

**UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI LAPIS
TIPIS (KLT) FRAKSI n-HEKSANA MIKROALGA *Chlorella sp.***

SKRIPSI

Oleh:
NUR AINI WAHDANIYAH
NIM. 15630049



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

**UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS
(KLT) FRAKSI n-HEKSANA MIKROALGA *Chlorella sp.***

SKRIPSI

Oleh:
NUR AINI WAHDANIYAH
NIM. 15630049

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

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

**UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI LAPIS
TIPIS (KLT) FRAKSI n-HEKSANA MIKROALGA *Chlorella sp.***

SKRIPSI

Oleh:
NUR AINI WAHDANIYAH
NIM. 15630049

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 11 Oktober 2019

Pembimbing I



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

Pembimbing II



Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P
NIP. 19750410 200501 2 009

Mengetahui,
Ketua Jurusan



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

**UJI TOKSISITAS ISOLAT STEROID HASIL KROMATOGRAFI LAPIS
TIPIS (KLT) FRAKSI n-HEKSANA MIKROALGA *Chlorella sp.***

SKRIPSI

Oleh:
NUR AINI WAHDANIYAH
NIM. 15630049

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 11 Oktober 2019

Penguji Utama	: Diana Candra Dewi, M.Si NIP. 19779720 200312 2 001	(.....)
Ketua Penguji	: Rachmawati Ningsih, M.Si NIP. 19810811 200801 2 010	(.....)
Sekretaris Penguji	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	(.....)
Anggota Penguji	: Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P NIP. 19750410 200501 2 009	(.....)

Mengetahui,
Ketua Jurusan



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

PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Nur Aini Wahdaniyah

NIM : 15630049

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : "Uji Toksisitas Isolat Steroid Kromatografi Lapis Tipis
(KLT) Fraksi n-Heksana Mikroalga *Chlorella sp.*"

menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi ini merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya, kecuali dengan mencantumkan sumber kutipan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia mempertanggungjawabkannya sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 22 November 2019
Yang Membuat Pernyataan,



Nur Aini Wahdaniyah
NIM. 15630049

MOTTO

PATIENCE IS NEEDED WHEN
YOU WANT TO ACHIEVE A
SUCCESS AND AN **ACTION**
IS THE FOUNDATION OF
A **SUCCESS**



HALAMAN PERSEMBAHAN

Pertama-tama saya ucapkan rasa syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan segala rahmat, karunia dan hidayah-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan tanggungjawab saya dalam menyelesaikan skripsi ini. Kedua kalinya sholawat serta salam selalu terlimpahkan kepada Baginda Nabi Muhammad SAW.

Skripsi ini saya persembahkan kepada kedua orang tua saya tercinta, terkasih, dan tersayang yang tak pernah luput sepanjang masa, Bapak Yusuf (alm.) dan Ibu Khaula. Terimakasih atas segala doa, dukungan, motivasi, kasih sayang dan semangat selama ini. Tanpa kedua orang tua saya, segala perjuangan tidak akan tercapai dengan mudah. Semoga Allah memberikan tempat terbaik untuk Ayah dan untuk Ibu semoga sehat selalu. Selanjutnya, teruntuk adek-adek tercinta, M. Khoirul Fikri, M. Shofwil Ibad, Alfina Amalia, dan M. Ikhwanul Hakim. Terimakasih atas segala bentuk dukungan secara tidak langsung melalui pertanyaan “Kapan selesai? Kapan pulang? Segeralah pulang mbak”.

Dan untuk sahabat-sahabatku tercinta, terimakasih karena selalu terbuka dalam menerima keluh kesahku dan selalu berbagi kebahagiaan tanpa pamrih, serta segala bentuk dukungan dari kalian sehingga dapat mengantar saya di titik ini. Tak lupa pula boygrup k-pop seventeen, musisi favorit saya. Terimakasih atas segala dukungan, motivasi dan semangat secara tidak langsung yang kalian tuliskan dalam karya.

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal penelitian dengan judul “**Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis Fraksi n-Heksana Mikroalga *Chlorella sp.***”. Selanjutnya penulis haturkan ucapan terimakasih kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya, khususnya kepada:

1. Kedua orang tua tercinta, Bapak Yusuf (alm.) dan Ibu Khaula yang selalu memberikan do'a, semangat, moral dan motivasi agar terus berusaha dan yakin kepada Allah sehingga skripsi ini dapat terselesaikan
2. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si, Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si, dan Ibu Dr. Akyunul Jannah, S.Si., M.P selaku dosen pembimbing, konsultan, dan pembimbing agama yang telah meluangkan waktu untuk membimbing, memotivasi, mengarahkan dan memberi masukan sehingga skripsi ini dapat terselesaikan
3. Seluruh dosen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan pengetahuan, pengalaman serta wawasannya sebagai pedoman dan bekal bagi penulis.
4. Laboran jurusa kimia seperti mas Abi, mbak Mei, mbak Rika, mbak Is, mbak Susi, pak Royyan, dan pak Taufik yang telah banyak membantu selama proses penelitian.
5. Teman satu riset mikroalga *Chlorella sp.* yang telah banyak membantu selama proses penelitian.

6. Sahabat tercinta seperjuangan dari seminal proposal sampai sidang skripsi Firda Marantika Fikri yang telah menemani, mendampingi, dan membantu banyak hal sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
7. Sahabatku tercinta Lailatussajja, Richanatuz Zuhriyah, Nur Imroatus Sholihah, Dita Amalia, Roisyatul Habibah, Miftahul Jannah Fakhruddin, Maghfirotus Sholihah, Nikmah Himmatul Ulya, Yolanda Sintia Dewi, Afifatul Farida, Nur Wida Ahdiyati, Nawang Wulan Widari, Saadatud Darain, Husnul Hamidah, Hurrotul Firdausiyah, dan Mas Aisyatul Widad yang selalu memberikan motivasi, do'a, dukungan dan nasihat sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
8. Musisi favoritku, S.coups, Jeonghan, Joshua, Jun, Hoshi, Wonwoo, Woozi, The8, Mingyu, DK, Seungkwan, Vernon, dan Dino (Seventeen) yang telah memberikan motivasi dan semangat secara tidak langsung melalui musik dan karya lainnya sehingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan.
9. Kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah ikut memberikan bantuan dalam menyelesaikan skripsi ini

Penulis sadar bahwa dalam pelaksanaan maupun penyusunan skripsi ini belum sempurna. Oleh karena itu, segala kritik dan saran akan penulis terima. Akhirnya, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca khususnya dan pembaca pada umumnya.

Malang, 17 Juli 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN.....	iv
MOTTO	v
HALAMAN PERSEMBAHAN	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR PERSAMAAN	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvi
مستخلص البحث.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Batasan Masalah.....	4
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dan Pemanfaatannya dalam Perspektif Islam ..	6
2.2 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam Media Ekstrak Tauge	9
2.3 Isolasi Senyawa Steroid dari Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	13
2.3.1 Ekstraksi Senyawa Aktif dari <i>Chlorella sp.</i> dengan Maserasi ...	15
2.3.2 Hidrolisi dan Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> ..	16
2.3.3 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	17
2.4 Uji Toksisitas Isolat Steroid Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan Metode BSLT (<i>Brine Shrimp Lethality Test</i>)	19
2.5 Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLT Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	20
2.6 Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLT Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> Menggunakan FTIR	22
2.7 Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLTP Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> Menggunakan LC-MS/MS	23
BAB III METODE PENELITIAN	26
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	26
3.2 Alat dan Bahan	26
3.2.1 Alat.....	26
3.2.2 Bahan.....	26
3.3 Tahapan Penelitian	26

3.4	Cara Kerja	27
3.4.1	Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%	27
3.4.2	Pemanenan Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	27
3.4.3	Ekstraksi Maserasi Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	28
3.4.4	Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	28
3.4.5	Uji Fitokimia Senyawa Steroid	28
3.4.6	Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)	28
3.4.7	Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)	29
3.4.8	Penetasan Larva Udang <i>Artemia salina</i> L.	30
3.4.9	Uji Toksisitas	30
3.4.10	Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis	31
3.4.11	Identifikasi Senyawa Steroid dengan FTIR	31
3.4.12	Identifikasi Senyawa Steroid dengan LC-MS/MS	32
3.5	Analisis Data	32
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		34
4.1	Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam MET 4%	34
4.2	Pemanenan Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	35
4.3	Ekstraksi Maserasi Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	35
4.4	Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	36
4.5	Uji Fitokimia Senyawa Steroid dengan Reagen <i>Lieberman – Burchard</i>	37
4.6	Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)	39
4.7	Pemisahan Senyawa Steroid Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)	42
4.8	Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil KLTP Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> Menggunakan Metode BSLT (<i>Brine Shrimp Lethality Test</i>)	44
4.8.1	Penetasan Larva Udang <i>Artemia salina</i>	44
4.8.2	Uji Toksisitas	45
4.9	Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLTP Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	48
4.10	Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLTP Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> Menggunakan Spektrofotometer <i>Fourier Transform Infrared</i> (FTIR) ..	50
4.11	Identifikasi Senyawa Steroid Hasil KLTP Menggunakan LC-MS/MS ..	51
4.12	Pengaplikasian Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> Sebagai Bentuk Kebersihan Allah SWT	55
BAB V PENUTUP		58
5.1	Kesimpulan	58
5.2	Saran	58
DAFTAR PUSTAKA		59
LAMPIRAN		66

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian	66
Lampiran 2 Diagram Alir	67
Lampiran 3 Perhitungan dan Pembuatan Larutan.....	75
Lampiran 4 Perhitungan Rendemen.....	78
Lampiran 5 Dokumentasi.....	80
Lampiran 6 Data Uji Toksisitas	88
Lampiran 7 Panjang Gelombang Maksimal Isolat Steroid	94
Lampiran 8 Hasil Spektra Infrared.....	95
Lampiran 9 Kromatogram LC-MS/MS Isolat Steroid Hasil KLTP.....	96



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	11
Gambar 2.2	Kurva pertumbuhan mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	13
Gambar 2.3	Struktur senyawa steroid a) Fukosterol, b) Kolesterol, c) β -sitosterol, d) Uvaol	14
Gambar 2.4	Hasil spektrum UV-Vis ekstrak etil asetat tumbuhan paku (<i>Christella arida</i>)	22
Gambar 2.5	Hasil kromatogram isolat steroid menggunakan LC-MS/MS dengan sumber ion APCI.....	24
Gambar 4.1	Perubahan warna kultur mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	34
Gambar 4.2	Reaksi hidrolisis pada ikatan glikosida	36
Gambar 4.3	Produk-produk yang dihasilkan reaksi kolesterol dengan LB .	37
Gambar 4.4	Dugaan reaksi sulfonasi dan desaturasi pada reaksi LB	38
Gambar 4.5	Uji fitokimia senyawa steroid fraksi n-heksana mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	38
Gambar 4.6	Pola noda KLTA semua variasi eluen setelah disemprot LB dan pemansan yang diamati dibawah sinar UV 256 nm dan 366 nm	41
Gambar 4.7	Kurva mortalitas larva udang pada fraksi n-heksana mikroalga <i>Chlorella sp.</i> ($LC_{50} = 15,0155$ ppm)	46
Gambar 4.8	Kurva mortalitas larva udang pada isolat steroid hasil KLTP mikroalga <i>Chlorella sp.</i> ($LC_{50} = 8,42353$ ppm)	47
Gambar 4.9	Hasil identifikasi isolat steroid hasil KLTP mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan spektrofotometer UV-Vis.....	49
Gambar 4.10	Spektrum FTIR isolat hasil KLTP mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	50
Gambar 4.11	Struktur senyawa kolesterol	51
Gambar 4.12	Hasil Identifikasi LC-MS/MS isolat steroid hasil KLTP mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	52
Gambar 4.13	Pola fragmentasi senyawa steroid	55
Gambar L.6.1	Kurva mortalitas <i>Artemia salina</i> terhadap fraksi n-heksana mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan $LC_{50} = 15,0155$ ppm	88
Gambar L.6.2	Kurva mortalitas <i>Artemia salina</i> terhadap isolat steroid hasil KLTP mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan $LC_{50} = 8,42343$ ppm	91
Gambar L.7.1	Panjang gelombang maksimal isolat steroid hasil KLTP mikroalga <i>Chlorella sp.</i> menggunakan spektrofotometer UV-Vis.....	94
Gambar L.8.1	Spektrum IR isolat steroid hasil KLTP mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	95
Gambar L.9.1	Kromatogram LC-MS/MS isolat steroid hasil KLTP mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	96

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Jumlah noda, resolusi, dan nilai Rf hasil KLTA	40
Tabel 4.2	Hasil KLTP fraksi n-heksana pada eluen n-heksana:etil asetat (3,75:1,25)	43
Tabel 4.3	Nilai resolusi hasil KLTP	44
Tabel 4.4	Kematian dan persentase mortalitas dari larva udang <i>Artemia salina</i> pada fraksi n-heksana mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	45
Tabel 4.5	Kematian dan persentase mortalitas dari larva udang <i>Artemia salina</i> pada isolat steroid hasil KLTP mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	47
Tabel 4.6	Interpretasi spektra IR isolat steroid hasil KLTP mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	50
Tabel 4.7	Senyawa target LC-MS/MS	54
Tabel L.4.1	Rata-rata berat basah dan berat kering biomassa mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	78
Tabel L.4.2	Berat ekstrak pekat hasil maserasi	78
Tabel L.4.3	Berat fraksi n-heksana mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	79
Tabel L.6.1	Persentase mortalitas <i>Artemia salina</i> terhadap fraksi n-heksana mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	88
Tabel L.6.2	Nilai mortalitas <i>Artemia salina</i> terhadap fraksi n-heksana mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	88
Tabel L.6.3	Persentase mortalitas <i>Artemia salina</i> terhadap isolat steroid hasil KLTP mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	91
Tabel L.6.4	Nilai mortalitas <i>Artemia salina</i> terhadap isolat steroid hasil KLTP mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	91

DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 2.1 Harga Rf..... 18



ABSTRAK

Wahdaniyah, N.A. 2019. **Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Fraksi n-Heksana Mikroalga *Chlorella sp.*** Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P; Konsultan: Rachmawati Ningsih, M.Si

Kata Kunci: *Chlorella sp.*, Steroid, Toksisitas, Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Mikroalga *Chlorella sp.* merupakan salah satu tumbuhan tingkat rendah yang mengandung metabolit sekunder. Salah satunya adalah steroid yang dikenal memiliki bioktivitas seperti antikanker dan antitumor. Uji skrining yang berkorelasi adalah uji toksisitas menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimo Lethality Test*). Isolat steroid dapat diperoleh melalui proses isolasi dari mikroalga *Chlorella sp.* yang dikultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%.

Tahapan isolasi yang dilakukan adalah ekstraksi biomassa mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan maserasi dengan metanol. Selanjutnya hidrolisis dengan penambahan asam dan partisi dengan pelarut n-heksana. Metode pemisahan yang digunakan adalah Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan variasi eluen n-heksana : etil asetat (4,50:0,50); (4,25:0,75); (4:1); (3,75:1,25); dan (3,50:1,5). Isolat steroid yang diperoleh akan diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR dan LC-MS/MS.

Hasil penelitian menunjukkan isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* memiliki nilai LC_{50} sebesar 8,42 ppm. Hasil identifikasi dengan Spektrofotometer UV-Vis diperoleh panjang gelombang 203 nm dan 205 nm. Hasil identifikasi FTIR diduga mengandung senyawa steroid dengan gugus fungsi -OH, C=C, C-OH sekunder dan gem dimetil. Sedangkan hasil identifikasi LC-MS/MS diperoleh senyawa ergosterol, kolesterol, latosterol, stigmasterol, β -sitosterol, dan brasikasterol.

ABSTRACT

Wahdaniyah, N.A. 2019. **Toxicity Test Steroid Isolate of Thin Layer Chromatography Result from n-Hexana Fraction Microalgae *Chlorella sp.*** Departmen of Cemistry, Science and Technology Faculty, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Supervisor II: Dr. Akyunul Jannah, S.Si, M.P; Consultant: Rachmawati Ningsih, M.Si.

Keywords: *Chlorella sp.*, Steroid, Toxicity Test, Thin Layer Chromatography (TLC)

Microalgae *Chlorella sp.* is one of the low level plants that contains secondary metabolites. One of them is a steroid that is known to have bioctivity such as anticancer and antitumor. Correlated screening test is a toxicity test using the BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) method. Steroid isolates can be obtained through the process of isolation from microalgae *Chlorella sp.* cultivated in 4% Bean Sprout Extract.

The isolation stage carried out is the biomass extraction of microalgae *Chlorella sp.* using maceration with methanol. Then the researcer did hydrolysis by adding acid and partitioning with n-hexane solvent. The separation method used was Thin Layer Chromatography (TLC) with variations in eluent n-hexane : ethyl acetate (4.50: 0.50); (4,25: 0,75); (4: 1); (3.75: 1.25); and (3.50: 1.5). The steroid isolates obtained was identified by using spectrophotometer UV-Vis, FTIR, and LC-MS/MS.

The result shows that the stereoid isolates from TLC microalgae *Chlorella Sp.* has value LC_{50} around 8,42 ppm. The identification result by spectrophotometer UV-Vis indicates that TLC microalgae *Chlorella sp.* has wavelengths 203 nm and 205 nm. While the identification result by FTIR shows that TLC microalgae *Chlorella sp.* contains steroid compound with functional groups -OH, C=C, C-OH secondary and gem dimethyl. Identification result by LC-MS/MS shows that TLC microalgae *Chlorella sp.* contains steroid such as ergosterol, cholesterol, lathosterol, stigmasterol, β -sitosterol, and brassicasterol.

مستخلص البحث

وحدانية، ن.أ. 2019 الاختبار السمية من عزل السترويد على نتيجة استشراب الطبقة الرقيقة فصل ن- الهكسين الطحالب *Chlorella sp.* قسم الكيمياء. كلية العلوم والتكنولوجيا. جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف 1: أ. غنائم فاشا الماجستير؛ المشرف 2: د. أعين الجنة الماجستير. المستشار: رحموات نينجسيه الماجستير.

الكلمات الرئيسية : *Chlorella sp.*، السترويد، السمية، استشراب طبقة رقيقة

الطحالب *Chlorella sp.* هي إحدى النباتات في الطبقة السفلى ذات المستقبلات الثانوية. منها سترويد معروف باستحقاق الحيوية كمضادة السرطان و الورم. اختبار الفحصى المعلق بما الاختبار السمية. المنهج المستخدم هو *BSLT (Brain Shrimp Lethal Test)*. يحصل عزل السترويد بالعملية العزلية من الطحالب *Chlorella sp.* المحلل في مقياس الاستخلاص المتوسط 4%.

المراحل العزلية المطبقة هي استخراج الكتلة الحيوية الطحالب *Chlorella sp.* باستخدام النقاة بالميثانول. يليها التحلل المائي عن طريق إضافة حمض والتقسيم مع المذيبات ن-الهكسان. منهج التفريق المستخدم هي استشراب الطبقة الرقيقة بنوع الشاطف ن-الهكسان : إيثيل الخلات (4،50:0،50)؛ (4،25:0،75)؛ (4:1)؛ (3،75:1،25) و (3،50:1،5). تحلل عزل المنشطات المحصول باستخدام التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية المرئية، مطيافية التحول الأشعة تحت الحمراء الفورية، الكروماتوغرافيا السائلة/المطيافية الكلية.

تنتج نتيجة التحليل مركبات السترويد من استشراب الطبقة الرقيقة الطحالب *Chlorella sp.* تبلغ LC_{50} 8.42 جزء في المليون. نتيجة التحليل بالطيف للأشعة فوق البنفسجية المرئية يبلغ طول الموجة 203 و 205 نانومتر. بالنسبة إلى نتيجة التحليل بمطيافية التحول الأشعة تحت الحمراء الفورية تحتوي على مركبات السترويد مع مجموعات وظيفية $C=C$, $-OH$, $C-OH$ ، الثانوية وجوهرة الثانوية الميثيل. أما نتيجة التحليل باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة/المطيافية الكلية تحصلها مركبات إرغوسترول وكولسترول و لاتوسترول و ستيغماسترول و ب-سيستوسترول و براسيكاسترول.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Mikroalga merupakan tumbuhan tingkat rendah yang banyak ditemukan di alam. Terdapat kurang lebih 30.000 jenis mikroalga yang dikenal dan diteliti secara intensif (Metting dan Pyne, 1986). Salah satu mikroalga yang digunakan dalam penelitian saat ini adalah mikroalga *Chlorella sp.* Colegate dan Molyneux (2007) melaporkan bahwa mikroalga *Chlorella sp.* dapat dimanfaatkan sebagai antimikroba, antikanker, dan antitumor karena mengandung metabolit sekunder yang memiliki bioaktivitas. Allah SWT berfirman dalam Surat al-Hijr ayat 19:

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا وَأَلْفَيْنَا فِيهَا رُوسِي وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ شَيْءٍ مَّوْزُونٍ ١٩

Artinya: “Dan Kami telah menghamparkan bumi dan menjadikan padanya gunung-gunung dan kami tumbuhkan padanya segala sesuatu menurut ukuran” QS. 15:19

Tafsir Kementerian Agama RI menjelaskan bahwa bagian akhir dari QS. al-Hijr ayat 19 menunjukkan Allah SWT telah menciptakan keberanekaragaman tumbuh-tumbuhan yang masing-masing memiliki ukuran dan kadar yang ditentukan. Seperti pohon kokoh disertai buah lebat dan hidup di tanah yang cocok. Allah menciptakan segala tumbuhan dengan ukuran dan manfaat masing-masing sehingga terciptanya keseimbangan, keserasian, perubahan iklim, dan keadaan daerah tempat tumbuhan tersebut tumbuh. Tafsir al-Misbah menjelaskan fakta ilmiah yang telah ditemukan bahwa setiap tumbuhan memiliki kelompok dilihat dari kesamaan di dalam dan di luar tumbuhan tersebut. Seperti halnya *Chlorella sp.*

dalam penelitian ini yang termasuk dalam golongan alga namun karena memiliki ukuran yang kecil, maka *Chlorella sp.* digolongkan dalam kelompok mikroalga.

Pembudidayaan mikroalga *Chlorella sp.* atau biasa disebut dengan kultivasi dapat dilakukan dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%. Penggunaan MET mampu menghasilkan mikroalga yang melimpah dibandingkan dengan medium lainnya seperti Medium Air Laut (MAL) dan Medium Guillard (MG). Hal ini didasarkan pada penelitian Wulandari, *et al.* (2010) yang menyatakan bahwa kelimpahan sel yang diperoleh dari metode MET dengan konsentrasi 4% adalah antara 21 sampai tak terhingga sel, sedangkan MAL dan MG menghasilkan kelimpahan sel berturut-turut antara 0-10 sel dan 11-20 sel.

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa kandungan metabolit sekunder pada mikroalga *Chlorella sp.* adalah steroid dan tanin (Fasya, dkk., 2013; dan Bariyyah, dkk., 2013). Steroid merupakan salah satu senyawa yang penting dalam bidang medis karena steroid memiliki bioaktivitas seperti sebagai penolak dan penarik serangga dan antimikroba (Susilawati, dkk., 2014). Kemampuan untuk melakukan bioaktivitas menjadikan steroid mikroalga *Chlorella sp.* banyak diisolasi meskipun tidak diketahui secara spesifik jenis steroidnya. Proses isolasi ini dapat dimulai dengan ekstraksi. Ekstraksi metabolit sekunder seperti steroid dalam mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol. Penggunaan ekstraksi maserasi merupakan hal yang menguntungkan karena senyawa aktif dalam mikroalga *Chlorella sp.* bersifat tidak tahan suhu tinggi (Guenther, 1987). Berdasarkan penelitian Bariyyah, dkk., (2013) ekstraksi *Chlorella sp.* metode maserasi dengan pelarut metanol menghasilkan rendemen yang lebih besar, yakni 7,001%, sedangkan dengan pelarut etil asetat

menghasilkan rendemen 3,673%. Metode selanjutnya adalah hidrolisis dengan penambahan asam dan partisi dengan pelarut n-heksana. Berdasarkan penelitian Afif, dkk., (2015), ekstrak metanol alga merah *E.cottonii* sebelum dihidrolisis memiliki nilai LC_{50} sebesar 194,40 ppm, sedangkan setelah hidrolisis memiliki nilai LC_{50} sebesar 70,32 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa proses hidrolisis diperlukan untuk mengoptimalkan bioaktivitas steroid. Berdasarkan penelitian Desianti, dkk., (2014), pelarut n-heksana memberikan rendemen lebih besar, yakni 32,7809% dibandingkan dengan pelarut Petroleum eter, yakni 12,0582%. Selain itu, fraksi n-heksana memiliki bioaktivitas yang cukup kuat dengan nilai LC_{50} sebesar 34,2133 ppm pada uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.

Pemisahan selanjutnya dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Berdasarkan hasil penelitian Imamah, dkk., (2015) diperoleh pemisahan steroid dengan eluen yakni n-heksana : etil asetat (4:1) dengan jumlah spot sebanyak 12 spot. Hidayah, dkk., (2015) melaporkan pemisahan steroid dengan KLT menghasilkan 13 spot dan 8 diantaranya merupakan senyawa golongan steroid. Selanjutnya, isolat steroid yang diperoleh akan dilakukan uji toksisitas menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Berdasarkan hasil penelitian Syofiyah (2016), senyawa steroid hasil KLTP fraksi etil asetat metanol mikroalga *Chlorella sp.* dengan uji BSLT didapatkan nilai LC_{50} sebesar 14,96 ppm. Di sisi lain, isolat steroid diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis, *Fourier Transform Infrared* (FTIR), dan LC-MS/MS.

