bagi kesehatan jantung dan pembuluh darah, sehingga bermanfaat dalam mencegah penyakit *stroke*. Banyaknya kandungan serat kurma baik bagi usus, dapat mencegah sembelit dan melancarkan buang air

besar. Dan kandungan kalsium, fosfor, dan magnesium kurma dapat membantu pertumbuhan dan kesehatan tulang serta gigi (Satuhu, 2010).

Terdapat penjelasan dalam Tafsir Ibnu Katsir mengenai keutamaan buah kurma dan anggur. Kedua jenis buah yakni anggur dan kurma merupakan jenis yang paling berharga bagi penduduk Hijaz, bahkan mungkin merupakan dua jenis buah terbaik di dunia. Sebagaimana Allah telah memberikan anugerah kepada hamba-hamba-Nya berupa kedua macam buah tersebut dalam firman-Nya yang artinya: “Dan dari buah kurma dan anggur, kamu buat minuman yang memabukkan dan rizki yang baik.” (Q.S. an-Nahl: 67). Hal itu terjadi sebelum pengharaman *khamr*.

Jenis tumbuhan lain yang disebut dalam surat al-An’am ayat 99 adalah delima dan zaitun. Sayyidina Ali ra pernah berkata:

كُلُوا الرُّمَانَ بِشَحْمِهِ، فَإِنَّهُ دِبَاعُ الْمَعِدَّةِ وَالْمَقْصُودُ بِدِبَاعِ الْمَعِدَّةِ أَنَّهُ يُصْلِحُهَا

“Makanlah buah delima dengan lemaknya, itu adalah penyamak lambung. Maksud dari penyamak lambung ialah bahwa delima dapat memperbaikinya”.

Rasulullah SAW memberi petunjuk agar mengonsumsi buah zaitun. Dalam sebuah hadits yang diriwayatkan dari Ibnu Umar, Rasulullah SAW bersabda:

إِتِّدِمُوا بِالزَّيْتِ وَادَّهِنُوا بِهِ، فَإِنَّهُ مِنْ شَجَرَةٍ مُبَارَكَةٍ (رواه البيهقي)

“Makanlah kalian dengan buah zaitun/minyak zaitun dan gunakan menggosok (mengoles) dengan minyak zaitun, sesungguhnya (zaitun) dari pohon yang diberkahi” (H.R. Al-Baihaqi).

Sudjijo (2014) menyatakan bahwa buah delima dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan, pencegah kanker, penyelamat ginjal, dan anti bakteri. Zaitun sebagian besar dimanfaatkan dalam bentuk minyaknya. Minyak zaitun bekerja sebagai antioksidan karena mengandung tokoferol. Warna minyak zaitun murni berasal

dari klorofil, feofitin dan karotenoid. Klorofil dan feofitin bekerja untuk melindungi minyak terhadap oksidasi dalam kondisi gelap, sedangkan karotenoid bekerja untuk melindungi minyak terhadap oksidasi dalam kondisi terang. Ketiga pigmen tersebut memudahkan penyerapan minyak di dalam tubuh (Soebahar, dkk., 2015).

Ayat tersebut tidak semata hanya menyebutkan jenis tumbuhan saja yang pada akhirnya ditemukan manfaatnya, akan tetapi juga terdapat pembelajaran lain yang dapat dijadikan bahan renungan bagi orang beriman. As-Suyuthi dan al-Mahalli (1997) menyebutkan dalam kitab tafsirnya tentang fase saat tumbuhan menghasilkan buah dan kematangannya; bagaimana keadaannya. Sesungguhnya yang demikian itu terdapat tanda-tanda yang menunjukkan kepada kekuasaan Allah SWT dalam menghidupkan kembali yang telah mati dan lain sebagainya. Orang-orang yang beriman disebut secara khusus sebab hanya merekalah yang dapat memanfaatkan hal ini untuk keimanan mereka, berbeda dengan orang-orang kafir.

## 2.2 Mikroalga *Chlorella sp.*

Mikroalga adalah organisme fotosintetik dengan morfologi sel yang bervariasi, baik uniseluler maupun multiseluler (membentuk koloni kecil) (Becker, 1994). Mikroalga dikelompokkan ke dalam Filum Talofita karena tidak memiliki akar, batang, dan daun sejati (semu). Mikroalga memiliki zat warna hijau daun (pigmen klorofil), sehingga mampu melakukan fotosintesis. Dengan bantuan air ( $H_2O$ ),  $CO_2$ , dan sinar matahari, energi kinetik diubah menjadi energi

kimiawi menghasilkan biomassa berupa karbohidrat. *Chlorella sp.* merupakan mikroalga laut dan termasuk ke dalam tumbuhan tingkat rendah (Amini, 2011).

Klasifikasi mikroalga *Chlorella sp.* menurut Bold dan Wyne (1985) dan Vahista (1999) adalah sebagai berikut.

Divisi : Chlorophyta  
Kelas : Chlorophyceae  
Ordo : Chlorococcales  
Familia : Oocystaceae  
Genus : Chlorella  
Spesies : *Chlorella sp.*

*Chlorella sp.* memiliki kandungan gizi yang lengkap, diantaranya protein, lemak, karbohidrat, vitamin, mineral, serat, klorofil,  $\beta$ -carotene (Wenno, dkk., 2010). Dilihat dari komposisi nutrisinya, mikroalga mengandung protein 30-55 %, karbohidrat 10-30 %, lemak 10-25 %, mineral 10-40 %, dan asam nukleat 4-6 % (Amini, 2011). Mikroalga menghasilkan beberapa vitamin penting, seperti vitamin A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, E, nikotinamida, biotin, asam folat, dan asam pantotenat. Pigmen yang dihasilkan meliputi klorofil (0,5-1 % dari berat kering), karotenoid (0,1-14 % dari berat kering), dan fikobiliprotein (Becker, 1994).

Mikroalga memerlukan kondisi lingkungan dengan nutrisi yang sesuai agar dapat tumbuh dengan baik. Faktor-faktor yang memengaruhi keberhasilan kultivasi *Chlorella sp.* adalah kualitas air yang meliputi suhu, salinitas, kekuatan cahaya, dan pH (Rostini, 2007). Pembudidayaan mikroalga *Chlorella sp.* dapat dilakukan dengan cara kultivasi dalam medium ekstrak taube (MET). MET merupakan salah satu media alami untuk pertumbuhan mikroalga, karena mengandung nutrisi organik seperti karbohidrat, protein, vitamin, dan lemak yang dibutuhkan sebagai sumber energi bagi pertumbuhan mikroalga (Wulandari, 2010). MET terbuat dari ekstrak taube. Taube merupakan sayuran yang mudah

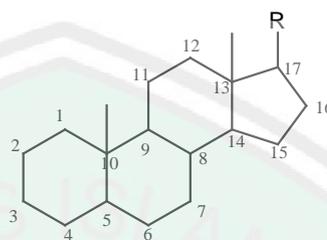
dikonsumsi, mudah diperoleh, ekonomis, dan tidak menghasilkan senyawa berefek toksik (Prihantini, dkk., 2005). MET dibuat dengan konsentrasi 4%. Prihantini, dkk. (2007) melakukan percobaan untuk mengetahui pengaruh beberapa konsentrasi MET terhadap kepadatan sel mikroalga marga *Scenedesmus*. Variasi konsentrasi MET dibuat 1, 2, 3, 4, 5, dan 6 %. Didapat hasil konsentrasi MET optimum bagi kepadatan sel mikroalga marga *Scenedesmus* selama 10 hari pengamatan sebesar 4% (v/v).

Komponen bioaktif dari mikroalga *Chlorella sp.* yang bisa menghasilkan efek farmakologis didapatkan dari biomassa *Chlorella sp.* Biomassa *Chlorella sp.* merupakan akumulasi dari sel *Chlorella sp.* hasil kultivasi dalam medium kultur (Rostini, 2007). Kandungan senyawa aktif yang ada di mikroalga dapat digunakan sebagai senyawa antibakteri, antikanker, dan antioksidan. Penelitian mengenai uji aktivitas mikroalga dilakukan oleh Anggraeni, dkk. (2014) dengan menguji potensi antioksidan mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan DPPH dari berbagai fraksi. Didapat nilai EC<sub>50</sub> dari fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter, *n*-heksana, air, dan ekstrak metanol berturut-turut yaitu 332; 182; 27,26; 173,7; 1.411; dan 1.334 ppm.

## 2.2 Steroid

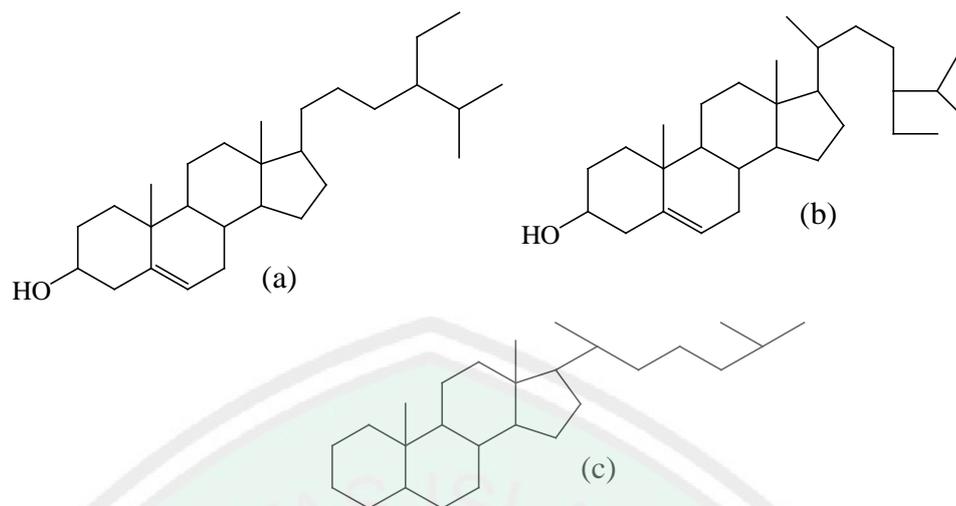
Steroid merupakan golongan lipid yang diturunkan dari senyawa jenuh yang dinamakan siklopentanoperhidrofenantrena yang memiliki inti dengan 3 cincin sikloheksana terpadu dan 1 cincin siklopentana yang tergabung pada ujung cincin sikloheksana tersebut (Poedjiadi dan Supriyanti, 1994). Steroid tersusun dari isopren-isopren dari rantai panjang hidrokarbon yang menyebabkan sifatnya

nonpolar. Steroid terdiri dari tiga sikloheksana dan satu pentaheksana. Beberapa senyawa steroid mengandung gugus  $-OH$  yang sering disebut dengan sterol, sehingga sifatnya cenderung lebih polar (Robinson, 1995).



Gambar 2.1 Kerangka dasar senyawa steroid (Kristanti, dkk., 2008)

Steroid terdapat dalam setiap makhluk hidup. Steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan disebut fitosterol (Gambar 2.2 (a)), sedangkan yang ditemukan dalam jaringan hewan lain disebut kolesterol (Gambar 2.2 (b)) (Robinson, 1995). Tonius (2016) melakukan isolasi senyawa steroid fraksi *n*-heksana dari daun buah-buas (*Premna serratifolia* L.) dan karakterisasi dengan FTIR. Hasil analisis spektrum IR menunjukkan adanya kemiripan terhadap senyawa *cholestane* (Gambar 2.2 (c)). Reaksi warna yang digunakan untuk uji warna pada steroid adalah dengan reaksi *Liebermann-burchard* (LB) yang menghasilkan warna hijau biru. Steroid setelah disemprot dengan reagen LB menghasilkan warna hijau (Sulastry dan Kurniawati, 2010) atau hijau kebiruan (Simaremare, 2014).



Gambar 2.2 Struktur senyawa (a) Fitosterol, (b) Kolesterol, dan (c) *Cholestane*

### 2.3 Isolasi Senyawa Steroid

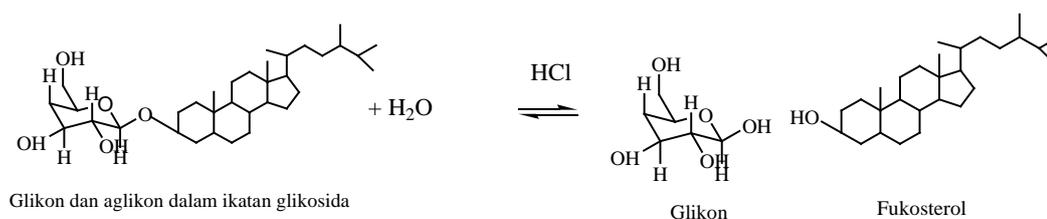
Isolasi senyawa steroid dilakukan dengan ekstraksi. Metode ekstraksi ditentukan oleh tekstur, kandungan air bahan yang akan diekstrak, dan senyawa yang akan diisolasi (Findryani, 2016). Metode ekstraksi yang paling sederhana adalah metode maserasi yang dilakukan dengan cara merendam padatan dalam suatu pelarut dengan tujuan untuk mengekstrak suatu senyawa dari bahan alam yang dilakukan tanpa pemanasan (suhu kamar). Salah satu keuntungan metode maserasi adalah cepat. Waktu rendam bahan dalam pelarut bervariasi antara 15-30 menit sampai 24 jam. Kelemahan dari metode ini adalah jumlah pelarut yang diperlukan cukup besar. Pemilihan pelarut berdasarkan pada kaidah “*like-dissolve like*” (Kristanti, dkk., 2008).

Metode maserasi dipilih karena aman digunakan dan dapat mengantisipasi senyawa yang rentan panas. Proses ini sangat menguntungkan dalam proses isolasi bahan alam karena proses perendaman mampu memecah dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel, sehingga senyawa

metabolit sekunder akan larut dalam pelarut organik (Handoko, 2016). Menurut Etika dan Suryelita (2014), maserasi dapat dilakukan dengan pelarut metanol karena metanol dapat melarutkan hampir semua senyawa organik dalam tumbuhan, baik yang bersifat polar maupun non polar.

Steroid akan larut dalam metanol karena keduanya mempunyai tingkat kepolaran yang sama (Sulastry dan Kurniawati, 2010). Senyawa steroid cenderung bersifat non polar atau semi-polar, namun dapat terekstrak dalam pelarut metanol yang bersifat polar karena diduga steroid masih terikat pada glikosidanya. Karenanya steroid dapat terekstrak dalam pelarut metanol yang bersifat polar (Anggraeni, dkk., 2014). Bariyyah, dkk. (2013) melakukan ekstraksi mikroalga *Chlorella sp.* dengan pelarut metanol dan etil asetat. Randemen yang didapat dengan pelarut metanol lebih besar daripada pelarut etil asetat, yakni sebesar 7,001 % (*b/b*).

Hasil maserasi selanjutnya dihidrolisis dan dipartisi dengan etil asetat. Hidrolisis ditujukan untuk memisah senyawa organik yang berada pada bentuk glikosida dengan cara memutus ikatan glikosidanya. Hidrolisis dilakukan dengan menambahkan asam klorida pada ekstrak metanol sebagai katalis (Anggraeni, dkk., 2014). Gambar 2.3 menunjukkan dugaan reaksi pemutusan ikatan glikosida saat proses hidrolisis berlangsung.



Gambar 2.3 Dugaan reaksi hidrolisis ikatan glikosida (Mardiyah, 2012)

Partisi dapat dilakukan dengan menambahkan pelarut dan mengocoknya menggunakan corong pisah (ekstraksi cair-cair). Prinsip partisi didasarkan pada distribusi zat terlarut dengan perbandingan tertentu antara dua pelarut yang tidak saling bercampur (Khopkar, 2008). Fasya, dkk. (2016) melakukan ekstraksi, hidrolisis dan partisi metabolit sekunder dari mikroalga *Chlorella sp.* Rendemen yang diperoleh dari proses hidolisis dan partisi dengan etil asetat dan petroleum eter berturut-turut yaitu 80,95 % dan 50,63 %. Proses partisi dengan pelarut etil asetat menunjukkan jumlah rendemen yang lebih tinggi. Ekstrak hasil partisi kemudian dipisahkan dengan kromatografi kolom cara basah setelah sebelumnya diuji fitokimia untuk mengetahui adanya kandungan senyawa steroid dalam ekstrak.

#### **2.4 Kromatografi Kolom Cara Basah**

Kromatografi kolom merupakan suatu metode pemisahan preparatif. Prinsip dasar dari kromatografi kolom adalah suatu pemisahan yang didasarkan pada prinsip adsorpsi. Fase diam (adsorben) yang paling sering digunakan untuk pemisahan produk alam ialah silika gel (Kristanti, dkk., 2008).

Permukaan silika gel mengandung gugus silanol. Gugus hidroksil ini adalah pusat aktif dan berpotensi dapat membentuk ikatan hirogen yang kuat dengan senyawa yang dipisahkan. Silika gel membentuk ikatan hidrogen terutama dengan donor H seperti alkohol, fenol, amina, amida, dan asam karboksilat (Palleros, 2000). Seberapa kuat senyawa tertahan dalam silika gel tergantung pada polaritas fase gerak. Semakin kuat kemampuan ikatan hidrogen suatu solven, maka semakin baik eluen untuk melulusi senyawa polar yang terserap pada

kolom silika gel. Pengembangan kolom biasanya meliputi peningkatan prosentase polar solven selama kromatografi berlangsung (Cannel, 1998).

Pemisahan komponen secara kromatografi kolom dilakukan dalam suatu kolom yang diisi dengan fase stasioner dan cairan (pereaksi) sebagai fase mobil untuk mengetahui banyaknya komponen contoh yang keluar melalui kolom (Adnan, 1997; Hayani, 2007). Pengisian kolom dilakukan dengan memasukkan adsorben dalam bentuk larutan (*slurry*), dan partikelnya dibiarkan mengendap (Hayani, 2007). Fase diam dalam kolom harus memiliki kerapatan yang maksimal. Fase diam juga harus dijaga agar tidak kering dan selalu terendam eluen sehingga tidak terjadi retakan. Jika fase diam retak, maka harus dikeluarkan karena tidak dapat digunakan untuk proses elusi (Kusmiyati, dkk., 2011).

Sifat eluen atau pelarut juga berpengaruh pada kromatografi adsorpsi. Umumnya digunakan pelarut yang polaritasnya rendah. Kekuatan pelarut melulusi komponen-komponen yang terikat pada penyangga meningkat dengan meningkatnya polaritas. Kemampuan pelarut untuk menggerakkan suatu senyawa berhubungan dengan kekuatan elusi pelarut (Atun, 2014).

Pemisahan campuran senyawa dengan rentang polaritas yang lebar atau dengan kata lain pemisahan dengan waktu retensi yang panjang dapat dilakukan dengan baik menggunakan teknik eluasi gradien. Metode ini dapat mengurangi waktu retensi sehingga pemisahannya menjadi lebih efektif (Scoot, 1995). Selain itu dalam pengembangannya, diperoleh pula keuntungan metode eluasi gradien antara lain: memungkinkan perkiraan rentang waktu retensi, pemilihan komposisi fase gerak yang sesuai, pemisahan yang lebih baik dan lebih cepat untuk sampel

total, dan dapat memisahkan komponen dengan konsentrasi rendah yang sering terabaikan pada metode eluasi isokratik (Snyder, 2010).

Handoko (2016) telah mengekstrak senyawa steroid dari mikroalga *Chlorella sp.* fraksi petroleum eter dengan metode kromatografi kolom fase diam basah dan kering. Fase diam basah menghasilkan lebih banyak fraksi berupa 4 fraksi murni, 1 di antaranya diduga steroid dan 3 lainnya diduga triterpenoid, sedangkan fase diam kering menghasilkan 2 fraksi murni yang diduga senyawa triterpenoid dan steroid.

Monitoring hasil isolasi senyawa dari kromatografi kolom dapat dilakukan dengan menggunakan KLTA. Ilyas (2015) menganalisis hasil fraksinasi kromatografi kolom cair vakum (KCV) ekstrak *n*-heksana kulit batang kayu bitti (*Vitex cofassus*) menggunakan KLT dengan tujuan pengelompokan lebih lanjut terhadap fraksi-fraksi yang diperoleh berdasarkan kesamaan profil kandungan kimia dari bercak KLT yang terbentuk dengan nilai *retardation factor* ( $R_f$ ) yang sama.

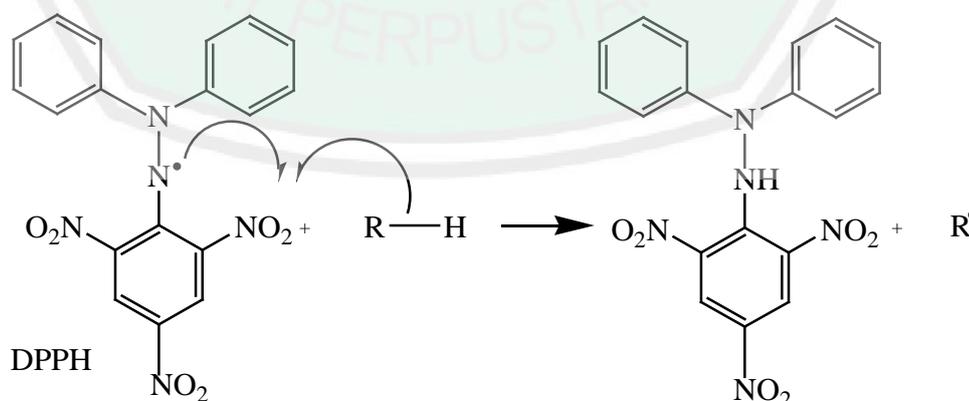
Pemilihan pelarut untuk KLT didasarkan pada prinsip “*like-dissolve like*”. Eluen yang dipilih sebaiknya menggunakan campuran pelarut organik yang mempunyai polaritas serendah mungkin, hal ini untuk mengurangi serapan dari setiap komponen dari campuran pelarut. Jika komponen-komponen yang mempunyai sifat polar tinggi (misalnya air) dalam campuran akan merubah sistem menjadi sistem partisi (Sastrohamidjojo, 2001). Fase gerak untuk KLTA yang digunakan dalam penelitian ini berupa campuran dua komponen, *n*-heksana:etil asetat dengan perbandingan 17:3. Mardaneni (2017) menggunakan metode KLT dengan lima variasi eluen perbandingan *n*-heksana dan etil asetat untuk

memisahkan senyawa steroid fraksi etil asetat alga merah *Eucheuma cottonii*. Hasil penelitian menunjukkan perbandingan eluen terbaik ialah perbandingan 17:3 dengan menghasilkan enam noda dengan tiga noda diantaranya diduga steroid.

