

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL
KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI n-HEKSANA MIKROALGA
*Chlorella sp.***

SKRIPSI

Oleh:
NURUL MAGHFIROH
NIM. 15630041



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

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL
KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI n-HEKSANA MIKROALGA
*Chlorella sp.***

SKRIPSI

Oleh:
NURUL MAGHFIROH
NIM. 15630041

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**

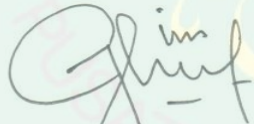
**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL
KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI n-HEKSANA MIKROALGA
Chlorella sp.**

SKRIPSI

Oleh:
NURUL MAGHFIROH
NIM. 15630041

Telah Diperiksa dan Disetujui Untuk Diuji
Tanggal: 19 Juni 2019

Pembimbing I



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

Pembimbing II



Rif'atul Mahmudah, M.Si
NIDT. 19830125 20160801 2 068

**Mengetahui,
Ketua Jurusan**



Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790629 200604 2 002

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL
KROMATOGRAFI KOLOM FRAKSI n-HEKSANA MIKROALGA
*Chlorella sp.***


SKRIPSI

Oleh:
NURUL MAGHFIROH
NIM. 15630041

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 19 Juni 2019

Penguji Utama	: Rachmawati Ningsih, M.Si NIP. 19810811 200801 2 010	(.....)
Ketua Penguji	: Dewi Yuliani, M.Si NIDT. 19880711 20160801 2 067	(.....)
Sekretaris Penguji	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	(.....)
Anggota Penguji	: Rif'atul Mahmudah, M.Si NIDT. 19830125 20160801 2 068	(.....)

Mengesahkan,
Ketua Jurusan


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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nurul Maghfiroh

NIM : 15630041

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil

Kromatografi Kolom Fraksi n-Heksana Mikroalga


Chlorella sp.

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

Malang, 19 Juni 2019
Yang membuat pernyataan,



Nurul Maghfiroh
NIM. 15630041



الحمد لله رب العالمين dengan penuh rasa syukur kepada Allah SWT, maka saya persembahkan karya saya ini untuk orang-orang yang saya sayangi, Ayah Ibu dan kedua adik saya, Keluarga saya, Bapak-Ibu Dosen pembimbing, teman-teman penelitian bahan alam, teman-teman Kimia 2015 khususnya Kimia B. Terimakasih telah ikut menghantarkan sampai proses ini. Jazakumullah ☺

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Wr. Wb

Syukur alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul “**Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi n-Heksana Mikroalga *Chlorella* sp.**”. Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada semua pihak yang telah memberikan kontribusi demi suksesnya penyusunan skripsi ini. :

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat, hidayat dan karunia-Nya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
2. Kedua orang tua dan kedua adik saya yang telah memberikan seluruh kasih sayang, kesabaran, dan cinta yang tulus ikhlas serta selalu memberikan doa dan dukungan baik secara moril maupun material.
3. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si selaku dosen pembimbing, Ibu Dewi Yuliani, M.Si selaku dosen konsultan dan Ibu Rif'atul Mahmudah, M.Si selaku dosen pembimbing agama yang telah memberikan bimbingan, motivasi serta arahan kepada penulis dalam penyelesaian penulisan skripsi ini.
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia UIN Malang.
5. Abi Isyroqunnajah, M.Ag dan Ibu Nyai Hj. Ismatuddiniyah yang telah banyak memberi motivasi, bimbingan dan siraman spiritual.
6. Bapak Prof. Abdul Haris, M.Ag selaku Rektor UIN Malang.
7. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang.
8. Ma'had Sunan Ampel Al Aly dan teman-teman Musyrif/ah seperjuangan

khususnya BTQ-GTA yang telah memberikan semangat dan motivasi dalam hari hari selama proses studi sarjana.

9. Teman-teman Jurusan Kimia UIN Malang, Kimia B 2015 khususnya tim penelitian bahan alam 2015 dan mikroalga.

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

Wassalamu'alaikum Wr. Wb

Malang, 23 Mei 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN ORISINALITAS	iv
PERSEMBAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
المخلص	xv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Batasan Masalah.....	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Manfaat Tumbuhan dalam Perspektif Islam	6
2.2 Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	7
2.3 Kandungan dan Manfaat Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.....	9
2.4 Senyawa Steroid.....	11
2.5 Ekstraksi Komponen Aktif <i>Chlorella</i> sp.....	13
2.5.1 Ekstraksi Maserasi	13
2.5.2 Hidrolisis dan Partisi	14
2.6 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom	15
2.7 Uji Aktivitas Antioksidan	17
2.8 Identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis	19
2.9 Identifikasi dengan FTIR	20
2.10 Identifikasi dengan LC-MS/MS	21
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	23
3.2 Alat dan bahan.....	23
3.2.1 Alat.....	23
3.2.2 Bahan	23
3.3 Tahapan Penelitian	24
3.4 Cara Kerja	24
3.4.1 Preparasi Sampel Biomassa Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.....	24
3.4.2 Ekstraksi Maserasi Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	25
3.4.3 Hidrolisis dan Partisi <i>Chlorella</i> sp.	25

3.4.4 Uji Senyawa Steroid Fraksi n-Heksana <i>Chlorella</i> sp.	26
3.4.4.1 Uji Fitokimia Senyawa Steroid	26
3.4.4.2 Identifikasi menggunakan LC-MS/MS	26
3.4.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom.....	27
3.4.6 Monitoring dengan KLTA dan Penggabungan Fraksi.....	28
3.4.7 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH	28
3.4.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH.....	28
3.4.7.2 Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid <i>Chlorella</i> sp..	29
3.4.8 Identifikasi Isolat Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis.....	29
3.4.9 Identifikasi Isolat Steroid dengan Spektrofotometer FTIR.....	29
3.5 Analisis Data	30
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	31
4.2 Ekstraksi Maserasi Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.....	31
4.3 Hidrolisis dan Partisi <i>Chlorella</i> sp.....	32
4.4 Identifikasi Senyawa Steroid Fraksi n-Heksana <i>Chlorella</i> sp.....	33
4.4.1 Uji Fitokimia.....	33
4.4.2 Identifikasi menggunakan LC-MS/MS.....	34
4.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom.....	36
4.6 Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH.	38
4.6.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	38
4.6.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Isolat Steroid.....	39
4.7 Identifikasi menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	40
4.8 Identifikasi menggunakan FTIR	41
4.9 Manfaat Senyawa Steroid dalam Perspektif Islam	43
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	46
5.2 Saran.....	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN	54

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Sel Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	8
Gambar 2.2	Kurva Pertumbuhan <i>Chlorella</i> sp. dalam MET 4%	9
Gambar 2.3	Struktur Dasar Golongan Senyawa Steroid.....	11
Gambar 2.4	Struktur Senyawa Steroid Kampesterol, Stigmasterol dan β -Sitosterol	12
Gambar 2.5	Dugaan Reaksi Hidrolisis.....	14
Gambar 2.6	Reaksi Penetralan antara HCl dan NaHCO ₃	15
Gambar 2.7	Mekanisme Reaksi Radikal DPPH dengan Flavonoid.....	18
Gambar 4.1	Uji Fitokimia Senyawa Steroid dengan Reagen LB.....	33
Gambar 4.2	Hasil LC-MS/MS fraksi n-heksana <i>Chlorella</i> sp.....	34
Gambar 4.3	Fragmentasi Senyawa β -sitosterol, kampesterol dan stigmasterol... ..	36
Gambar 4.4	Spektra UV-Vis Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom <i>Chlorella</i> sp.....	41
Gambar 4.5	Spektra FTIR Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom <i>Chlorella</i> sp.....	42
Gambar L.4.1	Hasil Monitoring Isolat C... ..	72
Gambar L.4.2	Ilustrasi Monitoring KLTA Plat A dilihat pada Lampu UV 254 nm.....	72
Gambar L.4.3	Hasil monitoring KLTA Plat A dilihat pada Lampu UV 254 nm.....	73
Gambar L.4.4	Ilustrasi Monitoring KLTA Plat A dilihat pada Lampu UV 366 nm.....	73
Gambar L.4.5	Hasil Monitoring KLTA Plat A dilihat pada Lampu 366 nm.....	73
Gambar L.4.6	Ilustrasi Monitoring KLTA Plat B dilihat pada Lampu UV 366 nm.....	74
Gambar L.4.7	Hasil Monitoring KLTA Plat B dilihat pada Lampu UV 366 nm.....	74
Gambar L.4.8	Ilustrasi Monitoring KLTA Plat C dilihat pada Lampu UV 366 nm.....	74
Gambar L.4.9	Hasil Monitoring KLTA Plat C dilihat pada Lampu UV 366 nm.....	75
Gambar L.4.10	Ilustrasi Monitoring KLTA Plat D dilihat pada Lampu UV 366 nm.....	75
Gambar L.4.11	Hasil Monitoring KLTA Plat D dilihat pada Lampu UV 366 nm.....	75

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Interpretasi Spektra FTIR Senyawa Steroid.....	21
Tabel 2.2	Interpretasi Spektra FTIR Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.....	22
Tabel 4.1	Spektra Massa Senyawa Steroid Fraksi n-Heksana <i>Chlorella</i> sp.....	36
Tabel 4.2	Hasil Monitoring KLTA	37
Tabel 4.3	Data Aktivitas Antioksidan Fraksi n-Heksana, Isolat Steroid dan Asam Askorbat	39
Tabel L.3.1	Pembuatan Eluen untuk Kromatografi Kolom	61
Tabel L.3.2	Pembuatan Larutan Sampel Uji Antioksidan	62
Tabel L.3.3	Pembuatan Larutan Vitamin C	63
Tabel L.3.4	Data <i>R_f</i> Hasil Monitoring dengan KLTA	64
Tabel L.3.5	Data Absorbansi Antioksidan Fraksi n-Heksana.....	65
Tabel L.3.6	Hasil Perhitungan % Aktivitas Antioksidan Fraksi n-Heksana...	65
Tabel L.3.7	Data Aktivitas Antioksidan untuk Perhitungan Nilai EC ₅₀ Fraksi n-Heksana	65
Tabel L.3.8	Data Absorbansi Antioksidan Isolat C	67
Tabel L.3.9	Hasil Perhitungan % Aktivitas Antioksidan Isolat C	67
Tabel L.3.10	Data Aktivitas Antioksidan untuk Perhitungan Nilai EC ₅₀ Isolat C	67
Tabel L.3.11	Data Absorbansi Antioksidan Asam Askorbat.....	69
Tabel L.3.12	Hasil Perhitungan % Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat.....	69
Tabel L.3.13	Data Aktivitas Antioksidan untuk Perhitungan Nilai EC ₅₀ Asam Askorbat	69

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Rancangan Penelitian	54
Lampiran 2	Diagram Alir.....	55
Lampiran 3	Perhitungan dalam Pembuatan Reagen Dan Larutan	60
Lampiran 4	Dokumentasi Penelitian.....	71
Lampiran 5	Spektra LC-MS/MS Fraksi n-Heksana <i>Chlorella</i> sp.....	77



ABSTRAK

Maghfiroh, N. 2019. Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi n-Heksana Mikroalga *Chlorella* sp. *Skripsi*. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Rif'atul Mahmudah, M.Si; Konsultan: Dewi Yuliani, M.Si

Kata Kunci: *Chlorella* sp., Steroid, *Liebermann Burchard*, Antioksidan, UV-Vis, FTIR.

Steroid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat di dalam mikroalga *Chlorella* sp. Steroid memiliki beberapa bioaktivitas, diantaranya adalah antioksidan, antibakteri, toksisitas, antiinflamasi, antitumor dan antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui nilai antioksidan dari isolat steroid mikroalga *Chlorella* sp. dengan menggunakan kromatografi kolom dalam pemisahannya. Sampel kering mikroalga *Chlorella* sp. diekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak pekat hasil maserasi dihidrolisis dengan HCl 2 N dan dilanjutkan partisi dengan pelarut n-heksana. Ekstrak hasil partisi positif mengandung senyawa steroid dengan reagen *Liebermann Burchard* (LB). Identifikasi fraksi n-heksana menggunakan LC-MS/MS juga memberikan hasil bahwa fraksi n-heksana positif mengandung senyawa steroid jenis stigmasterol, kampesterol dan β -sitosterol. Pemisahan senyawa steroid dilakukan dengan kromatografi kolom menggunakan perbandingan eluen n-heksana:etil asetat sebesar 95:5; 90:10; 85:15 dan 80:20. Monitoring dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA). Berdasarkan hasil monitoring, diperoleh 1 isolat yang diduga mengandung senyawa steroid serta 3 isolat yang diduga mengandung senyawa terpenoid. Isolat yang diduga mengandung senyawa steroid memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan nilai EC_{50} sebesar 6,224 ppm. Berdasarkan identifikasi isolat steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis diperoleh panjang gelombang maksimum isolat steroid adalah 204 nm. Spektra FTIR isolat steroid menunjukkan adanya serapan khas senyawa steroid seperti OH, CH₂, C=C, C=O ester, C-O ester, geminal dimetil -CH(CH₃)₂, serta C-OH sekunder.

ABSTRACT

Maghfiroh, N. 2018. Antioxidant Activity Test of Steroid Isolates Results from Column Chromatography in n-Hexane Fraction of Microalgae *Chlorella* sp. *Thesis*. Chemistry Department, Sains and Technology Faculty, Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang.

Advisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Advisor II: Rif'atul Mahmudah, M.Si; Consultant: Dewi Yuliani, M.Si.

Keywords: *Chlorella* sp., steroid, *Liebermann Burchard*, antioxidant, UV-Vis, FTIR.

Steroids are one of the secondary metabolites found in microalgae *Chlorella* sp. Steroids have several bioactivity, including antioxidants, antibacterial, toxicity, antiinflammatory, antitumor and anticancer. This study aims to determine the antioxidant value of steroid isolate of microalgae *Chlorella* sp. by using column chromatography in the separation. Dry sample of microalgae *Chlorella* sp. macerated extraction using methanol solvent. The concentrated extract of maceration was hydrolyzed with 2 N HCl and continued with n-hexane solvent. The partitioned extract was positive containing steroid compounds with reagent *Liebermann Burchard* (LB). The identification of n-hexane fraction using LC-MS/MS also showed that the n-hexane fraction positively contained stigmasterol, campesterol and β -sitosterol steroid compounds. Separation of steroid compounds was carried out by column chromatography using a ratio of 95:5 eluent n-hexane: ethyl acetate; 90:10; 85:15 and 80:20. Monitoring was carried out by Analytical Thin Layer Chromatography (ATLC). Based on ATLC obtained 1 isolate that assumed contain steroid compound and 3 isolate that assumed contain triterpenoid compounds. Steroid isolates has very strong antioxidant activity with an EC_{50} value of 6,224 ppm. Based on identification using a UV-Vis spectrophotometer obtained the maximum wavelength of steroid isolates is 204 nm. FTIR spectra showed absorption specific functional group of steroid such as –OH, CH₂, C=C, C=O esters, C-O esters, geminal dimethyl –CH (CH₃)₂, and secondary C-OH.

المَلخَص

المغفرة، ن. ٢٠١٩. الاختيارُ النَّشَاطِ المضادةُ للأكسدةِ مِنَ المُنشِطَاتِ المَعزُولَةِ نَتَائِجُ اللَّوْنِيِّ العَمُودِ الهِكْسَانِ الكُسرِ مِيكْرُوأَلْعَا جُلُورِيَا. بحث العلم. كلية العلوم وتكنولوجيا. الجامعة الإسلامية الحكومية مولانا مالك ابراهيم مالانج.

مشرف الأول: أحمد غنام فاشا الماجستير ، مشرفة الثاني: رفعة المحمودة، الماجستير. المششارة:

ديوي يولياني، الماجست

الكَلِمَاتُ الرَّئِيسِيَّةُ: جُلُورِيَا ، المُنشِطَاتُ ، لِيبْرِمَانُ بُورَكَارْدُ ، مُضَادَاتُ الأَكْسِدَةِ ، الأَشْعَةُ فَوْقَ البِنْفَسِجِيَّةِ

المُنشِطَاتُ هِيَ وَاحِدَةٌ مِنَ المُنشِطَاتِ التَّانَوِيَّةِ المَوْجُودَةُ فِي الطَّحَالِبِ الصَّغِيرَةِ جُلُورِيَا. تَحْتَوِي المُنشِطَاتُ عَلَى العَدِيدِ مِنَ النَّشَاطِ الحَيَوِيِّ ، بِمَا فِي ذَلِكَ مُضَادَاتُ الأَكْسِدَةِ وَمُضَادَاتُ الجِرَائِمِ وَالسَّمِيَّةِ وَالمُضَادَةُ لِلإِلْتِهَابَاتِ وَمُضَادَةُ لِلوَرْمِ وَمُضَادَةُ لِلسَّرَطَانِ. تَهْدَفُ هَذِهِ الدِّرَاسَةُ إِلَى تَحْدِيدِ قِيَمَةِ بِاسْتِخْدَامِ العَمُودِ اللَّوْنِيِّ فِي الفَصْلِ. عِيْنَةُ هِيكْسَانَا مِنَ الطَّحَالِبِ الصَّغِيرَةِ مُضَادَاتُ الأَكْسِدَةِ جُزْءٍ جَافَةٍ مِنَ الطَّحَالِبِ جُلُورِيَا اسْتِخْرَاجَ مُتَاكَلَةً بِاسْتِخْدَامِ المِثَانُولِ المَذِيْبَاتِ. تَمَّ تَحْلِيلُ المُنشِطَاتِ هِيكْسَانَانِ كَانِ المُنشِطَاتِ المُقْسَمُ مُوجِبُ يَحْتَوِي عَلَى بِاسْتِخْدَامِ وَاسْتِخْرَاجِ فِي المَرْكَزِ مِنَ هِيكْسَانَانِ أَيْضًا أَنْ جُزْءِ LC-MS/MS هِيكْسَانَانِ بِاسْتِخْدَامِ أَظْهَرَ تَحْدِيدَ جُزْءِ مَرْكَبَاتِ كَاشِفِ تَمَّ تَنْفِيذُ فَصْلِ . السْتوسْتِيرَالِ يَحْتَوِي إِجَابًا عَلَى مَرْكَبَاتِ سْتِيجمَاسْتِيرُولِ ، وَكَاسْتِيرُولِ ، وَسْتِيرُولِ المَرْكَبَاتِ السْتِيرُولِ يَدِيَّةِ بَوَاسِطَةِ تَحْلِيلِ كروماتوجرافي العَمُودِ بِاسْتِخْدَامِ نِسْبَةِ هِيكْسَانَا وَ أَيْلِ اسْتِخْرَاجِ ٩٥:٥ و ٩٠:١٠ و ٨٠:٢٠ . تَمَّ إِجْرَاءُ الرِّصْدِ بَوَاسِطَةِ تَحْلِيلِ كروماتوجرافي عَمُودِ طَبَقَةِ وَحَصِلَ عَلَى مَرْكَبِ سْتِيرُولِ وَاحِدٍ وَ ٣ مَرْكَبَاتِ تِيرَبُويدِيَّةِ مُفْرَدَةً. يَكُونُ لِشَعْرَلِ (KLTA) رَقِيْقَةً تَبْلُغُ جُزْءٍ فِي المِئُوْنِ. بِنَاءً $EC_{50} = 6,235$ السْتِيرُولِ نَشَاطِ مُضَادٍ لِالأَكْسِدَةِ قَوِيٍّ لِلعَايَةِ بِقِيَمَةِ الحِصُولِ عَلَيْهِ ، كَانِ أَقْصَى طَوَّلِ مَوْجِي لِعَزْلِ الَّذِي تَمَّ عَلَى التَّعْرِيفِ بِاسْتِخْدَامِ مُقْيَاسِ الطِّيفِ -OH-، -CH₂-، - FTIR هو ٢٠٤ نانومتر. أَظْهَرَتْ أَطْيَافِ السْتِيرُولِ 2. CH(CH₃) الصَّغِيرَةِ جُلُورِيَا، ثَنَائِي مِثِيلِ الأَحْمَاضِ C-OH ، إِسْتِرَاتِ -C=O-، -C=C-، -CH₃-

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Alam Indonesia memiliki wilayah perairan laut lebih dari 70% dengan kekayaan laut dan keanekaragaman biota laut yang melimpah. Kekayaan laut ini dapat memberikan banyak peluang apabila keberadaannya dimanfaatkan secara maksimal oleh masyarakat dalam berbagai bidang. Sebagaimana telah disebutkan dalam Q.S. an-Nahl ayat 14:

وَهُوَ الَّذِي سَخَّرَ الْبَحْرَ لِتَأْكُلُوا مِنْهُ لَحْمًا طَرِيًّا وَتَسْتَخْرِجُوا مِنْهُ حِلْيَةً تَلْبَسُونَهَا وَتَرَى
مَوَاحِرَ الثَّمَلِكِ فِيهِ وَلِتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ وَلِعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ

“Dan Dialah, Allah yang menundukkan lautan (untukmu), agar kamu dapat memakan daripadanya daging yang segar (ikan), dan kamu mengeluarkan dari lautan itu perhiasan yang kamu pakai; dan kamu melihat bahtera berlayar padanya, dan supaya kamu mencari (keuntungan) dari karuniaNya, agar supaya kamu bersyukur”

Q.S. an-Nahl ayat 14 di atas menjelaskan bahwa laut merupakan karunia dari Allah SWT. Lafaz *وَلِتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ* mengandung makna bahwa Allah SWT memerintahkan manusia untuk mencari rezeki dari karuniaNya, yaitu sumber daya hayati laut. Sumber hayati laut yang memiliki banyak manfaat adalah biota laut. Biota laut memiliki keanekaragaman yang tinggi, baik hewan maupun tumbuhan laut atau fitoplankton. Alga merupakan salah satu jenis fitoplankton yang memiliki jenis ukuran beragam baik yang berukuran besar (makroalga) ataupun kecil (mikroalga). Salah satu jenis mikroalga yang memiliki banyak manfaat dan sering digunakan sebagai objek penelitian adalah mikroalga *Chlorella* sp.

Mikroalga merupakan tumbuhan tingkat rendah yang hidup di perairan, baik perairan laut maupun tawar. Daur hidup mikroalga relatif cepat dan mudah untuk dibudidayakan sehingga sangat menguntungkan untuk digunakan sebagai objek penelitian (Hadiyanto dan Azim, 2012). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *Chlorella* sp. memiliki banyak bioaktivitas seperti aktivitas antioksidan, antibakteri, toksisitas, antikanker, antitumor, dan sebagainya (Aziz, 2014).

