

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL PEMISAHAN
KLTP FRAKSI *n*-BUTANOL MIKROALGA *Chlorella* sp.**

SKRIPSI

oleh:
VINNA SITI HARDIYANTI FAUZI
NIM. 16630076



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

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL PEMISAHAN
KLTP FRAKSI *n*-BUTANOL MIKROALGA *Chlorella* sp.**

SKRIPSI

oleh:
VINNA SITI HARDIYANTI FAUZI
NIM. 16630076

**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**

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL PEMISAHAN
KLTP FRAKSI *n*-BUTANOL MIKROALGA *Chlorella* sp.**

SKRIPSI

Oleh:
VINNA SITI HARDIYANTI FAUZI
NIM. 16630076

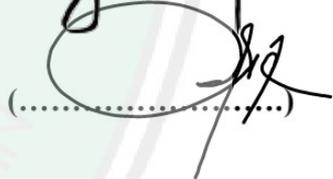
Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 08 Desember 2020

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

(.....

.....)

Pembimbing II : Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc
NIDT. 19900906 20180201 2 23

(.....

.....)

Mengetahui,
Ketua Jurusan


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

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN ISOLAT STEROID HASIL PEMISAHAN
KLTP FRAKSI *n*-BUTANOL MIKROALGA *Chlorella* sp.**

SKRIPSI

Oleh:
VINNA SITI HARDIYANTI FAUZI
NIM. 16630076

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 08 Desember 2020

Penguji Utama	: Elok Kamilah Hayati, M.Si NIP. 19790620 200604 2 002	(..... )
Ketua Penguji	: Rachmawati Ningsih, M.Si NIP. 19810811 200801 2 010	(..... )
Sekretaris Penguji	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	(..... )
Anggota Penguji	: Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc NIDT. 19900906 20180201 2 23	(..... )

**Mengesahkan,
Ketua Jurusan**


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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Vinna Siti Hardiyanti Fauzi
NIM : 16630076
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Pemisahan
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, 29 Desember 2020
Yang membuat pernyataan,



Vinna Siti Hardiyanti Fauzi
NIM. 16630076

PERSEMBAHAN

Dengan ucapan Alhamdulillahirrabbi'l'aalamiin, atas rahmat dan karunia-Nya, Allah Swt. berikan saya kekuatan dan kemampuan hingga saya berada di tahap ini. Tak hanya itu, penuh syukur saya panjatkan atas nikmat dan rizki dihadapkannya orang-orang terkasih yang turut andil menemani dan menyemangati dalam setiap proses panjang pengerjaan skripsi ini.

Karya ini merupakan pencapaian kecil yang saya persembahkan untuk kedua orang tua saya, Abi Ase Badrussalam & Ummi Elin Nurliani beserta keluarga besar tercinta, yang senantiasa menguatkan setiap langkah kecil ini lewat do'a-do'a serta pengorbanan riil materiil yang tak mungkin terbalaskan. Kasih sayang yang begitu besar, nasihat yang begitu tulus menjadi bekal penting saya dalam menjalani setiap alur dari proses kehidupan ini. Semoga setiap langkah yang sudah dan sedang saya tentukan mendapat keridloan penuh abi dan ummi, sebagai penghantar untuk mendapat keridloan yang hakiki dari Allah Swt.

Selanjutnya, saya persembahkan untuk guru-guru saya, yang dengan penuh hormat dan ta'dzim, saya haturkan beribu-ribu ucapan terimakasih. Segala ilmu, nasehat, dan bimbingan yang diberikan semoga bermanfaat, berkah, serta dapat saya amalkan dan ajarkan kembali pada umat sehingga mudah-mudahan menjadi pahala yang tak pernah terputus dan bermanfaat untuk agama.

Selanjutnya, saya persembahkan untuk sahabat-sahabat terkasih yang senantiasa membuka lengan, hati, dan telinga serta mengorbankan waktu dan tenaga untuk selalu memberikan perhatian, nasihat, dan dukungan terhadap diri yang tak bisa berdiri sendiri ini. Semoga Allah Swt. berikan kelancaran selalu dan disampaikan pada hajat sahabat-sahabat semua.

Dan yang terakhir, saya persembahkan karya kecil ini untuk kepentingan agama saya, al Islamu diinullah. Semoga hasil penelitian ini sedikit banyak berkontribusi memberikan ilmu pengetahuan dalam upaya mengeksplorasi dengan maksimal manfaat dari apa yang telah Allah swt. ciptakan di alam. Sehingga kedepannya dapat dikembangkan menjadi suatu karya yang turut serta dalam mensejahterakan umat.

Jaazakumullah khairan katsiiran. Semoga tidak hanya di dunia saja saya dipertemukan dengan orang-orang terkasih ini, namun senantiasa Allah pertemukan kembali InsyaaAllah di Jannah-Nya... Aamiin

MOTTO

Mengingat bahwa hidup hanya sesingkat jeda antara adzan dan iqamah, maka apa yang kau cari dari fananya dunia selain keridloan tuhanmu atas dirimu ?

Teruslah berusaha menjadi insan dengan akhirat sebagai orientasi hidup

Dunia tempat bersusah payah..

Bukan tempat berkeluh kesah..

Menjadikan Allah Swt. sebagai sandaran

Iman dan taqwa sebagai landasan

Saat diterpa ujian maka : **Ikhlas dan Huznudzon** atas segala yang telah

Allah Swt. tentukan

~Fauzhi Al-Khawarizmy 1453

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakaatuh

Alhamdulillah, puji dan syukur penyusun panjatkan atas kehadiran Allah Swt. yang telah memberikan segala rahmat dan nikmatnya berupa kesehatan, kesempatan, kekuatan, keinginan, serta kesabaran, sehingga penyusun dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “**Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil pemisahan KLTP Fraksi *n*-butanol Mikroalga *Chlorella* sp.**” dengan semaksimal mungkin.

Tak lupa, sholawat serta salam selalu tercurah limpahkan kepada Rasulullah Muhammad saw., yang merupakan pencetus kehidupan, keadilan, revolusionis dunia, penuntun umatnya agar senantiasa hidup berpedomankan al-Quran dan hadits.

Penyusun menyadari bahwa penulisan skripsi ini tidak akan tersusun dengan baik tanpa adanya dukungan dari pihak-pihak yang terkait. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penyusun mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Orang tua tercinta beserta keluarga besar yang telah memberikan perhatian, nasihat, do'a, motivasi, dukungan baik moril maupun materiil yang sangat berharga dan tak mungkin terbalaskan.
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. Bapak A.Ghanaim Fasya, M.Si, selaku Dosen pembimbing yang telah memberikan arahan dan motivasi dalam proses penulisan skripsi ini.

5. Ibu Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc, selaku Dosen Pemimbing agama yang telah memberikan bimbingan, arahan, serta motivasi dalam proses penulisan skripsi ini.
6. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si, selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan penguji utama yang telah membimbing dan memberi arahan dalam penulisan skripsi ini.
7. Ibu Rahmawati Ningsih, M. Si, penguji yang telah membimbing dan memberi arahan dalam penulisan skripsi ini.
8. Ibu Suci Amalia, M. Sc, selaku dosen wali yang telah memberikan bimbingan, motivasi, dan dukungan sepanjang penulis menempuh pendidikan S1 di jurusan kimia.
9. Seluruh sivitas akademika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan pengalaman dan wawasan sebagai bekal bagi penulis.
10. Segenap anggota teman-teman Jurusan Kimia angkatan 2016 dan sahabat-sahabat Kimia B 2016 yang saya cintai yang selalu memberikan motivasi dan dukungan.
11. Teman-teman penelitian Organik 2016, khususnya tim Kimia Bahan Alam dan partner penelitian mikroalga yang selalu memberi saran, motivasi, dan dukungan satu sama lain.

Penyusun menyadari banyaknya kekurangan dan keterbatasan dalam penulisan skripsi ini. Untuk itu, penyusun dengan senang hati mengharapkan kritik dan saran untuk perbaikan dalam penulisan selanjutnya. Terlepas dari segala

kekurangan, semoga skripsi ini dapat memberikan informasi dan kontribusi positif serta bermanfaat bagi kita semua Aamiin.

Wassalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakaatuh

Malang, 29 Desember 2020

Penyusun



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
PERSEMBAHAN	v
MOTTO	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvi
مستخلص البحث	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Batasan Masalah.....	7
1.5 Manfaat Penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Pemanfaatan Sumber Daya Alam dalam Perspektif Islam	9
2.2 Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	10
2.3 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella</i> sp. dalam MET	13
2.4 Manfaat dan Kandungan Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.....	15
2.5 Steroid	17
2.6 Ekstraksi Senyawa Aktif <i>Chlorella</i> sp	20
2.6.1 Ekstraksi Maserasi	20
2.6.2 Hidrolisis	22
2.6.3 Partisi Cair-Cair	25
2.7 Pemisahan Ekstrak Steroid dengan KLTP	26
2.8 Uji Aktivitas Antioksidan	28
2.8.1 Antioksidan	28
2.8.2 Uji Antioksidan Metode DPPH	29
2.9 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis	31
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	33
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	33
3.2.1 Alat-Alat Penelitian	33
3.2.2 Bahan-Bahan Penelitian	33
3.3 Rancangan Penelitian	34
3.4 Tahapan Penelitian	35
3.5 Cara Kerja	36

3.5.1 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella</i> sp	36
3.5.1.1 Pembuatan MET 4%	36
3.5.1.2 Kultivasi <i>Chlorella</i> sp. dalam MET 4%	36
3.5.1.3 Pemanenan Biomassa <i>Chlorella</i> sp	36
3.5.2 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga <i>Chlorella</i> sp	37
3.5.3 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Mikroalga <i>Chlorella</i> sp	37
3.5.4 Uji Fitokimia Golongan Senyawa Steroid dengan Reagen LB	38
3.5.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP	38
3.5.6 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH	38
3.5.6.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH	38
3.5.6.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel	39
3.5.7 Identifikasi Sampel dengan Spektrofotometri UV-Vis	40
3.5.8 Analisis Data	40
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Kultivasi dan Pemanenan Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	41
4.2 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	43
4.3 Hidrolisis dan Partisi Mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	44
4.4 Uji Fitokimia Senyawa Steroid Fraksi <i>n</i> -butanol.....	46
4.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP	49
4.6 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH	51
4.6.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH	51
4.6.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel	52
4.7 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometri UV-Vis	58
4.8 Pemanfaatan <i>Chlorella</i> sp. Sebagai Bahan Obat dalam Perspektif Islam.....	62
BAB IV PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	67
5.2 Saran.....	67
DAFTAR PUSTAKA	68
LAMPIRAN.....	78

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi <i>Chlorella</i> sp.	12
Gambar 2.2 Kurva pertumbuhan <i>Chlorella</i> sp.	14
Gambar 2.3 Kerangka dasar steroid	18
Gambar 2.4 Dugaan reaksi hidrolisis <i>phenyl-β-D-glucopyranoside</i>	24
Gambar 2.5 Struktur DPPH	29
Gambar 2.6 Mekanisme DPPH akseptor	30
Gambar 4.1 Perubahan warna kultur mikroalga <i>Chlorella</i> sp.	42
Gambar 4.2 Reaksi hidrolisis ikatan glikosida	44
Gambar 4.3 Uji fitokimia senyawa steroid	46
Gambar 4.4 Jalur reaksi LB dengan kolesterol	47
Gambar 4.5 Mekanisme reaksi kolesterol dengan LB	48
Gambar 4.6 Visualisasi hasil KLTP fraksi <i>n</i> -butanol pada UV λ 366 nm	50
Gambar 4.7 Spektra UV-Vis DPPH 0,2 mM	52
Gambar 4.8 Grafik % aktivitas antioksidan fraksi <i>n</i> -butanol	53
Gambar 4.9 Grafik % aktivitas antioksidan isolat 10 KLTP	53
Gambar 4.10 Grafik analisis non linear % aktivitas antioksidan terhadap log ppm fraksi <i>n</i> -butanol	55
Gambar 4.11 Grafik analisis nonlinear % aktivitas antioksidan terhadap log ppm isolat KLTP	56
Gambar 4.12 Spektra UV-Vis fraksi <i>n</i> -butanol mikroalga <i>Chlorella</i> sp	58
Gambar 4.13 Spektra UV-Vis isolat KLTP mikroalga <i>Chlorella</i> sp	60
Gambar 4.14 Struktur senyawa β -sitosterol	61

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Fungsi dan sumber fitosterol pada alga.....	19
Tabel 2.2 Hasil uji fitokimia senyawa alga merah <i>E. Cottoni</i>	26
Tabel 2.3 KLTA variasi perbandingan volume <i>n</i> -heksana:etil asetat.....	28
Tabel 4.1 Hasil Pemisahan KLTP pada sinar UV λ 366 nm.....	50
Tabel 4.2 Nilai EC ₅₀ fraksi <i>n</i> -butanol dan isolat steroid KLTP	57



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian	78
Lampiran 2. Diagram Alir.....	79
Lampiran 3. Perhitungan Pembuatan Reagen dan Pembuatan Larutan	84
Lampiran 4. Perhitungan Hasil Penelitian dan Data Pengamatan.....	88
Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian.....	98



ABSTRAK

Fauzi, V. S. H. 2020. **Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Pemisahan 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: Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc.

Kata Kunci: *Chlorella* sp., Steroid, *n*-butanol, KLTP, Uji Antioksidan

Steroid merupakan metabolit sekunder yang mempunyai beragam bioaktivitas. Salah satu sumber alam yang memiliki kandungan steroid dengan konsentrasi yang tinggi adalah mikroalga. Jenis mikroalga *Chlorella* sp. merupakan mikroalga yang sudah banyak diteliti potensi kandungan steroidnya terutama sebagai senyawa antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari fraksi *n*-butanol dan isolat steroid hasil pemisahan KLTP fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp. serta untuk mengetahui hasil identifikasinya dengan spektrofotometer UV-Vis. Mikroalga *Chlorella* sp. dikultivasi dalam medium ekstrak tauge (MET) 4%. Biomassa kering mikroalga *Chlorella* sp. hasil kultivasi diekstrak dengan metode maserasi dalam pelarut metanol. Lalu, dihidrolisis dengan HCl 2N dan selanjutnya dipartisi menggunakan pelarut *n*-butanol. Hasil partisi diuji fitokimia menggunakan reagen *Liebermann-Burchard*. Setelah itu, senyawa steroid diisolasi dari fraksi *n*-butanol dengan metode KLTP menggunakan eluen campuran *n*-heksana:etil asetat (3,75:1,25). Fraksi *n*-butanol dan isolat steroid hasil KLTP diuji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH untuk mengetahui nilai EC₅₀ dan diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil penelitian menunjukkan telah diperoleh spot yang diduga senyawa steroid pada hasil KLTP yang ditandai oleh munculnya spot berwarna hijau kebiruan pada nomor 10 dengan nilai R_f 0,83. Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antioksidan, fraksi *n*-butanol memiliki nilai EC₅₀ sebesar 11891 ppm, sementara isolat 10 KLTP memiliki nilai EC₅₀ sebesar 57,62 ppm. Adapun hasil identifikasi fraksi *n*-butanol menunjukkan serapan pada panjang gelombang maksimum 202,1; 203,9; 229,0; 262,0; 269,0; 403,9; 668,1 nm. Sedangkan pada isolat 10 KLTP, muncul dua serapan pada panjang gelombang maksimum 229,0 dan 230,9 nm akibat adanya transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ yang berasal dari gugus C=C, dimana gugus ini merupakan karakteristik dari senyawa steroid.

ABSTRACT

Fauzi, V. S. H. 2020. **Antioxidant Activity Test of Steroid Isolates Result from PTLC Separation of *n*-butanol Fraction Microalgae of *Chlorella* sp.** *Bachelor Thesis*. Chemistry Department, Sains and Technology Faculty, Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Advisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Advisor II: Lulu'atul Hamidatu Ulya, M.Sc.