## 2.5 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar. Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH (Erawati, 2012). Nilai absorbansi DPPH berkisar antara 515-520 nm (Vanselow, 2007; Tristantini, 2016).

Menurut Miliauskas (2003), ketika radikal DPPH bereaksi dengan suatu senyawa antioksidan yang dapat mendonorkan radikal hidrogen, radikal DPPH akan terus tereduksi membentuk DPPH-H. Warna berubah dari ungu menjadi kuning ketika elektron radikal bebas DPPH berpasangan dengan sebuah hidrogen dari penangkap radikal bebas suatu antioksidan. Mekanisme penghambatan radikal DPPH dapat dilihat pada gambar di bawah ini (Findryani, 2016).



Gambar 2.4 Mekanisme penghambatan radikal DPPH

Bariyyah, dkk. (2013) melakukan pengukuran waktu kestabilan dengan dan tanpa inkubasi saat pengujian antioksidan ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* Didapatkan waktu kestabilan DPPH berada pada rentang  $\pm 30$ -59 menit dengan adanya inkubasi. Sampel yang diinkubasi terlebih dahulu setelah penambahan DPPH cenderung lebih stabil dan mengalami penurunan absorbansi yang rendah jika dibandingkan dengan tanpa adanya inkubasi (Anggraeni, dkk., 2014).

Parameter yang dipakai untuk menunjukkan aktivitas antioksidan dinyatakan dalam *inhibition concentration 50* ( $IC_{50}$ ). Nilai  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi efektif sampel yang dibutuhkan untuk meredam 50% dari total DPPH (Tristantini, 2016). Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai  $IC_{50}$  kurang dari 50 ppm, kuat jika berada dalam rentang 50-100 ppm, sedang antara 100-150 ppm, dan lemah antara 151-200 ppm. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$ , maka semakin tinggi aktivitas antioksidan (Badarinath, dkk., 2010). Dinasti (2016) melakukan uji aktivitas antioksidan isolat steroid hasil KLTP fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* dan didapat nilai  $EC_{50}$  sebesar 77,78 ppm.

## 2.6 Identifikasi Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis ialah interaksi sinar ultraviolet atau tampak dengan molekul sampel. Energi cahaya akan mengeksitasi elektron terluar molekul ke orbital lebih tinggi. Pada kondisi ini, elektron tidak stabil dan dapat melepas energi untuk kembali ke tingkat dasar, dengan disertai emisi cahaya (Underwood dan Day, 1980).

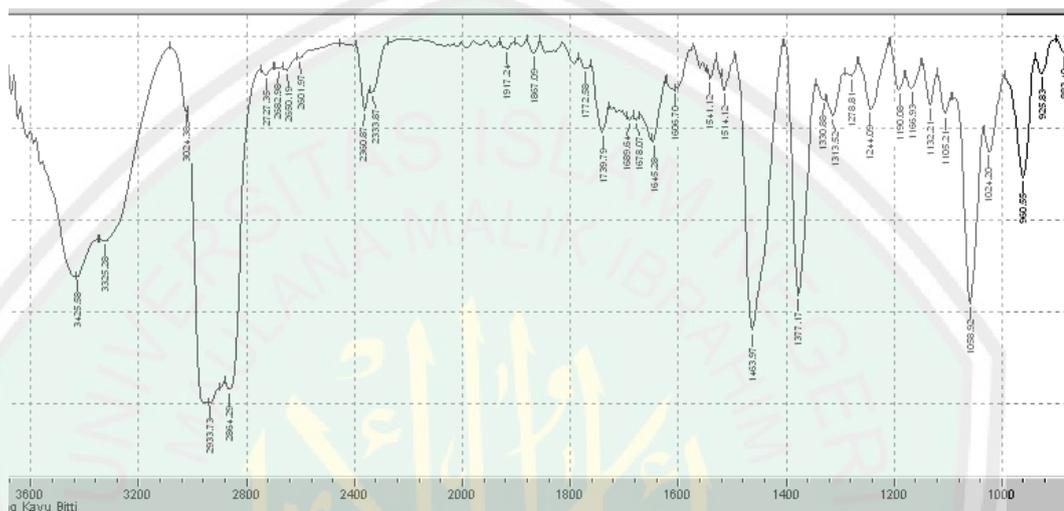
Penyerapan sinar UV-Vis oleh suatu molekul menyebabkan transisi diantara tingkat energi elektronik dari molekul tersebut. Transisi tersebut dapat terjadi antar orbital ikatan atau orbital antiikatan. Panjang gelombang sinar yang diserap sebanding dengan perbedaan tingkat energi orbital ( $\Delta E$ ). Tipe transisi elektronik ada empat macam, yaitu (Panji, 2012):  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  (alkana),  $\pi \rightarrow \pi^*$  (alkena, senyawa karbonil, alkuna),  $n \rightarrow \sigma^*$  (oksigen, nitrogen, sulfur, halogen), dan  $n \rightarrow \pi^*$  (senyawa karbonil).

Dinasti (2016) mengekstrak senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* dengan metode KLT dan mendapatkan panjang gelombang maksimum sebesar 204 nm melalui identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis. Etika dan suryelita (2014) mendapatkan panjang gelombang maksimum sebesar 203 nm yang menunjukkan adanya ikatan rangkap tak terkonjugasi untuk senyawa steroid dari daun mengkudu fraksi *n*-heksana. Ardji (2018) mengkarakterisasi senyawa steroid fraksi diklorometana dari batang tanaman andong (*Cordyline frucosa*) menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan mendapat pajang gelombang maksimum sebesar 220,5 nm yang menunjukkan ciri khas transisi  $n \rightarrow \pi^*$ . Fasya (2016 b) mendapatkan panjang gelombang maksimum dari senyawa steroid mikroaga *Chlorella sp.* fraksi etil asetat dan petroleum eter masing-masing sebesar 204 dan 276 nm.

## 2.7 Identifikasi Steroid Menggunakan FTIR

Penentuan struktur dilakukan dengan Inframerah (IR) untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat dalam senyawa organik (Silverstein, dkk., 2005). Dari hasil pengukuran dengan spektroskopi inframerah akan didapat puncak-puncak

yang spesifik (Harbone, 1987). Ilyas (2015) melakukan karakterisasi senyawa steroid yang didapat dari ekstrak *n*-heksana kulit batang kayu bitti (*Vitex cofassus*) untuk diuji toksisitasnya dengan metode *brine shrimp lethality test* (BSLT). Hasil karakterisasinya disajikan dalam Gambar 2.4.



Gambar 2.5 Spektrum IR senyawa steroid (Ilyas, 2015)

Hasil karakterisasi spektroskopi *infrared* (IR) yang tertera pada Gambar 2.4 menghasilkan serapan pada bilangan gelombang  $3425,58\text{--}3325,28\text{ cm}^{-1}$  yang menandakan adanya serapan ulur gugus O-H, adanya pita dengan intensitas kuat pada daerah serapan  $3024,38\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan gugus =C-H, pada serapan  $2933,73\text{--}2864,29\text{ cm}^{-1}$  merupakan C-H, pita tajam dan intensitas kuat pada daerah serapan  $1463,97\text{ cm}^{-1}$  merupakan CH<sub>2</sub>, sedangkan pada daerah serapan  $1377,17\text{ cm}^{-1}$  adalah CH<sub>3</sub> dan pada daerah bilangan gelombang  $1058,82\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan uluran C-OH siklik. Pita serapan yang menunjukkan adanya gugus O-H dan C-OH memberikan gambaran bahwa kemungkinan senyawa isolat merupakan suatu senyawa siklik steroid yang mengandung gugus OH (Ilyas, 2015).

Novadian (2014) melakukan isolasi senyawa steroid fraksi kloroform dari fraksinasi ekstrak metanol daun kerehau (*Callicarpa longifolia Lam.*) dan mengidentifikasi senyawa target menggunakan FTIR. Berdasarkan hasil dari interpretasi spektrum IR pada beberapa bilangan gelombang, didapatkan bahwa senyawa isolat mengandung gugus hidroksil (OH), alkil, alkohol sekunder (C-OH) dan alkena (C=C) tak terkonjugasi. Diduga senyawa steroid yang diisolasi adalah senyawa steroid golongan sterol (steroid alkohol). Hal ini disebabkan karena terdapat gugus -OH (alkohol sekunder) yang menunjukkan bahwa isolat merupakan senyawa steroid yang mengandung gugus -OH.

Handoko (2016) mengekstrak senyawa steroid dari mikroalga *Chlorella sp.* dengan metode kromatografi kolom fase diam basah dan kering. Identifikasi senyawa steroid menggunakan spektrofotometer FTIR menunjukkan bahwa isolat diduga merupakan senyawa steroid jenis fitosterol. Hal ini didasarkan pada gugus dan ikatan antar atom yang berhasil dideteksi berupa C=C, C=O, C-OH primer, C-OH tersier, OH, dan gem dimetil.

## 2.8 Identifikasi Jenis Steroid Menggunakan LC-MS/MS

LC-MS merupakan kromatografi cair yang memiliki detektor massa sehingga dapat memisahkan sekaligus mengidentifikasi massa dari sampel yang dipisahkan. Suatu sampel yang dianalisis akan dipisahkan dalam kromatografi cair kemudian ditembak oleh elektron berenergi tinggi. Penembakan tersebut akan menyebabkan lepasnya sebuah elektron dari suatu sampel membentuk suatu ion organik. Ion yang dihasilkan oleh penembakan elektron tersebut tidak stabil dan pecah menjadi fragmen kecil, baik dalam bentuk radikal maupun ion positif dan

negatif. Dalam sebuah spektroskopi massa yang khas, fragmen yang bermuatan positif akan dideteksi oleh rekorder (Supratman, 2010).

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

Ion yang terbentuk difragmentasi sesuai dengan perbandingan antara massa/muatan ( $m/z$ ), yang selanjutnya dideteksi secara elektrik menghasilkan spektra massa. Spektra massa merupakan rangkaian puncak-puncak yang berbeda-beda tingginya. Iyani (2017) melakukan identifikasi senyawa steroid hasil partisi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* dan didapatkan steroid jenis  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, dan campesterol. Kelimpahan terbanyak yaitu senyawa stigmasterol. Data spektra massa senyawa steroid ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Data spektra massa dari steroid yang teridentifikasi oleh LC-APCI-MS

Jenis Steroid	Waktu Retensi (min)	Massa Molekul (g/mol)	Massa Ion Prekursor [M-H <sub>2</sub> O+H <sup>+</sup> ] ( $m/z$ )	Massa Ion Produk ( $m/z$ )
Campesterol	1,42	414	383	161
Stigmasterol	1,43	412	395	81
$\beta$ -Sitosterol	1,52	414	397	161

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik dan Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan September 2018-Maret 2019.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Set alat maserat, seperangkat alat gelas, neraca analitik, *shaker*, corong pisah, *rotary evaporator vacuum*, plat KLT, bejana pengembang, *sentrifuge*, kolom, spektrofotometer UV-Vis, spektroskopi FTIR, dan LC-MS/MS.

##### **3.2.2 Bahan**

Isolat mikroalga *Chlorella sp.* diperoleh dari Laboratorium Fisiologi Tumbuhan dan Laboratorium Biokimia Jurusan Biologi dan dikultivasi di Laboratorium Organik Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah tauge (kacang hijau), akuades, metanol *p.a.*, *n*-heksana *p.a.*, etil asetat *p.a.*, HCl 2 N, natrium bikarbonat, silika gel, kloroform, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, etanol 95%, dan DPPH.

#### **3.3 Tahapan Penelitian**

Penelitian ini akan dilaksanakan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.*
2. Pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella sp.*
3. Preparasi sampel biomassa mikroalga *Chlorella sp.*
4. Ekstraksi mikroalga *Chlorella sp.* dengan maserasi menggunakan pelarut metanol
5. Hidrolisis ekstrak pekat metanol dengan HCl 2 N dan partisi ekstrak metanol hasil hidrolisis mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan etil asetat
6. Uji fitokimia steroid dalam fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.*
7. Pemisahan steroid mikroalga *Chlorella sp.* dengan kromatografi kolom basah
8. Monitoring dengan KLTA
9. Uji aktivitas antioksidan isolat steroid terhadap DPPH
10. Identifikasi panjang gelombang maksimum steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis
11. Identifikasi gugus fungsi dan ikatan antar atom steroid dengan FTIR
12. Identifikasi jenis senyawa steroid pada fraksi dan isolat dengan LC-MS/MS
13. Analisa data

### **3.4 Pelaksanaan Penelitian**

#### **3.4.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge 4%**

Tauge sebanyak 100 gram yang telah dicuci bersih direbus dalam 500 mL akuades yang mendidih (sampai warna tauge berubah menjadi pucat) selama  $\pm 1$  jam. Ekstrak tauge sebanyak 36 mL dilarutkan ke dalam 864 mL akuades dalam erlenmeyer 1000 mL sehingga diperoleh MET 4%. Isolat *Chlorella sp.* sebanyak 150 mL dimasukkan ke dalam masing-masing 900 mL MET 4% dalam erlenmeyer 1000 mL dan ditempatkan dalam suhu ruang antara suhu 25-27 °C.

Erlenmeyer berisi kultur mikroalga diletakkan pada rak yang dilengkapi dengan pencahayaan menggunakan lampu TL 36 watt (intensitas cahaya 1000-4000 *lux*) dan diinkubasi selama 10 hari dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap (Fasya, dkk., 2013).

#### **3.4.2 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.***

Pemanenan mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan pada hari ke-10 (fase akhir stasioner) dengan cara mikroalga *Chlorella sp.* disentrifuge dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit. Biomassa *Chlorella sp.* dipisahkan dari filtratnya kemudian dilakukan penimbangan yang dicatat sebagai berat basah. Biomassa *Chlorella sp.* dikeringanginkan pada suhu kamar selama 48 jam kemudian ditimbang dan dicatat sebagai berat kering.

#### **3.4.3 Ekstraksi Maserasi Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.***

Biomassa *Chlorella sp.* kering yang telah diperoleh dari fase pemanenan dimasukkan ke dalam erlenmeyer tutup 300 mL dan ditambahkan pelarut metanol dengan perbandingan 1:10 (*b/v*) (9,5 gram:95 mL). Permukaan erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil dan dilakukan maserasi dengan pengocokan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam pada suhu kamar (Iyani, 2017). Setelah itu, disaring dengan menggunakan corong Buchner sehingga terpisah antara residu dan filtrat. Bagian residu dimaserasi kembali hingga 4 kali proses ekstraksi. Filtrat yang diperoleh dari 5 kali proses maserasi tersebut dikumpulkan menjadi satu dan dihilangkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator vacuum* sehingga diperoleh ekstrak kasar *Chlorella sp.* (Handoko, 2016). Ekstrak

dipekatkan dengan dialiri gas N<sub>2</sub>. Kemudian ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang untuk selanjutnya dihitung nilai randemen ekstrak dengan menggunakan persamaan 3.1.

$$\text{Randemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{Berat sampel yang diekstrak}} \times 100 \% \dots\dots\dots(3.1)$$

#### 3.4.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstrak pekat metanol sebanyak 0,8 gram dihidrolisis dengan katalis HCl 2 N sebanyak 1,6 mL dan diaduk 1 jam pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan natrium bikarbonat hingga pHnya netral. Kemudian dipartisi dengan etil asetat dengan perbandingan antara sampel dan pelarut sebesar 1:10. Sampel yang telah ditambah etil asetat dikocok dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan, yaitu lapisan organik (atas) dan lapisan air (bawah). Masing-masing lapisan yang terbentuk dipisahkan. Proses partisi diulangi sebanyak empat kali. Lapisan organik dimasukkan ke dalam wadah gelas dan dipekatkan dengan dialiri gas N<sub>2</sub>. Ekstrak pekat yang diperoleh selanjutnya ditimbang dan dihitung randemennya menggunakan persamaan 3.1.

#### 3.4.5 Uji Fitokimia Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat

Isolat hasil partisi *Chlorella sp.* sebanyak ±1 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform dan ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya ditambahkan 10 tetes asam sulfat pekat melalui dinding tabung tersebut. Terbentuknya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid (Simaremare, 2014).

### 3.4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom Basah

Silika gel yang akan digunakan sebagai fase diam ditimbang sebanyak 10 gram kemudian diaktivasi dalam oven pada suhu 105 °C selama 1 jam. Silika gel yang telah diaktivasi dilarutkan dalam *n*-heksana:etil asetat dengan perbandingan 95:5 sebanyak 20 mL untuk dibuat *slurry* (bubur) (Etika dan Suryelita, 2014). Campuran tersebut diaduk dengan stirer hingga tidak terdapat gelembung udara kemudian dimasukkan ke dalam kolom berdiameter 1 cm (Sakdiyah, 2017). Kolom diketuk-ketuk agar diperoleh fase diam yang rapat dan bagian atas kolom ditutup dengan kertas wrap. Kemudian kolom dikocok secara pelan dan dijenuhkan minimal selama semalam (24 jam). Eluen dikeluarkan dari kolom hingga tersisa  $\pm 0,5$  cm dari permukaan silika (Iyani, 2017).

Sampel sebanyak 0,05 gram (perbandingan silika:sampel sebesar 1:200) dilarutkan dengan perbandingan *n*-heksana:etil asetat 95:5 sebanyak 1 mL. Sampel dimasukkan ke dalam kolom. Ditaburkan silika gel yang teraktivasi di atas permukaan sampel kemudian ditambahkan eluen dan dilakukan elusi. Eluen untuk fase gerak yang berupa perbandingan *n*-heksana dan etil asetat 95:5; 90:10; 85:25; 80:20; 75:25, dan 70:30 sebanyak 600 mL dimasukkan ke dalam kolom kromatografi secara bergantian. Kran dibuka hingga eluen mengalir dan ditampung dalam botol vial tiap 2 mL (laju alir 1,5 mL/menit). Langkah-langkah di atas diulangi untuk perbandingan antara silika dan sampel 1:150 (sampel sebanyak 0,067 gram).

### 3.4.7 Monitoring Senyawa Steroid Secara KLTA

Plat silika berukuran 10x10 diaktivasi dengan pemanasan dalam oven pada suhu 110 °C selama 60 menit. Vial-vial hasil kromatografi kolom dianalisis menggunakan KLTA per-dua jarak antara botol vial dengan cara ditotolkan pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler sebanyak 10 kali totolan yang diselingi dengan pengeringan. Kemudian dilakukan elusi dengan fase gerak *n*-heksana:etil asetat (17:3) (Mardaneni, 2017). Setelah gerakan fase gerak sampai pada garis batas atas, elusi dihentikan. Noda-noda pada permukaan plat pemisahan diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 366 nm. Dianalisis terbentuknya warna hitam, hijau, dan biru yang menunjukkan adanya steroid. Eluat yang mempunyai harga  $R_f$  yang sama dan bercak yang sama dikumpulkan menjadi satu sebagai fraksi yang sama. Fraksi yang menunjukkan hasil positif steroid digabungkan dan diuapkan pelarutnya untuk uji lanjutan.

### 3.4.8 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

#### 3.4.8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Etanol 95% dipipet sebanyak 3 mL kemudian ditambahkan larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dimasukkan ke dalam kuvet hingga penuh. Selanjutnya dicari  $\lambda_{maks}$  larutan dan dicatat hasil pengukuran  $\lambda_{maks}$  untuk digunakan pada tahap selanjutnya (Hanani, dkk., 2015; Anggraeni, dkk., 2014).

#### 3.4.8.2 Pengukuran Potensi Antioksidan pada Sampel

Sampel isolat dilarutkan dalam etanol 95% dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm. Ekstrak masing-masing konsentrasi dipipet 3 mL dan ditambahkan 1 mL

DPPH 0,2 mM kemudian diinkubasi dengan suhu 37 °C selama 30 menit, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang yang telah didapatkan. Data absorbansi yang diperoleh tiap konsentrasi masing-masing ekstrak dihitung nilai persen aktivitas antioksidan menggunakan persamaan 3.2.

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi DPPH sisa}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.2)$$

Kontrol yang digunakan yaitu larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 mL dalam 3 mL etanol 95% yang diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit.

#### **3.4.9 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis**

Isolat steroid yang didapatkan dari hasil pemisahan menggunakan kromatografi kolom dilarutkan dengan pelarutnya kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

#### **3.4.10 Identifikasi Senyawa Steroid dengan FTIR**

Isolat steroid dicampur dengan serbuk KBr dan digerus bersamaan dalam mortar agate. Hasil gerusan dibuat pellet. Pellet diletakkan dalam wadah sampel, kemudian dimasukkan dalam instrumen. Sampel dianalisis dengan FTIR dan diidentifikasi hasil spektranya.

#### **3.4.11 Identifikasi Jenis Senyawa Steroid dengan LC-MS/MS**

Frakasi etil asetat dan isolat hasil kromatografi kolom dianalisa dengan LC-MS/MS dengan spesifikasi alat sebagai berikut (Iyani, 2017).