Aktivitas biologis dan farmakologis *Chlorella* sp. disebabkan oleh senyawa metabolit sekunder di dalamnya. Berdasarkan penelitian Bariyyah, Fasya, Abidin dan Hanapi (2013), senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam *Chlorella* sp. diantaranya adalah steroid, tanin dan asam askorbat. Salah satu jenis senyawa metabolit sekunder *Chlorella* sp. yang diketahui memiliki banyak bioaktivitas adalah senyawa steroid. Bioaktivitas senyawa steroid mikroalga *Chlorella* sp. diantaranya adalah antioksidan (Bariyyah, dkk., 2013), toksisitas (Millati, 2016), antibakteri (Amaliyah, dkk., 2013), antidiabetes (Wahyuni, 2016) dan antiinflamasi (Yosti, 2017). Berdasarkan hal tersebut, maka penting untuk mengisolasi senyawa steroid *Chlorella* sp. dan mengetahui bioaktivitasnya agar dapat dimanfaatkan secara maksimal.

Isolasi senyawa steroid *Chlorella* sp. dapat dilakukan dengan ekstraksi maserasi. Menurut beberapa penelitian, metanol mampu menghasilkan rendemen ekstrak yang cukup tinggi. Bariyyah, dkk., (2013) melakukan ekstraksi maserasi *Chlorella* sp. dengan variasi pelarut metanol (polar) dan etil asetat (semi polar). Hasil rendemen ekstrak metanol adalah 7,001% sedangkan rendemen ekstrak etil asetat adalah 3,673%. Selain itu keuntungan metanol adalah memiliki titik didih yang relatif rendah, yaitu 64,7°C sehingga mudah untuk diuapkan.

Pemisahan hasil ekstrak yang lebih spesifik dilakukan dengan cara hidrolisis dan partisi menggunakan pelarut yang memiliki kepolaran sama dengan kepolaran senyawa target. Partisi pada penelitian ini akan menggunakan pelarut nonpolar n-heksana sesuai dengan senyawa steroid target yang cenderung bersifat nonpolar. Pemilihan pelarut tersebut juga didasarkan pada penelitian Anggraeni, dkk (2014) yang telah melakukan partisi ekstrak metanol *Chlorella* sp. dengan variasi pelarut n-heksana, petroleum eter, kloroform dan etil asetat. Rendemen yang dihasilkan berturut-turut adalah 45,6134%; 8,1854%; 7,5573% dan 7,4377%. Pada penelitian ini, dilakukan identifikasi senyawa steroid pada fraksi n-heksana menggunakan reagen LB serta diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS dengan 10 senyawa steroid target. Sehingga identifikasi akhir pada isolat akan difokuskan pada senyawa steroid yang positif saat identifikasi fraksi.

Senyawa steroid dapat diisolasi lebih lanjut dengan metode kromatografi kolom. Menurut Rosyidah (2011) campuran n-heksana dan etil asetat sangat efektif untuk memisahkan senyawa terpenoid dan turunannya. Solikah (2016) telah mengisolasi steroid dari alga merah (*Eucheuma spinosum*), hasil pemisahan terbaik adalah pada perbandingan eluen n-heksana:etil asetat (17:3) dengan didapatkan isolat steroid hingga 0,55 mg. Pada penelitian ini, pemisahan senyawa steroid dilakukan dengan metode kromatografi kolom menggunakan eluen campuran antara n-heksana dan etil asetat

Sistem elusi kromatografi kolom dalam penelitian ini akan dilakukan secara gradien menggunakan perbandingan eluen n-heksana:etil asetat 95:5; 90:10 dan 85:15 masing-masing sebanyak 100 mL. Elusi kemudian dilanjutkan dengan perbandingan eluen n-heksana:etil asetat 80:20 sebanyak 300 mL. Penggunaan metode elusi gradien merujuk pada penelitian Etika (2014) yang memisahkan

senyawa steroid dengan kromatografi kolom menggunakan sistem elusi gradien. Pemisahan tersebut menghasilkan pemisahan senyawa steroid yang baik, yaitu dengan dihasilkannya noda tunggal dan nilai *R_f* yang berbeda-beda pada saat monitoring dengan KLTA. Pemilihan eluen n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 80:20 dilakukan untuk memaksimalkan pemisahan senyawa steroid.

Hasil pemisahan terbaik senyawa steroid dalam penelitian ini dilakukan uji aktivitas antioksidan terhadap DPPH. Menurut Bariyyah, dkk., (2013) senyawa steroid *Chlorella* sp. memiliki aktivitas antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat reaksi oksidasi dalam tubuh yang dapat menimbulkan berbagai macam penyakit (Winarsi, 2007). Jenis senyawa steroid *Chlorella* sp. yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan adalah β -sitosterol dan kampesterol (Rahmawati, 2017). Identifikasi senyawa steroid pada penelitian ini dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan LC-MS/MS.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas antioksidan senyawa steroid hasil isolasi kromatografi kolom fraksi n-heksana *Chlorella* sp. terhadap DPPH ?
2. Bagaimana identifikasi senyawa steroid hasil kromatografi kolom fraksi n-heksana *Chlorella* sp. menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan LC-MS/MS.

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui aktivitas antioksidan senyawa steroid hasil isolasi kromatografi kolom fraksi n-heksana *Chlorella* sp. terhadap DPPH.

2. Untuk mengetahui hasil identifikasi senyawa steroid hasil kromatografi kolom fraksi n-heksana *Chlorella* sp. menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan LC-MS/MS.

1.4 Batasan Masalah

1. Isolat *Chlorella* sp. berasal dari Laboratorium Fisiologi Tumbuhan UIN Malang.
2. Kultivasi *Chlorella* sp. dalam medium ekstrak tauge (MET) 4%.
3. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol.
4. Hidrolisis dan partisi *Chlorella* sp. menggunakan pelarut n-heksana.
5. Identifikasi senyawa steroid dalam fraksi n-heksana dilakukan dengan uji fitokimia dan identifikasi menggunakan LC-MS.
6. Pemisahan senyawa steroid menggunakan kromatografi kolom dengan perbandingan eluen n-heksana:etil asetat 95:5; 90:10; 85:15 dan 80:20.
7. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.
8. Identifikasi senyawa steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan LC-MS/MS.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi tentang perbandingan terbaik eluen n-heksana dan etil asetat dalam pemisahan senyawa steroid menggunakan kromatografi kolom.
2. Memberikan informasi tentang aktivitas antioksidan yang dimiliki senyawa steroid *Chlorella* sp. fraksi n-heksana hasil pemisahan kromatografi kolom.
3. Memberikan informasi tentang jenis senyawa steroid yang terdapat dalam *Chlorella* sp. fraksi n-heksana hasil pemisahan kromatografi kolom.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Manfaat Tumbuhan dalam Perspektif Islam

Allah SWT telah menciptakan beragam jenis makhluk di bumi hingga membentuk suatu sistem yang teratur dan seimbang, baik di daratan maupun di lautan, baik tumbuhan maupun hewan. Tidak ada satupun makhluk ciptaan Allah SWT yang tidak memiliki nilai dan manfaat. Makhluk-makhluk tersebut diciptakan oleh Allah SWT senantiasa agar manusia berfikir dan mempelajari segala sesuatu yang ada di bumi sesuai dengan *sunnatullah* dalam rangka lebih mendekatkan diri pada Sang Khaliq. Hal tersebut sesuai dengan firman Allah SWT dalam Q.S. Luqman ayat 10 yang menjelaskan tentang keanekaragaman tumbuhan.

خَلَقَ السَّمَاوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا وَالْأَرْضِ رَوَسِيٍّ أَنْ تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

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

Menurut tafsir Qur'an Quraish Shihab, makna dari lafadz زَوْجٍ كَرِيمٍ adalah tumbuhan yang beraneka ragam dan membawa kebaikan. Tumbuhan yang baik menurut tafsir al-Mishbah adalah tumbuhan yang subur dan bermanfaat (Shihab, 2002). Allah SWT telah menumbuhkan bermacam-macam tumbuhan yang baik untuk makhlukNya khususnya manusia, yaitu tumbuhan yang bermanfaat. Manfaat tumbuhan dalam perspektif islam telah disebutkan dalam buku tafsir Al

Qur'an yang disusun oleh Departemen Agama RI tentang Pelestarian Lingkungan Hidup. Tumbuhan memiliki peran sebagai sumber makanan, baik untuk manusia maupun untuk hewan.

Manfaat tumbuhan dan tanaman banyak dijelaskan dalam Al-Qur'an. Firman Allah SWT dalam surat an-Nahl: 29 menjelaskan bahwa tanaman yang telah diciptakan Allah SWT masing-masing memiliki manfaat. Hal tersebut kembali ditegaskan oleh Allah SWT dalam Q.S. asy-Suara' ayat 80 bahwa ketika Allah SWT memberikan nikmat sakit, maka Allah SWT juga yang akan kuasa menyembuhkannya. Manfaat tumbuhan juga dijelaskan dalam hadist riwayat Bukhari dan Muslim (7: 25) yang menjelaskan bahwa segala macam tumbuhan dapat digunakan sebagai obat untuk segala penyakit, kecuali satu yaitu sakaratul maut.

Tumbuhan yang diciptakan oleh Allah SWT bermacam-macam bentuk, warna, rasa, bau dan ukurannya. Masing-masing memiliki manfaat tersendiri. Tidak hanya tumbuhan terlihat jelas oleh mata, namun juga yang berukuran mikro dan kasat mata. Salah satu tumbuhan tingkat rendah dan berukuran mikro yang diketahui memiliki banyak manfaat adalah mikroalga. Jenis mikroalga yang paling sering diteliti saat ini adalah *Chlorella* sp.

2.2 Mikroalga *Chlorella* sp.

Mikroalga *Chlorella* sp. merupakan jenis *Chlorophyta* (alga hijau). Mikroalga *Chlorella* sp. mengandung klorofil hijau sehingga dapat melangsungkan fotosintesis. *Chlorella* sp. memegang peranan penting, yaitu sebagai produsen primer dalam sistem rantai makanan organisme akuatik. *Chlorella* sp. termasuk tumbuhan tingkat rendah karena tidak memiliki akar,

batang dan daun (Wirosaputro, 2002) sesuai morfologinya pada Gambar 2.1.

Menurut Bold dan Wyne (1988), klasifikasi *Chlorella* sp. adalah sebagai berikut:

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



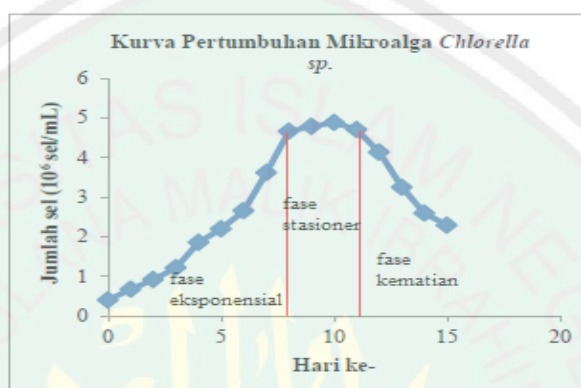
Gambar 2.1 Sel mikroalga *Chlorella* sp. (Kodama dan Fujshima, 2009).

Proses menumbuhkan *Chlorella* sp. dalam suatu medium disebut kultivasi. Media kultivasi *Chlorella* sp. harus diperhatikan karena sangat berpengaruh pada pertumbuhannya. Menurut Chumadi, dkk (1992) *Chlorella* sp. dapat tumbuh optimum pada media yang mengandung cukup unsur hara seperti nitrogen, karbon, kalsium, magnesium, kalium dan fosfor. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi pertumbuhan *Chlorella* sp. antara lain (Dewi dan Gultom, 2009):

- 1) *Chlorella* sp. tumbuh optimum pada suhu 25 – 30°C;
- 2) Fotosintesis *Chlorella* sp. membutuhkan intensitas cahaya rata-rata 4000 – 3000 lux;
- 3) pH optimum pertumbuhan *Chlorella* sp. berkisar antara 6,6 – 7,3 (Nielsen, 1995).

Hasil penelitian Wulandari, dkk (2010) menunjukkan bahwa penggunaan Media Ekstrak Tauge (MET) sebagai media kultivasi *Chlorella* sp. dapat menghasilkan pertumbuhan *Chlorella* sp. dengan pesat. Prihantini, dkk (2007) telah mengoptimasi konsentrasi MET terhadap pertumbuhan mikroalga *Scenedesmes*. Hasilnya menunjukkan bahwa pada MET konsentrasi 4%

menghasilkan kerapatan sel *Scenedesmes* yang tertinggi yaitu 3.981.071 sel/mL pada hari ke-10 pengamatan kultivasi. Oleh karena itu pemanenan *Chlorella* sp. juga dilakukan pada hari ke-10 kultivasi saat sel *Chlorella* sp. mencapai jumlah tertinggi sesuai dengan kurva pertumbuhan *Chlorella* sp. pada Gambar 2.2. (Prayitno, 2016).



Gambar 2.2 Kurva pertumbuhan *Chlorella* sp. dalam MET 4% (Fasya, dkk., 2013)

2.3 Kandungan dan Manfaat Mikroalga *Chlorella* sp.

Chlorella sp. mengandung hampir semua unsur dan kandungan gizi lengkap yang diperlukan oleh manusia seperti protein, lemak, karbohidrat, mineral, serat, zat besi, klorofil, β -carotene, *Chlorella* Growth Factor (CGF) dan sebagainya. Menurut Sargowo dan Ratnawati (2005), *Chlorella* sp. mengandung 60,5% protein; 11% lemak; 20,1% karbohidrat; 4,6% mineral dan 0,2% serat. Pada berat kering yang sama, *Chlorella* sp. mengandung vitamin A, B, E, D dan K 30 kali lebih banyak dari pada vitamin yang terdapat dalam hati sapi (Kawaroe, 2010).

Chlorella sp memiliki banyak manfaat baik untuk lingkungan maupun untuk manusia. *Chlorella* sp. dapat mengabsorpsi logam berat limbah dan gas CO₂ penyebab efek rumah kaca (Handayani, dkk., 2012). *Chlorella* sp. juga dapat

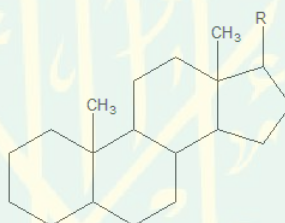
menghasilkan komponen bioaktif yang bermanfaat dalam bidang kedokteran. *Chlorella* sp. telah diproduksi secara komersial sebagai *health food*, baik untuk pakan ternak alami maupun untuk *food additive* melalui pembuatan suplemen *Chlorella* sp. (Wenno, dkk., 2010). Manfaat lain dari mikroalga *Chlorella* sp. adalah dapat menetralkan senyawa racun dalam tubuh melalui aktivitas-aktivitas biologis dan farmakologis yang dimilikinya (Susilo, 2017).

Mikroalga *Chlorella* sp. juga memiliki aktivitas biologis dan farmakologis yang bermacam-macam (Steenblock, 1996). Aktivitas biologis tersebut seperti aktivitas antioksidan (Bariyyah, dkk., 2013), antibakteri (Amaliyah, dkk., 2013), antikanker, antitumor, toksisitas (Millati, 2016) dan antiinflamasi (Wahyuni, 2015). Bioaktivitas tersebut dimiliki mikroalga *Chlorella* sp. karena adanya kandungan senyawa metabolit sekunder dalam mikroalga *Chlorella* sp.

Metabolit sekunder merupakan senyawa khas yang disintesis oleh jaringan tubuh makhluk hidup dan dapat digunakan untuk proses metabolismenya (Sudibyo, 2002). Menurut Yosti (2017), manfaat senyawa metabolit sekunder *Chlorella* sp. adalah sebagai bahan komersial alami yang aman, dapat digunakan sebagai obat tradisional serta memiliki peran sebagai proteksi untuk melawan penyakit (antioksidan). Senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam mikroalga *Chlorella* sp. diantaranya adalah steroid, tanin, asam askorbat dan flavonoid (Fasya, dkk., 2013), (Bariyyah, dkk., 2013), (Iyani, 2017). Dinasti (2017) meneliti bahwa fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella* sp. mengandung senyawa steroid dan memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan nilai $EC_{50} = 18,61$ ppm. Penelitian yang telah dilakukan oleh Rahmawati (2016) juga menyatakan bahwa fraksi petroleum *Chlorella* sp. memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai $EC_{50} = 73,82$ ppm.

2.4 Senyawa Steroid

Steroid merupakan salah satu kelompok senyawa dari bahan alam yang dapat ditemukan hampir disemua jaringan makhluk hidup, termasuk tumbuhan tingkat rendah seperti mikroalga *Chlorella* sp. Menurut Aziz (2014), steroid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang berperan dalam pertahanan terhadap musuh atau zat patogen dalam tubuh. Senyawa steroid dapat diuji secara fitokimia menggunakan reagen *Liebermann Burchard* (LB). Hasil positif steroid akan ditunjukkan dengan berubahnya warna larutan menjadi hijau kebiruan hingga gelap (kehitaman) pada sampel (Sugiyanto, 2012). Struktur dasar senyawa steroid ditunjukkan oleh Gambar 2.3.

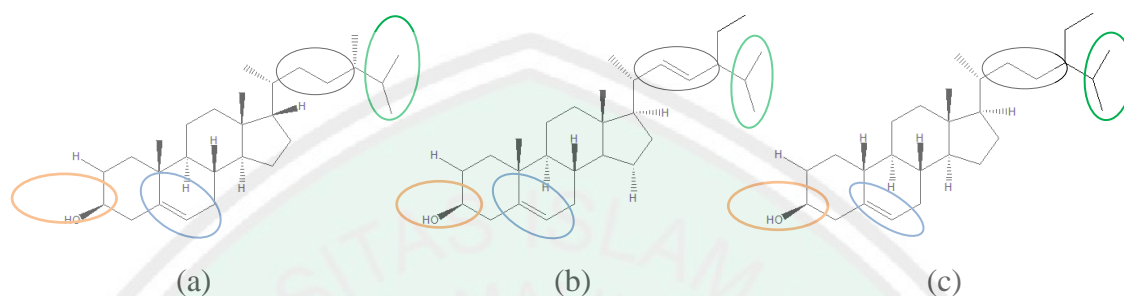


Gambar 2.3 Struktur dasar senyawa steroid (Illing, Safitri dan Erfiana, 2017)

Steroid yang terdapat dalam jaringan tumbuhan disebut juga dengan fitosterol yang termasuk ke dalam kelompok steroid alkohol. Fitosterol memiliki beberapa manfaat, yaitu dapat digunakan untuk menjaga keseimbangan membran fosfolipid dari sel tumbuhan. Jenis fitosterol yang umum terkandung dalam tumbuhan adalah kampesterol, stigmasterol, kolesterol, β -sitosterol, brasikasterol, fukosterol, kolestanon dan ergosterol (Moreau, dkk., 2002).

Iyani (2017) telah melakukan pemisahan senyawa steroid fraksi petroleum eter *Chlorella* sp. dengan kromatografi kolom basah. Identifikasi senyawa steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan LC-MS/MS. Hasil yang diperoleh adalah, isolat steroid tersebut adalah jenis senyawa steroid β -sitosterol,

stigmasterol, dan campesterol. Masing-masing struktur ketiga senyawa steroid tersebut memiliki struktur dan gugus fungsi yang berbeda seperti pada Gambar 2.4.



Keterangan:

Biru: C=C tidak terkonjugasi, Merah: -OH sekunder, Hijau: Gem dimetil, Hitam : -CH₂-

Gambar 2.4 Struktur steroid (a) Campesterol; (b) Stigmasterol; (c) β -sitosterol (Iyani, 2017)

Suryati (2011) mengisolasi steroid dari daun tumbuhan barito (*Ficus deltoideus* Jack). Hasil identifikasi berdasarkan IR, H-NMR, C-NMR dan MS menunjukkan adanya senyawa steroid jenis β -sitosterol. Hal yang sama juga dilakukan oleh Etika & Suryelita (2014) juga mengisolasi steroid dari daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). Hasil identifikasi berdasarkan H-NMR dan C-NMR menunjukkan adanya senyawa steroid jenis stigmasterol.

Struktur dan macam-macam senyawa steroid dalam setiap jaringan tubuh makhluk hidup sangatlah beragam. Senyawa steroid dalam mikroalga *Chlorella* sp. sebagian besar bersifat nonpolar dan sebagian bersifat polar. Oleh karena itu isolasi senyawa steroid harus menggunakan pelarut dan metode pemurnian yang sesuai. Sulastry dan Kurniawati (2010) menyatakan bahwa isolasi bahan alam terdiri dari empat tahap penting, yaitu maserasi, pemisahan, pemurnian serta identifikasi.

2.5 Ekstraksi Senyawa Aktif *Chlorella sp.*

2.5.1 Ekstraksi Maserasi

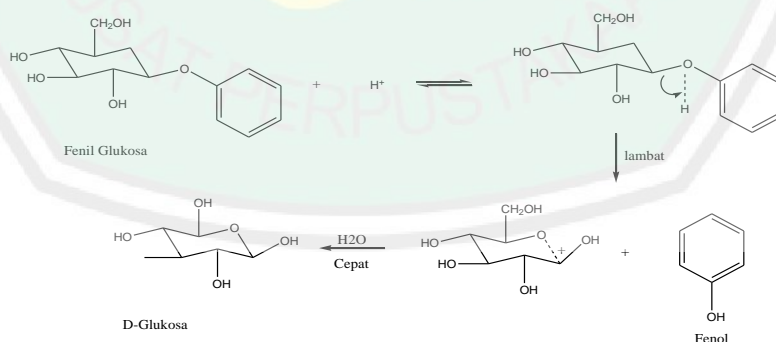
Ekstraksi maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan untuk mengekstrak senyawa dari bahan alam dengan cara perendaman. Kelebihan ekstraksi maserasi adalah tidak ada pemanasan yang dapat mempengaruhi senyawa dalam sampel. Menurut Lenny (2006), prinsip maserasi yaitu adanya proses difusi pelarut ke dalam sel. Difusi pelarut mengakibatkan terjadinya perbedaan konsentrasi antara cairan di dalam dan di luar sel yang mengakibatkan sel menjadi pecah (lisis) sehingga senyawa aktif akan dilepaskan ke luar sel. Peristiwa tersebut terjadi berulang-ulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara cairan diluar dan di dalam sel. Ekstraksi maserasi dapat dioptimalkan dengan pengadukan atau *shaking* untuk memaksimalkan ekstraksi dan menjaga kestabilan keseimbangan derajat perbedaan konsentrasi (Lenny, 2006).

Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi akan mempengaruhi keberhasilan ekstraksi. Dalam penelitian ini akan digunakan pelarut metanol untuk ekstraksi maserasi. Metanol juga dapat menarik analit yang berupa alkaloid, glukosa, steroid, saponin dan flavonoid dari tanaman (Jenie, *et al.*, 2005). Menurut Imamah, dkk., (2015) pelarut yang sesuai untuk ekstraksi maserasi bahan alam adalah metanol *p.a* dengan perbandingan 1:5. Aziz (2014) juga menyatakan bahwa pelarut metanol memiliki *extracing power* (daya ekstraksi) yang luas sehingga mampu mengekstrak metabolit sekunder secara maksimal. Fasya (2016) dan Iyani (2017) mengisolasi senyawa aktif *Chlorella sp.* dengan ekstraksi

maserasi menggunakan pelarut metanol. Rendemen ekstrak metanol yang dihasilkan berturut-turut adalah 21,89% dan 23,79%.