Keywords: *Chlorella* sp., Steroid, *n*-butanol, PTLC, Antioxidant Activity Test

Steroids are secondary metabolites that have various bioactivity. One of the natural sources that contain a high concentration of steroids is microalgae. The *Chlorella* sp. is a microalgae that has been widely studied for steroid content, especially its potential as an antioxidant compound. The aims of this research are to determine the antioxidant activity of *n*-butanol fraction and steroid isolates from PTLC separation of *n*-butanol fraction of the microalgae *Chlorella* sp. and to find out the result of its identification using UV-Vis spectrophotometer. Microalgae *Chlorella* sp. was cultivated in bean sprouts extract medium 4%. The dry biomass of microalgae *Chlorella* sp. from cultivation was extracted by maceration method in methanol solvent. Then, it was hydrolyzed with HCl 2N and partitioned using *n*-butanol solvent. The *n*-butanol fraction was tested for phytochemical analysis using *Liebermann-Burchard* reagent. Furthermore, steroid compound was isolated from *n*-butanol fraction with PTLC separation using mixed eluent *n*-hexane:ethyl acetate (3,75:1,25). After that, *n*-butanol fraction and steroid compound that had been isolated from PTLC were tested its antioxidant activity using DPPH method to find out the EC₅₀ value. Steroid isolate was identified using UV-Vis spectrophotometer. Research shows that there is a single spot which is suspected of being a steroid compound in the results of KLTP which is reported by a bluish green dot on number 10 with an R_f value of 0.83. Based on the result of the antioxidant activity test, *n*-butanol fraction had an EC₅₀ value of 11891 ppm, while the isolate 10 from PTLC separation had an EC₅₀ value of 57.62 ppm. The identification result of *n*-butanol fraction showed absorption at a maximum wavelengths of 202.1; 203.9; 229.0; 262.0; 269.0; 403.9; and 668,1 nm. Whereas in isolates 10 from KLTP separation, appeared absorption at maximum wavelengths of 229.0 and 230.9 nm caused by electronic transition $\pi \rightarrow \pi^*$ from C=C functional group. This functional group is a characteristic of steroid compound.

مستخلص البحث

فوزي ، ف.س.هـ. (٢٠٢٠). النشاط المضاد للأوكسدة لعزل الستيريود نتيجة فصل الفحص التحضيري للطبقة الرقيقة جزء ن بوتانول الطحالب الدقيقة شلوريلا 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: لؤلؤة الحميدة عليا الماجستير.

الكلمات المفتاحية: شلوريلا سف. (*Chlorella sp.*) ، الستيريود ، ن بوتانول ، الفحص

التحضيري للطبقة الرقيقة ، اختبار مضادات الأوكسدة

الستيريودات هي نواتج أيضية ثانوية لها نشاط بيولوجي مختلف. أحد المصادر الطبيعية التي تحتوي الستيريود على تركيزات عالية من المنشطات هي الطحالب الدقيقة. أنواع الطحالب الدقيقة شلوريلا سف. (*Chlorella sp.*) هي طحالب دقيقة تمت دراستها على نطاق واسع لمحتواها من الستيريود ، خاصة كمركب مضاد للأوكسدة. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد النشاط المضاد للأوكسدة لجزء ن بوتانول وعزلات الستيريود من فصل الفحص التحضيري للطبقة الرقيقة عن جزء ن بوتانول من الطحالب الدقيقة شلوريلا سف. (*Chlorella sp.*) ونتائج التحديد باستخدام مقياس الطيف الضوئي (UV-Vis). الطحالب الدقيقة شلوريلا سف. (*Chlorella sp.*) يزرع في ٤٪ مستخلص براعم الفول المتوسط. الكتلة الحيوية الجافة من شلوريلا سف. (*Chlorella sp.*) تم استخلاص نتائج الزراعة بطريقة النقع في مذيب الميثانول. بعد ذلك ، تم تحليلها بالماء مع حمض الهيدروكلوريك ٢ ن، ثم تم تقسيمها باستخدام ن بوتانول كمذيب. تم اختبار نتائج التقسيم للكيمياء النباتية باستخدام كاشف ليبرمان-بورشارد. بعد ذلك ، تم عزل مركبات الستيريود بطريقة الفحص التحضيري للطبقة الرقيقة باستخدام شطف مختلط من ن هكسان؛ إيثيل الأسيتات (٣،٧٥:١،٢٥). تم اختبار جزء ن بوتانول وعزل الستيريود الناتج عن الفحص التحضيري للطبقة الرقيقة من أجل نشاط مضادات الأوكسدة باستخدام طريقة ٢،٢ ثنائي فينيل ١ بيكريل هيدرازيل (DPPH) لتحديد قيمة (EC₅₀) وتحديد استخدامها باستخدام مقياس الطيف الضوئي (UV-Vis). أظهرت النتائج أنه تم الحصول على عزلة ستيريود واحدة في نتائج الفحص التحضيري للطبقة الرقيقة والتي تميزت بظهور بقعة خضراء مزرققة بقيمة (R_f) تبلغ ١١٨٩١ بناءً على نتائج اختبار نشاط مضادات الأوكسدة ، كان لجزء ن بوتانول قيمة (EC₅₀) قدرها ٥٧،٦٢ جزء في المليون ، بينما كان لعزل الستيريود الفحص التحضيري للطبقة الرقيقة قيمة (EC₅₀) ٥٩،١٩ جزء في المليون. أظهرت نتائج تحديد جزء ن بوتانول امتصاص بطول موجي أقصى قدره ٢٠٢،١ ؛ ٢٠٣،٩ ؛ ٢٢٩،٠ ؛ ٢٦٢،٠ ؛ ٢٦٩،٠ ؛ ٤٠٣،٩ ؛ و ٦٦٨،١ نانومتر. بينما في عزلات الستيريود الناتجة عن فصل الفحص التحضيري للطبقة الرقيقة، ظهر امتصاص أكثر تحديداً يشير إلى وجود مركبات ستيريود بأطوال موجية قصوى تبلغ ٢٢٩،٠ و ٢٣٠،٩ نانومتر.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Steroid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang memiliki peran penting bagi kehidupan makhluk hidup. Steroid memiliki struktur berupa 17 atom karbon yang membentuk struktur dasar 1,2-siklopentenoperhidrofenantren. Steroid dalam jaringan hewan disebut dengan kolesterol yang merupakan komponen penting dari plasma lipoprotein dan membran sel sebelah luar. Adapun steroid dalam jaringan tumbuhan disebut dengan fitosterol yang memiliki kemampuan untuk menurunkan kolesterol dalam tubuh manusia (Robinson, 1995).

Steroid mempunyai beragam bioaktivitas yang digunakan sebagai pendekatan fitofarmakologi seperti antikanker (Herlina, dkk., 2011), antibakteri (Fasya, dkk., 2013), antimalaria (Bialangi, dkk., 2017), dan antioksidan (Maghfiroh, 2019). Sebagai senyawa antioksidan, steroid dapat mengurangi jumlah metabolit CCl_4 sehingga sel-sel hati terlindungi dari kerusakan dan stabilitas membran sel hati serta aktivitasnya tetap terjaga (Wang, dkk., 2004). Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Winarsi, 2007). Keberadaan antioksidan dapat melindungi tubuh dari berbagai penyakit degeneratif dan kanker akibat adanya radikal bebas berlebih, serta membantu menekan proses penuaan/antiaging (Tapan, 2005).

Salah satu sumber alam yang memiliki kandungan steroid dengan konsentrasi tinggi adalah mikroalga (Andrade, dkk., 2018). Mikroalga dikenal sebagai organisme mikroskopis dengan kemampuan fotosintesis yang sangat efisien (Ahmad and Ahmad, 1994). Sekitar 40% fotosintesis secara global dilakukan oleh mikroalga (Fithriani, dkk., 2015). Mikroalga di alam umumnya bersifat sebagai fitoplankton yang bertindak sebagai penyusun metabolit sekunder (Nabris, 2012). Mikroalga dapat menjadi sumber produk alami alternatif karena dapat dikultivasi dalam skala besar pada bioreaktor dan jika dibandingkan dengan ragi dan fungi, mikroalga memiliki kelebihan dalam hal keamanannya (Fithriani, dkk., 2015; Nur, 2014). Pemanfaatan mikroalga sebagai sumber alami senyawa aktif steroid dapat dikorelasikan dengan firman Allah Swt. dalam QS. al-Baqoroh/2:29.

هُوَ الَّذِي خَلَقَ لَكُمْ مَّا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا ثُمَّ أَسْتَوَىٰ إِلَى السَّمَاءِ فَسَوَّاهُنَّ سَبْعَ سَمَاوَاتٍ وَهُوَ بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ

Artinya: “Dia-lah Allah, yang menjadikan segala yang ada di bumi untuk kamu dan Dia berkehendak menuju langit, lalu dijadikan-Nya tujuh langit. Dan Dia Maha Mengetahui segala sesuatu” (QS. al-Baqoroh/2:29).