**Kondisi LC**

Spesifikasi	: HPLC merk ACCELA type 1250, buatan <i>Thermo Scientific</i> yang terdiri dari <i>degasser vacuum</i> , pompa <i>quartener</i> , <i>autosampler thermostatik</i>
Kolom	: <i>hypersil gold</i> (50 mm x 2,1 mm x 1,9 $\mu\text{m}$ ) (30 °C)
Fase Gerak A	: 0,1 % asam format dalam metanol
Fase Gerak B	: isopropanol
Pengaturan eluen	: gradien linier 70% (A) : 0% (B) sampai 0% (A) : 30 % (B)
Laju alir	: 300 $\mu\text{L}$ /menit
<i>Run Time</i>	: 5 menit
Sampel yang diinjeksikan	: 5 $\mu\text{L}$

**Spektrometri Massa**

Spesifikasi	: menggunakan MS/MS tripel Q (Quadrupole) Merk TSQ QUANUM ACCES MAS dari <i>Thermo Finningan</i>
Sumber Ionisasi	: APCI, dikendalikan oleh software TSQ Tune dengan mode positif

**Kondisi Ion APCI**

Arus	: 4 $\mu\text{A}$
Suhu penguapan	: 250 °C
Suhu Kapiler	: 300 °C
<i>Sheat gas pressure</i>	: 45 arbitrary unit
<i>Aux gas pressure</i>	: 15 arbitrary unit

**3.5 Analisis Data**

Analisis data yang digunakan adalah dengan menentukan % inhibisi isolat steroid. Inhibisi suatu sampel terhadap radikal DPPH menunjukkan adanya aktivitas antioksidan. Parameter  $IC_{50}$  (*inhibition concentration 50*) didefinisikan sebagai konsentrasi sampel yang akan menyebabkan reduksi terhadap aktivitas DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  maka aktivitas antioksidannya semakin tinggi (Molyneux, 2003). Nilai  $IC_{50}$  diperoleh dengan mengolah data persen aktivitas antioksidan dan dianalisis menggunakan persamaan regresi non linear dengan menggunakan aplikasi *GraphPad prism7 software, Regression for analyzing dose-response data*.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Kultivasi dan Pemanenan Mikroalga *Chlorella sp.*

Mikroalga *Chlorella sp.* dikultivasi dalam MET 4% yang dibuat dari ekstrak taugé dan diencerkan dengan akuades. Taugé direbus sampai diperoleh ekstrak berwarna kuning agak kental dengan asumsi kandungan kimia taugé telah ikut terekstrak. Selama sepuluh hari proses kultivasi, kultur mikroalga mengalami perubahan warna dari hijau kekuningan sampai hijau tua yang mengindikasikan kerapatan sel dan kadar pigmen klorofil *Chlorella sp.* meningkat.

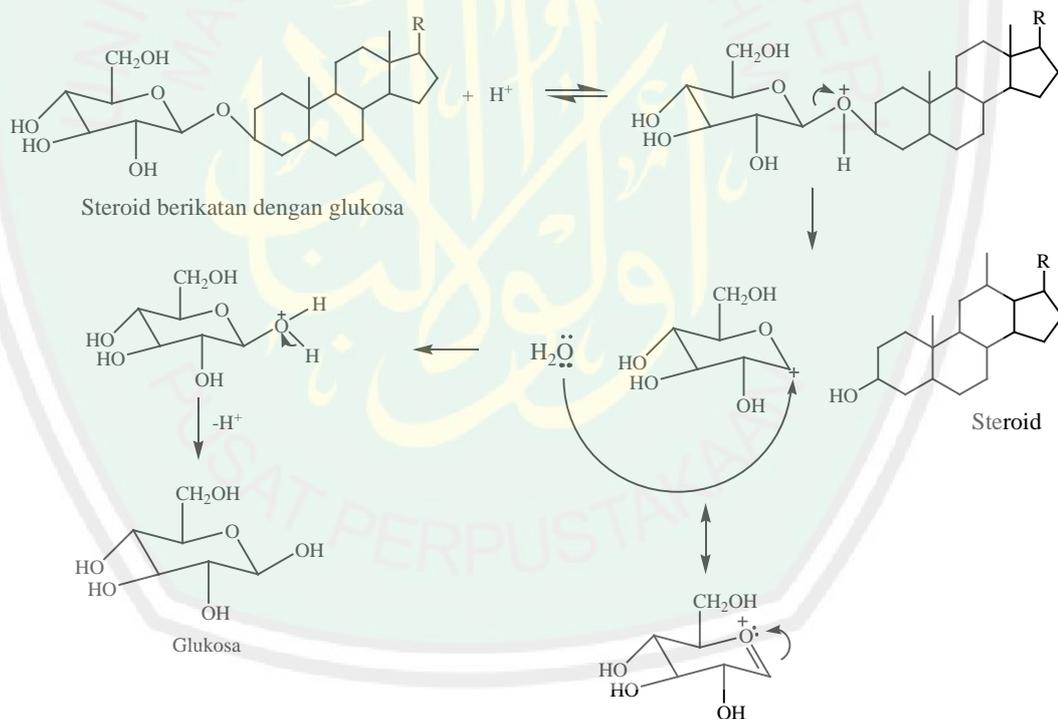
Pemanenan dilakukan pada hari ke-10 saat kepadatan sel *Chlorella sp.* berada pada jumlah maksimumnya. Hasil pemanenan berupa biomassa berwarna hijau tua dan disentrifuge untuk kemudian dihilangkan kandungan airnya dengan cara dikeringanginkan. Hal ini untuk mencegah pertumbuhan mikroba atau jamur. Berat sampel kering *Chlorella sp.* yang dihasilkan sebesar 9,5269 gram.

#### 4.2 Isolasi Senyawa Steroid

Isolasi senyawa steroid dari mikroalga *Chlorella sp.* diawali dengan maserasi. Saat proses perendaman berlangsung, terjadi proses difusi karena adanya perbedaan konsentrasi antara pelarut dengan sampel. Pelarut yang mempunyai konsentrasi lebih tinggi akan mendesak masuk ke dalam sel mikroalga dan mengakibatkan dinding dan membran sel pecah, sehingga metabolit sekunder yang berada dalam sitoplasma akan luruh dan terlarut. Hasil maserasi berupa ekstrak kasar berwarna hijau pekat dengan berat 0,8237 gram dan

randemen sebesar 8,6460%. Randemen yang diperoleh lebih besar dari penelitian Bariyah, dkk. (2013) yang memperoleh randemen ekstrak pekat metanol sebesar 7,001%.

Ekstrak kasar hasil maserasi dihidrolisis dengan penambahan HCl 2 N sebagai katalis asam yang berfungsi memutus ikatan glikosida steroid (Gambar 4.1). Penambahan NaHCO<sub>3</sub> selain untuk menghentikan proses hidrolisis yang bersifat *reversible* sekaligus untuk menetralkan suasana asam yang terbentuk setelah penambahan HCl. Reaksi penetralan berhenti jika sudah tidak terbentuk gelembung CO<sub>2</sub>. Gambar 4.2 menunjukkan reaksi penetralan HCl oleh basa NaHCO<sub>3</sub>.



Gambar 4.1 Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis pada steroid (Iyani, 2017)



Gambar 4.2 Reaksi penetralan HCl oleh NaHCO<sub>3</sub> (Mardiyah, 2012)

Ekstrak kasar yang telah dihidrolisis dipartisi dengan pelarut etil asetat. Saat partisi terbentuk dua fase, yaitu fase organik (atas) dan fase air (bawah). Fase organik berada di bagian atas karena massa jenis etil asetat (0,9 g/mL) yang merupakan perwakilan fase organik lebih kecil dibanding massa jenis air (1 g/mL). Berat ekstrak hasil partisi yang dihasilkan sebesar 0,4341 gram dengan randemen 52,7012%. Randemen fraksi yang diperoleh lebih besar dari penelitian Imamah (2015) yang menghasilkan randemen fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak pekat metanol sebesar 49,32%.

#### 4.3 Uji Fitokimia Fraksi Etil Asetat

Uji fitokimia menandakan positif steroid jika terbentuk warna hijau kebiruan. Prinsip reaksi dalam uji steroid menurut Siadi (2012) kondensasi atau pelepasan H<sub>2</sub>O dan penggabungan dengan karbokation. Reaksi ini diawali dengan proses asetilasi gugus hidroksil menggunakan asam asetat anhidrida. Selanjutnya akan terbentuk ikatan rangkap dengan lepasnya gugus asetil yang sebelumnya telah terbentuk setelah proses asetilasi. Gugus asetil merupakan gugus pergi yang baik. Setelah itu terjadi pelepasan gugus hidrogen beserta elektronnya, mengakibatkan ikatan rangkap berpindah. Senyawa ini mengalami resonansi yang bertindak sebagai elektrofil atau karbokation. Serangan karbokation menyebabkan adisi elektrofilik, diikuti pelepasan hidrogen. Kemudian gugus hidrogen beserta elektronnya dilepas, akibatnya senyawa mengalami perpanjangan konjugasi yang menyebabkan munculnya warna. Hasil uji fitokimia pada fraksi etil asetat menghasilkan warna hijau kebiruan yang mengindikasikan adanya steroid.

#### 4.4 Pemisahan Senyawa Steroid Menggunakan Kromatografi Kolom Basah dan Monitoring dengan KLTA

Senyawa steroid yang terdapat dalam ekstrak hasil partisi dipisahkan menggunakan kromatografi kolom basah dengan sistem gradien eluen berupa campuran perbandingan *n*-heksana dan etil asetat. Variasi eluen yang digunakan mempunyai kepolaran sangat rendah dan naik seiring bertambahnya jumlah volume etil asetat yang dicampurkan. Rentang etil asetat yang ditambahkan mempunyai selisih 5 mL per variasi, karenanya tingkat kepolaran eluen tidak akan naik secara drastis. Hal ini dimaksudkan untuk memaksimalkan pemisahan steroid yang cenderung bersifat nonpolar dengan senyawa lain yang kemungkinan mempunyai tingkat kepolaran tidak jauh berbeda dengan steroid. Eluat ditampung dalam vial dan mengalami perubahan warna dalam jangka waktu tertentu dimulai dari warna kuning keemasan, bening, keruh (kehijauan), hijau, dan kuning.

Pemisahan dengan kromatografi kolom dilakukan dengan dua variasi perbandingan silika dan sampel, yakni 1:200 dan 1:150. Secara berturut-turut perbandingan 1:200 dan 1:150 menghasilkan 307 dan 268 vial berisi eluat. Masing-masing vial berisi eluat  $\pm 2$  mL yang kemudian dimonitoring menggunakan KLTA. Pengelompokan fraksi didasarkan atas pola pemisahan yang sama, meliputi warna, jumlah, dan  $R_f$  spot yang dihasilkan. Hasil monitoring KLTA untuk eluat perbandingan 1:200 ditunjukkan pada Tabel 4.1 dan 4.2 untuk perbandingan 1:150.

Tabel 4.1 Hasil monitoring dengan perbandingan silika dan sampel 1:200

Fraksi	Vial	$\Sigma$ spot	Warna	Senyawa	Keterangan	$R_f$
J1	1-5	-	-	-	Kosong	-
J2	6-12	2	Hitam Hitam	Steroid Steroid	Campuran	0,89 0,7
<b>J3</b>	<b>13-19</b>	<b>1</b>	<b>Hitam</b>	<b>Steroid</b>	<b>Tunggal</b>	<b>0,68</b>
J4	20-44	-	-	-	Kosong	-
<b>J5</b>	<b>45-47</b>		<b>Merah</b>	<b>Triterpenoid</b>	<b>Tunggal</b>	<b>0,46</b>
J6	48-50	4	Merah Hitam Biru Biru	Triterpenoid Steroid Steroid Steroid	Campuran	0,46 0,48 0,39 0,31
J7	51-56	2	Merah Merah	Triterpenoid Triterpenoid	Campuran	0,46 0,19
J8	57-59	5	Hitam Merah Hijau Biru Merah	Steroid Triterpenoid Steroid Steroid Triterpenoid	Campuran	0,48 0,48 0,38 0,31 0,19
J9	60-61	2	Merah Hijau	Triterpenoid Steroid	Campuran	0,48 0,38
J10	62-70	3	Merah Hijau Biru	Triterpenoid Steroid Steroid	Campuran	0,48 0,38 0,31
J11	71-89	2	Hijau Merah	Steroid Triterpenoid	Campuran	0,40 0,28
<b>J12</b>	<b>90</b>	<b>1</b>	<b>Merah</b>	<b>Triterpenoid</b>	<b>Tunggal</b>	<b>0,29</b>
J13	91-93	2	Merah Merah	Triterpenoid Triterpenoid	Campuran	0,28 0,18
<b>J14</b>	<b>94-104</b>	<b>1</b>	<b>Merah</b>	<b>Triterpenoid</b>	<b>Tunggal</b>	<b>0,18</b>
J15	105-119	2	Merah Merah	Triterpenoid Triterpenoid	Campuran	0,24 0,18
J16	120-223	3	Merah Merah Merah	Triterpenoid Triterpenoid Triterpenoid	Campuran	0,24 0,14 0,06
J17	224-307	2	Merah Merah	Triterpenoid Triterpenoid	Campuran	0,14 0,08

Tabel 4.2 Hasil monitoring dengan perbandingan silika dan sampel 1:150

Fraksi	Vial	$\Sigma$ spot	Warna	Senyawa	Keterangan	Rf
<b>K1</b>	<b>1-16</b>	<b>1</b>	<b>Hitam</b>	<b>Steroid</b>	<b>Tunggal</b>	<b>0,78</b>
K2	17-41	-	-	-	Kosong	-
<b>K3</b>	<b>42-50</b>		<b>Merah</b>	<b>Triterpenoid</b>	<b>Tunggal</b>	<b>0,55</b>
K4	51-56	2	Merah Hijau	Triterpenoid Steroid	Campuran	0,55 0,45
K5	57-58	3	Hijau Merah Merah	Steroid Triterpenoid Triterpenoid	Campuran	0,45 0,55 0,43
K6	59-64	2	Hijau Merah	Steroid Triterpenoid	Campuran	0,45 0,44
<b>K7</b>	<b>65-69</b>	<b>1</b>	<b>Merah</b>	<b>Triterpenoid</b>	<b>Tunggal</b>	<b>0,44</b>
K8	70	2	Merah Merah	Triterpenoid Triterpenoid	Campuran	0,44 0,36
K9	71-77	2	Merah Hijau	Triterpenoid Steroid	Campuran	0,36 0,3
K10	78-86	-	-	-	Kosong	-
<b>K11</b>	<b>87-92</b>	<b>1</b>	<b>Merah</b>	<b>Triterpenoid</b>	<b>Tunggal</b>	<b>0,23</b>
K12	93-100	2	Merah Merah	Triterpenoid Triterpenoid	Campuran	0,23 0,05
K13	101-102	4	Merah Hitam Merah Merah	Triterpenoid Steroid Triterpenoid Triterpenoid	Campuran	0,23 0,20 0,18 0,05
K14	103-110	5	Merah Hitam Merah Merah Merah	Triterpenoid Steroid Triterpenoid Triterpenoid Triterpenoid	Campuran	0,23 0,20 0,18 0,14 0,05
K15	111-122	4	Merah Merah Merah Merah	Triterpenoid Triterpenoid Triterpenoid Triterpenoid	Campuran	0,23 0,18 0,14 0,05
K16	123-124	5	Merah Merah Merah Merah Merah	Triterpenoid Triterpenoid Triterpenoid Triterpenoid Triterpenoid	Campuran	0,23 0,18 0,14 0,11 0,05
K17	125-135	4	Merah Merah Merah Merah	Triterpenoid Triterpenoid Triterpenoid Triterpenoid	Campuran	0,23 0,14 0,11 0,05
K18	136-252	5	Merah Merah Merah Merah Merah	Triterpenoid Triterpenoid Triterpenoid Triterpenoid Triterpenoid	Campuran	0,23 0,14 0,11 0,08 0,05
K19	253-268	4	Merah Merah Merah Merah	Triterpenoid Triterpenoid Triterpenoid Triterpenoid	Campuran	0,14 0,11 0,08 0,05

Monitoring menggunakan KLTA menghasilkan dua jenis senyawa, yakni steroid dan triterpenoid. Dugaan senyawa steroid dihasilkan dari noda berwarna hitam (Azah, 2018), hijau (Tisnadjaja, dkk., 2006), dan biru (Hidayah, dkk., 2016), sedangkan dugaan senyawa teriterpenoid dihasilkan dari kemunculan noda merah (Santoni, dkk., 2015). Hasil monitoring pada Tabel 4.1 (perbandingan 1:200) didapat 17 fraksi (J1-J17) yang empat diantaranya merupakan fraksi tunggal. Satu fraksi (J3) merupakan seroid, sedangkan tiga fraksi lainnya (J5, J12, dan J14) merupakan triterpenoid. Randemen empat fraksi tunggal J3, J5, J12, dan J14 secara berturut-turut 6% (0,0030 gram); 0,6% (0,0003 gram); 0,6% (0,0003 gram); dan 4% (0,0020 gram).

Tabel 4.2 (perbandingan 1:150) menunjukkan terdapat 19 fraksi (K1-K19) yang dihasilkan. Empat diantaranya merupakan fraksi tunggal dengan dugaan 1 fraksi (K1) merupakan steroid, sedangkan 3 fraksi lainnya (K3, K7, dan K11) merupakan triterpenoid. Randemen yang diperoleh pada fraksi steroid K1 sebesar 18,06% (0,0121 gram), sedangkan randemen tiga fraksi triterpenoid K3, K7, dan K11 secara berturut-turut sebesar 1,79% (0,0012 gram); 1,34% (0,0009 gram); dan 1,34% (0,0009 gram).

Perbandingan 1:200 maupun 1:150 keduanya sama-sama menghasilkan empat fraksi tunggal, satu fraksi steroid dan tiga fraksi triterpenoid. Akan tetapi randemen fraksi tunggal steroid dari perbandingan 1:150 lebih besar dari pada perbandingan 1:200. Banyaknya sampel yang dimasukkan dalam kolom saat proses pemisahan senyawa juga berpengaruh terhadap banyaknya randemen yang dihasilkan. Semakin sedikit sampel yang dimasukkan mengakibatkan kurangnya

interaksi antara sampel dengan eluen, sehingga semakin sedikit senyawa dalam sampel yang berhasil dipisahkan.

Iyani (2017) menghasilkan tiga fraksi tunggal pada pemisahan steroid mikroalga menggunakan kromatografi kolom metode isokratik, yaitu satu fraksi steroid dan dua fraksi tunggal triterpenoid dengan menggunakan perbandingan silika dan sampel sebesar 1:150, sedangkan untuk perbandingan 1:200 menghasilkan satu fraksi tunggal triterpenoid. Penelitian ini dapat menghasilkan fraksi tunggal lebih banyak karena teknik gradien eluen yang digunakan. Rentang polaritas yang beragam dan kenaikan sifat kepolaran eluen yang tidak drastis memungkinkan pemisahan terjadi lebih maksimal.

#### **4.5 Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid**

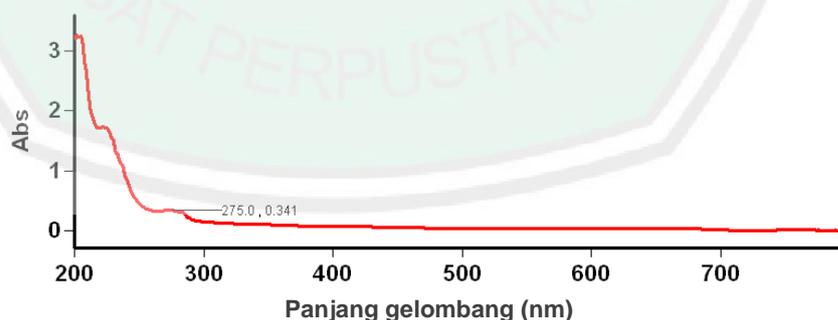
Analisis pengujian antioksidan metode DPPH dilakukan dengan melihat perubahan warna masing-masing sampel setelah di inkubasi bersama DPPH. Jika semua elektron DPPH berpasangan dengan elektron pada sampel isolat maka akan terjadi perubahan warna sampel dimulai dari ungu tua hingga kuning terang (Tristantini, 2016). Sampel isolat steroid yang ditambahkan DPPH hampir tidak mengalami perubahan warna, hanya memudar menjadi ungu muda. Sampel dianalisis pada panjang gelombang maksimum DPPH yang didapatkan, yakni 516,1 nm (Lampiran 7).

Data absorbansi DPPH sisa yang diperoleh digunakan untuk menghitung % inhibisi masing-masing sampel. Meskipun tidak mengalami pengurangan intensitas warna ungu secara drastis, akan tetapi dalam pembacaan absorbansi data yang diperoleh semakin kecil seiring bertambahnya konsentrasi sampel. Hal itu

berarti bahwa aktivitas antioksidan sampel dalam menangkap radikal DPPH semakin besar. Nilai  $IC_{50}$  yang dihasilkan sebesar 989.539 ppm. Nilai ini jauh lebih besar dari nilai  $IC_{50}$  fraksi etil asetat, yakni sebesar 332 ppm (Aggraeni, dkk., 2014). Hal tersebut mengindasikan penurunan kemampuan aktivitas antioksidan steroid dalam bentuk isolat, dibanding saat steroid berada dalam keadaan fraksi yang bercampur dengan senyawa lain. Efek protagonis suatu senyawa dapat menyebabkan kenaikan aktivitas senyawa saat senyawa tersebut bercampur dengan senyawa lain dan mengalami penurunan aktivitas saat senyawa tersebut berada dalam keadaan yang lebih murni atau terpisah dari senyawa lain.

#### 4.6 Identifikasi Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Isolat steroid K1 hasil pemisahan menggunakan kromatografi kolom dianalisa menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang maksimum yang didapatkan yaitu 275,0; 222,0; 205,0; dan 202,0 nm (Lampiran L.7.3). Spektra hasil pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis ditunjukkan pada Gambar 4.3.



