

**TOKSISITAS SENYAWA STEROID HASIL PEMISAHAN METODE
KLTP FRAKSI *n*-BUTANOL MIKROALGA *Chlorella* sp.**

SKRIPSI

Oleh:
HASAN ALI MAHBUBI
NIM 16630062



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**TOKSISITAS SENYAWA STEROID HASIL PEMISAHAN METODE
KLTP FRAKSI *n*-BUTANOL MIKROALGA *Chlorella* sp.**

SKRIPSI

Oleh:
HASAN ALI MAHBUBI
NIM. 16630062

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
2020**

**TOKSISITAS SENYAWA STEROID HASIL PEMISAHAN METODE
KLTP FRAKSI *n*-BUTANOL MIKROALGA *Chlorella* sp.**

SKRIPSI

Oleh:
HASAN ALI MAHBUBI
NIM. 16630062

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 10 Desember 2020

1. Pembimbing I : A. Ghanaim Fasya, M.Si
NIP. 19820616 200604 1 002
2. Pembimbing II : Oky Bagas Prasetyo, M.Si
NIDT. 19890113 20180201 1 244



Mengetahui,
Ketua Jurusan



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

**TOKSISITAS SENYAWA STEROID HASIL PEMISAHAN METODE
KLTP FRAKSI *n*-BUTANOL MIKROALGA *Chlorella* sp.**

SKRIPSI


Oleh:
HASAN ALI MAHBUBI
NIM. 16630062

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 28 Desember 2020

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

(.....)

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

(.....)

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

(.....)

Anggota Penguji : Oky Bagas Prasetyo, M.Si
NIDT. 19890113 20180201 1 244

(.....)

**Mengesahkan,
Ketua Jurusan**


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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Hasan Ali Mahbubi
NIM : 16630062
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Toksisitas Senyawa Steroid Hasil Pemisahan Metode Kltp
Fraksi *n*-butanol Mikroalga *Chlorella* Sp.

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

Malang, 25 Desember 2020

Yang membuat pernyataan,



Hasan Ali Mahbubi
NIM. 16630062

HALAMAN PERSEMBAHAN

Dengan bacaan alhamdulillah robbil 'aalamiin, Maha Kuasa Allah yang menjadikan segala sesuatu, yang telah menjadikan saya melewati tahapan penulisan tugas akhir ini dan yang telah mempertemukan saya dengan hamba-hamba yang baik, yang selalu mendo'akan dan mengajak taat pada Tuhan.

Rangkaian tulisan yang tersusun menjadi sebuah karya ini, saya persembahkan untuk kebaikan agama saya, yaitu untuk urusan mengagungkan Allah Swt. melalui ilmu alam. Semoga karya ini dapat menjadi wasilah menjadi seorang yang *Ulul Albab*

Karya ini juga saya persembahkan kepada orang tua saya, yang selalu menyertai saya di setiap langkah yang saya jalani, dari dukungan maupun do'a.

Tak lupa juga kepada sahabat-sahabat saya yang dengan ikhlash membantu saya di berbagai urusan, urusan lahiriyah maupun bathiniyah.

Semoga Allah Swt. menjadikan interaksi kebaikan ini kekal hingga kelak di Surga-Nya Allah Swt.

MOTTO

“JASAD KITA BERUSAHA
KARENA PERINTAH TUHAN
HATI KITA IMAN TAKDIR, RIDHO
KETENTUAN TUHAN”



KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakaatuh

Puji syukur kepada Allah Swt. yang telah memberikan rahmat dan nikmat berupa iman, kesehatan, kesempatan, kekuatan, keinginan, serta kesabaran, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Skripsi yang telah penulis susun ini berjudul “**Toksisitas Senyawa Steroid Hasil Pemisahan Metode KLTP Fraksi *n*-butanol Mikroalga *Chlorella sp.*”**. Sholawat serta salam penulis panjatkan kepada Rasulullah Muhammad Saw., hamba Allah Swt. yang detik demi detik hidupnya digunakan untuk mengabdikan kepada Allah Swt..

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini tidak akan tersusun dengan baik tanpa adanya bantuan dari pihak-pihak yang terkait. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu penulis dalam penyusunan penulisan skripsi ini. Selanjutnya penulis ucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak (alm), Ibu, kakak, adik dan keluarga yang selalu mendoakan serta memberi dukungan yang berharga.
2. Bapak Prof. Dr. Abdul Harris, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ibu Dr. Sri Harini, M. Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M. Si, selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

5. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si, selaku Dosen pembimbing serta dosen wali yang telah memberi bimbingan, arahan, dan motivasi dalam penyusunan skripsi ini
6. Bapak Oky Bagus Prasetyo, M.Si, selaku Dosen Pembimbing Agama yang telah menyempatkan waktu dan memberi bimbingan dalam penyusunan skripsi ini.
7. Teman satu riset mikroalga *Chlorella* sp., dan teman-teman penelitian bidang kimia Organik 2016, yang telah banyak membantu, dari tahap penelitian di laboratorium sampai penyusunan skripsi ini.
8. Segenap teman-teman mahasiswa Kimia Angkatan 2016 Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberi dukungan berupa do'a, motivasi, saran, dan kritik kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi ini, baik dari segi Bahasa maupun pembahasan. Demi kesempurnaan laporan penelitian ini, kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan. Semoga susunan skripsi ini dapat dilaksanakan dan memberi manfaat kepada banyak orang.

Wassalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakaatuh

Malang, 28 Desember 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
PERSEMBAHAN.....	v
MOTTO	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL	xiii
ABSTRAK	xiv
ABSTRACT	xv
مستخلص البحث.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.5 Batasan Penelitian	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	8
2.1 Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	8
2.2 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella</i> sp. dalam Medium Ekstrak Tauge.....	11
2.3 Kandungan dan Manfaat <i>Chlorella</i> sp.	13
2.4 Steroid	13
2.5 Ekstraksi Senyawa Aktif dengan Maserasi	15
2.6 Hidrolisis.....	18
2.7 Partisi Cair-Cair	20
2.8 Pemisahan Ekstrak Steroid dengan KLT	21
2.9 Uji Toksisitas Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT)	22
2.10 Analisis Probit.....	23
2.11 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan FTIR	24
BAB III METODE PENELITIAN	25
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	25
3.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	25
3.2.1 Alat-Alat Penelitian	25
3.2.2 Bahan-Bahan Penelitian	25
3.3 Rancangan Percobaan	26
3.4 Tahapan Penelitian.....	27
3.5 Cara Kerja	28
3.5.1 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	28
3.5.1.1 Pembuatan Media Ekstrak Tauge (MET) 4%	28

3.5.1.2 Kultivasi <i>Chlorella</i> sp. dalam MET 4 %	28
3.5.1.3 Pemanenan Biomassa <i>Chlorella</i> sp.	28
3.5.2 Preparasi Sampel	29
3.5.3 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga <i>Chlorella</i> sp. Metode Maserasi ...	29
3.5.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Peekat Metanol Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	29
3.5.5 Uji Fitokimia Senyawa Golongan Steroid.....	30
3.5.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Metode KLTP	30
3.5.7 Uji Toksisitas dengan Metode BSLT	30
3.5.7.1 Penetasan Larva Udang <i>Artemia salina</i>	30
3.5.7.2 Pengukuran Toksisitas pada Sampel	31
3.5.8 Identifikasi Struktur Senyawa Steroid menggunakan Spektrofotometri FTIR	32
3.5.9 Analisis Data	33
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1 Kultivasi dan Pemanenan Sampel Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	34
4.2 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	35
4.3 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Peekat Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	36
4.4 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Metode KLTP	37
4.5 Identifikasi Senyawa Steroid Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	39
4.5.1 Uji Fitokimia Senyawa Golongan Steroid Fraksi <i>n</i> -butanol	39
4.5.2 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer FTIR.....	42
4.6 Uji Toksisitas Senyawa Steroid dengan Metode BSLT.....	45
4.7 Relevansi Penelitian dengan Perspektif Islam	49
BAB V PENUTUP.....	53
5.1 Kesimpulan	53
5.2 Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN.....	60

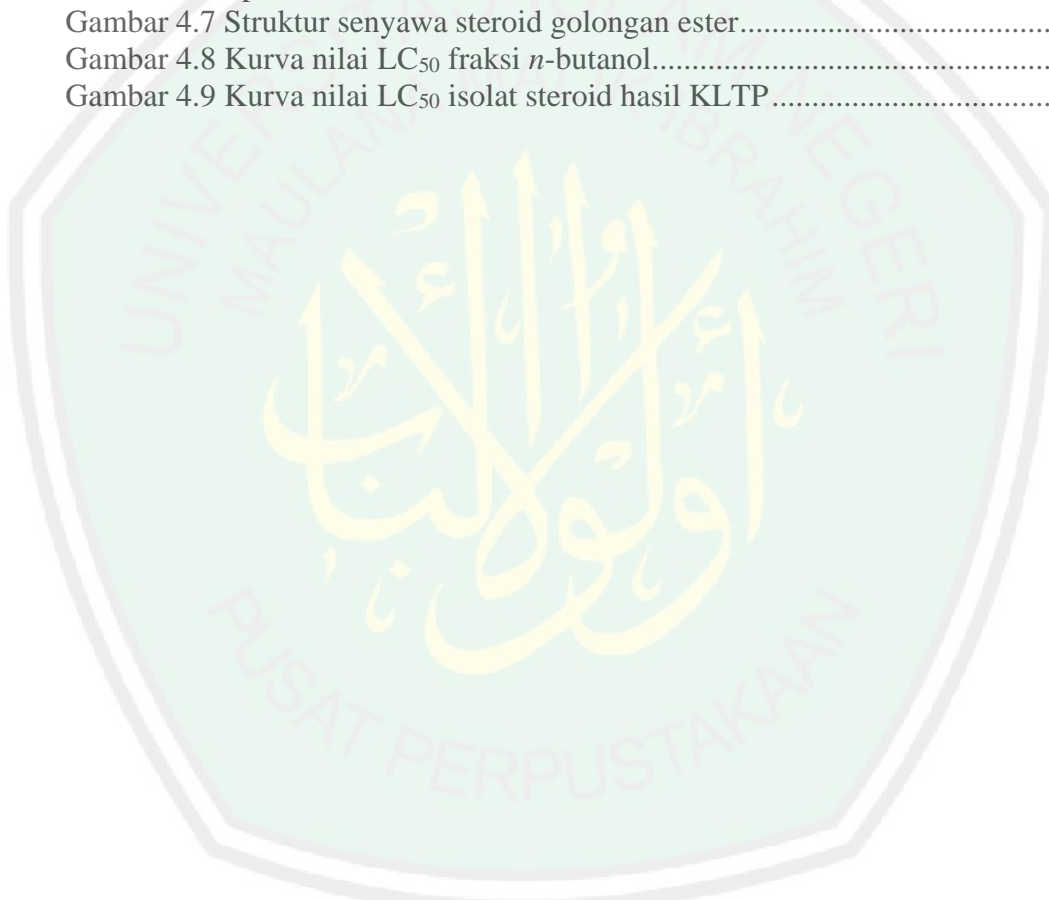
DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian	60
Lampiran 2. Skema Kerja	61
Lampiran 3. Perhitungan Kultivasi dan Pembuatan Reagen dan Larutan	67
Lampiran 4. Data Hasil Penelitian	71
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian	76
Lampiran 6. Spektra FTIR	80



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Chlorella</i> sp.	9
Gambar 2.2 Pola pertumbuhan <i>Chlorella</i> sp.	10
Gambar 2.3 Kerangka dasar steroid	14
Gambar 2.4 Struktur senyawa steroid golongan ester.....	16
Gambar 2.5 Reaksi pemutusan ikatan glikosida	20
Gambar 4.1 Pertumbuhan kultur mikroalga pada hari ke-0, ke-7, dan ke-10.....	34
Gambar 4.2 Plat hasil pemisahan KLTP	38
Gambar 4.3 Uji fitokimia senyawa steroid dengan reagen LB	40
Gambar 4.4 Jalur reaksi uji fitokimia dengan reagen LB	40
Gambar 4.5 Reaksi reagen LB dengan senyawa steroid.....	41
Gambar 4.6 Spektrum FTIR fraksi <i>n</i> -butanol dan isolat KLTP.....	42
Gambar 4.7 Struktur senyawa steroid golongan ester.....	44
Gambar 4.8 Kurva nilai LC ₅₀ fraksi <i>n</i> -butanol.....	47
Gambar 4.9 Kurva nilai LC ₅₀ isolat steroid hasil KLTP	47



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Uji Fitokimia dalam berbagai pelarut ekstrak <i>Chlorella</i> sp.....	10
Tabel 2.2 Bioaktivitas fitosterol yang dihasilkan dari mikroalga	14
Tabel 2.3 Potensi bioaktivitas berdasarkan nilai LC ₅₀	23
Tabel 4.1 Hasil Pemisahan KLTP pada UV λ 366 nm	38
Tabel 4.2 Hasil serapan fraksi <i>n</i> -butanol mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	43
Tabel 4.3 Hasil uji toksisitas fraksi <i>n</i> -butanol mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	46
Tabel 4.4 Hasil uji toksisitas isolat steroid hasil KLTP mikroalga <i>Chlorella</i> sp..	46
Tabel 4.5 Nilai Mortalitas dan LC ₅₀ Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.....	48



ABSTRAK

Mahbubi, Hasan A. 2020. **Toksisitas Senyawa Steroid Hasil Pemisahan Metode KLTP Fraksi *n*-butanol Mikroalga *Chlorella* sp. Skripsi.** Jurusan Kimia, Fakultas Sains Dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang. Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Oky Bagas Prasetyo, M.Si.

Kata Kunci: Steroid, *Chlorella* sp., *n*-butanol, Toksisitas, Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Penelitian senyawa steroid dari mikroalga *Chlorella* sp. mengenai tingkat toksisnya terus dilakukan. Uji toksisitas terhadap udang *Artemia salina* Leach memberikan nilai LC_{50} dari senyawa uji yang menunjukkan tingkat toksisnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat toksisitas dari fraksi *n*-butanol dan isolat senyawa steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella* sp.. Isolasi senyawa steroid dari *Chlorella* sp. dilakukan melalui ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol p.a; yang kemudian dihidrolisis dengan HCl 2 N dan dipartisi menggunakan pelarut *n*-butanol. Adanya senyawa steroid pada fraksi *n*-butanol ditandai dengan munculnya cincin hijau kebiruan oleh penambahan reagen LB. Pemisahan senyawa steroid hasil partisi, dilakukan menggunakan metode KLTP dengan rasio eluen *n*-heksana:etil asetat (3,75:1,25). Senyawa steroid hasil pemisahan kemudian diuji toksisitas terhadap udang *Artemia salina* Leach dan diidentifikasi dengan spektrofotometer FTIR. Hasil pemisahan KLTP didapat dugaan senyawa steroid dengan warna spot hijau kebiruan yang muncul pada R_f 0,83. Berdasarkan hasil uji toksisitas, didapatkan nilai LC_{50} dari fraksi *n*-butanol sebesar 6,84 ppm dan nilai LC_{50} isolat senyawa steroid hasil KLTP sebesar 6,35 ppm. Identifikasi menggunakan FTIR pada fraksi *n*-butanol menunjukkan adanya serapan gugus -OH, -CH, -C=C, C-H tekuk, dan C-O alkohol sekunder. Sedangkan pada isolat senyawa hasil KLTP menunjukkan serapan gugus -OH, -CH, -C=C, C-H tekuk, C-O-C, C-H alkena, geminal dimetil -CH(CH₃)₂, alkohol primer, dan alkohol sekunder.

ABSTRACT

Mahbubi, Hasan A. 2020. **Toxicity of Steroid Compound in *n*-butanol Fraction Isolated by Thin Layer Chromatography from Microalgae *Chlorella* sp.** *Bachelor Thesis*. Chemistry Departement, Faculty of Science and Technology, State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim, Malang. Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Supervisor II: Oky Bagas Prasetyo, M.Si.

Keywords: Steroid, *Chlorella* sp., *n*-butanol, Toxicity, Preparative Thin Layer Chromatography

Research on steroid compounds from the microalgae *Chlorella* sp. regarding the level of toxicity continues. The toxicity test for *Artemia salina* Leach shrimp gave the LC₅₀ value of the test compound which indicated its toxicity. This study aims to determine the level of toxicity of the *n*-butanol fraction and steroid compound isolates from the TLC microalgae *Chlorella* sp.. Isolation of steroid compounds from *Chlorella* sp. carried out by maceration extraction with methanol p.a. solvent; which was then hydrolyzed with 2 N HCl and partitioned using *n*-butanol as a solvent. The presence of steroid compounds in the *n*-butanol fraction is indicated by the appearance of a bluish-green ring by the addition of the LB reagent. Separation of partitioned steroid compounds was carried out using the PTLC method with the eluent ratio of *n*-hexane: ethyl acetate (3.75: 1.25). The separated steroid compounds were then tested for their toxicity against *Artemia salina* Leach shrimp and identified by the FTIR spectrophotometer. The results of PTLC separation obtained a single steroid isolate with a bluish-green spot color that appeared at *R_f* 0.83. Based on the results of the toxicity test, the LC₅₀ value of the *n*-butanol fraction was 6.84 ppm and the LC₅₀ value of the steroid compound isolate from TLC was 6.35 ppm. Identification using FTIR on the *n*-butanol fraction showed the presence of -OH, -CH, -C=C, C-H bending, and C-O secondary alcohol. While the TLC results showed absorption, such as -OH, -CH, -C=C, C-H bending, C-O-C, C-H alkene, geminal dimethyl -CH (CH₃)₂, primary alcohol, and secondary alcohols.

مستخلص البحث

محبوبي ، حسن ع. ٢٠٢٠. سمية مركبات الستيريود نتيجة الفصل بواسطة طريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (KLTP) لكسر ن-بوتانول الطحالب الدقيقة شلوريا سف. (*Chlorella sp.*). البحث العلمي. قسم الكيمياء، كلية العلوم و التكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف الأول: أ. غنائم فاشا الماجستير؛ المشرف الثاني: أوكي باكوس فراستيتيا الماجستير.

الكلمات المفتاحية: الستيريود ، شلوريا سف. (*Chlorella sp.*) ، ن-بوتانول ، اختبار السمية، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (KLTP)

بحث عن مركبات الستيريود من الطحالب الدقيقة شلوريا سف. (*Chlorella sp.*) فيما يتعلق بمستوى السمية يستمر. أعطى اختبار السمية لجمبري ارتيميا ساليينا ليتش قيمة LC₅₀ لمركب الاختبار مما يدل على سميته. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد مستوى السمية لجزء ن-بوتانول و عزلات مركب الستيريود من كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (KLTP) شلوريا سف. (*Chlorella sp.*) . عزل مركبات الستيريود من شلوريا سف. (*Chlorella sp.*) تتم عن طريق الاستخلاص بالنقع باستخدام مذيب الميثانول p.a ؛ و التي تم تحليلها بعد ذلك مع HCl 2 N و تقسيمها باستخدام ن-بوتانول كمذيب. يشار إلى وجود مركبات الستيريود في جزء ن-بوتانول بظهور حلقة خضراء مزرقه بإضافة كاشف LB. تم إجراء فصل مركبات الستيريود المقسمة باستخدام طريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (KLTP) مع نسبة لطيف ن-الهكسان:إيثيل الأسيتات (٣,٧٥:١,٢٥). تم بعد ذلك اختبار مركبات الستيريود المفصولة عن السمية ضد الجمبري ارتيميا ساليينا ليتش و تم التعرف عليها بواسطة مقياس الطيف الضوئي (FTIR). حصلت نتائج فصل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (KLTP) على عزلة ستيريود مفردة ذات لون موضعي أخضر مزرق ظهر عند R_f 0,83. بناءً على نتائج اختبار السمية ، كانت قيمة LC₅₀ لكسر ن-بوتانول ٦,٨٤ و قيمة LC₅₀ لعزلات مركب الستيريود من كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (KLTP) كانت ٦,٣٥. أظهر التعرف باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (KLTP) على جزء ن-بوتانول وجود مجموعات دورية -OH, -CH, -C=C, -CH₂، بينما أظهرت نتائج كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التحضيرية (KLTP) امتصاصًا نموذجيًا لمركبات الستيريود ، مثل -OH, -CH, -C=C، ثنائي ميثيل (CH₃)₂-CH- ، و كحولات ثانوية.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Steroid merupakan senyawa kimia bahan alam yang mempunyai beragam bioaktivitas, utamanya pada bidang fitofarmakologi. Kemampuan steroid dalam bidang farmasi dibuktikan pada berbagai penelitian. Dalam penelitian yang dilakukan (Prihantini, dkk., 2010) menunjukkan adanya aktifitas antibakteri dari steroid pada tumbuhan Acanthaceae terhadap bakteri *Bacillus cereus* yang merupakan bakteri mematikan dari makanan, dengan konsentrasi inhibisi dalam fraksi diklorometana sebesar 74%. Krisna, dkk (2014) dalam jurnalnya juga menyebutkan bahwa isolat steroid pada daun gayam memiliki aktivitas antioksidan terhadap Difenilpikril Hidrazil (DPPH) dengan nilai IC₅₀ sebesar 4 ppm.

Pengujian awal senyawa steroid yang memiliki potensi bioaktivitas (antioksidan, antinflamasi, antikanker, antitumor, dan sebagainya) dapat dilakukan melalui pengujian toksisitas senyawa. Hasil uji toksisitas akan memberikan data kemampuan racun dari senyawa yang mampu menimbulkan kerusakan terhadap organ target dalam tubuh makhluk hidup (Soemirat, 2005). Skrining awal ini dapat dikaitkan dengan upaya mencari produk bermanfaat bagi tubuh yang tersirat dalam firman Allah Swt. pada surat al-Baqarah ayat 168, yang berbunyi:

يَا أَيُّهَا النَّاسُ كُلُوا مِمَّا فِي الْأَرْضِ حَلَالًا طَيِّبًا وَلَا تَتَّبِعُوا خُطُوَاتِ الشَّيْطَانِ إِنَّهُ لَكُمْ عَدُوٌّ مُّبِينٌ

“Hai sekalian manusia, makanlah yang halal lagi baik dari apa yang terdapat di bumi, dan janganlah kamu mengikuti langkah-langkah syaitan; karena sesungguhnya syaitan itu adalah musuh yang nyata bagimu”.