Berdasarkan tafsir Jalalain, firman-Nya yang berbunyi (هُوَ الَّذِي خَلَقَ لَكُمْ مَّا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا) “Dia-lah Allah, yang menjadikan segala yang ada di bumi untuk kamu” yaitu menciptakan bumi beserta isinya, agar manusia dan makhluk hidup lainnya memperoleh manfaat dan mengambil perbandingan darinya (al-Mahalli, dkk., 2007). Ayat tersebut menjelaskan bahwasanya Allah Swt. telah menciptakan alam sekaligus dengan segala manfaatnya bagi umat manusia untuk memenuhi kebutuhan hidupnya. Sebagai

hamba-Nya, patut kita bersyukur dengan berupaya untuk mengeksplorasi secara maksimal manfaat dari kandungan-kandungan bahan alam yang ada, di antaranya adalah steroid dari mikroalga sebagai senyawa bioaktivitas antioksidan dengan melakukan penelitian-penelitian yang berkesinambungan.

Salah satu jenis mikroalga yang sudah banyak diteliti potensi kandungan steroidnya terutama sebagai senyawa antioksidan adalah *Chlorella* sp. (Dinasti, 2016; Rahmawati, 2016; dan Maghfiroh, 2019; Megawati, dkk., 2020). Sekitar 10% *Chlorella* sp. hidup di air laut dan 90% sisanya hidup di air tawar (Sopiah, dkk., 2013). Mikroalga *Chlorella* sp. memiliki keunggulan dalam pembudidayaannya, yaitu dapat menghasilkan oksigen dengan melalui proses fotosintesis, mengandung kadar protein yang tinggi dengan asam amino sebagai komponen utamanya, mudah dalam membudidayakan, dapat berkembangbiak dengan cepat di tempat dengan kondisinya dan tidak membutuhkan area yang luas jika dibandingkan dengan tumbuhan lain (Arifin, 2012; Simatupang, dkk., 2017). *Chlorella* sp. merupakan salah satu mikroalga yang sering dibudidayakan untuk berbagai keperluan seperti penghasil komponen senyawa bioaktif untuk bahan farmasi, kosmetik, atau untuk alternatif biodiesel karena memiliki nilai gizi yang tinggi dan tidak beracun (Aprilliyanti, dkk., 2016).

Mikroalga *Chlorella* sp. dapat dikultivasi pada Medium Ekstrak Tauge (MET) kacang hijau. Wulandari, dkk. (2010) dalam jurnalnya mengenai perbandingan potensi pertumbuhan mikroalga dalam Medium Air Laut (MAL), Medium Ekstrak Tauge (MET), dan Medium Guillard (MG), melaporkan bahwa MET konsentrasi 4% menghasilkan pertumbuhan mikroalga yang paling pesat yaitu antara 21 – tak terhingga sel.

Metode maserasi adalah metode yang paling banyak dilakukan untuk mengekstraksi senyawa aktif yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella* sp. Metode maserasi merupakan metode yang sederhana dan mudah serta merupakan metode ekstraksi dingin yang cocok digunakan pada senyawa yang tidak tahan terhadap pemanasan (Mutmainnah, dkk., 2017). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Bariyyah, dkk. (2013) ekstrak pelarut metanol mikroalga *Chlorella* sp. memiliki nilai rendemen yang lebih tinggi yaitu 7,00% dibandingkan dengan ekstrak pelarut etil asetat dengan nilai rendemen 3,67%. Beberapa penelitian bahkan menghasilkan nilai rendemen ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp. yang cukup tinggi, diantaranya penelitian Fasya, dkk. (2020) sebesar 23,27% dan Megawati, dkk. (2020) sebesar 24,29%. Pemilihan pelarut metanol didasarkan pada kemudahan metanol dalam melisiskan membran sel tanaman dan struktur molekulnya yang berukuran kecil sehingga dapat menembus jaringan tanaman untuk menarik senyawa aktif keluar (Mutmainnah, dkk., 2017). Ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp. positif mengandung senyawa aktif golongan steroid (Bariyyah, dkk., 2013; Amaliyah, dkk., 2013).

Perolehan metabolit sekunder yang lebih spesifik dapat dilakukan dengan hidrolisis dan partisi. Fikri (2019) dan Megawati, dkk. (2020) melakukan hidrolisis pada ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan HCl 2 N selama 2 jam untuk memutus ikatan glikosida sehingga didapatkan senyawa steroid yang terpisah dari glikon. Perolehan steroid lebih murni dilakukan dengan partisi dengan pelarut *n*-butanol. Berdasarkan penelitian Hongayo (2011), fraksi *n*-butanol alga cokelat *Cystoseira moniliformis* mengandung kandungan steroid lebih banyak dibanding pada fraksi *n*-heksana dan dietil eter. Begitu juga

penelitian Rudiyanto (2013) menunjukkan bahwa pada fraksi *n*-butanol alga merah *Euchema cottoni* diperoleh kandungan steroid yang lebih banyak dari pada kandungan alkaloid, flavonoid, dan triterpenoid. Selain itu, Rudiyanto (2013) juga menyatakan bahwa fraksi *n*-butanol alga merah *E. cottoni* memiliki aktivitas antioksidan paling kuat dengan nilai EC_{50} sebesar 3,71 ppm dibanding fraksi *n*-heksana 49,5 ppm; petroleum eter 18,20 ppm; kloroform 54,92 ppm, dan etil asetat 12,98 ppm. Adapun penelitian Yu, dkk. (2017) menunjukkan bahwa fraksi *n*-butanol mikroalga *Cryptocodinium cohnii* memberikan nilai inhibisi tertinggi dalam penangkapan radikal DPPH dibandingkan dengan fraksi air, etil asetat, dan petroleum eter.

Kemudian, isolasi steroid dari hasil partisi dapat dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP). Al-Quais (2015) dalam penelitiannya melakukan pemisahan steroid dari akar rumput bambu (*Lophatherum gracile* Brongn) dengan KLTP menggunakan variasi kombinasi eluen dengan kepolaran yang berbeda dimana hasil penelitian menunjukkan bahwa campuran eluen *n*-heksana dan etil asetat (8:2) merupakan eluen yang terbaik. Penelitian Fikri (2019) dan Wahdaniyah (2019) menunjukkan bahwa fase terbaik dalam penggunaan metode KLT adalah *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 3,75:1,25 karena dalam penelitiannya memberikan hasil positif terhadap pemisahan senyawa aktif steroid dalam mikroalga *Chlorella* sp. yaitu dengan terbentuknya 14 spot warna dan *R_f* berbeda hingga didapatkan 2 spot senyawa steroid tunggal. Selain itu, berdasarkan penelitian Wahdaniyah (2019), hasil KLTP fraksi *n*-heksana ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp. positif mengandung senyawa steroid jenis ergosterol, latosterol, kolesterol, stigmasterol,

β -sitosterol, dan brassicasterol. Adapun penelitian Sari (2017) menunjukkan bahwa jenis steroid yang terisolasi dari hasil KLTP fraksi *n*-butanol ekstrak metanol makroalga *E. cottoni* adalah kampesterol, stigmasterol, kolesterol, dan β -sitosterol.

Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH memiliki kelebihan antara lain adalah mudah dilakukan, cepat, biaya relatif murah serta membutuhkan sampel yang sedikit (Koleva, dkk., 2002). Metode DPPH memiliki aktivitas penangkap radikal bebas yang tinggi dalam pelarut organik, seperti metanol dan etanol pada suhu kamar (Salamah and Widayarsi, 2015). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Fikri (2019), isolat steroid mikroalga *Chlorella* sp. hasil KLTP fraksi *n*-heksana menghasilkan aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan nilai EC_{50} 35,09. Adapun Fasya, dkk. (2020^a) dalam penelitiannya melakukan partisi ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan fraksi petroleum eter lalu dipisahkan dengan metode pemisahan yang serupa yaitu KLTP menghasilkan aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai EC_{50} sebesar 73,82 ppm.

Berdasarkan uraian tersebut, perlu dilakukan penelitian lanjutan dari beberapa rujukan penelitian-penelitian sebelumnya, mengingat banyaknya keunggulan mikroalga *Chlorella* sp. di beberapa bidang khususnya sebagai senyawa bioaktivitas antioksidan pada metabolit sekunder steroid yang terkandung didalamnya. Ekstraksi pada penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol. Setelah itu, pemutusan ikatan glikosida untuk mendapatkan metabolit sekunder yang bebas glikon dilakukan dengan cara hidrolisis menggunakan HCl 2N dan dipisahkan dengan partisi menggunakan

n-butanol. Kemudian dilanjutkan dengan isolasi senyawa steroid menggunakan KLTP eluen *n*-heksana:etil asetat (3,75:1,25). Lalu, diuji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan diidentifikasi isolat menggunakan instrumentasi UV-Vis sebagai salah satu langkah untuk membuktikan keberadaan senyawa target, yaitu steroid.