2.5.2 Hidrolisis dan Partisi

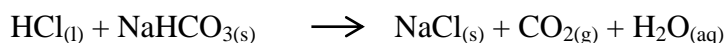
Hidrolisis merupakan ekstraksi lanjutan yang dilakukan untuk memperoleh ekstrak yang lebih murni (Day, 2002). Senyawa organik dalam tumbuhan terdapat dalam bentuk senyawa glikon dengan ikatan glikosida sehingga perlu dihidrolisis untuk memecahnya. Hidrolisis adalah reaksi antara suatu senyawa dengan air agar senyawa tersebut dapat terurai (Handoko, 2016). Dalam penelitian ini digunakan asam sebagai katalis untuk mempercepat proses hidrolisis. Asam yang digunakan adalah asam kuat HCl 2 N karena pada konsentrasi 2 N laju reaksi HCl lebih cepat ($0,052 \text{ min}^{-1}$) dibandingkan pada konsentrasi 1 N ($0,036 \text{ min}^{-1}$) (Tasic, dkk., 2009). Selain itu, HCl dipilih karena akan membentuk garam NaCl yang tidak berbahaya saat dinetralkan dengan basa NaHCO_3 (Setiawan, 2015). Dugaan reaksi hidrolisis menurut Lawoko, Deshpande dan Heiningen (2009) ditunjukkan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Dugaan Reaksi Hidrolisis phenyl-β-D-glucopyranoside

Reaksi Hidrolisis diberhentikan dengan cara penetralan. Penetreralan dilakukan dengan menambahkan basa NaHCO_3 seperti reaksi yang terjadi pada

Gambar 2.6. Penetralan dilakukan karena glikosida bersifat stabil pada kondisi netral (Fessenden dan Fessenden, 1986). Hasil hidrolisis dapat dipisahkan lebih lanjut dengan metode partisi menggunakan pelarut yang kepolarannya sama.



Gambar 2.6 Reaksi penetralan antara HCl dan NaHCO₃ (Mardiyah, 2012)

Proses partisi didasarkan pada ekstraksi cair-cair yang merupakan teknik pemisahan zat-zat terlarut diantara dua cairan yang berbeda kepolarannya (Septiandari, 2016). Proses partisi dalam penelitian ini menggunakan pelarut n-heksana untuk memperoleh fraksi n-heksana. Pemilihan pelarut n-heksana didasarkan atas penelitian Anggraeni, dkk., (2014) yang mengekstrak senyawa aktif mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan variasi pelarut n-heksana, petroleum eter, kloroform, etil asetat dan air. Rendemen yang dihasilkan masing-masing adalah 45,6132%; 8,1854%; 7,5573%; 7,4377% dan 10,0897%. Selain itu Utami (2012) juga mengekstrak senyawa aktif mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan variasi pelarut n-heksana, petroleum eter, kloroform, etil asetat dan air. Rendemen masing-masing yang dihasilkan adalah 44,85%; 10,41%; 9,94%; 9,09% dan 11,68%.

2.6 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom

Pemisahan senyawa atau pemurnian adalah suatu tahap yang penting dalam proses isolasi. Salah satu metode pemisahan senyawa adalah metode kromatografi. Pemisahan atau pemurnian senyawa steroid dapat dilakukan dengan beberapa metode, salah satunya adalah metode kromatografi kolom. Menurut Saleh, (2007) salah satu pemisahan terbaik untuk senyawa steroid adalah dengan metode kromatografi kolom.

Pemisahan senyawa steroid dalam penelitian ini menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam Silika gel G-60 F₂₅₄ (0,063 – 0,200 mm) karena memiliki struktur berpori dan juga memiliki ukuran partikel yang kecil. Permukaan silika gel tersebut mengandung gugus hidroksil. Gugus hidroksil merupakan pusat aktif dan mampu membentuk ikatan hidrogen yang kuat dengan senyawa polar yang terkandung pada sampel yang akan dipisahkan (Noviyanti, 2010).

Sampel yang melewati kolom akan berinteraksi dengan fase diam silika dan fase gerak eluen yang berupa interaksi absorpsi dengan daya absorpsi yang berbeda. Sebagian sampel teradsorpsi ke dalam pori-pori yang lebih dalam dan akan tertahan lebih lama dengan disertai perpindahan massa. Perpindahan massa tersebut membutuhkan waktu yang berbeda sehingga akan mempengaruhi pemisahan senyawa di dalam kolom (Rohman, 2009).

Fase gerak dalam kromatografi kolom akan sangat mempengaruhi pemisahan senyawanya. Menurut Rosyidah (2011) eluen campuran antara n-heksana:etil asetat yang telah diujikan sangat efektif untuk memisahkan senyawa terpen seperti, triterpenoid dan steroid. Aziz (2014) juga menyatakan bahwa fase gerak untuk profiling metabolit sekunder bahan alam yaitu kombinasi antara kloroform dengan metanol atau n-heksana dengan etil asetat. Kombinasi tersebut harus memiliki komposisi eluen nonpolar lebih banyak daripada komposisi eluen polar.

Elusi fase gerak dapat dilakukan dengan menggunakan metode gradien dan isokratik. Metode elusi isokratik dilakukan tanpa ada variasi komposisi eluen, sedangkan metode elusi secara gradien dilakukan dengan variasi komposisi eluen. Berdasarkan penelitian Majidah (2019) dan Fasya (2018) menyatakan bahwa

sistem elusi gradien dengan eluen campuran n-heksana:etil asetat yang cenderung nonpolar dapat menghasilkan fraksi tunggal steroid. Rahmawati (2017), telah melakukan pemisahan senyawa triterpenoid dan steroid alga merah menggunakan kromatografi kolom dengan model elusi gradien. Hasil yang didapatkan adalah 1 isolat yang diduga mengandung senyawa steroid dan 3 isolat diduga mengandung senyawa terpenoid.

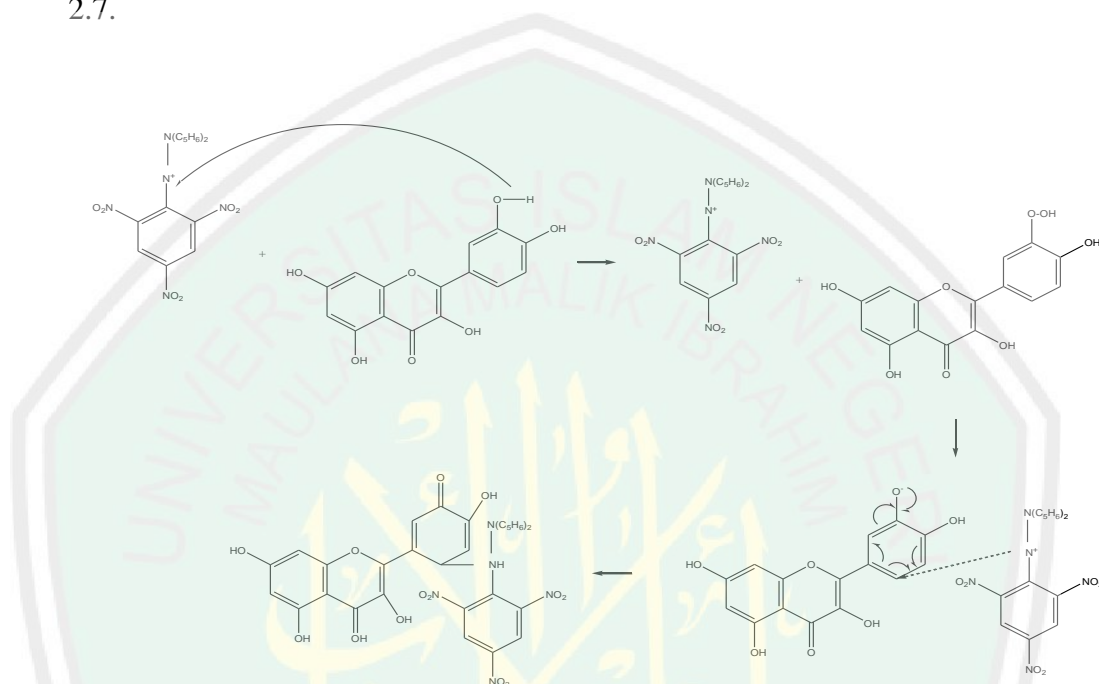
Prinsip utama sistem elusi gradien adalah didasarkan pada polaritas sistem eluen yang ditingkatkan secara perlahan. Sistem elusi gradien memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan sistem elusi isokratik. Pada elusi secara gradien, sifat kepolaran fase gerak akan terus berubah secara sistematis, sehingga komponen dengan sifat kepolaran yang berbeda dapat terpisahkan (Badrunato, 2013).

Fraksi hasil kromatografi kolom dilakukan monitoring dengan KLTA sebagai fase diam dan fase gerak eluen n-heksana:etil asetat. Azah (2019) melakukan pemisahan senyawa steroid *Hydrilla verticillata* dengan KLT menggunakan campuran eluen terbaik n-heksana:etil asetat 3,75:1,25. Hasil yang diperoleh adalah perbandingan eluen tersebut dapat memisahkan senyawa dengan baik karena menghasilkan 13 spot dengan warna dan *R_f* yang berbeda hingga diperoleh 2 fraksi senyawa steroid murni.

2.7 Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH

Aktivitas antioksidan adalah kemampuan senyawa untuk menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas yang sangat reaktif (Winarsi, 2007). Salah satu metode yang paling umum untuk uji aktivitas antioksidan adalah metode DPPH. Metode DPPH merupakan metode yang sederhana, cepat dan tidak

membutuhkan banyak reagen seperti metode lain. DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu ruang dan sering digunakan untuk uji aktivitas antioksidan (Molyneux, 2004). Mekanisme reaksi DPPH dengan senyawa flavonoid yang telah diketahui memiliki aktivitas sebagai antioksidan ditampilkan pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Mekanisme reaksi antara radikal DPPH dengan antioksidan flavonoid (Molyneux, 2004)

Pada reaksi di atas terjadi transfer proton Hidrogen dari senyawa antioksidan pada molekul radikal DPPH (DPPH direduksi oleh molekul antioksidan) sehingga radikal DPPH akan terstabilkan oleh adanya donor tersebut. Molekul radikal akan kehilangan satu atom hidrogennya sehingga terbentuk senyawa radikal baru dari senyawa antioksidan. Namun, radikal baru senyawa antioksidan ini tidak berbahaya dan akan tetap terstabilkan oleh adanya resonansi (Molyneux, P., 2004).

Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menggunakan prinsip spektrofotometri. Peningkatan jumlah DPPH tereduksi akan ditandai

dengan berubahnya warna ungu tua menjadi merah muda atau kuning pucat. Reaksi ini dapat diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis sehingga aktivitas antioksidan dalam sampel dapat ditentukan. Senyawa DPPH dalam metanol berwarna ungu tua terdeteksi pada panjang gelombang sinar tampak sekitar 515 – 518 nm setelah diinkubasi pada waktu kestabilannya (Hanani, dkk., 2005). Aktivitas penangkapan radikal bebas dapat dinyatakan dengan satuan persen (%) aktivitas antioksidan seperti pada Persamaan 3.2.

Parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian DPPH adalah dengan nilai *Efficiency Concentration* (EC_{50}) yang merupakan konsentrasi larutan substrat atau sampel yang mampu mereduksi DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai EC_{50} maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya (Molyneux, P., 2004). Aktivitas antioksidan sangat kuat apabila nilai $EC_{50} < 50$ ppm, kuat apabila nilai EC_{50} dalam rentang 50 - 100 ppm, sedang jika nilai EC_{50} antara 101 – 150 ppm dan rendah ketika nilai EC_{50} 150 – 200 ppm (Wulandari, dkk., 2010).

2.8 Identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis adalah salah satu instrumen yang memiliki fungsi untuk mengetahui nilai gelombang maksimum suatu senyawa sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi jumlah ikatan rangkap atau konjugasi aromatik. Adanya radiasi elektromagnetik dari sinar UV-Vis terhadap suatu molekul akan menyebabkan terjadinya absorpsi sinar UV-Vis oleh molekul. Absorpsi ini akan diukur oleh detektor pada berbagai panjang gelombang dan diinformasikan ke recorder untuk menghasilkan spektrum. Spektrum ini akan memberikan informasi penting untuk identifikasi adanya gugus kromofor (Hendayana, 2006). Absorpsi ini akan menyebabkan terjadinya transisi elektronik.

Transisi elektronik merupakan berpindahnya elektron dari tingkat energi yang lebih rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi dengan menyerap sejumlah energi dan direpresentasikan dengan serapan panjang gelombang (Sastrohamidjojo, H., 1998). Transisi dapat terjadi pada orbital anti ikatan ataupun orbital ikatan. Panjang gelombang maksimum yang diserap oleh sampel akan sebanding dengan perbedaan energi tingkat orbital (ΔE). Transisi ini akan terjadi didaerah UV-Vis pada panjang gelombang 200-800 nm. Terdapat 4 tipe transisi elektronik pada molekul, yaitu transisi $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$ dan $n \rightarrow \pi^*$ (Panji, 2012).

Struktur molekul steroid dengan cincin diena dan perbedaan konjugasinya menjadikan steroid memiliki serapan panjang gelombang yang berbeda-beda. Susilawati (2010), menganalisis steroid dengan UV-Vis pada rentang panjang gelombang 200 nm – 400 nm. Fasya (2016) juga mengekstrak steroid dari mikroalga *Chlorella* sp. Identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan panjang gelombang senyawa steroid yaitu 204 nm pada fraksi etil asetat. Aprelia (2013) juga memperoleh panjang gelombang maksimum senyawa steroid dari tumbuhan paku adalah 203 nm. Panjang gelombang 204 dan 203 menunjukkan bahwa steroid hasil isolasi memiliki ikatan rangkap yang tak terkonjugasi dengan transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$. Hal ini sesuai dengan kaidah *Woodward* bahwa senyawa steroid dengan ikatan rangkap terkonjugasi menyumbang serapan panjang gelombang sebesar 214 nm.

2.9 Identifikasi dengan FTIR

Spektrofotometer FTIR adalah instrumen yang digunakan untuk mendeteksi gugus fungsi suatu senyawa menggunakan energi radiasi Inframerah

(Day, 2002). Senyawa yang dianalisis akan berinteraksi dengan radiasi Inframerah (IR) dan akan menyebabkan terjadinya vibrasi molekular pada ikatan kovalennya. Vibrasi yang terjadi digunakan sebagai dasar untuk mengidentifikasi gugus fungsi suatu senyawa. Setiap senyawa akan memiliki serapan IR yang khas karena gugus-gugusnya berbeda (Hidayah, 2015).

Solikhah (2016) mengisolasi senyawa steroid dari alga merah dengan metode kromatografi kolom. Hasil isolasi dilakukan identifikasi menggunakan FTIR. Selain itu Safitri, (2016) juga melakukan pemisahan senyawa steroid dari mikroalga *Chlorella* sp. dengan metode kromatografi kolom cara basah dan kering. Identifikasi senyawa steroid dilakukan dengan spektrofotometer FTIR menghasilkan beberapa serapan yang khas pada senyawa hasil isolasi. Serapan-serapan yang khas tersebut diduga adalah serapan senyawa steroid. Interpretasi serapan dari kedua penelitian tersebut ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Interpretasi spektra FTIR senyawa steroid mikroalga *Chlorella* sp.

Jenis vibrasi	Bilangan gelombang (cm^{-1})		Referensi (cm^{-1})
	Solikhah (2016)*	Safitri (2016)**	
OH ulur	3448	3424 dan 3450	3550-3230 (Socrates, 1994)
C-H ulur	2929	2925	2960-2870 (Supratman, 2010)
- CH ₂ -	2859	2854	2870-2840 (Socrates, 1994)
C=O	1738	1734 dan 1735	1750-1730 (Supratman, 2010)
C-C	1462	1463	1454-1384 (Suryani, 2011)
C(CH ₃) ₂	1383	1380 dan 1382	1395-1365 (Socrates, 1994)
C-O	1259 dan 1174	1237 dan 1187	1300-1100 (Socrates, 1994)
C-OH sekunder	1063	1079	1024-1087 (Supratman, 2010)

2.10 Identifikasi dengan LC-MS/MS

LC-MS/MS merupakan salah satu instrumen dengan teknik gabungan, yaitu berdasarkan pemisahan secara fisik menggunakan kromatografi cair (*Liquid*

chromatography) yang menghasilkan ion dan pemisahan massa (MS) yang memisahkan ion. Komponen utama tersebut memiliki beberapa jenis. Penggunaan komponen pada LC-MS/MS disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dianalisis dengan kekurangan dan kelebihan masing-masing.

Identifikasi dengan LC-MS/MS pada penelitian ini menggunakan sumber ionisasi jenis APCI yang bekerja dengan menggunakan teknik ionisasi kimia pada tekanan atmosfer (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*). Teknik ini umumnya digunakan untuk menganalisis senyawa yang bersifat non polar (Hewlett, 1998). LC-MS/MS memiliki sensitivitas yang lebih tinggi karena memiliki 2 sistem detektor massa.

Iyani (2017) menganalisis senyawa steroid dan triterpenoid pada isolat *Chlorella* sp. fraksi petroleum eter hasil kromatografi kolom menggunakan instrumen LC-MS/MS. Hasil penelitiannya menunjukkan terdapat 3 senyawa jenis steroid. Data spektra massa senyawa steroid tersebut ditunjukkan pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Data spektra massa dari senyawa steroid *Chlorella* sp. yang teridentifikasi oleh LC-MS/MS (Iyani, 2017)

Senyawa	Waktu Retensi (menit)	Massa Molekul	Hasil Penelitian	
			[M+H-H ₂ O] ⁺ Ion Prekursor (m/z)	Ion Produk (m/z)
Campesterol	1,42	414	383	161
Stigmasterol	1,43	412	395	81
β-Sitosterol	1,52	414	397	161

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia. Penelitian ini juga dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia UIN Malang. Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari – Mei 2019.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat gelas seperti gelas kimia, gelas ukur, erlenmeyer, pipet ukur dan botol vial. Proses pemanenan sampel menggunakan *sentrifuge* dan penimbangan dengan neraca analitik. Peralatan lain yang digunakan adalah oven, *chamber*, desikator, corong *buchner*, *shaker*, *hot plate*, *rotary evaporator* serta kolom berdiameter 1 cm dengan panjang 50 cm. Identifikasi senyawa menggunakan spektrofotometer UV-Vis (*Merk Varian Cary 50*), spektrofotometer FTIR (*Merk Varian 1000 FTIR Scimitar Series*) dan LC-MS/MS (*Merk Accela type 1250*).

3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah isolat mikroalga *Chlorella* sp. dari Laboratorium Ekologi Tumbuhan Jurusan Biologi UIN Malang serta taugé untuk membuat MET 4%. Pelarut yang digunakan untuk isolasi adalah metanol *p.a* dan n-heksana *p.a*. Bahan untuk reagen *Liebermann Burchard* (LB) yaitu kloroform, H₂SO₄ 97%, asam asetat anhidrat. Selain itu juga digunakan HCl 37%, etanol 95%, Na(CO₃)₂ 5%, reagen DPPH 0,2 mM, vitamin C, silika gel 60 (0,063-0,2 mm), plat KLT silika gel 60 F₂₅₄ serta gas N₂.

3.3 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Preparasi sampel mikroalga *Chlorella* sp.;
2. Ekstraksi maserasi biomassa *Chlorella* sp. dengan pelarut metanol;
3. Hidrolisis dan partisi mikroalga *Chlorella* sp.;
4. Identifikasi senyawa steroid fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan reagen LB dan identifikasi dengan LC-MS/MS;
5. Pemisahan senyawa steroid dengan metode kromatografi kolom;
6. Monitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA);
7. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH;
8. Identifikasi isolat steroid dengan spektrofotometer FTIR dan UV-Vis;
9. Analisa data.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Preparasi Sampel Biomassa Mikroalga *Chlorella* sp.

Isolat mikroalga *Chlorella* sp. sebanyak 150 mL dikultivasi dalam 36 mL MET 4% dan 864 mL aquades. Kultivasi dilakukan di rak kultur yang dilengkapi lampu TL 36 watt dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap (Prihantini, dkk., 2005). Pemanenan *Chlorella* sp. dilakukan pada hari ke-10 kultivasi dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk adalah biomassa *Chlorella* sp. basah. Preparasi sampel dilakukan dengan pengeringan biomassa *Chlorella* sp. basah dalam suatu wadah selama ± 2 hari pada suhu ruang (suhu antara 25 – 30°C) (Anggraeni, dkk., 2014). Biomassa *Chlorella* sp. yang telah kering dikerok dan ditimbang sebagai berat kering.

3.4.2 Ekstraksi Maserasi Mikroalga *Chlorella* sp. (Bariyyah, et al., 2013)

Ekstraksi maserasi dilakukan menggunakan perbandingan sampel dan pelarut 1:10 (b/v). Biomassa kering *Chlorella* sp. sebanyak 10,32 gram dimaserasi dengan pelarut metanol sebanyak 100 mL. Maserasi dilakukan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama ± 24 jam dalam suhu ruang. Filtrat dan residu dipisahkan

dengan penyaringan menggunakan corong *Buchner*. Residu yang didapat dimaserasi kembali dengan metanol hingga 5 kali pengulangan. Filtrat yang didapat pada setiap maserasi dikumpulkan menjadi satu kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang dan dihitung nilai rendemennya menggunakan Persamaan 3.2 (Khopkar, 2003).

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

3.4.3 Hidrolisis dan Partisi *Chlorella* sp. (Anggraeni, 2014)

Hasil ekstrak pekat metanol mikroalga *Chlorella* sp. sebanyak 3,68 gram dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL. Hidrolisis dilakukan dengan menambahkan 2 mL HCl dan distirrer selama 1 jam pada suhu ruang (Tensiska, dkk., 2007). Hidrolisat dinetralkan dengan penambahan larutan $\text{Na}(\text{CO}_3)_2$ jenuh secara perlahan hingga pH-nya netral.

Hidrolisat sebanyak 3 gram yang diperoleh dipindahkan ke dalam corong pisah. Selanjutnya ditambahkan 30 mL pelarut n-heksana kemudian dikocok dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan. Proses partisi dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan. Ekstrak hasil partisi kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan dialiri gas N_2 . Ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang dan dihitung rendemennya menggunakan Persamaan 3.2

3.4.4 Uji Senyawa Steroid Fraksi n-Heksana Mikroalga *Chlorella* sp.

3.4.4.1 Uji Fitokimia Senyawa Steroid (Azah, 2019)

Identifikasi golongan senyawa steroid dilakukan dengan cara dimasukkan 1 mg fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella* sp. ke dalam tabung reaksi yang berbeda. Selanjutnya ditambahkan 0,1 mL kloroform, 0,1 mL asam asetat anhidrat dan 1 mL

H₂SO₄ melalui dinding tabung reaksi. pada masing-masing tabung reaksi. Terbentuknya cincin hijau kebiruan menunjukkan adanya senyawa steroid (Mardiyah, dkk., 2014).