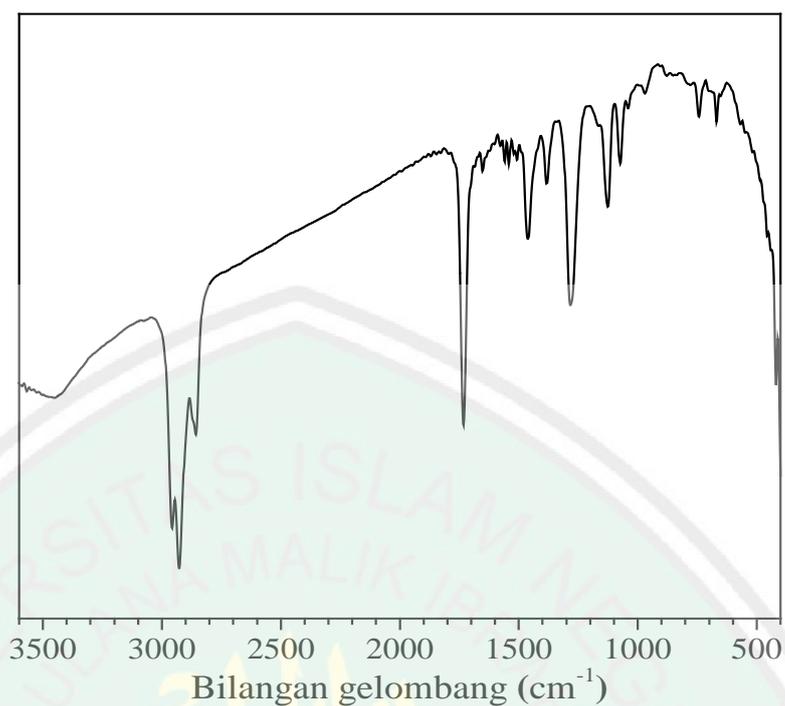
Gambar 4.3 Spektrum UV-Vis isolat steroid K1

Secara berturut-turut panjang gelombang maksimum steroid yang diperoleh sesuai dengan literatur. Fasya (2016 b) mendapatkan panjang

gelombang maksimum dari senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* fraksi petroleum sebesar 276 nm. Serapan 276 nm merupakan representasi kromofor berupa ikatan rangkap terkonjugasi. Ardji (2018) mendapatkan panjang gelombang maksimum 220,5 nm yang menunjukkan ciri khas transisi elektron  $n \rightarrow \pi^*$  untuk senyawa steroid fraksi diklorometana dari batang tanaman andong (*Cordyline frucosa*). Dinasti (2016) mengekstrak senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* dan mendapatkan panjang gelombang maksimum sebesar 204 nm. Etika dan suryelita (2014) mendapatkan panjang gelombang maksimum sebesar 203 nm untuk senyawa steroid dari daun mengkudu fraksi *n*-heksana. Baik 203 maupun 204 nm keduanya merupakan serapan khas dari kromofor berupa ikatan rangkap tak terkonjugasi hasil transisi elektron dari  $\pi \rightarrow \pi^*$ .

#### 4.7 Identifikasi Steroid Menggunakan FTIR

Identifikasi isolat steroid K1 menggunakan FTIR menghasilkan spektrum IR yang ditunjukkan pada Gambar 4.4. Berdasarkan Gambar 4.4 didapatkan serapan: gugus O–H ( $3499 \text{ cm}^{-1}$ ),  $-\text{CH}_2-$  ( $2926$  dan  $2856 \text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{C}=\text{C}(\text{CH}_2)_n$  sebagai representasi dari *exocyclic double bond* ( $1732 \text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{C}=\text{C}$  ( $1652 \text{ cm}^{-1}$ ), geminal dimetil ( $1461$  dan  $1382 \text{ cm}^{-1}$ ) yang merupakan serapan khas steroid, C–H ( $1283 \text{ cm}^{-1}$ ), C–C ( $1125 \text{ cm}^{-1}$ ), dan C–O untuk alkohol sekunder ( $1074 \text{ cm}^{-1}$ ). Interpretasi spektra IR untuk isolat steroid K1 disajikan dalam Tabel 4.3.



Gambar 4.4 Spektrum IR isolat steroid K1

Tabel 4.3 Interpretasi spektra IR isolat steroid K1

Gugus fungsi/ ikatan antar atom	Bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )	Silverstein, dkk. (2005) ( $\text{cm}^{-1}$ )
-OH, ulur	3499	3550-3200
-CH <sub>2</sub> - asimetri	2926	2922
-CH <sub>2</sub> - simetri	2856	2853
C=C(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> , <i>exocyclic double bond</i>	1732	1781
C=C, ulur	1652	1667-1640
-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (geminal dimetil)	1461 dan 1382	1454 dan 1384*
C-H, tekuk, <i>twisting</i>	1283	1350-1150
C-C, ulur	1125	1300-800
C-O, ulur (alkohol sekunder)	1074	1085-1050
C=C-H, <i>bending</i>	969	1000-650
-CH <sub>2</sub> -, <i>rocking</i>	743	~720
C=C-H, <i>bending</i>	668	1000-650

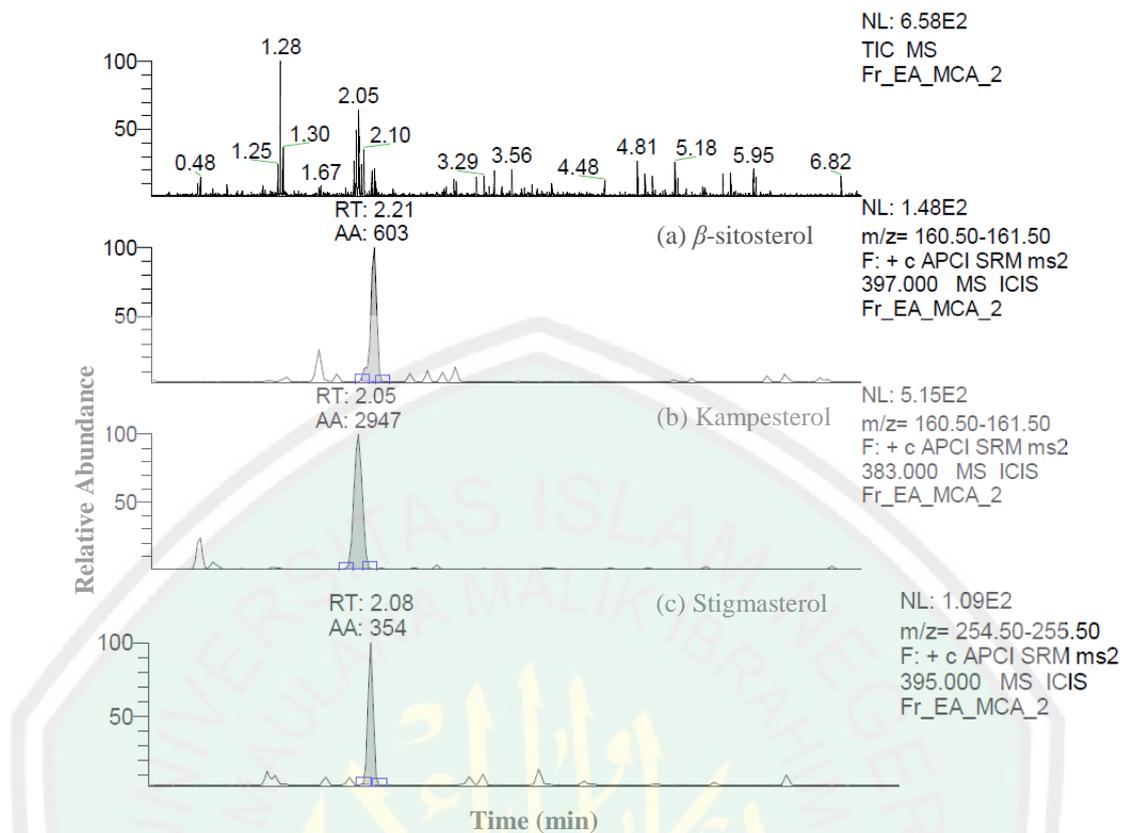
Keterangan: \*Suryani (2011)

#### 4.8 Identifikasi Steroid Menggunakan LC-MS/MS

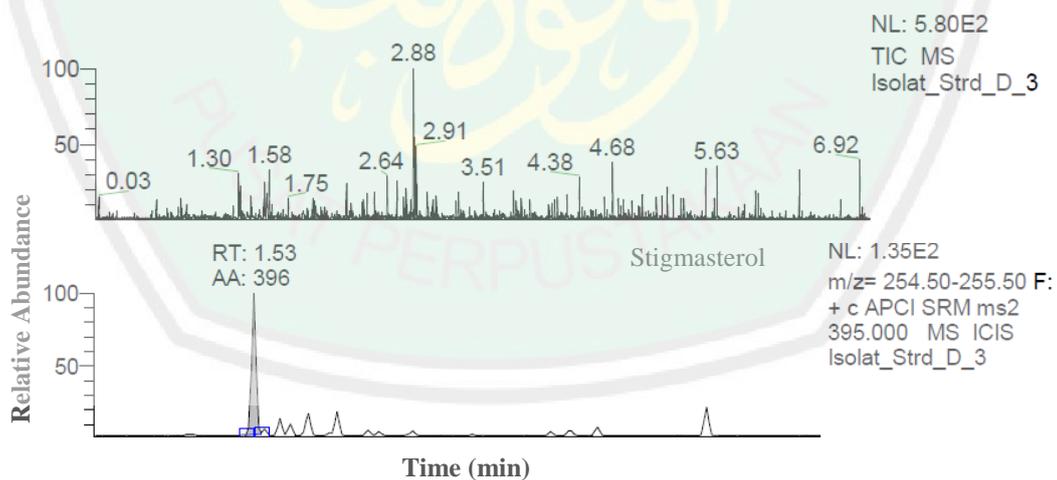
Fraksi hasil partisi dengan etil asetat dan isolat hasil pemisahan dengan kromatografi kolom mikroalga *Chlorella sp.* dianalisa menggunakan LC-MS/MS untuk mengetahui jenis senyawa steroid yang berhasil dipisahkan. Jenis senyawa steroid yang ditargetkan berupa  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, kampesterol, fukosterol, desmosterol, dan kolesterol. Spektra massa fraksi etil asetat ditampilkan pada Gambar 4.5, sedangkan Gambar 4.6 menunjukkan spektra massa untuk isolat steroid K1.

Berdasarkan Gambar 4.5 didapatkan senyawa steroid jenis  $\beta$ -sitosterol, kampesterol, dan stigmasterol dengan waktu retensi berturut-turut 2,21 menit, 2,05 menit, dan 2,08 menit. Luas puncak senyawa menandakan kelimpahan setiap senyawa yang berhasil dideteksi. Luas area paling luas dimiliki oleh kampesterol, kemudian  $\beta$ -sitosterol, dan terakhir stigmasterol, sehingga urutan kelimpahan secara berturut-turut ialah kampesterol >  $\beta$ -sitosterol > stigmasterol.

Gambar 4.6 menunjukkan hanya satu dari enam jenis senyawa target steroid yang berhasil dideteksi, yakni stigmasterol yang muncul pada waktu retensi 1,53 menit. Pemisahan dengan kromatografi kolom menyebabkan pemisahan jenis senyawa steroid menjadi lebih spesifik, karena hanya dihasilkan satu dari empat jenis senyawa steroid yang sebelumnya muncul di fraksi. Pengaturan tingkat kepolaran yang dilakukan pada saat pemisahan menggunakan kromatografi kolom sistem gradien eluen mempunyai tingkat kepolaran yang sama dengan tingkat kepolaran yang dimiliki oleh senyawa steroid jenis stigmasterol.

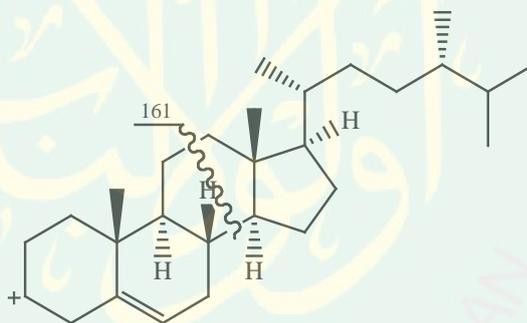


Gambar 4.5 Spektra massa fraksi etil asetat dengan senyawa steroid jenis (a)  $\beta$ -sitosterol, (b) Kampesterol, dan (c) Stigmasterol

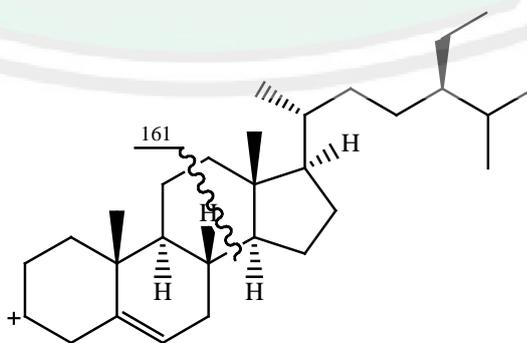


Gambar 4.6 Spektra massa isolat steroid K1 dengan senyawa steroid jenis stigmasterol

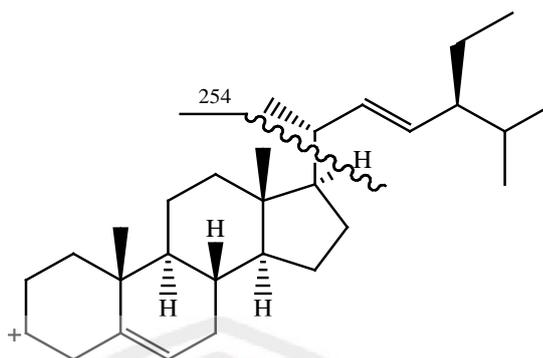
Senyawa steroid yang diionisasi dapat menghasilkan ion prekursor atau massa induk (*parent mass*) yang dideteksi dalam bentuk  $[M-H_2O+H^+]$ . Ion  $[M-H_2O+H^+]$  merupakan *base peak* dari spektra massa jenis sumber ion APCI mode positif yang menerangkan terlepasnya molekul air senyawa target yang telah terprotonasi (Mo, dkk., 2013). Ion prekursor (*parent mass*) terpecah menjadi ion produk atau massa anak (*daughter mass*) dengan nilai  $m/z$  yang lebih kecil. Massa anak yang dihasilkan akibat adanya fragmentasi akan terdeteksi sebagian dari massa induk. Pemecahan ion prekursor menjadi ion produk ditunjukkan oleh Gambar 4.7 untuk kampesterol, 4.8 untuk  $\beta$ -sitosterol, dan 4.9 untuk stigmasterol. Interpretasi spektra massa dengan ion prekursor dan ion produk untuk fraksi dan isolat ditunjukkan pada Tabel 4.4 dan 4.5.



Gambar 4.7 Pemecahan ion prekursor menjadi ion produk pada kampesterol (Mo, dkk., 2013)



Gambar 4.8 Pemecahan ion prekursor menjadi ion produk pada  $\beta$ -sitosterol (Mo, dkk., 2013)



Gambar 4.9 Dugaan pemecahan ion prekursor menjadi ion produk pada stigmasterol

Tabel 4.4 Interpretasi spektra massa fraksi etil asetat

Jenis Steroid	Waktu Retensi (menit)	Massa Molekul (g/mol)	Hasil penelitian		Literatur	
			Massa Ion Prekursor [M-H <sub>2</sub> O+H <sup>+</sup> ] (m/z)	Massa Ion Produk (m/z)	Massa Ion Prekursor [M-H <sub>2</sub> O+H <sup>+</sup> ] (m/z)	Massa Ion Produk (m/z)
Kampesterol	2,05	400	383	160,5-161,5	383,4*	161*
$\beta$ -Sitosterol	2,21	414	397	160,5-161,5	397*	161*
Stigmasterol	2,08	412	395	254,50-255,5	395,*	254-255**

Keterangan: \* Mo, dkk. (2013)  
\*\* Mardaneni (2017)

Tabel 4.5 Interpretasi spektra LC-MS/MS isolat steroid K1

Jenis Steroid	Waktu Retensi (menit)	Massa Molekul (g/mol)	Hasil penelitian		Literatur	
			Massa Ion Prekursor [M-H <sub>2</sub> O+H <sup>+</sup> ] (m/z)	Massa Ion Produk (m/z)	Massa Ion Prekursor [M-H <sub>2</sub> O+H <sup>+</sup> ] (m/z)	Massa Ion Produk (m/z)
Stigmasterol	1,53	412	395	254,5-255,5	395*	254-255**

Keterangan: \*Mo, dkk. (2013)  
\*\*Mardaneni (2017)

#### 4.8 Pemanfaatan Mikroalga Sebagai Antioksidan dalam Perspektif Islam

Penelitian mengenai isolasi senyawa steroid yang terdapat dalam mikroalga *Chlorella sp.* dalam upaya pemanfaatannya sebagai antioksidan merupakan salah satu bentuk *ikhtiar* yang dilakukan dalam usaha untuk mentadabburi ayat-ayat kauniyah Allah SWT. Sebagaimana firman Allah SWT dalam surat al-An'am ayat 99 mengenai turunnya air hujan yang digunakan untuk menumbuhkan tumbuh-tumbuhan hijau. Tumbuhan tersebut menghasilkan buah yang beberapa diantaranya disebutkan dalam hadits Nabi SAW mengenai keutamaan dan manfaatnya, serta adanya beberapa penelitian yang mendukung mengenai pemanfaatan buah tersebut. Selain beberapa tumbuhan penghasil buah yang telah disebutkan dalam surat al-An'am ayat 99, yakni kurma, anggur, zaitun, dan delima terdapat tumbuhan lain yang juga mempunyai manfaat untuk manusia. Tumbuhan tersebut ialah mikroalga *Chlorella sp.*

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan senyawa yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* berupa steroid berhasil diisolasi dan diuji aktivitasnya sebagai antioksidan. Meskipun hasil uji memberikan hasil bahwa potensi antioksidan steroid mikroalga *Chlorella sp.* sangat kecil, akan tetapi penelitian yang dilakukan dapat menjadi salah satu usaha pembuktian bahwa tumbuhan yang diciptakan Allah SWT mempunyai manfaat (bukan merupakan sebuah kesia-siaan) dan kandungan senyawa lainnya seperti triterpenoid yang belum diuji dalam penelitian ini dapat menjadi bahan eksplorasi tumbuhan untuk penelitian selanjutnya dalam rangka pengembangan penelitian dan ilmu pengetahuan.

## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil pemisahan steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan kromatografi kolom sistem gradien eluen menghasilkan 4 fraksi tunggal, satu fraksi steroid dan tiga fraksi triterpenoid.
2. Isolat steroid hasil dari kromatografi kolom fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* mempunyai aktivitas antioksidan terhadap DPPH sebesar 989.539 ppm.
3. Hasil identifikasi isolat steroid K1 menggunakan spektrofotometer UV-Vis menghasilkan serapan pada panjang gelombang 275,0; 222,0; 205,0; dan 202,0 nm. Hasil dari analisa menggunakan FTIR didapatkan serapan gugus O-H, -CH<sub>2</sub>-, C=C(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, C=C, geminal dimetil, dan C-O untuk alkohol sekunder. Identifikasi menggunakan LC-MS/MS pada fraksi etil asetat menghasilkan jenis senyawa steroid berupa kampesterol,  $\beta$ -sitosterol, dan stigmasterol dengan kelimpahan terbanyak berupa kampesterol, sedangkan identifikasi pada isolat hasil kolom menghasilkan jenis senyawa steroid berupa stigmasterol.

## 5.2 Saran

Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai potensi antioksidan senyawa steroid dari mikroalga *Chlorella sp.* yang berasal dari fraksi lain dengan metode isolasi yang sama. Selain itu, fokus untuk penelitian selanjutnya mengenai uji lanjutan hasil isolasi menggunakan kromatografi kolom basah sistem gradasi eluen diharapkan agar menjadikan triterpenoid sebagai senyawa target karena potensi untuk menghasilkan fraksi tunggal yang banyak lebih besar. Diharapkan bagi para peneliti yang mengidentifikasi senyawa menggunakan instrumen LC-MS/MS untuk dapat mempresentasikan setiap senyawa pada kromatogram total yang terdapat dalam spektra massa LC-MS/MS.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adnan, M. 1997. *Teknik Kromatografi untuk Analisis Bahan Makanan*. Yogyakarta: Andi.
- Ad-dimasyqi, Al-Imam Abul Fida Isma'il Ibnu Katsir. 2005. *Tafsir Ibnu Katsir*. Bandung: Sinar Baru Algensindo.
- Al-Asqalani, Ahmad Ibn Ali Ibn Hajar. 2000. *Fath al-Bârî bi Syarh Shahih al-Bukhârî*. Bairut: Dâr al-Fikr.
- Al-Mahalli, Imam Jalaluddin dan Imam Jalaluddin as-Suyuthi. 1997. *Tafsir Jalalain*. Bandung: Sinar Baru Algensindo Offset.
- Amini, Sri. 2011. Kandungan Minyak Mikroalga Jenis *Tetraselmis sp.* dan *Chlorella sp.* Berdasarkan Umur Pertumbuhannya. Di dalam: Seminar Forum Inovasi Teknologi Akuakultur. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur 2011*; Jakarta 2011. Jakarta: Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. Halaman 1133-1138.
- Anggraeni, Ony Novia, Fasya, A. G., 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*, 2 (3): 173-188.
- Atun, S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Kimia*, 8 (2): 53-61.
- Azah, Shofia Ning. 2018. Uji Toksisitas dan Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLTP Ekstrak *n*-Heksana dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata* menggunakan UV-Vis dan LC-MS/MS. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Badarinath A., Rao K., Chetty CS, Ramkanth S, Rajan T, & Gnanaprakash K. 2010. A Review on In-vitro Antioxidant Methods : Comparisons, Correlations, and Considerations. *International Journal of PharmTech Research*, 1276-1285.
- Bariyyah, Siti Khairul, Fasya, A. G., 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 Tuauge. *Alchemy*, 2 (3): 150-204.
- Becker. 1994. *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. London: Cambridge University Press.

- Bold, H. C., dan Wynne, M. J. (1985). *Introduction to the algae: Structure and Reproduction*. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice-Hall.
- Cahyadi, W. 2006. *Kedelai: Khasiat dan Teknologi*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Cannell, R.J.P. 1998. *Natural Product Isolation*. Totowa: Humana Press.
- Dalil, Fitri Yeni M. 2016. Hadis-hadis Tentang Farmasi; Sebuah Kajian Integratif dalam Memahami Hadis Rasulullah. *Batusangkar International Conference I*.
- Darmawan, A. dan Artanti, Nina. 2006. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif Antioksidan dari Ekstrak Air Daun Benalu yang Tumbuh pada Cemara (*Casuarina sp.*). *Kapita Selekta Widyariset LIPI*, 9 (3): 43-52.
- Dinasti, Anike Riska. 2016. Isolasi dengan KLTP dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.* *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Diniatik, Suparman, Anggraeni, D., dan Amar, I. 2016. Uji Antioksidan Ekstrak Etanol Daun dan Kulit Batang Manggis *Garcinia mangostana L.* *Pharmachiana*, 6 (1): 21-30.
- Etika, Sri Benti, dan Suryelita. 2014. Isolasi Steroid dari Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia L.*). *Eksakta*, 1 Tahun XV: 60-65.
- Fasya, A. Ghanaim, 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.
- Fasya, Ahmad Ghanaim, Dinasti, A. R., Syofiyah, M., Rahmawati, L. M., Millati, N., Safitri, D. A., Handoko, S., Hanapi, A., dan Ningsih, R. 2016 a. Ekstraksi, Hidrolisis, dan Partisi Metabolit Sekunder dari Mikroalga *Chlorella sp.* *Alchemy*, 5 (1): 5-9.
- Fasya, Ahmad Ganaim. 2016 b. Potensi Antikanker dan Antionksidan serta Idetifikasi Isolat Steroid mikroalga *Chlorella sp.* *Laporan Penelitian Kompetitif Individual*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik brahim.
- Findryani, Luthfi Fitri. 2016. Isolasi Dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa dalam Ekstrak Etanol Temu Kunci (*Boesenbergia Pandurata*) dengan Metode DPPH. *Skripsi*. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta.
- Fu, Rongjie, Zhang, Z., Lin, Z., nang, W., Chan, J., dan Bivens, A.. 2019. LC/MS/MS Separation of Cholesterol and Related Sterols in Plasma

on an Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 Column. *Application Note Clinical Research*: 1-8.