Menurut tafsir *Al-Wajiz*, Ayat ini dialamatkan kepada seluruh manusia, baik yang mukmin maupun yang kafir. Allah SWT telah memberikan karunia kepada manusia dengan memerintahkan kepada mereka untuk makan dari seluruh yang ada di bumi dalam keadaan halal, yaitu yang telah dihalalkan untuk dikonsumsi, yang bukan dari rampasan maupun curian, dan tidak diperoleh dari hasil transaksi bisnis yang diharamkan, atau dalam bentuk yang diharamkan, atau dalam hal yang membawa kepada yang diharamkan (Al-Zukhaili, 1982). Sedangkan *Thayyib* (yang baik) menurut Yaqub (2009) dalam buku *Kriteria Halal-Haram Untuk Pangan, Obat dan Kosmetika Menurut Al-Qur'an dan Hadits* dapat didefinisikan menjadi tiga makna, yakni *thayyib* semakna dengan halal yang tidak diharamkan oleh *nash*, suci substantif, dan tidak najis; kemudian *thayyib* dimaknakan tidak membahayakan tubuh, akal, maupun jiwa saat dikonsumsi; dan terakhir *thayyib* diartikan sebagai makanan atau minuman yang enak dan layak konsumsi. Selain itu, *thayyib* dapat dimaknai sebagai sesuatu yang proporsional, atau sesuai dengan kebutuhan konsumen. Misalkan seseorang yang memiliki penyakit diabetes, maka gula yang asalnya baik menjadi tidak baik baginya, dan sebagainya. Pada penelitian ini, diambil definisi kedua, yakni *thayyib* yang bisa dimaknai sebagai sesuatu yang memberi manfaat baik bagi makhluk hidup. Nilai toksisitas yang didapat nantinya akan dilakukan uji lanjutan sesuai dengan tingkat toksisitasnya.

Nilai toksisitas suatu senyawa dapat dihitung menggunakan berbagai metode, yang salah satunya akan didapat nilai LC_{50} (*Lethal Concentration 50*). Nilai LC_{50} menunjukkan berapa konsentrasi senyawa yang dibutuhkan untuk membunuh 50% organisme uji. Semakin kecil nilai konsentrasi yang diberikan menunjukkan tingkat toksisitas yang semakin tinggi. Metode yang digunakan

adalah metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Senyawa steroid sendiri dapat dijumpai di hampir setiap makhluk hidup, yakni dalam bentuk metabolit sekunder. Terdapat dua jenis senyawa steroid berdasarkan sumbernya, yakni tumbuhan dan hewan. Senyawa steroid pada tumbuhan disebut fitosterol, sedangkan pada hewan disebut kolesterol. Banyak penelitian tentang manfaat dari senyawa steroid pada tumbuhan, dikarenakan lebih murah, ramah lingkungan, serta mudah dijumpai. Pada penelitian ini, dipilih mikroalga untuk dimanfaatkan serta diteliti senyawa metabolit sekunder steroidnya.

Mikroalga merupakan salah satu penghasil senyawa steroid dengan konsentrasi lebih tinggi dibanding sumber tumbuhan lain (Andrade, 2018). Pada penelitian ini digunakan mikroalga *Chlorella* sp., yang memiliki berbagai keunggulan, diantaranya adalah dapat berkembangbiak dengan cepat dan penghasil senyawa steroid yang tinggi (Andrade, 2018). Penelitian mengenai mikroalga *Chlorella* sp. berkaitan dengan uji toksisitas telah banyak dilakukan sebelumnya. Desianti, dkk. (2014) dalam penelitiannya menyatakan uji toksisitas fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter, dan *n*-heksana dari ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp. telah memberikan nilai LC_{50} secara berturut-turut 43,3044 ppm, 32,9023 ppm, 32,6710, dan 34,2153 ppm. Kemudian Pratiwi (2019) menyatakan dua isolat senyawa steroid fraksi *n*-heksana dari ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp. memberikan nilai LC_{50} sebesar 11,07 ppm dan 7,55 ppm. Pada penelitian ini digunakan pelarut *n*-butanol dalam partisi ekstrak pekat mikroalga *Chlorella* sp. yang kemudian akan dicari nilai toksisitasnya.

Pemilihan pelarut *n*-butanol dalam partisi senyawa aktif dari sumber tumbuhan telah banyak dilakukan. Khasanah (2018) dalam penelitiannya

menunjukkan, senyawa aktif pada fraksi *n*-butanol dari ekstrak metanol pada tumbuhan *Hydilla verticillata* memberikan nilai toksisitas LC₅₀ sebesar 39,1573 ppm yang berpotensi memiliki aktivitas sitotoksitas. Selain itu, Rahmawati (2011) pada sampel spon (*porifera*) laut, menunjukkan bahwa fraksi *n*-butanol dari ekstrak metanol mengandung senyawa steroid dan memiliki nilai LC₅₀ paling rendah (0.0002 ppm) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Penggunaan pelarut *n*-butanol dalam partisi ekstrak metanol daun *Costus afer* yang dilakukan Anyasor, dkk (2014) juga menunjukkan adanya senyawa stigmasterol (24-Ethylcholesta-5,22-dien-3-ol) dan campesterol (ergost-5-En-3-ol) yang terkandung dalam fraksi *n*-butanol. Edewor, dkk (2016) juga menyatakan dalam penelitiannya bahwa hasil analisis spektroskopi massa fraksi butanol mengandung senyawa steroid campesterol. Sehingga, diketahui fraksi *n*-butanol mengandung senyawa-senyawa golongan steroid.

Pengembangbiakan mikroalga *Chlorella* sp. dilakukan dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dari kacang hijau. Pada penelitian ini, kultivasi *Chlorella* sp. menggunakan MET dengan konsentrasi 4%. Prihantini dkk (2010) menyatakan bahwa MET 4% memberikan hasil kerapatan sel paling besar pada pertumbuhan mikroalga *Scenedesmus* dibanding pada konsentrasi 1, 2, 3, 5, dan 6%, yakni sebesar 3.981.071 sel/mL Kultur *Chlorella* sp. dipanen pada masa stasioner, yaitu pada umur 10 hari dalam bentuk biomassa, yang kemudian akan diambil ekstrak senyawa aktifnya menggunakan metode maserasi (Richmond, 1986).

Metode maserasi digunakan untuk mengekstrak senyawa aktif yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella* sp. dengan menggunakan pelarut metanol. Pemilihan metode maserasi, didasarkan pada cara kerjanya yang sederhana dan

karena metode ekstraksi dingin ini cocok digunakan pada senyawa-senyawa yang cenderung mudah menguap (*volatile*) (Ningsi, dkk., 2015). Senyawa metabolit sekunder yang lebih spesifik dapat diperoleh melalui proses hidrolisis dan partisi. Senyawa organik umumnya berbentuk glikosida yang terdiri dari glikon dan aglikon yang dihubungkan dengan ikatan glikosida. Senyawa metabolit sekunder tergolong dalam senyawa aglikon. Hidrolisis dilakukan dengan penambahan katalis HCl 2 N untuk mempercepat reaksi pemutusan ikatan glikosida. Hasil hidrolisis kemudian dipartisi dengan pelarut *n*-butanol untuk mengambil metabolit sekunder yang di dalamnya mengandung senyawa steroid yang mempunyai kemiripan kepolaran dengan pelarut (Fasya, dkk., 2018).

Kemudian, dengan metode Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP), dilakukan pemisahan steroid dari hasil partisi. Penelitian yang dilakukan Azah, (2019) menyatakan bahwa fase terbaik dalam penggunaan metode KLTP adalah *n*-heksana dan etil asetat (3,75 : 1,25) dimana didapatkan hasil isolat yang positif mengandung senyawa steroid. Berdasarkan hal tersebut, maka diharapkan penelitian ini dapat menambah informasi mengenai tingkat toksisitas senyawa aktif steroid dari mikroalga *Chlorella* sp.. Hasil pemisahan KLTP kemudian diuji tingkat toksisitasnya menggunakan metode BSLT menggunakan udang *Artemia salina* untuk mendapatkan nilai LC₅₀. Kemudian senyawa steroid hasil KLTP diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR untuk menentukan jenis senyawa aktif golongan steroid dalam mikroalga *Chlorella* sp.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana tingkat toksisitas isolat senyawa steroid fraksi *n*-butanol hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp.?
2. Bagaimana hasil identifikasi senyawa steroid hasil KLTP fraksi *n*-butanol hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp.?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui tingkat toksisitas isolat senyawa steroid fraksi *n*-butanol hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp.
2. Untuk mengetahui hasil identifikasi senyawa steroid hasil KLTP fraksi *n*-butanol hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi wawasan lebih kepada pembaca mengenai toksisitas senyawa steroid dari hasil pemisahan menggunakan metode KLTP dengan fraksi *n*-butanol hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp. terhadap larva udang *Artemia Salina* Leach. serta hasil identifikasi senyawa steroid menggunakan instrumen spektrofotometer FTIR yang selanjutnya dapat dikembangkan untuk meningkatkan ilmu pengetahuan baik untuk skala kecil maupun skala besar yakni masyarakat pada umumnya.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Sampel yang digunakan adalah mikroalga hasil kultivasi dari Laboratorium Organik Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Kultivasi *Chlorella* sp. dikakukan dalam Medium Ekstrak Tauge.
3. Ekstraksi senyawa aktif dilakukan dengan metode ekstraksi menggunakan pelarut metanol.
4. Hidrolisis dan partisi *Chlorella* sp. menggunakan pelarut *n*-butanol.
5. Uji toksisitas senyawa steroid dilakukan menggunakan metode BSLT terhadap udang *Artemia salina* Leach.
6. Identifikasi senyawa steroid mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan spektrofotometer FTIR.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga *Chlorella* sp.

Nama *Chlorella* berasal dari Bahasa Yunani, *chloros* yang berarti hijau, dan *ella* yang berarti kecil. Keberadaan *Chlorella* sp. sudah ditemukan pada periode precambria, yakni 2,5 juta tahun yang lalu (Wawrik dan Harriman, 2010). *Chlorella* sp. merupakan makhluk hidup uniseluler keluarga ganggang hijau (Chlorophyta) yang memiliki sel bulat yang kecil dengan ukuran diameternya 3-8 mikron. *Chlorella* sp. dapat tumbuh dengan toleransi suhu yang tinggi yakni pada suhu 15° dan 40°C. *Chlorella* sp. tumbuh secara autotroph dalam media anorganik serta dalam kondisi mixotrophic dan heterotrophic (misalnya, dengan penambahan asam asetat dan glukosa). Pemrosesan sel *Chlorella* sp. membutuhkan sentrifugasi yang efektif dan disentrifugasi mekanis dari dinding sel selulosa. *Chlorella* sp. juga merupakan alga eukareotik yang paling banyak dibudidayakan, karena banyak digunakan sebagai suplemen makanan dan kebutuhan kesehatan, serta dalam industri farmasi dan kosmetik (Drucker, 2002) (Masojidek and Torzillo, 2008).

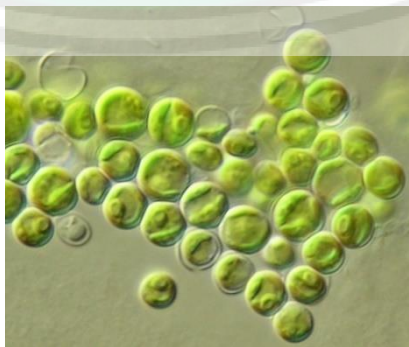
Menurut data NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (2018) klasifikasi *Chlorella* sp. (Taksonomi ID: 114055) adalah :

Superkingdom	: Eukaryota
Kingdom	: Viridiplantae
Phylum	: Chlorophyta
Kelas	: Trebouxiophyceae
Order	: Chlorellales
Famili	: Chlorellaceae
Genus	: Chlorella

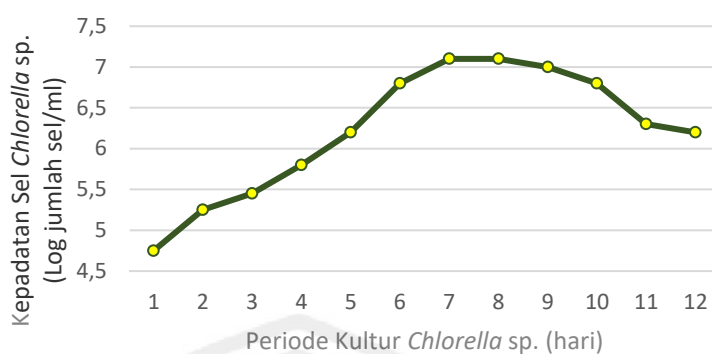
Chlorella sp. berkembangbiak dengan cara membelah diri dan pembentukan spora dengan waktu regenerasi yang sangat cepat, terutama jika cahaya dan sumber energi tersedia dalam jumlah yang cukup. Menurut Kawaroe, dkk. (2010) pertumbuhan mikroalga terbagi menjadi lima fase, yakni fase lag, fase eksponensial, fase penurunan laju pertumbuhan, fase stasioner, dan fase kematian.

Fase lag dapat disebut sebagai fase adaptasi, yaitu fase dimana tidak terjadi peningkatan jumlah sel secara nyata. Pada fase ini mikroalga sedang beradaptasi terhadap media tumbuhnya. Pada fase eksponensial, peningkatan jumlah mikroalga terjadi dengan pesat, peningkatan tersebut sesuai dengan pola progresi geometrik. Pada fase ketiga terjadi penurunan laju pertumbuhan. Fase stasioner terjadi pada saat jumlah sel mikroalga relatif konstan atau stabil. Hal ini disebabkan pertambahan kepadatan populasi seimbang dengan pengurangan kepadatan populasi akibat kematian. Pada fase terakhir yaitu fase kematian, adalah fase dimana terjadi penurunan kepadatan populasi akibat kematian (Foog, 1953) .

Kurva pertumbuhan mikroalga dapat dilihat pada Gambar 2.2. *Chlorella* sp. hidup secara berkoloni dalam jumlah besar. Habitatnya adalah di air atau tempat basah (Pratama, 2011). Morfologi *Chlorella* sp. dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 *Chlorella* sp. (Škaloud, 2007)



Gambar 2.2 Pola Pertumbuhan *Chlorella* sp. (Andreas dan Chilmawati, 2014)

Uji fitokimia yang dilakukan Adhoni, dkk. (2016) menunjukkan bahwa *Chlorella* sp. mengandung banyak senyawa yang bermanfaat, antara lain karotenoid, alkaloid, flavoniod, glikosida, fenol, lignin, saponin, tannin, gula pereduksi, minyak volatile, asam lemak, asam amino, karbohidrat, dan juga steroid.

Tabel 2.1 Uji Fitokimia dalam berbagai pelarut ekstrak *Chlorella* sp. (Adhoni, dkk., 2016):

No	Senyawa	Ekstrak <i>Chlorella</i> sp.						
		Kloroform	EA	Etanol	Heksana	Metanol	PE	Air
1	Flavoniod	-	+	+	+	+	-	+
2	Glikosida	+	+	-	+	+	+	+
3	Fenol	+	+	-	+	+	-	-
4	Lignin	+	+	-	+	-	-	-
5	Saponin	+	-	+	-	+	-	+
6	Steroid	-	+	+	+	+	-	+
7	Gula Pereduksi	+	-	-	-	+	-	+
8	Minyak Volatil	+	+	-	+	-	-	-
9	Asam Lemak	+	+	+	+	+	-	+
10	Asam Amino	+	+	+	+	+	+	+
11	Karbohidrat	+	+	+	+	+	+	+

* + : Mengandung, - : tidak mengandung

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

Kultivasi merupakan teknik yang digunakan untuk menumbuhkan mikroalga dalam kondisi yang terkontrol. Dengan teknik kultivasi didapat spesies tunggal pada kultur masal mikroalga yang kemudian bisa dilakukan pemanenan. Dalam teknik kultivasi dibutuhkan media pertumbuhan. Media pertumbuhan mikroalga haruslah mengandung elemen yang dapat membantu pertumbuhan mikroalga, seperti nitrogen, phosphor, dan besi. Beberapa faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga yakni, faktor abiotik (cahaya, temperature, nutrisi, oksigen, pH, salinitas), faktor biotik (bakteri, virus, competitor, jamur), dan faktor teknis (cara pemanenan, dan sebagainya) (Harun, dkk., 2010).

Medium kultur yang umum digunakan dalam kultivasi mikroalga *Chlorella* sp. adalah Medium Ekstrak Tauge (MET). Tauge sendiri merupakan jenis sayuran yang umum dikonsumsi, mudah diperoleh, murah, dan tidak mengandung senyawa toksis. Menurut Prihantini, dkk. (2010) Medium Ekstrak Tauge (MET) memiliki kandungan nutrisi yang dapat membantu pertumbuhan *Chlorella* sp., seperti nitrogen, fosfor, dan sulfur. Nitrogen merupakan unsur hara bagi pertumbuhan tanaman, yang sangat diperlukan untuk pembentukan atau pertumbuhan bagian-bagian vegetatif tanaman, meningkatkan pertumbuhan tanaman, menyehatkan pertumbuhan daun (kekurangan N akan menyebabkan klorosis), meningkatkan kadar protein pada tumbuhan. Nitrogen diserap dalam bentuk NO_3^- (nitrat) dan NH_4^+ (amonium) (Sutedjo, 1992). Fosfor berfungsi dalam mempercepat pertumbuhan akar semai, mempercepat dan memperkuat pertumbuhan tanaman muda menjadi tanaman dewasa. Fosfor juga berfungsi sebagai penyusun lemak dan protein. Sulfur merupakan kebutuhan esensial bagi semua sei, karena sulfur

merupakan pembentuk dari beberapa asam amino esensial, vitamin, dan sulfolipid (Becker, 1994). MET juga mengandung beberapa vitamin, seperti riboflavin, tiamin, niasin, piridoksin, asam pantotenat, triptofan, folasin, vitamin C dan K. Menurut Wulandari, dkk. (2010) vitamin yang dibutuhkan bagi pertumbuhan alga antara lain kobalamin, biotin dan tiamin. Kobalamin berfungsi untuk sintesis deoksiribosa, biotin berfungsi dalam sintesis lemak, fiksasi karbondioksida, dan reaksi β -dekarboksilasi, sedangkan tiamin berfungsi dalam reaksi α -dekarboksilasi dan transketolase.

Berdasarkan responnya terhadap suhu, *Chlorella* sp. dianggap mesofilik dan termofilik. Organisme mesofilik adalah organisme yang dapat tumbuh baik pada suhu pertumbuhan 20°C - 40°C, sedangkan organisme termofilik dapat tumbuh baik di atas suhu 40°C. Walaupun kisaran suhu tumbuh *Chlorella* sp. cukup tinggi, pertumbuhan optimum untuk strain *Chlorella* sp. pada suhu 25°C (Richmond, 1986). Pada umumnya suhu optimal untuk pertumbuhan sel merupakan kondisi optimal juga bagi pembentukan produk sel tersebut (Pandji, 1989).

Pengkulturan *Chlorella* sp. dalam MET dilakukan selama 10 hari dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap. Cahaya menjadi sumber energi yang dibutuhkan selama proses fotosintesis berlangsung. Cahaya dari lampu dapat menggantikan cahaya matahari, serta memberi kontrol yang tetap terhadap pertumbuhan *Chlorella* sp. (Bariyyah, dkk., 2013)

Wulandari, dkk. (2010) mengatakan penggunaan Medium Ekstrak Tauge sebagai medium kultur lebih efisien dalam menumbuhkan mikroalga dibandingkan medium lain, yakni Medium Guillard (MG) dan Medium Air Laut (MAL). Hasil penelitian yang dilakukan Khamidah, dkk., (2013) menunjukkan bahwa mikroalga

yang dikultivasi dalam Medium Ekstak Tauge (MET) 4% pada fase stasioner (dihari ke-10) menghasilkan kelimpahan sel tertinggi, yaitu sebesar 4.880.000 sel/mL.

2.3 Kandungan dan Manfaat *Chlorella* sp.

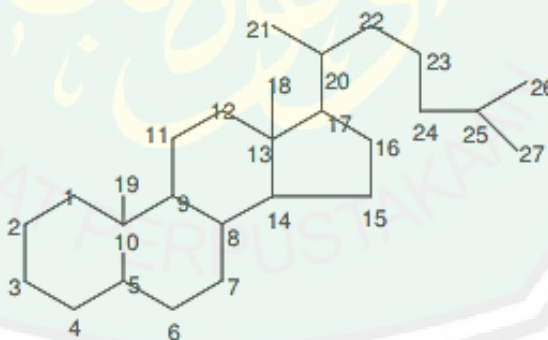
Mikroalga *Chlorella* sp. memiliki potensi sebagai pakan alami, pakan ternak, suplemen, bahan farmasi dan kedokteran serta sebagai penghasil komponen bioaktif. Di negara Meksiko dan Afrika, *Chlorella* sp. digunakan sebagai bahan tambahan pembuatan biscuit, donat, dan juga spageti. Hal ini dikarenakan *Chlorella* sp. memiliki produksi yang cukup tinggi pada kandungan asam lemak rantai panjang tak jenuh, senyawa fenolik, senyawa volatil, senyawa steroid, protein, asam amino, peptide, vitamin, dan polisakarida (Andrade, 2018). Selain itu, *Chlorella* sp. merupakan sumber besar dari klorofil, yang dapat dimanfaatkan sebagai pengatur menstruasi, obat asma dan diabetes, dan sebagainya (Rani, dkk., 2018).

Penelitian yang dilakukan Bariyyah, dkk. (2013) dan Khamidah, dkk. (2013) menunjukkan bahwa mikroalga *Chlorella* sp. mengandung senyawa golongan steroid dan tanin. Fasya, dkk (2013) dalam penelitiannya terhadap ekstrak metanol dan etil asetat *Chlorella* sp. menunjukkan adanya aktivitas sebagai anti kanker dan antimikroba. Penelitian Rahmawati (2016) menyatakan bahwa isolat steroid dari mikroalga *Chlorella* sp. memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai EC_{50} sebesar 73,82.

2.4 Steroid

Senyawa steroid adalah suatu senyawa organik yang memiliki inti siklopentanoperhidrofenantren. Di alam terdapat dalam tanaman (suku Solanaceae,

Liliceae, dan Schorphulariceae). Molekulnya mempunyai inti yang merupakan fusi tiga sikloheksana dan satu siklopentana dengan 17 atom karbon. Struktur inti molekul steroid yang jenuh disebut gonan. Semua golongan steroid dianggap turunan gonan yang mengalami substitusi, oksidasi, atau dehidrogenasi. Steroid memiliki inti dengan 3 cincin sikloheksana dan 1 cincin siklopentana (Poedjiadi, 1994). Steroid tersusun atas isoprene-isopren dan rantai panjang hidrokarbon sehingga senyawa ini tergolong senyawa non polar seperti yang terlihat pada Gambar 2.3. Namun, beberapa senyawa steroid bersifat polar karena mengandung gugus -OH, senyawa steroid yang mengandung gugus -OH biasa disebut sterol. Steroid yang terkandung dalam makhluk hidup terdapat dua jenis berdasarkan sumbernya. Fitosterol, yakni senyawa steroid dari tumbuhan dan kolesterol, yakni senyawa steroid dari hewan (Robinson, 1995). Beberapa jenis fitosterol yang ditemukan dari mikroalga ditunjukkan pada Tabel 2.2.