Berdasarkan uraian di atas, maka diperlukan pengujian tingkat toksisitas dari isolat steroid hasil KLT fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella sp.* dan

identifikasi senyawa steroid dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, FTIR, LC-MS/MS

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana tingkat toksisitas isolat steroid hasil KLT fraksi n-heksana dari mikroalga *Chlorella* sp. dengan metode BSLT?
2. Bagaimana hasil identifikasi isolat steroid hasil KLT fraksi n-heksana dengan spektrofotometer UV-Vis, FTIR, dan LC-MS/MS?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui tingkat toksisitas isolat steroid hasil KLT fraksi n-heksana dari mikroalga *Chlorella* sp. dengan metode BSLT.
2. Mengetahui hasil identifikasi isolat steroid hasil KLT fraksi n-heksana dengan spektrofotometer UV-Vis, FTIR, dan LC-MS/MS

1.4 Batasan Masalah

1. Isolat mikroalga *Chlorella* sp. yang digunakan berasal dari budidaya di Laboratorium Organik Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Kultivasi *Chlorella* sp. dalam medium ekstrak taube (MET) 4%
3. Ekstraksi steroid dari *Chlorella* sp. dilakukan dengan ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol
4. Partisi *Chlorella* sp. menggunakan pelarut n-heksana
5. Uji fitokimia senyawa steroid dengan *Lieberman – Burchard* (LB)

6. Pemisahan steroid menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) dengan variasi eluen n-heksana : etil asetat dengan perbandingan (4,50:0,50); (4,25:0,75); (4:1); (3,75:1,25); dan (3,50:1,5)
7. Isolasi steroid menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) dengan eluen terbaik n-heksana : etil asetat hasil KLTA
8. Uji toksisitas dengan metode BSLT dengan variasi konsentrasi isolat steroid 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm
9. Identifikasi senyawa steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR, dan LC-MS/MS

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat dan memberi informasi tentang mikroalga *Chlorella sp.* serta tingkat toksisitas senyawa steroid yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.*

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga *Chlorella sp.* dan Pemanfaatannya dalam Perspektif Islam

Mikroalga *Chlorella sp.* merupakan salah satu tumbuhan hijau tingkat rendah yang biasanya ditemukan di perairan darat maupun laut dan mampu berkembangbiak melalui pembelahan sel. Perkembangbiakan mikroalga *Chlorella sp.* secara tidak langsung telah disebutkan dalam QS. al-An'am (6:95) :

إِنَّ اللَّهَ فَالِقُ الْحَبِّ وَالنَّوَىٰ يُخْرِجُ الْحَيَّ مِنَ الْمَيِّتِ وَمُخْرِجُ الْمَيِّتِ مِنَ الْحَيِّ ذَٰلِكُمْ اللَّهُ
فَأَنَّىٰ تُؤْفَكُونَ ٩٥

Artinya: “*Sesungguhnya Allah menumbuhkan butir tumbuh-tumbuhan dan biji buah-buahan. Dia mengeluarkan yang hidup dari yang mati dan mengeluarkan yang mati dari yang hidup. (Yang memiliki sifat-sifat) demikian ialah Allah, maka mengapa masih berpaling?*” (QS. 6:95)

Tafsir Ibnu Katsir menjelaskan bahwa Allah yang membelah biji-bijian dan semua bibit tanaman kemudian menumbuhkan berbagai macam tanaman dari biji tersebut, sedangkan dari pohon tersebut menghasilkan buah-buahan yang berbeda-beda warna, bentuk dan rasanya. Tafsir Kementerian Agama RI menjabarkan QS. al-An'am (6:95) menjelaskan bahwa Allah SWT mengembangbiakkan segala macam tumbuhan dari benih-benih kehidupan baik berbentuk butiran maupun bijian. Hal ini dikarenakan agar mudah dipahami sesuai dengan ilmu pengetahuan umum termasuk segala pengetahuan tentang tumbuh-tumbuhan yang berkembangbiak dengan spora atau dengan pembelahan sel yang hanya diketahui oleh orang-orang tertentu. Proses tersebut atas kehendak dan aturan Allah. Berdasarkan tafsir al-Misbah menjelaskan tentang bukti kekuasaan Allah yang

menciptakan biji dan embrio tanaman disetiap tempat yang sempit sedangkan bagian lain dari biji tersebut terdapat zat-zat tidak hidup yang terakumulasi. Ketika mulai pertumbuhan sel-sel hidup mulai terbentuk dan memasuki tahapan tumbuhan membutuhkan makanan hingga titik akhir dari kehidupan tumbuhan.

Mikroalga *Chlorella sp.* merupakan tumbuhan hijau yang berfotosintesis.

Penjelasan Allah tentang proses fotosintesis yang terjadi pada tumbuhan hijau disebutkan dalam QS. al-An'am ayat 99:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا
نُخْرِجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِن طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ
وَالزَّيْتُونِ وَالرُّمَّانِ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُنْتَسِبٍ أَنْظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَلِكُمْ
لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ٩٩

Artinya: “Dan Dialan yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak, dan dari mayang kurma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan dilemma yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman” (QS. 6:99)

Tafsir al-Misbah menjelaskan QS. al-An'am (6:99) merupakan ayat tentang tumbuh-tumbuhan dalam proses pertumbuhan dan perkembangannya melalui beberapa fase hingga sampai fase kematangan. Proses tersebut dapat diumapamakan tentang adanya proses fotosintesis pada tumbuhan berwarna hijau, seperti mikroalga *Chlorella sp.* pada penelitian kali ini. Faktor penting dalam proses fotosintesis adalah adanya matahari. Tetapi hanya tumbuhan fototropik yang mampu menyimpan daya matahari melalui klorofil untuk selanjutnya dimanfaatkan oleh hewan dan manusia dalam bentuk makanan organik. Sedangkan pada bagian

akhir ayat tersebut, yakni “أَنْظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ” menjelaskan perintah untuk mengembangkan ilmu tumbuh-tumbuhan dengan mengandalkan metode pengamatan bentuk luar sampai semua fase perkembangannya. Dengan demikian, pada penelitian ini dilakukan pembudidayaan mikroalga *Chlorella sp.* dan isolasi steroid sebagai pemanfaatan dalam kehidupan. Sebagaimana Allah berfirman dalam QS asy-Syu'ara (26:7).

أَوْ لَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ۝٧

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak kami tumbuhkan di bumi ini berbagai macam (tumbuh-tumbuhan) yang baik?” (Q.S. 26:7).

Tafsir Kementerian Agama RI menjelaskan Allah mencela orang-orang kafir yang tidak mau mempergunakan akal pikiran mereka untuk apa yang terjadi di alam dan kekuasaan Allah. Seandainya memikirkan dan merenungkan ciptaan Allah, tentu mereka menjadi orang beriman kepada Allah dan Rasul. Orang kafir tidak memperhatikan berbagai macam tumbuhan dari segi bentuk, warna dan rasanya. Berdasarkan tafsir Al-Misbah, ayat tersebut mengajak manusia untuk mengarahkan pandangan hingga batas kemampuannya memandang sampai batas bumi, dengan keanekaragaman tumbuh-tumbuhan yang memiliki banyak manfaat dan tak terhitung jumlahnya. Segala sesuatu yang bermanfaat tersebut adalah bentuk keesaan dan Maha Kuasa Allah. Manusia sebagai kholifah di muka bumi diharapkan dapat mengetahui kebesaran Allah SWT atas berbagai macam tumbuhan yang baik dan memiliki manfaat didalamnya. “tumbuh-tumbuhan yang baik”, kata baik disini tidak hanya diartikan sebagai “baik” secara dhohir, melainkan dapat diartikan lebih luas lagi terkait dengan kandungan dan manfaat dari tumbuh-tumbuhan. Penggunaan mikroalga *Chlorella sp.* sebagai obat

antikanker, antimikroba dan antitumor merupakan salah satu bentuk pemanfaatan untuk mencari kesembuhan dari Allah. Sebagaimana Firman Allah dalam QS. al-Syu'ara (26:80):

وَإِذَا مَرَضْتُ فَبُهِتَ اللَّهُ أَن يَمُرُّ بِيَوْمِي فَأَجِزًا ۗ

Artinya: “Dan apabila aku sakit, Dialah Yang menyembuhkan aku” (QS 26:80)

Imam Jamaluddin al-Qasimi menguraikan tentang tata susila seorang hamba kepada Allah, sebab penyakit terkadang akibat perbuatan manusia sendiri karena adanya pelanggaran norma-norma kesehatan. Sebaliknya yang berhak menyembuhkan adalah Allah. Apabila manusia mampu merasakan waktu-waktu sulit maka Allah akan menurunkan nikmat kesembuhan. Tafsir al-Misbah menyebutkan apabila terdapat penyakit maka Allah yang menyembuhkan dan akan dipermudah apabila manusia berserah diri kepada Allah.

Pencarian obat dari bermacam-macam penyakit dapat ditemukan dari ilmu pengetahuan dan menyadari akan kebesaran Allah SWT yang telah menciptakan tanam-tanaman, salah satunya mikroalga *Chlorella sp.* dengan steroid yang dapat dimanfaatkan sebagai obat. Pemanfaatan mikroalga *Chlorella sp.* tidak tersurat dalam Al-qur'an dan hadits sebagai tanaman yang berpotensi sebagai obat alternatif, tetapi pemanfaatannya diqiyaskan dengan tumbuhan yang dimanfaatkan sebagai pengobatan.

2.2 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.* dalam Media Ekstrak Tauge

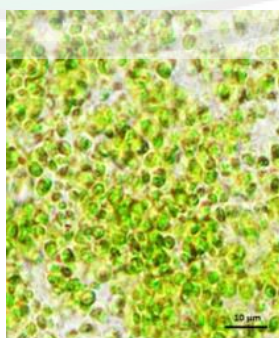
Chlorella sp. merupakan mikroalga uniseluler yang termasuk ke dalam golongan alga hijau (*chlorophyta*) dan berukuran mikroskopis. *Chlorella sp.* tidak mempunyai batang, akar, dan daun sebenarnya. Sel *Chlorella sp.* berbentuk bulat lonjong dengan garis tengah antara 2-8 μm , tidak memiliki flagella, sedangkan

dinding selnya terdiri dari selulosa dan pektin (Kumar dan Singh, 1976; Sidabutar, 1999). mikroalga ini berkembangbiak dengan cara membelah diri dan pembentukan spora dengan waktu generasi yang sangat cepat. Setiap sel *Chlorella sp.* mampu berkembangbiak menjadi 10.000 sel dalam waktu 24 jam (Sachlan, 1982).

Klasifikasi *Chlorella sp.* adalah sebagai berikut (Guiry, 2018):

Kingdom : Plantae
 Filum : Chlorophyta
 Kelas : Trebouxiophyceae
 Ordo : Chlorellales
 Famili : Chlorellaceae
 Genus : *Chlorella*
 Spesies : *Chlorella sp.*

Secara morfologi, mikroalga *Chlorella sp.* dapat dilihat menggunakan mikroskop seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.1. *Chlorella sp.* tampak berwarna hijau akibat kandungan klorofil a dan b dalam jumlah besar. Selain kandungan tersebut, *Chlorella sp.* mengandung protein, karbohidrat, asam lemak tak jenuh, vitamin, enzim, karotin, xantofil, dan senyawa aktif seperti tannin, asam askorbat dan steroid. (Kumar dan Signh, 1976; Ben Amotz, 1997; Khamidah, dkk., 2014). Senyawa aktif pada mikroalga *Chlorella sp.* umumnya digunakan sebagai pertahanan diri dari lingkungan dan makhluk hidup disekitarnya (Salempa dan Muharram, 2010).



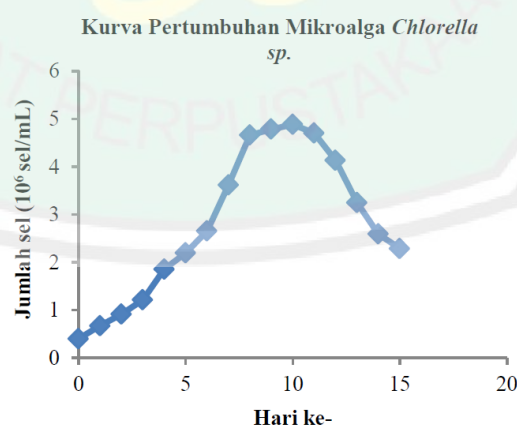
Gambar 2.1 Mikroalga *Chlorella sp.* (Mondal, dkk., 2016)

Pembudidayaan mikroalga *Chlorella sp.* atau biasa disebut dengan kultivasi merupakan cara untuk memenuhi kebutuhan stok biomassa mikroalga. Proses kultivasi dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan dari mikroalga. Faktor-faktor tersebut adalah suhu, salinitas, dan cahaya, pH, dan unsur hara. Suhu merupakan faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap proses metabolisme dan fotosintesis (Rafaelina, dkk., 2016). Berdasarkan penelitian Maharsyah, dkk., (2013), suhu yang tepat untuk proses kultivasi berkisar 25°C – 27°C . Salinitas digunakan untuk mempertahankan tekanan osmotik antara sel dengan air sebagai lingkungan hidupnya. Menurut Rafaelina, dkk., (2016), mikroalga dapat tumbuh secara optimal pada salinitas sebesar 25-34 ppt. Peranan cahaya dalam pertumbuhan yaitu untuk proses fotosintesis dengan menyediakan energi untuk diubah menjadi energi kimia dengan bantuan klorofil. Berdasarkan penelitian Prihartini, dkk., (2005), kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan pencahayaan 2 buah lampu TL 36 watt (intensitas cahaya 1000-4000 lux) dan waktu fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap. Faktor selanjutnya adalah pH. Faktor pH sebagai penentu kemampuan biologis mikroalga dalam pemanfaatan unsur hara dalam medium kultur. Berdasarkan penelitian Fasya (2016), pH pada kultur *Chlorella sp.* berkisar 7-7,2. Sedangkan unsur hara diperlukan untuk proses tumbuh kembangnya.

Salah satu medium kultur yang mengandung unsur hara yang cukup untuk pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* adalah Medium Ekstrak Tauge (MET). Sumber medium tersebut adalah tauge kacang hijau, dimana cara memperolehnya sangat mudah, ekonomis, dan tidak menghasilkan senyawa yang berefek toksik. Media perlakuan MET mengandung nutrisi organik seperti karbohidrat, protein,

vitamin dan lemak yang dibutuhkan sebagai sumber energi bagi pertumbuhan mikroalga. Selain itu, media kultur MET juga mengandung makronutrient anorganik seperti K, P, Ca, Mg, dan Na yang dibutuhkan oleh sel mikroba sebagai komponen penyusun sel, sedangkan mikronutrien seperti Fe, Zn, Mn, dan Cu dibutuhkan oleh sel sebagai kofaktor enzim dan sebagai komponen pembentuk klorofil (Richmond, 1986).

Pada penelitian ini, kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan MET 4% dengan waktu kultivasi 10 hari. Hal ini didasarkan pada penelitian Wulandari, *et al.* (2010) yang menyatakan bahwa kelimpahan sel yang diperoleh dari metode MET dengan konsentrasi 4% adalah antara 21 sampai tak terhingga sel. Sedangkan lama proses kultivasi dilakukan selama 10 hari berdasarkan penelitian Khamidah, dkk., (2015) yang menghasilkan jumlah kelimpahan sel sebesar 4.880.000 sel/mL. selain itu, pada hari ke-10 merupakan fase stasioner dimana terjadi proses sintesis dan perombakan produk metabolit primer menjadi metabolit sekunder secara keseluruhan. Salah satunya adalah steroid (Herbert, 1995).



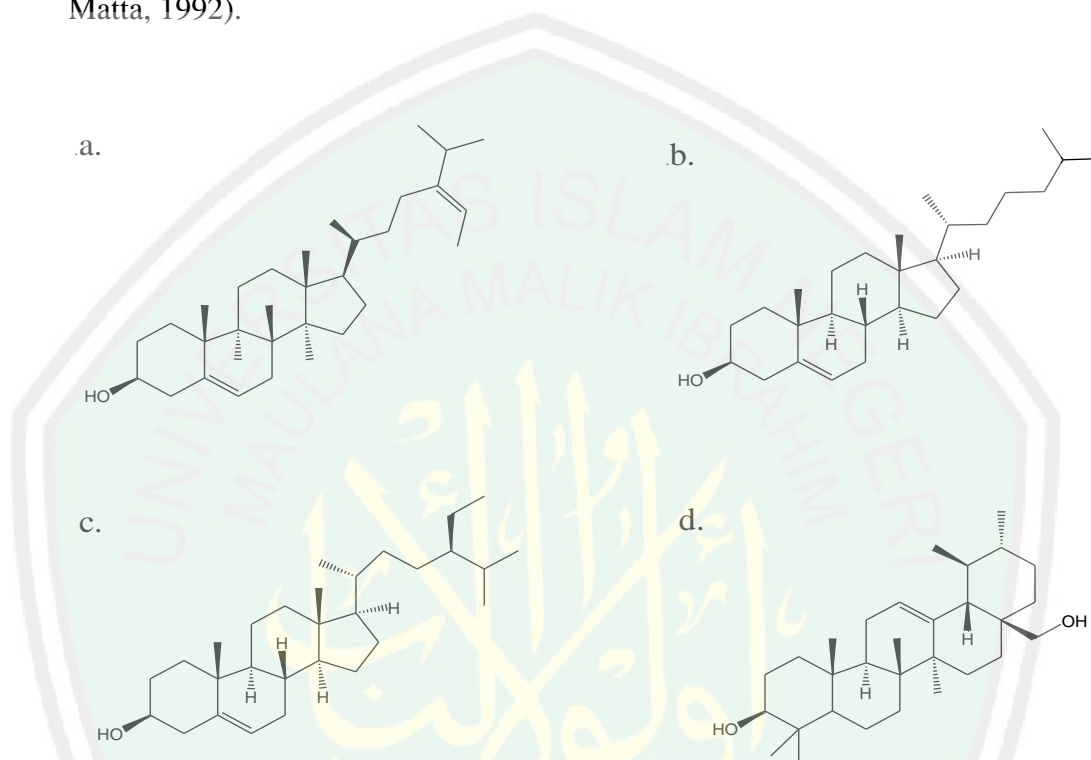
Gambar 2.2 Kurva Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella sp.* (Fasya, dkk., 2013)

Selama proses kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* mengalami empat fase pertumbuhan, yaitu fase log atau eksponensial, fase penurunan laju pertumbuhan, fase stasioner dan fase kematian (Fogg, 1975) fase pertumbuhan ini tidak terjadi fase lag atau adaptasi. Hal ini dikarenakan pada fase eksponensial terjadi pertumbuhan dan pembelahan sel yang cepat, sehingga memungkinkan fase adaptasi tidak terlihat (Bariyyah, dkk., 2013). Berdasarkan Gambar 2.1 fase eksponensial terjadi mulai hari ke-0 sampai hari ke-8 yang ditandai dengan jumlah sel *Chlorella sp.* yang terus meningkat. Fase $\frac{1}{2}$ eksponensial terjadi di hari ke-4 dengan kelimpahan sel 1.856.000 sel/mL dan $\frac{3}{4}$ eksponensial terjadi di hari ke-6 dengan kelimpahan sel 2.656.000 sel/mL. fase stasioner terjadi pada hari ke-8 sampai hari ke-11 ditandai dengan laju pertumbuhan *Chlorella sp.* yang cenderung konstan. Pada fase tersebut sel *Chlorella sp.* tidak mengalami pembelahan sel karena kurangnya nutrient yang tersedia. Fase awal stasioner terjadi pada hari ke-8 dengan kelimpahan sel 4.656.000 sel/mL. Fase stasioner terjadi pada hari ke-10 dengan kelimpahan 4.880.000 sel/mL. Sedangkan fase akhir stasioner terjadi pada hari ke-11 dengan kelimpahan sel yang cenderung menurun, yakni 4.704.000 sel/mL. Kelimpahan sel pada hari ke-12 sampai hari ke-15 mengalami penurunan yang cukup signifikan, sehingga dapat dikatakan sebagai fase kematian.

2.3 Isolasi Senyawa Steroid dari Mikroalga *Chlorella sp.*

Steroid merupakan turunan jenuh dari fenantrena (hidrokarbon aromatik trisiklik) dengan penambahan cincin siklopentana yang bergabung dalam cincin fenantrena. Semua senyawa steroid terbentuk dari struktur dasar atau inti steroid, kemudian cincinnya akan tersubstitusi oleh rantai hidrokarbon, gugus fungsi, atau memasukkan rangkap cincin karbon untuk membentuk senyawa golongan steroid.

Senyawa steroid yang mengandung gugus hidroksi dan tidak memiliki gugus aldehida dan karbonil disebut dengan sterol. Sterol memiliki sifat cenderung sedikit polar dibandingkan dengan senyawa steroid yang mengandung gugus aldehida dan karbonil, meskipun pada dasarnya steroid memiliki sifat non-polar (Wilbraham dan Matta, 1992).



Gambar 2.3 Struktur senyawa steroid a) Fukosterol, b) Kolesterol, c) β -Sitosterol d) Uvaol

Hampir semua sistem kehidupan mengandung senyawa steroid didalamnya.

Salah satunya pada tumbuhan, steroid berperan sebagai pelindung. Senyawa steroid mampu bekerja untuk menolak maupun menarik serangga lain. Beberapa turunan steroid yang penting ialah steroid alkohol atau sterol. (Robinson, 1995). Berdasarkan penelitian Fasya (2016), didapatkan empat jenis steroid dalam mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan LC-MS, yakni Fukosterol, Kolesterol, β -Sitosterol, dan Eritodiol atau Uvaol (Gambar 2.3).

2.3.1 Ekstraksi Senyawa Aktif dari *Chlorella sp.* dengan Maserasi

Ekstraksi merupakan proses penarikan komponen dari suatu simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu, dimana prinsipnya didasarkan pada kemampuan suatu pelarut dalam melarutkan komponen tersebut (Bernasconi, dkk., 1995). Jenis ekstraksi sangatlah beragam, salah satunya adalah maserasi. Metode maserasi secara umum digunakan untuk ekstraksi bahan-bahan alam yang tidak tahan terhadap panas seperti senyawa aktif pada mikroalga *Chlorella sp.* (Lenny, 2006).

Maserasi merupakan proses perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada suhu ruang. Pada saat proses maserasi terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat tekanan antara di dalam dan di luar sel, sehingga metabolit sekunder yang disimpan dalam sitoplasma akan terlepas dan larut dalam pelarut organik. Proses maserasi bekerja secara optimal apabila waktu kontak antara pelarut organik dan jaringan yang diekstraksi dapat tersedia dan cukup (Lenny, 2006; Guenther, 1987).

Faktor yang mempengaruhi proses ekstraksi adalah lama ekstraksi, suhu dan jenis pelarut yang digunakan. Lama ekstraksi yang optimal adalah ketika pelarut telah jenuh, yakni tidak mampu mengekstrak sampel kembali. Sedangkan suhu harus disesuaikan dengan ketahanan komponen sampel terhadap panas. Hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan jenis pelarut adalah daya melarutkan, titik didih, sifat toksik, mudah tidaknya terbakar, dan sifat korosif terhadap peralatan ekstraksi (Karger, dkk., 1973; Indrayani, 2006).

Daya kelarutan bahan terhadap pelarut didasarkan pada tingkat kepolaran suatu pelarut terhadap bahan tersebut. Proses maserasi biomassa *Chlorella sp.*

menggunakan pelarut metanol dikarenakan kebanyakan metabolit sekunder di alam berikatan dengan glukosa sebagai glikosida yang bersifat polar. Glikosida merupakan senyawa yang terdiri dari gabungan gula (gliko) yang mempunyai sifat polar dan bagian bukan gula (aglikon) yang dapat bersifat polar, semipolar ataupun nonpolar. Seperti halnya steroid yang bersifat non polar akan larut dalam metanol karena berikatan glikosida (Khamidah, dkk., 2014).

Amaliyah, dkk., (2013) melakukan ekstraksi biomassa *Chlorella sp.* dengan variasi pelarut yaitu metanol, etil asetat, dan n-heksana menghasilkan rendemen berturut-turut adalah 7,001%; 3,673%; dan 0,004%. Hal ini menunjukkan metabolit sekunder lebih terekstrak ke dalam pelarut metanol.

2.3.2 Hidrolisi dan Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

Senyawa metabolit sekunder yang berikatan glikosida akan mempengaruhi perubahan struktur yang berdampak pada perubahan fisika, kimia, dan aktifitas biologinya (Saifudin, dkk., 2006). Agar dapat mengisolasi senyawa metabolit sekunder, maka diperlukan pemutusan ikatan glikosida dengan reaksi hidrolisis asam. Prinsipnya adalah penguraian suatu senyawa dengan cara memutus ikatan glikosida menggunakan air dan katalis asam (Fasya, 2016). Reaksi hidrolisis dibutuhkan asam kuat karena asam kuat lebih mudah melepas ion H^+ secara sempurna di dalam air. Sedangkan asam lemah relatif lebih sukar melepas ion H^+ sehingga memiliki kecenderungan terionisasi dalam air (Handoko, 2006).

Selanjutnya adalah proses partisi. Partisi merupakan pemisahan kimia berdasarkan perbedaan distribusi antara dua fase pelarut yang tidak saling bercampur dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Berdasarkan penelitian Desianti (2014) pada proses partisi didapatkan rendemen tertinggi sebesar 32,7809% dengan

pelarut n-heksana, fase air memberikan rendemen sebesar 9,522%, kloroform memberikan rendemen 9,3531%, etil asetat memberikan rendemen 8,1952%, sedangkan pelarut petroleum eter memberikan rendemen sebesar 12,0582%. Selain rendemen yang besar, bioaktivitas fraksi n-heksana memberikan nilai LC_{50} yang cukup kuat. Hasil penelitian Desianti (2014) menunjukkan bahwa ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* dengan variasi pelarut menghasilkan fraksi yang bersifat toksik. Nilai LC_{50} dari fraksi etil asetat, kloroform, n-heksana, petroleum eter, dan fase air secara berturut-turut 43,3044%; 32,9023%; 34,2133%; 32,6710%; dan 44,3401%.

2.3.3 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis merupakan jenis kromatografi yang menggunakan fase diam berupa adsorben dan fase gerak berupa cairan. Kromatografi Lapis Tipis dapat digunakan untuk tujuan analitik dan preparatif. Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) untuk menganalisis senyawa-senyawa organik dalam jumlah kecil, misalnya penentuan jumlah komponen dalam campuran tertentu dan penentuan pelarut terbaik untuk pemisahan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP). Sedangkan KLTP untuk pemisahan campuran senyawa dalam jumlah besar berdasarkan fraksinya dan dikumpulkan untuk analisa selanjutnya (Sastrohamidjojo, 2007).