1.1 Rumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas antioksidan fraksi *n*-butanol dan isolat steroid hasil KLTP fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp. dengan metode DPPH?
2. Bagaimana hasil identifikasi fraksi *n*-butanol dan isolat steroid hasil KLTP fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan spektrofotometer UV-Vis?

1.2 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui aktivitas antioksidan fraksi *n*-butanol dan isolat steroid hasil KLTP fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp. dengan metode DPPH.
2. Untuk mengetahui hasil identifikasi fraksi *n*-butanol dan isolat steroid hasil KLTP fraksi butanol mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

1.3 Batasan Masalah

1. Sampel berupa isolat *Chlorella* sp. yang diperoleh dari Laboratorium Organik UIN Malang.
2. Kultivasi *Chlorella* sp. dikakukan dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%.

3. Ekstraksi senyawa aktif dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol.
4. Hidrolisis dan partisi *Chlorella* sp. menggunakan pelarut *n*-butanol.
5. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*) dan dinyatakan dalam nilai EC_{50} .
6. Identifikasi senyawa aktif fraksi *n*-butanol dan isolat steroid hasil KLTP fraksi *n*-butanol ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi wawasan lebih kepada pembaca mengenai aktivitas antioksidan fraksi *n*-butanol dan senyawa steroid dari hasil pemisahan menggunakan metode KLTP fraksi *n*-butanol hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp. serta hasil identifikasi senyawa steroid menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis yang selanjutnya dapat dikembangkan untuk meningkatkan ilmu pengetahuan sehingga nantinya dapat diaplikasikan penggunaannya dalam masyarakat luas.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pemanfaatan Sumber Daya Alam dalam Perspektif Islam

Allah Swt. memberikan rizki yang bermacam-macam kepada manusia lewat ciptaan-Nya yang ada di bumi, sebagaimana firman Allah Swt. dalam QS. al-Mulk/67:15:

هُوَ الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ ذَلُولًا فَامْشُوا فِي مَنَاكِبِهَا وَكُلُوا مِن رِّزْقِهَا وَإِلَيْهِ النُّشُورُ ۝

Artinya: “Dialah Yang menjadikan bumi itu mudah bagi kamu, maka berjalanlah di segala penjuru dan makanlah sebahagian dari rezeki-Nya. Dan hanya kepada-Nya lah kamu (kembali setelah) dibangkitkan” (QS. al-Mulk/67:15).

Allah Swt. menciptakan alam dan isinya untuk manusia, supaya manusia bisa mengambil manfaat dari semua yang dihalalkan-Nya, tidak ada di alam ini yang diciptakan Allah Swt. secara sia-sia. Kekayaan alam yang dapat dimanfaatkan untuk memenuhi kebutuhan dan kesejahteraan manusia disebut sebagai sumber daya alam. Sumber daya alam akan berkembang dan akan terus dibutuhkan seiring perkembangan teknologi. Alam yang terdiri dari lingkungan biotik dan abiotik memiliki manfaat yang beranekaragam sesuai dengan peruntukannya.

Allah Swt. berfirman dalam QS. al-Hijr/15:20:

وَجَعَلْنَا لَكُمْ فِيهَا مَعِيشَ وَمَن لَّسْتُمْ لَهُ بِرُزُقِينَ ۝

Artinya: “Dan Kami telah menjadikan padanya sumber-sumber kehidupan untuk keperluanmu dan (kami ciptakan pula) makhluk-makhluk yang bukan kamu pemberi rezekinya”(QS.al-Hijr/15:20).

Menurut tafsir Kementrian Agama RI (2006), QS. al-Hijr ayat 20 menjelaskan bahwa anugrah Allah Swt. diberikan secara tidak terhingga untuk manusia, yaitu dengan menciptakan bermacam-macam keperluan hidup manusia. Dia telah menciptakan tanah yang subur yang ditanami tumbuh-tumbuhan berguna serta merupakan kebutuhan pokok bagi manusia. Dia juga telah menciptakan air yang dapat diminum serta untuk menumbuhkan tumbuh-tumbuhan. Diciptakan laut yang hidup di dalamnya bermacam-macam jenis biota laut yang terdiri dari hewan, tumbuhan ataupun fitoplankton serta barang tambang dan mutiara yang diperlukan oleh manusia dan menjadi sumber pangan serta mata pencaharian. Kemudian, telah Allah Swt. mudahkan pula bagi manusia segala sumber kebutuhan hidup yang dapat dijadikan pakaian, makanan, obat-obatan dan lain-lain, sebagai cerminan sikap bersyukur manusia atas karunia-Nya.

Dalam hal pemanfaatan, Islam mengajarkan kepada manusia untuk memanfaatkan secara efektif sumber daya alam yang ada di bumi ini, di antaranya adalah sebagai senyawa bioaktif. Salah satu biota laut yang banyak dikaji karena memiliki beragam senyawa bioaktif yang dikandungnya adalah mikroalga. Salah satu jenis mikroalga yang paling sering diteliti adalah *Chlorella* sp. Mikroalga *Chlorella* sp. memiliki beragam sifat bioaktivitas seperti antibakteri (Fasya, dkk., 2013), toksisitas (Majidah, 2019), dan antioksidan (Maghfiroh, 2019; Megawati, dkk. 2020).

2.2 Mikroalga *Chlorella* sp.

Mikroalga merupakan salah satu kelompok protista dengan ukuran renik yang termasuk dalam kelas alga, dengan diameter 3-30 μm , baik sel tunggal

ataupun koloni yang di seluruh wilayah perairan tawar maupun laut, yang lazimnya disebut firoplankton (Romimohtarto, 2004). Mikroalga dapat melakukan proses fotosintesis dan hidup dari nutrien anorganik serta menghasilkan zat-zat organik dari CO₂ oleh fotosintesis. Mikroalga memiliki zat warna hijau daun klorofil yang berfungsi pada proses fotosintesis dengan bantuan H₂O, CO₂, dan sinar matahari agar dapat menghasilkan energi yang digunakan untuk proses biosintesis sel, penambahan, dan pertumbuhan sel, berpindah, bergerak dan reproduksi (Pranayogi, 2003).

Mikroalga dapat menjadi sumber produk alami alternatif karena dapat dikultivasi dalam skala besar pada bioreaktor (Fithriani, dkk., 2015). Sejak dulu mikroalga digunakan oleh masyarakat sebagai sumber vitamin, protein, dan mineral sehingga mikroalga telah banyak dikenal sebagai pangan fungsional. Jika dibandingkan dengan ragi dan fungi, mikroalga memiliki kelebihan dalam hal keamanannya (Nur, 2014).

Chlorella sp. merupakan ganggang hijau bersel tunggal dan berukuran mikroskopis. Tubuh *Chlorella* sp. berbentuk bulat seperti bola ataupun bulat telur dan mempunyai diameter 3-8 mikrometer. Sel dari *Chlorella* sp. memiliki protoplasma dengan bentuk cawan dan tidak memiliki flagella sehingga tidak dapat bergerak aktif, dinding selnya terdiri dari selulosa dan pektin, setiap selnya terdapat sebuah inti sel dan satu kloroplas (Isnansetyo and Kurniastuty, 1995). Protoplasma sel *Chlorella* sp. diliputi oleh suatu membran yang sangat selektif terhadap apa aja yang memasuki sel (Kumar dan Singh, 1976). Morfologi *Chlorella* sp. dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Morfologi *Chlorella* sp. (Mondal, dkk., 2017)

Menurut Bold and Wynne (1985) klasifikasi *Chlorella* sp. adalah sebagai berikut.

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

Chlorella sp. merupakan mikroalga yang termasuk kedalam golongan alga hijau (chlorophyta). Mikroalga ini 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. *Chlorella* sp. hidup secara berkoloni dalam jumlah besar. Habitatnya adalah di air atau tempat basah (Pratama, 2011).

Proses reproduksi *Chlorella* sp. dapat dibagi menjadi 4 tahap (Kumar dan Singh, 1976):

1. Tahap pertumbuhan, dimana pada tahap ini sel *Chlorella* sp. akan tumbuh membesar.
2. Tahap pemasakan awal saat terjadi peningkatan aktivitas sintesa yang merupakan persiapan awal pembentukan autospora.