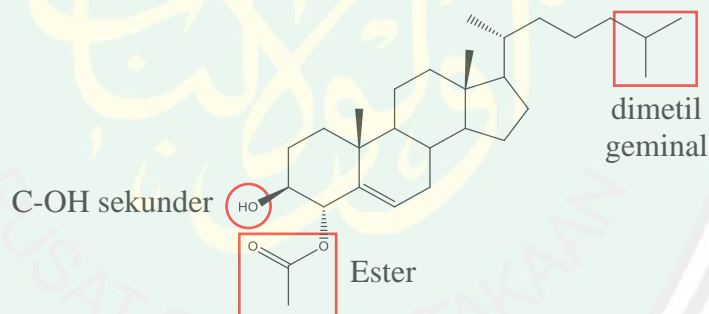
Gambar 2.3 Kerangka dasar senyawa steroid (Robinson, 1995)

Tabel 2.2 Bioaktivitas fitosterol yang dihasilkan dari mikroalga (Luo, 2015):

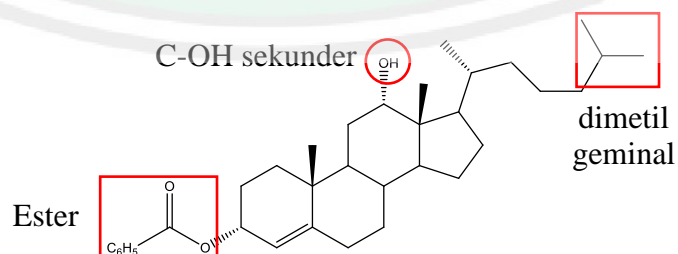
Spesies Mikroalga	Fitosterol	Aktivitas Biologis
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ergosterol, 7-Dehidroporiferasterol, Ergosterol peroksida,	Antiinflamasi

	7-Dehidroporiferasterol peroksida, 7-oxocholesterol	
<i>Chlorella vulgaris</i>	Ergosterol peroxide	Antikanker
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Ergosterol, 7-Dehidroporiferasterol	Antiinflamasi
<i>Schizochytrium aggregatum</i>	Campesterol, 24-Methylene cholesterol, 24-Methyl-colest-7-en-3 β -ol, Ergosterol, Stigmasterol dan lipida yang lain	Antioksidan

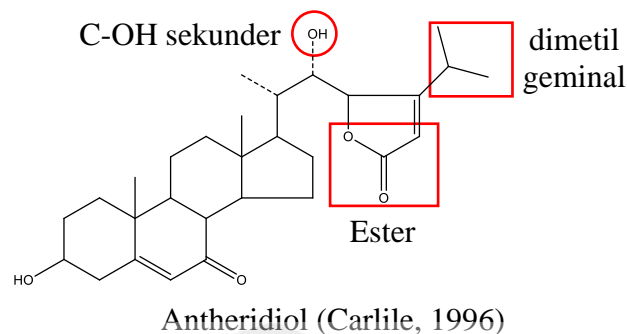
Umumnya senyawa steroid mengandung gugus dimetil geminal, yakni dua metil yang terhubung pada satu atom karbon. Selain itu beberapa senyawa golongan steroid juga mengandung gugus-gugus lain, seperti ester, keton, aldehyd, dan sebagainya. Contoh beberapa senyawa steroid yang mengandung gugus ester sekaligus dimetil geminal yakni.



(3 β ,4 α)-3-Hydroxycholest-5-en-4-yl acetate (NCBI, 2020)



12 α -Hydroxy-5 β -cholestane-3 α -yl benzoate (Freidman, dkk., 2006)



Gambar 2.4 Struktur senyawa steroid golongan ester

Sebagian besar struktur dari steroid membentuk senyawaan yang bersifat semi polar (mengandung gugus -OH), sehingga dalam proses isolasinya menggunakan senyawa-senyawa yang bersifat polar, dimana memenuhi prinsip *like dissolve like*. (Hwang, dkk., 2012). Dalam proses isolasi terdapat empat tahapan utama, yakni maserasi, pemisahan, pemurnian, dan identifikasi. Isolasi sendiri merupakan proses pemisahan komponen kimiawi dari suatu bahan. Penelitian Millati, (2016) menunjukkan ekstrak petroleum eter mikroalga *Chlorella* sp. mengandung senyawa steroid.

2.5 Ekstraksi Senyawa Aktif dengan Maserasi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan, penarikan, atau pengeluaran suatu komponen dari campurannya. Umumnya menggunakan pelarut yang memiliki sifat yang sesuai dengan komponen yang dicari. senyawa kimia yang memiliki kelarutan tinggi dalam suatu pelarut tertentu akan tertarik pada pelarut tersebut, sehingga dapat dipisahkan dari bahan yang memiliki kelarutan rendah dalam pelarut tersebut. Ekstraksi memanfaatkan pembagian suatu zat terlarut antara dua pelarut yang tidak saling campur untuk mengambil zat terlarut tersebut dari satu pelarut ke pelarut yang lain (Oxtoby, 2001). Pada proses ekstraksi terjadi perbedaan konsentrasi

antara larutan di dalam sel dengan cairan ekstraksi di luar sel. Pelarut akan mengalir ke dalam ruang sel, sehingga protoplasma akan membengkak dan menyebabkan kandungan sel berdifusi ke luar sel (Achmadi, 1992).

Berdasarkan fasenya, ekstraksi digolongkan menjadi dua jenis, yaitu ekstraksi padat-cair dan ekstraksi cair-cair. Faktor-faktor yang mempengaruhi proses ekstraksi, yakni suhu, lama ekstraksi, dan jenis pelarut yang dipakai. Oleh karena itu pemilihan pelarut yang tepat sangat penting untuk diperhatikan. Dalam pemilihan pelarut yang sesuai perlu diperhatikan beberapa hal, seperti daya melarutkan, titik didih, sifat toksik, mudah tidaknya terbakar, serta korosifitas terhadap peralatan ekstraksi (Karger, dkk., 1973).

Metode ekstraksi maserasi tergolong ke dalam jenis ekstraksi padat-cair cara dingin yang merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperature ruangan. Prinsip dari maserasi yaitu pelarut yang digunakan akan masuk ke dalam sel tanaman melewati dinding sel, dan dinding akan mengalami pemecahan, isi sel yang merupakan metabolit sekunder dalam sitoplasma akan larut dalam pelarut organik. Proses ekstraksi maserasi dapat sempurna karena lama perendaman yang dapat diatur sesuai kebutuhan. Hal penting dalam ekstraksi maserasi adalah tersedianya waktu yang cukup dalam kontak antara pelarut dengan jaringan yang akan diekstrak (Guenther, 1990).

Sampel dibuat dalam serbuk dengan tujuan memperluas bidang sentuh antara pelarut dengan serbuk simplisia, sehingga penyarian dapat lebih efektif. Pemilihan pelarut dalam ekstraksi maserasi akan efektif dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut. Kelarutan dari senyawa didasarkan pada teori *like dissolves like*, zat yang bersifat polar akan larut dalam

pelarut polar dan zat yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut non polar. Umumnya pelarut-pelarut golongan alkohol paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam, karena dapat melarutkan seluruh senyawa metabolit sekunder (Karger, dkk., 1973; Khopkar 2003). Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut metanol, dimana pelarut ini memiliki daya ekstraksi yang cukup luas sehingga dalam proses ekstraksi metabolit sekunder akan berjalan maksimal, dengan dibuktikan munculnya kandungan metabolit sekunder dalam ekstrak (Millati, 2016). Penelitian Khamidah (2013), juga menyatakan ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp. mengandung senyawa aktif golongan steroid. Selain itu, penelitian Fasya, dkk. (2013) menunjukkan rendemen ekstrak metanol dari mikroalga *Chlorella* sp. lebih besar dibanding ekstrak etil asetat dan *n*-heksana, secara berturut-turut rendemen yang didapatkan 7,001 %, 3, 673 % dan 0,004 %. Pada penelitian mikroalga *Dunaliella* sp. yang dilakukan Yudha (2008) menunjukkan ekstrak metanol yang didapat memiliki rendemen 2,59 %, sedangkan ekstrak etil asetat 1,94 % dan *n*-heksana 1,29 %. Oleh karena itu penggunaan pelarut metanol dalam ekstraksi memiliki ekstifitas yang tinggi.

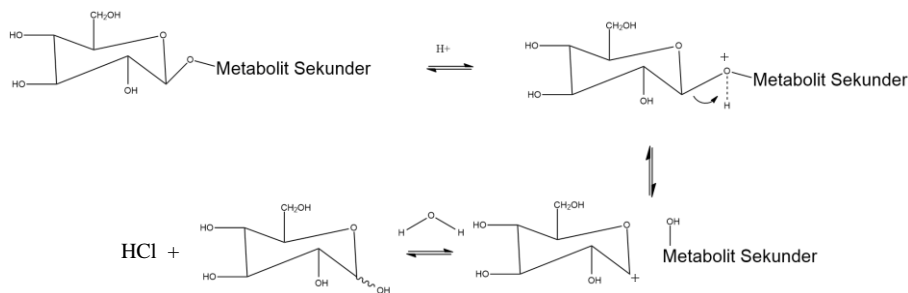
2.6 Hidrolisis

Umumnya senyawa organik berada dalam bentuk glikosida, yakni terikat dengan gugus gula. Sehingga, untuk memperoleh senyawa steroid yang bebas dari gula perlu dilakukan pemutusan ikatan glikosida dengan proses hidrolisis. Glikosida merupakan senyawa yang terbentuk atas gabungan dari bagian gula (glikon) yang sifatnya polar dan bagian bukan gula (aglikon) yang sifatnya semi polar atau non polar. Senyawa metabolit sekunder tergolong dalam senyawa

aglikon. Semakin banyak senyawa itu mengandung ikatan glikosida maka kepolarannya akan meningkat (Saifuddin, dkk., 2011).

Hidrolisis merupakan proses dekomposisi kimia yang ditunjukkan dengan terjadinya pemutusan ikatan glikosida yang merupakan penghubung antar monomer. Hidrolisis dilakukan dengan mereaksikan sampel dengan air (H_2O), yang kemudian terbentuk senyawa-senyawa yang lebih sederhana. Reaksi hidrolisis menggunakan air berlangsung sangat lambat, oleh karena itu diperlukan katalisator yang dapat mempercepat jalannya reaksi (misalnya asam) (Nihlati, dkk., 2008).

Pemilihan asam kuat seperti HCl sebagai katalis dalam proses hidrolisis didasarkan pada kemudahan dalam melepas proton (H^+) secara sempurna dalam air, sehingga dengan semakin banyaknya proton yang terionisasi dalam air, pemutusan ikatan glikosida dapat berjalan lebih cepat. Selain itu, HCl diketahui lebih baik daripada H_2SO_4 karena lebih reaktif, mudah dipisahkan karena mudah menguap, dan juga murah. Penggunaan HCl juga lebih efektif dibandingkan dengan H_2SO_4 , karena hanya membutuhkan sedikit alkali hidroksida dalam proses netralisasi (Handoko, 2006). Konsentrasi HCl yang digunakan sebesar 2 N, karena memiliki laju reaksi yang lebih cepat ($0,052 \text{ min}^{-1}$) dibandingkan pada konsentrasi 1 N ($0,036 \text{ min}^{-1}$). Penelitian Wang, dkk (2002) pada *Anoectochilus formosanus* Hayata (Orchidaceae) menyatakan bahwa prosedur hidrolisis asam dapat secara signifikan meningkatkan aktivitas antioksidan ekstrak. Reaksi pemutusan ikatan glikosida pada metabolit sekunder dengan bantuan katalisator asam HCl dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.5 Reaksi pemutusan ikatan glikosida (Mardiyah, 2012)

2.7 Partisi Cair-Cair

Ekstraksi cair-cair atau juga dikenal dengan partisi pelarut, merupakan metode untuk memisahkan suatu komponen, yang didasarkan pada kelarutan relatifnya terhadap dua cairan yang tidak saling bercampur, umumnya dari perbedaan kepolaran. Terjadi transfer komponen dari suatu fasa cairan ke fasa cairan yang lain, biasanya dari air ke organik. Transfer ini dipengaruhi oleh potensial kimia (Berk, 2013). Satu komponen dari campuran akan memiliki kelarutan dalam kedua lapisan tersebut (biasanya disebut fase) dan setelah beberapa waktu, dicapai kesetimbangan konsentrasi dalam kedua lapisan. Partisi umumnya dilakukan menggunakan corong pisah, sehingga proses pencampuran dapat berjalan lebih cepat. Senyawa-senyawa yang lebih polar akan terdistribusi di dalam fase air, sedangkan senyawa-senyawa yang bersifat hidrofobik akan masuk pada pelarut organik (Ditjen POM, 1986).

Penelitian yang dilakukan Afif, dkk. (2016) dalam uji toksisitas *Eucheuma cottoni* dalam berbagai pelarut partisi, menunjukkan bahwa partisi menggunakan pelarut *n*-butanol menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 70,32 ppm, lebih toksik dibanding dengan petroleum eter (LC_{50} 195,3 ppm) dan *n*-heksana (LC_{50} 635 ppm).

Sehingga diketahui bahwa fraksi *n*-butanol berpotensi dalam sitotoksitas yang dapat dihubungkan dengan aktivitas antikanker maupun antitumor. Selain itu, diketahui bahwa senyawa steroid dari fraksi *n*-butanol lebih pekat dibanding fraksi-fraksi yang lain (metanol dan etil asetat), pada uji fitokimia alga merah oleh Rudiyanto (2013). Rudiyanto (2013), juga menyatakan bahwa fraksi *n*-butanol memberikan nilai EC_{50} yang lebih kecil dibanding (3,71 ppm) fraksi *n*-heksana (49,5 ppm), petroleum eter (18,20), kloroform (54,92 ppm), dan etil asetat (12,98 ppm).

2.8 Pemisahan Ekstrak Steroid dengan KLT

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah metode pemisahan fisikokimia yang memisahkan suatu komponen dari campurannya berdasarkan perbedaan distribusi molekul komponen diantara dua fasa (fase gerak/eluen dan fasa diam/adsorben) dengan tingkat kepolaran yang berbeda (Hendayana, 2006). Media pemisahan yang digunakan merupakan zat padat yang memiliki ketebalan sekitar 0,1-0,3 mm yang berperan sebagai adsorben. Zat padat ini menempel di atas sebuah lempeng plastik, kaca, atau alumunium. Adapun zat padat yang digunakan sebagai adsorben adalah gel silika, alumina, dan selulosa (Underwood, 2002).

KLT memiliki keunggulan dari segi kecepatan dibanding dengan kromatografi kertas, yaitu proses elusi pada kromatografi lapis tipis membutuhkan waktu rata-rata hanya setengah jam saja. KLT digunakan secara luas untuk analisis cairan-cairan organik, terutama dalam bidang biokimia, farmasi, klinis, forensik, baik untuk analisis kuantitatif dengan cara membandingkan nilai *R_f* (*retention factor*) solut dengan nilai *R_f* senyawa baku atau untuk analisis kualitatif (identifikasi

keberadaan senyawa). Persamaan untuk R_f dapat dilihat sebagai berikut (Underwood, 2002):

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh bercak}}{\text{jarak yang ditempuh oleh larutan pengembang}}$$

Penelitian Marliana (2007) menyatakan bahwa suatu senyawa yang positif mengandung steroid akan muncul noda ungu kehitaman ($R_f = 0,06$), ungu merah ($R_f = 0,16$), ungu gelap ($R_f = 0,24$), ungu ($R_f = 0,37; 0,74$) menggunakan eluen *n*-heksana : etil asetat (4 : 1), setelah disemprot dengan reagen *Lieberman-Buchard*. Begitu juga Azah, (2019) melaporkan hasil KLT senyawa steroid dari *Hydrilla verticillata* menggunakan eluen *n*-heksana : etil asetat (3,75 : 1,25) menghasilkan 13 spot warna dan R_f yang berbeda, yang menunjukkan adanya golongan senyawa steroid setelah disemprot reagen *Lieberman-Buchard*.

2.9 Uji Toksisitas Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Toksisitas merupakan suatu keadaan yang mengidentifikasi adanya efek racun/toksik yang terdapat pada bahan sebagai sediaan *single dose* atau campuran (Donatus, 2005). *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) adalah suatu metode pendahuluan untuk menguji toksisitas dan berkembang menjadi salah satu metode bioassay dalam proses isolasi senyawa aktif yang ada dalam ekstrak. Metode BSLT sering digunakan untuk proses pra skrining terhadap senyawa aktif dalam ekstrak karena murah, cepat, dan dapat dipercaya (Meyer, dkk., 1982).

Uji BSLT didasarkan pada bioaktivitas senyawa terhadap larva udang yang ditunjukkan oleh tingkat mortalitas larva udang yang diujikan, yakni udang *Artemia salina*. Kematian larva udang *Artemia salina* dalam pengujian ini berhubungan dengan fungsi senyawa golongan alkaloid, steroid, dan flavonoid yang dapat

menghambat daya makan larva (*antifeedant*), dengan meracuni perut sehingga alat pencernaannya terganggu. Selain itu, senyawa tersebut dapat menghambat reseptor perasa di daerah mulut larva, mengakibatkan larva tidak dapat menstimulus rasa, sehingga tidak bisa mengenali makanannya (Muaja, dkk., 2013).

Data mortalitas yang diperoleh selanjutnya diolah dengan *Probit Analysis* untuk menentukan nilai LC_{50} (*Lethal Concentration*) pada tingkat kepercayaan 95%. LC_{50} merupakan tingkat konsentrasi ekstrak yang mampu untuk mematikan 50% dari hewan uji, dalam hal ini larva udang *Artemia salina* Leach. Senyawa dengan nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ mengidentifikasi bahwa senyawa tersebut memiliki potensi bioaktif. Pembagian potensi bioaktivitas suatu senyawa berdasarkan nilai LC_{50} adalah sebagai berikut (Halimah (2010) dan Meyer, dkk (1982)).

Tabel 2.3 Potensi bioaktivitas berdasarkan nilai LC_{50}

No.	Nilai LC_{50} (ppm)	Keterangan
1.	< 30	Sangat toksik, berpotensi memiliki aktivitas antitumor/antikanker
2.	30-200	Toksik, berpotensi memiliki aktivitas sebagai antimikroba
3.	200-1000	Toksik, berpotensi sebagai pestisida
4.	> 1000	Tidak toksik

2.10 Analisis Probit

Penentuan nilai LC_{50} dapat dilakukan dengan metode analisis probit menggunakan perangkat lunak statistika MINITAB. Nilai LC_{50} menunjukkan respon mematikan suatu senyawa kimia terhadap suatu populasi makhluk hidup yang didapat dari perlakuan berbagai variasi konsentrasi. Analisis probit merupakan jenis regresi yang digunakan untuk menganalisis variabel respon

binomal. Analisis probit digunakan dalam toksikologi untuk menentukan toksisitas relatif bahan kimia dan kemudian membandingkan konsentrasi di mana respon terjadi (Singh dan Zahra, 2017).

2.11 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan FTIR

Identifikasi senyawa steroid *Chloirella* sp. menggunakan spektrofotometer infra merah yang digunakan untuk mendeteksi gugus fungsional, identifikasi senyawa dan analisis campuran. Rentang bilangan gelombang yang digunakan] pada FTIR adalah $4000-400\text{ cm}^{-1}$. Pada penelitian sebelumnya dengan fraksi etil aasetat, Imamah, dkk., (2015) berhasil mengidentifikasi senyawa steroid mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan FTIR dengan informasi serapan pada daerah bilangan gelombang $3450,61\text{ cm}^{-1}$ (O-H), bilangan gelombang $2926,28\text{ cm}^{-1}$ (C-H pada CH₃), $2857,60\text{ cm}^{-1}$ (C-H pada CH₂), $1737,22\text{ cm}^{-1}$ (C=O), $1638,98\text{ cm}^{-1}$ (C=C), $1465,93\text{ cm}^{-1}$ dan $1387,09\text{ cm}^{-1}$ (C-H tekuk), $1254,92\text{ cm}^{-1}$ (C-O), $1164,47\text{ cm}^{-1}$ (C-OH alkohol tersier), $1064,03\text{ cm}^{-1}$ (C-OH alkohol primer), $752,22\text{ cm}^{-1}$ dan $670,59\text{ cm}^{-1}$ (C-H pada gugus alkena).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik, Kimia Analitik, Bioteknologi Jurusan Kimia dan Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim dari bulan September sampai dengan Desember 2019.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat-Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah oven, timbangan analitik, *heater*, *hotplate*, kaca arloji, cawan porselen, wadah penetasan, cawan petri, lampu penetasan, lampu TL 36 watt, *shaker incubator*, *aerator*, spatula, pengaduk kaca, akuarium, *autoklaf*, pipet mikro, pipet ukur, pipet tetes, pipet volume, sentrifuga, bunsen spiritus, penjepit, bola hisap, erlenmeyer, beaker glass, corong pisah, statif, pipa kapiler, *chamber KLT*, *hairdryer*, gelas vial, corong gelas, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *mortar agate*, plat KLT *silica GF₂₅₄*, seperangkat alat penyaring vakum, desikator, *centrifugate*, *rotary evaporator vacuum*, *fortex*, lampu UV, spektrofotometer IR

3.2.2 Bahan-Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat mikroalga *Chlorella* sp. yang didapatkan dari Laboratorium Fisiologi Tumbuhan jurusan

Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah tauge (kacang hijau), metanol p.a, *n*-heksana, etil asetat, *n*-butanol, natrium bikarbonat, HCl 2 N, gas N₂, *Lieberman Burchard* (H₂SO₄ 97 %, kloroform, asam asetat anhidrida, dan HCl 2 N), air laut, ragi roti, dimetil sulfoksida (DMSO), pellet KBr, akuades, tisu, *aluminium foil*, dan kertas whatman no. 42. Adapun hewan uji yang digunakan adalah larva udang *Artemia salina* yang berasal dari telur *Artemia salina*.

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini dilakukan dalam skala laboratorium. Diawali dengan penanaman atau kultivasi mikroalga *Chlorella* sp. dalam medium ekstrak tauge (MET) 4 % selama 10 hari (akhir fasa stationer *Chlorella* sp.) dengan pengaturan pencahayaan 14 jam terang dan 10 jam gelap, kemudian dipanen dengan disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm sehingga didapat biomassa basah *Chlorella* sp.. Biomassa kemudian dikering-anginkan pada suhu ruang (25 – 30 °C) selama ± 48 jam. Biomassa kering diekstrak untuk mendapatkan senyawa aktif metabolit sekunder menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol p.a, kemudian hasil ekstraksi dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak pekat dihidrolisis menggunakan asam klorida (HCl) 2 N dan dipartisi menggunakan pelarut *n*-butanol. Hasil partisi diidentifikasi keberadaan senyawa steroidnya menggunakan reagen LB. Pemisahan senyawa steroid dilakukan dengan metode KLTP dengan eluen *n*-heksana : etil asetat (3,75 : 1,25). Hasil pemisahan diletakkan di bawah sinar UV 254 dan 366 nm untuk mengetahui spot yang mengandung steroid. Spot tersebut dikerok dan larutkan dalam pelarut *n*-heksana,

setelah itu disentrifugasi dan diambil supernatannya. Kemudian isolat diuji toksisitasnya dengan metode BSLT terhadap larva udang *Artemia salina* menggunakan variasi konsentrasu 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm. Terakhir isolat dan fraksi diidentifikasi lebih lanjut dengan instrumen spektrofotometer FTIR

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut :

1. Kultivasi mikroalga *Chlorella* sp.
 - a. Pembuatan Media Ekstrak Tauge (MET) 4 %
 - b. Kultivasi *Chlorella* sp. dalam Media Ekstrak Tauge (MET) 4 %
 - c. Pemanenan biomassa *Chlorella* sp.
2. Preparasi Sampel
3. Ekstraksi maserasi senyawa aktif pada Mikroalga *Chlorella* sp.
4. Hidrolisis dan partisi ekstrak pekat metanol mikroalga *Chlorella* sp. dengan fraksi *n*-butanol
5. Uji fitokimia
6. Pemisahan senyawa steroid dengan KLTP menggunakan eluen terbaik
7. Uji toksisitas dengan metode BSLT terhadap larva udang *Artemia salina* L. dengan variasi konsentrasi
8. Identifikasi stuktur senyawa steroid menggunakan spektrofotometri FTIR
9. Analisis Data

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella* sp.