Parameter KLT adalah Faktor Retensi (R_f). Harga R_f merupakan perbandingan jarak yang ditempuh solut dengan jarak yang ditempuh fase gerak. Harga R_f ditunjukkan pada Persamaan 2.1. Komponen yang mempunyai afinitas lebih besar dari fase gerak atau afinitas lebih kecil dari fase diam akan bergerak

lebih cepat dari komponen yang mempunyai sifat sebaliknya (Gritter, dkk., 1991; Sastrohamidjojo, 2007).

$$\text{harga } R_f = \frac{\text{jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}} \dots\dots\dots (2.1)$$

Pemisahan dikatakan baik apabila menghasilkan noda yang tidak berekor, dan pemisahan nodanya jelas (Gandjar dan Rohman, 2007). Beberapa penelitian telah melaporkan hasil KLT untuk pemisahan senyawa steroid dari bahan alam. Anggraeni, *et al.*, (2014) melakukan pemisahan senyawa steroid menggunakan KLTA dengan variasi pelarut n-heksana:etil asetat (9:1); (8,2):(7:3); dan n-heksana:aseton (7:3). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa eluen n-heksana:etil asetat (7:3) dan n-heksana:aseton (7:3) merupakan eluen terbaik dengan jumlah noda berturut-turut 12 dan 13 noda. Noda-noda tersebut diamati di bawah sinar UV 366 nm dan disemprot reagen Lieberman-Burchand (LB) menghasilkan 11 noda dugaan senyawa steroid dengan noda berwarna hijau, merah muda dan ungu. Desianti (2014) juga telah melaporkan bahwa eluen terbaik untuk pemisahan steroid mikroalga *Chlorella sp.* adalah n-heksana : etil asetat (3,5:1,5) dan n-heksana:etil asetat (3,5:1,5) menghasilkan 11 noda dugaan steroid setelah disemprotkan pereaksi Lieberman-Burchand dan diamati di bawah sinar 366 nm menghasilkan noda berwarna hijau, merah muda, dan ungu. Berbeda dengan hasil penelitian Hidayah (2015), pemisahan senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* dengan eluen terbaik adalah n-heksana:etil asetat (8:2) yang menghasilkan 8 noda dugaan steroid setelah disemprotkan LB dan diamati di bawah sinar 366 nm dengan nilai R_f 0,06 (pink); 0,11 (hijau kecoklatan); 0,14 (ungu); 0,16 (pink); 0,74 (ungu); dan 0,80 (ungu kebiruan). Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan,

maka pada penelitian kali ini menggunakan variasi eluen n-heksana: etil asetat (4,50:0,50); (4,25:0,75); (4:1); (3,75:1,25); dan (3,50:1,5).

2.4 Uji Toksisitas Isolat Steroid Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Uji toksisitas dapat dilakukan dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode ini merupakan salah satu metode untuk menguji sifat toksik dari senyawa menggunakan hewan uji larva udang *Artemia salina* Leach. BSLT berkorelasi dengan daya sitotoksik senyawa antikanker. Hal inilah yang menjadikan BSLT sebagai metode skrining untuk menentukan sifat toksik tersebut (Hendrawati 2009).

Larva *Artemia Salina* L. berbentuk bulat dalam keadaan kering dan penuh dalam keadaan basah. Larva udang sangat peka terhadap apapun yang berada di lingkungannya dan berkembang dengan sangat cepat menyerupai pertumbuhan sel kanker. Sehingga ketika senyawa aktif ditambahkan maka senyawa tersebut mampu mengganggu metabolisme dan menyebabkan kematian pada larva udang. Senyawa tersebut bekerja dengan cara menghambat daya makan dengan bertindak sebagai racun. Hal ini menyebabkan larva udang kehilangan stimulus rasa sehingga tidak mengenali makanannya (Isnansetyo dan Kurniastuti, 1995).

Uji ini menghasilkan nilai LC_{50} yang menyatakan konsentrasi suatu senyawa untuk menyebabkan 50% kematian hewan uji larva *Artemia salina* L. Suatu senyawa dikatakan toksik jika harga LC_{50} lebih kecil dari 1000 $\mu\text{g/mL}$. Halimah (2010) dan Meyer, dkk., (1982) menyatakan bahwa pembagian nilai LC_{50} untuk ekstrak atau senyawa murni yang berpotensi sebagai senyawa bioaktif adalah:

1. Nilai $LC_{50} < 30$ ppm bersifat sangat toksik sehingga memiliki potensi aktivitas sebagai antitumor atau antikanker
2. Nilai LC_{50} antara 30-200 ppm bersifat toksik sehingga memiliki potensi sebagai antimikroba
3. Nilai $LC_{50} > 200$ ppm kurang lebih dari 1000 ppm bersifat pestisida karena masih bersifat toksik
4. Nilai $LC_{50} > 1000$ ppm bersifat tidak toksik.

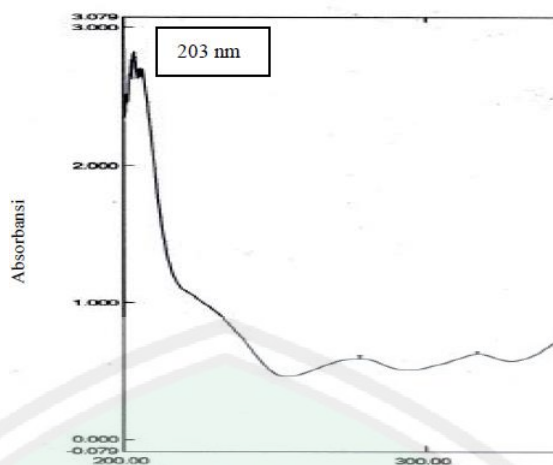
Berdasarkan penelitian Amaliyah, dkk., (2013), uji toksisitas ekstrak metanol dan etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* menghasilkan nilai LC_{50} 20,516 ppm pada ekstrak metanol dan LC_{50} 167,417 pada ekstrak etil asetat. Penelitian Putra, dkk., (2011), uji toksisitas isolat steroid hasil kromatografi kolom ekstrak kloroform daun ketapang (*Terminalia catappa* Linn.) menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 99,434 ppm. Berdasarkan penelitian Millati (2016), isolat steroid yang diperoleh dari Kromatografi Lapis Tipis (KLT) fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* toksik terhadap larva udang *Artemia* Leach dengan nilai LC_{50} sebesar 19,6889 ppm. Desianti (2014) juga melakukan uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* pada ekstrak *Chlorella sp.* dari hasil partisi dengan pelarut metanol, etil asetat, kloroform, n-heksana, dan petroleum eter menghasilkan nilai LC_{50} berturut-turut 38,9697 ppm; 43,3044 ppm; 32,9023 ppm; 34,2133 ppm; dan 32,6710 ppm.

2.5 Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLT Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis adalah pengukuran panjang gelombang dan intensitas sinar ultraviolet dan cahaya tampak yang diabsorpsi oleh sampel. Sinar

ultraviolet berada pada panjang gelombang 200-400 nm, sedangkan sinar tampak berada pada panjang gelombang 400-800 nm. Dalam kasus identifikasi senyawa organik, spektrofotometer UV-Vis dapat memberikan informasi dari struktur berdasarkan panjang gelombang maksimal (Dachriyanus, 2004). Suatu senyawa yang mengabsorpsi cahaya dinamakan gugus kromofor yang dapat menimbulkan pita-pita absorpsi yang khas (Triyati, 1985). Bagian molekul yang paling cepat bereaksi dengan sinar adalah elektron-elektron ikatan dan elektron-elektron non ikatan. Elektron-elektron tersebut akan mengalami eksitasi ke tingkat energi yang lebih tinggi (Suhartati, 2017).

Identifikasi senyawa steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis telah banyak dilakukan oleh banyak peneliti. Aprelia (2013) melakukan identifikasi senyawa steroid dari ekstrak etil asetat tumbuhan paku *Christella arida* menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil yang diperoleh adalah panjang gelombang maksimal 203 nm yang menunjukkan adanya ikatan C=C tak terkonjugasi dengan transisi elektron dari $\pi \rightarrow \pi^*$ (Gambar 2.6). Luthfia dan Atun (2018) melaporkan pula panjang gelombang maksimal 207,40 nm menunjukkan adanya transisi elektron dari $\pi \rightarrow \pi^*$ dari ikatan C=C tak terkonjugasi.



Gambar 2.4 Hasil spektrum UV-Vis ekstrak etil asetat tumbuha paku (*Christella arida*) (Aprelia, 2013).

2.6 Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLT Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan FTIR

Pengukuran pada spektrum inframerah atau FTIR dilakukan pada daerah cahaya inframerah tengah, yakni bilangan gelombang $4000\text{-}200\text{ cm}^{-1}$ atau panjang gelombang $2,5\text{-}50\text{ }\mu\text{m}$. Energi yang dihasilkan oleh radiasi ini disebabkan oleh vibrasi atau getaran pada suatu molekul, setiap molekul memiliki vibrasi khusus sehingga memberikan serapan pada bilangan gelombang yang khas. Metode ini sangat berguna untuk mengidentifikasi senyawa organik (Dachriyus, 2004).

Identifikasi senyawa steroid menggunakan FTIR telah banyak dilakukan oleh peneliti. Ilyas, dkk., (2015) melakukan identifikasi senyawa golongan steroid dari ekstraks n-heksana kulit batang kayu bitti (*Vitex cofassus*) menggunakan FTIR. Hasil yang diperoleh adalah terdapat serapan pada daerah $3425\text{-}3325\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan vibrasi dari gugus -OH . Serapan kuat di daerah 3024 cm^{-1} menunjukkan gugus =C-H atau CH sp^2 . Pada serapan $2933\text{-}2864\text{ cm}^{-1}$ merupakan vibrasi dari C-H. gugus metilen memberikan serapan di daerah 1463 cm^{-1} sedangkan gugus metil memberikan serapan pada daerah 1377 cm^{-1} . Pada serapan

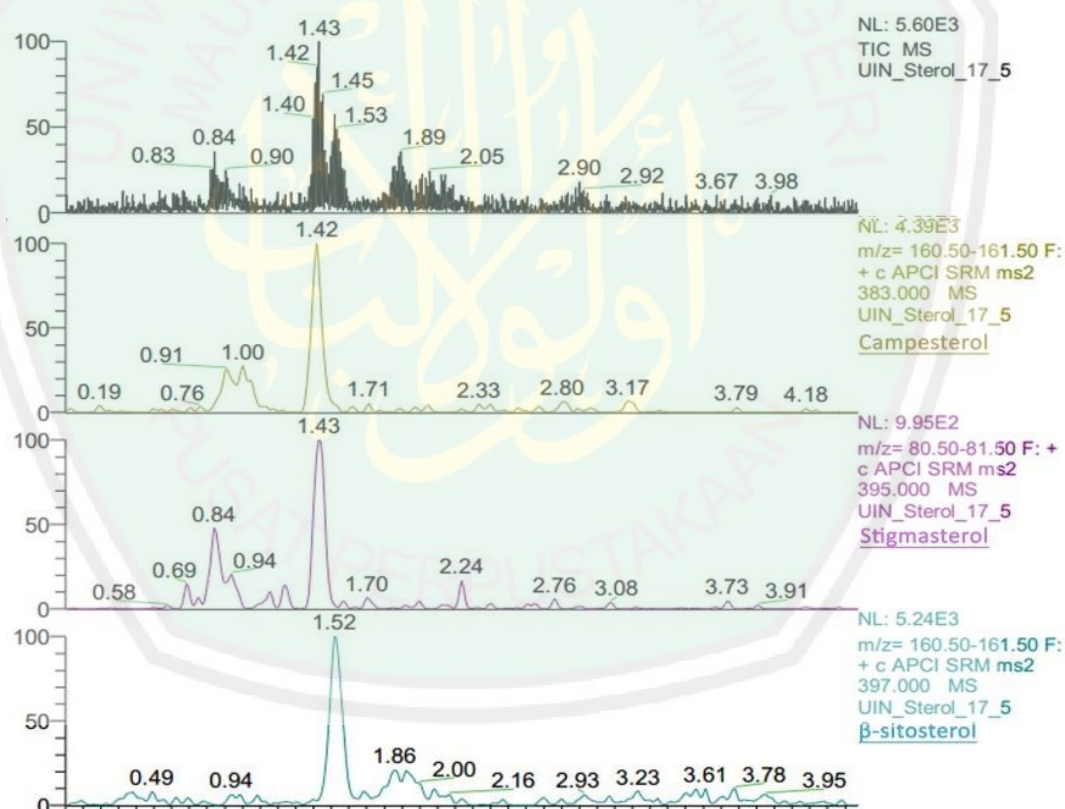
1058 cm^{-1} menunjukkan vibrasi ulur C-OH siklik. Adanya serapan gugus C-OH memberikan gambaran senyawa steroid yang mengandung gugus OH atau berupa senyawa sterol. Imamah, dkk., (2015) melaporkan identifikasi senyawa steroid hasil KLT 2D mikroalga *Chlorella sp* menggunakan FTIR menunjukkan bahwa terdapat serapan yang khas pada senyawa steroid, yakni vibrasi gem dimetil pada daerah 1465 cm^{-1} dan 1387 cm^{-1} . Selain itu, senyawa steroid di tumbuhan berupa senyawa sterol sehingga terdapat serapan gugus -OH di daerah 3450 cm^{-1} .

2.7 Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLTP Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan LC-MS/MS

Sistem LC-MS umumnya menggunakan beberapa jenis sumber ion dan penganalisa massa yang dapat disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dianalisa. Pada LC-MS, sampel yang telah dipisahkan dalam kolom diuapkan pada suhu tinggi, kemudia diionisasi. Ion yang terbentuk difragmentasi sesuai dengan rasio massa/muatan (m/z), yang selanjutnya dideteksi secara elektrik (Karisma, 2012).

Sumber ion yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ionisasi Kimia Tekanan Atmosfer (*Athmospher Pressure Chemical Ionization/APCI*). Sumber ion ini menggunakan eluen yang disemprotkan melalui pemanas bersuhu tinggi (200-400°C pada tekanan atmosfer. APCI mampu menganalisis m/z dengan range 70-1000. Sistem LC menggunakan alliance 2695 lengkap dengan autosampler, degasser, dan pemanas kolom. Sistem MS menggunakan ZQ 2000 *single quadrupole*. Sedangkan kolom yang digunakan adalah C_{18} 150 \times 2,1 mm dengan fase gerak asetoniril/air (0,01% asam asetat) dengan laju air 0,5 mL/menit.

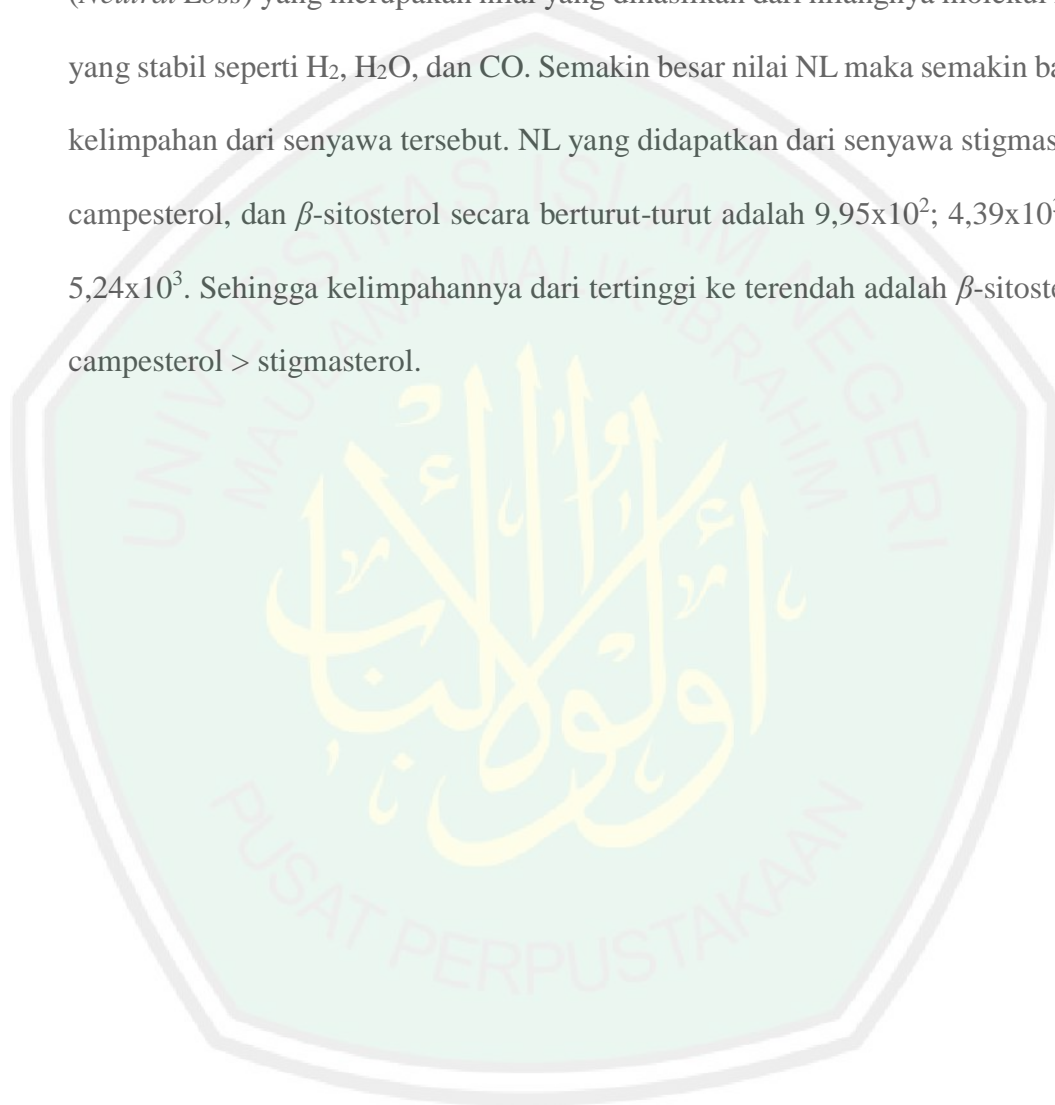
Iyani (2017) melakukan identifikasi senyawa steroid hasil partisi dengan pelarut petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan LC-MS/MS dengan sumber ion APCI menghasilkan 3 senyawa steroid, yakni stigmasterol, campesterol, dan β -sitosterol. Senyawa stigmasterol memiliki waktu retensi 1,43 menit dengan massa ion induk 395 m/z dan massa ion produk 80,5-81,5 m/z. Senyawa campesterol memiliki waktu retensi 1,42 menit dengan massa ion induk 383 m/z dan massa ion produk 160,5-161,5 m/z. Sedangkan senyawa β -sitosterol memiliki waktu retensi 1,52 dengan massa ion induk 397 m/z dan massa ion produk 160,5-161,6 m/z.



Gambar 2.5 Hasil kromatogram isolat steroid menggunakan LC-MS/MS dengan sumber ion APCI (Iyani, 2017).

Hasil kromatogram yang didapatkan ditunjukkan pada Gambar 2.5. Waktu retensi menunjukkan tingkat kepolaran dari senyawa steroid akibat berinteraksi

dengan fase gerak, semakin kecil waktu retensi maka semakin polar, sehingga tingkat kepolaran dari ketiga steroid tersebut adalah kampesterol > stigmasterol > β -sitosterol. Massa ion induk menunjukkan $[M-H_2O+H]^+$ sedangkan massa ion produk dihasilkan dari fragmentasi ion induk. Selain itu, didapatkan pula nilai NL (*Neutral Loss*) yang merupakan nilai yang dihasilkan dari hilangnya molekul netral yang stabil seperti H_2 , H_2O , dan CO . Semakin besar nilai NL maka semakin banyak kelimpahan dari senyawa tersebut. NL yang didapatkan dari senyawa stigmasterol, kampesterol, dan β -sitosterol secara berturut-turut adalah $9,95 \times 10^2$; $4,39 \times 10^3$; dan $5,24 \times 10^3$. Sehingga kelimpahannya dari tertinggi ke terendah adalah β -sitosterol > kampesterol > stigmasterol.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Organik dan Bioteknologi Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Desember – Juni 2019.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, lampu TL 36 watt, lampu pijar, *shaker*, *rotary evaporator*, neraca analitik, *sentrifuse*, plat KLT, *heater*, *hotplate*, *stirrer*, bejana pengembang, lampu UV, pipa kapiler, dan seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis, FTIR serta LC-MS/MS.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah tauge kacang hijau, isolat *Chlorella sp.*, telur *Artemia salina* Leach, metanol p.a, n-heksana p.a, etil asetat p.a, natrium bikarbonat, akuades, kloroform, H₂SO₄ pekat, dan anhidrida asetat.

3.3 Tahapan Penelitian

1. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge 4%
2. Pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella sp.*
3. Ekstraksi maserasi biomassa mikroalga *Chlorella sp.*
4. Hidrolisis dan partisi ekstrak pekat metanol mikroalga *Chlorella sp.*
5. Uji fitokimia senyawa steroid dengan *Lieberman – Burchard* (LB)

6. Pemisahan senyawa steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)
7. Pemisahan senyawa steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)
8. Uji toksisitas dengan metode BSLT
9. Identifikasi golongan senyawa steroid dengan spektrofotometer UV-Vis
10. Identifikasi golongan senyawa steroid dengan FTIR
11. Identifikasi golongan senyawa steroid dengan *Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS)

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%

Tauge 100 gram direbus dalam 500 mL akuades selama ± 1 jam. Ekstrak tauge sebanyak 36 mL dilarutkan ke dalam 864 mL akuades dalam erlenmeyer 1000 mL sehingga diperoleh Medium Ekstrak Tauge (MET 4%). Ditambahkan isolat *Chlorella sp.* sebanyak 150 mL dan kemudian diinkubasi selama 10 hari dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap (pencahayaan menggunakan lampu TL 36 watt) (Prihantini, dkk., 2007).

3.4.2 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Mikroalga *Chlorella sp.* dipanen pada hari ke-10 kultivasi. Media kultur *Chlorella sp.* dipisahkan dari isolat menggunakan metode sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Biomassa *Chlorella sp.* yang dihasilkan dipisahkan dari cairannya. Selanjutnya biomassa *Chlorella sp.* dikeringkan pada suhu kamar selama 48 jam (Bariyyah, dkk., 2013).

3.4.3 Ekstraksi Maserasi Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Biomassa *Chlorella sp.* kering sebanyak 10 gram dimaserasi menggunakan pelarut metanol dengan perbandingan 1:10 (b/v) (10 gram : 100 mL) selama ± 24 jam dengan bantuan shaker pada suhu ruang. Kemudian disaring. Residu dimaserasi kembali selama 24 jam hingga filtrat bening. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan dihilangkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator*. Dialiri ekstrak pekat dengan gas N₂. Selanjutnya ekstrak pekat ditimbang dan dihitung rendemennya.

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

Ekstrak pekat metanol dihidrolisis dengan katalis HCl 2N dan diaduk selama 1 jam menggunakan *magnetic stirrer hot plate* pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan natrium bikarbonat hingga pHnya netral. Kemudian dipartisi dengan pelarut n-heksana. Kemudian dikocok dan didiamkan, sehingga didapatkan dua lapisan. Lapisan organik yang didapatkan selanjutnya dialiri dengan gas N₂. Kemudian ditimbang ekstrak pekat dan dihitung rendemennya.

3.4.5 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Hasil fraksi n-heksana diambil dan dilarutkan dengan kloroform sebanyak 0,5 mL ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan dengan 0,5 mL anhidrida asetat. kemudian ditambahkan asam sulfat pekat sebanyak 1 mL (Bariyyah, dkk., 2013).

3.4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)

Pemisahan dengan KLTA digunakan plat silika gel F₂₅₄ yang sudah diaktifkan dengan pemanasan dalam oven selama 30 menit pada suhu 60-80°C. plat diukur 1 × 10 cm. Ekstrak pekat hasil partisi sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 10

mL n-heksana hingga menjadi konsentrasi 1000 ppm. Selanjutnya, ekstrak ditotolkan pada jarak ± 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler (Anggraeni, *et al.*, 2014). Pada setiap tempat penotolan diulang 5 kali penotolan. Selanjutnya plat dimasukkan ke dalam bejana pengembang yang telah jenuh dengan larutan pengembang. Larutan pengembang yang digunakan adalah variasi perbedaan antara n-heksana dan etil asetat, yakni (4,50:0,50); (4,25:0,75); (0,40:1,0); (3,75:1,25); dan (3,50:1,5). Setelah fase gerak sampai batas garis atas, maka diangkat plat dan dikeringkan. Diulangi perlakuan sebanyak 3 kali. Noda-noda pada plat diperiksa dengan perlakuan sebelum dan sesudah disemprot *Lieberman-Buchard* (LB) serta setelah pemanasan yang diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Handayani, dkk., 2008).

Dihitung nilai Rf pada setiap spot yang didapatkan. Diperhatikan pemisahan dan terbentuknya noda yang jelas dan tidak *tailing*, maka akan didapatkan eluen terbaik (Bawa, 2007).

3.4.7 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Pemisahan dengan KLTP menggunakan plat silika GF₂₅₄ dengan ukuran 10 x 20 cm. Ekstrak pekat hasil partisi sebanyak 10 mg dilarutkan dengan 10 mL n-heksana sehingga didapatkan ekstrak dengan konsentrasi 1000 ppm. Kemudian ditotolkan sepanjang plat pada jarak 1 cm dari garis bawah dan 1 cm dari garis tepi dengan pipa kapiler sebanyak 10 kali penotolan. Setiap penotolan diberi jarak waktu untuk dilakukan pengeringan pada selanjutnya. Selanjutnya dielusikan menggunakan eluen terbaik n-heksana : etil asetat dengan volume total eluen sebanyak 20 mL. Dilakukan satu kali perulangan. Hasil pemisahan dideteksi di

bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm. Ditentukan nilai Rf dari jarak spot yang diperoleh. Noda yang didapatkan diamati dan dikerok noda yang diduga steroid. Kemudian dilarutkan dengan n-heksana. Selanjutnya divortex dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Diambil supernatan sedangkan residu larutkan kembali dengan pelarut n-heksana. Kemudian divortex dan disentrifugasi kembali. dilakukan pengulangan pada residu sebanyak 3 kali. Selanjutnya semua supernatan yang diperoleh diuapkan pelarutnya pada suhu ruang di lemari asam. Isolat yang diperoleh ditimbang untuk didapatkan berat isolat hasil KLTP.

3.4.8 Penetasan Larva Udang *Artemia salina* L.

Air laut sebanyak 250 mL dimasukkan dalam wadah penetasan. Dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina* L. Dibiarkan selama waktu \pm 48 jam dalam keadaan diaerasi dan disinari lampu pijar. Kemudian, larva udang *Artemia salina* L yang sudah menetas siap dijadikan hewan uji toksisitas (Halimah, 2010).

3.4.9 Uji Toksisitas

Isolat steroid dibuat menjadi konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm. Masing-masing konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali. Selanjutnya pelarut diuapkan di suhu ruang. Ditambahkan 100 μ L DMSO, setetes larutan ragi roti (3 mg/5 mL air laut), dan 2 mL air laut. Kemudian divortex sampai isolat larut dalam air laut. Dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L. dan ditambahkan air laut sampai volume 10 mL. Vial-vial diletakkan dibawah lampu pijar selama 24 jam dan dihitung jumlah larva *Artemia salina* L. yang mati. Selanjutnya dibandingkan dengan kontrol dan hasilnya dianalisis untuk menentukan nilai LC₅₀.