3.4.4.2 Identifikasi menggunakan LC-MS/MS (Iyani, 2017)

Fraksi n-heksana *Chlorella* sp. 100 ppm sebanyak 2 mL dianalisa menggunakan LC-MS/MS. Kolom LC-MS memiliki spesifikasi *Hypersil gold* (50 mm x 2,1 mm x 1,9 µm). Kolom dikontrol agar suhunya tetap 30°C. HPLC merk ACELLA *type* 1250 buatan *Thermo Scientific* yang terdiri dari degasser vakum, pompa quartener, autosampler termostatik yang dikendalikan oleh satu personal komputer menggunakan software X-Calibur 2.1.

Fase gerak yang digunakan terdiri dari 0,1 % asam format dalam air (fasa A) dan 0,1 % asam format dalam asetonitril (fasa B), Volume injeksi adalah 2 µL dengan laju alir 500 µL/menit. Penganalisa massa yang digunakan adalah jenis MS/MS Triple Q (*Quadrupole*) TSQ Quantum ACCESS MAX menggunakan metode SRM (*Selected Reaction Monitoring*). Sumber ionisasi yang digunakan adalah APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*).

3.4.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom

Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 sebanyak 10 gram. Fase gerak yang digunakan adalah eluen n-heksana dan etil asetat dengan variasi perbandingan volume n-heksana:etil asetat 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 80:20 dan 80:20. Aktivasi silika gel dilakukan dengan memanaskan silika gel pada suhu 110°C selama 2 jam di dalam oven. Silika gel yang telah teraktivasi dimasukkan dalam gelas kimia, kemudian ditambahkan eluen etil asetat:n-heksana (95:5) sebanyak 20 mL lalu diaduk dengan stirrer hingga homogen dan membentuk bubuk silika.

Pembuatan kolom diawali dengan meletakkan *glasswool* ke dalam ujung bawah kolom. Selanjutnya, bubuk silika yang telah dibuat dimasukkan ke dalam kolom dan dijenuhkan selama 24 jam untuk memampatkan silika dalam kolom. Mulut kolom

ditutup dengan plastik *wrap*, sedangkan kran bawah kolom ditutup agar tidak ada celah atau rongga untuk udara masuk.

Sampel fraksi n-heksana *Chlorella* sp. ditimbang sebanyak 0,0067 gram kemudian dilarutkan dengan pelarut n-heksana:etil asetat (95:5) sebanyak 1 mL. Fraksi yang telah larut kemudian dimasukkan ke dalam kolom. Elusi dilakukan secara gradien dengan perbandingan volume eluen n-heksana:etil asetat 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 80:20 dan 80:20 masing-masing sebanyak 100 mL. Eluen dalam kolom harus selalu berada di atas kolom silika gel selama proses elusi. Eluen kedua dielusikan ketika eluen pertama tersisa sedikit (kira-kira 3 garis) diatas kolom silika gel. Begitupula dengan elusi ketiga dan seterusnya. Kran bagian bawah kolom dibuka perlahan hingga eluat keluar dan ditampung dalam vial setiap 2 mL (laju alir 2 mL/menit) dari tiap elusi.

3.4.6 Monitoring dengan KLTA dan Penggabungan Fraksi

Eluat hasil kromatografi kolom pada vial-vial genap (vial, 2, 4, 6, 8, 10 dan seterusnya) dikelompokkan berdasarkan perbandingan volume fase geraknya. Selanjutnya dilakukan monitoring dengan KLTA. Fase diam yang digunakan adalah plat KLT silika gel 60 F₂₅₄. Fase gerak yang digunakan adalah eluen n-heksana:etil asetat dengan perbandingan volume (3:1) sebanyak 20 mL yang telah dijenuhkan.

KLTA diawali dengan penotolan eluat dalam vial genap pada plat KLT menggunakan pipa kapiler. Penotolan dilakukan sebanyak 10 kali dengan jarak 0,5 cm setiap totolan. Selanjutnya, plat KLT dimasukkan ke dalam bejana pengembang atau *chamber* yang berisi eluen jenuh. Noda pada plat KLT yang terbentuk diamati dibawah lampu UV pada panjang gelombang 254 dan 366 nm. Noda yang terlihat ditandai dan dihitung *R_f* tiap noda. Fraksi yang memiliki kesamaan jumlah noda, warna noda dan nilai *R_f* dikelompokkan dalam satu vial dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Selanjutnya, dilakukan uji aktivitas antioksidan.

3.4.7 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

3.4.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH (Anggraeni, dkk., 2014)

Etanol 95% dipipet sebanyak 3 mL kemudian ditambahkan larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 mL. Larutan dimasukkan ke dalam kuvet. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada daerah panjang gelombang sinar tampak, yaitu 400–800 nm. Panjang gelombang maksimum ini digunakan sebagai acuan dalam pengukuran aktivitas antioksidan sampel.

3.4.7.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel

Sampel dilarutkan dalam etanol 95% dengan variasi konsentrasi 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 3 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda kemudian ditambahkan 1 mL reagen DPPH 0,2 mM. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama waktu kestabilan. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan sebelumnya. Data absorbansi yang diperoleh dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya menggunakan Persamaan 3.3.

$$\% \text{ Aktivitas Antioksidan} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% \dots (3.3)$$

Prosedur pembuatan larutan blanko dilakukan tanpa penambahan sampel. Kontrol positif yang digunakan adalah larutan vitamin C dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm dan diperlakukan sama dengan sampel.

3.4.8 Identifikasi Isolat Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis

Isolat hasil kolom dibuat larutan dengan konsentrasi 50 ppm sebanyak 5 mL. Selanjutnya dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur panjang gelombang maksimumnya. Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan bergantian dengan blanko pelarut n-heksana.

3.4.9 Identifikasi Isolat Steroid dengan Spektrofotometer FTIR

Isolat hasil identifikasi UV-Vis diuapkan kemudian ditambahkan KBr. Selanjutnya, campuran dihomogenkan pada mortar agat dan dibuat pelet. Pelet yang dibuat diidentifikasi gugus senyawanya dengan spektrofotometer FTIR.

3.5 Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dengan melihat pola pemisahan kromatografi kolom dengan metode elusi gradien. Pola pemisahan diketahui dengan memonitoring vial-vial hasil kromatografi kolom dengan KLTA. Pemisahan terbaik didefinisikan sebagai pemisahan yang mampu memisahkan banyak senyawa murni dengan spot tunggal atau tidak ada campuran. Fraksi tersebut dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan menghitung % aktivitasnya. Hasil uji aktivitas antioksidan berupa data angka yang dinyatakan dalam EC_{50} yang dapat diolah menggunakan software "*GraphPad prism software*".

Fraksi hasil pemisahan terbaik juga diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer FTIR dan UV-Vis. Identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis akan menghasilkan spektra UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum yang kemudian dibandingkan dengan literatur. Identifikasi dengan FTIR akan diperoleh spektra FTIR yang disertai dengan bilangan gelombang dari setiap vibrasi gugus fungsi senyawanya kemudian dibandingkan dengan literatur.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kultivasi dan Pemanenan Mikroalga *Chlorella* sp.

Kultivasi *Chlorella* sp. dilakukan untuk meregenerasi sel *Chlorella* sp. dalam medium ekstrak tauge (MET) 4% (Lampiran 4). Pada kultivasi *Chlorella* sp. terjadi pertumbuhan dan penambahan jumlah sel *Chlorella* sp. yang ditandai dengan adanya perubahan warna dari hijau muda menjadi hijau pekat tiap penambahan hari kultivasi. Perubahan warna tersebut mengindikasikan bahwa telah terjadi peningkatan jumlah sel *Chlorella* sp. Hal ini menunjukkan bahwa *Chlorella* sp. dapat tumbuh dan berkembang biak dengan baik dalam MET 4% sehingga kepadatan selnya bertambah.

Pemanenan *Chlorella* sp. dilakukan pada hari ke-10 kultivasi saat produksi metabolit sekunder mikroalga *Chlorella* sp. mencapai jumlah maksimum. Hal ini didukung oleh penelitian Khamidah, dkk., (2013) yang menunjukkan hasil bahwa *Chlorella* sp. memiliki aktivitas antibakteri tertinggi pada hari ke-10 kultivasi. Pemanenan dilakukan dengan cara sentrifuge. Supernatan yang dihasilkan merupakan isolat basah *Chlorella* sp. dengan warna hijau tua yang kemudian dikeringanginkan pada suhu ruang. Biomassa *Chlorella* sp. kering yang diperoleh adalah 10,32 gram.

4.2 Ekstraksi Maserasi Mikroalga *Chlorella* sp.

Proses maserasi pada penelitian ini dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan dengan pelarut yang selalu baru. Pada setiap pengulangan, terjadi penurunan intensitas warna filtrat yang diasumsikan bahwa senyawa aktif dalam sampel telah maksimum terekstrak oleh pelarut metanol. Ekstraksi maserasi menghasilkan

ekstrak pekat berwarna hijau kecokelatan dengan berat kering sebesar 3,68 g dan rendemen sebesar 35,65%.

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Iyani (2017) menunjukkan hasil rendemen ekstrak metanol *Chlorella* sp. adalah 23,79%. Penelitian Dinasti (2016) juga mendapatkan hasil rendemen ekstrak metanol *Chlorella* sp. sebesar 21,89%. Hasil rendemen pada penelitian ini lebih besar karena ekstraksi maserasi menggunakan perbandingan sampel dan pelarut 1:10 sedangkan penelitian Iyani (2017) dan Dinasti (2016) menggunakan perbandingan sampel dan pelarut 1:5. Menurut Yulianingtyas dan Kusmantoro (2016), volume pelarut yang semakin besar akan menghasilkan ekstrak yang semakin banyak.

4.3 Hidrolisis dan Partisi Mikroalga *Chlorella* sp.

Senyawa aktif yang terdapat di alam sebagian besar adalah mengandung komponen gula (glikosida). Hidrolisis dilakukan untuk memutus ikatan glikosida agar didapatkan senyawa aktif yang tidak mengandung komponen gula lagi. Ekstrak hasil maserasi dihidrolisis menggunakan katalis HCl 2 N dan dilanjutkan dengan partisi menggunakan pelarut n-heksana.

Ekstrak hasil hidrolisis dilakukan partisi menggunakan pelarut n-heksana sebanyak 5 kali. Hasil partisi berupa fraksi pekat berwarna hijau kecokelatan dengan berat 1,06 gram dan rendemen sebesar 32,72%. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Desianti (2014) hasil rendemen fraksi n-heksana *Chlorella* sp. adalah 32,78%. Penelitian Anggraeni, dkk., (2014) menghasilkan rendemen fraksi n-heksana *Chlorella* sp. sebesar 45,61%. Berdasarkan hasil rendemen fraksi n-heksana *Chlorella* sp. pada beberapa penelitian sebelumnya,

dapat dinyatakan bahwa n-heksana adalah pelarut yang baik untuk partisi senyawa aktif mikroalga *Chlorella* sp.

4.4 Identifikasi Senyawa Steroid dalam Fraksi n-Heksana

4.4.1 Uji Fitokimia

Uji fitokimia senyawa steroid dalam penelitian ini dilakukan menggunakan pereaksi *Lieberman Burchard* (LB). Hasil uji fitokimia diperoleh bahwa fraksi n-heksana *Chlorella* sp. positif mengandung senyawa steroid. Hal ini ditunjukkan dengan berubahnya warna larutan menjadi warna hijau kebiruan setelah ditambahkan pereaksi LB seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.2.

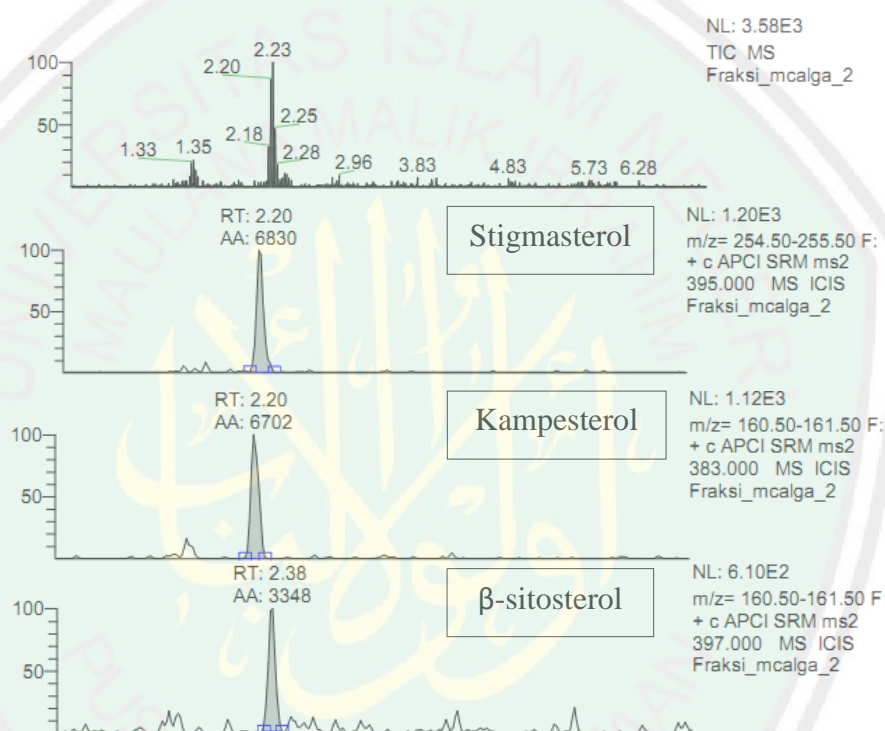


Gambar 4.1 Uji fitokimia senyawa steroid ditambahkan reagen LB

Menurut Anggraini dan Nabillah (2018), reaksi antara senyawa steroid dengan reagen LB harus bebas dari air karena reaksi ini tidak stabil pada air. Pereaksi LB terdiri dari asam asetat anhidrat, kloroform dan H_2SO_4 (Ilyas, Novianty dan Irmayanti, 2015). Reaksi ini diawali dengan asetilasi gugus OH pada molekul steroid yang menghasilkan molekul kompleks asetil steroid. Selanjutnya akan terjadi reaksi sulfonasi oleh H_2SO_4 . Reaksi tersebut mengakibatkan terjadinya perpanjangan konjugasi sehingga terjadi perubahan warna menjadi hijau seperti yang teramati pada penelitian ini (Xion, Wilson dan Pang, 2007).

4.4.2 Identifikasi Menggunakan LC-MS/MS

Fraksi n-heksana *Chlorella* sp. diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS untuk mengetahui jenis senyawa steroid didalamnya berdasarkan atas senyawa steroid yang ditargetkan. Adapun 10 jenis senyawa steroid yang ditargetkan diantaranya adalah kampesterol, stigmasterol, β -sitosterol, fukosterol, desmosterol, kolesterol, fitosterol, lathosterol kolestanon dan kolestanol.



Gambar 4.2 Hasil identifikasi fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan LC-MS/MS

Gambar 4.2 menunjukkan bahwa dalam fraksi n-heksana *Chlorella* sp. mengandung senyawa steroid jenis kampesterol, stigmasterol dan β -sitosterol dengan waktu retensi berturut-turut adalah 2,20 menit; 2,20 menit dan 2,38 menit. Waktu retensi merupakan waktu yang dibutuhkan sampel untuk bergerak melewati kolom menuju detektor. Waktu retensi 2,20 menit menunjukkan bahwa kampesterol dan stigmasterol memiliki kelarutan tinggi pada fase gerak. Waktu

retensi 2,38 menit menunjukkan bahwa β -sitosterol lebih tertahan pada kolom dan kurang larut pada fase gerak. Kolom yang digunakan dalam identifikasi ini bersifat non polar. Berdasarkan data waktu retensi di atas dapat disimpulkan bahwa tingkat kepolaran dari yang tertinggi berturut-turut adalah β -sitosterol>stigmasterol>kampesterol (Kono, 2013).

Identifikasi fraksi petroleum eter *Chlorella* sp. menggunakan LC-MS/MS yang dilakukan oleh Iyani (2017) menunjukkan bahwa kampesterol memiliki waktu retensi 1,42 menit dan stigmasterol 1,43 menit. Hal yang sama juga terjadi pada penelitian Baderos (2017) yang mengidentifikasi senyawa steroid dari alga merah menggunakan LC-MS/MS. Hasil yang diperoleh adalah senyawa kampesterol dan stigmasterol memiliki waktu retensi yang sama, yaitu 1,27 menit. Kemiripan waktu retensi antara senyawa kampesterol dan stigmasterol menunjukkan bahwa tingkat kepolaran keduanya tidak berbeda jauh. Menurut Anggraini (2018), setiap senyawa memiliki pola fragmentasi massa yang spesifik. Kedua puncak senyawa stigmasterol dan kampesterol dapat dibedakan berdasarkan pola fragmentasi massa yang terjadi.

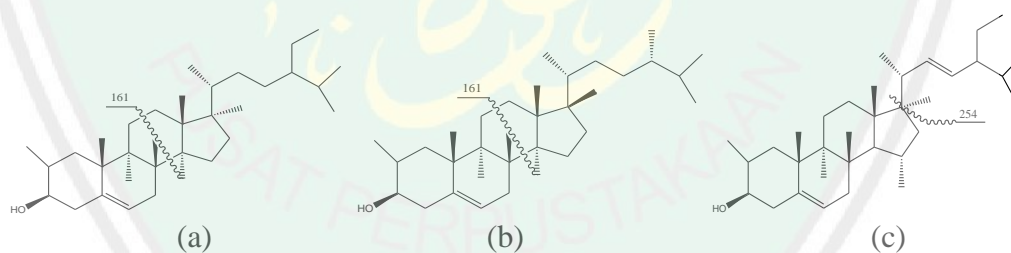
Gambar 4.3 menunjukkan bahwa puncak paling luas dimiliki oleh stigmasterol, selanjutnya berturut-turut adalah kampesterol dan β -sitosterol yang diinformasikan oleh nilai AA (*Abundance Area*). Berdasarkan hal tersebut kelimpahan senyawa pada fraksi n-heksana *Chlorella* sp. dari yang tertinggi adalah stigmasterol>kampesterol> β -sitosterol. Hasil spektra massa senyawa steroid yang teridentifikasi pada LC-MS/MS dalam penelitian ini ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Data spektra massa senyawa steroid fraksi n-heksana *Chlorella* sp. yang teridentifikasi oleh LC-MS/MS.

Senyawa	Waktu Retensi (menit)	Mr (g/mol)	Literatur		Hasil Penelitian	
			[M+H-H ₂ O] ⁻ Ion Prekursor (m/z)	Ion Produk (m/z)	[M+H-H ₂ O] ⁻ Ion Prekursor (m/z)	Ion Produk (m/z)
Stigmasterol	2,20	412	395 ^{a)}	254,50-255,50 ^{a)}	395	254
Kampesterol	2,20	414	383 ^{b)}	160,50-161,50 ^{b)}	383	161
β-sitosterol	2,38	414	397 ^{c)}	160,50-161,50 ^{c)}	397	161

Keterangan:a.(Fu & Joseph, 2012), b.(Gobo, 2016), c.(Mo, Dong, Hurst & Bremen, 2013)

Berdasarkan hasil kromatogram LC-MS/MS yang dihasilkan pada Gambar 4.3, dugaan senyawa steroid yang paling dominan adalah stigmasterol. Hal ini diperkuat dengan nilai *Neutral Lose* (NL) atau nilai yang dihasilkan dari hilangnya molekul netral yang stabil seperti H₂O yang dimiliki oleh stigmasterol lebih tinggi dibandingkan dengan kampesterol dan β-sitosterol. Semakin besar nilai NL maka semakin banyak fragmentasi yang terjadi. Gambar 4.3 berikut merupakan fragmentasi dari senyawa β-sitosterol, stigmasterol dan kampesterol.



Gambar 4.4 Fragmentasi (a) β-sitosterol, (b) kampesterol (Mo, Dong, Hurst dan Bremen, 2013), (c) stigmasterol (Lukitaningsih, 2012)

4.5 Pemisahan Senyawa dengan Kromatografi Kolom

Pemisahan senyawa steroid menggunakan metode kromatografi kolom dengan sistem elusi gradien menggunakan perbandingan eluen n-heksana:etil asetat 95:5; 90:10 dan 85:15 masing-masing sebanyak 100 mL. Selanjutnya elusi dilanjutkan secara isokratik menggunakan perbandingan eluen n-heksana:etil

asetat 80:20 sebanyak 300 mL. Eluat hasil kromatografi kolom ditampung dalam vial-vial hingga dihasilkan 295 vial pada semua elusi.

Eluat yang ditampung dalam botol vial genap (vial ke-2, 4, 6, 8, dan seterusnya) dimonitoring dengan KLTA. Pada penelitian ini KLTA dilakukan untuk mengetahui profil pemisahan kromatografi kolom. KLTA dilakukan menggunakan eluen n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 3,75:1,25. Vial dengan profil pemisahan (jumlah spot, nilai R_f dan warna spot) yang sama dilakukan penggabungan ke dalam satu fraksi seperti Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil monitoring kromatografi kolom

Isolat	Vial ke-	Warna Spot	Dugaan Mengandung Senyawa	R_f
A	1-16	-	-	-
B	17-32	Hijau Hitam	Steroid	0,91 0,82
C	33-45	Hitam	Steroid	0,82
D	46-59	-	-	-
E	60	Merah	Triterpenoid	0,75
F	61-79	Merah Hijau	Triterpenoid Steroid	0,75 0,62
G	80-109	Merah Hijau	Triterpenoid Steroid	0,67 0,62
H	110-111	Merah Merah Merah	Triterpenoid	0,62 0,56 0,47
I	112-122	Merah Merah	Triterpenoid	0,65 0,47
J	123-132	Merah	Triterpenoid	0,47
K	133-171	Merah Merah	Triterpenoid	0,47 0,37
L	172-180	Merah Merah Merah	Triterpenoid	0,47 0,37 0,28
M	181-202	Merah Merah	Triterpenoid	0,37 0,28
N	203-210	Merah Merah Merah	Triterpenoid	0,37 0,87 0,15
O	211-235	Merah Merah	Triterpenoid	0,28 0,15
P	236-276	Merah	Triterpenoid	0,15
Q	277-296	Merah Merah	Triterpenoid	0,21 0,15

Pemisahan dengan kromatografi kolom menghasilkan 17 isolat (A-Q) dengan 1 isolat diduga mengandung senyawa steroid, 3 isolat diduga mengandung senyawa triterpenoid dan 14 isolat lainnya mengandung senyawa campuran. Hasil monitoring KLTA pada isolat A dan D tidak memunculkan spot. Pada isolat A, eluat yang tertampung dalam vial merupakan eluen sisa dari pembuatan fase diam serta dimungkinkan bahwa sampel belum turun saat elusi pertama. Pada isolat D dimungkinkan bahwa senyawa dalam sampel teradsorpsi kuat ke dalam fase diam dan memiliki kepolaran yang berbeda dengan eluen yang mengalir pada saat itu.