3.5.1.1 Pembuatan Media Ekstrak Tauge (MET) 4 %

Larutan stok MET dibuat dengan cara merebus 100 g tauge ke dalam 500 mL akuades dan didihkan selama 1 jam hingga volume ekstrak 200 mL atau sampai larutan berubah menjadi keruh kekuningan. Larutan MET 4 % (v/v) sebanyak 900 mL dibuat dengan melarutkan 36 mL larutan stok MET ke dalam 864 mL akuades pada wadah erlenmeyer 1000 mL (Prihantini, dkk., 2010).

3.5.1.2 Kultivasi *Chlorella* sp. dalam Media Ekstrak Tauge (MET) 4 %

Isolat mikroalga *Chlorella* sp. sebanyak 150 mL diinokulasikan ke dalam erlenmeyer 1000 mL yang telah diisi MET 4 % (900 mL). Kemudian ditempatkan ke dalam ruang kultur yang telah dilengkapi pencahayaan lampu TL 36 watt (intensitas cahaya 1000-4000 lux) dengan aturan fotoperioditas, yakni masa ternang 14 jam dan masa gelap 10 jam. Kultivasi dilakukan selama 10 hari (Prihantini dkk., 2010).

3.5.1.3 Pemanenan Biomassa *Chlorella* sp.

Pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella* sp. dilakukan pada fase stasioner, yakni pada hari ke-10 masa kultivasi. Kultivat disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm. Kemudian biomassa *Chlorella* sp. dipisahkan dari supernatannya. Biomassa yang diperoleh kemudian ditimbang dan dicatat sebagai berat basah (Desianti dkk., 2014).

3.5.2 Preparasi Sampel

Biomassa mikroalga *Chlorella* sp. basah diambil dan dikeringanginkan pada suhu ruang (25-30 °C) selama ± 48 jam, kemudian ditimbang dan dicatat sebagai berat kering biomassa mikroalga *Chlorella* sp. (Desianti dkk., 2014).

3.5.3 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga *Chlorella* sp. Metode Maserasi

Sebanyak 6 g biomassa *Chlorella* sp. kering dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian dimaserasi dengan 60 mL pelarut metanol p.a.. di atas *shaker* pada kecepatan 120 rpm selama 24 jam. Hasil perendaman disaring menggunakan corong buchner. Residu hasil penyaringan diekstrak kembali hingga 7 kali pengulangan atau sampai pelarut menjadi lebih bening. Filtrat yang diperoleh, kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* (Imamah dkk., 2015). Ekstrak pekat hasil maserasi ditimbang dan dihitung nilai randemennya menggunakan persamaan berikut (Khopkar, 2003).

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

3.5.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol Mikroalga *Chlorella* sp.

Hidrolisis dilakukan dengan melarutkan ekstrak pekat metanol ke dalam katalis HCl 2 N dengan perbandingan 1:2, kemudian diaduk selama 1 jam menggunakan *magnetic stirrer*. Hasil hidrolisis dinetralkan menggunakan natrium bikarbonat. Penambahan dilakukan hingga pH larutan netral (Imamah dkk., 2015). Hasil hidrolisis sebanyak 0,74 g dipartisi menggunakan pelarut *n*-butanol sebanyak 7,4 mL (1:10) dalam corong pisah. Lapisan organik hasil partisi dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* dan dihitung randemennya.

3.5.5 Uji Fitokimia Senyawa Golongan Steroid

Ekstrak pekat dari fraksi *n*-butanol dilarutkan ke dalam reagen *Lieberman Burchard* dengan komposisi 0,5 mL kloroform, 0,5 mL asam asetat anhidrida, dan 1-2 mL asam sulfat pekat. Keberadaan dugaan senyawa golongan steroid akan ditunjukkan oleh terbentuknya cincin hijau kebiruan di dalam larutan hasil reaksi.

3.5.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Metode KLTP

Pemisahan KLTP dilakukan menggunakan plat silika gel GF₂₅₄ (10 X 20 cm). Ekstrak pekat hasil partisi ditotolkan menggunakan pipa kapiler sepanjang plat secara horizontal pada 1 cm di atas ujung bawah plat KLT. Plat silika kemudian dielusi menggunakan eluen *n*-heksana: etil asetat dengan perbandingan 3,75: 1,25. Perbandingan eluen ini memberikan hasil pemisahan terbaik pada KLT kualitatif (Azah, 2019). Spot hasil pemisahan dideteksi dengan menyemprotkan reagen *Lieberman Buchard* (LB) dan diamati di bawah lampu UV 254 dan 366 nm. Noda dugaan senyawa steroid dikerok dan dilarutkan ke dalam pelarut *n*-heksana, kemudian disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm. Supernatan yang diperoleh dipekatkan, sehingga didapatkan isolat pekat dugaan senyawa steroid hasil pemisahan KLTP (Rahmawati, 2016).

3.5.7 Uji Toksisitas dengan Metode BSLT

3.5.7.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina*

Sebanyak 250 mL air laut dimasukkan ke dalam wadah penetasan. Selanjutnya, dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina* dan diaerasi selama \pm 48 jam. Telur larva udang akan menetas dan tumbuh menjadi naupli larva udang *Artemia*

salina. Larva udang dewasa yang siap digunakan sebagai target uji toksisitas berwarna putih transparan (Halimah, 2010).

3.5.7.2 Pengukuran Toksisitas pada Sampel

Larutan stok dibuat dengan cara, sebanyak 0,9 mg sampel isolat hasil KLTP dilarutkan dalam 25 mL pelarutnya *n*-heksana sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 36 ppm. Selanjutnya dibuat variasi konsentrasi yaitu 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm, kemudian dimasukkan ke dalam botol vial dan pelarutnya diuapkan. Lalu dibuat larutan ragi dengan melarutkan 3 mg dalam 5 mL air laut. Satu tetes larutan ragi roti dan 100 μ L DMSO ditambahkan ke dalam botol vial yang berisi isolat, kemudian dikocok hingga larut sempurna. 10 ekor larva udang *Artemia salina* dimasukkan ke dalam botol vial dan ditambahkan air laut hingga volumenya menjadi 10 mL (Rahayu dkk., 2013). Uji toksisitas dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan. Semua botol vial diletakkan di bawah lampu pijar selama 24 jam kemudian diamati kematian larva udang. Kematian larva udang dalam larutan isolat dibandingkan dengan dua kontrol, yakni kontrol pelarut dan kontrol DMSO.

Kontrol pelarut dibuat dengan mengambil 100 μ L pelarut dimasukkan ke dalam botol vial dan diuapkan, kemudian ditambahkan dengan setetes larutan ragi roti dan 2 mL air laut ke dalam botol vial, kemudian dikocok. Selanjutnya dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L ke dalam botol vial dan ditambahkan air laut hingga volumenya menjadi 10 mL. disimpan botol vial dibawah lampu pijar selama 24 jam dan diamati kematian larva udang.

Kontrol DMSO dibuat dengan mengambil 50 μ L DMSO dan dimasukkan kedalam botol vial. Setetes larutan ragi roti dan 10 ekor larva udang *Artemia salina*

L dimasukkan kedalam botol vial dan ditambahkan air laut hingga volumenya menjadi 10 mL. disimpan botol vial di bawah lampu pijar selama 24 jam dan diamati kematian larva udang.

Efek toksisitas diamati dengan persen kematian larva udang yang dinyatakan dengan LC₅₀. Data yang diperoleh berupa data dan grafik nilai LC₅₀. LC₅₀ dihasilkan dari analisa probit pada program MINITAB 17 dengan tingkat kepercayaan 95 %. Uji toksisitas dilakukan dengan variasi konsentrasi terhadap isolat steroid yang mempunyai toksisitas tertinggi. Variasi konsentrasi yang digunakan yaitu 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm dengan 5 kali pengulangan. Data yang dimasukkan ke dalam analisa probit pada program MINITAB 17 yaitu mortalitas dan konsentrasi sehingga akan didapatkan nilai % mortalitas dengan rumus (Desianti dkk., 2014):

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

3.5.8 Identifikasi Struktur Senyawa Steroid menggunakan Spektrofotometri FTIR

Pellet KBr sebanyak 0,2 gr dicampurkan dengan ekstrak kasar isolat steroid hasil KLTP dan digerus bersamaan dengan bantuan *mortar agate*. Kemudian serbuk campuran dilakukan pengepresan dengan tekanan 80 torr (8-20 torr per satuan waktu) selama 10 menit. Setelah itu, dimasukkan ke dalam wadah sampel diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR pada rentang bilangan gelombang 4000-400 cm⁻¹.

3.5.9 Analisis Data

Diperoleh data berupa grafik dan angka yang selanjutnya dideskripsikan hasilnya. Potensi toksisitas berupa data angka yang menyatakan nilai LC_{50} . Identifikasi senyawa steroid dapat diketahui dengan melakukan analisis hasil isolat dari pemisahan KLTP dengan menggunakan instrumen spektrofotometer FTIR, dimana spektra yang dihasilkan dibandingkan dengan literatur.



BAB IV

PEMBAHASAN

4.1 Kultivasi dan Pemanenan Sampel Mikroalga *Chlorella* sp.

Kultivasi mikroalga *Chlorella* sp. dilakukan dalam media ekstrak taugé (MET) dengan konsentrasi media (v/v) 4%. Ekstrak diperoleh dari 100 g taugé yang direbus dalam air mendidih 500 mL sampai air berubah menjadi warna kuning, yang menandakan kandungan nutrisi dalam taugé telah terekstrak atau terdistribusi ke dalam air. MET mengandung nutrisi yang dibutuhkan mikroalga untuk proses pertumbuhan yang terjadi selama 10 hari atau sampai fasa stasioner. Kultivasi dilakukan dengan perlakuan fotoperioditas. Berdasarkan pengamatan, terjadi perubahan kepekatan warna yang signifikan antara hari ke-0 dan hari ke-10 seperti ditunjukkan pada Gambar 4.1, yakni dari hijau muda ke hijau tua yang menandakan terjadinya peningkatan jumlah sel dari mikroalga *Chlorella* sp.



Gambar 4.1 Pertumbuhan kultur mikroalga pada hari ke-0, ke-5, dan ke-10

Pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella* sp. dilakukan ketika pertumbuhan sel mencapai fase stasioner yakni, pada hari ke-10. Dimana terjadi proses metabolisme sekunder dan perombakan metabolit primer (Herbert, 1995).

Pemanenan dilakukan menggunakan prinsip sentrifugasi dengan memperhatikan sifat fisika dari campuran antara biomassa mikroalga dengan media ekstrak taube. Biomassa mikroalga memiliki berat jenis yang lebih besar dibandingkan media ekstrak taube sehingga pada saat mengalami gaya sentrifugasi biomassa terkumpul menjadi endapan hijau di dinding tabung.

Biomassa yang terkumpul dikeringanginkan selama 2 hari untuk mengurangi kadar air yang dapat memicu tumbuhnya jamur dan mikroorganisme lain dalam biomassa (Risdianti, dkk., 2016). Biomassa kering kemudian dikerok sehingga terbentuk serbuk kering mikroalga *Chlorella* sp.. Biomassa dalam bentuk serbuk ini akan memudahkan proses ekstraksi, dimana kontak antara pelarut dan sampel menjadi lebih luas, sehingga komponen yang dituju akan banyak larut ke dalam pelarut. Hasil biomassa kering yang didapat dari hasil kultivasi mikroalga *Chlorella* sp. berwarna hijau kehitaman dengan berat 6 g.

4.2 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga *Chlorella* sp.

Pemisahan senyawa aktif dalam mikroalga *Chlorella* sp. dilakukan menggunakan metode ekstraksi maserasi dengan perbandingan 1:10, yakni 6 g sampel direndam ke dalam 60 mL pelarut metanol p.a secara berulang-ulang 5 kali sehingga senyawa aktif terkestrak maksimal ke dalam pelarut metanol. Perendaman dilakukan selama 24 jam di atas shaker untuk memaksimalkan proses ekstraksi. Setelah 24 jam, dilakukan penyaringan menggunakan corong buchner dalam keadaan vakum untuk memisahkan filtrat dengan residu. Residu kemudian dimaserasi kembali dengan pelarut metanol agar kandungan metabolit sekunder dalam sampel biomassa mikroalga *Chlorella* sp. terekstrak keseluruhan. Pada

proses ekstraksi, pelarut metanol masuk ke dalam sel mikroalga melalui dinding sel, kemudian metabolit sekunder dalam sitoplasma akan ikut larut dengan pelarut metanol karena memiliki kemiripan tingkat kepolaran. Senyawa metabolit sekunder umumnya terikat dengan gugus gula dalam ikatan glikosida yang memiliki sifat cenderung polar, sehingga dapat larut dalam pelarut metanol yang juga polar. Larutnya senyawa metabolit sekunder ke dalam pelarut metanol dibuktikan dengan berubahnya warna pelarut dari bening ke hijau dan meninggalkan ampas di bawah wadah.

Filtrat yang diperoleh diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* kemudian dialiri gas N₂ untuk menguapkan sisa pelarut, sehingga didapatkan ekstrak pekat hasil maserasi. Rendemen yang didapatkan dari hasil ekstraksi dengan pelarut metanol sebesar 0,85 g dengan rendemen 14,17 %. Penelitian yang dilakukan oleh Fasya, dkk. (2020) pada ekstraksi maserasi mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan pelarut metanol menghasilkan rendemen sebesar 23,27%.

4.3 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Mikroalga *Chlorella* sp.

Ekstrak hasil maserasi yang mengandung senyawa metabolit sekunder dihidrolisis untuk memutus ikatan glikosida, karena umumnya senyawa metabolit sekunder terikat dengan komponen gula dalam ikatan glikosida. Hasil pemutusan menghasilkan senyawa glikon dan senyawa aglikon (non gula) yang diduga mengandung senyawa steroid. Hidrolisis dilakukan menggunakan asam kuat HCl 2 N sebagai katalis untuk mempercepat reaksi hidrolisis. Pemilihan HCl didasarkan pada kemudahan terionisasi secara sempurna dan menghasilkan produk garam yang tidak beracun. Reaksi hidrolisis bersifat *reversible*, sehingga perlu dihentikan

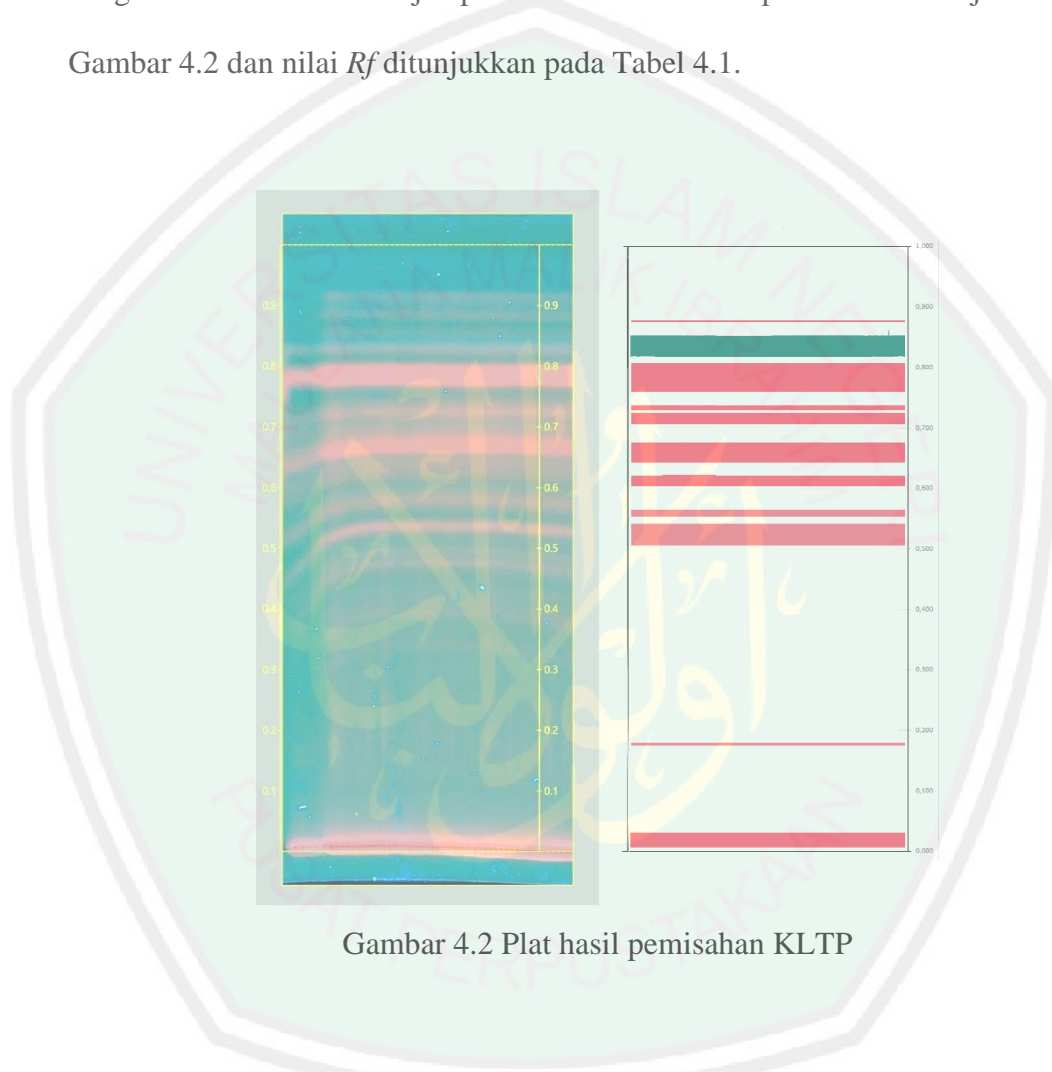
dengan menambahkan basa NaHCO_3 sampai pH larutan netral agar tidak terjadi pembentukan kembali ikatan glikosida.

Hasil hidrolisis kemudian dipartisi menggunakan pelarut *n*-butanol. Proses partisi menggunakan prinsip *like dissolve like* yang bertujuan untuk memisahkan gugus aglikon yang diduga mengandung senyawa steroid dari komponen. Pengocokkan dalam partisi menghasilkan dua lapisan, yakni lapisan organik dan lapisan air yang diakibatkan oleh perbedaan densitas antara *n*-butanol (0,8 g/mL) dan air (1 g/mL). Senyawa dugaan steroid dan senyawa yang mirip tingkat kepolarannya akan terdistribusi ke lapisan yang memiliki kemiripan tingkat kepolaran, yakni lapisan organik. Partisi dilakukan sebanyak 5 kali untuk memaksimalkan pemisahan. Fase organik yang terbentuk ditampung dan dipisahkan dengan dialiri gas N_2 , sehingga didapatkan berat hasil partisi sebesar 0,30 g dengan persen rendemen 40,4%. Partisi menggunakan pelarut *n*-butanol pernah dilakukan Sari (2017) pada ekstrak makroalga *Euchema cottoni* dan mendapatkan rendemen sebesar 33,89%.

4.4 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP

Hasil partisi menggunakan *n*-butanol dipisahkan dengan KLTP untuk mendapatkan senyawa dugaan steroid yang lebih murni. Fase diam yang digunakan yakni plat silika gel $\text{G}_{60}\text{F}_{254}$ berukuran 10 x 20 cm dapat berpendar di bawah cahaya dengan panjang gelombang 254 nm (Fasya, 2016), sedangkan fase gerak yang digunakan adalah campuran eluen dari pelarut *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 3,75:1,25. Eluen yang digunakan memiliki tingkat kepolaran yang lebih rendah dari fasa diam silika, sehingga komponen senyawa yang memiliki

kepolaran tinggi akan terdistribusi pada fasa diam (silika) dengan nilai R_f yang kecil. Sedangkan komponen senyawa yang kepolarannya rendah (non polar) akan lebih terdistribusi pada fasa gerak, sehingga nilai R_f -nya akan besar. Hasil pemisahan senyawa steroid dengan KLTP menunjukkan terbentuknya 11 noda dengan 1 noda berwarna hijau pada noda ke-10. Hasil pemisahan ditunjukkan pada Gambar 4.2 dan nilai R_f ditunjukkan pada Tabel 4.1.



Gambar 4.2 Plat hasil pemisahan KLTP

Tabel 4.1 Hasil Pemisahan KLTP pada UV λ 366 nm

No.	Nilai R_f	Warna Noda	Dugaan Senyawa
1.	0.016	Merah	Triterpenoid
2.	0.180	Merah	Triterpenoid
3.	0.526	Merah	Triterpenoid
4.	0.564	Merah	Triterpenoid
5.	0.620	Merah	Triterpenoid
6.	0.662	Merah	Triterpenoid
7.	0.715	Merah	Triterpenoid

8.	0.730	Merah	Triterpenoid
9.	0.785	Merah	Triterpenoid
10.	0.834	Hijau Kebiruan	Steroid
11.	0.877	Merah	Triterpenoid

Berdasarkan Tabel 4.1 diketahui bahwa dugaan senyawa steroid muncul pada noda ke-10 dengan nilai R_f 0,834. Nilai R_f yang besar menunjukkan komponen senyawa lebih terdistribusi ke dalam fasa gerak, sehingga komponen senyawa tersebut memiliki kepolaran yg rendah (non-polar). Penelitian yang dilakukan Fikri (2019) menunjukkan bahwa noda hijau yang muncul pada R_f 0,81 pada identifikasai senyawa steroid hasil KLTP fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella* sp., merupakan spot senyawa steroid setelah dilakukan identifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR dan UV-Vis. Wahdaniyah (2019) dalam penelitiannya pada pemisahan senyawa steroid menggunakan KLTP menunjukkan bahwa isolat pada spot dengan R_f 0,81 merupakan senyawa steroid setelah diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS.