Terdapat tiga kontrol yang digunakan, yaitu kontrol DMSO, kontrol pelarut, dan blanko. Kontrol DMSO dibuat dengan cara dimasukkan 100 μ L DMSO, setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut kedalam vial dan dikocok. Kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L. dan ditambahkan air laut sampai volume 10 mL. Kontrol pelarut dibuat dengan 100 μ L pelarut kedalam botol vial. Kemudian diuapkan hingga kering. Selanjutnya dimasukkan setetes laruta ragi roti, 2 mL air laut dan dikocok. Dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L. dan ditambahkan air laut sampai 10 mL. Selanjutnya diamati kematian larva udang *Artemia salina* L. dibawah lampu pijar selama 24 jam. Sedangkan blanko dibuat dengan cara menambahkan setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut kedalam vial dan dikocok. Kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L. dan ditambahkan air laut sampai volume 10 mL

3.4.10 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis

Hasil isolat steroid dari KLT dilarutkan dalam n-heksana dan divortex. Kemudian dimasukkan kedalam kuvet sampai sepertiga dari isi kuvet penuh. Dilakukan identifikasi dalam rentang panjang gelombang antara 200-400 nm sehingga diperoleh spektra dari isolat steroid.

3.4.11 Identifikasi Senyawa Steroid dengan FTIR

Isolat steroid dicampur dengan serbuk KBr dengan digerus secara bersamaan dalam mortar agate. Kemudian dibuat pelet dari hasil gerusan dengan tekanan 80 Torr (8-20 Torr persatuan waktu). Selanjutnya dianalisis menggunakan spektrofotometer FTIR.

3.4.12 Identifikasi Senyawa Steroid dengan LC-MS/MS

Isolat steroid hasil KLTP dianalisa menggunakan LC-MS/MS. Kolom yang digunakan dengan spesifikasi *hypersil gold* atau C18 (50 mm x 2,1 mm x 1,9 μm). UHPLC merk ACCELLA *type* 1250 buatan *Thermo Scientific* yang terdiri dari *degasser* vakum, pompa *quartener*, *autosampler thermostatic* yang dikendalikan oleh komputer melalui program *x-calibur 2.1*. Fasa gerak yang digunakan adalah 0,1% asam format dalam air (fasa A) dan 0,1% asam format dalam asetonitril (fase B). Eluen diatur pada laju alir 300 $\mu\text{L}/\text{menit}$ selama 6 menit. Sistem elusi secara gradien linier pada menit 0 – 0,6 dengan perbandingan 50% (B) : 50% (A), menit 0,6 – 4 dengan perbandingan 90% (B) : 10% (A), menit 4 – 4,5 dengan perbandingan 90% (B) : 10% (A), dan menit 4,5 – 6 perbandingan 50% (B) : 50% (A). Volume yang diinjeksikan sebesar 2 μL . Kolom dikontrol pada suhu 30°C, dan kompartemen *autosampler* ditetapkan untuk 10°C.

MS yang digunakan adalah MS/MS triple Q (*Quadrupole*) spektrometer massa TSQ QUANTUM ACCESS MAX dari Thermo Finnigan dengan sumber ionisasi APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) dikendalikan oleh software TSQ Tune yang dikendalikan dengan metode positif. Kondisi ion APCI 41 sebagai berikut: Arus yang digunakan 4 μA , suhu penguapan 250°C, suhu kapiler 300 °C, *sheat gas pressure* 45 *arbitrary units*, dan *Aux gas pressure* 15 *arbitrary units*.

3.5 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah dengan menentukan LC_{50} atau persen kematian larva udang. Data yang diperoleh berupa data dan grafik nilai LC_{50} yang dihasilkan dari analisa probit pada program MINITAB 17 dengan tingkat

kepercayaan 95%. Data yang dimasukkan dalam analisa probit pada program MINITAB 17 yaitu konsentrasi dan mortalitas (Desianti, dkk., 2014).

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{Modus}}{\text{Jumlah larva yang dimasukkan}} \times 100\%$$



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.* dalam MET 4%

Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4% yang merupakan hasil ekstraksi kecambah kacang hijau pada titik didih air. Medium tersebut berwarna kuning dan sedikit kental yang menunjukkan bahwa nutrien-nutrien dalam tauge telah terekstrak. Nutrien-nutrien tersebut digunakan sel mikroalga *Chlorella sp.* melakukan fotosintesis, metabolisme, pertumbuhan, dan respirasi (Prihantini, dkk., 2007).

Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dalam pencahayaan lampu TL dengan fotoperiodisitas gelap terang pada temperatur ruang untuk memaksimalkan proses fotosintesis (Utami, dkk., 2012; Maia, dkk., 2016). Kultivasi dimulai dari isolat murni mikroalga *Chlorella sp.* yang memasuki fase ekponensial karena sel secara aktif membelah. Rerata peningkatan kerapatan sel mikroalga *Chlorella sp.* secara langsung dapat dilihat dari perubahan warna kultur pada setiap harinya (Gambar 4.1). Warna hijau kultur mengindikasikan banyaknya kandungan klorofil secara signifikan.



Gambar 4.1 Perubahan warna kultur mikroalga *Chlorella sp.*

4.2 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Prinsip pemanenan biomassa *Chlorella sp.* didasarkan pada proses dekantasi dan pengeringan. Tujuan dekantasi adalah untuk memisahkan medium kultur dari biomassa mikroalga *Chlorella sp.* Sedangkan pengeringan bertujuan untuk menguapkan kandungan air pada biomassa basah setelah dekantasi. Hal ini dikarenakan kandungan air akan mengganggu proses ekstraksi dan mempercepat pertumbuhan mikroorganisme serta reaksi biokimia yang berpotensi mendegradasi metabolit sekunder (Roshanak, dkk., 2013; Rocha, dkk., 2011). Hasil dekantasi berupa biomassa mikroalga *Chlorella sp.* berwarna hijau pekat dan mengandung air dengan berat sebesar 1051,21 gram. Sedangkan, hasil pengeringan diperoleh biomassa mikroalga *Chlorella sp.* yang telah kering, sebesar 10,31 gram dengan rendemen 0,9808%.

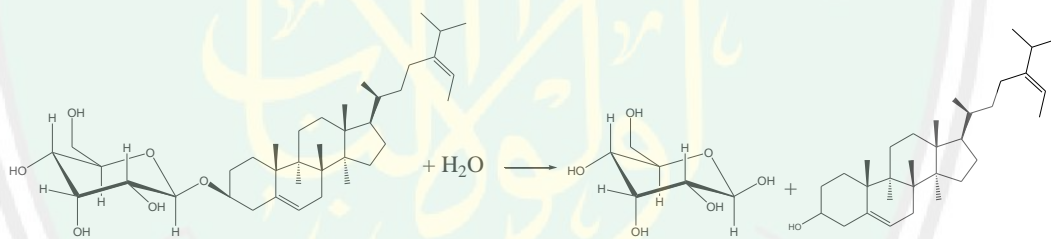
4.3 Ekstraksi Maserasi Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstraksi metabolit sekunder dalam biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan metode maserasi dalam pelarut metanol. Pemilihan metanol didasarkan pada kepolaran senyawa metabolit sekunder akibat adanya ikatan glikosida. Pada saat proses maserasi terjadi pelunakan dan penghancuran sel untuk melepaskan komponen yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* Hal ini disebabkan oleh tekanan dari luar, dimana metanol mampu memecah dinding sel mikroalga *Chlorella sp.* sehingga komponen dalam sel dan jaringan mikroalga *Chlorella sp.* mampu terlarut dalam metanol (Raaman, 2006 dalam Silva, dkk., 2017). Maserasi dihentikan ketika filtrat telah bening, hal ini mengindikasikan bahwa komponen dalam mikroalga *Chlorella sp.* telah terekstrak sempurna dalam

metanol. Hasil dari ekstraksi maserasi biomassa mikroalga *Chlorella sp.* kali ini adalah sebesar 3,68 gram dengan rendemen sebesar 35,69%.

4.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Peekat Mikroalga *Chlorella sp.*

Tujuan hidrolisis adalah memutus ikatan glikosida pada metabolit sekunder dengan penambahan HCl untuk memaksimalkan proses hidrolisis karena mampu terionisasi sempurna dan hasil penetralan berupa garam dapur tak beracun (Judaningsih dan Yuliansyah, 2003). Reaksi hidrolisis yang terjadi ditunjukkan pada Gambar 4.2. Proses penetralan dilakukan dengan natrium bikarbonat hingga pH netral untuk mencegah reaksi balik. Reaksi penetralan tersebut menghasilkan gas CO₂ hasil reaksi HCl dan Na₂CO₃. Dengan terjadinya reaksi hidrolisis, maka senyawa steroid menjadi bersifat nonpolar.

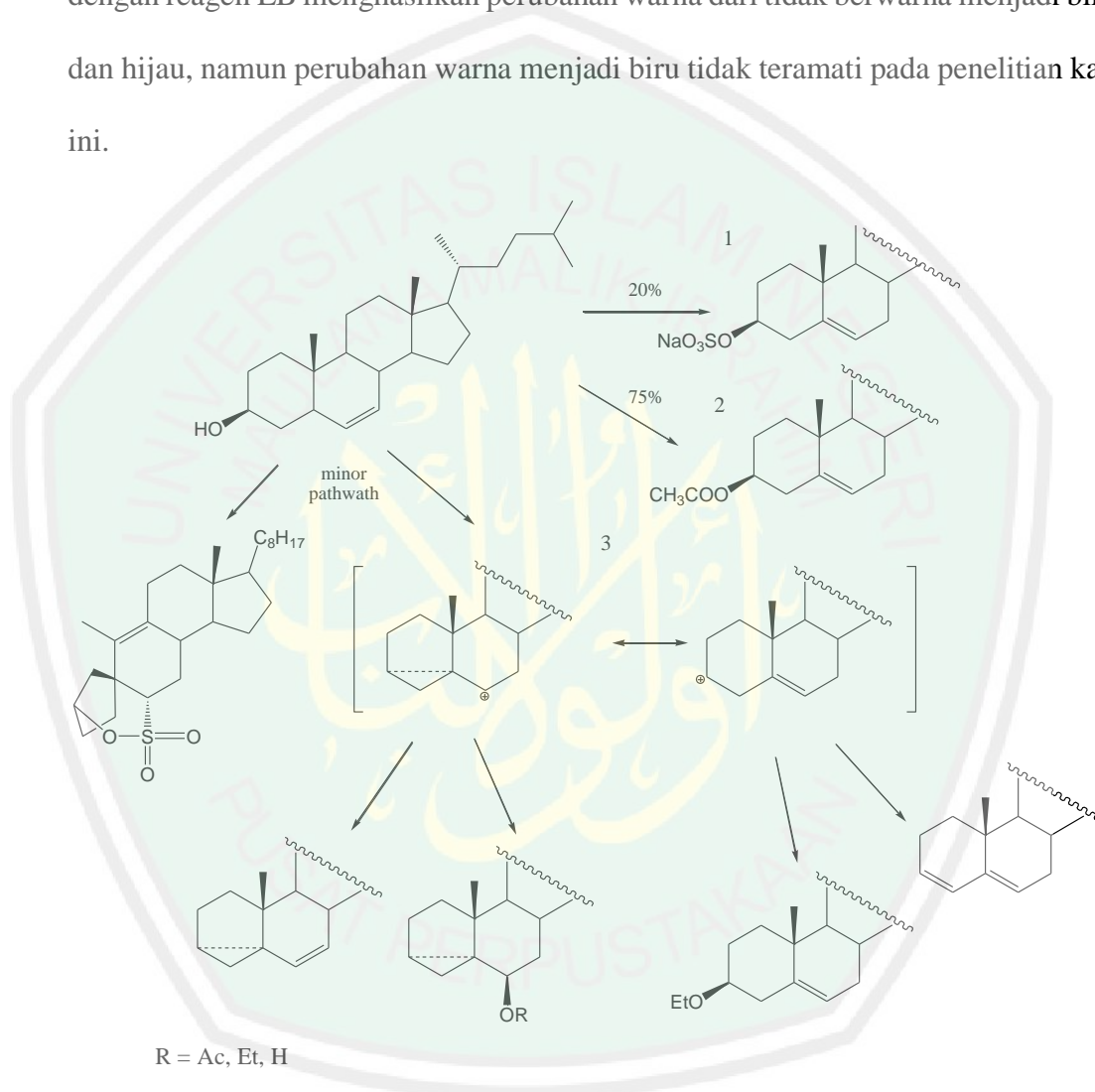


Gambar 4.2 Reaksi Hidrolisis pada Ikatan Glikosida (Fasya, 2016)

Steroid yang telah terputus dari glikonnya dipisahkan dengan metode ekstraksi cair-cair dalam pelarut n-heksana, dimana terjadi distribusi senyawa sterol dalam fase organik sedangkan glikon dan garam hasil hidrolisis tetap larut dalam fase air (Dinan, dkk., 2001). Rendemen fraksi n-heksana yang didapatkan adalah sebesar 32,72%. Nilai rendemen tersebut mengindikasikan bahwa proses hidrolisis terjadi sehingga senyawa nonpolar, termasuk steroid terdistribusi ke dalam pelarut n-heksana.

4.5 Uji Fitokimia Senyawa Steroid dengan Reagen *Lieberman – Burchard*

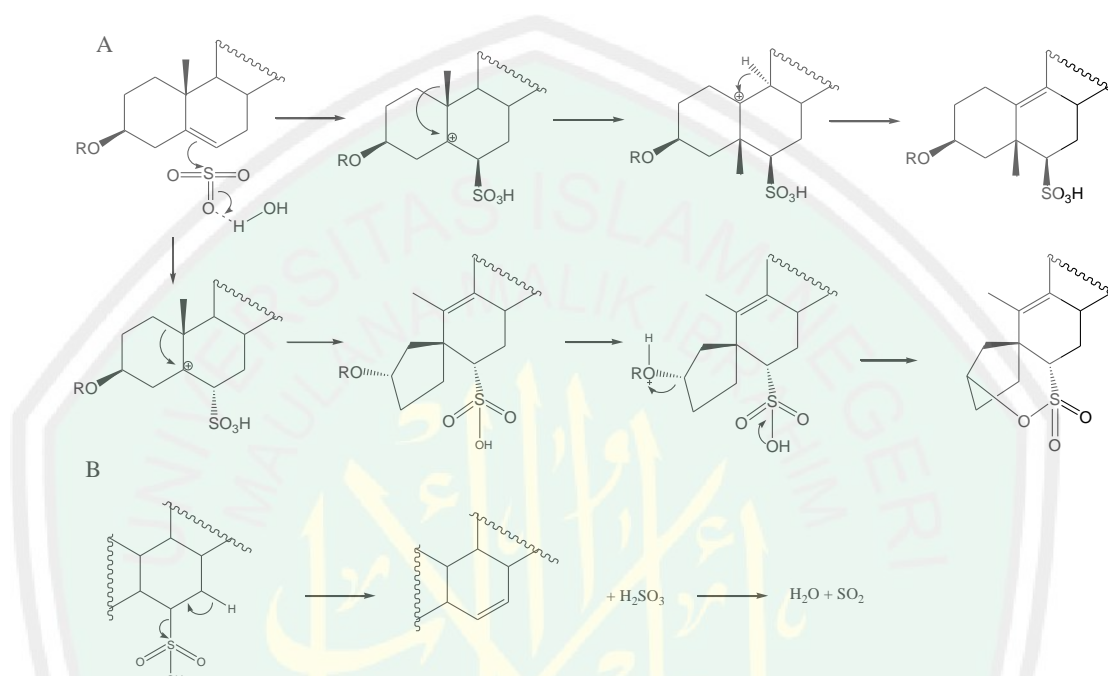
Uji fitokimia senyawa steroid dilakukan dengan menggunakan reagen *Lieberman – Burchard* (LB), yakni penambahan asetat anhidrat dan asam sulfat pekat dengan kloroform sebagai pelarut (Kristanti, dkk., 2008). Reaksi steroid dengan reagen LB menghasilkan perubahan warna dari tidak berwarna menjadi biru dan hijau, namun perubahan warna menjadi biru tidak teramati pada penelitian kali ini.



Gambar 4.3 Produk-produk yang dihasilkan dari reaksi kolesterol dengan LB (Xiong, dkk., 2007)

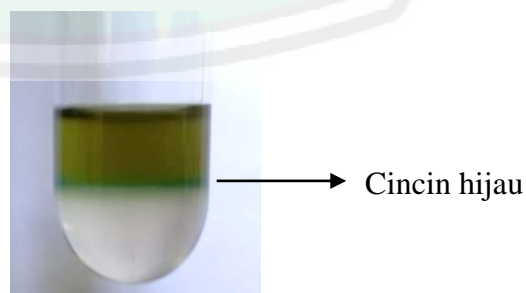
Berdasarkan Gambar 4.3, reaksi kolesterol dengan reagen LB menghasilkan produk mayor berupa kolesteril sulfat (1) dan kolesteril asetat (2) serta produk minor berupa hasil penataan-ulang (3), 3,5-kolestadiena, dimer dan i-steroid yang

selanjutnya secara perlahan mengalami sulfonasi dan desaturasi membentuk asam sulfonat poliena. Selanjutnya asam sulfonat poliena mengalami sulfonasi dan desaturasi kembali untuk membentuk senyawa asam sulfonat aromatis. Dugaan reaksi yang terjadi ketika sulfonasi dan desaturasi ditunjukkan dalam Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Dugaan reaksi sulfonasi dan desaturasi pada reaksi LB. A) sulfonasi
B) desaturasi (Xiong, dkk., 2007)

Berdasarkan Gambar 4.5 menunjukkan adanya senyawa steroid dalam fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella sp.* yang ditandai dengan pembentukan cincin berwarna hijau.



Gambar 4.5 Uji fitokimia senyawa steroid fraksi n-heksana *Chlorella sp.*

Fasya, dkk., (2013) melaporkan ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* menunjukkan adanya warna hijau kebiruan setelah diberikan reagen LB yang diduga berasal dari senyawa steroid. Desianti (2014) menyebutkan fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter, dan n-heksana hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* menunjukkan adanya dugaan senyawa steroid dimana, fraksi n-heksana dan petroleum eter mengandung senyawa steroid lebih banyak dibandingkan fraksi lainnya. Beberapa penelitian melaporkan pula tentang keberadaan senyawa selain steroid dalam mikroalga *Chlorella sp.* Khamidah, dkk., (2014) melaporkan ekstrak metanol biomassa *Chlorella sp.* diduga mengandung senyawa tannin dengan terbentuknya endapan putih setelah diberikan larutan gelatin. Anggraeni, dkk., (2014) melaporkan fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter, dan n-heksana hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* menunjukkan dugaan adanya senyawa asam askorbat dengan terbentuknya warna ungu menjadi coklat setelah diberikan pereduksi kalium permanganat.

4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)

Metode KLTA dilakukan menggunakan 5 variasi perbandingan eluen antara n-heksana:etil asetat, yakni (4,50:0,50); (4,25:0,72); (4,00:1,00); (3,75:1,25), dan (3,50:1,50). Pemilihan eluen campuran tersebut dikarenakan sifat steroid dalam rentang nonpolar ke semipolar, sehingga dibutuhkan etil asetat untuk memberikan efek sedikit polar. Analisis KLTA diamati pada lampu UV 254 nm dan 366 nm saat sebelum dan sesudah disemprot reagen LB serta setelah pemanasan karena noda steroid tidak tampak langsung oleh mata.

Tabel 4.1 Jumlah noda, resolusi dan nilai Rf hasil KLTA

Variasi Eluen (n-Heksana : Etil Asetat)	Jumlah Noda Setelah Pemanasan	Nilai Rf	Resolusi
4,50 : 0,50	10	0,06; 0,11; 0,20; 0,24; 0,31; 0,40; 0,46; 0,56; 0,86; dan 0,94	0,4; 0,7; 0,5; 0,6; 0,7; 0,5; 0,8; 2,4; 0,6
4,25 : 0,75	11	0,06; 0,14; 0,23; 0,26; 0,31; 0,36; 0,43; 0,556; 0,84; 0,89; dan 0,94	0,6; 0,7; 0,3; 0,4; 0,5; 0,11; 2,2; 0,4; dan 0,4
4,00 : 1,00	12	0,09; 0,14; 0,21; 0,33; 0,39; 0,45; 0,50; 0,56; 0,61; 0,78; 0,93; dan 0,96	0,4; 0,6; 0,9; 0,5; 0,5; 0,4; 0,5; 0,4; 1,3; 1,2; dan 0,3
3,75 : 1,25	14	0,04; 0,13; 0,19; 0,24; 0,30; 0,44; 0,49; 0,56; 0,60; 0,68; 0,74; 0,83; 0,93; dan 0,96	0,8; 0,5; 0,4; 0,5; 1,1; 0,4; 0,6; 0,3; 0,6; 0,5; 0,7; 0,8; dan 0,3
3,50 : 1,50	14	0,05; 0,10; 0,20; 0,26; 0,35; 0,43; 0,54; 0,58; 0,68; 0,72; 0,80; 0,84; 0,89; dan 0,92	0,4; 0,8; 0,5; 0,7; 0,6; 0,9; 0,3; 0,8; 0,4; 0,6; 0,3; 0,3; dan 0,3

Berdasarkan Tabel 4.1 menunjukkan adanya peningkatan jumlah noda pada setiap bertambahnya volume etil asetat yang mengindikasikan tingkat pemisahan lebih tinggi karena mampu memisahkan senyawa lebih banyak. Jumlah noda terbanyak diperoleh pada variasi n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 3,75: 1,25 dan 3,50: 1,5 sehingga kedua variasi eluen dapat dijadikan acuan awal dalam penentuan eluen terbaik. Selanjutnya, nilai Rf dan resolusi mampu memberikan interpretasi pemisahan baik atau tidak untuk memperkuat alasan pemilihan eluen terbaik.

Berdasarkan Tabel 4.1 diperoleh nilai Rf antara 0,04-0,96 sedangkan nilai resolusi antara 0,3-1,3 pada semua variasi. Nilai Rf menunjukkan kemampuan suatu senyawa dalam berinteraksi dengan fase diam dan fase gerak. Sedangkan resolusi mampu menunjukkan jarak antar noda dengan jarak sedikitnya 0,20 cm (Kumar, dkk., 2014). Apabila dilihat dari nilai Rf dan resolusi yang diperoleh maka dapat dikatakan semua variasi memiliki pemisahan yang baik sehingga perlu dilakukan tinjauan lebih lanjut dalam menentukan eluen terbaik.



Gambar 4.6 Pola Noda KLTA pada semua variasi eluen setelah disemprot LB dan pemanasan yang diamati dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm

Berdasarkan Gambar 4.6 menunjukkan bahwa variasi eluen (4,50:0,50); (4,00:1,00); dan (3,75:1,25) menghasilkan dua noda dugaan steroid yang berwarna

hijau dan biru. Sedangkan, variasi eluen (4,25:0,75) dan (3,50:1,50) hanya menghasilkan satu noda berwarna biru yang diduga steroid. Berdasarkan jumlah noda terduga steroid, maka variasi eluen (4,50:0,50); (4,00:1,00); dan (3,75:1,25) dapat dijadikan acuan dalam penentuan eluen terbaik dibandingkan variasi eluen (4,25:0,75) dan (3,50:1,50) karena menghasilkan jumlah noda terduga steroid lebih banyak. Namun apabila dilihat dari jumlah noda yang ditunjukkan pada Tabel 4.1, variasi eluen (4,50:0,50) dan (4,00:1,00) memiliki jumlah noda berturut-turut 10 dan 12 sedangkan eluen 3,75:1,25 memiliki 14 noda sehingga pemisahan dengan eluen 3,75:1,25 lebih baik dibandingkan eluen (4,50:0,50) dan (4,00:1,00). Peningkatan jumlah noda berkorelasi dengan tingkat pemisahan senyawa, sehingga isolat steroid lebih murni. Dengan demikian, eluen terbaik yang diperoleh adalah n-heksana:etil asetat 3,75:1,25 yang memunculkan jumlah noda terbanyak, pemisahannya baik, tidak berekor, nilai R_f baik, resolusi besar, dan 2 noda dugaan steroid.

4.7 Pemisahan Senyawa Steroid Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Langkah KLTP dilakukan untuk mendapatkan isolat steroid dalam jumlah besar. Fase gerak berupa eluen terbaik, n-heksana:etil asetat (3,72:1,25). Berdasarkan Tabel 4.2 menunjukkan hasil KLTP fraksi n-heksana menghasilkan 16 noda dengan dua noda diduga steroid, yakni noda ke-11 berwarna biru (R_f 0,811) dan noda ke-12 berwarna hijau (R_f 0,756). Noda terduga steroid hasil KLTP berbeda dengan hasil KLTA karena noda ke-11 pada KLTP diduga merupakan noda baru hasil pemisahan noda ke-10 atau ke-12 akibat medan elusi KLTP lebih luas sehingga memberikan pemisahan lebih maksimal. Sedangkan noda ke-13 pada

KLTA (noda warna biru) dimungkinkan tidak muncul pada KLTP. Ketidakhadiran noda tersebut konsisten setelah 5 kali perulangan.

Tabel 4.2 Hasil KLTP fraksi n-heksana pada eluen n-heksana:etil asetat (3,75:1,25)

No	Rf	Sebelum Disemprot Lieberman-Buchard		Setelah Disemprot Lieberman-Buchard		Setelah Dipanaskan	
		Visual	UV 366 nm	Visual	UV 366 nm	Visual	UV 366 nm
1	0,05	Putih	Merah	Putih	Merah	Putih	Putih
2	0,122	Putih	Merah	Putih	Merah	Putih	Putih
3	0,156	Kuning	Merah	Kuning	Merah	Kuning	Putih
4	0,189	Putih	Merah	Putih	Merah	Putih	Merah
5	0,278	Putih	Merah	Putih	Merah	Putih	Merah
6	0,356	Kuning	Merah	Kuning	Merah	Kuning	Merah
7	0,550	Hijau	Merah	Hijau	Merah	Hijau	Merah
8	0,611	Putih	Merah	Putih	Merah	Putih	Putih
9	0,70	Hijau	Merah	Hijau	Merah	Hijau	Merah
10	0,744	Putih	Merah	Putih	Merah	Putih	Merah
11	0,756	Putih	Biru	Putih	Biru	Putih	Biru
12	0,811	Putih	Hijau	Putih	Hijau	Putih	Hijau
13	0,85	Putih	Merah	Putih	Merah	Putih	Putih
14	0,894	Putih	Merah	Putih	Merah	Putih	Merah
15	0,922	Putih	Merah	Putih	Merah	Putih	Putih
16	0,967	Kuning	Merah	Kuning	Merah	Kuning	Putih

Pemilihan isolat steroid hasil KLTP sebagai bahan uji toksisitas perlu dipertimbangkan untuk mendapatkan hasil LC_{50} yang baik. Pemilihan isolat didasarkan pada resolusi tiap noda (Tabel 4.3). Noda ke-12 (hijau) memiliki resolusi 0,7 dari noda ke-13 dan 1,0 dari noda ke-11 sedangkan noda ke-11 (biru) memiliki resolusi 1,0 dari noda ke-12 dan 0,2 dari noda ke-10. Hal ini menunjukkan noda ke-12 memiliki jarak yang jauh dari noda ke-13 dan noda ke-11 sehingga pemisahan yang terjadi lebih baik, sedangkan noda ke-11 memiliki jarak yang sangat dekat dengan noda ke-10 sehingga dimungkinkan tercampur. Apabila noda ke-11 dijadikan sebagai bahan uji toksisitas maka bioaktivitas dalam menyebabkan

kematian larva udang *Artemia salina* akan menurun. Dengan demikian pemilihan isolat steroid hasil KLTP yang dikerok adalah noda ke-12.