Hasil monitoring KLTA menunjukkan bahwa isolat yang diduga mengandung senyawa steroid berada pada vial 33-45 (isolat C) dengan ditandai munculnya spot berwarna hitam dibawah lampu UV 254 nm. Senyawa steroid hasil kromatografi kolom pada penelitian ini bersifat non polar karena terpisah pada saat elusi eluen n-heksana:etil asetat 95:5. Selain itu, profil pemisahan senyawa steroid pada KLTA menghasilkan nilai R_f sebesar 0,82. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada saat KLTA isolat steroid lebih terdistribusi ke fasa gerak yang bersifat non polar.

4.6 Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH

4.6.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Berdasarkan hasil pengukuran panjang gelombang DPPH 0,2 mM dengan spektrofotometer UV-Vis diperoleh panjang gelombang maksimum radikal DPPH 0,2 mM adalah 518 nm. Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Bariyyah, Fasya, Abidin dan Hanapi (2013). Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum larutan DPPH adalah 518 nm. Menurut Kuntorini (2010) DPPH memiliki warna komplementer ungu karena memiliki elektron yang tidak

berpasangan dan memiliki absorbansi maksimum pada panjang gelombang 515-520 nm. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH yang didapat digunakan untuk uji aktivitas antioksidan pada isolat steroid.

4.6.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Isolat Steroid

Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan pada isolat steroid hasil kromatografi kolom dalam hal ini adalah isolat C (Tabel 4.2) dengan variasi konsentrasi 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm. Larutan pembanding asam askorbat diperlakukan sama dengan sampel. Selanjutnya diukur pada panjang gelombang maksimum DPPH, yaitu 518 nm. Pengukuran aktivitas antioksidan pada isolat steroid menggunakan larutan kontrol DPPH 0,2 mM (Lampiran 4). Tabel 4.3 berikut merupakan data hasil % aktivitas antioksidan dan nilai EC₅₀ fraksi, isolat steroid dan pembanding asam askorbat.

Tabel 4.3 Data hasil % aktivitas antioksidan dan nilai EC₅₀ fraksi, isolat steroid dan pembanding asam askorbat

No	Sampel	Aktivitas Antioksidan (%)	Nilai EC ₅₀ (ppm)
1	Fraksi n-heksana		
	1 ppm	13,33	1673
	2 ppm	14,66	
	3 ppm	15,36	
	4 ppm	15,83	
	5 ppm	19,90	
2	Isolat C		
	1 ppm	5,56	6,235
	2 ppm	6,57	
	3 ppm	12,16	
	4 ppm	13,93	
	5 ppm	37,04	
3	Asam Askorbat		
	1 ppm	54,82	0,957
	2 ppm	48,72	
	3 ppm	83,00	
	4 ppm	95,19	
	5 ppm	96,63	

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan pada isolat C dan fraksi n-heksana untuk mengetahui potensinya sebagai antioksidan. Berdasarkan Tabel 4.2, isolat C memiliki potensi sebagai antioksidan dengan nilai $EC_{50} = 6,235$ ppm dan fraksi n-heksana memiliki potensi sebagai antioksidan dengan nilai $EC_{50} = 1673$ ppm. Isolat C memiliki potensi sebagai antioksidan yang kuat dan fraksi n-heksana memiliki potensi sebagai antioksidan yang lemah dibandingkan dengan asam askorbat.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa isolat C hasil pemisahan kromatografi kolom lebih berpotensi sebagai antioksidan dibandingkan fraksi n-heksana sebelum dipisahkan dengan kromatografi kolom. Hasil tersebut didukung oleh beberapa penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Laili (2016) menghasilkan data bahwa EC_{50} fraksi petroleum eter *Chlorella* sp. adalah 248 ppm dan nilai EC_{50} isolat hasil pemisahan dengan KLTP adalah 94,48 ppm. Penelitian Rahmawati (2016) juga menyatakan bahwa nilai EC_{50} fraksi petroleum eter *Chlorella* sp. adalah 152 ppm dan nilai EC_{50} isolat hasil pemisahan dengan KLTP adalah 73,82 ppm

Hasil perbedaan aktivitas ini menunjukkan bahwa dalam fraksi n-heksana *Chlorella* sp. terdapat banyak senyawa campuran. Banyaknya senyawa campuran memungkinkan adanya kerja atau efek yang berbeda. Efek antagonis suatu senyawa dapat menyebabkan penurunan aktivitas senyawa lainnya (Sukandar, 2018). Senyawa campuran dalam fraksi n-heksana dimungkinkan dapat menurunkan aktivitas senyawa steroid yang terdapat dalam isolat C dalam menangkal radikal bebas DPPH (Rang, *et al.*, 1999). Oleh karena itu potensi fraksi n-heksana sebagai antioksidan lebih lemah dibandingkan dengan isolat C.

4.7 Identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Isolat hasil kromatografi kolom diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui panjang gelombang maksimum isolat hasil kromatografi kolom. Berdasarkan hasil identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis didapatkan panjang gelombang maksimum isolat steroid adalah 204 nm seperti pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Spektra UV-Vis isolat steroid hasil kromatografi kolom

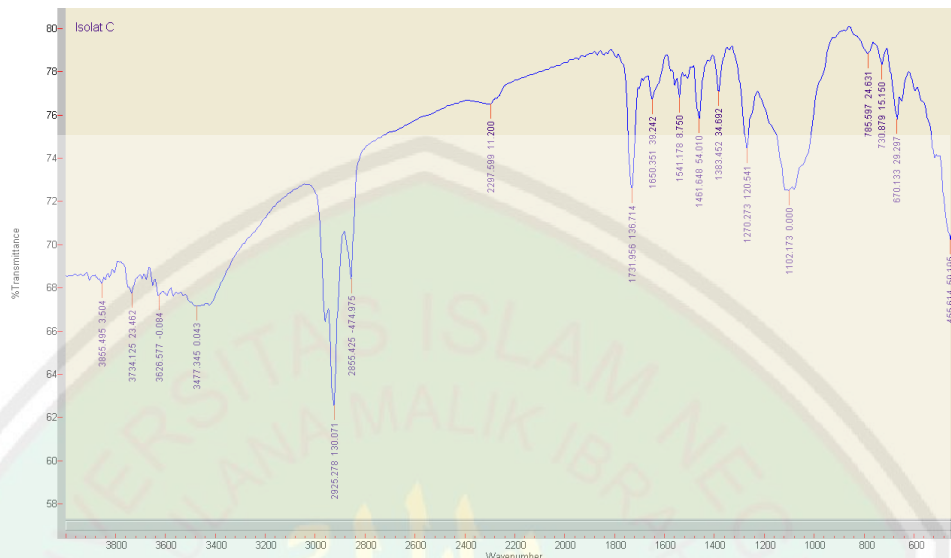
Panjang gelombang 204 nm menunjukkan adanya transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ yang merupakan serapan kromofor ikatan rangkap yang tidak terkonjugasi. Hal ini sesuai dengan penelitian Fasya (2016) dimana diperoleh panjang gelombang steroid dari *Chlorella* sp. adalah 204 nm yang menunjukkan adanya ikatan C=C yang tidak terkonjugasi. Aprelia (2013) juga mendapatkan panjang gelombang maksimum steroid dari tumbuhan paku sebesar 203 nm yang menunjukkan adanya ikatan C=C yang tidak terkonjugasi. Penelitian Etika (2014) menghasilkan serapan maksimum steroid sebesar 203 nm. Panjang gelombang tersebut menunjukkan bahwa senyawa yang terisolasi mengandung stigmasterol.

4.8 Identifikasi menggunakan FTIR

Isolat steroid hasil kromatografi kolom diidentifikasi menggunakan instrumen FTIR. Identifikasi menggunakan FTIR dilakukan untuk

mengidentifikasi gugus fungsi isolat yang dihasilkan dari kromatografi kolom.

Gambar 4.5 merupakan spektra FTIR isolat steroid hasil kromatografi kolom.



Gambar 4.5 Spektra hasil FTIR isolat steroid *Chlorella* sp.

Berdasarkan hasil spektra FTIR isolat steroid terdapat serapan gugus -OH pada bilangan gelombang 3477 cm^{-1} , $\text{-CH}_2\text{-}$ asiklik (2925 cm^{-1}) dan ikatan C=C non konjugasi (1650 cm^{-1}). Gugus fungsi penting lainnya yaitu O-H untuk alkohol sekunder muncul pada 1102 cm^{-1} . Gugus geminal dimetil yang merupakan serapan khas senyawa steroid yang muncul pada bilangan gelombang 1461 dan 1383 cm^{-1} . Interpretasi spektra FTIR isolat steroid dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Interpretasi spektra IR isolat steroid

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm^{-1})	Bilangan Gelombang (cm^{-1})
OH sterching	3855, 3734, 3626 dan 3477	3600-3450 (Durga, dkk., 2016)
CH_2 asimetri	2925	2940-2915 (Silverstein, 2005)
CH_2 simetri	2855	2870-2840 (Silverstein, 2005)
C=O ester	1731	1750-1725 (Silverstein, 2005)
C=C terisolasi	1650	1667-1640 (Silverstein, 2005)
C-C stretching	1541	1541 (Baker, 2008)
$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	1461 dan 1383	1454 dan 1384 (Suryani, 2011)
C-O ester	1270	1320-1210 (Durga, dkk., 2016)
O-H sekunder	1102	1125-1085 (Silverstein, 2005)
$=\text{C-H}$ siklik	785 dan 730	995-650 (Socrates, 1994)

4.9 Manfaat Senyawa Steroid dalam Perspektif Islam

Al-Qur'an diturunkan oleh Allah untuk menjadi pegangan dan petunjuk hidup manusia di dunia dan di akhirat. Al Qur'an menjelaskan bahwa derajat orang yang berilmu akan lebih tinggi. Oleh karena itu manusia tidak boleh menerima begitu saja apa yang telah disampaikan Allah dalam Al-Qur'an. Melainkan manusia harus dapat memaparkan fenomena serta masalah dan membuktikannya dengan argumentasi dari berbagai sudut, seperti ilmu ilmiah dan integrasinya dengan Al-Qur'an.

Firman Allah SWT dalam Q.S Thaha ayat 53 menjelaskan bahwa Allah SWT telah menciptakan berbagai macam (ukuran, bau, bentuk, warna, rasa) tumbuhan dengan segala manfaatnya. Mikroalga *Chlorella* sp. adalah salah satu dari banyak contoh tumbuhan yang diciptakan Allah SWT. Mikroalga *Chlorella* sp. tergolong tumbuhan dengan ukuran sangat kecil (mikro) yang memiliki banyak manfaat (Amaliyah, dkk., 2013). Sesuatu yang lebih kecil disebutkan Allah SWT dalam Q.S. Yunus ayat 61:

وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُوا مِنْهُ مِنْ قُرْآنٍ وَلَا تَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا كُنَّا عَلَيْكُمْ شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ
وَمَا يَعْزُبُ عَنْ رَبِّكَ مِنْ مِثْقَالِ ذَرَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا فِي السَّمَاءِ وَلَا أَصْغَرَ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرَ إِلَّا فِي كِتَابٍ
مُبِينٍ

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

Kitab Tafsir Ibnu Katsir (2001) yang ditulis oleh Ad-Dimasyqi menerangkan bahwa tidak ada sesuatu yang tersembunyi dari pengetahuan Allah

SWT, barang sebesar atom yang ada di langit dan di bumi, bahkan yang lebih kecil atau lebih besar dari itu, semuanya tidak luput dari pengetahuannya. Kata ذرة diartikan sebagai atom, اصغر berartikan “lebih kecil” sedangkan اكبر berartikan “lebih besar”, dalam hal ini dibandingkan dengan ذرة. Senyawa steroid dalam *Chlorella* sp. merupakan suatu molekul atau sekumpulan atom yang membentuk struktur tertentu. Dari segi ukuran, steroid lebih besar daripada atom, namun lebih kecil dibandingkan sel *Chlorella* sp. Allah SWT Maha Mengetahui segala sesuatu. Segala bentuk ciptaan Allah SWT, dari yang terkecil hingga terbesar, semuanya memiliki nilai manfaat tertentu. Menurut tafsir Ibnu Katsir surat al Mu'minun ayat 20 bahwa buah zaitun dapat dijadikan sebagai minyak pereda nyeri dan juga sebagai pelezat makanan. Hal ini kembali ditegaskan oleh Fattah (2010) bahwa buah zaitun, kurma anggur serta tumbuhan lainnya memiliki khasiat dan manfaat sebagai obat. Penjelasan tersebut sesuai dengan firman Allah dalam surat asy-Syuara: 7 yang menjelaskan tentang tumbuhan yang baik. Tumbuhan yang baik adalah tumbuhan yang memiliki manfaat.

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

“Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik.”

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT telah menumbuhkan segala tumbuhan yang baik, yaitu yang memiliki manfaat tanpa terkecuali mikroalga *Chlorella* sp. Mikroalga *Chlorella* sp. telah dibuktikan dalam penelitian ini mengandung senyawa aktif steroid yang memiliki manfaat sebagai obat. Seperti hadist yang telah diriwayatkan oleh Imam Bukhari berikut:

عَنْ أَبِي هُرَيْرَةَ رَضِيَ اللَّهُ عَنْهُ عَنِ النَّبِيِّ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ قَالَ : مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِذَا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

Diriwayatkan dari Abu Hurairah R.A bahwa Nabi Muhammad SAW pernah bersabda “Tidaklah Allah menurunkan suatu penyakit melainkan Allah turunkan padanya pula obatnya”

Steroid memiliki berbagai manfaat yang dapat dieksplorasi lebih lanjut, terutama manfaat dalam bidang kesehatan dan pengobatan. Akan tetapi kemampuan mengobati adalah kuasa Allah SWT sesuai dengan firman Allah SWT dalam surat Asy-Syuara’: 80

قَالُوا لَا ضَيْرَ إِنَّا إِلَىٰ رَبِّنَا مُنْقَلِبُونَ

“Mereka berkata: Tidak ada kemudharatan (bagi kami); sesungguhnya kami akan kembali kepada Tuhan kami”

Senyawa steroid bersifat toksik dengan nilai LC_{50} sebesar 88,20 ppm (Ilyas & Novianty, 2009). Steroid dalam *Chlorella* sp. sangat berpotensi sebagai antikanker dengan nilai LC_{50} yang rendah yaitu 19,68 ppm (Fasya, 2016). Selain sebagai antikanker, steroid murni juga berpotensi sebagai antioksidan kuat seperti dalam penelitian ini. Isolat steroid yang dihasilkan memiliki nilai EC_{50} sebesar 6,235 ppm. Optimasi untuk memperoleh senyawa steroid *Chlorella* sp. adalah dengan cara pemisahan kromatografi kolom. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat C diduga merupakan senyawa steroid dengan informasi panjang gelombang maksimum 204 nm dan menghasilkan serapan gugus O-H, C-H C=O, C-O, C-OH alkohol sekunder dan gugus geminal dimetil ($CH(CH_3)_2$).

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Isolat steroid hasil kromatografi kolom fraksi n-heksana *Chlorella* sp. memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan nilai EC_{50} sebesar 6,235 ppm.
2. Identifikasi fraksi n-heksana dengan LC-MS/MS didapatkan steroid jenis β -sitosterol, kampesterol dan stigmasterol. Kelimpahan paling banyak adalah stigmasterol. Identifikasi isolat menggunakan spektrofotometer UV-Vis didapatkan panjang gelombang maksimum 204 nm. Identifikasi isolat steroid menggunakan FTIR menghasilkan serapan gugus khas steroid seperti $-OH$, $C-OH$ sekunder dan $CH(CH_3)_2$.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya diharapkan untuk melakukan pemisahan yang lebih baik dengan metode kromatografi cair vakum (KCV) kemudian dilanjutkan dengan kromatografi kolom. Selanjutnya dimurnikan kembali dengan metode kristalisasi dalam aseton. Isolat hasil kromatografi kolom diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS serta isolat hasil kristalisasi diidentifikasi menggunakan HNMR.

DAFTAR PUSTAKA

- Ad-Dimasyqi, Al-Imam Abul Fida Isma'il Ibnu Katsir. 2001. *Tafsir Ibnu Katsir*. Terjemahan oleh Abu Bakar, dkk., Bandung: Sinar Baru Algesindo.
- Amaliah, S. 2013. Uji Toksisitas terhadap Larva Udang *Artemia Salina* dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella* sp. Hasil Kultivasi dalam Media Ekstrak Tauge (MET). *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Anggraeni, O. N., 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 Journal of Chemistry*, 3(2): 173-188.
- Anggraini, I. D., dan Nabillah. 2018. Activity Test of Suji Leaf Extract on In Vitro Cholesterol Lowering. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. 21(2): 54-58.
- Anggraini, Rini., Afghani Jayuska dan Andi Hairil Alimuddin. 2018. Isolasi dan Karakterisasi Minyak Atsiri Lada Hitam Asal Sajingan Kalimantan Barat. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*. 7(4): 124-133.
- Arindah, D. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Golongan Senyawa Antioksidan pada Daging Buah Pepino (*Solonum muricatum aiton*) yang Berpotensi sebagai Antioksidan. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Azah, S. N., 2019. Uji Toksisitas dan Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLTP Ekstrak n-Heksana dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata* Menggunakan Uv-Vis dan LC-MS/MS. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Aziz, S. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder*. Yogyakarta: Deepublish.
- Baderos, Ahmad. 2017. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma spinossum*) Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan Identifikasi Menggunakan LC-MS/MS. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Badrunanto. 2013. Pengoptimuman Fase Gerak Kromatografi Kinerja Tinggi untuk Analisis Sidik Jari Ekstrak Temu Putih (*Curcuma zedoaria*). *Skripsi*. Departemen Kimia Institut Pertanian Bogor.
- Bariyyah, S. K., 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 Tauge. *ALCHEMY Journal of Chemistry*, 2(3): 195-204.
- Bold, H. C., dan Wyne, M. J. 1988. *Introduction of The Algae, Second edition*. New York: Prentice Hall Mc. Engelwood Cliffs.

- Borowitzka, M. A. dan Lesley, J. B. 1998. *Microalgae Biotechnology*. London: Cambridge University Press.
- Chumadi, dkk., 1992. *Pedoman Teknis Budidaya Pakan Alami Ikan dan Udang*. Jakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan.
- Day, R. A. Dan Underwood, A. L. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif Edisi Keenam*. Jakarta: Erlangga.
- Desianti, N., A. Ghanaim Fasya., dan Tri Kustono A. 2014. Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter dan n-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol *Chlorella* sp. *ALCHEMY Journal of Chemistry*, 2(3): 195–204.
- Dinasti, A. R. 2016. Isolasi dengan KLTP dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella* sp. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Durga, R., S. Ananda., K. Rajkumar., S. Ramalingam dan R.S. Sundrarajan. 2016. Molecular Structure, Vibrational Spectra [FT-IR and FT-Raman], Electronic Spectra [UV-Visible and NMR Analysis on Hydroquinone Using HF and DFT Calculations. *International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology*, 3(5): 211-223.
- El Gengaihi, S., Ella, F., Emad, M., Shalaby, E.M & Doha, H. 2014. Food Processing & Technology Antioxidant Activity of Phenolic Compounds From Different Grape Wates. *Journal of Food Processing % Technology*, 5(2): 1-5.
- Etika, S. B., dan Suryelita. 2014. Isolasi Steroid dari Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Eksakta*, 18(1): 60–65.
- Fasya, A. G. 2016b. Potensi Antikanker dan Antioksidan serta Identifikasi Isolat Steroid Mikroalga *Chlorella* sp. *Laporan Penelitian Kompetitif Individual*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Fasya, A. G., dkk. 2016a. Ekstraksi, Hidrolisis dan Partisi Metabolit Sekunder dari Mikroalga *Chlorella* sp. *ALCHEMY Journal of Chemistry*, 5(1): 5-9.
- Fessenden, R. J. dan J.S. Fessenden. 1986. *Kimia Organik Dasar Edisi Ketiga*. Jilid 1. Terjemahan oleh A. H Pudjaatmaka. Jakarta: Erlangga.
- Fu, R., & Joseph, M. 2012. LC/ELSD and LC/MS/MS of Cholesterol and Related Sterols on a Poroshell 120 Column. *Application Note*.
- Gobo, L. A., Viana, C., & Lameira, A. 2016. A Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Photoionization Tandem Mass Spectrometric (LC-APPI- MS/MS) Method for The Determination of Triterpenoids in Medicinal Plant Extracts. *Journal of Mass Spectrometry*, (51), 558–565.

- Hadiyanto dan Azim, M. 2012. *Mikroalga Sumber Pangan dan Energi Masa Depan*. Semarang: UPT Undip Press.
- Hanani, E., Abdul, M., dan Sekarini, R. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dan Spons *Callispongia* sp. dari Kepulauan Seribu. *Majalah Kefarmasian*, 2(3): 127-133.
- Handayani, N. A., dan Sekarini, R. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia* sp. dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3): 127-133.
- Handoko, S. 2016. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Metode Kromatografi Kolom Pembuatan Fasa Diam Cara Basah dan Kering. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Hewlett Packard Company. 1998. *Basic of LC-MS/MS In a Primer*.
- Hidayah, H. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid pada Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasinya menggunakan FTIR. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Illing, W. S. dan E. Erfiana. 2017. Uji Fitokimia Ekstrak Buah Dengan. *Journal of Mathematics and Natural Sciences*, 4(2): 66-87.
- Ilyas, Asriani, Iin Novianty dan Irmayanti. 2015. Senyawa Golongan Steroid dari Ekstrak n-Heksana Kulit Batang Kayu Bitti dan Uji Toksisitas Terhadap *Artemia salina* L. *Jurnal Chemica et Natura Acta*, 3(3): 119-123.
- Imamah, N. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* Sp. menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasinya menggunakan Spektrofotometer FTIR. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Iyani, R. 2017. Variasi Rasio Sampel terhadap Silika Gel pada Pemisahan Steroid dan Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Jenie, B. S. L., Irma Isnafia Arief dan Made Astawan. 2015. Identification and Probiotic Characteristic of Lactic Acid Bacteria Isolated from Indonesian Local Beef. *Asian Journal of Animal Sciences*, 9(1): 23-36.
- Kawaroe, M., Prartono, T., Sunuddin, A., dan Sari, S. W. 2010. *Mikroalga Potensi dan Pemanfaatannya untuk Produksi Bio Bahan Bakar*. Bogor: IPB Press.
- Khamidah, U. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* Ekstrak Mikroalga *Chlorella* sp. Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *Skripsi*. UIN Maulana Malik Ibrahim

Malang.