3. Tahap pemasakan akhir, yang merupakan tahap terbentuknya autospora.
4. Tahap pelepasan autospora, dimana terjadi pemecahan dinding sel induk dan diikuti pelepasan autospora yang akan tumbuh menjadi sel induk muda.

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

Pertumbuhan mikroalga dapat diperbanyak jumlahnya dengan menggunakan teknik kultur. Menurut Bold and Wynne (1985), pertumbuhan *Chlorella* sp. dalam kultur dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain: medium, nutrisi, cahaya, temperatur, serta salinitas. Medium merupakan tempat hidup bagi kultur *Chlorella* sp. yang pemilihannya ditentukan pada jenis *Chlorella* sp. yang akan dibudidayakan.

Salah satu dari medium kultur yang dapat digunakan untuk kultivasi mikroalga *Chlorella* sp. adalah Medium Ekstrak Tauge (MET). Medium Ekstrak Tauge (MET) merupakan medium kultur alami dengan kandungan-kandungan nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroalga *Chlorella* sp. untuk tumbuh seperti nitrogen dan fosfor (Prihantini, dkk., 2010). Selain itu MET juga mengandung beberapa vitamin (riboflavin, tiamin, niasin, piridoksin, asam pantotenat, triptofan, folasin, vitamin C dan K). Vitamin yang dibutuhkan bagi pertumbuhan alga antara lain kobalamin, biotin dan tiamin. Tiamin berfungsi dalam reaksi α -dekarboksilasi dan transketolase. Biotin berfungsi dalam sintesis lemak, fiksasi karbondioksida, dan reaksi β -dekarboksilasi. Adapun kobalamin berfungsi untuk sintesis deoksiribosa (Wulandari, dkk., 2010).

Pertumbuhan *Chlorella* sp. yang dikultur sangat ditentukan oleh ketersediaan unsur hara dan kondisi lingkungan. Faktor pembatas dalam budidaya *Chlorella* sp. adalah nitrat dan fosfat. Selain nutrisi dan kondisi lingkungan yang sesuai dengan *Chlorella* sp., inokulum juga merupakan faktor yang sangat penting di dalam kultur *Chlorella* sp. karena kultur tidak mungkin dilaksanakan tanpa adanya inokulum. Alga ini dapat tumbuh pada salinitas 0 – 35 ppt. Alga ini masih dapat bertahan hidup pada suhu 40°C, tetapi tidak tumbuh. Kisaran suhu 25 – 30°C merupakan kisaran suhu yang optimal untuk pertumbuhan alga ini (Aprilliyanti, dkk., 2016).

Menurut Fasya dkk. (2013), penentuan hari panen didasarkan pada kurva pertumbuhan yang diperoleh saat kultivasi selama 15 hari. Mikroalga *Chlorella* sp. memiliki kurva pertumbuhan yang dapat dilihat pada Gambar 2.2.



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

Hari ke-8 merupakan fase awal stasioner karena jumlah selnya tidak mengalami peningkatan yang signifikan dibandingkan hari ke-7, dengan kelimpahan sel sebesar 4.656.000 sel/mL. Adapun hari ke-10 merupakan fase

stasioner dengan kelimpahan sel sebesar 4.880.000 sel/mL. Proses pengkulturan dalam Medium Ekstrak Tauge (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 lampu TL dapat digunakan untuk sumber penyorotan sebagai pengganti cahaya matahari langsung (Bariyyah, dkk., 2013).

Hasil penelitian Wulandari, dkk., (2010) menyatakan bahwa penggunaan MET sebagai medium kultur menghasilkan pertumbuhan mikroalga yang pesat jika dibandingkan dengan dua medium lainnya yaitu Medium Guillard (MG) dan Medium Air Laut (MAL). Fasya, dkk., (2013) dalam penelitiannya menunjukkan bahwa mikroalga yang dikultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4% menghasilkan kelimpahan sel tertinggi yaitu sebesar 4.880.000 sel/mL pada fase stasioner dihari ke-10.

2.4 Manfaat dan Kandungan Mikroalga *Chlorella* sp.

Mikroalga dapat berfungsi sebagai stok pangan. Potensi mikroalga sebagai sumber pangan fungsional di Indonesia sudah dikenal lebih dari 2000 tahun yang lalu. Produksi mikroalga sebagai stok pangan mulai digalakkan secara masif ketika perang dunia kedua, di mana Jepang, Amerika, dan Jerman pada waktu itu sedang menghadapi krisis. Sampai saat ini mikroalga masih digunakan oleh masyarakat sebagai sumber protein, vitamin, dan mineral, dan lebih dikenal sebagai pangan fungsional. Dibandingkan dengan sumber lain seperti yeast maupun fungi, mikroalga memiliki keunggulan pada aspek keamanannya. Jika dibandingkan dengan protein bersel tunggal yang bersumber dari mamalia,

mikroalga lebih unggul dibidang efisiensi dan kemudahan dalam produksinya (Nur, 2014).

Chlorella sp. adalah fitoplankton yang sering dijumpai di perairan umum, baik itu perairan tawar maupun perairan laut. Karena tidak beracun namun memiliki nilai gizi yang tinggi, *Chlorella* sp. merupakan salah satu mikroalga yang sering dibudidayakan untuk berbagai keperluan seperti obat-obatan, kosmetik, atau untuk alternatif biodiesel. Beberapa kelebihan dalam membudidayakan *Chlorella* sp. diantaranya: (1) berkembangbiak dengan cepat pada kondisi tumbuhnya; (2) mudah dalam membudidayakan; (3) menghasilkan oksigen melalui proses fotosintesis; dan (4) mengandung protein yang tinggi dengan komponen utama asam amino (Aprilliyanti, dkk., 2016).

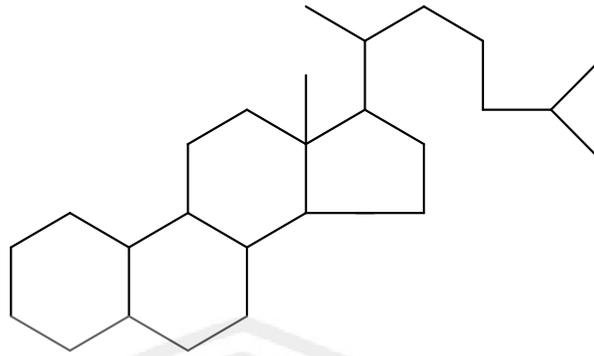
Mikroalga *Chlorella* sp. memiliki potensi sebagai pakan alami, pakan ternak, suplemen, bahan farmasi dan kedokteran serta sebagai penghasil komponen bioaktif. Hal tersebut disebabkan kandungan nutrisi yang terdapat dalam mikroalga *Chlorella* sp. seperti protein, karbohidrat, vitamin, asam lemak tak jenuh, enzim, klorofil dan serat yang tinggi (Kawaroe, dkk., 2009). Selain itu, *Chlorella* sp. juga mempunyai pigmen warna hijau dan kaya dengan warna biru yang disebut dengan *Phycocyanin*. *Phycocyanin* ini merupakan pembentuk darah putih didalam tubuh manusia dan merupakan antibodi atau pembentuk imunitas dari serangan racun kumia dan radiasi. (Pranayogi, 2003).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa mikroalga *Chlorella* sp. memiliki berbagai bioaktivitas karena adanya metabolit sekunder yang dikandungnya. Hasil penelitian Bariyyah, dkk. (2013) dan Fasya, dkk. (2013) menunjukkan bahwa ekstrak kasar *Chlorella* sp. mengandung senyawa golongan

steroid dan tanin yang berperan sebagai antioksidan dan antibakteri. Begitu pula Amaliyah, dkk., (2013) menyatakan dalam penelitiannya bahwa ekstrak metanol *Chlorella* sp. berpotensi sebagai anti kanker dan ekstrak etil asetat *Chlorella* sp. berpotensi sebagai antimikroba. Adapun penetian Maghfiroh (2019) menunjukkan adanya metabolit sekunder steroid dan terpenoid pada hasil pemisahan kromatografi kolom fraksi *n*-heksana mikroalga *Chlorella* sp. Selain itu, Maghfiroh (2019) juga menyatakan bahwa isolat steroid dari mikroalga *Chlorella* sp. menunjukkan adanya aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan nilai EC₅₀ 6,224 ppm.