- Hanani, E., Abdul, M., dan Ryany, S. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia sp.* dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 2 (3): 127-133.
- Handoko, D.S.P. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam Sebagai Katalis. *Sigma*, Jember: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember.
- Handoko, Singgih. 2016. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter (PE) Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Metode Kromatografi Kolom Pembuatan Fase Diam Cara Basah dan Kering. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Hayani, Eni. 2017. Pemisahan Komponen Rimpang Temu Kunci Secara Kromatografi Kolom. *Buletin Teknik Pertanian*, 12 (1): 35-37.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: Penerbit ITB.
- Hewlett, P. 2001. Basics of LC/MS Agilent Technologies, 1-36. DOI 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Hidayah, Wihda Wihdatul, Kusriani, D., dan Fachriyah, E. 2016. Isolasi, Identifikasi Senyawa Steroid dari Daun Getih-Getihan (*Rivina humilis* L.) dan Uji Aktivitas sebagai Antibakteri. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 19 (1): 32-37.
- Ilyas, Asriani, Novianty, I., dan 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 Sterois Faksi 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.
- Iyani, Roikhatul. 2017. Variasi Rasio Sampel Terhadap Silika Gel pada Pemisahan Steroid dan Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Khopkar, S.M. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.

- Krisna, I Gusti Agung Putu Surya Adi, Santi, S.R., dan Rustini, N.L. 2014. Senyawa Steroid pada Daun Gayam (*Inocarpus fagiferus* Fosb) dan Aktivitasnya Sebagai Antioksidan Terhadap Difenilpicril Hidrazil (DPPH). *Kimia*, 8 (2): 251-256.
- Kristanti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M., dan Kurniadi, B. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Kumalasari, Diah, 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, Kusmiyati, Aznam, Nurfina, dan Handayani, Sri. 2011. Isolasi dan Identifikasi Zat Aktif Ekstrak Metanol Rimpang Kunyit Putih (*Curcuma mangga* Val) Fraksi Etil Asetat. *Pharmaciana*, 1 (2).
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q., dan Dubois-Calero, N. 2008. Biofuels from Microalgae. *Journal of Biotechnol*, 24 (4).
- Lin, An-Shen, Engel, S., Smith, B.A., Fairchild, C.R., Aalbersberg, W., Hay, M.E., dan Kubanek, J. 2010. Structure and Biological Evaluation of Novel Cytotoxic Sterol Glycosides from The Marine Red Alga *Peyssonnelia sp.* *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18. 8264-8269.
- Lisdawati, V., dan Broto. 2006. Aktivitas antioksidan dari berbagai fraksi ekstrak daging buah dan kulit biji mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*). *Artikel Media Litbang Kesehatan*, 16 (4).
- Mardaneni, Isma. 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: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Mardiyah, U. 2012. Ekstraksi Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Meydani, M. 2000. Effect of Functional Food Ingredient: Vitamin E Modulation of Cardiovascular Diseases and Immune Status in The Elderly. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71 (6): 1665S.
- Molyneux, P. 2003. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH), for Estimating Antioxidant Activity. *Science and Technology*, 26 (2): 211-219.

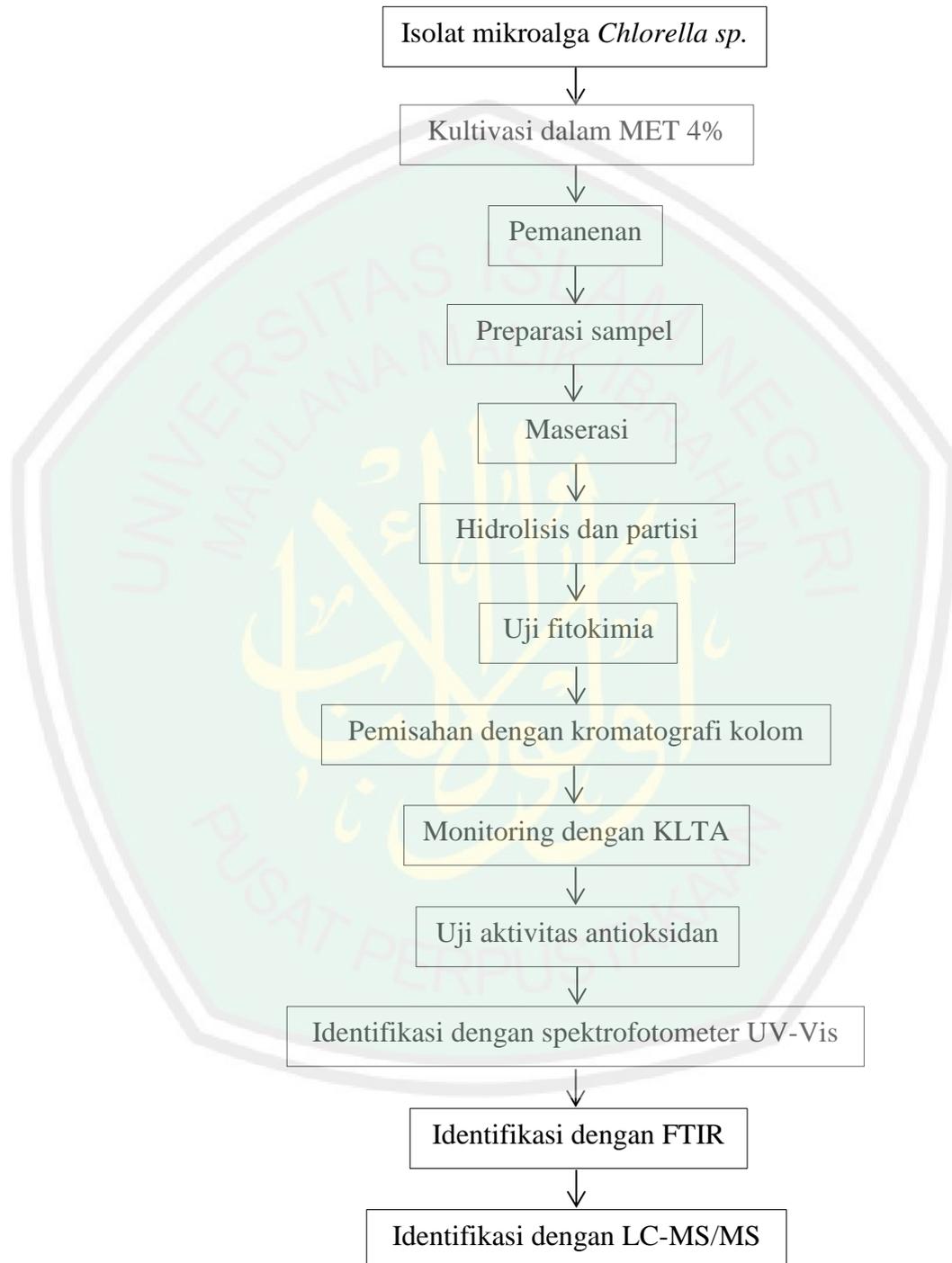
- Nogrady, T. 1992. *Kimia Midisinal*. Bandung: Penerbit ITB.
- Palleros, D.R. 2000. *Experimental Organic Chemistry*. New York: John Willey and Sons.
- Panji, T. 2012. *Teknik Spektroskopi untuk Elusidasi Struktur Molekul*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Poedjiadi, A. dan Supriyanti. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Prihantini, N.H., Putri B., dan Yuliati R. 2005. Pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam Media Ekstrak Tauge (MET) dengan variasi pH Awal. *Jurnal Makara Sains*, Vol. 9 (1):1-6.
- Qutb, Sayyid. 2004. *Tafsir Fii Zhilalil Qur'an Jilid 8*. Jakarta: UI Press.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: ITB.
- Rostini, I. 2007. Kultur Fitoplankton (*Chlorella sp.* dan *Tetraselmis chuii*) pada Skala Laboratorium. *Skripsi*. Jatinangor: Universitas Padjajaran.
- Sakdiyah, Halimatus. 2017. Pemisahan Senyawa Triterpenoid dan Steroid Fraksi Etil Asetat Alga Merah (*Euchema spinosum*) Menggunakan Kromatografi Kolom Basah dengan Variasi Ukuran Kolom. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Santoni, Adlis, Sabariah, dan Efdi, M. 2015. Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Triterpenoid dari Kulit Batang Ambacang (*Mangifera Foetida L.*) Serta Uji Brine Shrimp Letality Test (BSLT). *Jurnal Riset Kimia*, 9 (1):1-8.
- Satuhu, S. 2010. *Kurma, Kasiat dan Olahannya Edisi I*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Sayuti, Kesuma dan Yenrina, Rina. 2015. *Antioksidan, Alami dan Sintetik*. Padang: Andalas University Press.
- Scout, Paymond P.W. 1995. *Techniques and Practice of Chromatography*. USA: Marcel Dekker Inc. 27-65, 284-287.
- Setyaningsih, Iriani. 1999. Ekstraksi dan Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Chlorella sp.* *Buletin THP*, 17 (1).
- Shihab, Quraisy. 2001. *Tafsir Al-Misbah: Pesan, Kesan, dan Kelestarian Al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati.

- Silverstein, R.M., Webster, F. X., dan Kiemle, D.J. 2005. *Spectrometric Identification of Organic Compounds Seventh Edition*. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Simaremare, Ava Susanty. 2011. Skrining Fitokimia Ekstrak Etano; Daun Gatal (*Laportea decumana* (Roxb.) Wedd). *Pharmacy*, 11 (1): 98-107.
- Sudjijo. 2014. *Sekilas Tanaman Delima dan Manfaatnya*. Sumatera Barat: Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika.
- Sulastry, Taty, dan Kurniawati, Nilam. 2010. Isolasi Steroid dari Ekstrak Metanol daun Bluntas (*Plucea Indica L*). *Chemica*, 11 (1): 52-56.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., dan Dolan, J.W. 2010. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 24-30.
- Soebahar, Moh. Erfan, R. Arizal Firmansyah, dan I. Edi Daenuri Anwar. 2015. Mengungkap Rahasia Buah Kurma dan Zaitun dari Petunjuk Hadits dan Penjelasan Sains. *Ulul Albab*, 16 (2): 191-214.
- Supratman, U. 2010. *Elusidasi Struktur Senyawa Organik*. Bandung: Widya Padjajaran.
- Suryani, E. 2011. Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Triterpenoid dari Ekstrak Etil Asetat Kulit Batang Tumbuhan Kecapi (*Sandoricum koetjapi* Merr). *Artikel*. Universitas Andalas Padang.
- Tamat, S.R, Wikanta, T., Maulina, L. S. 2007. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Rumpun Laut Hijau *Ulva reticulata* Forsskal. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 5(1): 31-36.
- Tisnadjaja, Dradjat, Hidayat, S. L., Sumirja, S., dan Simanjuntak, P. 2006. Pengkajian Kandungan Fitosterol pada Tanaman Kedawung (*Parkia roxburgii* G. Don). *Biodiversitas*, 7 (1): 21-24.
- Tonius, Joly, Wibowo, M.A., dan Idiawati, N. 2016. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Steroid Fraksi *n*-heksana Daun Buas-buas (*Premna serratifolia* L.). *JKK*, 5 (1): 1-7.
- Tristantini, Dewi, Ismawati, A., Pradana, B. T., dan Jonathan, J. G. 2016. Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH pada Daun Tanjung (*Mimusops elengi* L). *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "Kejuangan" Pengembangan Teknologi Kimia untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia*, Yogyakarta ISSN 1693-4393.
- Underwood, A. L. dan Day. 1980. *Analisis Kimia Kuantitatif Ed ke-4*. Jakarta: Erlangga.

- Uppu, R.M, Murthy, S.N., Pryor, W.A., dan Parinandi, N.L. 2010. *Free Radical and Antioxidant Protocols*. New York: Humana Press.
- Vashista, B.R. 1999. *Botany for Degree Students: Algae*. New Delhi: S. Chand & Company Ltd.
- Vaya, Jacob dan Aviram, Michael. 2001. Nutritional Antioxidants: Mechanisms of Action, Analyses of Activities and Medical Applications. *Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endorine and Metabolic Agents*, 1 (1).
- Wahdaningsih, Sri, Setyowati, E.P., dan Wahyuono, S. 2011. Aktivitas Penangkap Radikal Bebas dari Batang Pakis (*Alsophila Glauca J. Sm.*). *Majalah Obat Tradisional*, 16 (3).
- Wenno, Max R., Purbosari, N., dan Thenu, J.L. 2010. Ekstraksi Senyawa Antibakteri dari *Chlorella sp.* *Jurnal Penelitian Terapan*, 10 (2): 131-137.
- Wulandari, A.P., Frida N., Annisa E.P., dan Dilaekha R.P. 2010. Identifikasi Mikroalga di Sekitar Pantai Pangandaran dan dan Potesi Pertumbuhan pada Formulasi Medium Ekstrak Tauge (MET). *Prosiding Seminar Nasional Limnologi V*.

## LAMPIRAN

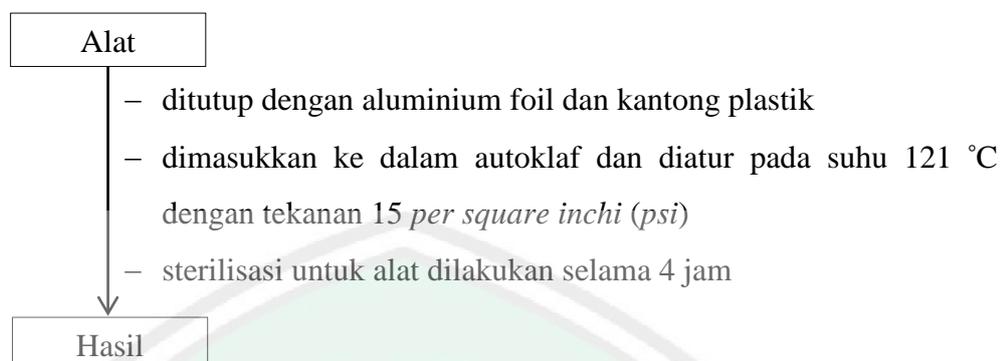
### Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian



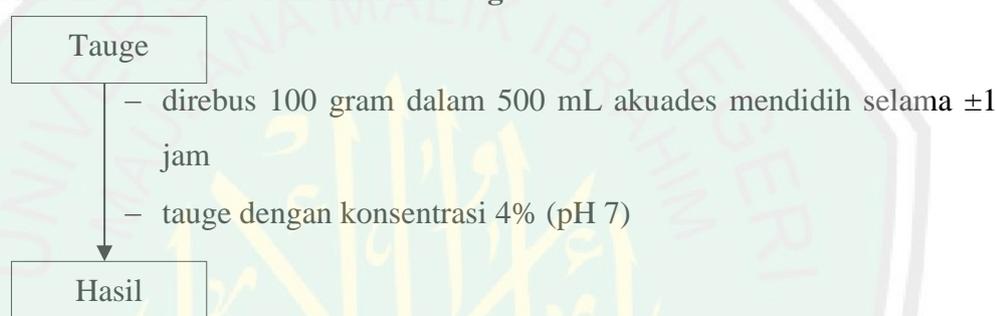
## Lampiran 2. Diagram Alir

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

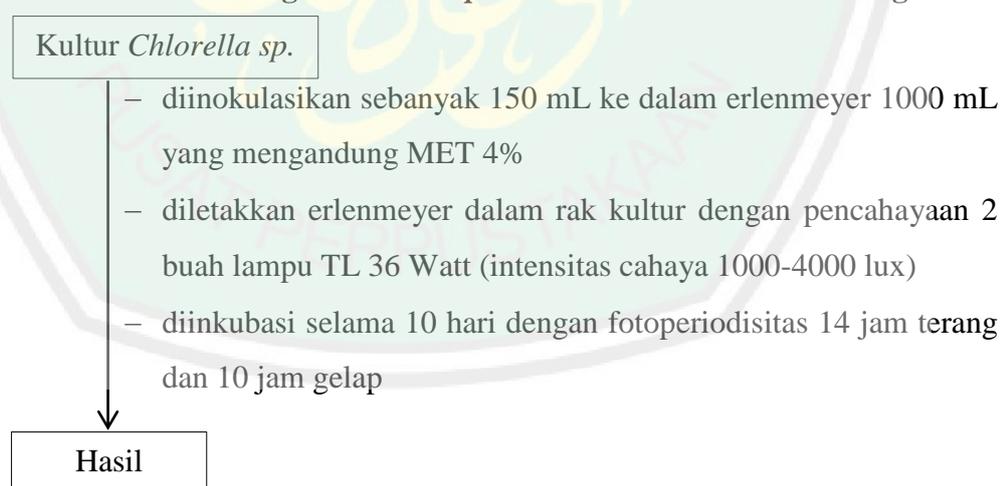
#### L.2.1.1 Sterilisasi alat



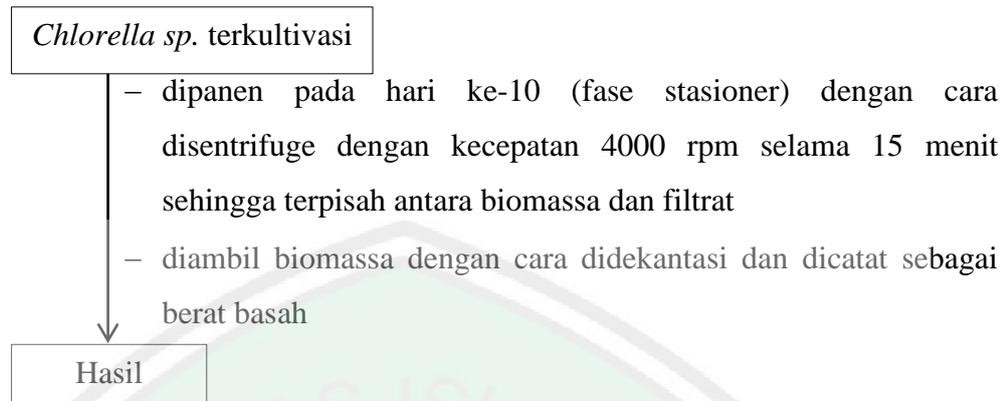
#### L.2.1.2 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge 4%



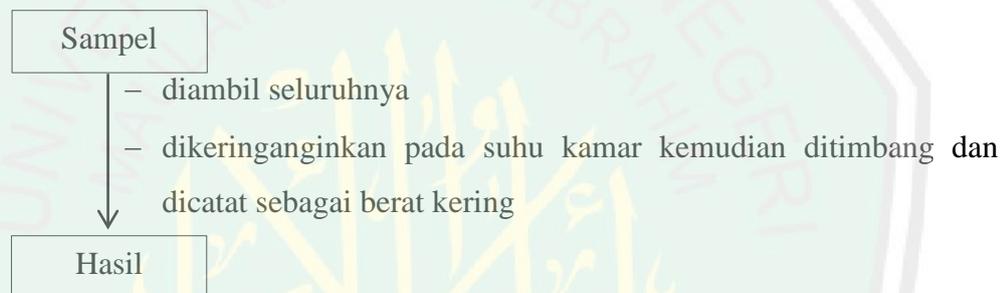
#### L.2.1.3 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge 4%



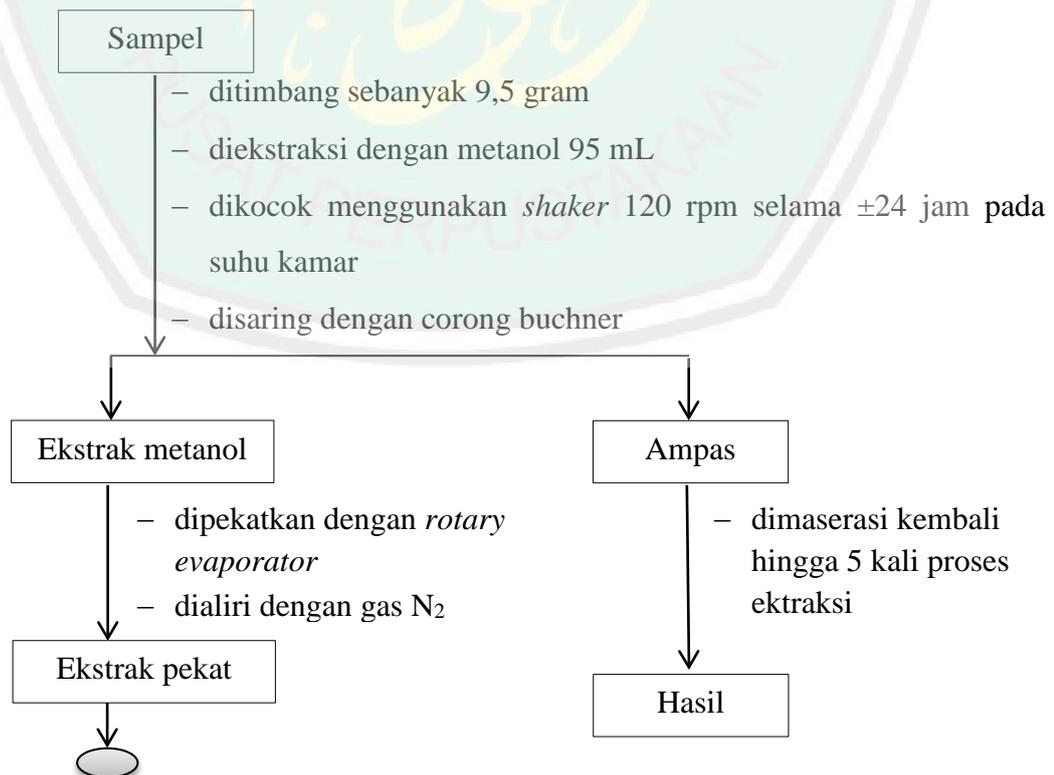
#### L.2.1.4 Pemanenan Mikroalga *Chlorella sp.*