4.5 Identifikasi Senyawa Steroid Mikroalga *Chlorella* sp.

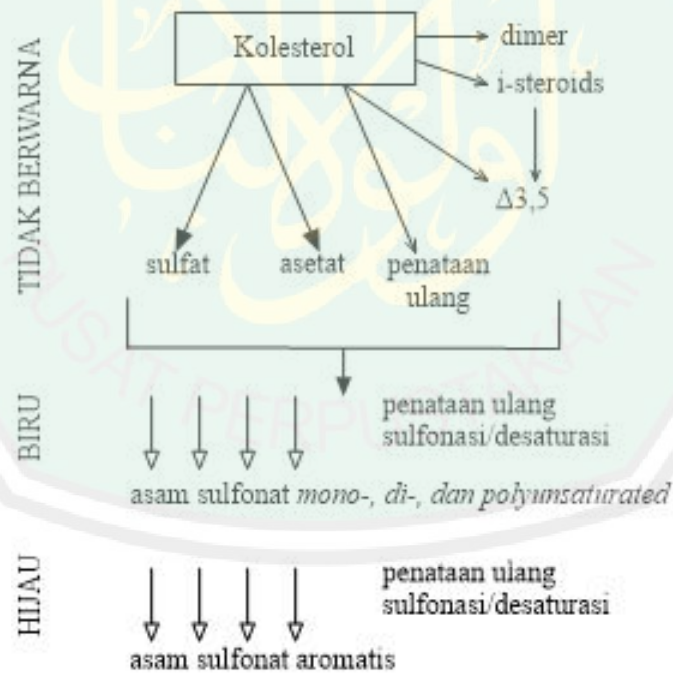
4.5.1 Uji Fitokimia Senyawa Golongan Steroid Fraksi *n*-butanol

Identifikasi awal dengan uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui keberadaan senyawa steroid dalam sampel mikroalga *Chlorella* sp. secara kualitatif, yakni dengan mereaksikan sampel fraksi *n*-butanol dengan reagen *Liebermann-Burchard* (LB). Hasil uji fitokimia yang ditunjukkan pada Gambar 4.3 menunjukkan terbentuknya warna hijau kebiruan pada larutan yang menandakan keberadaan senyawa steroid dan terbentuknya cincin coklat yang diduga pertanda keberadaan senyawa golongan triterpenoid. Penelitian yang dilakukan Fikri (2019)

menyatakan bahwa keberadaan senyawa steroid dari uji fitokimia menggunakan reagen LB ditunjukkan dengan munculnya warna hijau kebiruan pada larutan.



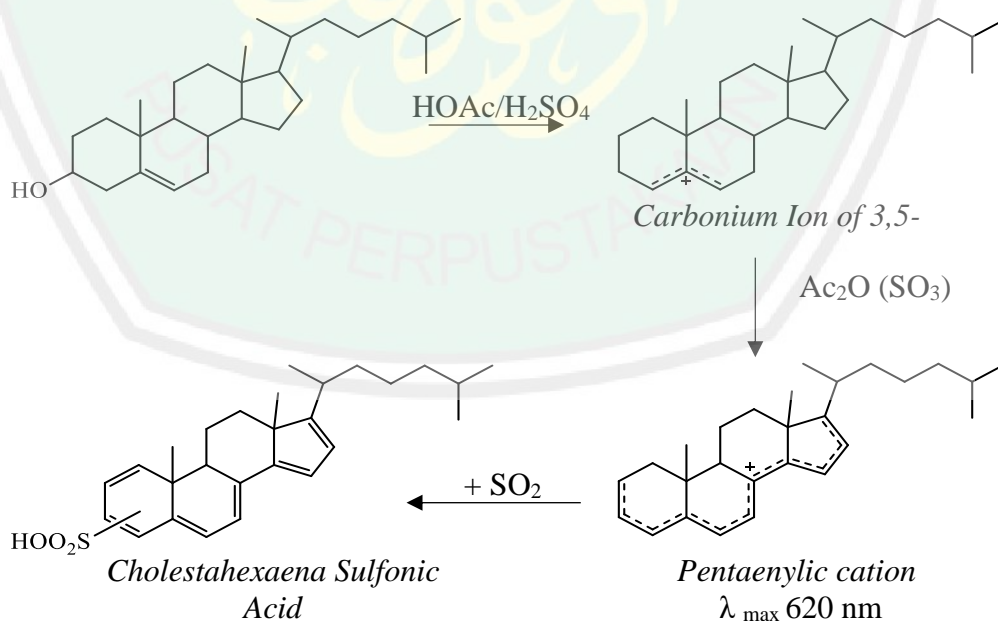
Gambar 4.3 Uji fitokimia senyawa steroid dengan reagen LB



Gambar 4.4 Jalur reaksi uji fitokimia dengan reagen LB

Menurut analisis Xiong, dkk. (2007), reagen LB yang terdiri dari asam sulfat, asam asetat di dalam kloroform secara cepat merubah kolesterol ke senyawa turunan asetat dan sulfatnya, dan diikuti terbentuknya sejumlah kecil i-steroid, kolesta-3,5-diena, dan senyawa tak jenuh lainnya. Spesies yang dominan kemudian secara perlahan berubah menjadi asam sulfonat tak jenuh tunggal (*monounsaturated*), tak jenuh ganda (*diunsaturated*), dan tak jenuh jamak (*polyunsaturated*) dari proses penataan ulang melalui sulfonasi atau desaturasi. Kemudian akan kembali tertata ulang membentuk senyawa steroid aromatis. Secara ringkas dapat dilihat skema pada Gambar 4.4 di atas.

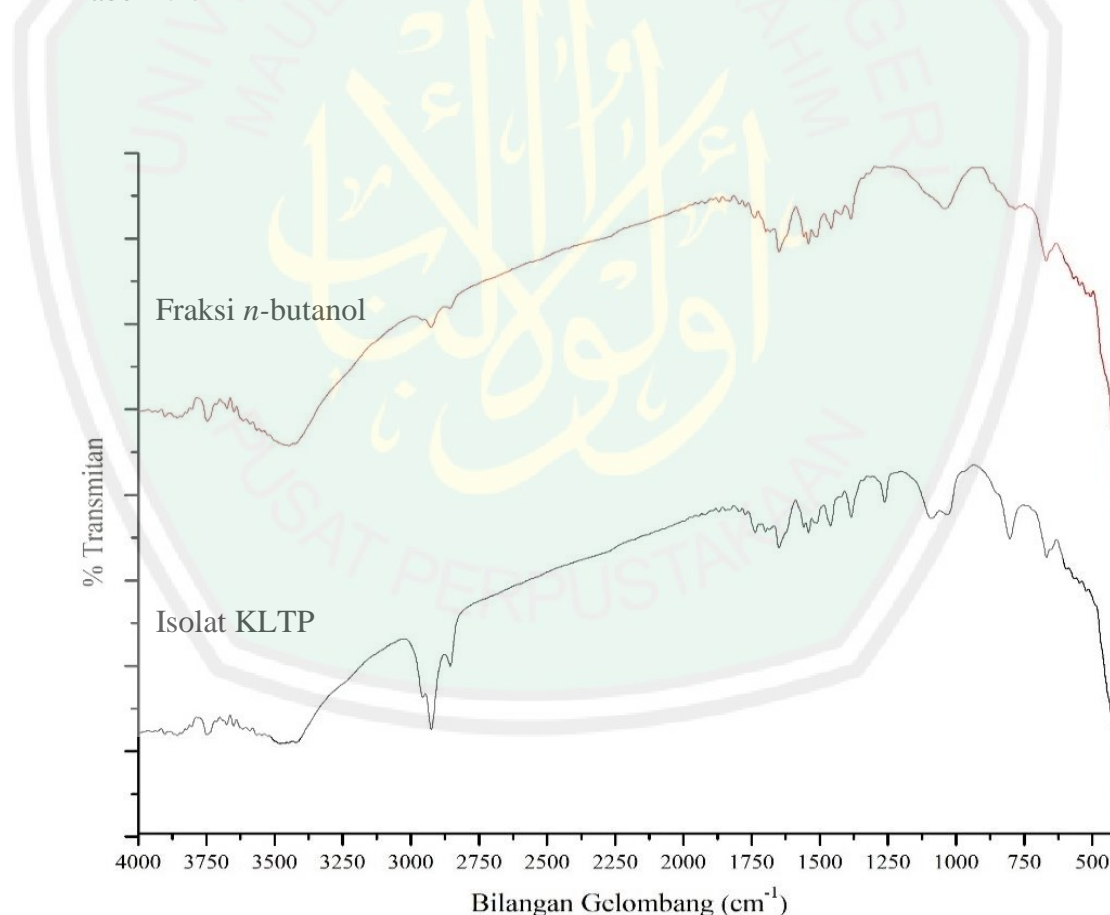
Pembentukan warna hijau kebiruan pada reaksi reagen LB dengan senyawa steroid menurut Burke, dkk. (1974) merupakan akibat terbentuknya kation pentaenilik yang memberikan serapan pada panjang gelombang *visible* 610 nm. Reaksi antara senyawa sterol dengan reagen LB ditunjukkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Reaksi reagen LB dengan senyawa steroid (Burke, dkk., 1974)

4.5.2 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer FTIR

Identifikasi senyawa steroid dilakukan menggunakan spektrofotometer FTIR pada sampel hasil partisi dengan fraksi *n*-butanol dan isolat hasil pemisahan KLTP. Puncak spektrum inframerah memberikan bukti adanya gugus fungsi dalam sampel yang dituju, tapi belum bisa menginterpretasi struktur senyawa sesungguhnya. Kasal, dkk. (2010) menyatakan serapan bilangan gelombang khas dari senyawa steroid sendiri adalah pada bilangan gelombang $1475\text{-}1445\text{ cm}^{-1}$ dan $1390\text{-}1370\text{ cm}^{-1}$ yang menandakan adanya gugus dimetil geminal. Hasil spektra FTIR dari fraksi *n*-butanol dan isolat KLTP dapat dilihat pada Gambar 4.6 dan Tabel 4.2.



Gambar 4.6 Spektrum FTIR fraksi *n*-butanol dan isolat KLTP

Tabel 4.2 Hasil serapan fraksi *n*-butanol dan isolat KLTP mikroalga *Chlorella* sp

Bilangan Gelombang (cm^{-1})		Rentang Pustaka (cm^{-1})	Jenis Vibrasi
Fraksi <i>n</i> - butanol	Isolat KLTP		
3680	3680	3450-3700 ^(a)	O-H <i>nonhydrogen-bonded</i> , ulur
3447	3477	3230-3550 ^(a)	-OH, ulur
2925	2924	2800-3000 ^(a)	-C _{sp3} -H, ulur
1649	1649	1640-1667 ^(a)	C=C, ulur
1458	1460	1440-1480 ^(d)	C-H pada CH ₂ tekuk
1385	1384	1385-1380 ^(d)	C-H pada C-H ₃ tekuk
	1261	1100-1300 ^(d)	C-O-C
1044	1091	1000-1090 ^(b)	Alkohol primer -CH ₂ -OH
		1087-1124 ^(a)	Alkohol sekunder C-O, ulur
781	802	780-975 ^(d)	C-H tekuk (<i>deformation vibration of aldehyde</i>)
669	668	650-790 ^(d)	C-H alkana

Keterangan: ^(a)Silverstein, dkk. (2005)

^(b)Kasal, dkk. (2010)

^(c)Khafagy, dkk. (1980)

^(d)Socrates (2001)

Berdasarkan Gambar 4.6 dan Tabel 4.2, diketahui bahwa terdapat kemiripan pola spektra antara spektra fraksi *n*-butanol dengan spektra isolat hasil KLTP. Kemiripan pola spektra menunjukkan bahwa kemungkinan senyawa-senyawa yang terkandung di dalam fraksi *n*-butanol memiliki gugus-gugus yang sama dengan isolat hasil pemisahan KLTP. Pada spektra IR fraksi *n*-butanol muncul serapan pada bilangan gelombang 3680 cm^{-1} dengan serapan O-H ulur, yang tidak berikatan hidrogen. Kemudian pada bilangan gelombang 3447 cm^{-1} muncul serapan yang menandakan adanya gugus -OH ulur, kemudian pada 2925 cm^{-1} yang menandakan adanya C-H alkana, pada 1649 cm^{-1} ada C=C, ulur. Pada spektra fraksi juga muncul serapan yang kebanyakan muncul pada senyawa golongan steroid, yakni gugus dimetil geminal, dengan munculnya puncak pada bilangan gelombang 1458 cm^{-1}

dan 1385 cm^{-1} . Kemudian pada 1044 cm^{-1} muncul alkohol primer $-\text{CH}_2\text{-OH}$. Pada bilangan gelombang 781 cm^{-1} muncul serapan C-H tekuk dari aldehyd dan pada 669 cm^{-1} muncul serapan C-H alkena.

Adapun pada identifikasi isolat steroid hasil KLTP menunjukkan munculnya serapan yang biasanya muncul pada senyawa golongan steroid, yakni pada bilangan gelombang 1460 cm^{-1} dan 1384 cm^{-1} yang menandakan adanya gugus dimetil geminal $[\text{CH}(\text{CH}_3)_2]$. Gugus dimetil geminal sering ditemukan pada senyawa golongan steroid, seperti yang dilakukan (Pratiwi, 2019) dalam identifikasi FTIR senyawa steroid hasil isolasi kromatografi kolom dari fraksi *n*-heksana mikroalga *Chlorella* sp. menunjukkan adanya gugus dimetil geminal pada bilangan gelombang 1463 cm^{-1} dan 1382 cm^{-1} , begitu juga yang dilakukan (Megawati et al., 2020) dalam isolat steroid hasil pemisahan KLTP mikroalga *Chlorella* sp. menunjukkan adanya gugus dimetil geminal dengan bilangan gelombang pada $1459,3\text{ cm}^{-1}$ dan $1381,0\text{ cm}^{-1}$. Selain itu pada isolat steroid hasil KLTP muncul serapan O-H yang tidak berikatan hidrogen pada bilangan gelombang 3680 cm^{-1} , kemudian muncul serapan melebar gugus -OH pada bilangan gelombang 3477 cm^{-1} dan diperkuat dengan adanya vibrasi alkohol sekunder C-O pada daerah bilangan gelombang 1091 cm^{-1} . Serapan umum akibat vibrasi ulur gugus $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$ muncul pada daerah 2924 cm^{-1} , Kemudian pada bilangan gelombang 1261 cm^{-1} terdapat serapan gugus C-O-C. Kemudian pada bilangan gelombang 1649 cm^{-1} terdapat puncak yang menunjukkan adanya vibrasi ulur gugus C=C yang didukung dengan adanya gugus C-H tekuk pada bilangan gelombang 802 cm^{-1} . Kemudian muncul serapan C-H alkena pada bilangan gelombang 668 cm^{-1} .

4.6 Uji Toksisitas Senyawa Steroid dengan Metode BSLT

Uji toksisitas dilakukan pada isolat senyawa steroid hasil KLTP dan fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp. terhadap larva udang *Artemia salina* L.. Parameter uji yang digunakan sebagai penentu aktivitas biologis dari senyawa pada uji ini adalah persen kematian dari larva udang *Artemia salina* L.

Telur larva udang ditetaskan dalam air laut yang telah diberi larutan ragi sambil di-aerasi selama 48 jam di bawah sinar lampu pijar. Larva udang *Artemia salina* L. merupakan organisme fototropik yang memerlukan cahaya untuk merangsang terjadi penetasan telur. Larva udang yang telah berumur 48 jam memiliki organ-organ yang sudah lengkap sehingga dapat mencerna air laut yang terkandung sampel uji hasil KLTP dan fraksi *n*-butanol.

Uji toksisitas pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek toksik dari sampel fraksi *n*-butanol dan isolat senyawa steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella* sp. terhadap larva udang *Artemia salina* L. yang kemudian didapatkan nilai LC₅₀. Perbedaan kepolaran antara sampel dengan air laut membuat keduanya tidak saling campur sehingga perlu dilakukan penambahan DMSO sebagai surfaktan yang dapat melarutkan sampel yang bersifat nonpolar dan air laut yang bersifat polar. DMSO memiliki ikatan S=O yang bersifat polar sehingga dapat melarutkan air laut dan juga memiliki dua alkil CH₃ yang bersifat nonpolar yang dapat melarutkan sampel yang bersifat nonpolar, sehingga penambahan DMSO menghasilkan sampel yang larut sempurna dalam air laut.

Sampel yang telah larut kemudian dimasukkan larva udang *Artemia salina* dan diberi tetesan ragi sebagai makanan larva udang. Pengujian dilakukan selama 24 jam dengan kondisi vial terbuka. Data hasil pengamatan kematian larva setelah

24 jam oleh sampel isolat steroid hasil KLTP dan fraksi *n*-butanol ditunjukkan pada Tabel 4.3 dan Tabel 4.4.

Tabel 4.3 Hasil uji toksisitas fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp.

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati (ekor)						%Mortalitas (%)	Mortalitas
	I	II	III	IV	V	Modus		
0*	0	0	0	0	0	0	0	0
0**	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	0	0	0	0	0	0
2	1	2	1	1	1	1	10	5
3	1	1	1	2	2	1	10	5
4	1	2	1	2	2	2	20	10
5	3	3	2	5	3	3	30	15

Keterangan: * : Kontrol pelarut *n*-butanol
 ** : Kontrol DMSO

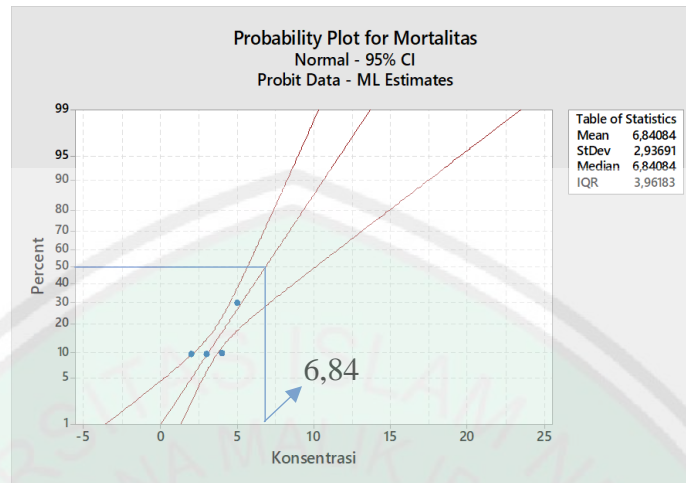
Tabel 4.4 Hasil uji toksisitas isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella* sp.

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati (ekor)						%Mortalitas (%)	Mortalitas
	I	II	III	IV	V	Modus		
0*	0	0	0	0	0	0	0	0
0**	0	0	1	0	0	0	0	0
1	0	1	0	0	0	0	0	0
2	0	2	1	1	1	1	10	5
3	1	2	2	1	2	2	20	10
4	7	2	3	2	2	2	20	10
5	3	3	4	2	3	3	30	15

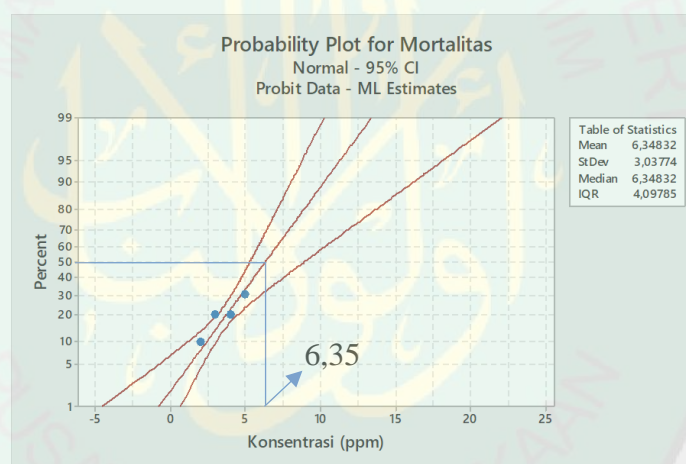
Keterangan: * : Kontrol pelarut *n*-heksana
 ** : Kontrol DMSO

Berdasarkan perhitungan analisis probit dari data kematian larva udang *Artemia salina* dalam larutan sampel fraksi *n*-butanol dan isolat steroid hasil KLTP

menggunakan aplikasi MINITAB 17, didapatkan kurva nilai LC₅₀ yang ditampilkan pada Gambar 4.8 dan Gambar 4.9.



Gambar 4.8 Kurva nilai LC₅₀ fraksi *n*-butanol



Gambar 4.9 Kurva nilai LC₅₀ isolat steroid hasil KLTP

Hubungan antara % mortalitas dan konsentrasi pada kurva LC₅₀ ditunjukkan dengan hubungan sumbu x dan sumbu y. Sumbu x pada kurva menunjukkan seri variasi konsentrasi yang digunakan dalam uji toksisitas, sedangkan sumbu y menunjukkan % mortalitas. Terdapat tiga garis yang terbentuk di dalam kurva, yakni *lower line*, *percentile line* dan *upper line*. *Lower line* berfungsi sebagai batas bawah yang menunjukkan konsentrasi terendah pada setiap % mortalitas,

sedangkan *percentile line* berfungsi sebagai garis normal yang menunjukkan ada tidaknya hubungan linear antara konsentrasi dengan % mortalitas. *Upper line* berfungsi sebagai batas atas yang menunjukkan konsentrasi tertinggi pada setiap % mortalitas (Pratiwi, 2019). Keterangan *Mean* yang muncul di samping kurva menunjukkan besar nilai LC_{50} , yang secara manual didapat dengan menarik garis horisontal dari persen 50 pada sumbu y sampai mengenai *percentile lime*, kemudian ditarik garis vertikal ke bawah dan dilihat pada konsentrasi berapa garis berhenti.

Tabel 4.6 Nilai Mortalitas dan LC_{50} Mikroalga *Chlorella* sp.

Jenis Sampel	Nilai Mortalitas					Nilai LC_{50} (ppm)
	1 ppm	2 ppm	3 ppm	4 ppm	5 ppm	
Fraksi <i>n</i> -butanol	0	5	5	5	15	6,84
Isolat KLTP	0	5	10	10	15	6,35

Berdasarkan Tabel 4.6, nilai LC_{50} fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp. sebesar 6,84 ppm, sedangkan nilai LC_{50} isolat steroid hasil KLTP lebih kecil, yakni sebesar 6,35 ppm. Hal ini menandakan kekuatan toksisitas isolat KLTP lebih kuat dibanding fraksi *n*-butanol walaupun tidak jauh berbeda, karena nilai LC_{50} yang kecil berarti konsentrasi yang diperlukan untuk mematikan 50% hewan uji adalah sedikit. Menurut Meyer, dkk. (1982) senyawa dengan nilai LC_{50} di bawah 30 ppm termasuk golongan senyawa sangat toksik dan berpotensi sebagai senyawa antitumor atau antikanker. Lisdawati, dkk. (2006) menyatakan bahwa semakin kecil nilai LC_{50} maka potensi untuk memiliki aktifitas biologis atau efek farmakologi seperti antikanker semakin tinggi.

4.7 Relevansi Penelitian dengan Perspektif Islam

Allah Swt. Maha Kuasa menciptakan segala sesuatu di bumi untuk dimanfaatkan oleh seluruh manusia, sebagaimana dalam surat al-Baqarah ayat 29, Allah Swt. berfirman.