2.5 Steroid

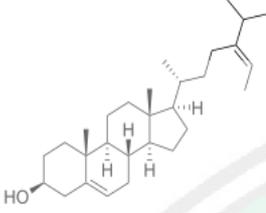
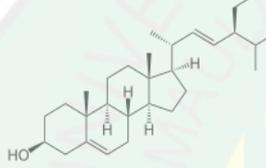
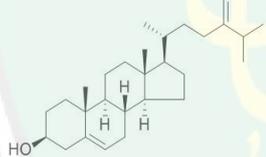
Steroid merupakan terpenoid lipid dengan empat cincin kerangka dasar karbon yang menyatu. Steroid memiliki struktur senyawa yang sangat beragam. Perbedaan struktur tersebut dikarenakan adanya gugus fungsi teroksidasi yang terikat pada cincin dan terjadinya proses oksidasi pada cincin karbonnya. Steroid memiliki peran yang sangat penting bagi tubuh, diantaranya dalam menjaga keseimbangan garam, meningkatnya fungsi organ seksual, mengendalikan metabolisme, dan perbedaan fungsi biologis lainnya antara jenis kelamin (Nasrudin, dkk., 2019). Stereokimia steroid telah diselidiki oleh para ahli dengan menggunakan analisis sinar X dari struktur kristalnya atau cara-cara kimia. Percobaan-percobaan menunjukkan bahwa steroid memiliki kerangka dasar seperti yang disajikan pada Gambar 2.3



Gambar 2.3 Kerangka dasar steroid (Robinson, 1995)

Fitosterol merupakan senyawa yang termasuk ke dalam kelompok steroid yang terdapat pada hampir semua tanaman dan banyak pula ditemukan dalam jumlah banyak pada mikroalga. Secara struktur, fitosterol terdiri dari triterpena yang bentuknya mirip dengan kolesterol pada hewan. Perbedaan antara keduanya terletak pada sisi samping kerangkanya. Akibat struktur yang mirip, ketika dikonsumsi, keduanya akan berkompetisi dalam penyerapan oleh sistem pencernaan dalam tubuh sehingga keberadaan fitosterol mampu menurunkan kadar kolesterol dalam tubuh manusia. Bahkan sejak pertengahan 1990-an, produk senyawa golongan fitosterol telah dikomersialkan sebagai *nutraceuticals* atau obat-obatan yang memiliki kemampuan untuk menurunkan kadar kolesterol darah. Beberapa jenis senyawa yang termasuk ke dalam kelompok fitosterol diantaranya adalah stigmasterol, sitosterol, campesterol, fucosterol, dan ergosterol (Jati, dkk., 2019). Fungsi dan sumber beberapa senyawa fitosterol pada alga ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Fungsi dan sumber fitosterol pada alga (Luo, dkk., 2015)

Struktur fitosterol	Asal spesies	Bioaktivitas	Mikroalga yang memiliki sterol sama
 <p>Fukosterol</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Mikroalga <i>Pelvetia siliquosa</i> - Alga coklat <i>Turnaria conoides</i> - Makroalga <i>Himanthalia elongate</i>, <i>Undaria pinnatifida</i>, <i>Phorphyra sp.</i>, <i>Chondus crispus</i>, <i>Cystoseira sp.</i> dan <i>Ulva sp.</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Antioksidan - Antidiabetes - Antikanker 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Chrysoderma sp.</i> - <i>Chrysomeris</i> - <i>Chyrowaernella</i> - <i>Giraudyopsis</i> - <i>Olisthodiscus luteus</i>
 <p>Stigmasterol</p>	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Butea monosperma</i> - <i>Parkia speciosa</i> seeds 	<ul style="list-style-type: none"> - Penghambat tiroid - Antioksidan - Hipoglikemik 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Porphyridium cruentum</i>
 <p>Δ^5-Avenasterol</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Alga coklat <i>Fucus vesiculocus</i> - Alga hijau <i>Ulva lactuta</i> - Spons laut <i>Petrosia weinbergi</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Antioksidan - Penghambat lipase - Prekursor ortoester antivirus 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Myxophyceae</i> - <i>Chlorophyceae</i> - <i>Chattonella marina</i>

Penelitian Yudiati, dkk. (2011) menyatakan bahwa ekstrak metanol, ekstrak kasar pigmen metanol/aseton dan ekstrak kasar pigmen mikroalga *Spirulina sp.* positif mengandung sterol. Adapun penelitian Jati, dkk. (2019) menyatakan bahwa hasil identifikasi menggunakan GC-MS menunjukkan bahwa mikroalga *Nannochloropsis oculata* mengandung fitosterol dari jenis campasterol, stigmasterol, dan β -sitosterol. Begitu juga Maghfiroh (2019) dalam

penelitiannya menyatakan bahawa hasil identifikasi dengan menggunakan LC-MS/MS dari fraksi *n*-heksana ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp. mengandung steroid jenis campesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol.

2.6 Ekstraksi Senyawa Aktif *Chlorella* sp.

2.6.1 Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi merupakan proses penarikan senyawa kimia yang memiliki kelarutan tinggi dalam suatu pelarut tertentu sehingga dapat dipisahkan dari bahan yang memiliki kelarutan rendah dalam pelarut tersebut (Hildani, 2018). Dilihat dari fase yang terlibat, ekstraksi digolongkan menjadi dua jenis, yaitu ekstraksi padat-cair dan ekstraksi cair-cair. Dalam prosesnya, ekstraksi padat-cair dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah suhu yang digunakan, waktu ekstraksi, jumlah pelarut yang dipakai, dan pengadukan (Harbone, 1987). Tingkat proses ekstraksi bahan atau sampel ditentukan oleh ukuran partikel dari bahan yang digunakan. (Sudarmadji, dkk., 1996).

Metode ekstraksi maserasi tergolong ke dalam jenis ekstraksi padat-cair cara dingin yang merupakan pengekstraksian simplisia dengan menggunakan pelarut organik dan pengulangan pengocokan ataupun pengadukan dalam kondisi kamar (Hildani, 2018). Prinsip dari maserasi yaitu pelarut yang digunakan akan masuk ke dalam sel tanaman melewati dinding sel, isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan didalam dan diluar sel melalui proses difusi hingga terjadi keseimbangan antara larutan didalam sel dan larutan diluar sel (Ansel, 1989).

Maserasi merupakan metode yang paling sederhana diantara metode yang lain, yaitu hanya dengan merendam sampel dalam pelarut yang sesuai. Sampel

dibuat dalam serbuk dengan tujuan memperluas bidang sentuh antara pelarut dengan serbuk simplisia, sehingga penyarian dapat lebih efektif. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut. Sifat kelarutan 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 akan larut dalam pelarut non polar. Secara umum pelarut-pelarut golongan alokohol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam, karena dapat melarutkan seluruh senyawa metabolit sekunder (Khopkar 2003). Dalam penelitian ini digunakan pelarut metanol yang bersifat polar. Pemilihan pelarut metanol didasarkan pada kemudahan metanol dalam melisiskan membran sel tanaman dan struktur molekulnya yang berukuran kecil sehingga dapat menembus jaringan tanaman untuk menarik senyawa aktif keluar (Mutmainnah, dkk., 2017). Selain itu, menurut Aziz (2014), pelarut metanol memiliki *extracting power* (daya ekstraksi) yang luas sehingga memiliki kemampuan untuk mengekstraksi metabolit sekunder dengan lebih maksimal.

Hasil penelitian Anggraeni, dkk., (2014) menunjukkan bahwa seluruh ekstrak *Chlorella* sp. mengandung golongan senyawa steroid yang dibuktikan dengan memberikan perubahan warna menjadi hijau kebiruan pada uji fitokimia golongan senyawa steroid. Senyawa steroid memiliki sifat non polar atau semi polar namun dapat terektrak oleh pelarut metanol yang bersifat polar. Saat proses ekstraksi, steroid masih terikat pada glikosidanya yang juga ikut terektrak dalam

metanol. Beberapa senyawa steroid mengandung gugus –OH yang sering disebut sterol sehingga sifatnya menjadi lebih polar. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Bariyyah, dkk., (2013) ekstrak pelarut metanol mikroalga *Chlorella* sp. memiliki nilai rendemen yang lebih tinggi yaitu 7,00% dibandingkan dengan ekstrak pelarut etil asetat dengan nilai rendemen 3,67%. Beberapa penelitian bahkan menghasilkan nilai rendemen ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp. yang cukup tinggi, diantaranya penelitian Fasya, dkk. (2020^a) sebesar 23,27% dan Maghfiroh (2019) sebesar 35,65%.