- Kodama, Y. dan Fujshima. 2009. Infection of *Paramecium busaria* by Symbiotic *Chlorella* sp. *Microbiology Monographs*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Konoz, Elaheh., Amir H.M. Sarrafi., Alireza Feizbakhsh dan Zahra Dashtbozorgi. 2013. Prediction of Gas Chromatography-Mass Spectrofotometry Retention Times of Pesticide Residues by Chemometrics Methods. *Research Article*. Department of Chemistry Islamic Azad University, Iran.
- Kuntorini, Evi Mintowati. 2010. Botani Ekonomi Suku *Zingiberaceae* sebagai Obat Tradisional oleh Masyarakat di Kota Banjarbaru. *Jurnal Bioscientic*. 2(1): 25-36.
- Lawoko, M., Sagar, D., Adrian, R.P. van H. 2009. Pre-Hydrolysis of The Phenyl Glycosidic Bond in a Model Compound. *Lenzinger Berichte*: 77-87.
- Lenny, S. 2006. Uji Bioaktifitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metode BSLT. *Skripsi*. Jurusan Kimia Universitas Sumatera Utara.
- Lukitaningsih, Endang. 2012. Kandungan Fitosterol dalam Bengkoang. *Jurnal Pharmacon*. 13(2): 47-54.
- Majidah, B. 2019. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella* sp. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Mardiyah, U. 2012. Ekstraksi, Uji Aktivitas terhadap *1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil* (DPPH) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Euचेuma spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Millati, N. 2016. Uji Toksisitas Metode BSLT Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella* sp. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Mo, S., Dong, L., Hurst, W. J., & Breemen, R. B. Van. (2013). Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry *Lipids*,(48), 949–956.
- Molyneux, P. 2004. The Stable Free Radical *Diphenylpicryl-hydrazyl* (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *J. Sci Technol*, 26(2): 211-221.
- Moreau, S. J. Dingremont, Doury dan Giordanengo. 2002. Effect of Parasitism by *Asobara tabida* (*Hymenoptera Ichneumonidae*) *Journal of Entomology Indonesia*, 8(1): 36-44.
- Nielsen, M. I., Andersen, G. Dan Vestergaad, K., 1995. Incidence of Central post-Stroke Pain. *Journal Medical*. 6(1): 187-193.

- Noviyanti, L. 2010. Modifikasi Teknik Kromatografi Kolom untuk Pemisahan Trigliserida dari Ekstrak Buah Merah (*Pandanus conoideus*). *Skripsi*. Jurusan Kimia Universitas Sebelas Maret.
- Panji, T. 2012. *Teknik Spektroskopi*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Parwata, I. M. O. A., Wiwik, S. R., dan Raditya, Y. 2009. Isolasi dan Uji Anti Radikal Bebas Minyak Atsiri pada Daun Sirih (*Paper betle. Linn*) secara Spektroskopi Ultra Violet-Tampak. *Jurnal Kimia*, 111(1): 7-13.
- Prayitno, J. 2016. Pola Pertumbuhan dan Pemanenan Biomassa dalam Fotobioreaktor Mikroalga untuk Penangkapan Karbon. *Jurnal Teknologi Lingkungan*, 17(1): 45-52.
- Prihantini, N. B., Berta, P. dan Ratna, Y. 2005. Pertumbuhan *Chlorella* sp. dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan Variasi pH Awal. *Makara Sains*, 9(1):1.
- Prihantini, N. B., Damayanti, D., dan Yuniati, R. 2007. Pengaruh Konsentrasi Medium Ekstrak Tauge (MET) terhadap Pertumbuhan *Scenedesmus* Isolat Subang. *Makara Sains*, 11(1):1.
- Rahmawati, L. M. 2016. Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Senyawa Steroid Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan UV-Vis. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Rahmawati, Y. D. 2017. Variasi Eluen pada Pemisahan Senyawa Terpenoid dan Steroid Alga Merah (*E. spinosum*) menggunakan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Rohman, A. 2009. *Kromatografi Kolom untuk Analisis Obat*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Rosyidah, K. 2011. Isolasi dan Uji Sitotoksik Senyawa Limonen dari Kulit Batang Kasutri (*Mangifera casturi*). *Journal of Bioscientiae*, 8(2): 1-5.
- Safitri, D. A. 2016. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella* sp. Menggunakan Kromatografi Kolom Cara Basah dan Kering. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Saleh, C. 2007. Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Steroid dari Akar Tumbuhan Cendana (*Santalum albian*). *Disertasi*. Program Doktor Ilmu Kimia Pascasarjana Universitas Sumatera Utara.
- Sargowo, D. dan Ratnawati. 2005. Pengaruh Zat Aktif Ganggang Hijau terhadap Produk Radikal Bebas dan Fraksi Lipid Penderita Dislipidemia Usia Lanjut. *Journal of Medika*, 28(11): 693-701.
- Sastroamidjojo, H. 1998. *Sintesis Bahan Alam*: Yogyakarta: UGM.

- Setiawan, A., Fuadi dan Harismah. 2015. *Hidrolisis Enzimatis Kertas Bekas dengan Variasi Pemanasan Awal*. University Research Colloquium.
- Shihab, M. Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an* Jakarta: Lentera Hati.
- Solikah, A. N. L. 2016. Isolasi Senyawa Steroid dari Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Eucheuma spinosum*) menggunakan Metode Kromatografi Kolom. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Steenblock, D. 1996. *Chlorella: Makanan Sehat dan Alami*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Sudibyo dan Sunarminingsih, R. 2002. Metabolit Sekunder: Manfaat dan Perkembangannya dalam Dunia Farmasi. *Pidato Pengukuhan Guru Besar*. UGM Yogyakarta.
- Sugiyanto, Nurulita, N. A., Meiyanto, E., Matsuda, E., Kawaichi, M. 2012. *Gynura procumbens* Modulates The Microtubules Integrity and Enhances Distinc Metabolism on Doxorubicin and 5-flurouracil-induced Breast Cancer Cell Death. *Journal Oriet Pharm Exp Med*, 12(3): 205-218.
- Sulastry, T. dan Kurniawati, N. 2010. Isolasi Steroid dari Ekstrak Metanol Daun Bluntas (*Plucea indica L.*) *Jurnal Chemica*, 11(1): 52-56.
- Surya, A. N. 2015. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif Penangkap Radikal Bebas DPPH, UV Protection dan Antibakteri Ekstrak Bunga Kenanga. *Skripsi*. Jurusan Kimia Universitas Sanatha Darma Yogyakarta.
- Susilawati, H. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid dari Daun Rimbang (*Solanum tarvum*). *Jurnal Repositoy*, University of Riau.
- Susilo, A. B. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Mikroalga *Chlorella* sp. *Skripsi*. Departemen Ilmu dan Teknologi Kelautan Institut Pertanian Bogor.
- Tasic, P., Okanovic, D. J. M. Ristic, M. Popovic dan J. Guvic. 2009. Chemical Characteristic of Cattle Slaughtering by-products for Technical Processing. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25 (5): 785-790.
- Utami, P. N., MS. Yuniarti dan K. Haetami. 2012. Pertumbuhan *Chlorella* sp. yang dikultur pada Periodisitas Cahaya yang Berbeda. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 3(3): 237-244.
- Wahyuni, S. 2015. Pengaruh Pemberian Salep Fitoplankton *Chlorella* terhadap Penyembuhan Luka Sayat (*Incisi*) pada Mencit (*Mus musculus albinus*). *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Hasanuddin.
- Wahyuni, S. 2016. *Kimia Bahan Alam*. Mataram: Universitas Mataram.

Wenno, M. R., Purbosari, N., dan Thenu, J., 2010. Ekstraksi Senyawa Antibakteri dari *Chlorella* sp. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, 10(2): 31-137.

Winarsi. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.

Wirosaputro, S. 2002. *Chlorella* sp. *Makanan Kesehatan Global Alami*. Yogyakarta: UGM.

Wulandari, A. P., Frida, N., Annisa, E. P dan Dialekha R. P. 2010. Identifikasi Mikroalga di sekitar Pantai Pangandaran dan Potensi Pertumbuhannya pada Formulasi Medium Ekstrak Tauge (MET). *Prosiding Seminar Nasional Limnologi V*. Universitas Padjajaran.

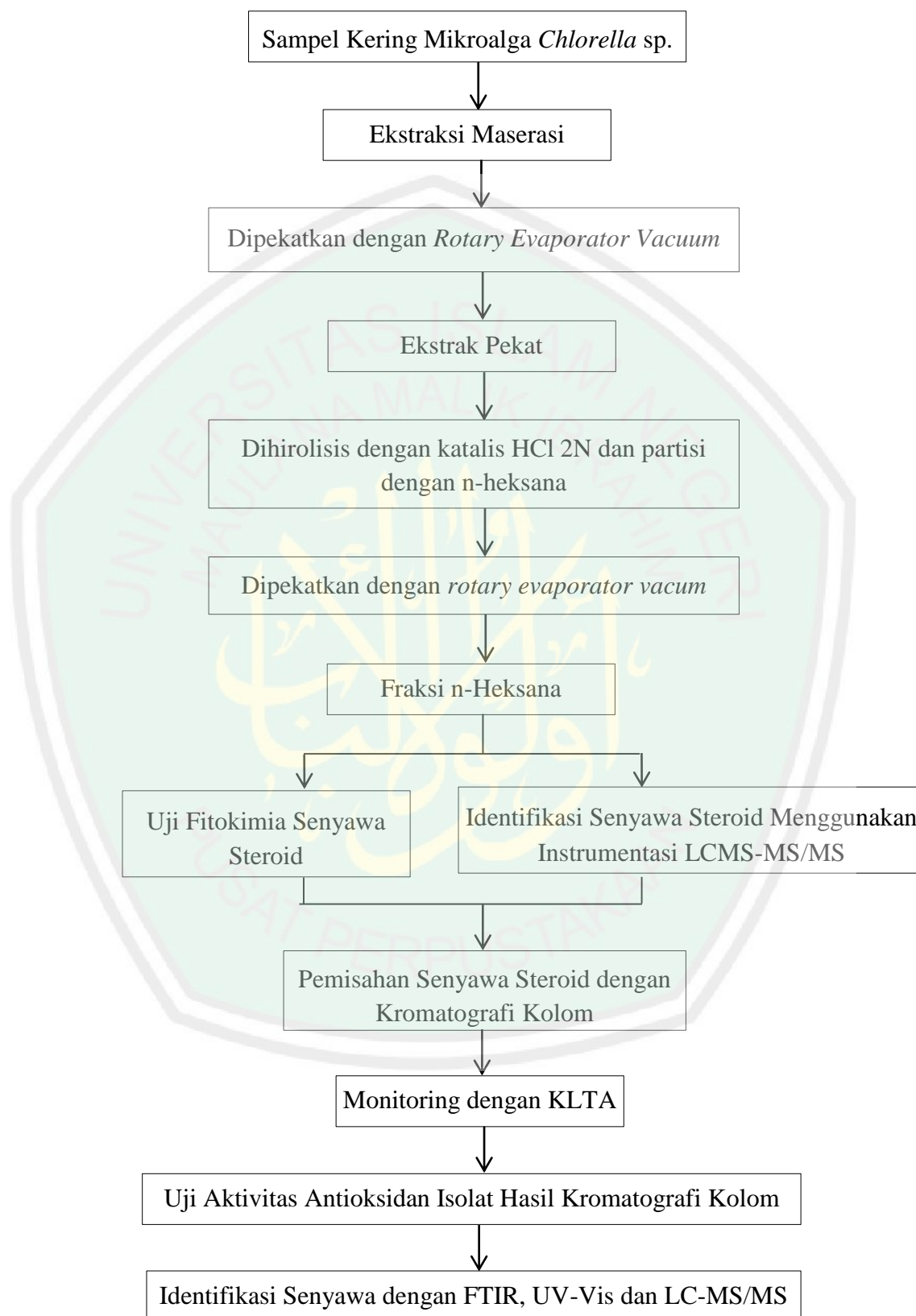
Xiong, Q., William K. Wilson dan Jai Phang. The *Liebermann Burchard* Reaction: Sulfonatio, Desaturation, and Rearrangement of Cholesterol in Acid. 2007. *Article Lipids*, 42: 87-96.

Yosti, M. S. 2017. Pengaruh Pemberian Mikroalga *Chlorella* sp. terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah pada Mencit yang diinduksi Aloksan. *Skripsi*. Jurusan Kimia Universitas Andalas.

Yulianingtyas, Aning dan Kusmartono, Bambang. 2016. Optimasi Volume Pelarut dan Waktu Maserasi Pengambilan Flavonoid dari Daun Belimbing Wuluh. *Jurnal Teknik Kimia*. IST AKPRIND Yogyakarta.

LAMPIRAN

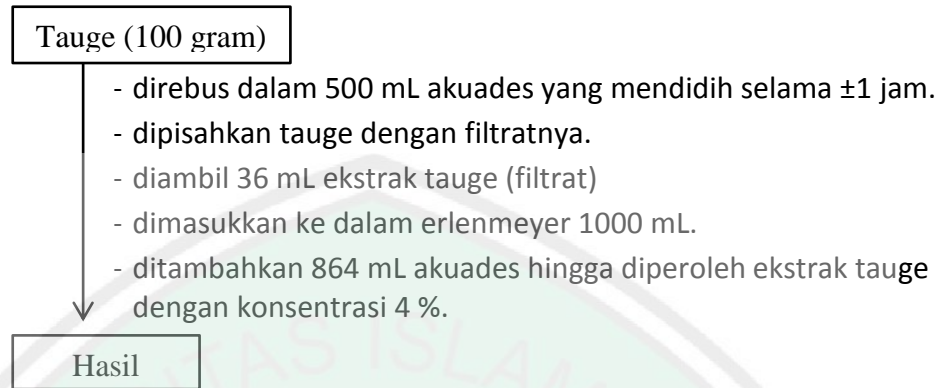
Lampiran 1. Rancangan Penelitian



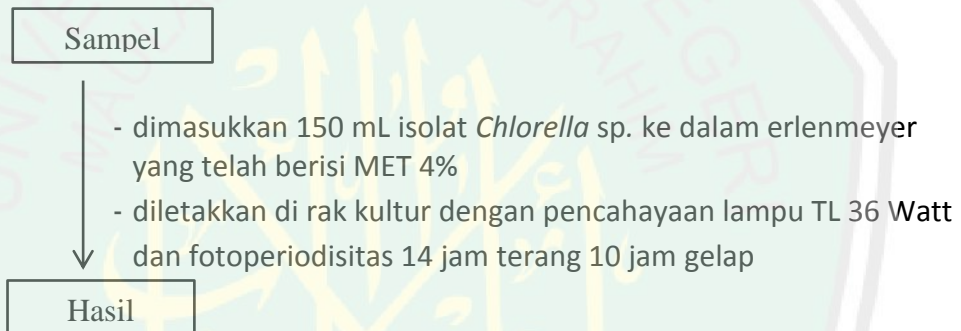
Lampiran 2. Diagram Alir

L.2.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

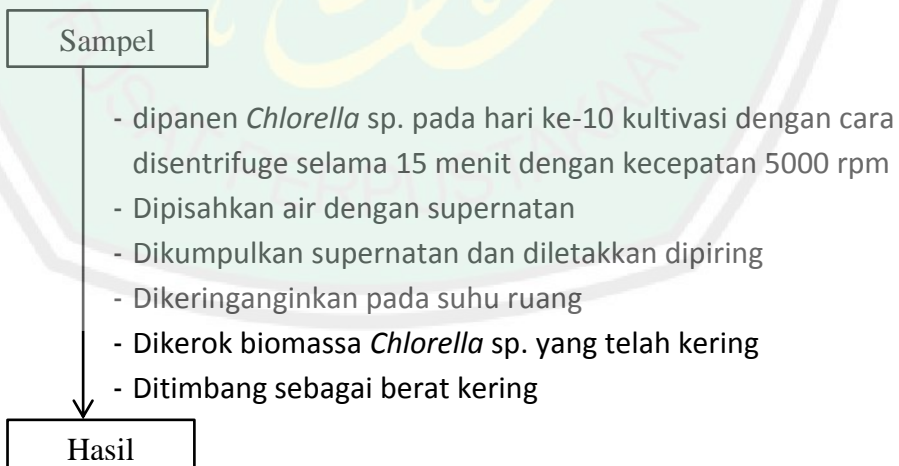
L.2.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%



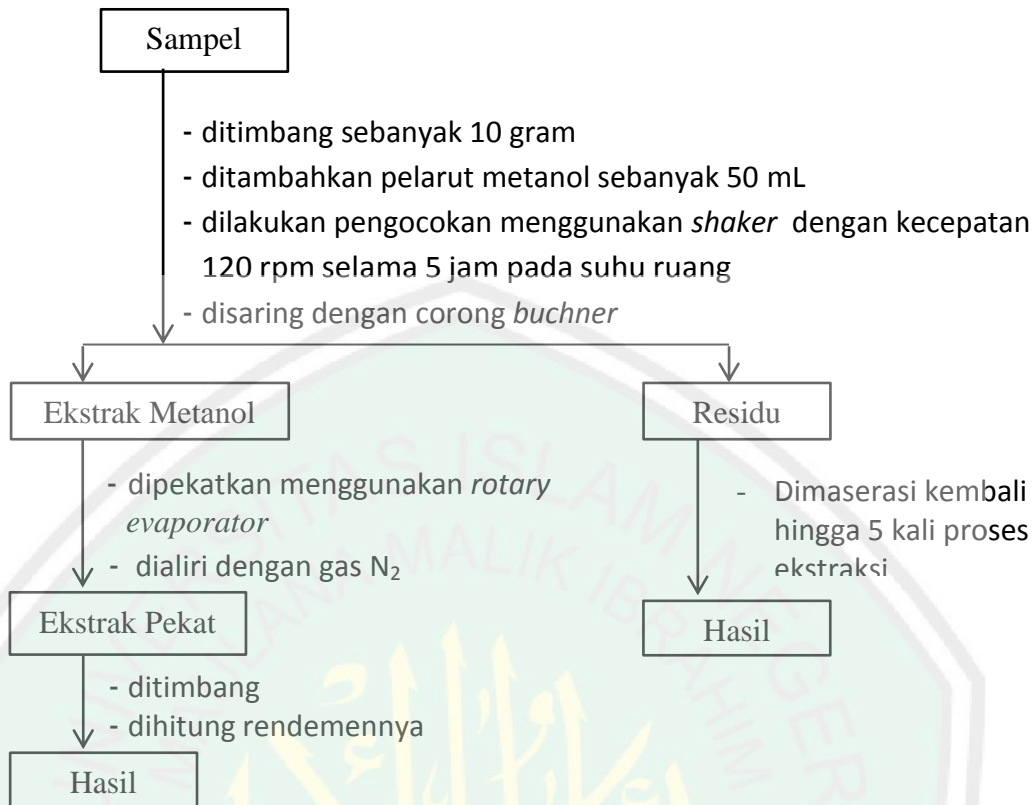
L.2.1.2 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge



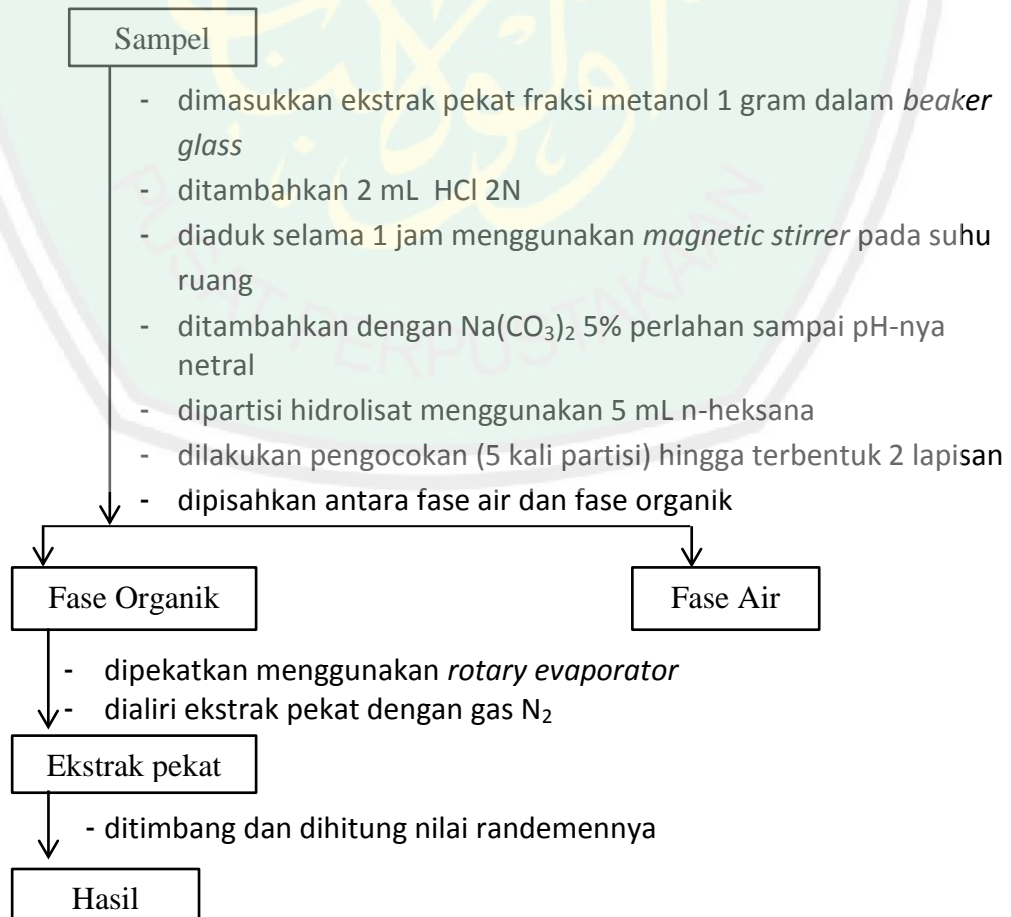
L.2.1.3 Pemanenan Mikroalga *Chlorella sp.*



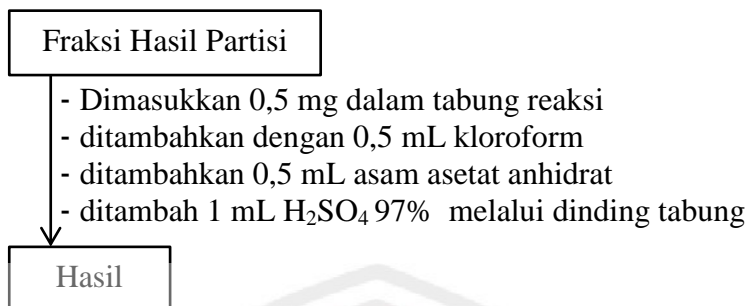
L.2.2 Ekstraksi Maserasi Mikroalga *Chlorella* sp.