Tabel 4.3 Nilai resolusi dari hasil KLTP

No	Nomor Noda	Jarak antar noda (Resolusi)
1	1-2	1,3
2	2-3	0,6
3	3-4	0,6
4	4-5	1,6
5	5-6	1,4
6	6-7	3,5
7	7-8	1,1
8	8-9	1,6
9	9-10	0,8
10	10-11	0,2
11	11-12	1,0
12	12-13	0,7
13	13-14	0,8
14	14-15	0,5
15	15-16	0,8

4.8 Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil KLTP Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

4.8.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina*

Penetasan telur *Artemia salina* dilakukan dalam medium air laut dengan penyinaran dari lampu TL dan pemasokan udara dari aerator untuk mempercepat proses penetasan. Hal ini dikarenakan larva udang *Artemia salina* merupakan organisme fototropik (Amaliyah, dkk., 2013; Vanhaecke, dkk., 1981). Mekanisme penetasan *Artemia salina* melalui tiga tahapan, yakni hidrasi, pemecahan cangkang dan pengeluaran atau tahap payung. Tahap hidrasi merupakan tahapan terjadinya penyerapan air pada telur kering sehingga menjadi bulat dan aktif bermetabolisme (Sriwahyuni, 2010). Hasil metabolisme mampu bertambah sehingga akan terjadi peningkatan tekanan osmotik dalam membran dan menyebabkan pecahnya

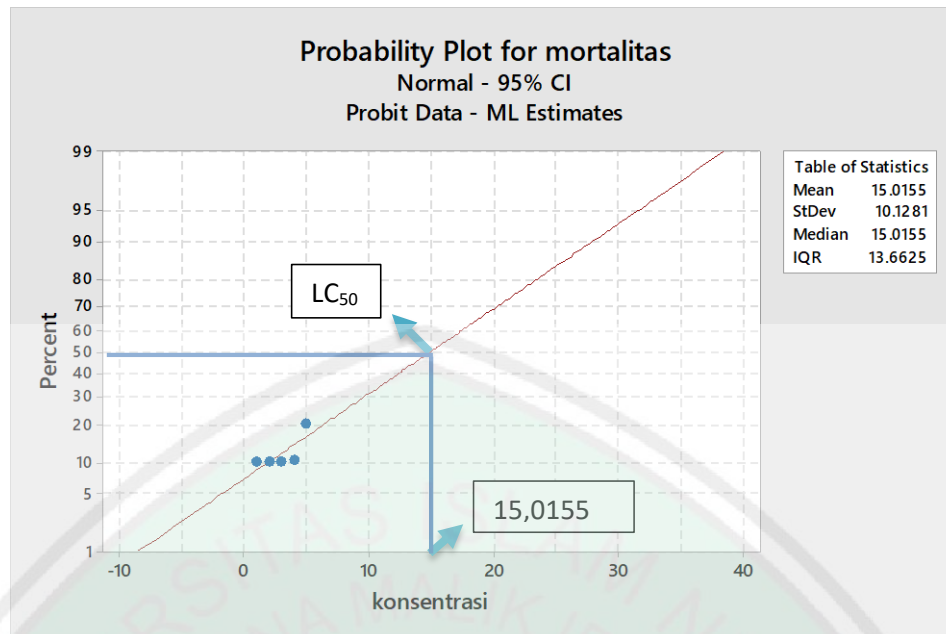
cangkang. Setelah itu terjadi tahapan pengeluaran larva dari cangkang (Lavens dan Sorgeloos, 1987). Larva yang digunakan untuk uji toksisitas terhadap isolat steroid hasil KLTP adalah larva yang berusia 48 jam karena memiliki kepekaan dan sensitifitas tinggi terhadap lingkungan sehingga akan merespon isolat steroid secara aktif (Vanhaecke, dkk., 1981).

4.8.2 Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan pada fraksi n-heksana dan isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* dari noda ke-12 yang berwarna hijau dengan variasi konsentrasi isolat sebesar 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm, serta terdapat kontrol berupa pelarut, DMSO dan blanko. Penggunaan DMSO sebagai surfaktan sedangkan larutan ragi sebagai makanan larva udang. Setiap variasi dilakukan 5 kali perulangan untuk memperkuat data uji karena berhubungan dengan makhluk hidup yang pergerakannya cukup sulit untuk dikondisikan.

Tabel 4.4 Kematian dan persentase mortalitas dari larva udang *Artemia salina* pada fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella sp.*

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati					MODUS	%Mortalitas
	I	II	III	IV	V		
Pelarut	0	0	0	0	0	0	0
DMSO	0	0	0	0	0	0	0
Blanko	0	0	0	0	0	0	0
1	1	2	1	1	1	1	10
2	0	1	1	1	0	1	10
3	0	1	0	1	1	1	10
4	0	1	1	1	0	1	10
5	1	2	2	0	1	2	20



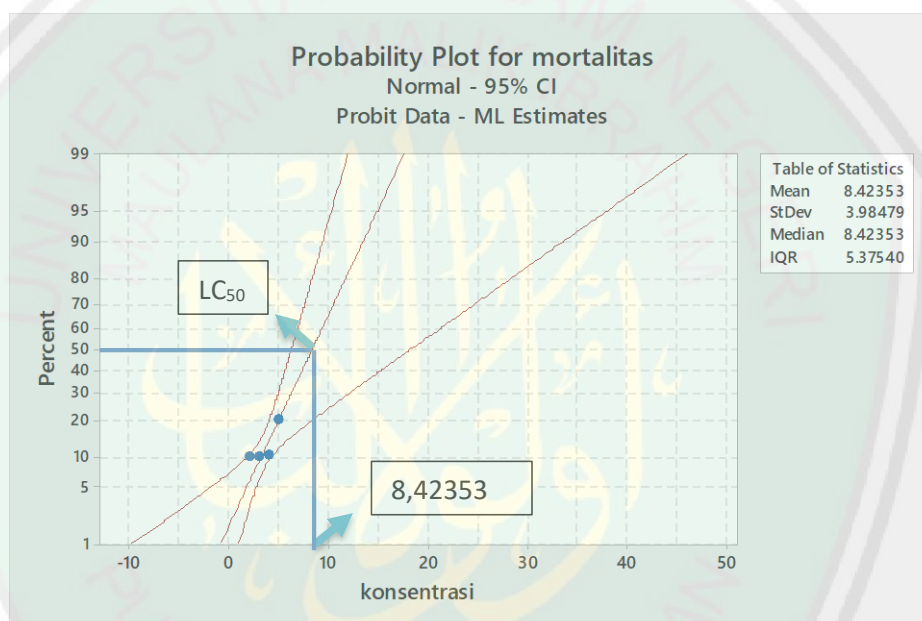
Gambar 4.7 Kurva mortalitas larva udang pada fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella sp.* ($LC_{50} = 15,0155$ ppm)

Mekanisme yang terjadi ketika pengujian toksisitas senyawa steroid terhadap larva udang *Artemia salina* adalah gugus $-OH$ pada steroid akan berikatan dengan protein integral membran sel. Hal ini menyebabkan transport aktif Na^+/K^+ terhenti sehingga transport aktif tak terkendali dan terjadi pemecahan membran sel dan menyebabkan kematian larva udang *Artemia salina* (Tulung, dkk., 2017).

Berdasarkan Tabel 4.4 menunjukkan hasil uji toksisitas fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella sp.* Nilai modus yang diperoleh digunakan untuk menghitung persentase mortalitas, mortalitas dan nilai LC_{50} (Gambar 4.7). Nilai LC_{50} yang diperoleh dari fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella sp.* adalah sebesar 15,02 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella sp.* bersifat sangat toksik (Meyer, dkk., 1982; dan Wawan, 2003).

Tabel 4.5 Kematian dan persentase mortalitas dari larva udang *Artemia salina* pada isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.*

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati					MODUS	% mortalitas
	I	II	III	IV	V		
Pelarut	0	0	0	0	0	0	0
DMSO	0	0	0	0	0	0	0
Blanko	0	0	0	0	0	0	0
1	2	0	0	1	0	0	0
2	2	1	0	0	1	1	10
3	1	0	3	1	0	1	10
4	2	1	2	1	0	2	20
5	1	2	0	1	2	2	20



Gambar 4.8 Kurva Mortalitas Larva Udang isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* (LC₅₀ = 8,42353 ppm)

Hasil uji toksisitas isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* ditunjukkan dalam Tabel 4.5 dan Gambar 4.8. Berdasarkan Tabel 4.5 diperoleh nilai persentase mortalitas yang berbanding lurus dengan konsentrasi isolat steroid. Berdasarkan Gambar 4.8 menunjukkan nilai LC₅₀ dari isolat steroid hasil KLTP adalah 8,42 ppm. Hal ini menunjukkan isolat steroid bersifat sangat toksik (Meyer, dkk., 1982; dan Wawan, 2003).

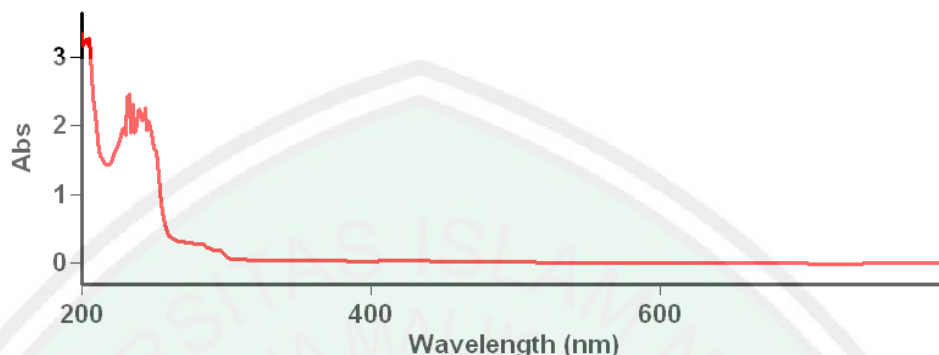
Berdasarkan hasil uji toksisitas yang diperoleh menunjukkan bahwa nilai LC_{50} isolat steroid lebih rendah dibanding fraksi n-heksana yang mengindikasikan sifat toksik isolat steroid lebih tinggi dibanding fraksi n-heksana karena isolat steroid lebih murni sehingga kemampuan bioaktivitasnya tidak terhambat. Akan tetapi, hasil uji toksisitas fraksi n-heksana dan isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* menunjukkan adanya potensi sebagai antikanker dan antitumor karena menghasilkan nilai $LC_{50} < 30$ ppm (Halimah, 2010), sehingga pada penelitian berikutnya dapat dilakukan uji toksisitas akut. Pengujian toksisitas akut dapat menentukan efek dari pemberian dosis tunggal suatu senyawa pada hewan uji dan biasanya dinyatakan dalam LD_{50} (Siswanto, dkk., 2015). Nilai LD_{50} atau *Lethal Dose* merupakan dosis tunggal suatu senyawa untuk bersifat toksik atau menimbulkan 50% kematian pada hewan uji (Frank, 1996). Sehingga pengujian ini dapat memberikan batas dosis maksimal dari suatu senyawa untuk bersifat toksik.

4.9 Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLTP Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Langkah awal untuk identifikasi senyawa steroid dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis yang didasarkan perolehan panjang gelombang maksimal akibat transisi elektron yang terjadi. Identifikasi digunakan isolat steroid hasil KLTP noda ke-12 mikroalga *Chlorella sp.* dengan pelarut n-heksana pada panjang gelombang 200 – 800 nm.

Berdasarkan Gambar 4.9 dan Tabel 4.5 menunjukkan bahwa hasil isolat hasil KLTP diperoleh beberapa panjang gelombang maksimal akibat transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ dari C=C tak terkonjugasi dengan dugaan senyawa steroid dan $\pi \rightarrow \pi^*$ C=C terkonjugasi dan $n \rightarrow \sigma^*$ dari gugus C=O merupakan terduga senyawa

triterpenoid. Banyaknya serapan yang muncul mengindikasikan bahwa isolat yang digunakan pada penelitian kali ini kurang murni. Dugaan steroid muncul pada panjang gelombang maksimal 203 nm dan 205 nm.

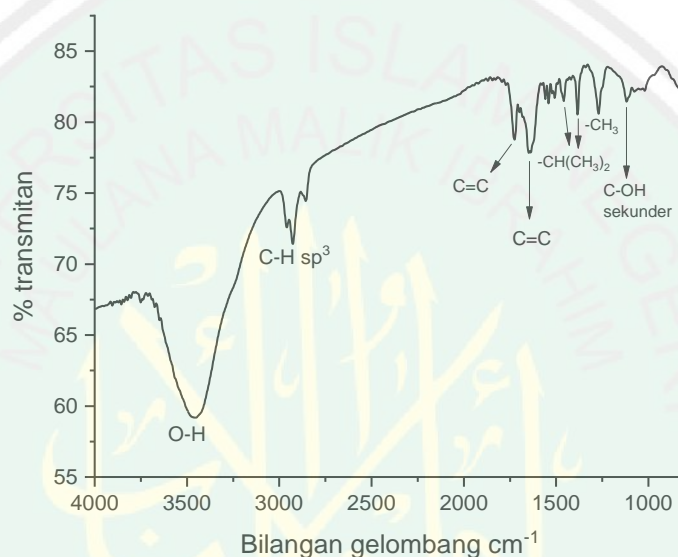


Gambar 4.9 Hasil identifikasi isolat hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* dengan spektrofotometer UV-Vis

Dugaan steroid dan triterpenoid didasarkan pada beberapa penelitian terdahulu. Aprelia (2013) melaporkan hasil spektrofotometer UV-Vis dari ekstrak etil asetat tumbuhan paku *Chlorella arida* yang menunjukkan nilai panjang gelombang maksimal di 203 nm akibat adanya transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ dari ikatan C=C yang tak terkonjugasi. Kristanti, dkk., (2007) menyebutkan bahwa senyawa stigmasterol memunculkan panjang gelombang maksimal sebesar 204 nm dengan adanya ikatan rangkap pada C=C. Astuti, dkk., (2017) melaporkan adanya serapan transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ dari C=C terkonjugasi pada panjang gelombang 232 nm dan 237 nm dengan dugaan senyawa triterpenoid (28-noraleana-12,17-dien-3 β -ol). Murdianto dkk, (2011) mendapatkan serapan di 239 nm akibat transisi elektron $n \rightarrow \sigma^*$ dari C=O pada isolat triterpenoid (2,3,19,23-tetrahidroksi-12-ena-24,28-dimetelester) ekstrak daun binahong. Rita (2010) melaporkan hasil spektrofotometer UV-Vis isolat triterpenoid dalam etanol memberikan serapan pada panjang gelombang 242 nm akibat transisi elektron $n \rightarrow \sigma^*$ dari C=O.

4.10 Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLTP Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Spektrofotometer *Fourier Transform Infrared (FTIR)*

Identifikasi FTIR tidak mampu memberikan interpretasi struktur yang sesungguhnya tetapi mampu menunjukkan serapan gugus fungsi dari steroid. Spektrum FTIR diperoleh dari isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* noda ke-12 ditunjukkan pada Gambar 4.10 dan dijabarkan dalam Tabel 4.6.



Gambar 4.10 Spektrum FTIR isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.*

Tabel 4.6 Interpretasi spektra IR isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.*

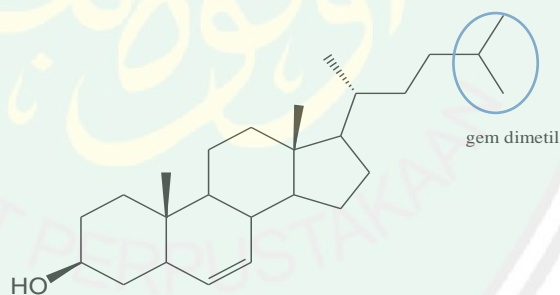
Bilangan Gelombang Observasi (cm ⁻¹)	Bilangan Teoritis (cm ⁻¹)	Gelombang	Jenis Vibrasi
3451	3550-3200 ^a		ulur -OH ^a
2926	3000-2840 ^a		ulur -CH ₃ ^a
1648	1667-1640 ^a		ulur C=C ^a
1458 dan 1384	1475-1445 dan 1390-1370 ^b		tekuk -CH(CH ₃) ₂ gem dimetil <i>scissoring</i> ^b
1270	1300-1200 ^c		tekuk -CH ₃ <i>twisting</i> ^c
1118	1124-1087 ^a		ulur C-O alkohol sekunder ^a

^aSilverstein, dkk., 2005

^bKasal, dkk., 2010

^cSocrates, 1994

Hasil FTIR yang diperoleh menunjukkan terdapat beberapa serapan terduga steroid, yakni serapan melebar gugus –OH daerah 3451 cm^{-1} dan diperkuat adanya vibrasi C-O alkohol sekunder pada daerah 1118 cm^{-1} yang mengindikasikan dugaan sterol dengan gugus –OH melekat pada cincin A (Robinson, 1995). Serapan umum di daerah 2926 cm^{-1} akibat vibrasi ulur gugus C-H sp^3 . Daerah 1648 cm^{-1} terdapat vibrasi ulur dari C=C tak terkonjugasi disubstituen yang menunjukkan rangkap dari cincin B. Serapan khas terduga steroid adalah gugus gem dimetil yang muncul pada 1458 cm^{-1} dan 1384 cm^{-1} . Serapan gem dimetil diperkuat dengan penelitian Oktoba, dkk., (2019) yang melaporkan isolat sikloartenal hasil pemurnian fraksi n-heksana Rampai (*Lycopersicon esculentum*) diperoleh serapan khas gem dimetil di daerah $1456,7$ dan 1376 cm^{-1} dan diperkuat dengan hasil spektrofotometer ^1H - ^{13}C *Heteronuclear Multiple Bond Connectivity* (HMBC) yang menunjukkan adanya gem dimetil dari korelasi antara proton metil H3-26 dan H3-27 dengan C-25, C-24 dan C-26/C-27 pada rantai samping.

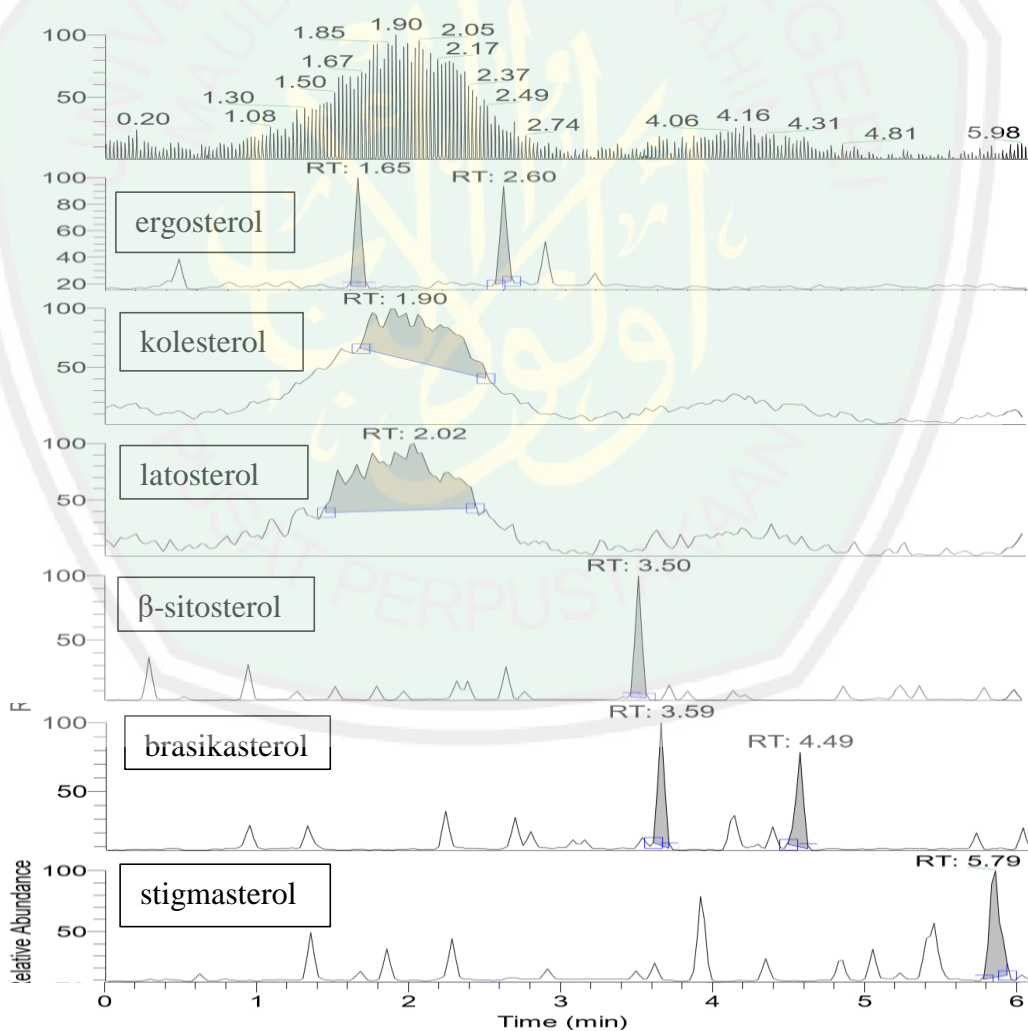


Gambar 4.11 Struktur senyawa kolesterol (Xiong, dkk., 2007)

4.11 Identifikasi Senyawa Steroid Hasil KLTP Menggunakan LC-MS/MS

Sistem LC-MS/MS dalam penelitian kali ini menggunakan sumber ion berupa APCI mode positif karena memiliki sensitifitas lebih tinggi dibandingkan mode negatif dan cocok untuk menganalisa sampel dengan kepolaran rendah

hingga medium dan berat molekul yang besar (Canabate-Diaz, 2007). Penganalisa massa berupa *triple quadrupole*. Pada fragmentasi pertama, *quadrupole* menyeleksi ion induk, sedangkan fragmentasi kedua *quadrupole* menyeleksi ion anak (Xiao, dkk., 2012). Fase diam berupa kolom C₁₈ bersifat nonpolar sedangkan fase gerak yang digunakan adalah asam format/air dan asam format/asetonitril bersifat polar. Sistem elusi dilakukan secara gradien linier untuk meningkatkan resolusi campuran yang kompleks dengan kisaran polaritas yang luas. Hasil yang diperoleh dari LC-MS/MS adalah waktu retensi, massa ion induk, massa ion anak, dan NL (*Neutral Loss*).



Gambar 4.12 Hasil identifikasi LC-MS/MS isolat steroid hasil KLTP

Identifikasi senyawa steroid menggunakan LC-MS/MS diperlukan senyawa target, yakni ergosterol, kolesterol, kampesterol, stigmasterol, β -sitosterol, brasikasterol, dan latosterol. Hasil identifikasi isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* diperoleh 6 senyawa steroid yakni ergosterol, kolesterol, latosterol, β -sitosterol, brasikasterol, dan stigmasterol sedangkan kampesterol tidak terdeteksi.

Berdasarkan Gambar 4.12 diperoleh waktu retensi yang bervariasi. Munculnya dua waktu retensi pada ergosterol dan brasikasterol yang berturut-turut muncul pada waktu retensi 2,60 menit dan 4,49 menit disebabkan oleh dugaan isomer dari keduanya. Waktu retensi berkorelasi dengan tingkat kepolaran akibat interaksi senyawa dengan fase gerak dan fase diamnya, dimana semakin kecil waktu retensi maka semakin besar tingkat kepolarannya. Urutan retensi waktu yang diperoleh adalah ergosterol < kolesterol < latosterol < β -sitosterol < brasikosterol < stigmasterol. Sehingga urutan kepolaran adalah ergosterol > kolesterol > latosterol > β -sitosterol > brasikosterol > stigmasterol.

Waktu retensi dan tingkat kepolaran dapat dihubungkan dengan massa relatif (Tabel 4.7) dan struktur dari senyawa steroid (Gambar 4.12). Ergosterol diperoleh waktu retensi lebih pendek dibandingkan kolesterol dan latosterol karena memiliki 3 ikatan rangkap C=C yang memberi efek polar meskipun massa relatifnya lebih besar. Urutan waktu retensi β -sitosterol, brasikasterol, dan stigmasterol sedikit berbeda karena waktu retensi β -sitosterol lebih pendek dibandingkan brasikaterol dan stigmasterol. Urutan yang seharusnya adalah brasikasterol < stigmasterol < β -sitosterol karena β -sitosterol memiliki 1 ikatan rangkap dengan massa relatif senyawa 414 g/mol sedangkan Brasikasterol

memiliki 2 ikatan rangkap dan massa relatif 398 g/mol dan stigmasterol memiliki 2 ikatan rangkap dengan massa relatif 412 g/mol.