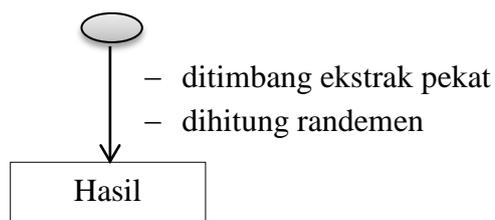


#### L.2.2 Preparasi Sampel

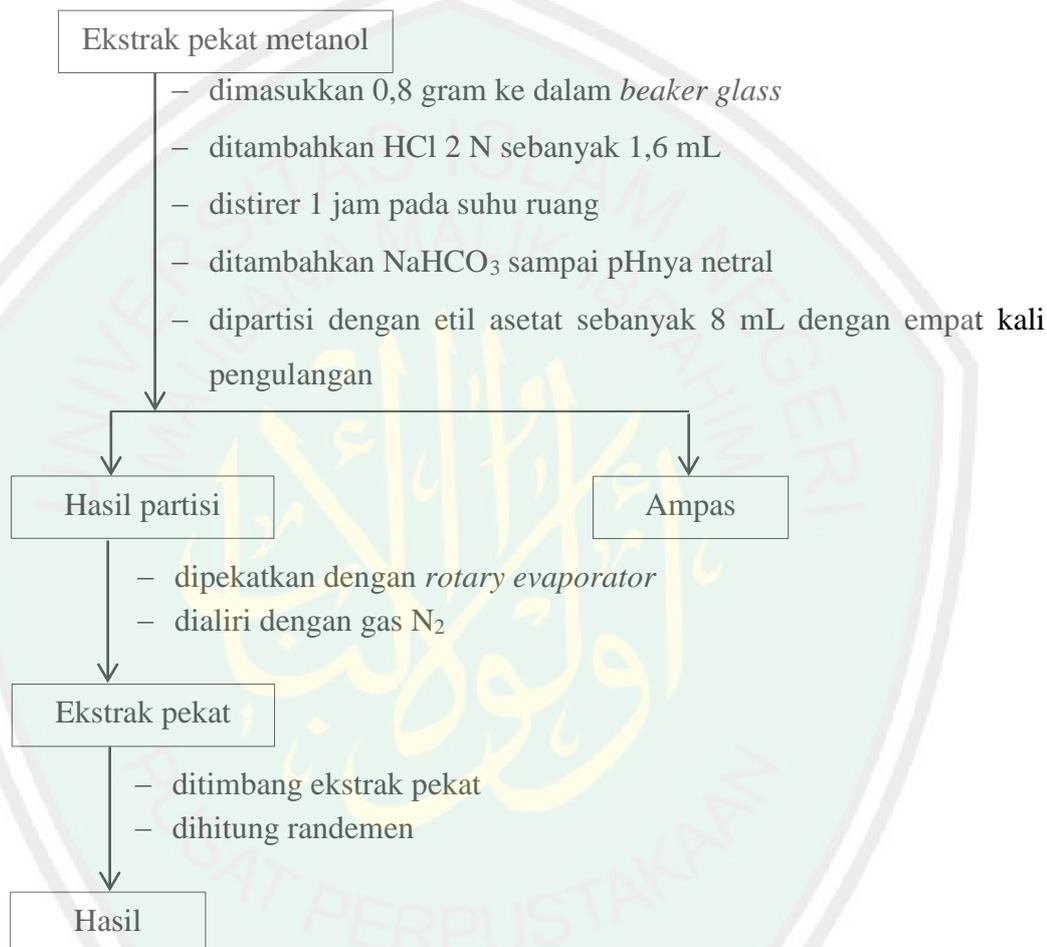


#### L.2.3 Ekstraksi Maserasi Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

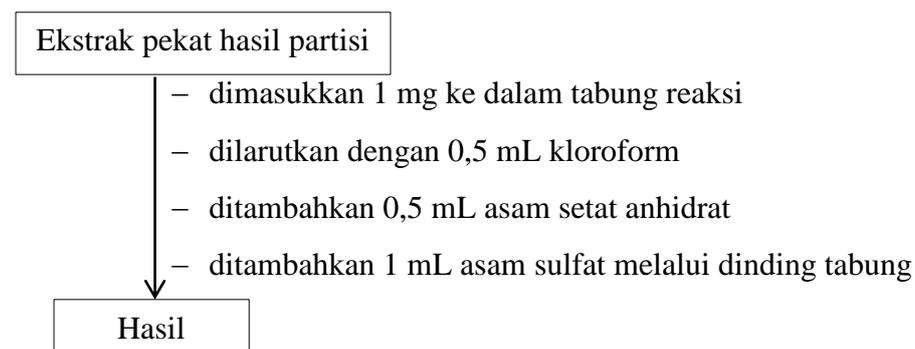




#### L.2.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*



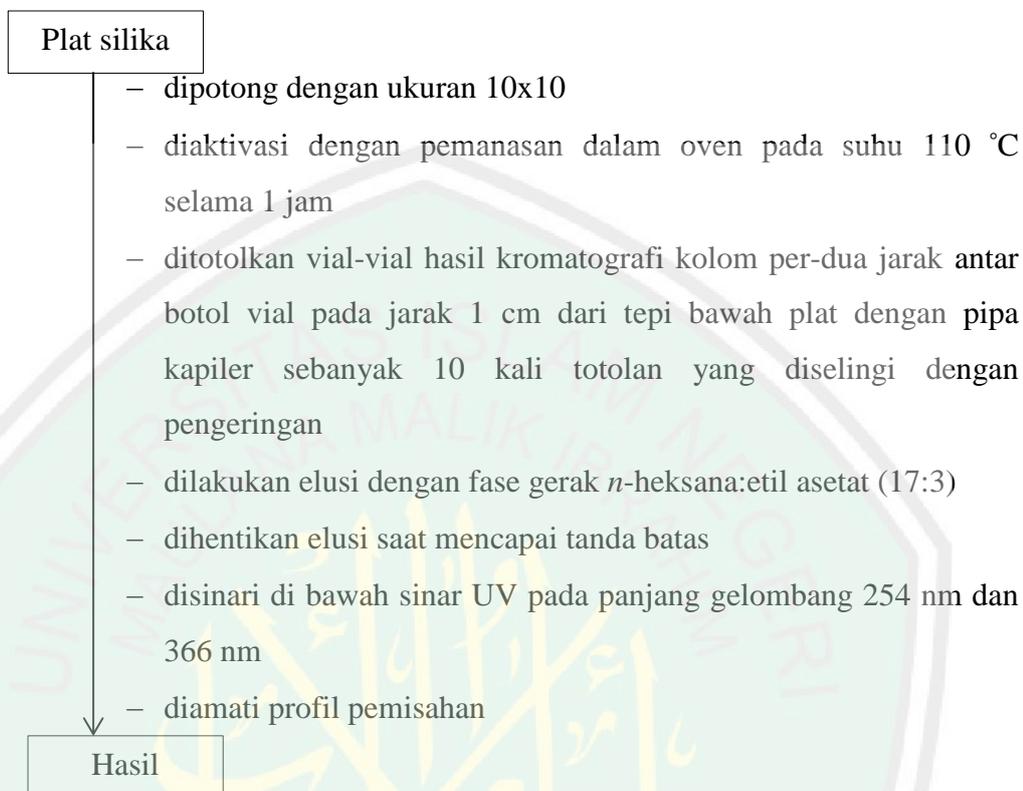
#### L.2.5 Uji Fitokimia Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat



### L.2.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom Basah

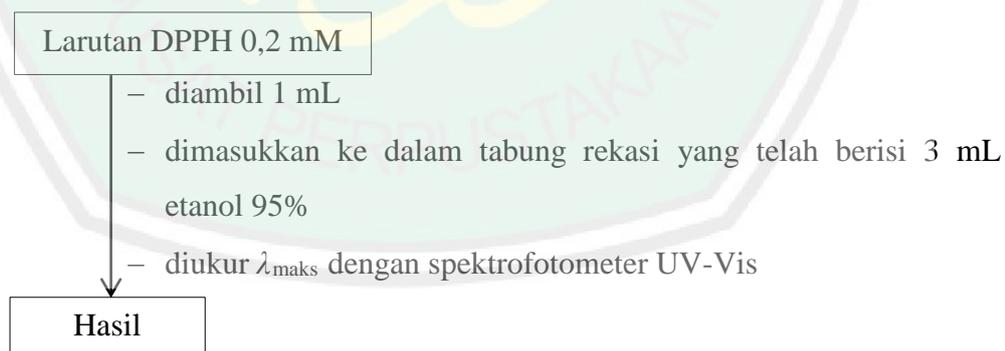


### L.2.7 Monitoring Senyawa Steroid Menggunakan KLTA

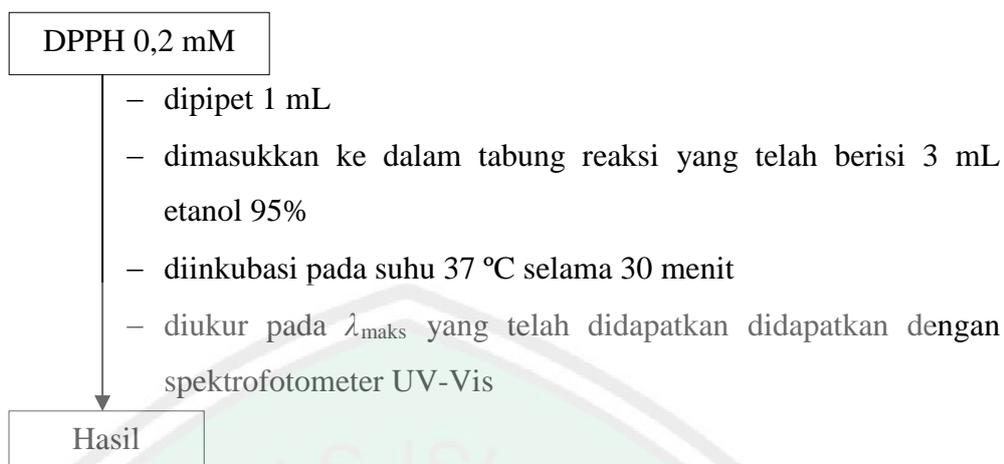


### L.2.8 Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

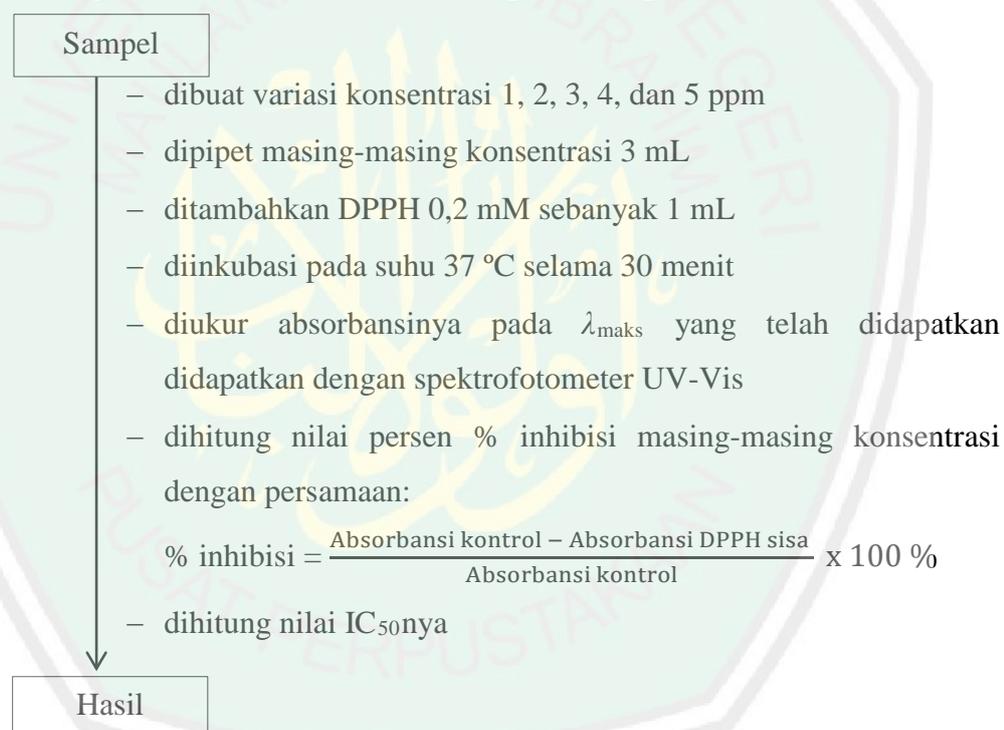
#### L.2.8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH



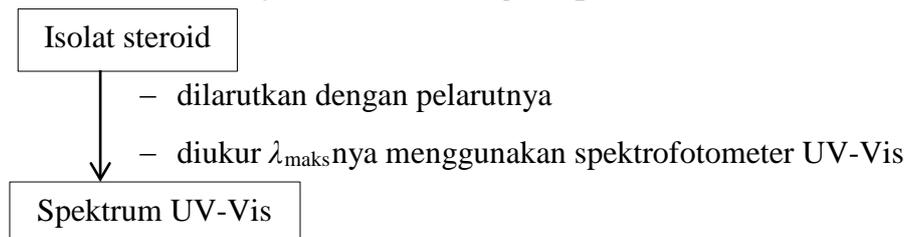
### L.2.8.2 Absorbansi Kontrol



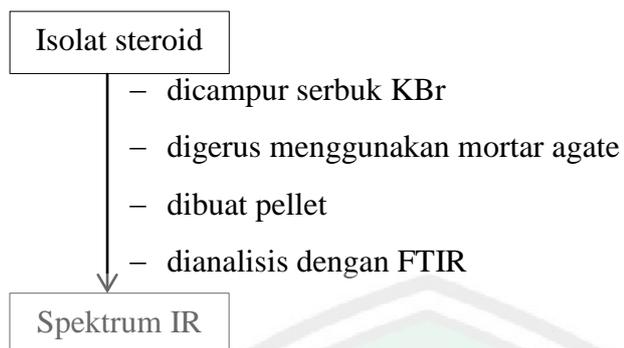
### L.2.8.3 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel



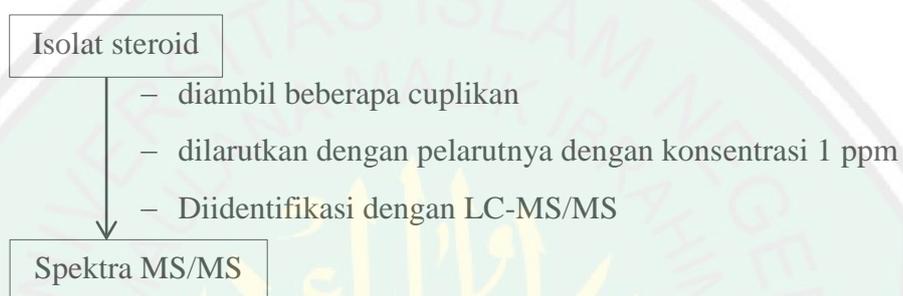
### L.2.9 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis



### L.2.10 Identifikasi Senyawa Steroid dengan FTIR



### L.2.11 Identifikasi Jenis Senyawa Steroid dengan LC-MS/MS



**Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Reagen**  
**L.3.1 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam MET 4%**

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

- a. Kultivasi dalam Erlenmeyer 1000 mL dengan memaksimalkan daya tampung

Erlenmeyer

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

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

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

$$\text{Volume total} = \text{Isolat } \textit{Chlorella sp.} + \text{MET 4\%}$$

$$= 150 \text{ mL} + 900 \text{ mL}$$

$$= 1050 \text{ mL}$$

- b. Pembuatan MET 4% sebanyak 900 mL

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

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

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

$$\text{Volume Akuades} = \text{MET 4\%} - (\text{Volume ekstrak tauge})$$

$$= 900 \text{ mL} - 36 \text{ mL}$$

$$= 864 \text{ mL}$$

- c. Kultivasi dalam botol 1500 mL dengan memaksimalkan daya tampung botol

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

$$60x = 1200 \text{ mL}$$

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

$$\text{Volume total} = \text{Isolat } \textit{Chlorella sp.} + \text{MET 4\%}$$

$$= 200 \text{ mL} + 1200 \text{ mL}$$

$$= 1400 \text{ mL}$$

d. Pembuatan MET 4% sebanyak 1200 mL

MET = (akuades + ekstrak tauge)

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

$$= 48 \text{ mL ekstrak tauge}$$

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

$$= 1200 \text{ mL} - 48 \text{ mL}$$

$$= 1152 \text{ mL}$$

### L.3.2 Pembuatan Larutan HCl 2 N

Pembuatan larutan HCl 2 N dapat dilakukan dengan menggunakan persamaan L3.1.

- Berat jenis larutan HCl pekat = 1,19 g/mL = 1190 g/L
- Konsentrasi HCl = 37%
- Berat Molekul HCl = 36,46 g/mol
- $n = 1$  (jumlah ion  $\text{H}^+$ )

Normalitas HCl =  $n \times \text{Molalitas HCl}$  ..... (L.3.1)

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

$$= 1 \times \frac{37 \% \times 1190 \text{ g/L}}{36,46 \text{ g/mol}} = 12,08 \text{ N}$$

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

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

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

Prosedur pembuatannya adalah diambil larutan HCl pekat 37% sebanyak 16,6 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL yang berisi  $\pm 20$  mL akuades. Selanjutnya ditambah akuades sampai tanda batas lalu dihomogenkan.

### L.3.3 Pembuatan larutan $\text{NaHCO}_3$

Sebanyak 9,9 gram natrium bikarbonat dilarutkan dengan akuades dalam gelas kimia. Kemudian dimasukkan dalam labu takar 100 mL, ditambah akuades sampai tanda batas lalu ditandabtaskan dan dihomogenkan.

### L.3.4 Pengujian Aktivitas Antioksidan

#### L.3.4.1 Pembuatan Larutan DPPH 0,2 mM

DPPH 0,2 mM dalam etanol 95% sebanyak 20 mL larutan

$$\begin{aligned} \text{Mr DPPH} &= 394,33 \text{ g/mol} \\ &= 394,33 \text{ mg/mmol} \end{aligned}$$

$$\text{Mol DPPH} = 20 \text{ mL} \times 0,2 \text{ mM}$$

$$= 20 \text{ mL} \times \frac{0,2}{1000} \text{ M}$$

$$= 0,004 \text{ mmol}$$

$$\text{mg DPPH} = 0,004 \text{ mmol} \times \text{Mr DPPH}$$

$$= 0,004 \text{ mmol} \times 394,33 \text{ mg/mmol}$$

$$= 1,6 \text{ mg}$$

Prosedur pembuatannya adalah ditimbang DPPH sebanyak 1,6 mg (0,0016 gram) dalam gelas beker dan dilarutkan dalam etanol 95%. Selanjutnya DPPH dimasukkan dalam labu ukur 20 mL dan dihomogenkan setelah sebelumnya ditandabataskan dengan etanol 95%.

### L.3.4.2 Pengukuran Potensi Antioksidan pada Sampel

#### L.3.4.2.1 Pembuatan Larutan Stok Sampel 390 ppm dalam 10 mL Pelarut

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

$$390 = \frac{\text{mg}}{0,001 \text{ L}}$$

$$\text{mg} = 3,9$$

Jadi, untuk membuat larutan stok dengan konsentrasi 390 ppm sebanyak 10 mL diperlukan isolat sebanyak 3,9 mg. Prosedur pembuatannya adalah dengan melarutkan 3,9 mg isolat di dalam labu ukur 10 mL, ditandabatkan dengan pelarut dan dihomogenkan.

#### L.3.4.2.2 Pengukuran Potensi Antioksidan pada Sampel

Konsentrasi larutan sampel yang digunakan untuk pengukuran potensi antioksidan dibuat dengan variasi konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm. Variasi konsentrasi isolat steroid dapat diperoleh dengan mengencerkan larutan stok sampel 390 ppm.

##### ➤ Larutan sampel 5 ppm

$$V_1 = \frac{4 \text{ mL} \times 5 \text{ ppm}}{390 \text{ ppm}} = 0,0103 \text{ mL} = 10,3 \mu\text{L}$$

Jadi, untuk membuat 4 mL larutan sampel 5 ppm diperlukan larutan stok sampel 390 ppm sebesar 10,3  $\mu\text{L}$ . Perhitungan pembuatan larutan sampel variasi konsentrasi 1, 2, 3, dan 4 ppm dapat dilakukan dengan mengikuti cara di atas.