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



L.2.4 Uji Fitokimia Senyawa Steroid



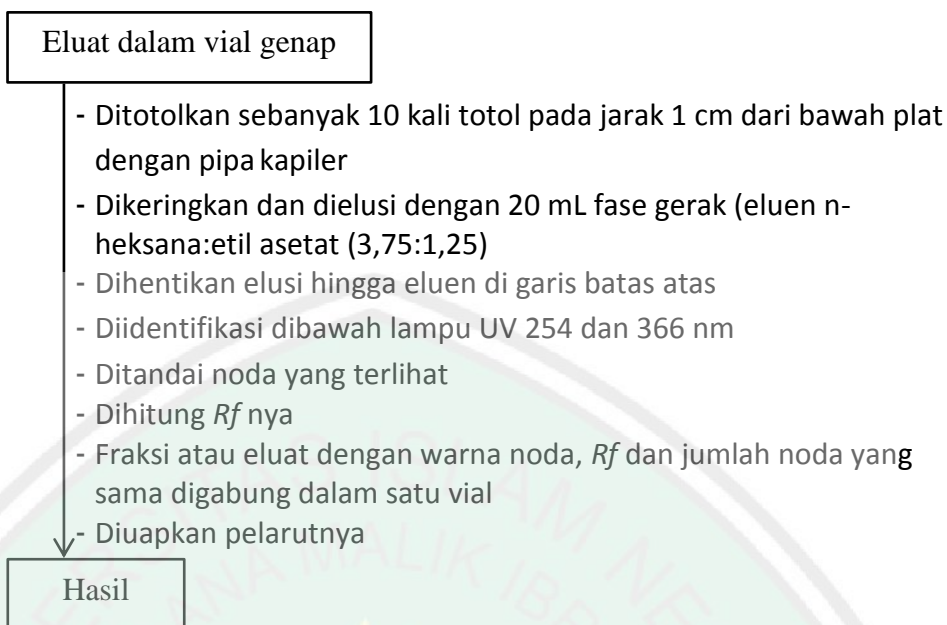
L.2.5 Identifikasi Senyawa Steroid Fraksi n-heksana dengan Instrumentasi LC-MS/MS



L.2.6 Pemisahan Senyawa Steroid Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Kromatografi Kolom Basah

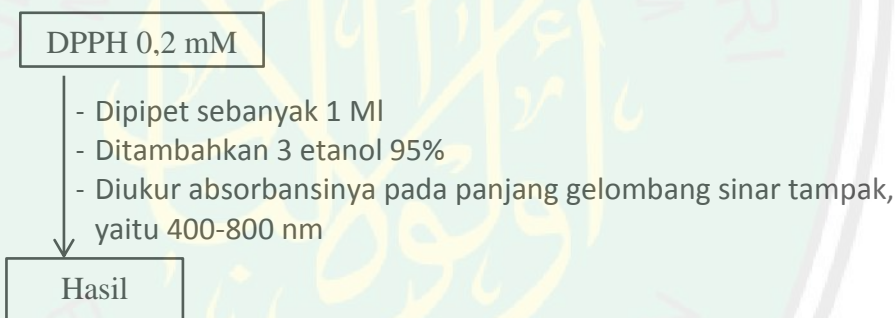


L.2.7 Monitoring Hasil Kromatografi Kolom dengan KLTA

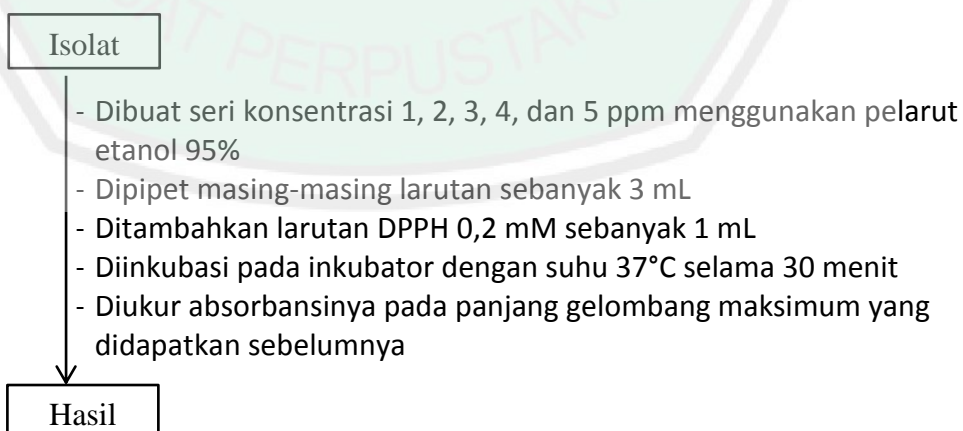


L.2.8 Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH 0,2 mM

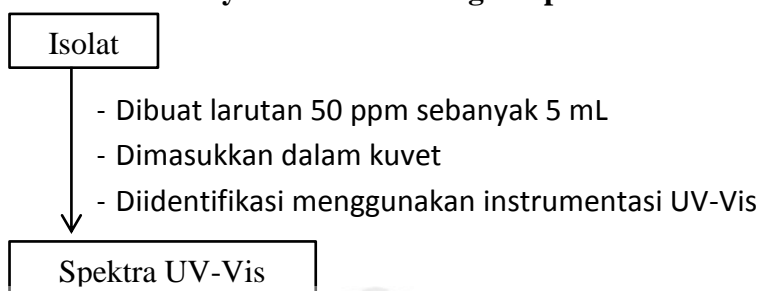
L.2.8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH 0,2 mM



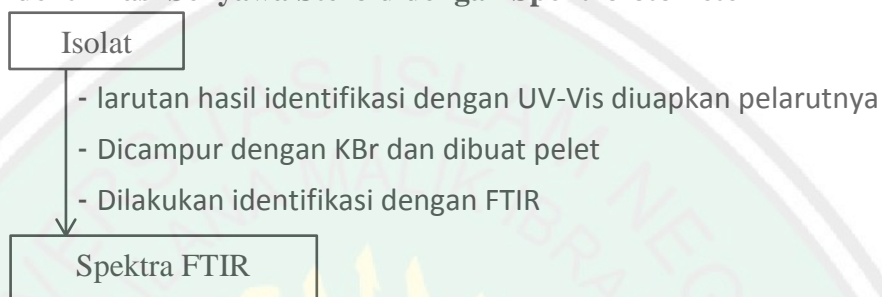
L.2.8.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel



L.2.9 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis



L.2.10 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer FTIR



Lampiran 3. Perhitungan, Pembuatan Reagen dan Pembuatan Larutan

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

a. Pembuatan MET 4% sebanyak 900 mL

MET 4% = (Akuades + Ekstrak tauge)

MET rebusan tauge = $\frac{4}{100} \times \text{Volume MET 4\% yang dibuat}$

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

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

Volume akuades = Volume MET 4% yang dibuat - Volume MET

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

$$= 864 \text{ mL}$$

b. Kultivasi dalam Erlenmeyer 1000 mL

Ketentuan Kultivasi = Perbandingan volume Isolat:MET 4% adalah (1:6)

$$\frac{1}{6} = \frac{x}{900 \text{ mL MET 4\%}}$$

$$6x = 900 \text{ mL}$$

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

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

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

$$= 1050 \text{ mL}$$

L.3.2 Pembuatan Larutan HCl 2N

Konsentrasi larutan HCl dalam produk adalah 37% dengan :

$$\rho \text{ HCl 37\%} = 1,19 \text{ g/mL} = 1190 \text{ g/L}$$

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

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

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

$$\begin{aligned} \text{Mol HCl dalam konsentrasi 37\%} &= \frac{\text{gram HCl}}{\text{BM HCl}} \\ &= \frac{37 \text{ gram}}{36,42 \text{ g/mol}} = 1,0159 \text{ mol} \end{aligned}$$

$$\text{Volume Larutan HCl dalam larutan HCl 37\%} = \frac{m}{\rho}$$

$$= \frac{100 \text{ gram}}{1,19 \text{ g/ml}}$$

$$= 84,033 \text{ mL} = 0,084 \text{ L}$$

$$\text{Molaritas HCl } 37\% = \frac{\text{Mol}}{\text{V (L)}} = \frac{1,0159 \text{ mol}}{0,084 \text{ L}} = 12,094 \text{ mol/L}$$

$$\text{Normalitas HCl } 37\% = n \times \text{Molaritas HCl} = 1 \times 12,094 \text{ mol/L} = 12,094 \text{ N}$$

Sehingga untuk membuat larutan HCl 2 N sebanyak 20 mL dari larutan HCl 12,094 N menggunakan prinsip pengenceran berikut:

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

$$12,094 \text{ N} \times V_1 = 2 \text{ N} \times 20 \text{ mL}, V_1 = 3,3 \text{ mL}$$

Larutan HCl pekat 37 % dipipet sebanyak 3,3 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 20 mL. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.3 Pembuatan larutan $\text{Na}(\text{CO}_3)_2$ 5% (b/v)

Sebanyak 5 gram padatan $\text{Na}(\text{CO}_3)_2$ dilarutkan dengan sedikit akuades dalam gelas kimia 10 mL. Selanjutnya dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan ditambahkan aquades sampai tanda batas lalu dihomogenkan.

L.3.4 Pembuatan reagen *Lieberman Burchard* (LB)

Dipipet 0,5 mL kloroform kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya ditambahkan 1 mL H_2SO_4 95% (Wagner, 2001).

L.3.5 Pembuatan Eluen n-Heksana:Etil Asetat

L.3.5.1 Eluen n-Heksana dan Etil Asetat untuk Kromatografi Kolom

Tabel L.3.1. Pembuatan Eluen Kromatografi Kolom

Perbandingan	Volume n-Heksana (mL)	Volume Etil Asetat (mL)
95:5	95	5
90:10	90	10
85:15	85	15
80:20	80	20

Keterangan: Masing-masing eluen n-heksana:etil asetat yang dibuat adalah sebanyak 100 mL dengan mencampurkan volume n-heksana dan etil asetat sesuai dengan tabel diatas.

L.3.5.2 Eluen n-Heksana dan Etil Asetat untuk Monitoring KLTA

Eluen n-heksana:etil asetat untuk monitoring KLTA dibuat sebanyak 20 mL.dengan perbandingan 3,75:1,25. Volume n-heksana yang digunakan adalah 15 mL dan etil asetat sebanyak 5 mL,kemudian dijenuhkan dalam *Chamber*.

L.3.6 Pembuatan Larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 50 mL

$$\text{Mr DPPH} = 349,33 \text{ g/mol} = 349,33 \text{ mg/mmol}$$

$$\text{Mol DPPH} = V \times C$$

$$= 50 \text{ mL} \times 0,2 \text{ mM} = 50 \text{ mL} \times \frac{0,2}{1000} \text{ M} = 0,01 \text{ mmol}$$

$$\text{mg DPPH} = \text{Mol DPPH} \times \text{Mr DPPH}$$

$$= 0,01 \text{ mmol} \times 349,33 \text{ mg/mmol} = 3,9433 \text{ mg}$$

Serbuk DPPH sebanyak 3,9433 mg kemudian dilarutkan dengan 50 mL etanol dalam labu ukur 50 mL dan dihomogenkan.

L.3.7 Pembuatan Larutan Sampel untuk Uji Antioksidan

L.3.7.1 Pembuatan larutan stok sampel 20 ppm

Sebanyak 0,2 mg isolat steroid dilarutkan dalam 5 mL etanol 95% kemudian dihomogenkan.

L.3.7.2 Pembuatan larutan sampel 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm sebanyak 10 ml dari larutan stok sampel 20 ppm

Contoh pembuatan 10 mL larutan sampel 1 ppm dari larutan stok sampel 20 ppm:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$20 \text{ ppm} \times V_1 = 1 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} = V_1 = 0,25 \text{ mL}$$

Sehingga untuk membuat larutan sampel 1 ppm adalah larutan stok sampel 20 ppm sebanyak 0,25 mL ditandabatkan dengan etanol 95% pada labu ukur 5 mL.

Tabel L.3.2 Pembuatan Larutan Sampel Uji Antioksidan

Konsentrasi (ppm)	Volume Larutan Stok 20 ppm (mL)
1	0,25
2	0,5
3	0,75
4	1
5	1,25

Keterangan: Pembuatan larutan dilakukan dalam labu ukur 5 mL. Setiap larutan stok 20 ppm yang diambil diencerkan menjadi 5 mL menggunakan etanol 95%.

L.3.8.3 Pembuatan Larutan Vitamin C (Nugraheni, 2007)

L.3.8.3.1 Pembuatan larutan stok vitamin C 50 ppm sebanyak 10 mL

Vitamin C sebanyak 0,5 mg kemudian ditandabatkan dengan etanol 95% pada labu ukur 10 mL sehingga diperoleh larutan vitamin C 50 ppm.

L.3.8.3.2 Pembuatan larutan vitamin C 1, 2, 3, 4 dan 5 ppm sebanyak 5 ml dari larutan stok vitamin C 50 ppm

Contoh pembuatan 10 mL larutan vitamin C 1 ppm dari larutan stok vitamin C 10

ppm: $(M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2)$:

$$50 \text{ ppm} \times V_1 = 1 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,1 \text{ mL} = 100 \mu\text{L}$$

Sehingga untuk membuat larutan vitamin C 1 ppm adalah larutan stok vitamin C 10 ppm sebanyak 1 mL kemudian ditandabatkan dengan etanol hingga 10 mL.

Tabel L.3.3 Pembuatan larutan vitamin C

Konsentrasi (ppm)	Volume Larutan Stok Vitamin C 10 ppm (mL)
1	0,1
2	0,2
3	0,3
4	0,4
5	0,5

Keterangan: Pembuatan larutan vitamin C dilakukan dalam labu ukur 5 mL.

Setiap larutan stok vitamin C 10 ppm yang diambil diencerkan menjadi 5 mL menggunakan etanol 95%.

L.3.9 Rendemen Hasil Maserasi

Berat sampel awal = 10,32 g

Berat ekstrak yang diperoleh = 3,68 g

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kasar}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% = \frac{3,68 \text{ gram}}{10,32 \text{ gram}} \times 100\% = 35,65\%$$

L.3.10 Rendemen Hasil Hidrolisis dan Partisi

Berat sampel awal = 3,24 g

Berat fraksi yang diperoleh = 1,06 g

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat fraksi n-heksana}}{\text{Berat ekstrak metanol}} \times 100\%$$

$$= \frac{1,06 \text{ gram}}{3,24 \text{ gram}} \times 100\% = 32,72\%$$

L.3.11 Perhitungan Nilai R_f Monitoring dengan KLTA

Jarak plat KLT dari batas bawah ke batas atas adalah 8 cm. Nilai R_f dihitung dengan rumus:

$$R_f = \frac{\text{jarak tempuh spot}}{\text{jarak tempuh fasa gerak}}$$

Contoh perhitungan R_f isolat C = $\frac{6,6}{8} = 0,82$

Perhitungan R_f pada Tabel L.1.3 untuk isolat lainnya seperti contoh diatas

Tabel L.3.4 Data R_f Hasil Monitoring dengan KLTA

Isolat	Vial ke-	Jarak tempuh senyawa	R_f
A	1-16	-	-
B	17-32	7,3	0,91
C	33-45	6,6	0,82
D	46-59	-	-
E	60	6	0,75
F	61-79	6	0,75
		5	0,62
G	80-109	5,4	0,67
		5	0,62
		5	0,62
H	110-111	4,5	0,56
		3,8	0,47
		5	0,62
I	112-122	3,8	0,47
J	123-132	3,8	0,47
K	133-171	3,8	0,47
		3	0,37
		3,8	0,47
L	172-180	3	0,37
		2,3	0,28
M	181-202	3	0,37
		2,3	0,28
		3	0,27
N	203-210	2,3	0,28
		1,2	0,15
		2,3	0,28
O	211-235	1,2	0,15
P	236-276	1,2	0,15
Q	277-296	1,7	2,12
		1,2	0,15

L.3.12 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi n-Heksana, Isolat dan Asam Aksorbat

Tabel L.3.5 Data Absorbansi Antioksidan Fraksi n-Heksana

C (ppm)	Pengukuran ke-1		Pengukuran ke-2		Pengukuran ke-3	
	Abs. Kontrol	Abs Sampel	Abs. Kontrol	Abs Sampel	Abs. Kontrol	Abs Sampel
1	0,1846	0,1600	0,2305	0,2190	0,1860	0,4163
2	0,1802	0,1891	0,2310	0,2008	0,1848	0,1577
3	0,1865	0,1736	0,2276	0,2156	0,1848	0,1564
4	0,1845	0,1553	0,2272	0,2063	0,1856	0,2785
5	0,1844	0,1477	0,2277	0,2002	0,1842	0,2330

Keterangan:

Data absorbansi diatas adalah absorbansi rata rata dari 3 pegulangan uji aktivitas antioksidan fraksi n-heksana pada waktu uji yang berbeda

- Perhitungan % Aktivitas Antioksidan Fraksi n-Heksana dengan rumus:

$$\% \text{ Aktivitas Antioksidan} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\%$$

- Contoh perhitungan % aktivitas antioksidan pada konsentrasi 1 ppm pengukuran ke-1:

$$\% \text{ Aktivitas Antioksidan} = \frac{0,1846 - 0,1600}{0,1846} \times 100\% = 13,226\%$$

- Perhitungan % aktivitas antioksidan pada konsentrasi lainnya seperti contoh perhitungan % aktivitas antioksidan pada konsentrasi 1 ppm di atas.

Tabel L.3.6 Hasil Perhitungan % Aktivitas Antioksidan Fraksi n-heksana

C (ppm)	Aktivitas Antioksidan Pengukuran ke-1 (%)	Aktivitas Antioksidan Pengukuran ke-2 (%)	Aktivitas Antioksidan Pengukuran ke-3 (%)
1	13,23	4,90	-12,38
2	-4,90	13,07	14,66
3	6,90	16,62	15,36
4	15,83	9,10	-50,05
5	19,90	12,04	26,49

Berdasarkan Tabel L.3.2, % aktivitas antioksidan yang digunakan dalam perhitungan nilai EC₅₀ untuk masing-masing konsentrasi adalah:

Tabel L.3.7 Data Aktivitas Antioksidan untuk Perhitungan Nilai EC₅₀ Fraksi n-Heksana

Konsentrasi (ppm)	Aktivitas Antioksidan (%)
1	13,23
2	14,66
3	15,36
4	15,83
5	19,90

Perhitungan nilai EC₅₀ Fraksi n-Heksana :

Best-fit values			
Bottom	= 0		
Top	= 100		
LogEC50	3,224		
HillSlope	0,2622		
EC50	1673		
Span	= 100		
Std. Error			
LogEC50	1,171		
HillSlope	0,1109		
95% CI (profile likelihood)			
LogEC50	1,579 to +infinity		
HillSlope	-0,08134 to 0,6586		
EC50	37,97 t		
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	3		
R square	0,6585		
Absolute Sum of Squares	8,919		
Sy.x	1,724		
Constraints			
Bottom	Bottom = 0		
Top	Top = 100		
One curve for all data sets			
Best-fit values			
Bottom	= 0		
Top	= 100		
LogEC50	3,224		3,224
HillSlope	0,2622		0,2622
EC50	1673		1673
Span	= 100		
Std. Error			
LogEC50	1,171		1,171
HillSlope	0,1109		0,1109
95% CI (profile likelihood)			
LogEC50	1,579 to +infinity		1,579 to +infinity
HillSlope	-0,08134 to 0,6586		-0,08134 to 0,6586
EC50	37,97 to ???		37,97 to ???
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom			3
R square	0,6585		0,6585
Absolute Sum of Squares	8,919		8,919
Sy.x			1,724
Constraints			
Bottom	Bottom = 0		
Top	Top = 100		
LogEC50	LogEC50 is shared		
HillSlope	HillSlope is shared		
Number of points			
# of X values	15		
# Y values analyzed	5		

- **Data Absorbansi Pengukuran Antioksidan Isolat C**

Tabel L.3.8 Data Absorbansi Antioksidan Isolat C

C (ppm)	Pengukuran ke-1		Pengukuran ke-2		Pengukuran ke-3	
	Abs. Kontrol	Abs Sampel	Abs. Kontrol	Abs Sampel	Abs. Kontrol	Abs Sampel
1	0,2752	0,2297	0,2859	0,2700	0,6678	0,4524
2	0,2749	0,2292	0,2860	0,2672	0,6681	0,4451
3	0,2760	0,2352	0,2829	0,2485	0,6665	0,4832
4	0,2735	0,2354	0,2839	0,2488	0,6657	0,4408
5	0,2738	0,2462	0,2843	0,3006	0,6657	0,4191

Keterangan:

Data absorbansi diatas adalah absorbansi rata rata dari 3 pegulangan uji aktivitas antioksidan isolat C pada waktu uji yang berbeda.

- Perhitungan % aktivitas antioksidan isolat sesuai dengan contoh perhitungan % aktivitas antioksidan fraksi n-heksana di atas.

Tabel L.3.9 Hasil Perhitungan % Aktivitas Antioksidan Isolat C

C (ppm)	Aktivitas Antioksidan Pengukuran ke-1 (%)	Aktivitas Antioksidan Pengukuran ke-2 (%)	Aktivitas Antioksidan Pengukuran ke-3 (%)
1	16,53	5,56	33,25
2	16,62	6,57	33,38
3	14,78	12,16	33,06
4	13,93	12,36	22,78
5	10,08	-5,73	37,04

Berdasarkan Tabel L.3.2, % aktivitas antioksidan yang digunakan dalam perhitungan nilai EC50 untuk masing-masing konsentrasi adalah:

Tabel L.3.10 Data aktivitas antioksidan untuk perhitungan nilai EC50 Isolat C

Konsentrasi (ppm)	Aktivitas Antioksidan (%)
1	5,56
2	6,57
3	12,16
4	13,93
5	37,04

Perhitungan nilai EC₅₀ Isolat Hasil Kromatografi Kolom :

Best-fit values	
Bottom	= 0
Top	= 100
LogEC50	0,7948
HillSlope	3,052
EC50	6,235
Span	= 100
Std. Error	
LogEC50	0,06122
HillSlope	1,104
95% CI (profile likelihood)	

LogEC50	0,6912 to 2,299	
HillSlope	0,3935 to ???	
EC50	4,911 to 199,1	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R square	0,8464	
Absolute Sum of Squares	100,4	
Sy.x	5,784	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
One curve for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0	
Top	= 100	
LogEC50	0,7948	0,7948
HillSlope	3,052	3,052
EC50	6,235	6,235
Span	= 100	
Std. Error		
LogEC50	0,06122	0,06122
HillSlope	1,104	1,104
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	0,6912 to 2,299	0,6912 to 2,299
HillSlope	0,3935 to ???	0,3935 to ???
EC50	4,911 to 199,1	4,911 to 199,1
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R square	0,8464	0,8464
Absolute Sum of Squares	100,4	100,4
Sy.x		5,784
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
# of X values	15	
# Y values analyzed	5	

- **Data Absorbansi Pengukuran Antioksidan Asam Askorbat**

Tabel L.3.11 Data Absorbansi Antioksidan Asam Askorbat

C (ppm)	Pengukuran ke-1		Pengukuran ke-2		Pengukuran ke-3	
	Abs. Kontrol	Abs Sampel	Abs. Kontrol	Abs Sampel	Abs. Kontrol	Abs Sampel
1	0,4699	0,2240	0,4699	0,2840	0,4064	0,1836
2	0,4696	0,2792	0,4696	0,2714	0,4068	0,2086
3	0,4701	0,2183	0,4701	0,0876	0,4066	0,0691
4	0,4690	0,2049	0,4690	0,0429	0,4073	0,0196
5	0,4688	0,2154	0,4688	0,0363	0,4061	0,0137

Keterangan:

Data absorbansi diatas adalah absorbansi rata rata dari 3 pegulangan uji aktivitas antioksidan isolat C pada waktu uji yang berbeda.