هُوَ الَّذِي خَلَقَ لَكُمْ مَّا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا ثُمَّ اسْتَوَىٰ إِلَى السَّمَاءِ فَسَوَّاهُنَّ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ وَهُوَ بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ ﴿٢٩﴾

“Dialah Allah, yang menjadikan segala yang ada di bumi untuk kamu dan Dia berkehendak (menciptakan) langit, lalu dijadikan-Nya tujuh langit. Dan Dia Maha Mengetahui segala sesuatu”

Penggalan ayat هُوَ الَّذِي خَلَقَ لَكُمْ مَّا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا menurut tafsir *an-Nafahat al-*

Makiyyah dimaknai sebagai kabar, bahwa Allah Swt. menciptakan sesuatu di bumi sebagai suatu kebaikan dan kasih sayang kepada manusia untuk dapat diambil manfaatnya, dinikmati, dan dijadikan sebagai pelajaran (Asy-Syawid, 2018). Sebagai seorang yang belajar beriman dalam melihat segala ciptaan Allah Swt. harus berusaha meyakini bahwa Allah Swt. yang menghendaki segalanya. Begitu juga dalam pemanfaatan sumber daya yang ada di bumi, perlu diilmui agar dapat selalu ingat Maha Kuasa Allah Swt.. Perihal mengilmui ciptaan Allah Swt., Qoyyim (2016) dalam buku *Kumpulan Qosidah Ilmu*, yakni tafsir Al-Qur'an yang dilagukan, mengatakan bahwa *“Ilmu alam tuk sarana, memikirkan Sang Pencipta. Alam tanda kuasaNya, bukti keagunganNya. Ilmu alam tuk dunia, maut tiba habis guna. Kenal Tuhan Yang Maha Kekal, bermanfaat selamanya”*. Sehingga, mengingat siapa yang menghendaki segalanya merupakan bukti keimanan seseorang kepada Tuhannya.

Pemanfaatan nikmat Allah Swt. berupa segala segala sesuatu di bumi sudah sangat banyak dilakukan. Berbagai penemuan khususnya dalam bidang kimia telah banyak membantu kehidupan manusia, mulai dari obat, kosmetik, sumber energi, bahan makanan, bahan bangunan, dan sebagainya. Dalam penelitian ini, telah dicari potensi dari senyawa steroid mikroalga *Chlorella* sp. sebagai bakal obat antikanker melalui skrining awal uji toksisitas. Mikroalga *Chlorella* sp. sendiri merupakan tanaman golongan *Virdiplantae* yang hidup di air tawar dengan kandungan senyawa steroid yang lebih banyak dibanding tanaman penghasil steroid lainnya. Steroid hasil biosintesis mikroalga (fitosterol) memiliki banyak bioaktivitas, seperti sebagai antioksidan, antibakteri, dan antiinflamasi.

Selain itu senyawa ini memiliki potensi dijadikan sebagai senyawa antikanker dengan melihat nilai pada uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina*. Hasil yang didapat menunjukkan senyawa steroid berpotensi menjadi senyawa antikanker dengan nilai LC_{50} di bawah 30 ppm, yakni sebesar 6,35 ppm. Senyawa antikanker sendiri merupakan senyawa yang mampu menghambat poliferasi atau perkembangbiakan sel kanker. Untuk mengetahui senyawa tersebut dapat bekerja sebagai antikanker perlu dilakukan uji lanjutan terhadap sel kanker. Mencari potensi suatu senyawa dari sumber yang diberikan Allah Swt. merupakan implementasi usaha menjadi seorang *Ulul Albaab* (orang-orang yang berakal), sebagaimana definisi *Ulul Albaab* dalam firman Allah Swt. pada surat Ali 'Imran ayat 190 dan 191 yang berbunyi.

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَأَخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ
 اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا
 سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

“*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 atau dalam keadan 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."*

Menurut tafsir *al-Wajiz*, *Ulul Albaab* dimaknai sebagai orang-orang yang selalu mengingat Allah Swt. dalam segala kondisinya dan mentadaburi penciptaan langit dan bumi seraya mensucikan keagungan Allah Swt. dengan mengakui bahwa penciptaan makhluk tidak ada yang sia-sia dan bukan diperuntukkan sebagai hiburan, tapi untuk sebagai petunjuk atas kuasa dan hikmah Allah Swt., kemudian mereka memohon pada Allah Swt. untuk dihindarkan dari siksa neraka (Al-Zukhaili, 1982). Secara tersirat ayat ini memerintahkan manusia untuk menggunakan akalinya sebagai media memikirkan ciptaan-ciptaan Allah Swt. Sehingga, penelitian potensi dari senyawa steroid pada mikroalga *Chlorella* sp. merupakan bentuk memanfaatkan akal fikiran untuk memikirkan ciptaan Allah Swt., yakni mikroalga *Chlorella* sp.

Menggunakan akal fikiran untuk mentadaburi ayat-ayat *kauniyah* Allah Swt. merupakan bentuk dari amal saleh. Sebagaimana definisi amal saleh, yakni amal kebaikan yang dilandaskan karena Allah Swt. termasuk di dalamnya menggunakan akal fikiran untuk sarana memikirkan kebesaran Allah Swt. atas ciptaanNya. Dalam surat al-Kahfi ayat 110, Allah Swt. berfirman terkait tujuan dari amal saleh.

قُلْ إِنَّمَا أَنَا بَشَرٌ مِّثْلُكُمْ يُوحَىٰ إِلَيَّ أَنَّمَا إِلَهُكُمُ إِلَهُ وَاحِدٌ فَمَن كَانَ يَرْجُوا لِقَاءَ رَبِّهِ فَلْيَعْمَلْ عَمَلًا صَالِحًا وَلَا يُشْرِكْ بِعِبَادَةِ رَبِّهِ أَحَدًا ﴿١١٠﴾

“Katakanlah: Sesungguhnya aku ini manusia biasa seperti kamu, yang diwahyukan kepadaku: "Bahwa sesungguhnya Tuhan kamu itu adalah Tuhan yang Esa". Barangsiapa mengharap perjumpaan dengan Tuhannya, maka hendaklah ia mengerjakan amal yang saleh dan janganlah ia mempersekutukan seorangpun dalam beribadat kepada Tuhannya”.

Menurut tafsir *Ibnu Katsir* dari ayat tersebut, syarat amal diterima adalah dengan mengerjakannya semata-mata karena Allah Swt. dan sesuai dengan tuntunan syari’at yang telah dijelaskan oleh Rasulullah Saw. Sehingga dapat didefinisikan, amal saleh merupakan semua perbuatan baik yang dilakukan karena Allah Swt. dan tidak keluar dari ajaran syari’at agama. Oleh karena itu, pemanfaatan akal fikiran dan juga tenaga dalam penelitian uji toksisitas senyawa steroid hasil pemisahan KLTP fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp. yang telah dilakukan merupakan implementasi *Ulul Albaab* dan harapannya oleh Allah Swt. digolongkan sebagai amal saleh yang diterima Allah Swt.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach didapatkan nilai LC_{50} untuk fraksi *n*-butanol sebesar 6,84 ppm dan isolat hasil KLTP sebesar 6,35 ppm.
2. Identifikasi senyawa menggunakan spektrofotometer FTIR didapatkan serapan pada sampel fraksi *n*-butanol yakni serapan gugus OH, $C_{sp^3}-H_3$, C=C, C=O. Sedangkan pada isolat dugaan steroid hasil KLTP didapatkan serapan gugus OH, C=O, C=C, C-O-C. Gugus khas steroid $-CH(CH_3)_2$ (dimetil geminal) muncul pada fraksi *n*-butanol dan isolat hasil KLTP secara berturut-turut pada bilangan gelombang 1458 dan 1385 cm^{-1} , dan pada bilangan gelombang 1460 dan 1384 cm^{-1} .

5.2 Saran

Penelitian lanjutan perlu dilakukan utamanya dalam mengetahui potensi antikanker senyawa dengan melakukan uji terhadap sel kanker. Selain itu pemisahan lebih spesifik perlu dilakukan agar menghasilkan isolat yang lebih murni, seperti menggunakan metode kromatografi kolom vacuum atau kromatografi lapis tipis dua dimensi. Identifikasi senyawa steroid perlu dilakukan lebih lengkap untuk mengetahui struktur spesifik isolat steroid yang didapatkan, seperti menggunakan spektrofotometer UV-Vis, LC-MS/MS, H-NMR, maupun C-NMR

DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi, S. 1992. *Teknik Kimia Organik*. Bogor: IPB Press.
- Adhoni, S.A., Thimmappa, S.C., Kaliwal, B.B. 2016. Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Chorella vulgaris* Isolated from Unkal Lake. *J. Coastal Life Medicine*. 4, 368–373.
- Afif, S., Fasya, A.G., Ningsih, R.. 2016. Extraction, Toxicity Assay and Identification of Active Compounds of Red Algae (*Eucheuma cottonii*) from Sumenep Madura. *ALCHEMY*, 4(2).
- Al Zuhaili, Wahbah. 1982. *Tafsir Al-Wajiz*. Suraih: Darul Fikr.
- Andrade, L.M. 2018. *Chlorella* and *Spirulina* Microalgae as Sources of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements; an Overview. *MOJ Food Process. Technol*. 6.
- Andreas, S.Q., Chilmawati, D., 2014. Studi Pola Pertumbuhan dan Kualitas Sel *Chlorella* sp. yang Dihasilkan melalui Teknologi Pencucian Bibit Sel. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. 3(8).
- Anyasor, G., Onajobi, F., Osilesi, O., Adebawo, O., Oboutor, E. 2014. Chemical Constituents in *n*-butanol Fractions of *Costus afer* ker Gawl leaf and stem. *J. Intercult. Ethnopharmacol*. 3(2).
- Asy-Syawii, Muhammad bin Saleh. 2018. *An-Nafahat al-Makkiyah fii Tafsiiir Kitaab Robbi al-Bariyyah*. Riyadh: Perpustakaan Obeikan.
- Azah, S.N. 2019. Uji Toksisitas dan Identifikasi Isolat Steroid Hasil KLTP Ekstrak *n*-Heksana dan Petroleum Eter *Hydrilla verticillata* Menggunakan UV-Vis dan LC-MS/MS. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Bariyyah, S.K., Hanapi, A., Fasya, A.G., Abidin, M. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella* sp. Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *ALCHEMY*. 2(3).
- Becker, E.W., 1994. *Microalga for Human and Animal Consumption*. Australia: Cambridge University Press.
- Berk, Z. 2013. *Food Process Engineering and Technology (Second Edition). Advances in Molecular Toxicology*. Amerika: Academic Press.
- Burke, R.W., Diamondstone, B.I., Velapoldi, R.A., Menis, O. 1974. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol. *Clin. Chem*. 20, 794–801.
- Carlile, Michael J. 1996. The Discovery of Fungal Sex Hormones: II. Antheridiol. *Mycologist*. 10(3), 113-117.

- 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.
- Ditjen POM. 1986. *Materia Medika Indonesia Jilid V*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Drucker, M. 2002. *Chlorella: The Key to Health, Vitality and Longevity*. Greenville: Health & Happiness Publishing.
- Edewor, T.I., Landmark University, Omu Aran, Kwara State, Nigeria, Ologan, A.O. 2016. Quantitative Determination of The Saponin Content and GC-MS study of The Medicinal Plant *Cassythia filiformis* (linn.) leaves. *J. Coast. Life Med.* 4(2), 154–156.
- Fasya, A.G., Amaliyah S., Bariyyah, S.K., Khamidah, U., Hanapi, A., Romaidi. 2013. *Toxicity, Antioxidant and Antibacterial Activity Test of Methanol Extract of Chlorella sp. Microalgae Result Cultivation in Tauge Extract Medium*. Indonesia: The 4th Green Technology Faculty of Science and Technology Islamic of University State Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Fasya, A.G., Dinasti, A.R., Shofiyah, M., Rahmawati, L.M., Millati, N., Safitri, D.A., Handoko, S., Hanapi, A., Ningsih, R. 2018. Ekstraksi, Hidrolisis dan Partisi Metabolit Sekunder dari Mikroalga *Chlorella* sp. *ALCHEMY* 5, 5. <https://doi.org/10.18860/al.v5i1.3686>
- Fasya, A.G., Millati, N., Rahmawati, L.M., Iyani, R., Hanapi, A., Ningsih, R., Yuliani, D., Megawati, D.S., 2020. Isolation and Bioactivity of Steroids Isolates from Petroleum Ether Fraction of *Chlorella* sp. *Presented at The 8th International Conference Of The Indonesian Chemical Society (ICICS) 2019*, Bogor, Indonesia, p. 030005.
- Fikri, F.M. 2019. Antioxidant Test Steroid Isolate of Thin Layer Chromatography (TLC) from *n*-Hexane Fraction Microalgae *Chlorella* sp. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Foog, G.E. 1953. *The Metabolism of Algae*. London: Methoen and Co LTD.
- Friedman, D., Alex, B., Dov, T., Meir, E. 2006. Steroid Kit Foamable Composition and Uses Thereof. *United States Patent Application Publication*. US 2006/0018937 A1.
- Guenther, E. 1990. *The Essential Oil*. 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: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Handoko, D.S.P. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis. *SIGMA: Jurnal Sains dan Teknologi* 9(1).

- Harun, R., Singh, M., Forde, G.M., Danquah, M.K. 2010. Bioprocess Engineering of Microalgae to Produce a Variety of Consumer Products. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 14(3), 1037–1047.
- Hendayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung: PT. Remaja Rosdakarya.
- Herbert, R. 1995. *Biosintesis Metabolit Sekunder Edisi Kedua*. Diterjemahan oleh *Srigandono B.* Semarang: IKIP Semarang Press.
- Hwang, S.H., Jang, J.M., Lim, S.S. 2012. Isolation of Fucosterol from *Pelvetia siliquosa* by High-speed Countercurrent Chromatography. *Fish. Aquat. Sci.* 15, 191–195.
- Imamah, N., Fasya, A.G., Adi, T.K. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer FTIR. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Karger, B.L., Synder, L., Hosvart C. 1973. *An Introduction to Separation*. Brisbane: John and Sons.
- Kasal, A., Budesinsky, M., Griffiths, W.J. 2010. Spectroscopic Methods of Steroid Analysis, in: Makin, H.L.J., Gower, D.B. (Eds.), *Steroid Analysis*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 27–161.
- Kawaroe, M., Prartono, T., Sanuddin, A., Augustine, D.W.D. 2010. *Mikroalga Potensi dan Pemanfaatannya untuk Produksi Bio Bahan Bakar*. Bogor: IPB Press.
- Khafagy, S., Nazmi, N., Salam, N.A., Eldin, A.S. 1980. Steroid, Triterpenoid, and Flavonoid Constituents of *Euphorbia pulcherrima* Willd. Leaves. *Acta Pharms Jugosl.* 30, 103–107.
- Khamidah, U., Hanapi, A., Romaidi. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge Terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Khasanah, N.F. 2018. Uji Toksisitas Senyawa Aktif Fraksi *n*-Heksana, Kloroform, dan *n*-Butanol *Hydrilla verticillata* Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol dari Perairan Danau Ranu Pasuruan. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Khopkar, S.M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Krisna, I.G.A.P.S.A., Santi, S.R., Rustini, N.L. 2014. Senyawa Steroid pada Daun Gayam (*Inocarpus fagiferus Fosb*) dan Aktivitasnya Sebagai Antioksidan Terhadap Difenilpikril Hidrazil (DPPH). *Jurnal Kimia.* 8(2), 251–256.

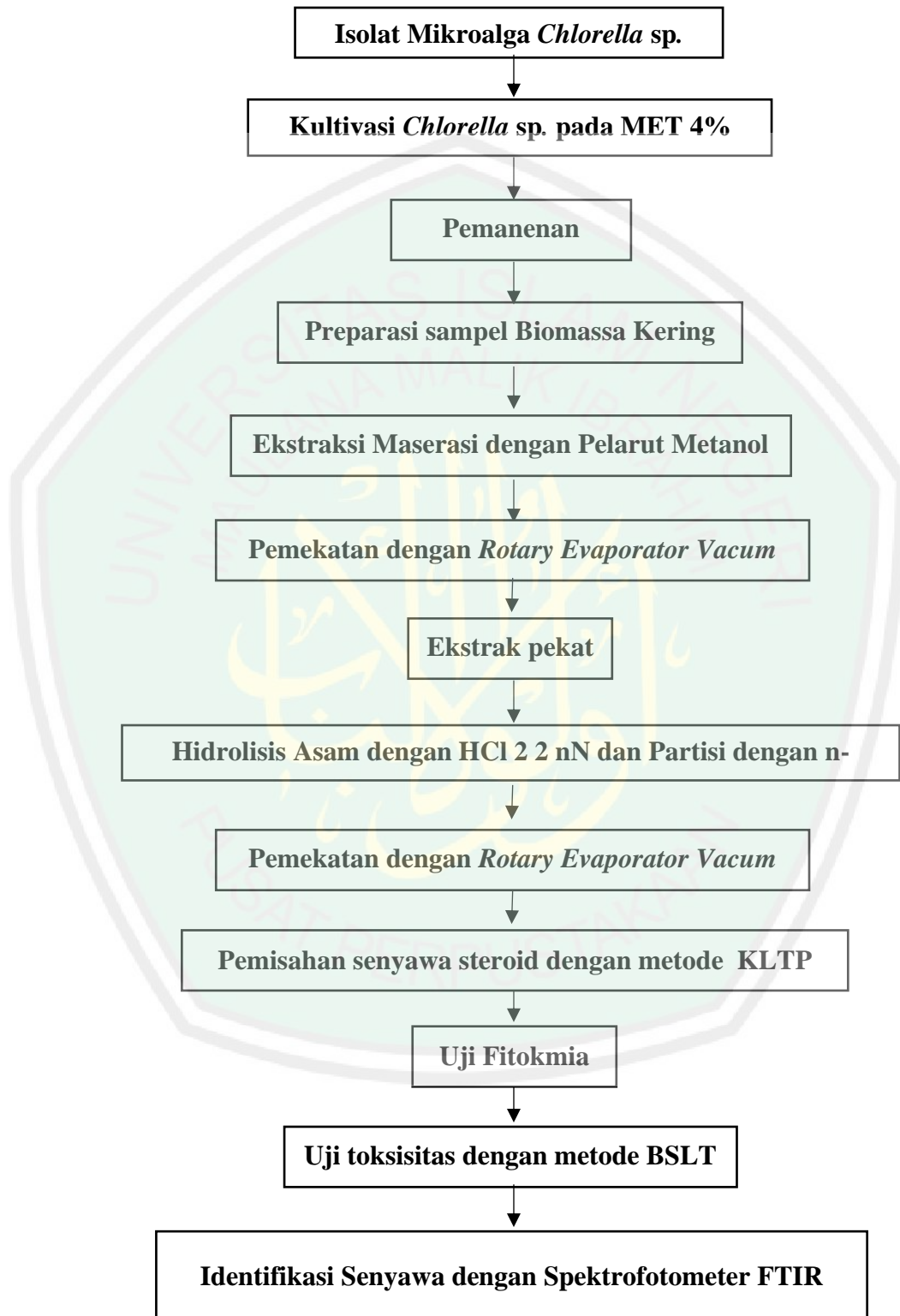
- Lisdawati, V., Sumali Wiryowidagdo, L. Broto S. Kardono. 2006. Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) dari Berbagai Fraksi Ekstrak Daging Buah dan Kulit Biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*). *Bul. Penel. Kesehatan*. 34(3), 111–118.
- Luo, X. 2015. Advances in Microalgae-Derived Phytosterols for Functional Food and Pharmaceutical Applications. *J. Mar. Drugs*. 13, 4321–4254.
- Masojidek, J., Torzillo, G. 2008. Mass Cultivation of Freshwater Microalgae. *Ecol. Eng.* 10.
- Megawati, D.S., Fasya, A.G., Pratiwi, R.A., Maghfiroh, N. 2020. Pharmacology Potency of Thin Layer Chromatography Steroid Isolates of *Chlorella* sp. Chloroform Fraction. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 456, 012012.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., Mc Laughlin, J.L. 1982. Brine Shrimp, A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent. *Plant Medica*. 45.
- Millati, N., 2016. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella* sp. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Muaja, A.D., Koleangan, H.S.J., Runtuwene, M.R.J. 2013. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) dengan Metode Soxhletasi. *J. MIPA*. 2(2), 115.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2020. PubChem Compound Summary for CID 71748929, (3beta,4alpha)-3-Hydroxycholest-5-en-4-yl acetate. Diakses 14 September 2020 dari: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3beta_4alpha_-3-Hydroxycholest-5-en-4-yl-acetate.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2018. *Chlorella* Taxonomy ID: 114055. Taxonomy. Diakses 11 Juni 2019 dari: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=114055&lvl=3&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&p=mapview&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock (accessed 11.6.19).
- Nihlati, I., Abdul, R., Triana, H., 2008. Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandu* (roxb) Schlecth) dengan Metode Penangkap DPPH (2,2-difenil-2-pikrihidrazil). *Fakultas Farmasi UGM*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Ningsi, E.M., Fasya, A.G., Hanapi, A. 2015. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid pada Fraksi *n*-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma spinosum*. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Oxtoby, D. 2001. *Kimia Modern Edisi Ke Empat Jilid I*. Jakarta: Erlangga.

- Pandji, 1989. *Industria Mikrobial*. Bogor: Pusat Antar Universitas.
- Poedjiadi, A. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Pratiwi, R.A. 2019. Uji Toksisitas Hasil Isolat Steroid Kromatografi Kolom Fraksi *n*-Heksana Mikroalga *Chlorella* sp. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Prihantini, N.B., Putri, B., Yuniati, R. 2010. Pertumbuhan *Chlorella* sp. dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan Variasi pH Awal. *MAKARA Sci. Ser.* 9.
- Qoyyim, Muhammad. 2016. *Kumpulan Qosidah Ilmu*. Jombang: IPdI.
- Rahayu, M.R., James, S., I Made. 2013. Uji Toksisitas dan Identifikasi Ekstrak Etanol Spons *Callyspongia aerizusa* terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Cakra Kim.* 1, 1–7.
- Rahmawati, L.M., 2016. Uji Antioksidan dan Identifikasi Senyawa Steroid Isolat Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan UV-Vis. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Rahmawati, N., Handayani, D., Mulyanti, N. 2011. Skrining Aktivitas Sitotoksik Ekstrak dan Fraksi Beberapa Jenis Spon Laut Asal Pulau Mandeh Sumatera Barat. *Fakultas Farmasi Unand*. Padang Universitas Andalas Padang.
- Rani, K., PK Sahoo, Nidhi Sandal. 2018. A Comprehensive Review on *Chlorella*-its Composition, Health Benefits, Market and Regulatory Scenario. *Pharma Innov. J.* 7, 584–589.
- Richmond, A.E. 1986. *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*. Florida: CRC Press.
- Risdianti, D., Murad, dan Putra, G. M. D. 2016. Kajian Pengeringan Jahe (*Zingiber Officinale* Rose) Berdasarkan Perubahan Geometrik dan Warna menggunakan Metode *Image Analysis*. *Jurnal Ilmiah Rekayasa Pertanian dan Biosistem*, 4 (2): 275-284
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: ITB Press.
- Rudiyanto. 2013. Kajian Antioksidan Terhadap DDPH dan Kandungan Fenolik Total Ekstrak Alga Merah Jenis *Euchemma cottoni* dari Perairan Sumenep. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Saifuddin, A.V., Rahayu, Teruna, H.Y. 2011. *Standarisasi Bahan Obat Alam*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Sari, I.R., 2017. Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis dan Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan LC-MS pada Fraksi *n*-Butanol Alga Merah (*Euchemma cottoni*) Perairan Wongsorejo Banyuwangi. *Skripsi* tidak diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.

- Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J. 2005. *Spectrometric Identification of Organic Compounds, 7th ed.* New York: John Wiley & Sons.
- Singh, A., Zahra, D.K., 2017. LC₅₀ Assessment of Cypermethrin in *Heteropneustes fossilis*: Probit analysis. *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 5(5), 126–130.
- Škaloud, P. 2007. Image Gallery of CAUP Strains H1955. 2007. *Chlorella vulgaris* var. *vulgaris* f. *vulgaris*. *Kated. Bot. Přír. Fak. Univerzity Karlovy V Praze*. Diakses 11 Desember 2019 dari: https://botany.natur.cuni.cz/algo/CAUP/H1955_Chlorella_vulgaris.htm
- Socrates, G. 2001. *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts, 3rd ed.* New York: Wiley.
- Soemirat, J. 2005. *Toksikologi Lingkungan*. Yogyakarta: UGM Press.
- Sutedjo, M.M. 1992. *Pupuk dan Cara Pemupukan*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Underwood. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Jakarta: Erlangga.
- Wahdaniyah, N.A. 2019. Uji Toksisitas Isolat Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Fraksi *n*-heksana Mikroalga *Chlorella* sp. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Wawrik, B., Harriman, B.H. 2010. Rapid, Colorimetric Quantification of Lipid from Algal Cultures. *J. Microbiol. Methods.* 80, 262–266.
- Wulandari, A.P., Naderia, F., Pattalia, A.E., Permata, D.R. 2010. Identifikasi Mikroalga di Sekitar Pantai Pangandaran dan Potensi Pertumbuhannya pada Formulasi Medium Ekstrak Tauge (MET). *Pros. Semin. Nas. Limnol.* V.
- Xiong, Q., Wilson, W.K., Pang, J. 2007. The Liebermann-Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangement of Cholesterol in Acid. *Lipids* 42, 87–96.
- Yaqub, Ali Musthofa. 2009. *Kriteria Halal-Haram untuk Pangan, Obat, dan Kosmetika menurut Al-Qur'an dan Hadits*. Jakarta: PT. Pustaka Firdaus
- Yudha, A.P., 2008. Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Dunaliella* sp. pada Umur Panen yang Berbeda. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

LAMPIRAN

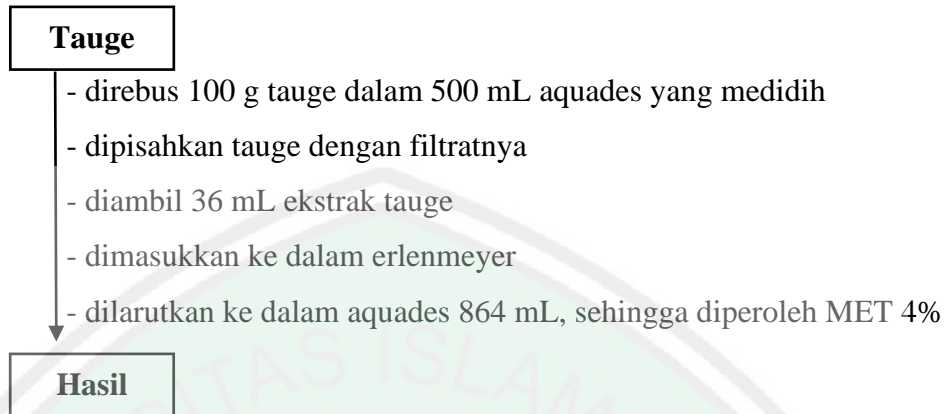
Lampiran 1. Rancangan Penelitian



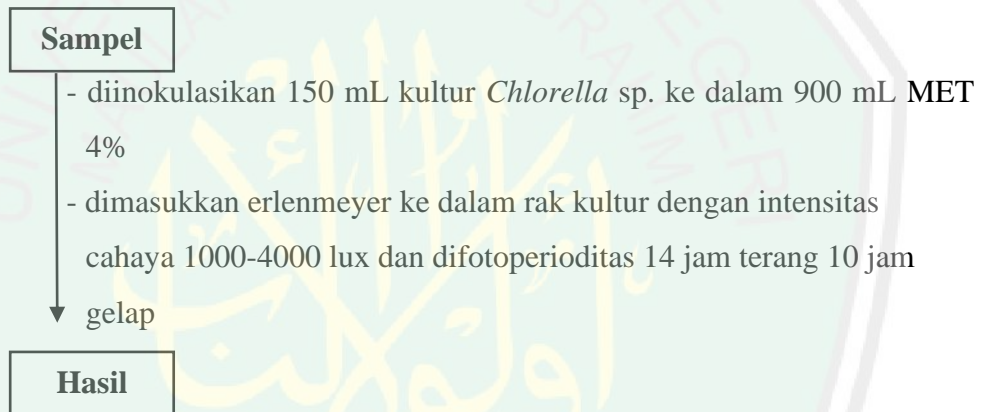
Lampiran 2. Skema Kerja

L.2.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella* sp.

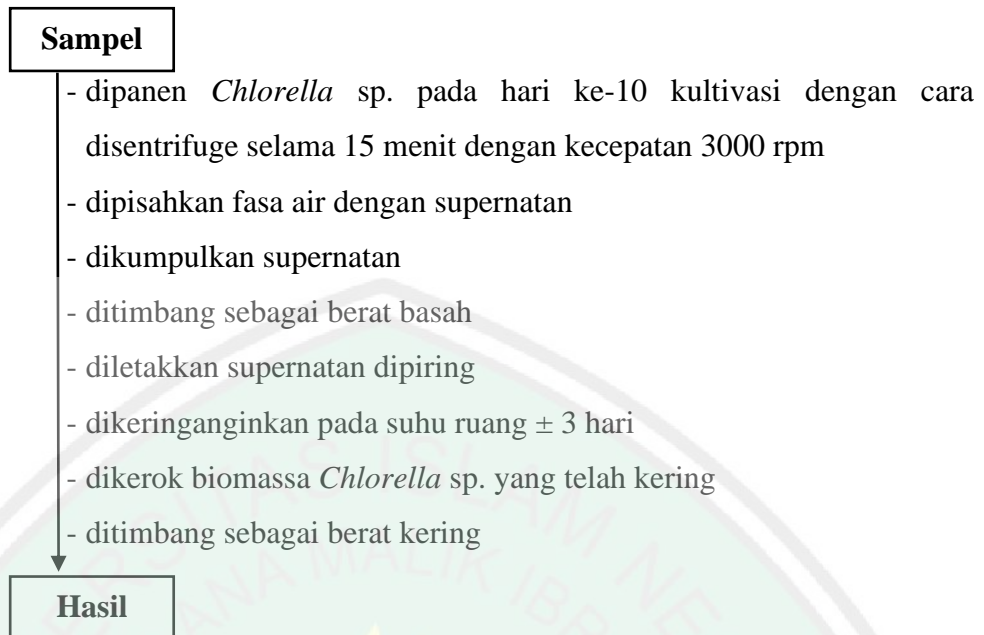
A. Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%



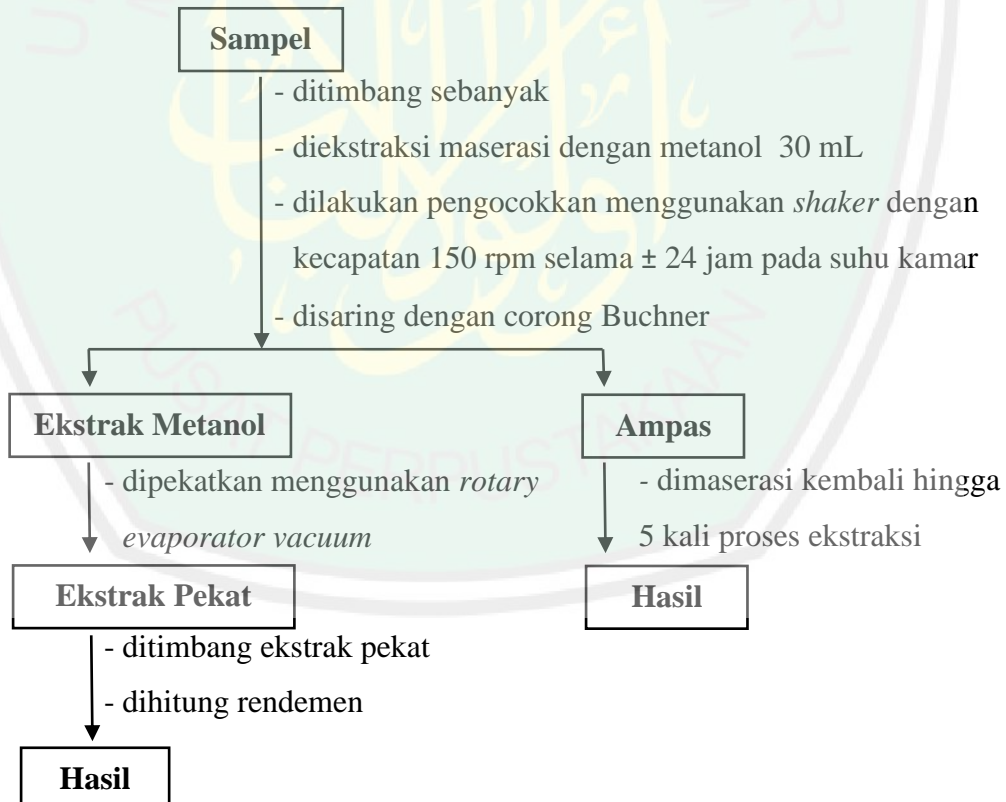
B. Kultivasi *Chlorella* sp. dalam MET 4%



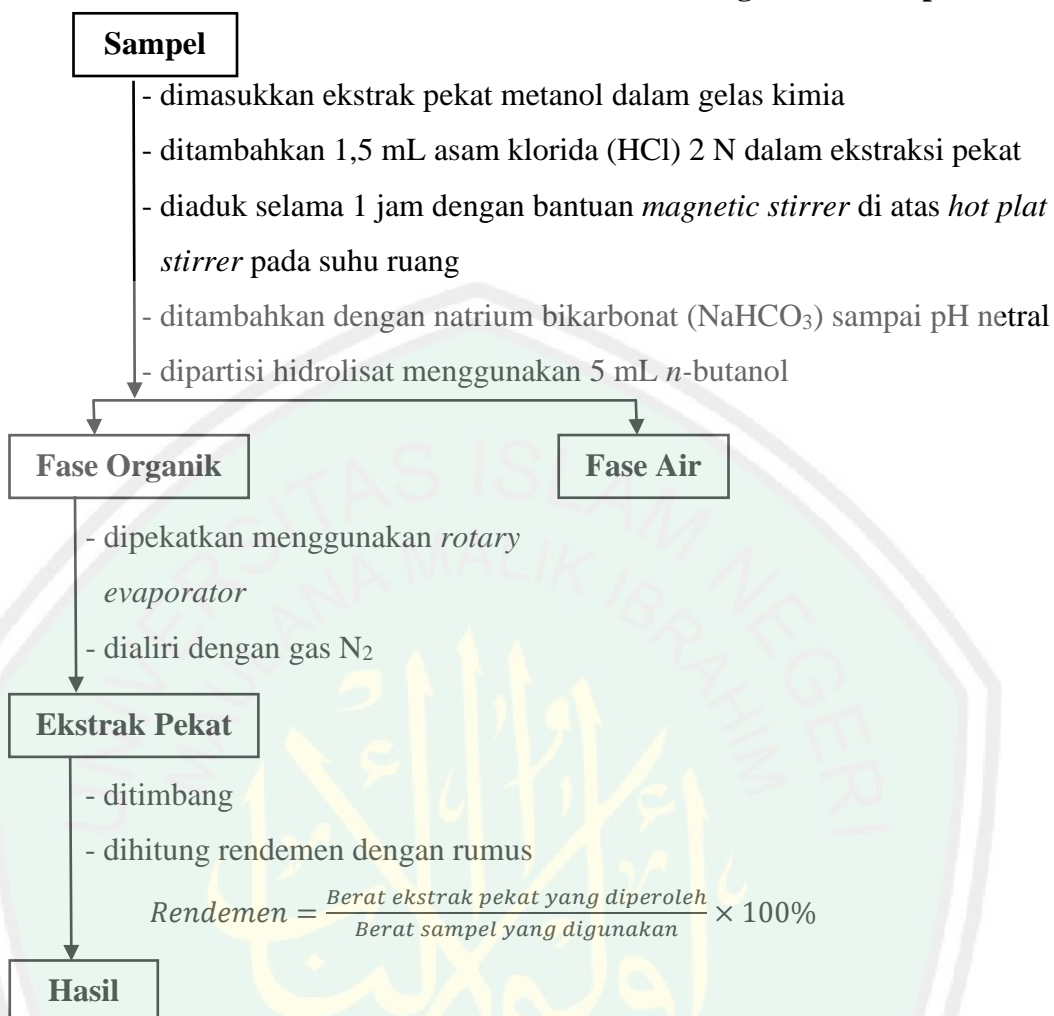
C. Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella* sp.



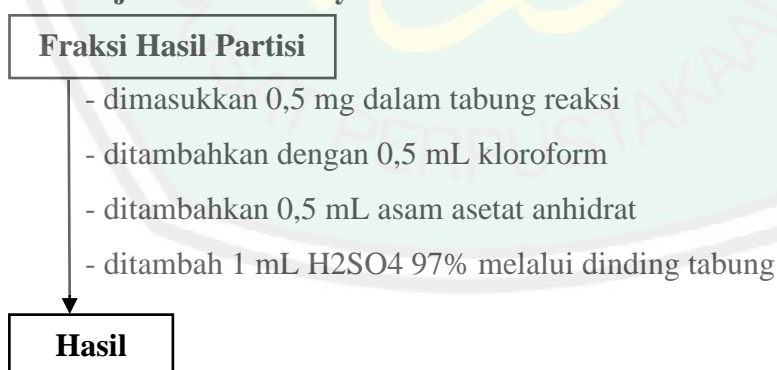
L.2.2 Ekstraksi Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Maserasi



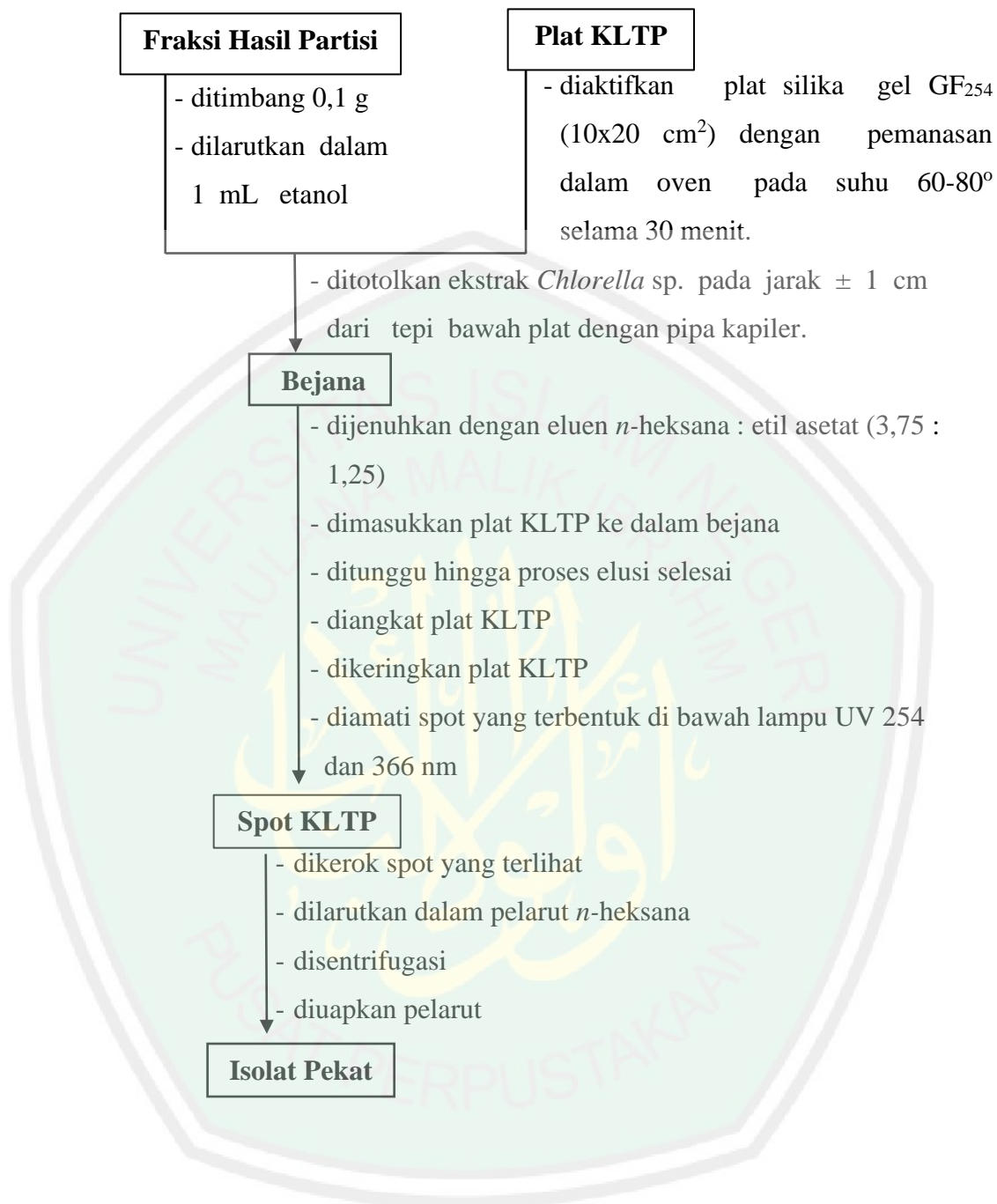
L.2.3 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp.



L.2.4 Uji Fitokimia Senyawa Steroid



L.2.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT Preparatif



L.2.6 Uji Toksisitas dengan Larva Udang *Artemia salina*

A. Penetasan Telur Larva

Air Laut 250 mL

- ditempatkan dalam wadah penetasan
- dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina*
- diaerasi selama \pm 48 jam sampai telur menetas

Hasil

B. Uji Toksisitas pada Sampel Fraksi *n*-Butanol

Sampel

- dipipet larutan stok 100 ppm sebanyak 100, 200, 300, 400, 500 μ L
- dimasukkan kedalam botol vial
- diuapkan pelarutnya
- ditambahkan 100 μ L DMSO dan setetes larutan ragi
- ditambahkan 2 mL air laut dan dikocok
- dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L
- ditambahkan air laut hingga 10 mL
- diamati dibawah lampu pijar selama 24 jam

Hasil

C. Uji Toksisitas pada Sampel Isolat Steroid Hasil KLTP

Sampel

- dipipet larutan stok 36 ppm sebanyak 270, 550, 830, 1100, 1380 μ L
- dimasukkan kedalam botol vial
- diuapkan pelarutnya
- ditambahkan 100 μ L DMSO dan setetes larutan ragi
- ditambahkan 2 mL air laut dan dikocok
- dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L
- ditambahkan air laut hingga 10 mL
- diamati dibawah lampu pijar selama 24 jam

Hasil

D. Kontrol DMSO**DMSO**

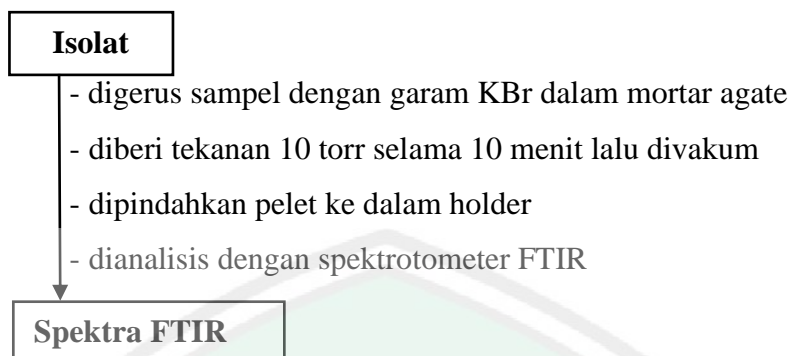
- dimasukkan 100 μ L ke dalam botol vial
- ditambah setetes larutan ragi roti
- ditambahkan 2 mL air laut
- dikocok
- dimasukkan 10 ekor larva udang
- ditambahkan air laut hingga 10 mL
- diamati dibawah lampu pijar selama 24 jam

Hasil**E. Kontrol Pelarut****Pelarut**

- dimasukkan pelarut dalam botol vial sesuai konsentrasi
- diupkan hingga kering
- ditambah setetes larutan ragi roti dan 2 mL air laut
- dikocok
- dimasukkan 10 ekor larva udang
- ditambahkan air laut hingga 10 mL
- diamati dibawah lampu pijar selama 24 jam

Hasil

L.2.7 Identifikasi Struktur Senyawa Steroid Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Spektrofotometer FTIR



Lampiran 3. Perhitungan Kultivasi dan Pembuatan Reagen dan Larutan

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

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

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

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

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

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

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

b. Pembuatan MET 4 % sebanyak 900 ml

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

$$\begin{aligned} \text{MET 4 \%} &= 4/100 \times 900 \text{ mL} \\ &= 36 \text{ mL ekstrak tauge} \end{aligned}$$

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

- c. **Kultivasi dalam botol air mineral 1200 ml dengan memaksimalkan daya tampung botol air mineral**

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

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

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

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

- d. **Pembuatan MET 4 % sebanyak 1200 ml**

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

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

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

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

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

$$= 1152 \text{ mL}$$

L.3.2 Pembuatan Larutan HCl 2 N

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

L.3.3 Pembuatan Reagen Lieberman-Burchard

- Asam sulfat pekat = 5 mL
- Anhidrida asetat = 5 mL
- Etanol absolut = 50 mL

Cara pembuatannya adalah disiapkan etanol absolut dan dimasukkan dalam beaker glass, kemudian anhidrida asetat dituangkan secara perlahan pada dinding beaker glass. Selanjutnya asam sulfat pekat dicampur kedalam beaker glass dan dikocok secara perlahan.

L.3.4 Pembuatan larutan Eluen *n*-Heksana dan Etil Asetat untuk KLTP

Eluen *n*-heksana:etil asetat yang digunakan untuk KLTP dibuat sebanyak 20 mL dengan perbandingan 3,75:1,25. Sehingga, volume *n*-heksana yang digunakan adalah 15 mL dan etil asetat adalah 5 mL. Selanjutnya, campuran dijenuhkan dalam *chamber* KLT.

L.3.5 Pembuatan larutan stok 100 ppm ekstrak metanol fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp. untuk KLTP

$$\begin{aligned} \text{ppm} &= \text{mg/L} \\ \text{mg} &= \text{ppm} \cdot \text{L} \text{ (jika dibuat larutan stok 1 mL = 10-3L)} \\ &= 100 \text{ ppm} \cdot 0,025 \text{ L} \\ &= 2,5 \text{ mg} \end{aligned}$$

Cara Pembuatannya larutan stok 100 ppm adalah dibuat dengan diambil 2,5 mg ekstrak pekat metanol fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp., kemudian dilarutkan dengan pelarutnya (*n*-butanol), dan ditanda bataskan dalam labu takar 25 mL.