Tabel 4.7 Senyawa target LC-MS/MS

Steroid	NL (<i>Neutral Loss</i>) (m/z)	Massa (g/mol)	Massa Ion Induk (m/z)	Massa Ion Anak (m/z)
Kolesterol	$2,23 \times 10^3$	386 ^b	369 ^b	160,50-161,50 ^b
Latosterol	$6,48 \times 10^3$	386 ^d	369 ^b	95 ^b
Ergosterol	$0,018 \times 10^3$	396 ^a	379 ^a	144,50-145,50 ^a
Brasikosterol	$0,040 \times 10^3$	398 ^c	381 ^c	296,50-297,50 ^c
Kampesterol	-	400 ^a	383 ^a	160,50-161,50 ^a
Stigmasterol	$0,032 \times 10^3$	412 ^a	395 ^a	254,50-255,50 ^a
β -sitosterol	$0,10 \times 10^3$	414 ^a	397 ^a	160,50-161,50 ^a

^a(Khalaf, dkk., 2012)

^b(Fu and Joseph, 2012)

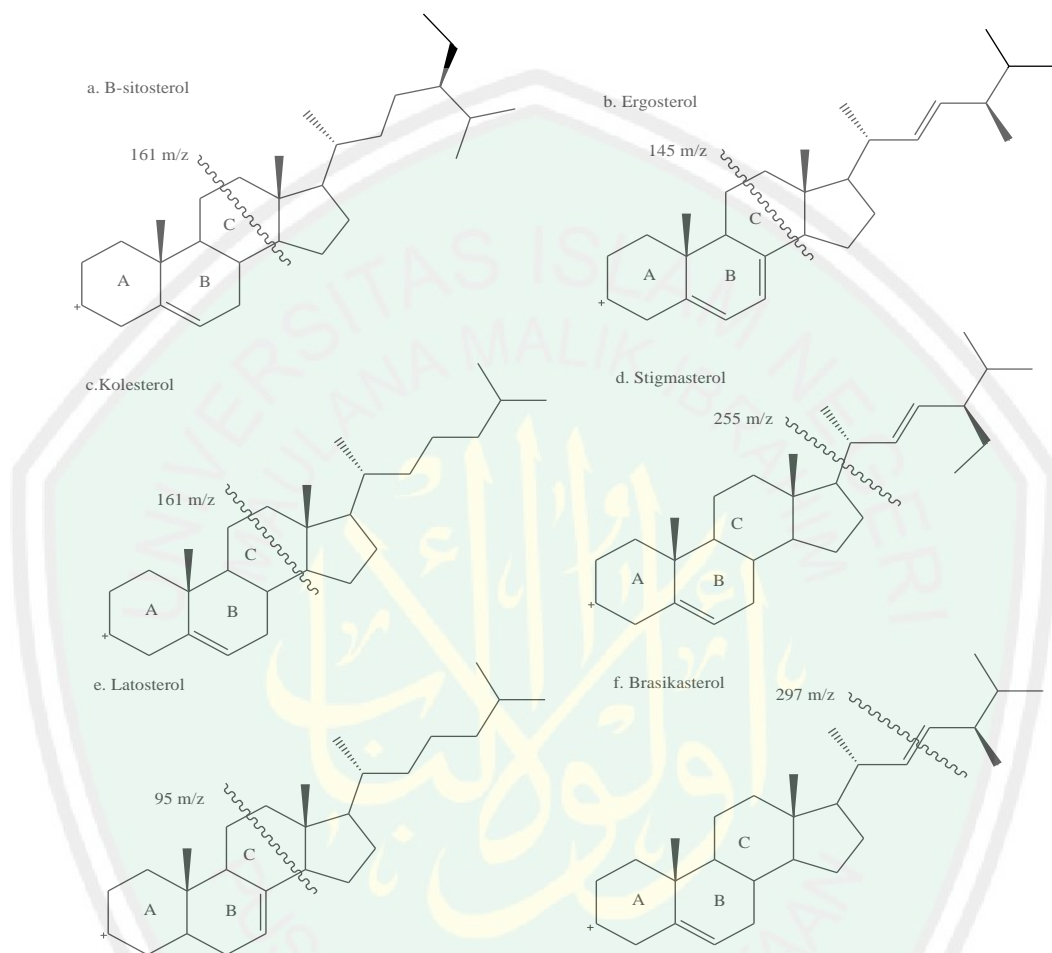
^c(Mo, dkk., 2013)

^d(Abdel-Aal, dkk., 2015)

Berdasarkan Tabel 4.7 menunjukkan bahwa setiap senyawa target akan kehilangan molekul H₂O untuk menghasilkan massa ion induknya sehingga massa relatif senyawa kehilangan 18 m/z (Mo, dkk., 2013). Selanjutnya massa ion induk akan terfragmentasi menjadi massa ion anak yang lebih stabil. Pola fragmentasi dari β -sitosterol, ergosterol, dan latosterol adalah pembelahan cincin C (Gambar 4.13.a – Gambar 4.13.c). Akan tetapi ergosterol melalui pemutusan cincin B terlebih dahulu, kemudian H-shift dan reaksi retro Diels-Alder. Pada stigmasterol dan brasikosterol akan kehilangan 96 m/z dan 84 m/z pada rantai samping C₁₇ untuk membentuk lebih banyak ion anak 255 m/z dan 297 m/z (Gambar 4.13.d dan Gambar 4.13.f).

Hasil identifikasi LC-MS/MS dapat memberikan informasi tentang NL yang sebanding dengan kelimpahan senyawa dalam sampel (Tabel 4.7). NL yang diperoleh dari ergosterol, kolesterol, stigmasterol, β -sitosterol, dan brasikosterol

dan secara berturut-turut adalah $0,018 \times 10^3$; $2,23 \times 10^3$; $0,032 \times 10^3$; $0,10 \times 10^3$; dan $6,48 \times 10^3$. Hal ini menunjukkan bahwa kelimpahan senyawa tertinggi pada isolat steroid mikroalga *Chlorella sp.* adalah latosterol.



Gambar 4.13 Pola fragmentasi senyawa steroid (Mo, dkk., 2013; Mungger, dkk., 2018)

4.12 Pengaplikasian Mikroalga *Chlorella sp.* Sebagai Bentuk Kebesaran Allah SWT

Mikroalga *Chlorella sp.* dikenal sebagai fitoplankton yang mengandung metabolit sekunder dan komponen lainnya sehingga mampu bermanfaat bagi kehidupan manusia, diantaranya dalam bidang industri pangan, kosmetik, dan farmasi (Abu-Rezq, dkk., 2010). Salah satu pemanfaatan yang dilakukan dalam

penelitian kali ini adalah mengetahui tingkat toksisitas senyawa steroid dalam mikroalga *Chlorella sp.* untuk berkorelasi sebagai antikanker, antitumor, dan antimikroba. Berdasarkan hasil uji toksisitas isolat steroid hasil KLTP fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella sp.* metode BSLT diperoleh LC₅₀ 8,42 ppm yang mengindikasikan bahwa steroid dalam mikroalga *Chlorella sp.* bersifat toksik dan berkorelasi terdapat obat antikanker dan antitumor. Pengaplikasian mikroalga *Chlorella sp.* tersebut dapat dijadikan salah satu proses pendekatan diri kepada Allah melalui renungan terhadap penciptaan salah satu komponen yang ada di bumi. Allah berfirman dalam QS Ali Imron 190-191:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَأَخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِأُولِي الْأَلْبَابِ ۚ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ۙ ١٩١

Artinya: “*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal. (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka*”

Tafsir Ibnu Katsir menjabarkan bahwa kalimat *إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ* bermakna bahwa penciptaan bumi dan langit terpaut ketinggian, keluasan, hamparan, kepadatan serta tata letaknya dan semua yang ada di langit dan di bumi dapat ditemukan bintang-bintang yang beredar, gunung-gunung, padang pasir, pepohonan tumbuh-tumbuhan, buah-buahan serta hewan-hewan, bahan tambang, serta benda lainnya yang bermanfaat dengan keragaman warna, rasa, bau dan kegunaannya. Dibagian akhir ayat 190, yakni *لِأُولِي الْأَلْبَابِ* menjelaskan bahwa segala

sesuatu dengan hakikatnya masing-masing dapat diketahui secara jelas bagi orang-orang yang berakal dan memiliki kecerdasan.

Tafsir al-Misbah menjelaskan QS. Ali Imron ayat 190 terdapat penciptaan langit dan bumi oleh Allah dengan kesempurnaan dan ketepatan, perbedaan antara siang dan malam, cahaya dan kegelapan, rentang panjang dan pendeknya waktu, merupakan tanda-tanda yang jelas bagi mereka yang memiliki akal yang mengetahui keesaan dan kekuasaan Allah. Sebagian hikmah Tuhan Yang Maha Kuasa terkait siang-malam dan perkisaran keduanya dalam waktu relative membuat cuaca menjadi seimbang sehingga terciptanya iklim di berbagai belahan bumi.

QS. Ali Imron ayat 191 menjelaskan bahwa salah satu ciri khas orang berakal adalah memperhatikan segala sesuatu dengan memperoleh manfaat darinya dan menggambarkan kebesaran Allah SWT dengan mengingat kebijaksanaan, keutamaan dan banyaknya nikmat yang Allah berikan. Selain itu, orang-orang berakal akan mengingat Allah pada setiap waktu dan keadaan apapun serta tidak lalai dalam memikirkan penciptaan langit dan bumi. Bertambahnya kegiatan dalam memikirkan dan merenungkan penciptaan Allah dan menunjukkan bahwa segala sesuatu yang diciptakan Allah tidak sia-sia. Apabila renungan tersebut didalami maka akan menuju pemikiran tentang kebesaran Allah.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Tingkat toksisitas atau LC₅₀ isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* adalah 8,42 ppm.
2. Hasil identifikasi isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan spektrofotometer UV-Vis diperoleh panjang gelombang maksimal 203 nm dan 205 nm dengan transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ dari ikatan C=C tak terkonjugasi. Hasil FTIR diperoleh serapan di daerah 3451 cm⁻¹ (-OH); 2926 cm⁻¹ (C-H); 1648 cm⁻¹ (C=C); 1458 cm⁻¹ dan 1384 cm⁻¹ (gem dimetil); dan 1118 cm⁻¹ (C-OH sekunder). Sedangkan hasil LC-MS/MS menunjukkan adanya senyawa ergosterol, stigmasterol, brasikasterol, kolesterol, latosterol, dan β -sitosterol.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan pemisahan dengan kromatografi cair vakum dan dilanjutkan dengan pemurnian menggunakan rekristalisasi
2. Perlu dilakukan uji toksisitas akut menggunakan hewan uji mencit

DAFTAR PUSTAKA

- Ad-Dimasyqi, A. A. F. I. I. K. 2007. *Tafsir Ibnu Kasir Juz 14*. Bandung: Sinar Baru Algosndo.
- Afif, S., Fasya, A.G., dan Ningsih, R. 2015. Extraction, Toxicity Assay and Identification of Active Compound of Red Algae (*Eucheuma cottonii*) from Sumenep Madura. *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, 4(2):101-106.
- Al-Qorni, A. 2008. *Tafsir Muyyasar, Jilid I*. Terjemahan Tim Qisthi Press. Jakarta: Qisthi Press.
- Amaliyah, dkk. 2013. “Uji Toksisitas, antioksidan dan Antibakteri dari Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi pada Media Ekstrk Tauge”. *Jurnal Green technology*.
- Anggraeni, Ony Novia, Fasya, A. G., Abidin, M., dan Hanapi, A. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* *Jurnal Alchemy*, 2 (3): 173-188.
- Aprilea, F. dan Suyatno. 2013. Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etil Asetat Tumbuhan Paku *Christella arida* dan Uji Pendahuluan Sebagai Antikanker. *UNESA journal of Chemistry*. Volume 2 Nomor 3.
- Bariyyah, Siti Khairul, Fasya, A. G., Abidin, M., dan Hanapi, A. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tuauge. *Jurnal Alchemy*, 2 (3): 150-204.
- Bawa, A., Putra, B., dan Laila, I. 2007. Penentuan pH Optimum Isolasi Karanginan dari Rumput Laut Jenis *Eucheuma cottoni*. *Skripsi*. Bali: Jurusan Kimia Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan dan Alam Universitas Udayana.
- Ben-Amotz; Fishler dan Schneller. 1987. Chemical Composition of Dietary Species of Marine Unicellular Algae and Rotifers with Emphasis on Fatty Acid. *Marine Biology*. Volume 95: 31-36.
- Bernasconi, G., Gerster, H., Hauser, H., Stauble, E. 1995. *Teknologi Kimia Jilid 2*. Jakarta: Pradaya Paramita.
- Budaraga, I.K., Armin, MArlida, Y., dan Bulanin, U. 2016. Toxicity of Liquid Smoke Cinnamon (*Cinnamomum Brumanni*) Production of Ways for Purification and Different Concentration. *International Journal of Scientific and Research Publications*. Volume 6.
- Colegate, S.M., Molyneux, R.J. 2007. *Bioactive Natural Products: Determination, Isolastion, and Structural Determination Second Edition*. Prancis: CPC Press.

- Dachriyanus. 2004. *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi*. Padang: Universitas Andalas.
- Desianti, N. 2014. Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa AKtif Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Kimia.
- Dinan, L., Harmatha, J., dan Lafont, R. 2001. Chromatographic Procedures for The isolation of Plant Steroids. *Journal of Chromatographic A*. 935.
- Fasya, A.G., Khamidah, U. Amaliyah, S., Bariyyah, S.K., dan Romaidi. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) pada Tiap Fase Pertumbuhan. *Jurnal Alchemy*, 2 (3): 5-9.
- Fasya, A.G. 2016. Potensi Antikanker dan AntiOksidan Serta Identifikasi Isolat Steroid Mikroalga *Chlorella sp.* *Laporan Penelitian Kompetitif Individual*.
- Fasya, dkk. 2016. Ekstraksi, Hidrolisis dan Partisi Metabolit Sekunder dari Mikroalga *Chlorella sp.* *ALCHEMY: Journal of Chemistry* Vol. 5 No. 1. Hal 6-9.
- Fogg, G.E. 1975. *Algae Culture and Phytoplankton Ecology*. London: The University of Wisconsin Press.
- Fu, R., dan Joseph, M. 2012. *LC/ELSD and LC/MS/MS of Cholesterol and Related Sterols on a Poroshell 120 column*. USA: Agilent Technologies.
- Gandjar, I.G dan Rohman, A. 2012. *Analisis Obat*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gritter dkk., 1991. *Pengantar Kromatografi*. Bandung: Penerbit ITB.
- Guenther. 1987. *Minyak Atsiri Jilid I*. Jakarta: UI press.
- Halimah, N. 2010. Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting Anting (*Acalypha indica* Linn.) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Handayani, D., Sayuti, N., dan Dachriaynus. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Anti Bakteri Epidioksi Sterol dari Spon Laut *Petrosia nigrans* Asal Sumatera Barat. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi II*. Lampung: Universitas Lampung.
- Hamidi, M. R., Jovanova, B., Panovska, T.K. 2014. Toxicological Evaluation of The Plans Products Using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) Model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*. 60(1): 9-18.
- Hendrawati, S. 2009. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* Linn.) terhadap Larva *Artemia salina* Leach dengan Metode Brine

Shrimp Lethality Test (BSLT). Laporan Akhir Karya Tulis Ilmiah. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

- Herbert, R.B. 1995. *Biosintesis Metabolit Sekunder.* Semarang: IKIP Semarang Press.
- Hidayah, H., A. Ghanaim F. dan A. hanapi. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid pada Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasi Menggunakan FTIR. *Skripsi tidak diterbitkan.* Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Indrayani, L., Soetjipto, H., dan Sihasale, L. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. Berk. Penelitian. *Hayati, Vol. XII: 57-61.*
- Iriawan, N., dan Astuti, S.P. 2006. *Mengelolah Data Statistika dengan Mudah Menggunakan Minitab.* Yogyakarta: CV Andi Offset.
- Isnasetyo, A., dan Kurniastuti. 1995. *Teknik Kultur Phitoplankton dan Zooplankton pakan Alami untuk Pembenihan Organisme Laut.* Yogyakarta: Kanisius.
- Jemal, M. 2000. High-Troughput Quantitative Bioanalysis by LC-MS/MS. *Biomedical Chromatography.* 14: 422-429.
- Kanwan, A.S. 2007. Brine Shrimp (*Artemia salina*) A Marine Animal for Simple and Rapid Biological Assays. *Journal of Chinese Clinical Medicine.* 2: 236-240.
- Kasal, A., Budesinsky, M., dan Griffiths, W.J. 2010. *Steroid Analysis.* UK:
- Karger, dkk., 1973. *An Introduction to Separation.* Brisbane: John and Sons.
- Karisma, M. G. 2012. Validasi Metode LC-MS/MS untuk Penentuan Senyawa Asam Trans, Trans-Mukonat, Asam Hippurat, Asam 2-Metil Hippurat, Asam 3-Metil Hippurat, Asam 4-Metil Hippurat Sebagai Biomarker Paparan Benzena, Toluena, dan Xilena. *Skripsi.* Depok: Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
- Kawaroe, M. 2008. Mikroalga sebagai Bahan Baku Biofuel. Surfactant and Bioenergy Research Centre, Lembaga Pengabdian Pada Masyarakat, Institut Pertanian Bogor.
- Khamidah, U., Fasya, A.G., dan Romaidi. 2014. “Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* pada fase stationer hasil kultivasi dalam medium ekstrak tauge (MET)”. *ALCHEMY: Journal of Chemistry,* Vol. 3 No. 1, Hal. 1-7
- Kristanti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M., dan Kurniadi, B. 2008. *Buku Ajar Fitokimia.* Surabaya: Airlangga University Press.

- Kristanti, A.V., Aminah, N.S., Tanjung, M., & Kurniadi, B. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Kumar, H.D. And H.N. Singh. 1976. *A Text Book on Algae*. London: Macmilan and Co Ltd.
- Kumar, S., Jyotirmayee, K., dan Sarangi M. 2013. Thin Layer Chromatographic: A Tool of Biotechnology for Isolation of Bioactive Compounds From Medicinal Plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 18(1).
- Kurniati, D.R. 2003. "Pemisahan Mikroalga dari Limbah Cair Industri Tapioka dengan Menggunakan Membran". *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Lade, B.D., Patil, A.S., Paikrao, H.M., Kale, A.S., dan Hire, K.K. 2014. A Comprehensive Working, Principles and Application of Thin Layer Chromatography. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*. 5(4).
- Lavens, P. dan Sorgeloos, P. 1987. The Cryptobiotic State of *Artemia* Cysts, Its Diapause Deactivation and Hatching: A Review. *Artemia Research and Its Application*. Volume 3.
- Lenny, S dan Zuhra, C. F. 2005. *Isolasi dan Uji Bioaktivitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah (Graptophyllum pictum L. Griff) dengan Metode Brine Shrimp*. *Jurnal Komunikasi Penelitian*, 17 (5): 56 - 59.
- Luthfia, N., dan Atun, S. 2018. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder pada Fraksi Etil Asetat Daun Mindi. *Jurnal Penelitian Sainstek* Volume 23 Nomor 2.
- Li, Y., et al. 2008. *Biotechnology Progress*. 24(4): 815-820.
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q, Dubois-calero, N. 2008. Biofuels from Microalgae. *Biothechnol*. 24.
- M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2018. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 01 November 2018.
- Maharsyah, T., Lutfi, M., dan Nugroho, W.A. 2013. Efektivitas Penambahan *Plant Growth Promoting Bacteria (Azospirillum sp.)* dalam Meningkatkan Pertumbuhan Mikroalga (*Chlorella sp.*) pada Media Limbah Cair Tahu Setelah Proses Anaerob. *Jurnal Keteknik Pertanian Tropis dan Biosistem*. 1(3): 258-264.
- Maia, R.S., Goncalves, A.L., Bernard, O., dan Bensalem, S. 2016. Influence of Temperature on *Chlorella vulgaris* Growth and Mortality Rates in a Photobioreactor. *Algal Research*. 18.
- Metting, B., dan Pyne, J. W. 1986. Biologically Active Compound from Microalgae. *Journal of Enzym Microb*. 8.

- Meyer, B.N., Ferrigni, Putnam, J.E. Jacobsen, L.B. Nichols dan McLaughlin. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*. 45: 31-34.
- Millati, Nuria. 2016. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella sp.* Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Mo, S., Dong, L., dan Hurst, W.J. 2013. Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Lipids* 48: 949-956.
- Mondal, M., Ghosh, A., Sharma, A.S., Tiwari, O.N., Gayen, K., Mandal, M.K., dan Halder., G.N. 2016. Mixotropic Cultivation og *Chlorella sp.* BTA 9031 and *Chlamydomonas sp.* BTA 9031 Isolated from Coal Field Using Various Carbon Sources for Biodiesel Production. *Energy Conversion and Management*. 124: 297-304.
- Munger, L.H., Boulos, S., Nystrom, L. 2018. UPLC-MS/MS Based Identification of Dietary Steryl Glucosides by Investigation of Corresponding Free Sterols. *Frontiers in Chemistry*. Volume 6: 1-19.
- Oktoba, Z., Moektiwardoyo, M., dan Mustarichie, R. 2019. Active Compound from n-Hexane Fraction of Rampai (*Lycopersicon esculentum*) Leaves Ethanol Extract. *IJPRS*. 10(5): 2537-2544.
- Oswaldo, Z.S., Panca, P.S., Faizal, M. 2012. Pengaruh Konsentrasi Asam dan Waktu pada Proses Hidrolisis dan Fermentasi Pembuatan Bioetanol dari Alang-alang. *Jurnal Teknik Kimia*. Volume 18 Nomor 2.
- Prihantini, N. B., Putri B., dan Yuliati R. 2005. Pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam Media Ekstrak Tauge (MET) dengan variasi pH Awal. *Jurnal Makara Sains*, Vol. 9 No. 1 p. 1-6.
- Prihantini, N. B., Damayani, D., dan Yuniati, R. pengaruh Konsentrasi Medium Ekstrak Tauge (MET) terhadap Pertumbuhan *Scenedesmus* Isolat Subang. *MAKARA SAINS*. 11(1): 1-9.
- Qorthubi, S. I. 2009. *Tafsir Al Qurthubi*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Rafaelina, M., Yoswita R., dan Sri Amjni. 2016. "Pertumbuhan dan Aktifitas Antioksidan dari Mikroalga *Porphyridiuim cruentum* dan *Chlorella sp.*". *BIOMA Vol, 12 No. 1, Hal. 12*
- Richmond, A.E.. 1986. *Microalga Culture*. Tokyo: CRC Press.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: ITB.
- Rocha, R.P., Melo, E.C., dan Radunz, L.L. 2011. Influence of Drying Process on The Quality of Medical Plants: A Review. *Academic journal*. Volume 5(33).

- Rohman, A. dan Gandjar, I.G. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka belajar.
- Roshanak, S., Rahimmalek, M., dan Goli, S.A.H. 2016. Evaluation of Seven Different Drying Treatment in Respect to Total Flavonoid, Phenolic, Vitami C Content, Chlorophyll, Antioxidant Activity and Color of Green Tea (*Camellia sinensis* or *assamica*) leaves. *Journal of Food Sci Technology*. 53(1).
- Sachlan, M.. 1982. *Planktonologi*. Semarang: Fakultas Peternakan dan Perikanan Universitas Diponegoro.
- Saifudin, dkk., 2006. Biotransformasi Kurkumin Melalui Kultur Suspensi Sel Daun *Catharanthus roseus* [L] G,Don Berbunga Merah. *Skripsi*.surakarta: Universitas Muhammadiyah.
- Salempa, P., dan Muharram. 2016. *Senyawa Steroid dalam Tumbuhan Bayur*. Makassar: Badan Penerbit Universitas Negeri Makassar.
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an Vol. 11 dan 12*. Jakarta: Penerbit Lentera Hati.
- Santosa, C. M., dan Hertiani, T. 2005. Kandungan Senyawa Kimia dan Efek Ekstrak Air Daun Bangun-Bangun (*Coleus amboinicus* L.) Pada Aktivitas Fagositosis Netrofil Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Majalah Farmasi Indonesia*. 16(3): 141-148.
- Sastrohamidjojo, H. 2007. *Kromatografi*. Yogyakarta: Liberty.
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an Vol. 11 dan 12*. Jakarta: Penerbit Lentera Hati.
- Simanjuntak, P. 1988. *Metode Isolasi dan Pemurnian Ekstrak Air dari Tumbuhan*.
- Silva, G.O.D., Abeysundara, A.T., dan Aponso, M.W.A. extraction Method Qualitative and Quantitative Techniques for Screening of Phytochemical from Plants. *American journal of Essential Oils and Nature Products*. 5(2).
- Sorgeloos, p. 1973. First Report on The Triggering of Light on The Hatching Mechanism of *Artemia salina* Dry Cysts. *Marine Biology*.
- Suhartati, T. 2014. *Dasar-dasar Spektrofotometri Uv-Vis dan Spektrometri Massa untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Lampung: AURA.
- Syofiyah, M., Fasya, A. G., dan Ningsih R. 2016. Uji Toksisitas Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Metode BSLT dan Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer FTIR. *ALCHEMY Journal of Chemistry*.
- Triyati, E. 1985. Spektrofotometer Ultra-Violet dan Sinar Tampak Serta Aplikasinya dalam Oseanologi. *Oseana*. Volume X Nomor 1: 39-47.

- Tulung, P.C., Rorong, J.A., dan Pontoh, J. 2017. Analisis Fitokimia dan Uji Toksisitas dari Kulit atang Kersen (*Muntingia calabura*). *Chem Prog* 10(1): 15-19.
- Utami, N.P., Suherman, Y.M., dan Haetami, K. 2012. Pertumbuhan *Chlorella sp.* yang Dikultur pada Perioditas Cahaya yang Berbeda. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. Volume 3 Nomor 3.
- Vongsak, B., Sithisarn, P. Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., dan Gritsanapan, W. 2013. Maximizing Total Phenolic, Total Flavonoid Contents and Antioxidant Activity of *Mongira oleifera* Leaf Extract by The Appropriate Extraction Method. *Industrial Crops and Products*. 44.
- Vanhaecke, P., Persoone, G., Claus C., Sorgeloos, P. 1981. Proposal for Short-Time Toxicity Test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicol Env Safety*. 5:382-387.
- Wilbraham, A.C. dan Matta, M.S. 1992. *Pengantar Kimia Organik dan Hayati*. Bandung: Penerbit ITB.
- Wulandari, A. P., Naderia, F., Pattalia, A. E. dan Permata, D. R. 2010. Identifikasi Mikroalgae di Sekitar Pantai Pangandaran dan Potensi Pertumbuhannya pada Formulasi Medium Ekstrak Tauge (MET). Prosiding Seminar Nasional Limnologi V Tahun 2010. Jatinangor: Jurusan Biologi FMIPA Universitas Padjadjaran. 535-542.
- Xiong, Q., Wilson, W.K., dan Pang, J. 2007. The Liebermann-Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangment of Cholestrol in Acid. *Lipids*. 42.