- Perhitungan % aktivitas antioksidan isolat sesuai dengan contoh perhitungan % aktivitas antioksidan fraksi n-heksana di atas.

Tabel L.3.12 Hasil Perhitungan % Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat

C (ppm)	Aktivitas Antioksidan Pengukuran ke-1 (%)	Aktivitas Antioksidan Pengukuran ke-2 (%)	Aktivitas Antioksidan Pengukuran ke-3 (%)
1	52,33	39,50	54,82
2	40,50	42,20	48,72
3	53,56	81,36	83,00
4	56,23	90,85	95,19
5	54,05	92,28	96,63

Berdasarkan Tabel L.3.2, % aktivitas antioksidan yang digunakan dalam perhitungan nilai EC50 untuk masing-masing konsentrasi adalah:

Tabel L.3.13 Data Aktivitas Antioksidan untuk Perhitungan Nilai EC50 Asam Askorbat

Konsentrasi (ppm)	Aktivitas Antioksidan (%)
1	54,82
2	48,72
3	83,00
4	95,19
5	96,63

Perhitungan nilai EC₅₀ Asam Askorbat :

Best-fit values	
Bottom	= 0
Top	= 100
LogEC50	-0,01869
HillSlope	1,503
EC50	0,9579
Span	= 100
Std. Error	
LogEC50	0,07274
HillSlope	0,3344

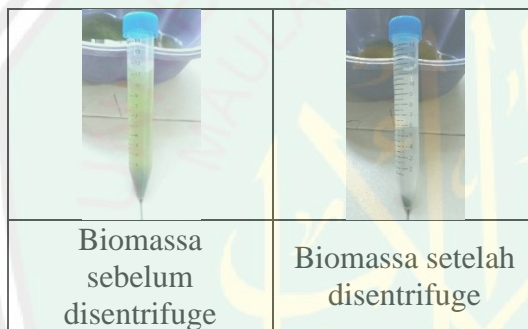
95% CI (profile likelihood)			
LogEC50	-0,5425 to 0,1525		
HillSlope	0,6128 to 2,767		
EC50	0,2868 to 1,421		
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom		3	
R square	0,9074		
Absolute Sum of Squares	120,6		
Sy.x	6,34		
Constraints			
Bottom	Bottom = 0		
Top	Top = 100		
One curve for all data sets			
Best-fit values			
Bottom	= 0		
Top	= 100		
LogEC50	-0,01869	-0,01869	
HillSlope	1,503	1,503	
EC50	0,9579	0,9579	
Span	= 100		
Std. Error			
LogEC50	0,07274	0,07274	
HillSlope	0,3344	0,3344	
95% CI (profile likelihood)			
LogEC50	-0,5425 to 0,1525	-0,5425 to 0,1525	
HillSlope	0,6128 to 2,767	0,6128 to 2,767	
EC50	0,2868 to 1,421	0,2868 to 1,421	
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom			3
R square	0,9074		0,9074
Absolute Sum of Squares	120,6		120,6
Sy.x			6,34
Constraints			
Bottom	Bottom = 0		
Top	Top = 100		
LogEC50	LogEC50 is shared		
HillSlope	HillSlope is shared		
Number of points			
# of X values	15		
# Y values analyzed	5		

Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian

L.4.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella* sp.



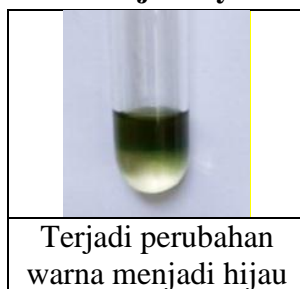
L.4.2 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella* sp.



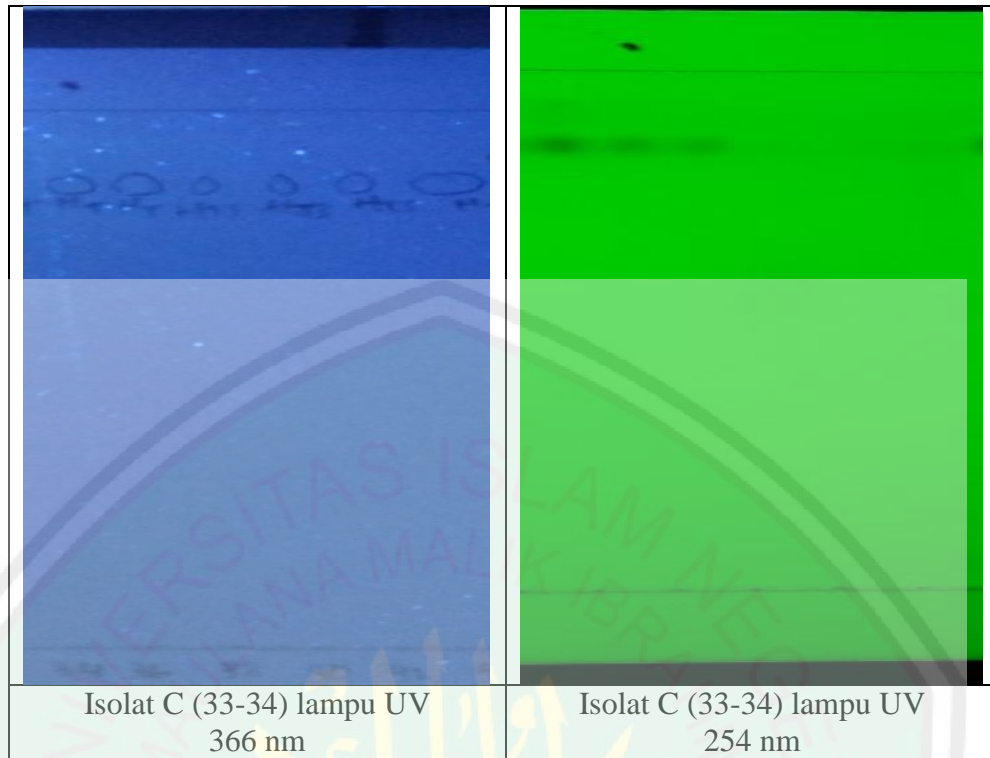
L.4.3 Ekstraksi Maserasi dan partisi



L.4.4 Uji Senyawa Steroid dengan reagen LB

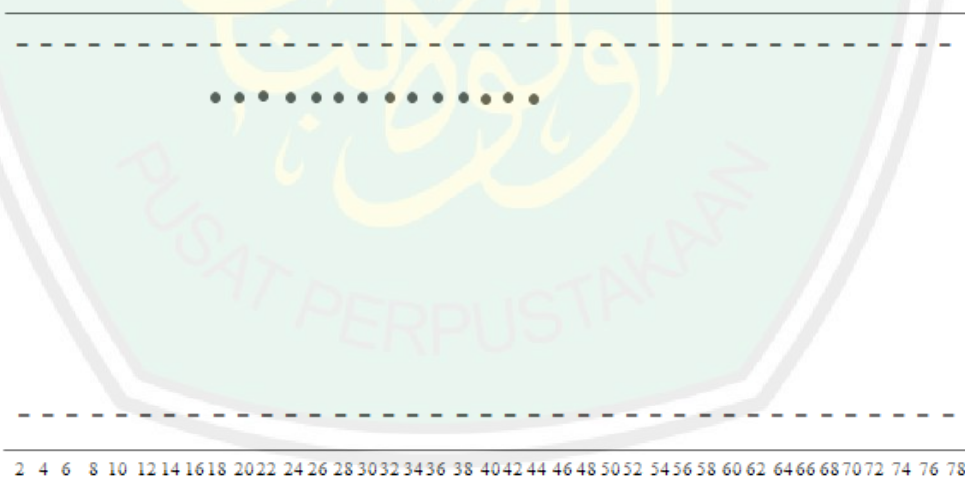


L.4.5 Hasil Monitoring Isolat C dengan KLTA

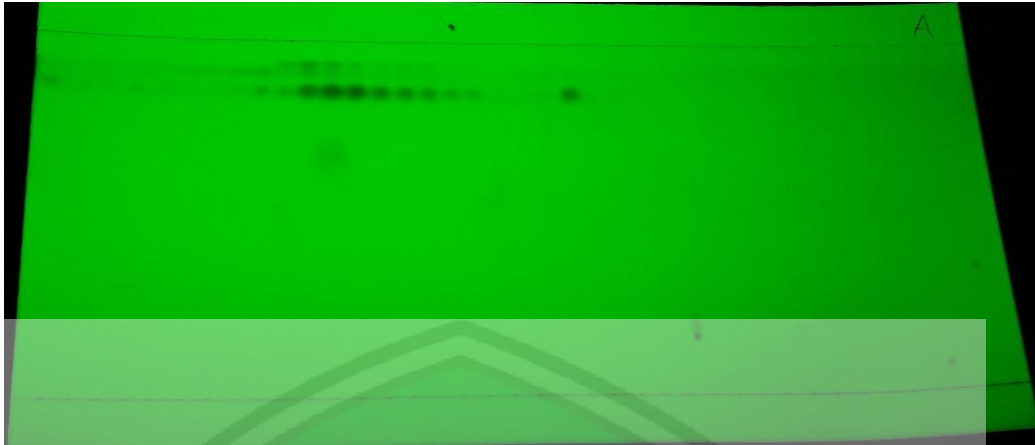


Gambar L.4.1 Hasil Monitoring Isolat C

L.4.6 Hasil Monitoring dengan KLTA PLAT A (UV 254 nm)

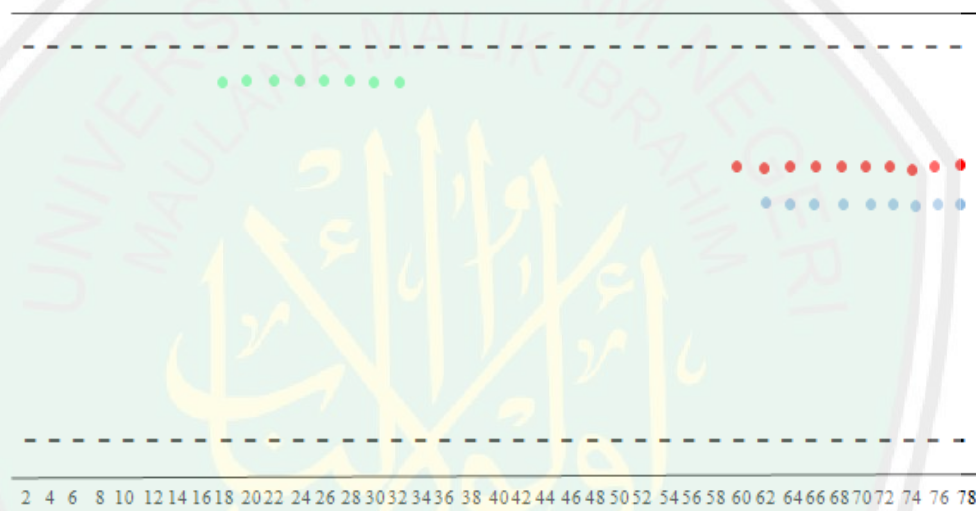


Gambar L.4.2 Ilustrasi Monitoring KLTA Plat A dilihat pada Lampu UV 254 nm

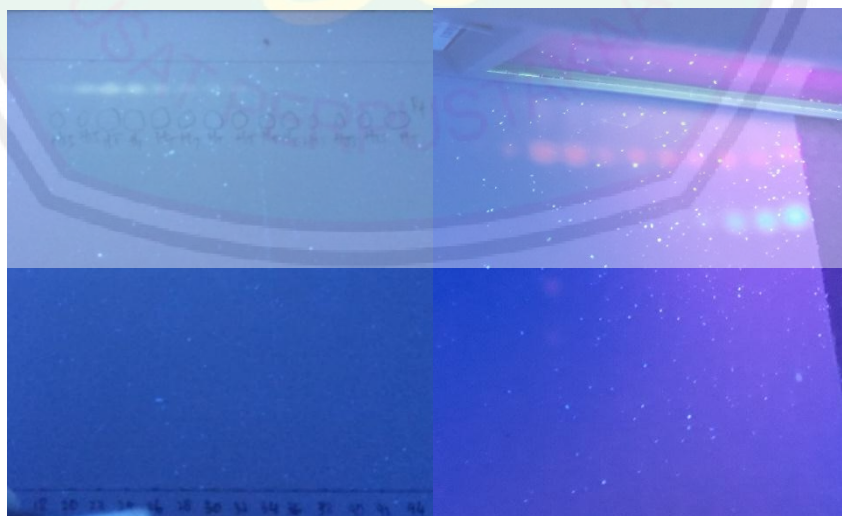


Gambar L.4.3 Hasil monitoring KLTA Plat A dilihat pada Lampu UV 254 nm

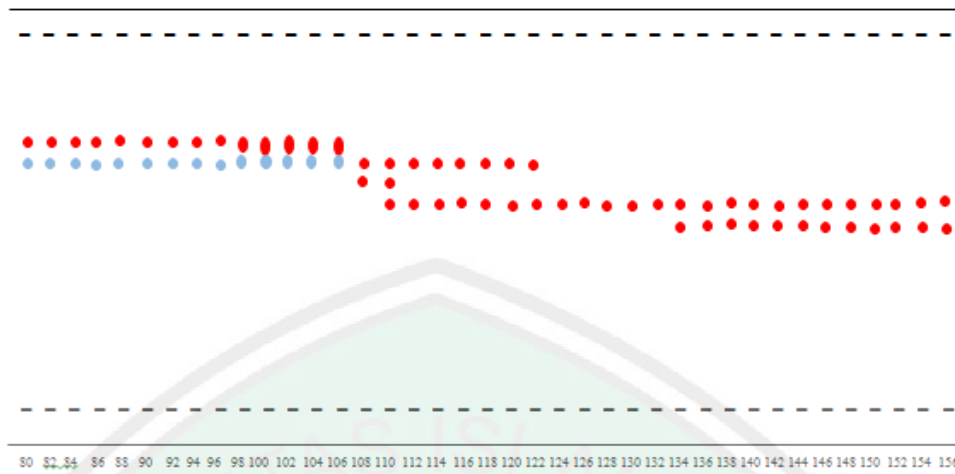
PLAT A (UV 366 nm)



Gambar L.4.4 Ilustrasi Monitoring KLTA plat A dilihat pada Lampu UV 366 nm



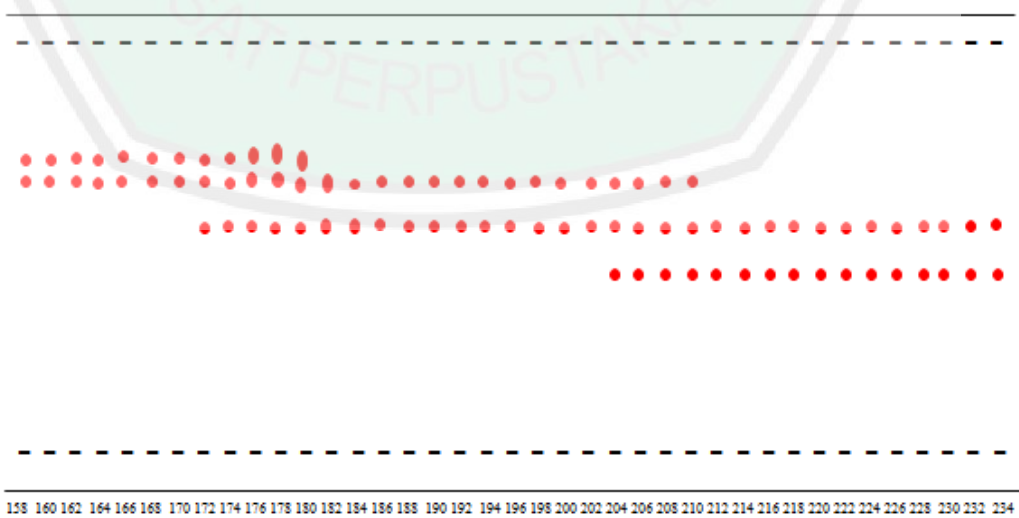
Gambar L.4.5 Hasil Monitoring KLTA Plat A dilihat pada Lampu UV 366 nm

PLAT B (UV 366 nm)

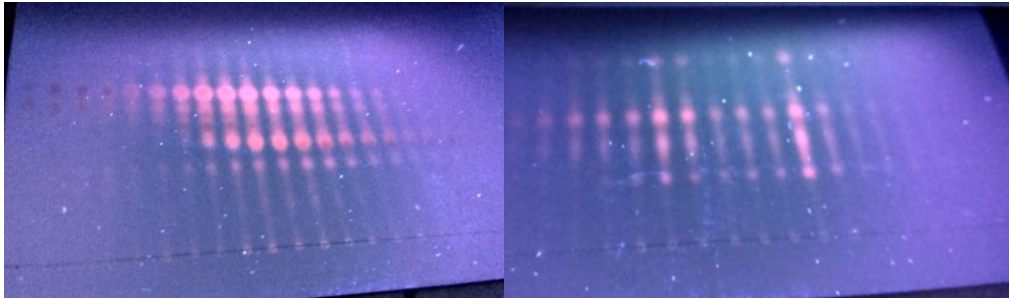
Gambar L.4.6 Ilustrasi Monitoring KLTA Plat B dilihat pada Lampu UV 366 nm



Gambar L.4.7 Hasil Monitoring KLTA Plat B dilihat pada Lampu UV 366 nm

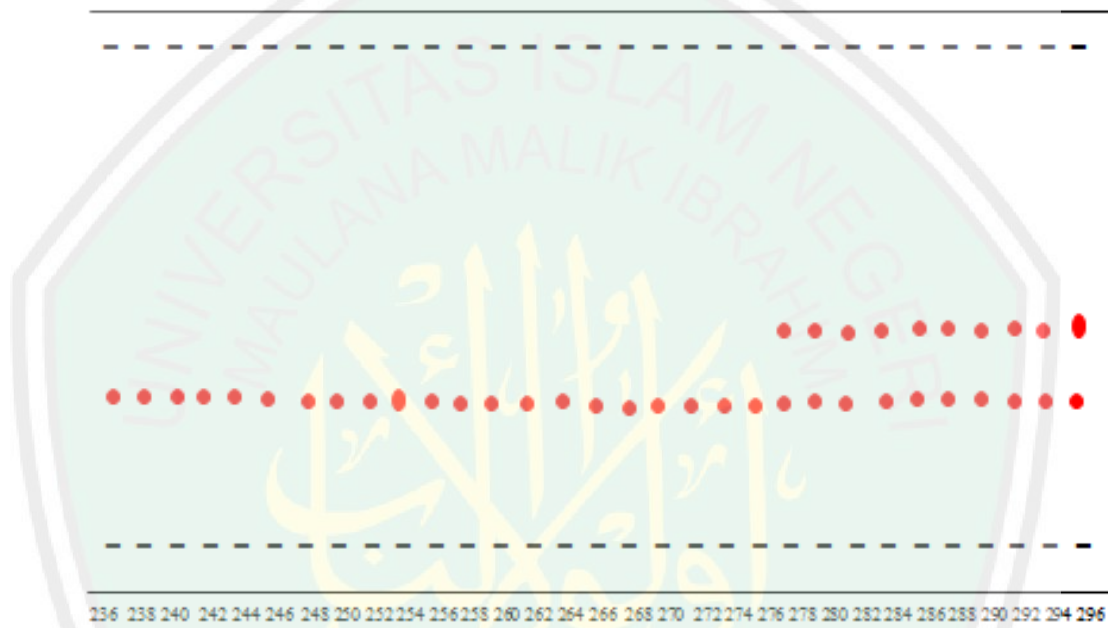
PLAT C (UV 366 nm)

Gambar L.4.8 Ilustrasi Monitoring KLTA Plat C dilihat pada Lampu UV 366 nm

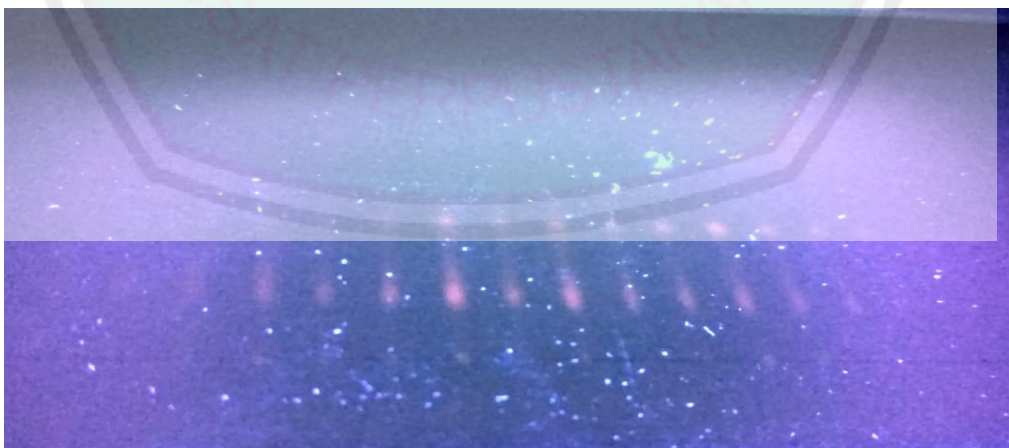


GambarL.4.9 Hasil Monitoring KLTA Plat C dilihat pada Lampu UV 366 nm

PLAT D (UV 366 nm)



Gambar L.4.10 Ilustrasi Monitoring KLTA Plat D dilihat pada Lampu UV 366 nm



Gambar L.4.11 Hasil Monitoring KLTA Plat D dilihat pada Lampu UV 366 nm

L.4.7 Uji Aktivitas Antioksidan



Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid



Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin C



Lampiran 5. Spektra LC-MS/MS Fraksi n-Heksana *Chlorella* sp.

E:\KALIAWAN\...AW JUNI\Fraksi_mcalga_2

RT: 0.00 - 7.02 SM: 5G