#### Lampiran 4. Perhitungan Randemen

##### L.4.1 Randemen Hasil Pengeringan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Tabel L.4.1 Randemen hasil pengeringan biomassa basah *Chlorella sp.*

Berat wadah kosong (g)	Berat wadah dan biomassa (g)	Berat biomassa basah (g)	Berat biomassa kering (g)	Randemen
42,40	188,95	146,55	2,27	0,72%
42,40	179,31	136,91	4,11	
42,41	193,99	151,58		
42,40	335,60	293,20	2,51	
42,40	335,51	293,11		
42,42	255,22	212,80	1,40	
42,41	131,58	89,17	0,76	
Total		1.326,32	9,53	

$$\begin{aligned}
 \text{Randemen} &= \frac{\text{Berat kering biomassa (g)}}{\text{Berat basah biomassa (g)}} \times 100\% \\
 &= \frac{9,53}{1.326,32} \times 100\% \\
 &= 0,007185 \times 100\% \\
 &= 0,7185\%
 \end{aligned}$$

##### L.4.2 Randemen Hasil Maserasi

Tabel L.4.2 Randemen hasil maserasi biomassa kering *Chlorella sp.*

Berat sampel kering (g)	Berat wadah kosong (g)	Berat wadah dan ekstrak pekat (g)	Berat ekstrak pekat (g)
9,5269	67,7533	68,5770	0,8237

$$\begin{aligned}
 \text{Randemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat (g)}}{\text{Berat sampel kering (g)}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,8237}{9,5269} \times 100\% \\
 &= 8,6460\%
 \end{aligned}$$

### L.4.3 Randemen Hasil Hidrolisis dan Partisi

Tabel L.4.3 Randemen hasil hidrolisis dan partisi ekstrak kasar *Chlorella sp.*

Berat ekstrak pekat (g)	Berat wadah kosong (g)	Berat wadah dan hasil partisi (g)	Berat hasil partisi (g)
0,8237	149,5840	150,0181	0,4341

$$\begin{aligned}
 \text{Randemen} &= \frac{\text{Berat hasil partisi (g)}}{\text{Berat ekstrak pekat (g)}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,4341}{0,8237} \times 100\% \\
 &= 52,7012\%
 \end{aligned}$$



**Lampiran 5. Perhitungan Nilai  $R_f$  Hasil Monitoring KLTA  
L.5.1 Monitoring Perbandingan 1:200**

Tabel L.5.1 Perhitungan  $R_f$  untuk monitoring perbandingan 1:200

Fraksi	Vial	Warna	$R_f$	Fraksi	Vial	Warna	$R_f$
J1	1-5	-	-	J10	62-70	Merah Hijau Biru	$\frac{3,8}{8} = 0,48$ $\frac{3}{8} = 0,38$ $\frac{2,5}{8} = 0,31$
J2	6-12	Hitam Hitam	$\frac{7,1}{8} = 0,89$ $\frac{5,6}{8} = 0,70$	J11	71-89	Hijau Merah	$\frac{3,2}{8} = 0,40$ $\frac{2,2}{8} = 0,28$
<b>J3</b>	<b>13-19</b>	<b>Hitam</b>	$\frac{5,4}{8} = 0,68$	<b>J12</b>	<b>90</b>	<b>Merah</b>	$\frac{2,3}{8} = 0,29$
J4	20-44	-	-	J13	91-93	Merah Merah	$\frac{2,2}{8} = 0,28$ $\frac{1,4}{8} = 0,18$
<b>J5</b>	<b>45-47</b>	<b>Merah</b>	$\frac{3,7}{8} = 0,46$	<b>J14</b>	<b>94-104</b>	<b>Merah</b>	$\frac{1,4}{8} = 0,18$
J6	48-50	Merah Hitam Biru Biru	$\frac{3,7}{8} = 0,46$ $\frac{3,8}{8} = 0,48$ $\frac{3,1}{8} = 0,39$ $\frac{2,5}{8} = 0,31$	J15	105- 119	Merah Merah	$\frac{1,9}{8} = 0,24$ $\frac{1,4}{8} = 0,18$
J7	51-56	Merah Merah	$\frac{3,7}{8} = 0,46$ $\frac{1,5}{8} = 0,19$	J16	120- 223	Merah Merah Merah	$\frac{1,9}{8} = 0,24$ $\frac{1,1}{8} = 0,14$ $\frac{0,5}{8} = 0,06$
J8	57-59	Hitam Merah Hijau Biru Merah	$\frac{3,8}{8} = 0,48$ $\frac{3,8}{8} = 0,48$ $\frac{3}{8} = 0,38$ $\frac{2,5}{8} = 0,31$ $\frac{1,5}{8} = 0,19$	J17	224- 307	Merah Merah	$\frac{1,1}{8} = 0,14$ $\frac{0,6}{8} = 0,08$
J9	60-61	Merah Hijau	$\frac{3,8}{8} = 0,48$ $\frac{3}{8} = 0,38$				

### L.5.2 Monitoring Perbandingan 1:150

Tabel L.5.2 Perhitungan  $R_f$  untuk monitoring perbandingan 1:150

Fraksi	Vial	Warna	$R_f$	Fraksi	Vial	Warna	$R_f$
<b>K1</b>	<b>1-16</b>	<b>Hitam</b>	$\frac{6,2}{8} = 0,78$	<b>K11</b>	<b>87-92</b>	<b>Merah</b>	$\frac{1,8}{8} = 0,23$
K2	17-41	-	-	K12	93-100	Merah Merah	$\frac{1,8}{8} = 0,23$ $\frac{0,4}{8} = 0,05$
<b>K3</b>	<b>42-50</b>	<b>Merah</b>	$\frac{4,4}{8} = 0,55$	K13	101-102	Merah Hitam Merah Merah	$\frac{1,8}{8} = 0,23$ $\frac{1,6}{8} = 0,20$ $\frac{1,4}{8} = 0,18$ $\frac{0,4}{8} = 0,05$
K4	51-56	Merah Hijau	$\frac{4,4}{8} = 0,55$ $\frac{3,6}{8} = 0,45$	K14	103-110	Merah Hitam Merah Merah Merah	$\frac{1,8}{8} = 0,23$ $\frac{1,6}{8} = 0,20$ $\frac{1,4}{8} = 0,18$ $\frac{1,1}{8} = 0,14$ $\frac{0,4}{8} = 0,05$
K5	57-58	Hijau Merah Merah	$\frac{3,6}{8} = 0,45$ $\frac{4,2}{8} = 0,53$ $\frac{3,4}{8} = 0,43$	K15	111-122	Merah Merah Merah Merah	$\frac{1,8}{8} = 0,23$ $\frac{1,4}{8} = 0,18$ $\frac{1,1}{8} = 0,14$ $\frac{0,4}{8} = 0,05$
K6	59-64	Hijau Merah	$\frac{3,6}{8} = 0,45$ $\frac{3,5}{8} = 0,44$	K16	123-124	Merah Merah Merah Merah Merah	$\frac{1,8}{8} = 0,23$ $\frac{1,4}{8} = 0,18$ $\frac{1,1}{8} = 0,14$ $\frac{0,9}{8} = 0,11$ $\frac{0,4}{8} = 0,05$
<b>K7</b>	<b>65-69</b>	<b>Merah</b>	$\frac{3,5}{8} = 0,44$	K17	125-135	Merah Merah Merah Merah	$\frac{1,8}{8} = 0,23$ $\frac{1,1}{8} = 0,14$ $\frac{0,9}{8} = 0,11$ $\frac{0,4}{8} = 0,05$
K8	70	Merah Merah	$\frac{3,5}{8} = 0,44$ $\frac{2,9}{8} = 0,36$	K18	136-252	Merah Merah Merah Merah Merah	$\frac{1,8}{8} = 0,23$ $\frac{1,1}{8} = 0,14$ $\frac{0,9}{8} = 0,11$ $\frac{0,6}{8} = 0,08$ $\frac{0,4}{8} = 0,05$
K9	71-77	Merah Hijau	$\frac{2,4}{8} = 0,36$ $\frac{2,9}{8} = 0,30$	K19	253-268	Merah Merah Merah Merah	$\frac{1,1}{8} = 0,14$ $\frac{0,9}{8} = 0,11$ $\frac{0,6}{8} = 0,08$ $\frac{0,4}{8} = 0,05$
K10	78-86	-	-				

## Lampiran 6. Data Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid

### L.6.1 Perhitungan % Inhibisi Isolat Steroid K1

- Konsentrasi 2 ppm

$$\begin{aligned} \% \text{ inhibisi} &= \frac{1,1221-1,0866}{1,1221} \times 100\% \\ &= 3,1637\% \end{aligned}$$

- Konsentrasi 3 ppm

$$\begin{aligned} \% \text{ inhibisi} &= \frac{0,9099-0,8678}{0,9099} \times 100\% \\ &= 3,6741\% \end{aligned}$$

- Konsentrasi 4 ppm

$$\begin{aligned} \% \text{ inhibisi} &= \frac{0,9031-0,8682}{0,9031} \times 100\% \\ &= 3,8645\% \end{aligned}$$

- Konsentrasi 5 ppm

$$\begin{aligned} \% \text{ inhibisi} &= \frac{0,9025-0,8642}{0,9025} \times 100\% \\ &= 4,2438\% \end{aligned}$$

- Konsentrasi 10 ppm

$$\begin{aligned} \% \text{ inhibisi} &= \frac{0,9077-0,8641}{0,9077} \times 100\% \\ &= 4,8034\% \end{aligned}$$

### L.6.2 Perhitungan Nilai IC<sub>50</sub>

Berikut disajikan data perhitungan % inhibisi masing-masing variasi konsentrasi isolat steroid K1. Nilai IC<sub>50</sub> dihitung menggunakan aplikasi *GraphPad prism7 software*, dengan menggunakan analisa *Regression for analyzing dose-response data*. Nilai % inhibisi yang digunakan untuk menghitung

nilai  $IC_{50}$  merupakan nilai % aktivitas antioksidan yang dimulai dari konsentrasi 2, 3, 4, 5, dan 10 ppm.

Tabel L.6.1 Nilai % inhibisi dari masing-masing konsentrasi isolat

Konsentrasi Isolat (ppm)	Log Konsetrasi Isolat	% Inhibisi
2	0,3010	3,1637
3	0,4771	3,6741
4	0,6020	3,8645
5	0,6989	4,2438
10	1,0000	4,8034

	% Aktivitas Antioksidan	Global (shared)
<b>Comparison of Fits</b>		Can't calculate
Null hypothesis		2 parameters different for each data set
Alternative hypothesis		2 parameters same for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		2 parameters different for each data set
F (DFn, DFd)		
<b>2 parameters different for each data set</b>		
<b>Best-fit values</b>		
Bottom	= 0.000	
Top	= 100.0	
LogIC50	5.995	
HillSlope	0.2583	
IC50	989539	
Span	= 100.0	
<b>Std. Error</b>		
LogIC50	0.4927	
HillSlope	0.02391	
<b>95% CI (profile likelihood)</b>		
LogIC50	4.794 to 8.205	
HillSlope	0.1827 to 0.3338	
IC50	62296 to 160230010	
<b>Goodness of Fit</b>		
Degrees of Freedom	3	
R squared	0.9746	
Sum of Squares	0.03844	

Sy.x	0.1132
<b>Constraints</b>	
Bottom	Bottom = 0
Top	Top = 100

**2 parameters for all data sets**

**Best-fit values**

Bottom	= 0.000	
Top	= 100.0	
LogIC50	5.995	5.995
HillSlope	0.2583	0.2583
IC50	989539	989539
Span	= 100.0	

**Std. Error**

LogIC50	0.4927	0.4927
HillSlope	0.02391	0.02391

**95% CI (profile likelihood)**

LogIC50	4.794 to 8.205	4.794 to 8.205
HillSlope	0.1827 to 0.3338	0.1827 to 0.3338
IC50	62296 to 160230010	62296 to 160230010

**Goodness of Fit**

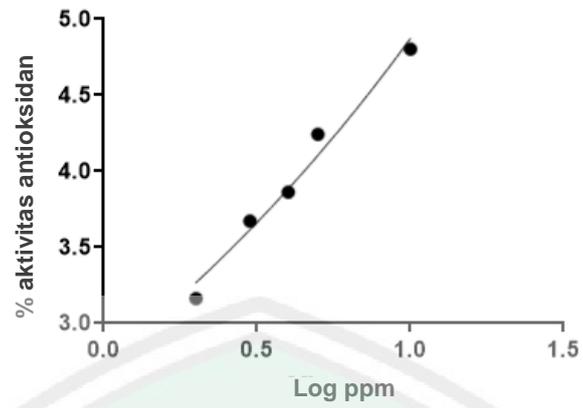
Degrees of Freedom		3
R squared	0.9746	0.9746
Sum of Squares	0.03844	0.03844
Sy.x		0.1132

**Constraints**

Bottom	Bottom = 0
Top	Top = 100
LogIC50	LogIC50 is shared
HillSlope	HillSlope is shared

**Number of points**

# of X values	15
# Y values analyzed	5



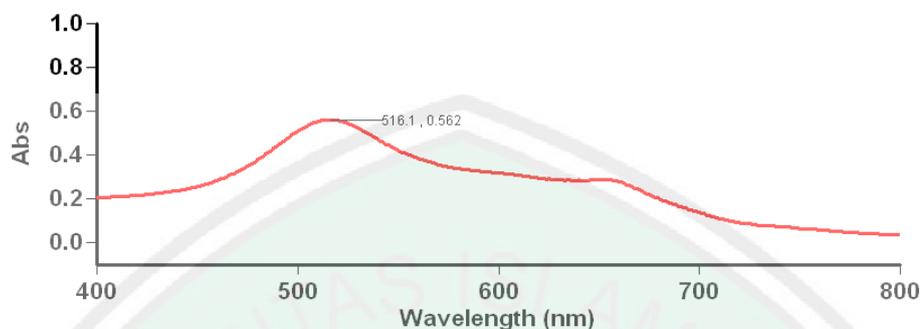
Gambar L.6.1 Grafik aktivitas antioksidan isolat steroid K1



## Lampiran 7. Data Absorbansi dan Spektra UV-Vis L.7.1 Panjang Gelombang Maksimum DPPH

### Lamdha Maks DPPH

Tanggal Analisa : 05 Maret 2019



### Scan Analysis Report

Report Time : Tue 05 Mar 03:31:58 PM 2019

Method:

Batch: D:\Mahsunah\Lamdha Maks DPPH (05-03-2019).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

#### Sample Name: DPPH

Collection Time

3/5/2019 3:32:38 PM

Peak Table

Peak Style

Peaks

Peak Threshold

0.0100

Range

800.0nm to 200.1nm

Wavelength (nm)	Abs
516.1	0.562
330.0	0.889
241.0	1.312
239.0	1.382
236.0	1.454
233.9	1.503
220.9	2.887
207.0	3.586
203.0	3.628

## L.7.2 Data Absorbansi DPPH pada Pengujian Aktivitas Antioksidan

### Absorbansi DPPH Sampel Steroid U2

Tanggal Analisa : 13 Maret 2019

### Advanced Reads Report

Report time

3/13/2019 3:18:50 PM

Method

Batch name

D:\Mahsunah\Absorbansi DPPH Sampel Steroid U2 (13-03-2019).BAB

Application

Advanced Reads 3.00(339)

Operator

Rika

## Instrument Settings

Instrument Cary 50  
 Instrument version no. 3.00  
 Wavelength (nm) 516.1  
 Ordinate Mode Abs  
 Ave Time (sec) 0.1000  
 Replicates 3  
 Sample averaging OFF

Comments:

## Zero Report

Read	Abs	nm
Zero	(0.1063)	516.1

## Analysis

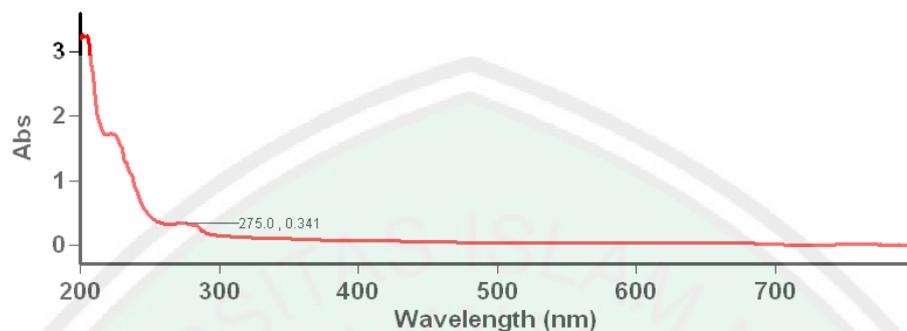
Collection time 3/13/2019 3:18:50 PM

Sample	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Kontrol					1.1241 1.1213 1.1208
		1.1221	0.0018	0.16	
C 2 ppm U2					1.0875 1.0862 1.0862
		1.0866	0.0007	0.07	
Kontrol					0.9011 0.9013 0.9003
		0.9009	0.0005	0.05	
C 3 ppm					0.8674 0.8676 0.8684
		0.8678	0.0006	0.06	
Kontrol					0.9042 0.9026 0.9024
		0.9031	0.0010	0.11	
C 4 ppm					0.8681 0.8690 0.8675
		0.8682	0.0007	0.09	
Kontrol					0.9022 0.9025 0.9029
		0.9025	0.0004	0.04	
C 5 ppm					0.8632 0.8649 0.8645
		0.8642	0.0009	0.10	
Kontrol					0.9078 0.9080 0.9072
		0.9077	0.0004	0.05	
C 10 ppm					0.8632 0.8638 0.8652
		0.8641	0.0010	0.11	

### L.7.3 Panjang Gelombang Maksimum Steroid K1

## Lamdba Maks Steroid

Tanggal Analisa : 20 Maret 2019



### Scan Analysis Report

Report Time: Wed 20 Mar 02:52:21 PM 2019  
 Method:  
 Batch: D:\Mahsunah\Lamdha Maks Steroid (20-03-2019).DSW  
 Software version: 3.00(339)  
 Operator: Rika

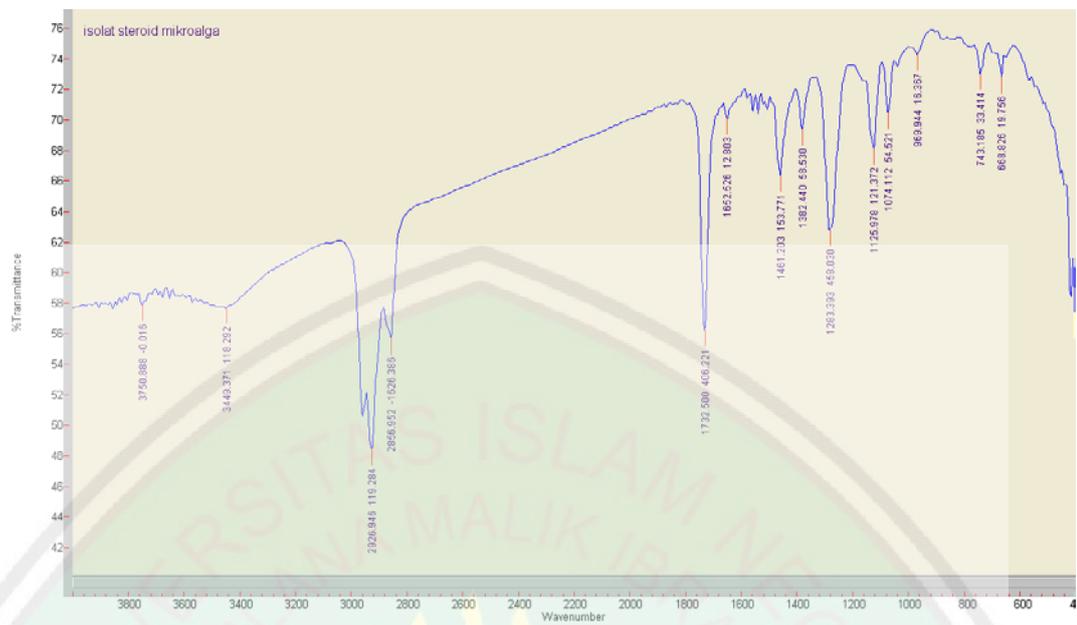
#### Sample Name: Steroid

Collection Time 3/20/2019 2:52:49 PM

Peak Table  
 Peak Style Peaks  
 Peak Threshold 0.0100  
 Range 799.9nm to 200.0nm

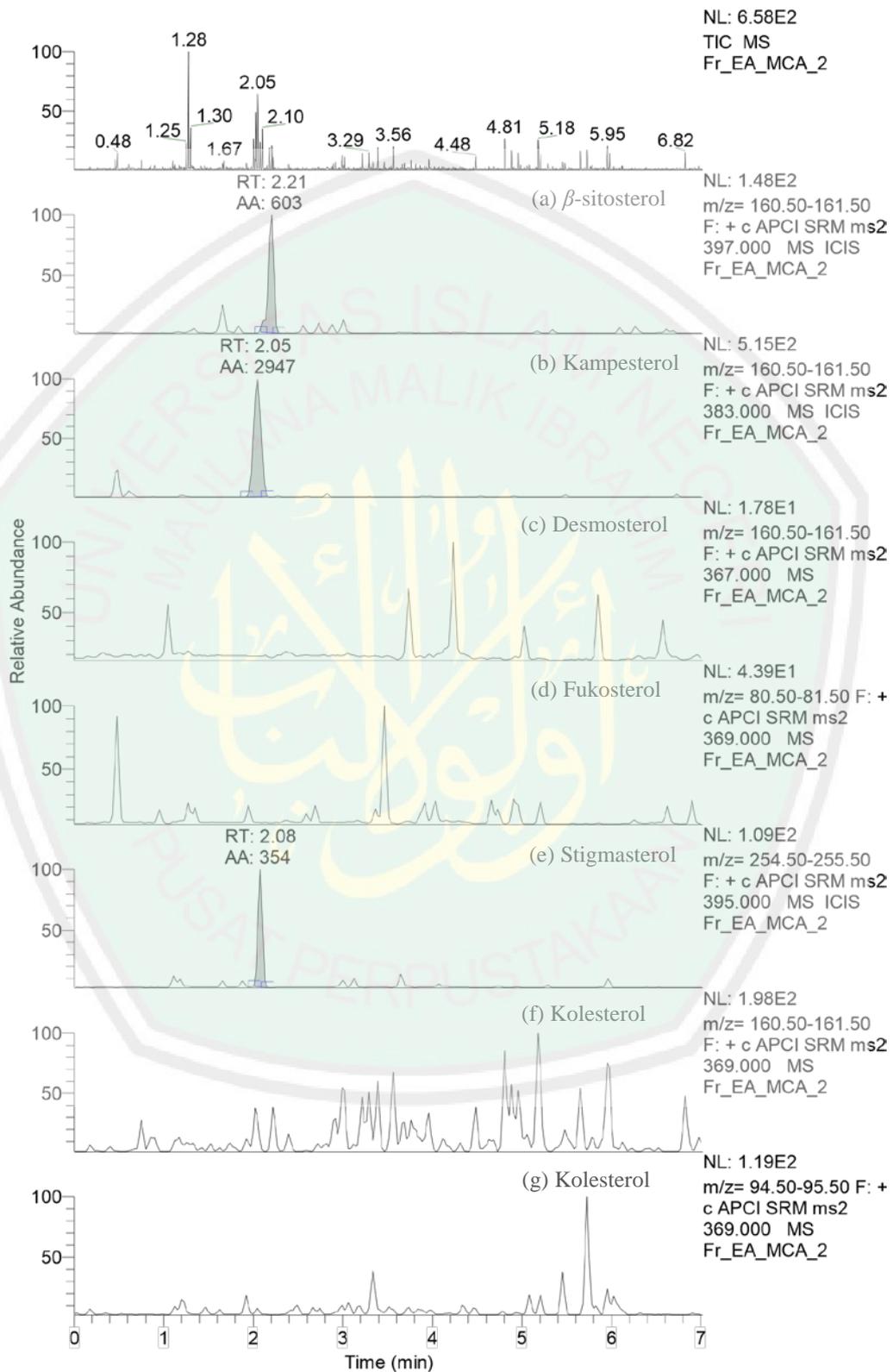
Wavelength (nm)	Abs
591.0	0.038
275.0	0.341
222.0	1.731
205.0	3.259
202.0	3.273