LAMPIRAN

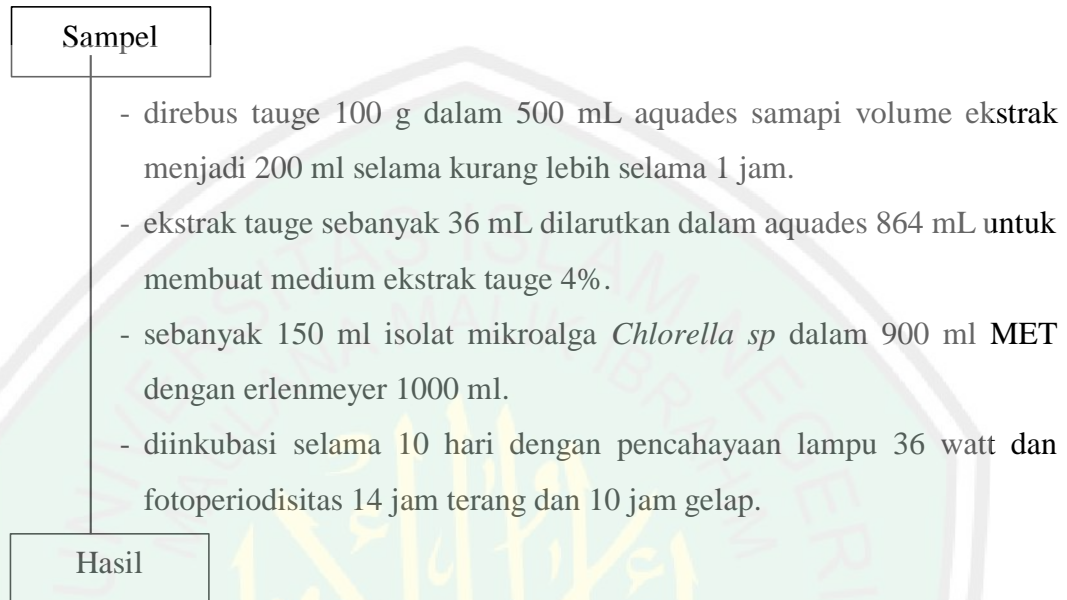
Lampiran 1. Rancangan Penelitian



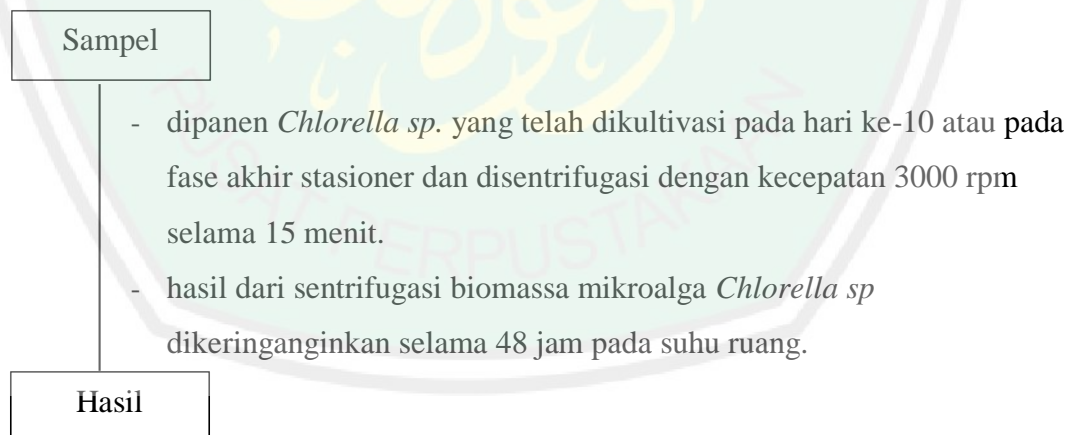
Lampiran 2. Skema kerja

L.2.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

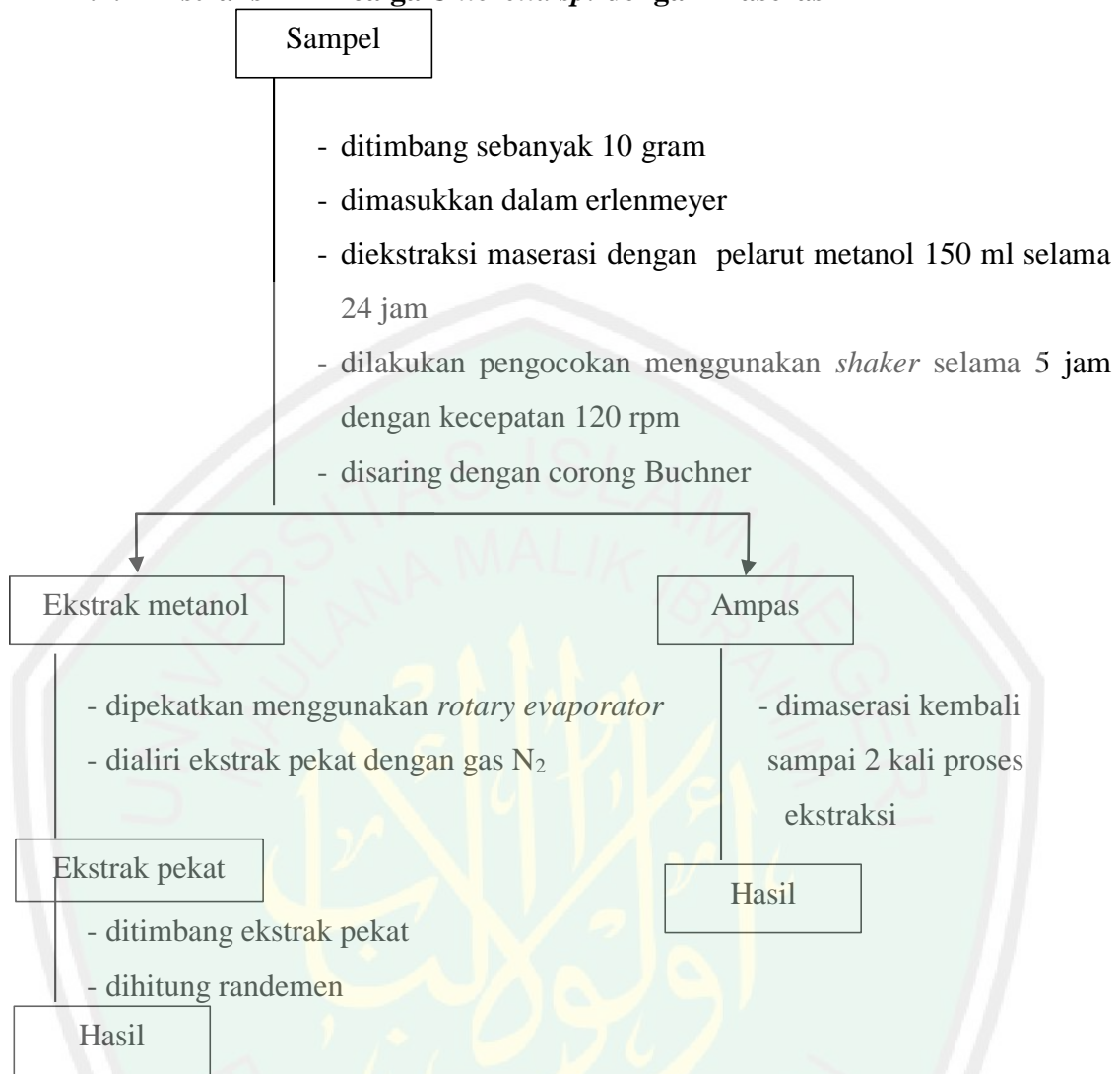
L.2.1.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella Sp* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%



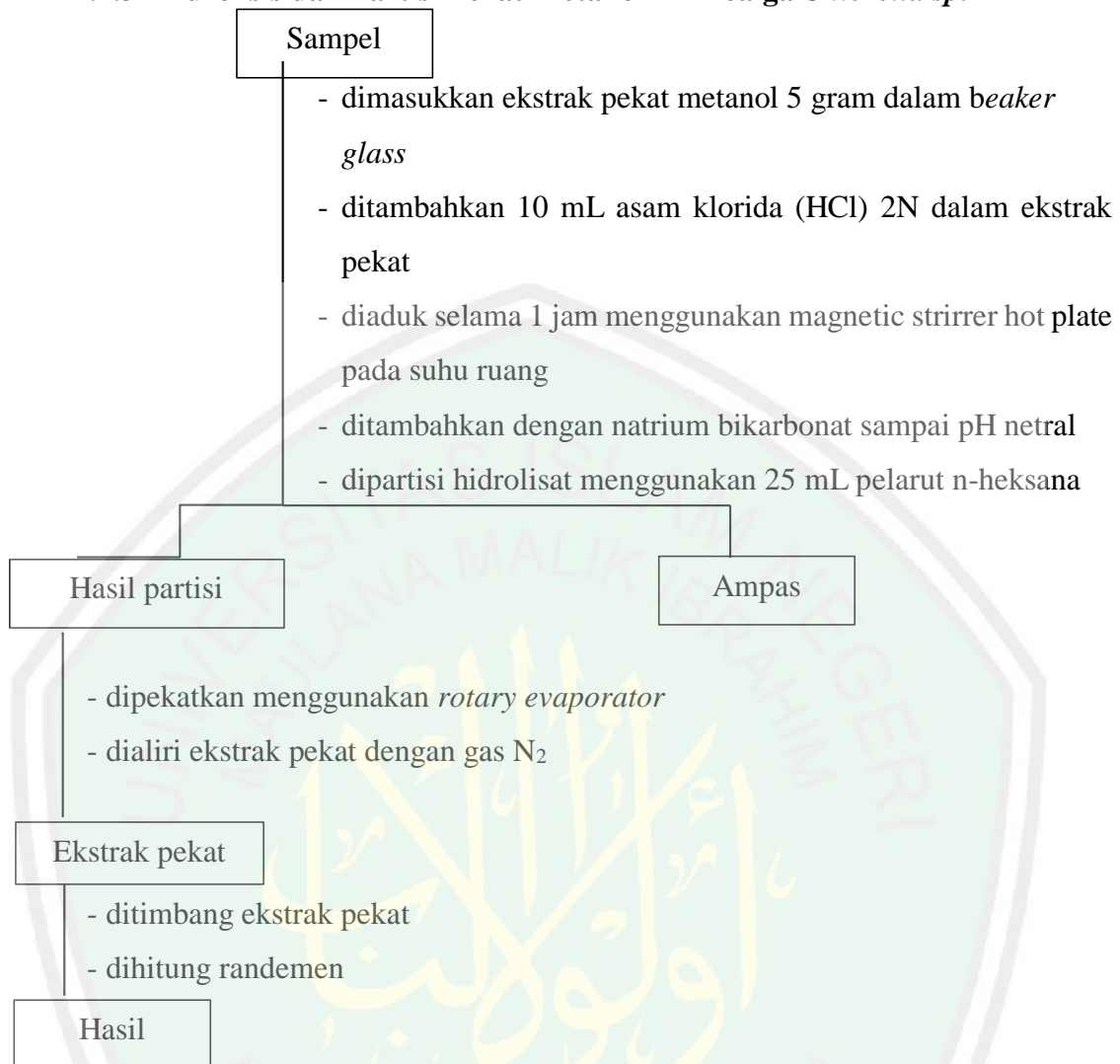
L.2.1.2 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*



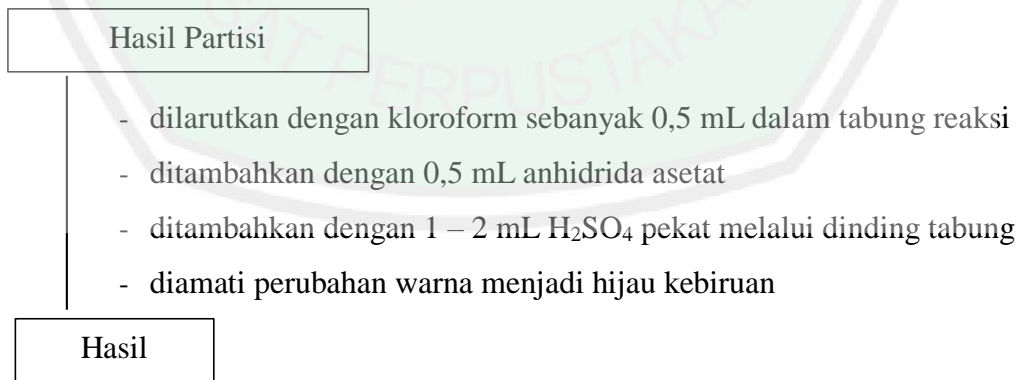
L.2.2 Ekstraksi Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Maserasi



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



L.2.4 Uji Fitokimia Senyawa Steroid



L.2.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)

Ekstrak Partisi

- dipanaskan plat dalam oven selama 30 menit pada suhu 60-80°C
- dipotong masing-masing plat 1 X 10 cm
- ditotolkan ekstrak *Chlorella sp.* pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat silika GF₂₅₄ dengan pipa kapiler 3-5 penotolan
- dikeringkan dan dielusikan dengan n-heksana : etil asetat (4,75:0,25); (4,50:0,50); (4,25:0,75); (0,40:1,0); (3,75:1,25); dan (3,50:1,5)
- dihentikan setelah gerakan larutan pengembang samapi pada garis batas elusi dan dikeringkan plat hasil elusi
- dideteksi dengan menyemprotkan Lieberman Buchard (LB) dibawah sinar lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm
- ditandai noda yang telah terlihat
- ditentukan nilai R_f
- ditentukan eluen terbaik

Hasil

L.2.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Ekstrak Partisi

- dipotong masing-masing plat 10 X 20 cm
- ditotolkan pada jatak kurang lebih 1 cm dari tepi bawah plat silika GF₂₅₄ dengan pipa kapiler 5-10 penotolan
- dikeringkan dan dielusikan dengan eluen terbaik n-heksana : etil asetat
- dihentikan setelah gerakan larutan pengembang samapi pada garis batas elusi dan dikeringkan plat hasil elusi
- dideteksi dibawah sinar lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm
- ditandai noda yang telah terlihat
- dikerok hasil noda yang diperoleh dan dilarutkan dalam pelarut n-heksana kemudian sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm
- diuapkan pelarunya sampai habis menguap sehingga diperoleh isolat pekat dari noda

Hasil

L.2.7 Uji Toksisitas Senyawa Steroid Terhadap Larva Udang *Artemia salina*

L.2.7.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina* Leach

Telur larva udang

- dimasukkan 250 mL air laut dalam wadah penetasan
- dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina* L.
- diaerasi
- ditunggu telur sampai menetas dalam waktu \pm 48 jam

Hasil

L.2.7.2 Uji Toksisitas dengan Metode BSLT

Isolat steroid

- ditimbang 2,5 mg
- dilarutkan dengan eluen sampai 5 mL
- dipipet larutan stok 500 ppm sebanyak 10 μ L; 20 μ L; 30 μ L; 40 μ L; dan 50 μ L
- dimasukkan kedalam botol vial
- diuapkan pelarutnya
- ditambahkan 50 μ L DMSO
- ditambahkan setetes larutan ragi
- ditambahkan 2 mL air laut
- dikocok
- dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L.
- ditambahkan air laut hingga 5 mL
- diamati dibawah lampu pijar selama 24 jam

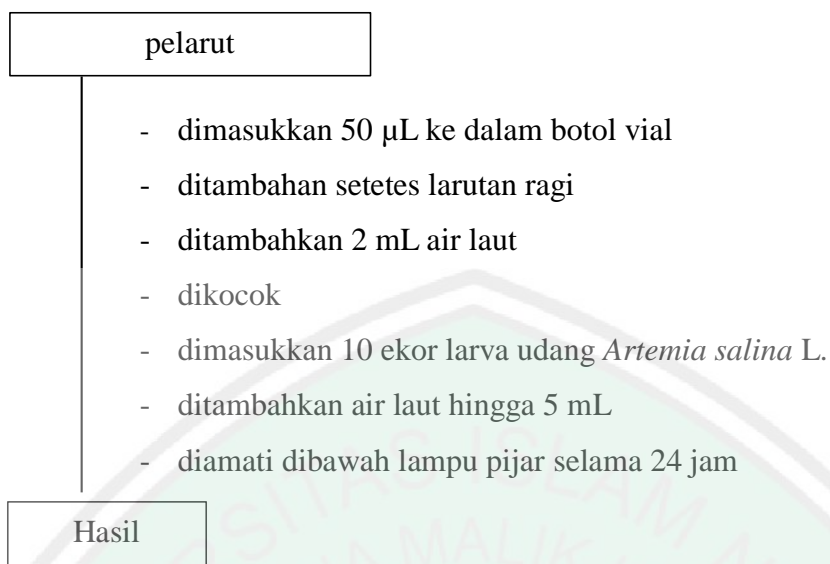
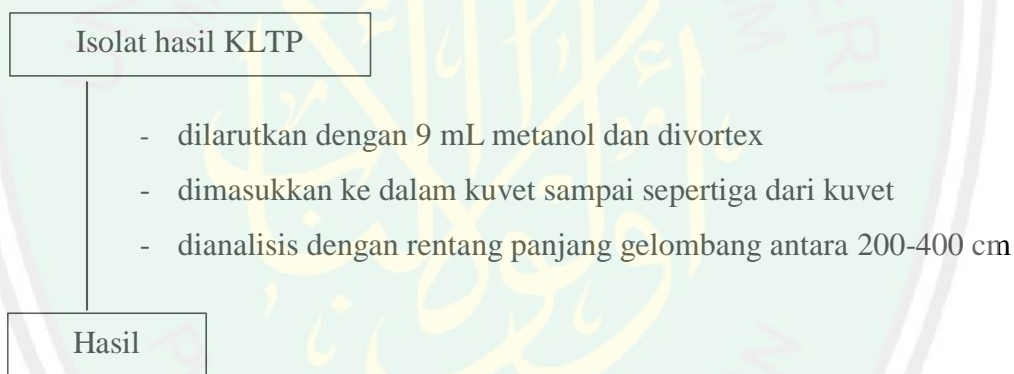
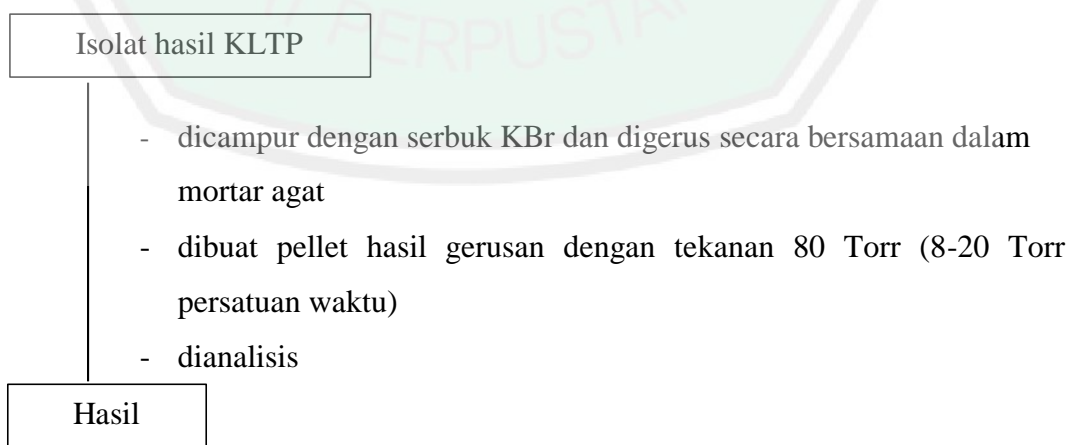
Hasil

a. Kontrol DMSO

DMSO

- dimasukkan 50 μ L ke dalam botol vial
- ditambahkan setetes larutan ragi
- ditambahkan 2 mL air laut
- dikocok
- dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L.
- ditambahkan air laut hingga 5 mL
- diamati dibawah lampu pijar selama 24 jam

Hasil

b. Kontrol Pelarut**L.2.8 Identifikasi Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis****L.2.9 Identifikasi Steroid Menggunakan FTIR**

L.2.10 Identifikasi Steroid Menggunakan LC-MS



Kolom : Spesifikasi *hypersil gold* (50 mm x 2.1 mm x 1,9 μm).

Alat : UHPLC merk *ACCELLA type 1250* buatan *Thermo Scientific* yang terdiri dari :*degasser* vakum, pompa *quartener*, *autosampler* thermostatik yang dikendalikan oleh computer melalui program *x-calibur 2.1*.

Fasa gerak : 0,1 % asam format dalam air (fasa A) dan 0,1 % asam format dalam asetonitril (fase B).

Laju alir : 300 $\mu\text{L}/\text{menit}$.

Volume injeksi : 2 μL

MS :MS/MS triple Q (*Quadrupole*) spektrometer massa TSQ QUANTUM ACCESS MAX dari Thermo Finnigan

Sumber ionisasi :APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) dikendalikan oleh software TSQ Tune yang dikendalikan dengan mode positif.

Kondisi ion APCI adalah sebagai berikut: Arus yang digunakan 4 μA , Suhu penguapan 250°C, Suhu kapiler 300°C, sheat gas pressure 45 arbitrary units, dan Aux gas pressure 15 arbitrary units.

Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan

L.3.1 Kultivasi *Chlorella* sp. dalam MET

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

L.3.1.1 Kultivasi dalam Erlenmeyer 1000 mL dengan Memaksimalkan Daya

Tampung Erlenmeyer

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

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

$$x = \frac{9000 \text{ mL}}{60} = 150 \text{ mL isolat } Chlorella \text{ sp.}$$

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

L.3.1.2 Pembuatan MET 4% Sebanyak 900 mL

MET = (aquades + ekstrak tauge)

$$\text{MET } 4\% = \frac{4}{100} \times 900 \text{ mL} = 36 \text{ mL ekstrak tauge}$$

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

L.3.1.3 Kultivasi dalam Erlenmeyer 1500 mL dengan Memaksimalkan Daya

Tampung Erlenmeyer

$$\frac{10}{60} = \frac{x}{1200 \text{ ml MET } 4\%}$$

$$60 x = 12000 \text{ ml}$$

$$x = \frac{12000 \text{ ml}}{60} = 200 \text{ mL isolat } Chlorella \text{ sp.}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume total} &= \text{isolat } Chlorella \text{ sp} + \text{MET } 4\% \\ &= 200 \text{ mL} + 1200 \text{ mL} \\ &= 1400 \text{ mL} \end{aligned}$$

L.3.1.4 Pembuatan MET 4% Sebanyak 1200 mL

MET = (aquades + ekstrak taugé)

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

$$= 48 \text{ mL ekstrak taugé}$$

Volume aquades = MET 4% – (volume ekstrak taugé)

$$= 1200 \text{ mL} - 48 \text{ mL} = 1152 \text{ mL}$$

L.3.2 Pembuatan Larutan HCl 2 N

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

Konsentrasi = 37%

BM HCl = 36,42 g/mol

n = 1 (jumlah mol ion H⁺)

Normalitas HCl = n × Molaritas HCl

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

$$= \frac{0,37 \times 1190 \text{ g/L}}{36,42 \text{ g/mol}}$$

$$= 12,09 \text{ N}$$

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

$$12,09 \text{ N} \times V_1 = 2 \text{ N} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 1,65 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah dengan diambil larutan HCl pekat 37% sebanyak 1,65 mL, kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml yang berisi ± 5 ml aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.3 Pembuatan Larutan Senyawa Steroid untuk Uji Toksisitas

L.3.3.1 Pembuatan Larutan Stok 100 ppm

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

$$\text{ppm} = \frac{1,6 \text{ mg}}{0,01 \text{ L}}$$

$$\text{ppm} = 160 \text{ ppm}$$

$$\text{ppm}_1 \times V_1 = \text{ppm}_2 \times V_2$$

$$160 \text{ ppm} \times V_1 = 100 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 3,125 \text{ mL}$$

L.3.3.2 Pembuatan Larutan Steroid 1,2,3,4, dan 5 ppm

a. 1 ppm

$$\text{ppm}_1 \times V_1 = \text{ppm}_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 1 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 50 \mu\text{L}$$

b. 2 ppm

$$\text{ppm}_1 \times V_1 = \text{ppm}_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 2 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 100 \mu\text{L}$$

c. 3 ppm

$$\text{ppm}_1 \times V_1 = \text{ppm}_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 3 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 150 \mu\text{L}$$

d. 4 ppm

$$\text{ppm}_1 \times V_1 = \text{ppm}_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 4 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 200 \mu\text{L}$$

e. 5 ppm

$$\text{ppm}_1 \times V_1 = \text{ppm}_2 \times V_2$$

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 5 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 250 \mu\text{L}$$

Lampiran 4. Perhitungan Rendemen

L.4.1 Perhitungan Preparasi Sampel

Tabel L.4.1 Rata-rata berat basah dan berat kering biomassa mikroalga *Chlorella sp.*

No.	Berat wadah kosong (g)	Berat wadah + <i>Chlorella sp.</i> Basah (g)	Berat <i>Chlorella sp.</i> Basah (g)	Berat <i>Chlorella sp.</i> kering (g)
1.	42,42	129,15	86,73	1,22
2.	42,39	119,03	76,64	2,2
3.	42,38	136,59	94,21	1,29
4.	42,41	119,19	76,78	0,92
5.	42,41	186,77	144,36	1,21
6.	42,39	122,24	79,85	0,57
7.	42,46	384,93	342,47	1,78
8.	42,47	192,64	150,17	1,12
Total			1051,21	10,31

$$\begin{aligned} \% \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat kering}}{\text{Berat basah}} \times 100\% \\ &= \frac{10,31 \text{ gram}}{1051,21 \text{ gram}} \times 100\% = 0,9808\% \end{aligned}$$

L.4.2 Rendemen Hasil Maserasi

Tabel L.4.2 Berat ekstrak pekat hasil maserasi

Berat sampel (gr)	Berat wadah (gr)	Berat wadah + ekstrak pekat (gr)	Berat ekstrak pekat (gr)
10,31	126,9	130,58	3,68

$$\begin{aligned} \% \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak kasar}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{3,68 \text{ gram}}{10,31 \text{ gram}} \times 100\% = 35,69\% \end{aligned}$$

L.4.3 Rendemen Hasil Hidrolisi dan Partisi

Tabel L.4.3 Berat fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella sp.*

Berat ekstrak methanol yang dihidrolisis (gr)	Berat wadah (gr)	Berat sampel + wadah (gr)	Berat fraksi n-heksana (gr)
3,24	162,84	163,90	1,06

$$\begin{aligned}\% \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat fraksi n-heksana}}{\text{Berat ekstrak metanol}} \times 100\% \\ &= \frac{1,06 \text{ gram}}{3,24 \text{ gram}} \times 100\% = 32,72\%\end{aligned}$$














Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian





L.5.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%

			
Tauge kacang hijau	Perebusan tauge	Ekstrak tauge pekat	MET 4%



L.5.2 Kultivasi Mikroalga *Chlorella* sp.

					
Hari ke-0	Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3	Hari ke-4	Hari ke-5
					
Hari ke-6	Hari ke-7	Hari ke-8	Hari ke-9	Hari ke-10	

L.5.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella* sp.

			
Biomassa <i>Chlorella</i> sp.	Biomassa sebelum disentrifuge	Biomassa setelah disentrifuge	Biomassa hasil sentrifuge



L.5.4 Preparasi Mikroalga *Chlorella* sp.

	
Pengeringan biomassa <i>Chlorella</i> sp.	Biomassa kering setelah dikerok




L.5.5 Ekstraksi Maserasi

			
Perendaman sampel dalam metanol	Pengadukan dengan shaker	Penyaringan ekstrak	Ekstrak metanol Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.
			