L.3.6 Perhitungan Konsentrasi Larutan untuk Uji Toksisitas

a. Pembuatan larutan stok 36 ppm isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* untuk uji toksisitas

$$\begin{aligned} \text{ppm} &= \text{mg/L (jika dibuat larutan stok 1 mL} = 10^{-3} \text{ L)} \\ &= 0,9 \text{ mg/ 0,025 L} \\ &= 36 \text{ ppm} \end{aligned}$$

b. Pembuatan Variasi Konsentrasi dari Larutan Stok 36 ppm Isolat Ssteroid Hasil KLTP Mikroalga *Chlorella sp.* untuk Uji Toksisitas

1 ppm	2 ppm
$M1.V1 = M2.V2$ $36 \text{ ppm. X} = 1 \text{ ppm. 10 mL}$ $X = 10 \text{ ppm.mL/ 36 ppm}$ $X = 0,27 \text{ mL} = 270 \mu\text{L}$	$M1.V1 = M2.V2$ $36 \text{ ppm. X} = 2 \text{ ppm. 10 mL}$ $X = 20 \text{ ppm.mL/ 36 ppm}$ $X = 0,55 \text{ mL} = 550 \mu\text{L}$
3 ppm	4 ppm
$M1.V1 = M2.V2$ $36 \text{ ppm. X} = 3 \text{ ppm. 10 mL}$ $X = 30 \text{ ppm.mL/ 36 ppm}$ $X = 0,830 \text{ mL} = 830 \mu\text{L}$	$M1.V1 = M2.V2$ $36 \text{ ppm. X} = 4 \text{ ppm. 10 mL}$ $X = 40 \text{ ppm.mL/ 36 ppm}$ $X = 1,110 \text{ mL} = 1100 \mu\text{L}$
5 ppm	
$M1.V1 = M2.V2$ $36 \text{ ppm. X} = 5 \text{ ppm. 10 mL}$ $X = 50 \text{ ppm.mL/ 36 ppm}$ $X = 1,380 \text{ mL} = 1380 \mu\text{L}$	

c. Pembuatan Variasi Konsentrasi dari Larutan Stok 100 ppm Fraksi *n*-butanol Mikroalga *Chlorella sp.* untuk Uji Toksisitas

1 ppm	2 ppm
$M1.V1 = M2.V2$ $100 \text{ ppm. X} = 1 \text{ ppm. 10 mL}$ $X = 10 \text{ ppm.mL/ 100 ppm}$ $X = 0,1 \text{ mL} = 100 \mu\text{L}$	$M1.V1 = M2.V2$ $100 \text{ ppm. X} = 2 \text{ ppm. 10 mL}$ $X = 20 \text{ ppm.mL/ 100 ppm}$ $X = 0,4 \text{ mL} = 400 \mu\text{L}$
3 ppm	4 ppm
$M1.V1 = M2.V2$ $100 \text{ ppm. X} = 3 \text{ ppm. 10 mL}$ $X = 30 \text{ ppm.mL/ 100 ppm}$ $X = 0,2 \text{ mL} = 200 \mu\text{L}$	$M1.V1 = M2.V2$ $100 \text{ ppm. X} = 4 \text{ ppm. 10 mL}$ $X = 40 \text{ ppm.mL/ 100 ppm}$ $X = 0,5 \text{ mL} = 500 \mu\text{L}$
5 ppm	
$M1.V1 = M2.V2$ $100 \text{ ppm. X} = 5 \text{ ppm. 10 mL}$ $X = 50 \text{ ppm.mL/ 100 ppm}$ $X = 0,3 \text{ mL} = 300 \mu\text{L}$	

Lampiran 4. Data Hasil Penelitian

L.4.1 Rendemen Hasil Maeserasi

Berat sampel (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + ekstrak pekat (g)	Berat ekstrak pekat (g)
6	105,11	105,96	0,85

$$\begin{aligned} \% \text{ Randemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel awal}} \times 100\% \\ &= \frac{0,85 \text{ gram}}{6 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 14,17\% \end{aligned}$$

L.4.2 Rendemen Hasil Hidrolisis dan Partisi

Berat ekstrak metanol yang dihidrolisis (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + fraksi <i>n</i> -butanol (g)	Berat fraksi <i>n</i> -butanol (g)
0,74	98,36	98,66	0,30

$$\begin{aligned} \% \text{ Randemen} &= \frac{\text{Berat fraksi } n\text{-butanol}}{\text{Berat ekstrak metanol}} \times 100\% \\ &= \frac{0,3 \text{ gram}}{0,74 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 40,54\% \end{aligned}$$

L.4.3 Data R_f Pemisahan KLTP

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

No. Spot	Jarak tempuh spot (cm)	Jarak tempuh fasa gerak (cm)	Nilai R _f
1	0,36	18	0,02
2	3,24		0,18
3	9,54		0,53
4	10,08		0,56
5	11,16		0,62
6	11,88		0,66
7	12,90		0,72
8	13,14		0,73

9	13,86		0,77
10	14,94		0,83
11	15,84		0,88

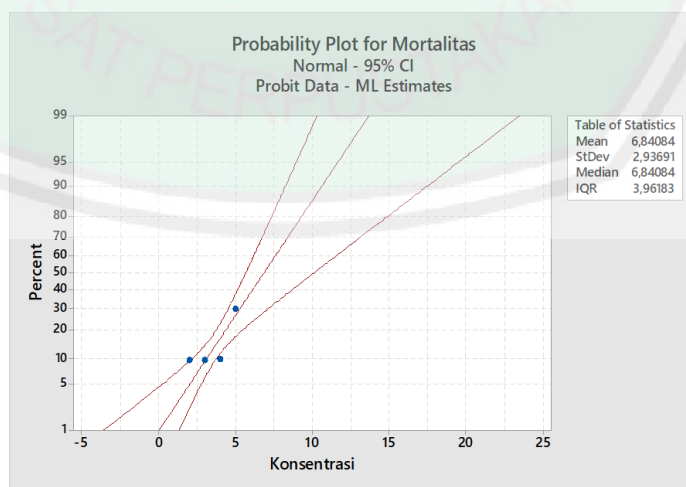
L.4.4 Data Kematian Larva dan Perhitungan Nilai LC₅₀ dengan MINITAB 17

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

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

Tabel L.4.4.1 Hasil uji toksisitas fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp.

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati (ekor)						%Mortalitas (%)	Mortalitas
	I	II	III	IV	V	Modus		
0*	0	0	0	0	0	0	0	0
0**	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	1	0	0	0	0	0	0
2	1	2	1	1	1	1	10	5
3	1	1	1	2	2	1	10	5
4	1	2	1	2	2	2	20	10
5	3	3	2	5	3	3	30	15



Gambar L.4.4.1 Kurva nilai LC₅₀ fraksi *n*-butanol

Probit Analysis: Mortalitas; N versus Konsentrasi (ppm)

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	-2,32927	0,328967	-7,08	0,000
Konsentrasi (ppm)	0,340494	0,0856695	3,97	0,000
Natural Response	0			
Log-Likelihood = -82,604				

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	5,80312	3	0,122
Deviance	6,59750	3	0,086

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95,0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	6,84084	0,870138	5,13540	8,54628
StDev	2,93691	0,738935	1,79360	4,80900

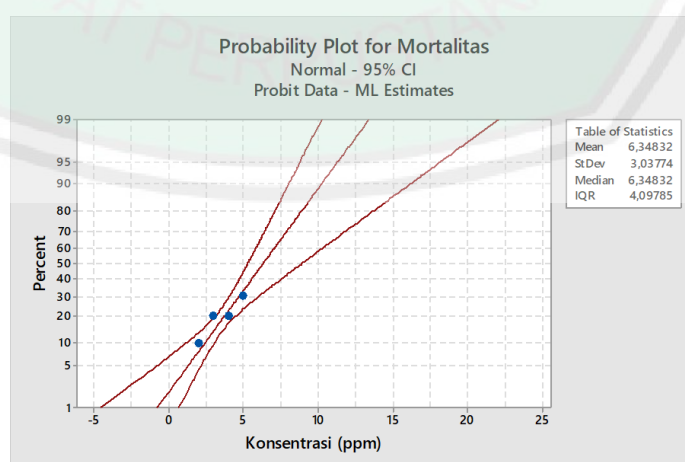
Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95,0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	0,008579	0,964109	-3,61635	1,31012
2	0,809176	0,776927	-2,06551	1,87497
3	1,31713	0,662516	-1,09063	2,24243
4	1,69924	0,580145	-0,36518	2,52676
5	2,01006	0,516663	0,217176	2,76579
6	2,27462	0,466169	0,704815	2,97728
7	2,50658	0,425548	1,12378	3,17131
8	2,71428	0,392987	1,48959	3,35436
9	2,90317	0,367345	1,81216	3,53097
10	3,07705	0,347834	2,09819	3,70443
20	4,36908	0,370403	3,74033	5,47666
30	5,30073	0,529181	4,5312	7,14781
40	6,09679	0,699389	5,12666	8,65604
50	6,84084	0,870138	5,65829	10,0907
60	7,5849	1,04653	6,17826	11,537

70	8,38096	1,23877	6,72742	13,0915
80	9,3126	1,4665	7,36461	14,9163
90	10,6046	1,78517	8,24256	17,4528
91	10,7785	1,82823	8,36037	17,7944
92	10,9674	1,87504	8,48828	18,1657
93	11,1751	1,92656	8,62885	18,574
94	11,4071	1,98414	8,78575	19,0301
95	11,6716	2,04986	8,96458	19,5504
96	11,9824	2,12714	9,17456	20,1618
97	12,3646	2,22224	9,43253	20,9136
98	12,8725	2,34879	9,77519	21,9133
99	13,6731	2,5485	10,3148	23,4894

Tabel L.4.4.1 Hasil uji toksisitas fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp.

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati (ekor)						%Mortalitas (%)	Mortalitas
	I	II	III	IV	V	Modus		
0*	0	0	0	0	0	0	0	0
0**	0	0	1	0	0	0	0	0
1	0	1	0	0	0	0	0	0
2	0	2	1	1	1	1	10	5
3	1	2	2	1	2	2	20	10
4	7	2	3	2	2	2	20	10
5	3	3	4	2	3	3	30	15



Gambar L.4.6.1 Kurva nilai LC₅₀ fraksi *n*-heksana

Probit Analysis: Mortalitas; N (jumlah larva) versus Konsentrasi (ppm)

Distribution: Normal
Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas	Event	40
	Non-event	210
N	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-2,08981	0,293655	-7,12	0,000
Konsentrasi (ppm)	0,329192	0,0783216	4,20	0,000
Natural Response	0			
Log-Likelihood = -99,973				

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	4,53730	3	0,209
Deviance	6,27015	3	0,099

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95,0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	6,34832	0,737492	4,90286	7,79377
StDev	3,03774	0,722743	1,90560	4,84250

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95,0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-0,71853	1,05437	-4,51433	0,719157
2	0,109556	0,86759	-2,98311	1,30432
3	0,63495	0,751803	-2,01714	1,68113
4	1,03018	0,666898	-1,29503	1,96913
5	1,35167	0,599845	-0,71187	2,20763
6	1,62531	0,544736	-0,21971	2,41482
7	1,86524	0,498403	0,207488	2,60082
8	2,08007	0,458978	0,585408	2,77194
9	2,27545	0,425289	0,924173	2,93251
10	2,45529	0,39657	1,23064	3,08569
20	3,79169	0,310779	3,17336	4,55846
30	4,75532	0,422241	4,10125	6,09339
40	5,57871	0,575667	4,75216	7,54685
50	6,34832	0,737492	5,32034	8,94558
60	7,11792	0,907441	5,8716	10,3612

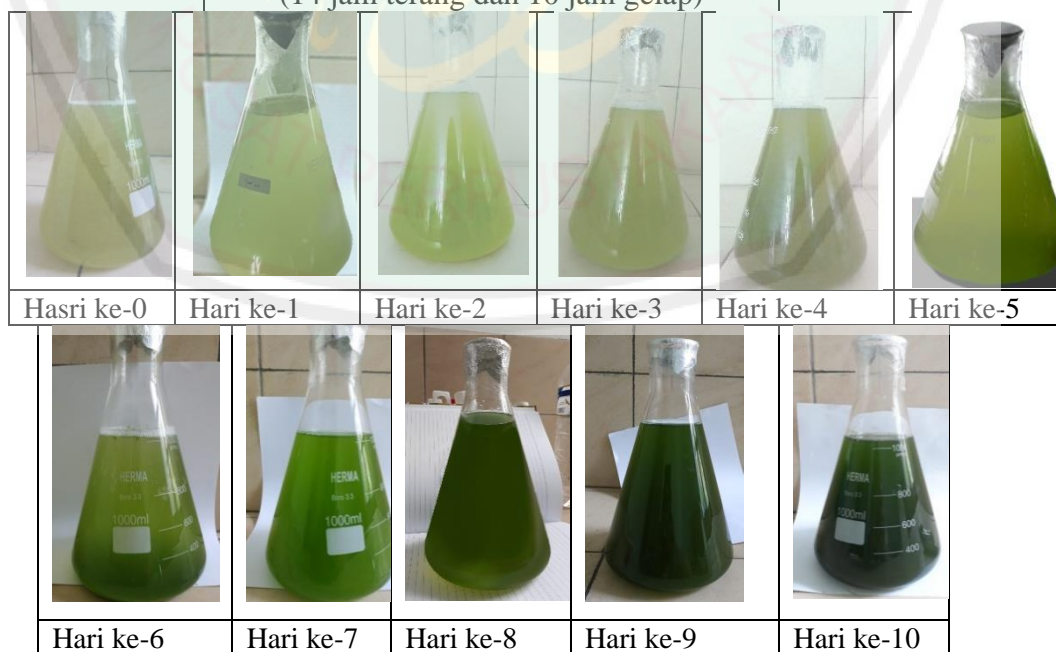
70	7,94131	1,09398	6,45177	11,8854
80	8,90495	1,31575	7,12381	13,6762
90	10,2413	1,62676	8,04893	16,1666
91	10,4212	1,66881	8,17303	16,5021
92	10,6166	1,71453	8,30777	16,8667
93	10,8314	1,76486	8,45583	17,2677
94	11,0713	1,82112	8,62109	17,7157
95	11,345	1,88534	8,80944	18,2267
96	11,6665	1,96086	9,03059	18,8272
97	12,0617	2,05381	9,30227	19,5656
98	12,5871	2,17751	9,66313	20,5475
99	13,4152	2,37276	10,2314	22,0957

Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian





L.5.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella* sp.



Kultivasi dengan fotoperiodisitas
(14 jam terang dan 10 jam gelap)








L.5.2 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella* sp.

			
Biomassa cair mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	Biomassa sebelum disentrifugasi	Biomassa setelah disentrifugasi	Biomassa pekat <i>Chlorella</i> sp.

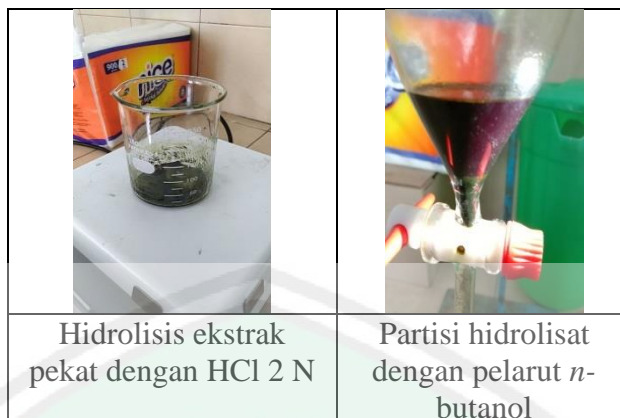
L.5.3 Preparasi Mikroalga *Chlorella* sp.

	Pengeringangan Biomassa <i>Chlorella</i> sp.
	Biomassa Kering <i>Chlorella</i> sp.

L.5.4 Ekstraksi Maserasi

				
Perendaman sampel dalam metanol	Pengadukan dengan <i>shaker</i> selama 24 jam	Penyaringan sampel	Filtrat hasil penyaringan	Ekstrak metanol pekat mikroalga <i>Chlorella</i> sp.

L.5.5 Hidrolisis dan Partisi

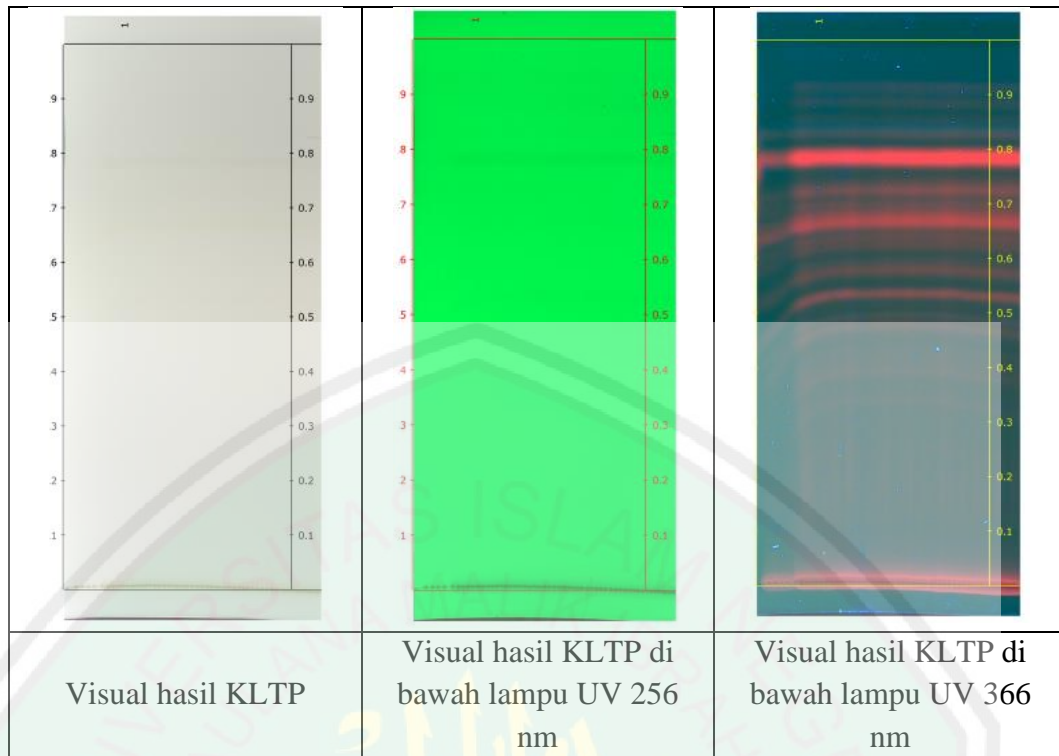


L.5.6 Uji Fitokimia Steroid



L.5.7 Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

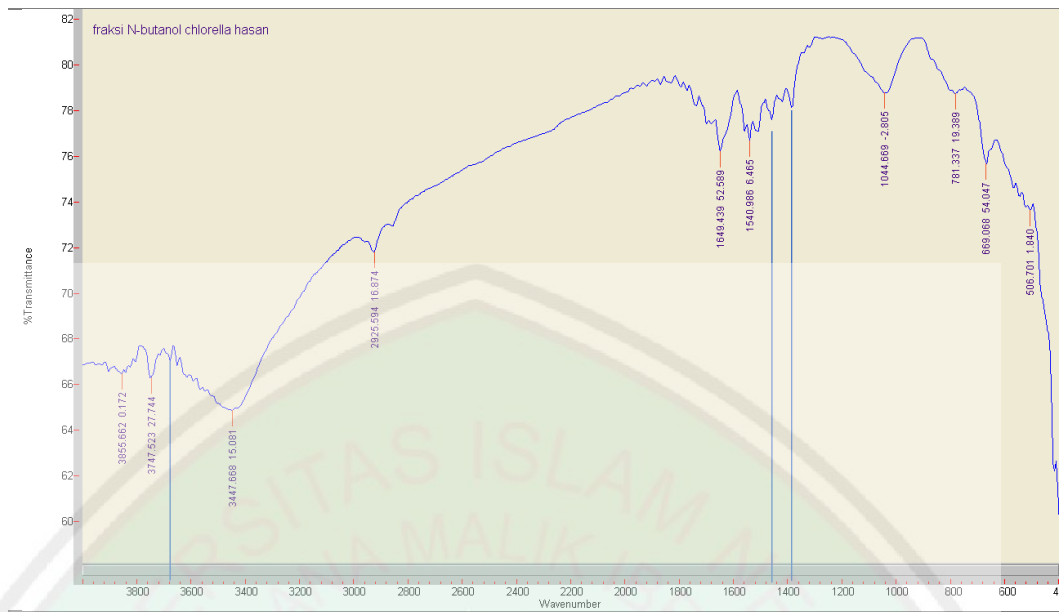




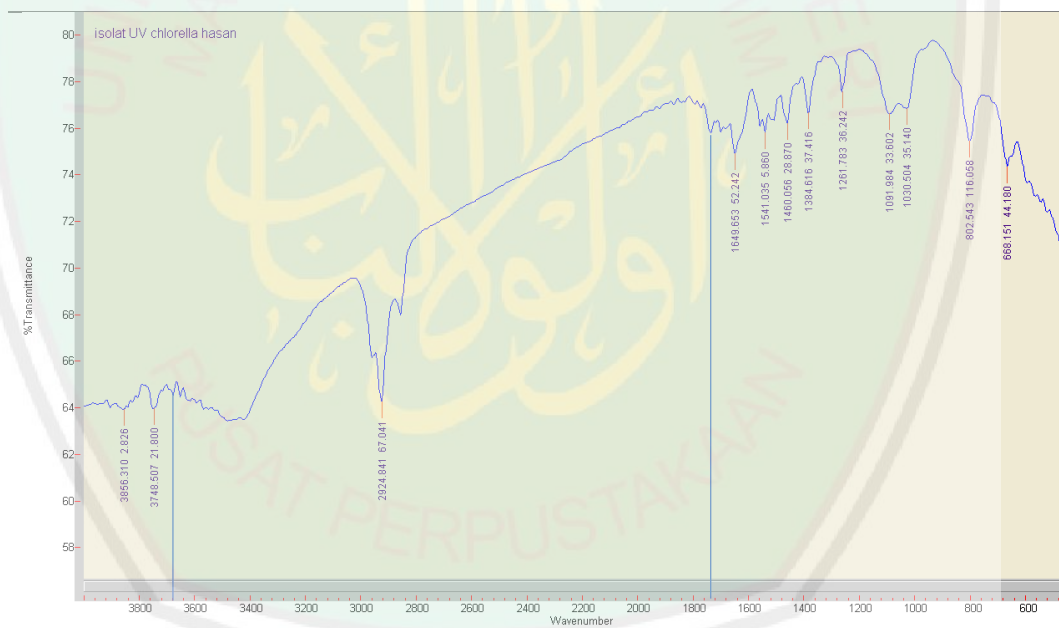
L.5.8 Uji Toksisitas



Lampiran 6 Spektra FTIR



Spektra IR fraksi *n*-butanol



Spektra IR isolat hasil KLTP