## Lampiran 8. Spektrum FTIR

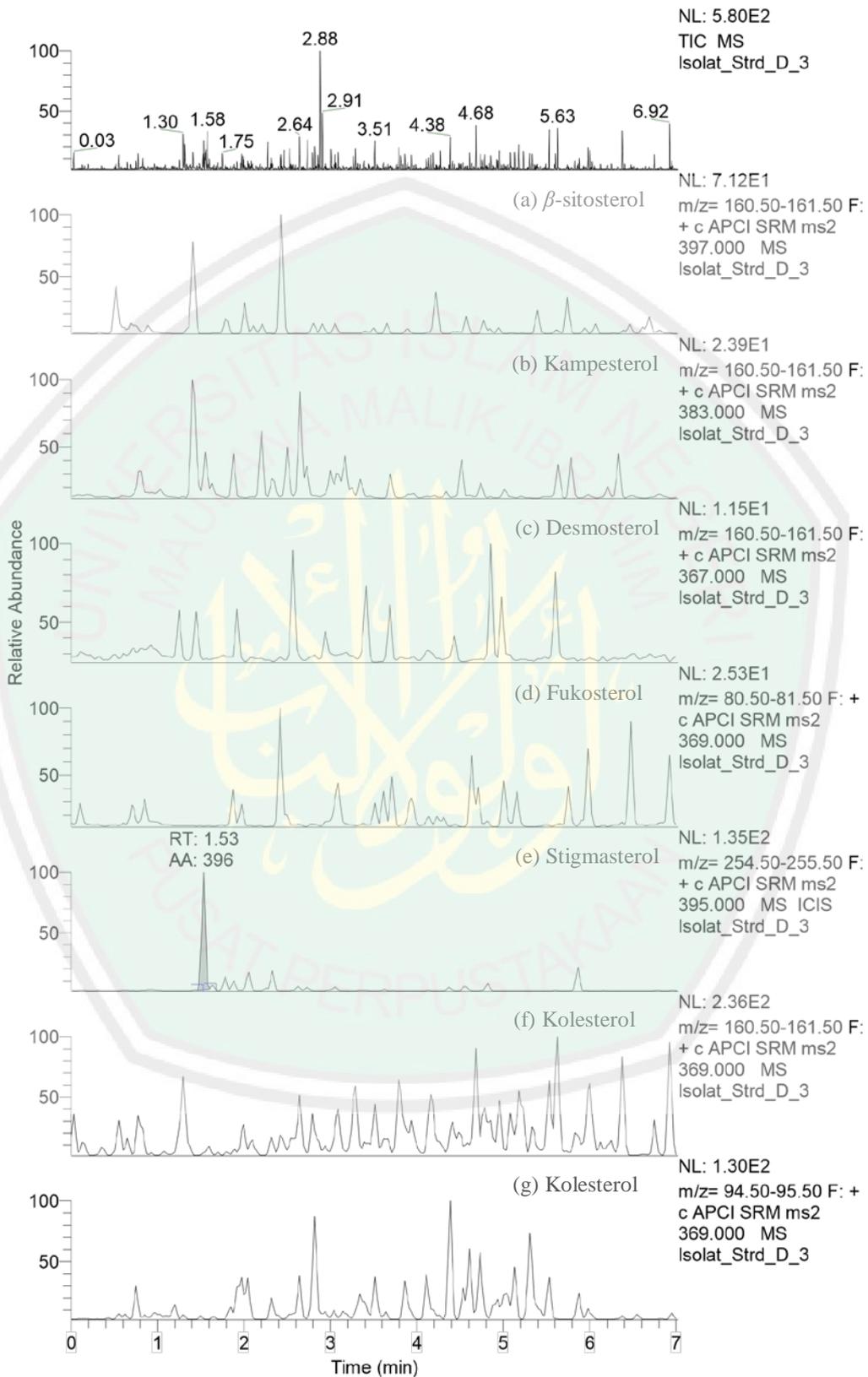


## Lampiran 9. Spektra Massa LC-MS/MS

### L.9.1 Spektra Massa Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.*



### L.9.2 Spektra Massa Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.*

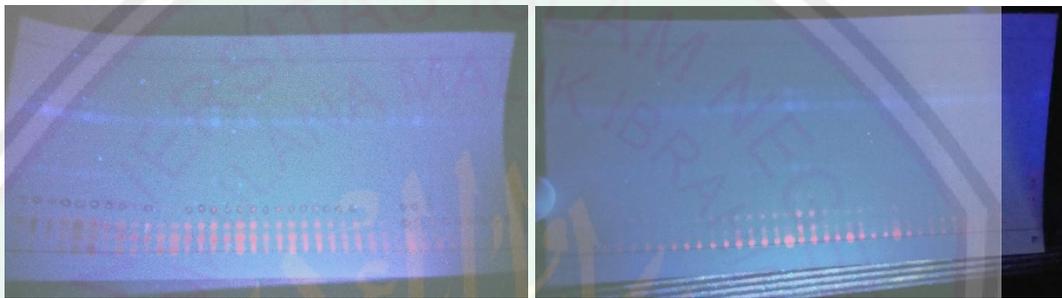


**Lampiran 10. Ilustrasi Hasil Monitoring KLTA  
L.10.1 Perbandingan 1:200**



(a)

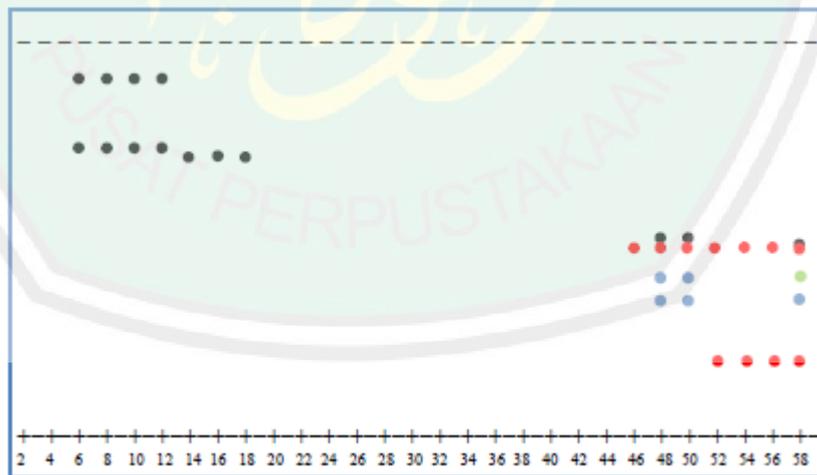
(b)



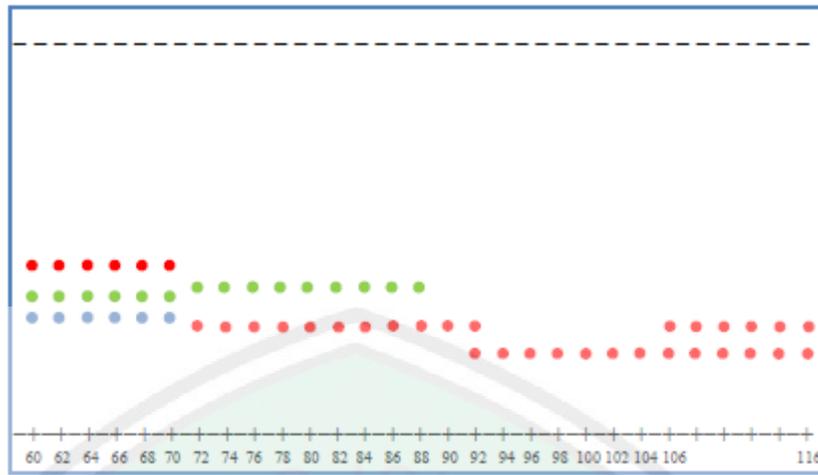
(c)

(d)

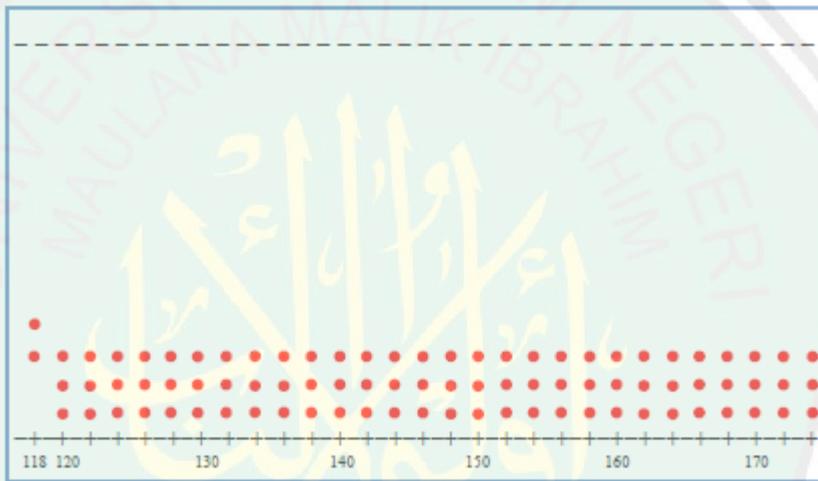
Gambar L.10.1.1 (a) Monitoring vial 2-76, (b) Monitoring vial 80-156, (c) Monitoring vial 158-234, dan (d) Monitoring vial 236-306



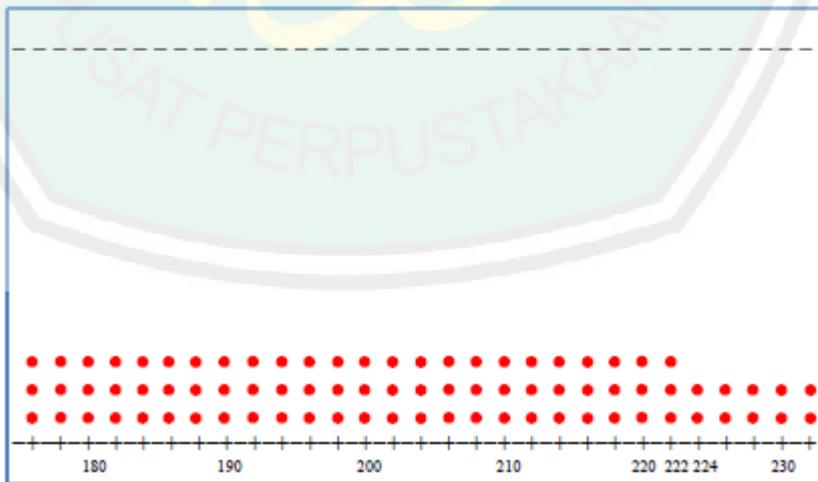
(a)



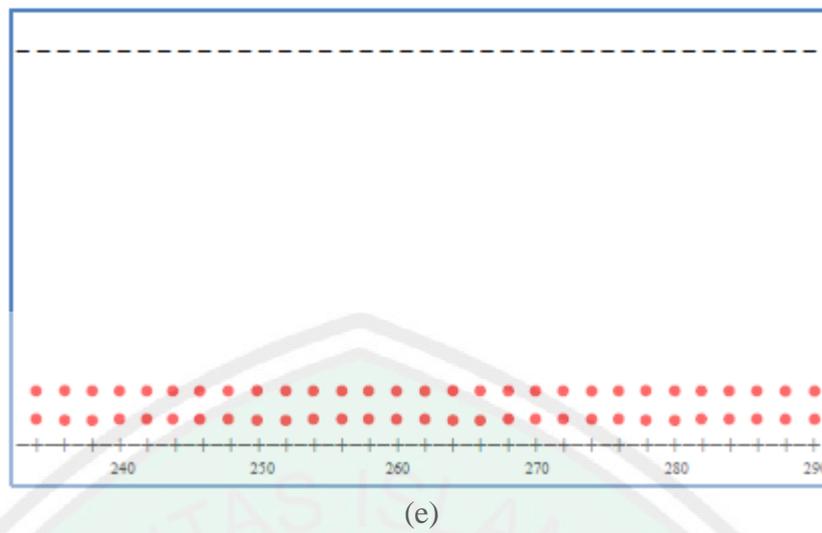
(b)



(c)

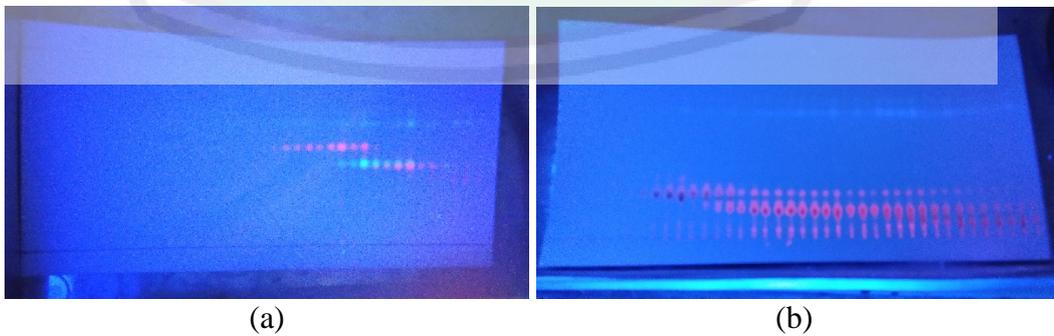


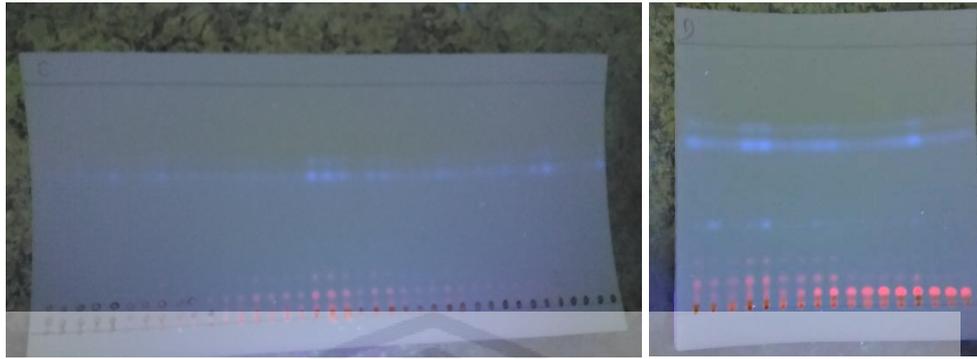
(d)



Gambar L.10.1.2 (a) Ilustrasi vial 2-58, (b) Ilustrasi vial 60-116, (c) Ilustrasi vial 118-174, (d) Ilustrasi vial 176-232, (e) Ilustrasi vial 234-290, dan (f) Ilustrasi vial 292-306

### L.10.2 Perbandingan 1:150





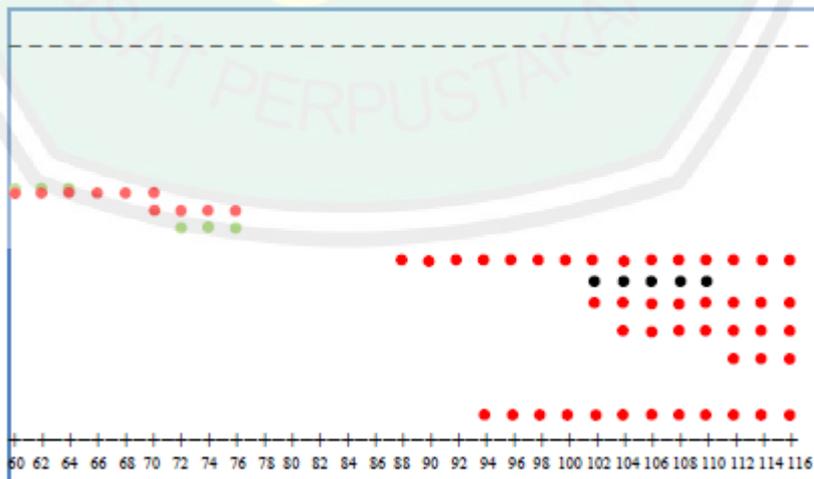
(c)

(d)

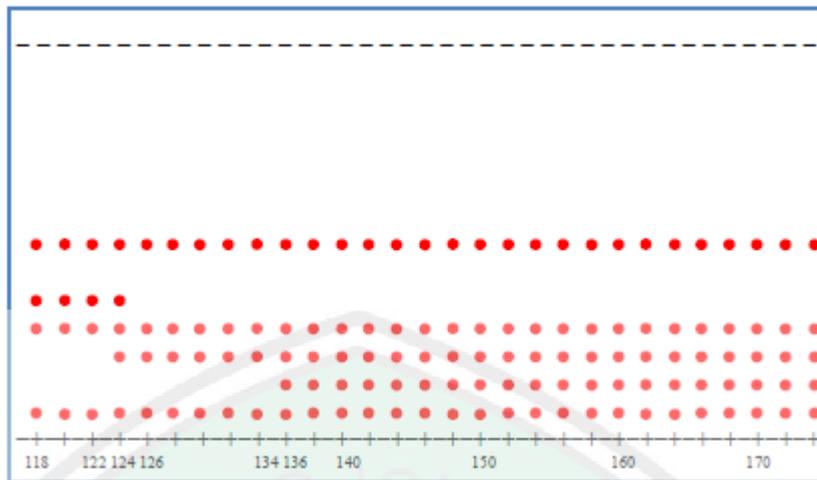
PGambar L.10.2.1 (a) Monitoring vial 2-76, (b) Monitoring vial 80-156, (c) Monitoring vial 158-234, dan (d) Monitoring vial 236-268



(a)



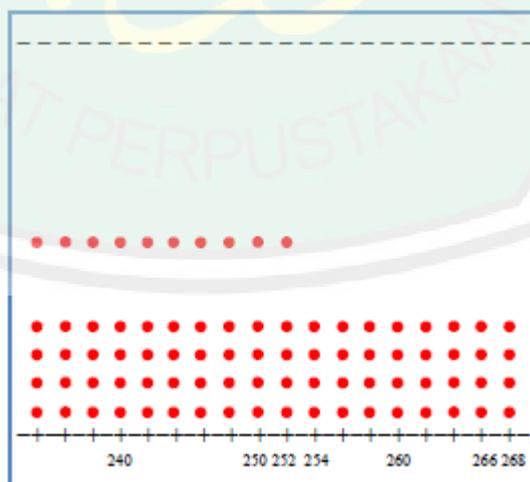
(b)



(c)



(d)



(e)

Gambar L.10.2.2 (a) Ilustrasi vial 2-58, (b) Ilustrasi vial 60-116, (c) Ilustrasi vial 118-174, (d) Ilustrasi vial 176-232, (e) Ilustrasi vial 234-268

## Lampiran 11. Dokumentasi

### L.11.1 Pembuatan MET 4% dan Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*



(a)

(b)

(c)

Gambar L.11.1 (a) Tauge, (b) Perebusan tauge, dan (c) MET 4% yang telah ditambah isolat *Chlorella sp.*

### L.11.2 Preparasi Sampel Mikroalga *Chlorella sp.*



(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

Gambar L.11.2 (a) Biomassa sebelum disentrifuge, (b) Biomassa setelah disentrifuge, (c) Pengumpulan biomassa, (d) Pengeringan biomassa, dan (e) Biomassa setelah dikeringkan

### L.11.3 Ekstraksi Maserasi



(a)

(b)

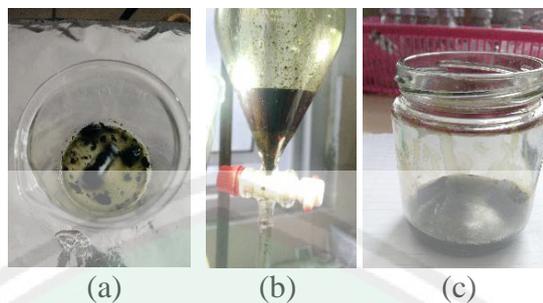
(c)

(d)

(e)

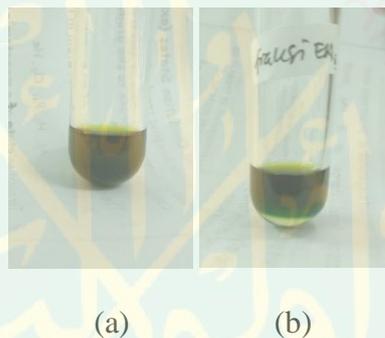
Gambar L.11.3 (a) Pengadukan dengan *shaker*, (b) Penyaringan sampel ekstraksi, (c) Filtrat *Chlorella sp.*, (d) Pemekatan ekstrak, dan (e) Ekstrak kasar hasil maserasi

#### L.11.4 Hidrolisis dan Partisi



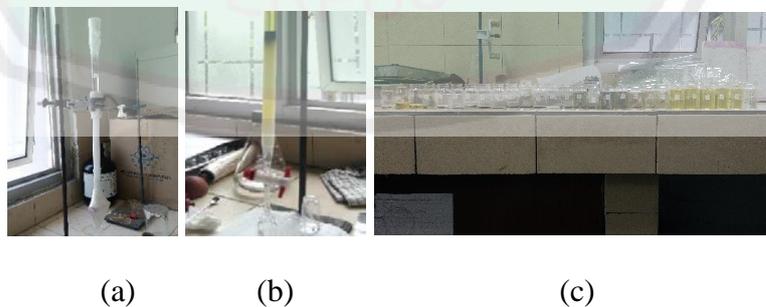
Gambar L.11.4 (a) Hidrolisis dengan HCl 2 N, (b) Partisi dengan etil asetat, dan (c) Fraksi etil asetat

#### L.11.5 Uji Fitokimia



Gambar L.11.5 (a) Fraksi etil asetat sebelum ditambah reagen LB dan (b) Fraksi etil asetat setelah ditambah reagen LB

#### L.11.6 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom Basah



Gambar L.11.6 (a) Preparasi kolom, (b) Elusi, dan (c) Pengelompokan fraksi berdasarkan hasil monitoring KLTA

### L.11.7 Uji Aktivitas Antioksidan



(a)

(b)

Gambar L.11.7 (a) Preparasi sampel dan (b) Sampel setelah ditambah DPPH