	Ekstrak metanol hasil rotary evaporator	Ekstrak pekat setelah diberi gas N ₂	

L.5.6 Hidrolisis





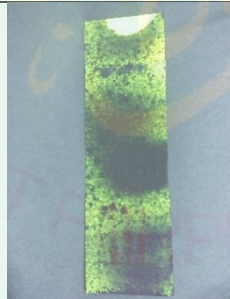

	
Proses hidrolisis ekstrak dengan HCl 2 N dan distirer	Penetralan dengan NaHCO ₃ dan pengecekan pH 7

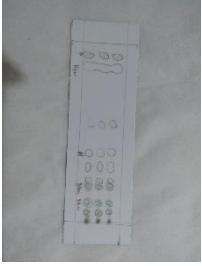


L.5.7 Partisi dengan n-Heksan

		
Proses partisi ekstrak hasil hidrolisis	Pemisahan fase organik dan fase air	Ekstrak pekat hasil partisi




L.5.8 Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)




L.5.8.1 Variasi eluen (4,50:0,50)

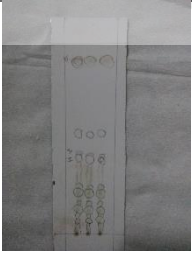
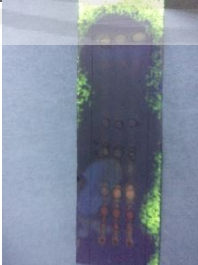
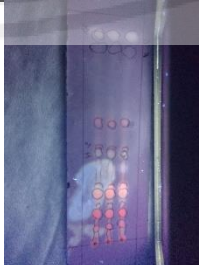
		
visual sebelum disemprot LB	UV 256 nm sebelum di LB	UV 366 nm sebelum di LB
		
visual seetelah disemprot LB	UV 256 nm setelah di LB	UV 366 nm setelah di LB

		
visual setelah di LB dan pemanasan	UV 256 nm setelah di LB dan pemanasan	UV 366 nm setelah di LB dan pemanasan


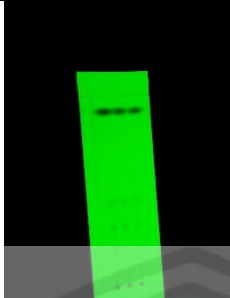

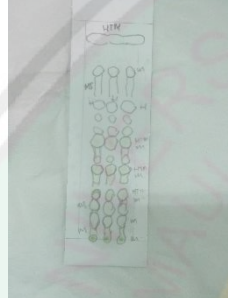

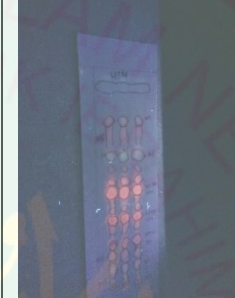
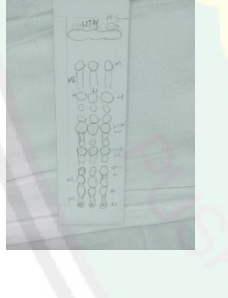


L.5.8.2 Variasi Eluen (4,25:0,75)

		
visual sebelum disemprot LB	UV 256 nm sebelum di LB	UV 366 nm sebelum di LB


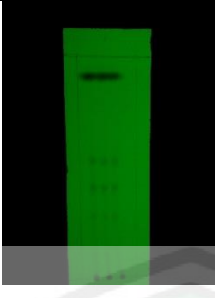

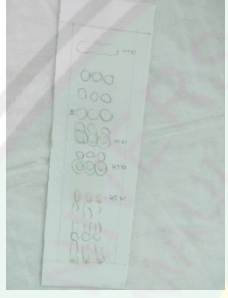


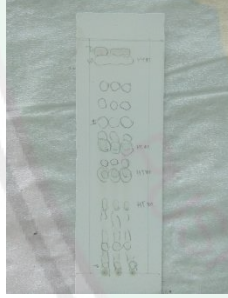

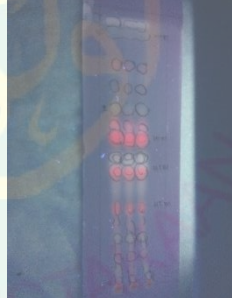
		
visual seetelah disemprot LB	UV 256 nm setelah di LB	UV 366 nm setelah di LB

		
visual setelah di LB dan pemanasan	UV 256 nm setelah di LB dan pemanasan	UV 366 nm setelah di LB dan pemanasan


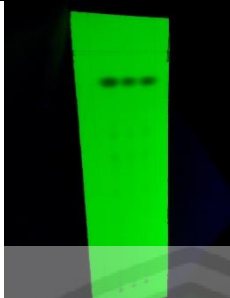
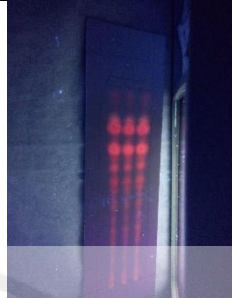
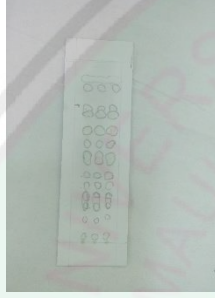
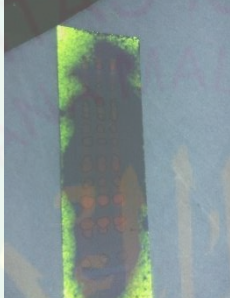
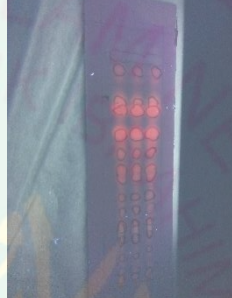
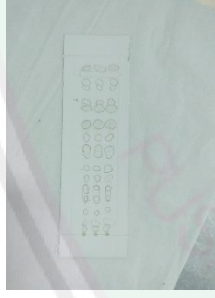
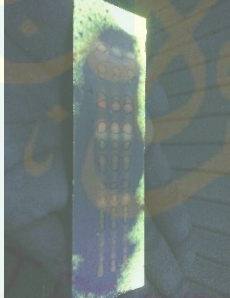

L.5.8.3 Variasi Eluen (4:1)

		
visual sebelum disemprot LB	UV 256 nm sebelum di LB	UV 366 nm sebelum di LB
		
visual setelah disemprot LB	UV 256 nm setelah di LB	UV 366 nm setelah di LB
		
visual setelah di LB dan pemanasan	UV 256 nm setelah di LB dan pemanasan	UV 366 nm setelah di LB dan pemanasan

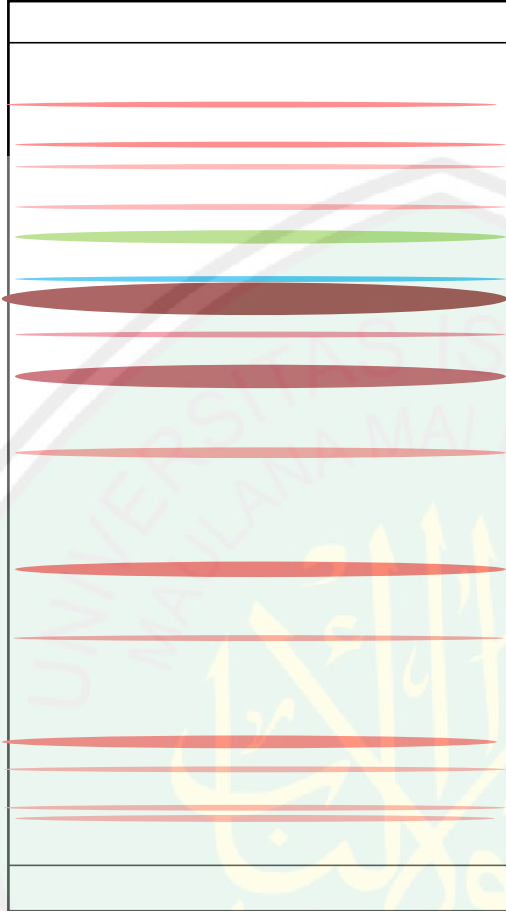

L.5.8.4 Variasi Eluen (3,75:1,25)

		
visual sebelum disemprot LB	UV 256 nm sebelum di LB	UV 366 nm sebelum di LB
		
visual setelah disemprot LB	UV 256 nm setelah di LB	UV 366 nm setelah di LB
		
visual setelah di LB dan pemanasan	UV 256 nm setelah di LB dan pemanasan	UV 366 nm setelah di LB dan pemanasan



L.5.8.5 Variasi Eluen (3,50;1,50)

		
visual sebelum disemprot LB	UV 256 nm sebelum di LB	UV 366 nm sebelum di LB
		
visual setelah disemprot LB	UV 256 nm setelah di LB	UV 366 nm setelah di LB
		
visual setelah di LB dan pemanasan	UV 256 nm setelah di LB dan pemanasan	UV 366 nm setelah di LB dan pemanasan

L.5.9 Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Gambar Ilustrasi	Gambar visual
	

L.5.10 Uji Toksisitas

	
Penetasan Larva Udang	Uji toksisitas isolat steroid

Lampiran 6 Data Uji Toksisitas

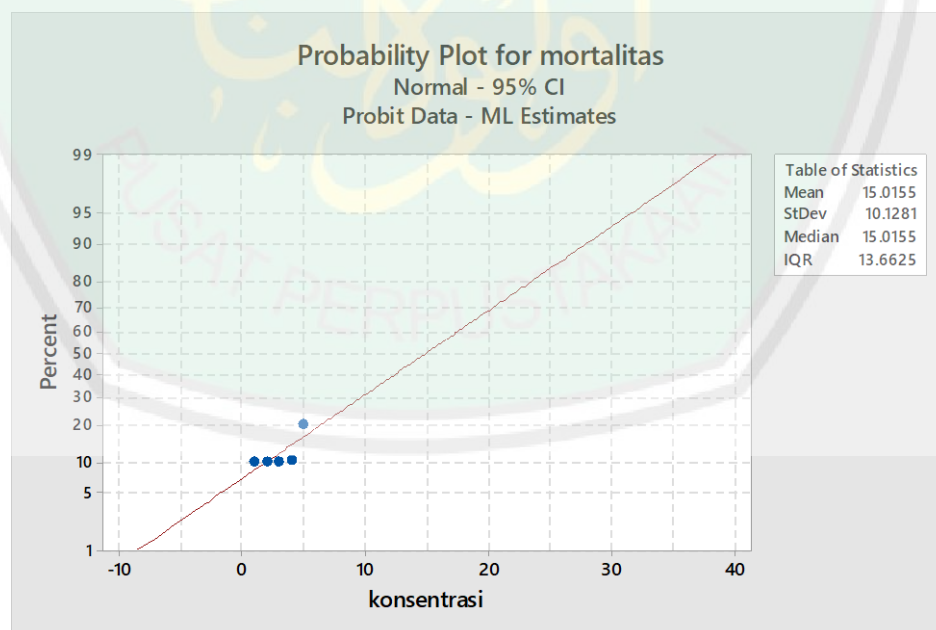
L.6.1 Fraksi n-Heksana Mikroalga *Chlorella sp.*

Tabel L.6.1 Persentase mortalitas *Artemia salina* terhadap fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella sp.*

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati					MODUS	% mortalitas
	I	II	III	IV	V		
1	1	2	1	1	1	1	10
2	0	1	1	1	0	1	10
3	0	1	0	1	1	1	10
4	0	1	1	1	0	1	10
5	1	2	2	0	1	2	20

Tabel L.6.2 Nilai mortalitas *Artemia salina* terhadap fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella sp.*

konsentrasi	N	mortalitas
1	50	5
2	50	5
3	50	5
4	50	5
5	50	10



Gambar L.6.1 Kurva mortalitas *Artemia salina* terhadap fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella sp.* dengan $LC_{50} = 15,0155$ ppm

Probit Analysis: mortalitas, N versus konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas	Event	30
	Non-event	220
N	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1.48257	0.253249	-5.85	0.000
konsentrasi	0.0987356	0.0727664	1.36	0.175

Natural

Response 0

Log-Likelihood = -90.800

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	1.50602	3	0.681
Deviance	1.52741	3	0.676

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	15.0155	8.78682	-2.20632	32.2374
StDev	10.1281	7.46420	2.38894	42.9385

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-8.54586	8.70312	*	*
2	-5.78497	6.68761	*	*
3	-4.03326	5.41630	*	*
4	-2.71553	4.46738	*	*
5	-1.64365	3.70402	*	*
6	-0.731315	3.06491	*	*

7	0.0686252	2.51882	*	*
8	0.784876	2.05040	*	*
9	1.43628	1.65574	*	*
10	2.03589	1.34258	*	*
20	6.49153	2.65692	*	*
30	9.70436	4.92254	*	*
40	12.4496	6.91290	*	*
50	15.0155	8.78682	*	*
60	17.5814	10.6668	*	*
70	20.3267	12.6818	*	*
80	23.5395	15.0428	*	*
90	27.9952	18.3200	*	*
91	28.5948	18.7612	*	*
92	29.2462	19.2405	*	*
93	29.9624	19.7676	*	*
94	30.7624	20.3564	*	*
95	31.6747	21.0279	*	*
96	32.7466	21.8169	*	*
97	34.0643	22.7870	*	*
98	35.8160	24.0766	*	*
99	38.5769	26.1096	*	*

Probability Plot for mortalitas

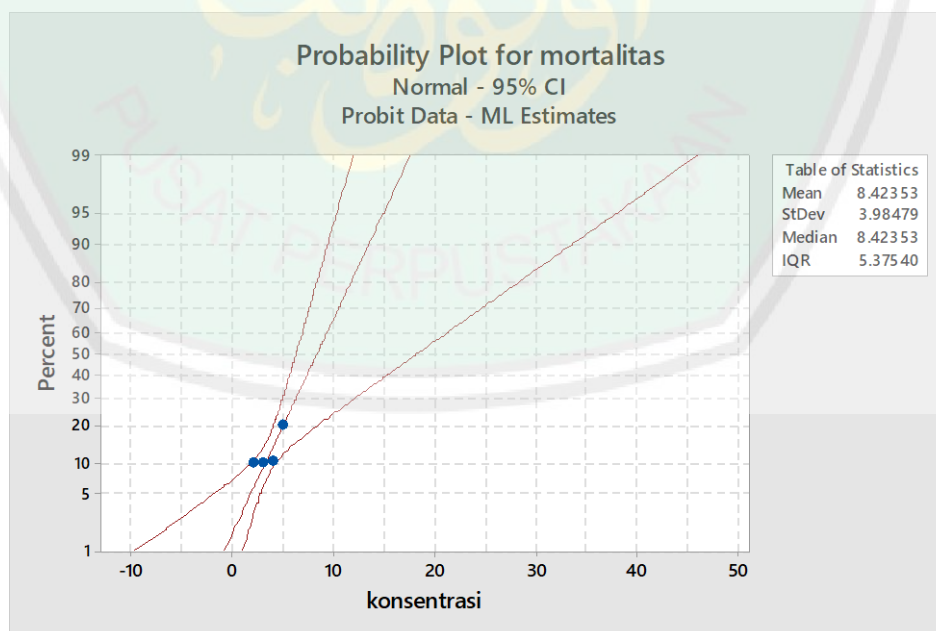
L.6.2 Isolat Steroid Hasil KLTP Mikroalga *Chlorella sp.*

Tabel L.6.3 Persentase mortalitas *Artemia salina* terhadap isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.*

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati					MODUS	% mortalitas
	I	II	III	IV	V		
Pelarut	0	0	0	0	0	0	0
DMSO	0	0	0	0	0	0	0
Blanko	0	0	0	0	0	0	0
1	2	0	0	1	1	1	10
2	2	1	0	0	1	1	10
3	1	0	3	1	0	1	10
4	2	1	2	1	0	2	20
5	1	2	0	1	2	2	20

Tabel L.6.4 Nilai mortalitas *Artemia salina* terhadap isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.*

konsentrasi	N	mortalitas
1	50	5
2	50	5
3	50	5
4	50	10
5	50	10



Gambar L.6.2 Kurva mortalitas *Artemia salina* terhadap isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* dengan $LC_{50} = 8,42353$ ppm

Probit Analysis: mortalitas, N versus konsentrasi
 Distribution: Normal
 Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	25
	Non-event	225
N	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood
 Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-2.11392	0.319625	-6.61	0.000
konsentrasi	0.250954	0.0853619	2.94	0.003

Natural

Response 0
 Log-Likelihood = -76.549

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	4.35256	3	0.226
Deviance	5.53363	3	0.137

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	8.42353	1.73046	5.03188	11.8152
StDev	3.98479	1.35542	2.04583	7.76140

Table of Percentiles

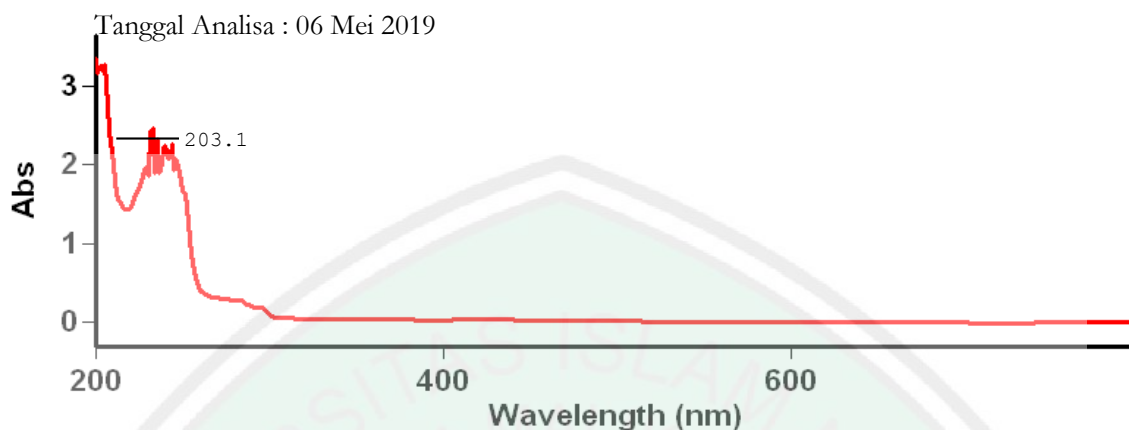
Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-0.846475	1.54665	-9.68512	1.02499
2	0.239774	1.19757	-6.46779	1.71827
3	0.928964	0.983850	-4.44324	2.17488
4	1.44741	0.830474	-2.93702	2.53514
5	1.86913	0.713586	-1.73085	2.84721
6	2.22808	0.622904	-0.727306	3.13592
7	2.54281	0.553422	0.123479	3.41820

8	2.82461	0.502536	0.848072	3.70812
9	3.08090	0.468648	1.46063	4.01822
10	3.31682	0.450300	1.97016	4.35801
20	5.06984	0.693465	4.10892	8.53035
30	6.33390	1.05957	5.00671	12.1833
40	7.41399	1.40144	5.70724	15.3712
50	8.42353	1.73046	6.34194	18.3710
60	9.43306	2.06417	6.96700	21.3803
70	10.5131	2.42419	7.62968	24.6061
80	11.7772	2.84793	8.40044	28.3861
90	13.5302	3.43815	9.46424	33.6334
91	13.7661	3.51773	9.60709	34.3398
92	14.0224	3.60422	9.76221	35.1074
93	14.3042	3.69936	9.93270	35.9514
94	14.6190	3.80566	10.1230	36.8941
95	14.9779	3.92694	10.3400	37.9694
96	15.3996	4.06949	10.5948	39.2329
97	15.9181	4.24483	10.9079	40.7863
98	16.6073	4.47803	11.3238	42.8515
99	17.6935	4.84582	11.9789	46.1071

Probability Plot for mortalitas

Lampiran 7 Panjang Gelombang Maksimal Isolat Steroid

Lamdha Maks Isolat Mikroalga



Gambar L.7.1 Panjang gelombang maksimal isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan spektrofotometer UV-Vis

Scan Analysis Report

Report Time : Mon 06 May 02:23:27 PM 2019

Method:

Batch: D:\Firda\Lamdha Maks Isolat Mikroalga (06-05-2019).DSW

Software version: 3.00 (339)

Operator: Rika

Sample Name: Isolat Mikroalga

Collection Time 5/6/2019 2:23:33 PM

Peak Table

Peak Style

Peak Threshold

Range

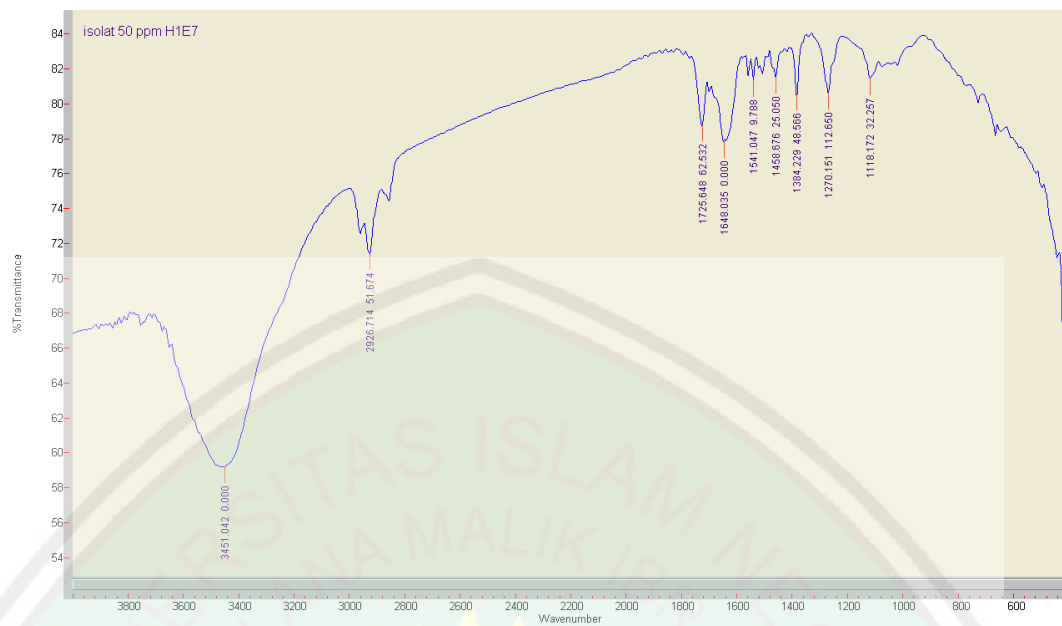
Peaks

0.0100

800.0nm to 199.9nm

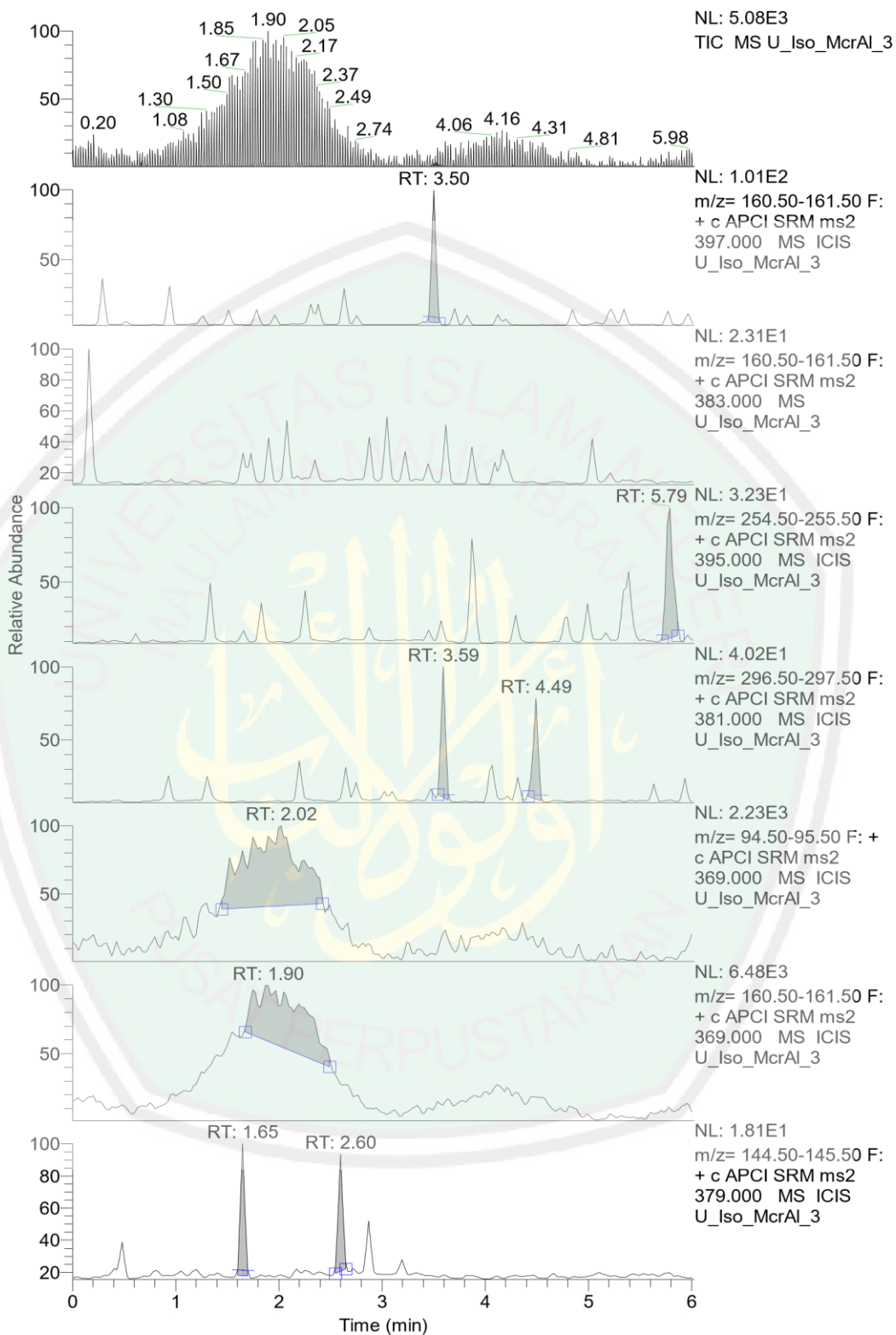
Wavelength (nm)	Abs
246.0	2.051
244.0	2.258
239.9	2.243
235.1	2.318
233.0	2.460
231.0	2.421
229.0	1.967
205.0	3.263
203.1	3.249

Lampiran 8 Hasil Spektra Infrared



Gambar L.8.1 Spektrum IR isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.*

Lampiran 9 Kromatogram LC-MS/MS Isolat Steroid Hasil KLTP



Gambar L.9.1 Kromatogram LC-MS/MS isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.*