2.6.2 Hidrolisis

Hidrolisis adalah proses lanjutan dari ekstraksi dengan tujuan memperoleh ekstrak yang lebih murni (Day, 2002). Umumnya, senyawa organik yang terdapat dalam tanaman baik tingkat rendah maupun tinggi berada dalam bentuk glikosidanya (terikat dengan gugus gula), begitu halnya dengan steroid. 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 polar, semi polar, maupun non polar. Perubahan struktur ke dalam bentuk glikosida menyebabkan kepolaran senyawa tersebut meningkat (Gunawan, 2004; Saifuddin, dkk., 2011).

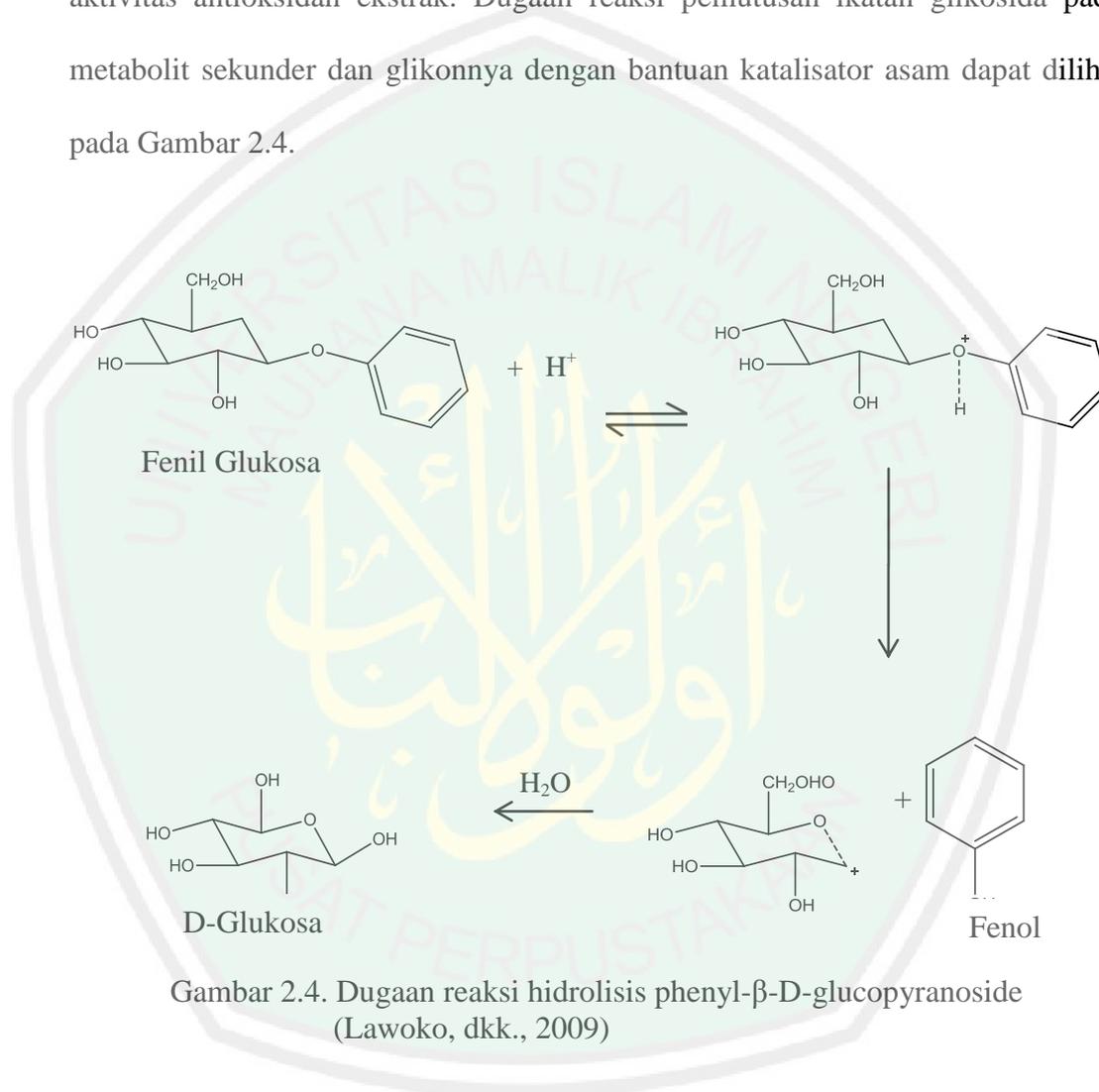
Hidrolisis merupakan proses dekomposisi kimia yang terjadi dengan adanya pemutusan ikatan glikosida yang menjadi penghubung antar monomer melalui reaksi menggunakan air (H₂O) dan membentuk senyawa-senyawa yang lebih sederhana. Reaksi hidrolisis dalam air berlangsung sangat lambat sehingga

diperlukan bantuan katalisator untuk mempercepat reaksinya (Adhiatama, dkk., 2012; Nihlati, dkk., 2008).

Ningsih, dkk. (2015) dalam penelitiannya menggunakan asam sebagai katalisator dalam proses hidrolisis untuk memutuskan ikatan glikosida pada steroid. Asam yang biasa digunakan dalam proses hidrolisis di industri adalah H_2SO_4 dan HCl . Katalis yang berasal dari asam kuat akan lebih mudah untuk melepas proton (H^+) dengan sempurna dalam air (Handoko, 2006). Menurut Groggins (1958), penggunaan asam kuat HCl lebih baik dibanding H_2SO_4 karena HCl lebih reaktif, memiliki efektifitas mempercepat reaksi berlangsung, mudah dipisahkan dari produknya karena mudah menguap, dan dapat diperoleh dengan harga yang murah. Asam klorida (HCl) merupakan asam kuat yang bersifat monoprotik. Dimana proses pembentukan H^+ terjadi dalam 1 tahap, sehingga reaksi hidrolisis yang dikatalisnya berlangsung reaktif cepat dibandingkan dengan H_2SO_4 (Saleh, dkk., 2016).

Konsentrasi HCl yang digunakan dalam penelitian adalah 2 N (Mardiyah, dkk., 2012; Rahmawati, 2016; Maghfiroh, 2019). Menurut Artati, dkk. (2012), konsentrasi asam kuat yang optimum untuk hidrolisis adalah 2 N. Asam kuat HCl pada konsentrasi 2 N memiliki konstanta kecepatan reaksi (k) tertinggi sebesar 0,00660/menit dibandingkan dengan konsentrasi 1 N (0,00209/menit); 1,5 N (0,00240/menit); 2,5 N (0,00638/menit); dan 3 N (0,00591/menit). Dibandingkan dengan H_2SO_4 , penggunaan HCl sebagai katalis memerlukan lebih sedikit alkali hidroksida untuk proses netralisasi pada reaksi akhir. Selain itu, aktivitas katalitik ion hidrogen pada HCl juga lebih tinggi. Adapun katalis H_2SO_4 akan bereaksi dengan konstituen lain pada bahan alam serta dapat membentuk garam dengan

beberapa senyawa non-karbohidrat yang terdapat pada bahan alam yang akan menghambat proses hidrolisis (Tasic, dkk., 2009). Penelitian lain dilakukan oleh Shiau, dkk. (2002) pada *Anoectochilus formosanus* Hayata (Orchidaceae) menyatakan bahwa prosedur hidrolisis asam dapat secara signifikan meningkatkan aktivitas antioksidan ekstrak. Dugaan reaksi pemutusan ikatan glikosida pada metabolit sekunder dan glikonnya dengan bantuan katalisator asam dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Dugaan reaksi hidrolisis phenyl-β-D-glucopyranoside (Lawoko, dkk., 2009)

Proses reaksi hidrolisis berlangsung secara *reversible*, sehingga perlu dihentikan dengan menambahkan basa NaHCO₃ dengan prinsip penetralan. Penetralan bertujuan untuk menyetabilkan glikosida sehingga tidak terbentuk

kembali ikatan antara glikon dan aglikonnya (Fessenden dan Fessenden, 1986; Handoko, 2016).

2.6.3 Partisi Cair-Cair

Ekstraksi cair-cair merupakan proses pemisahan zat terlarut di dalam dua macam zat pelarut yang tidak saling bercampur atau dengan kata lain perbandingan konsentrasi zat terlarut dalam pelarut organik dan pelarut air. Ekstaraksi cair-cair biasa juga disebut sebagai metode corong pisah. Jika suatu cairan ditambahkan ke dalam ekstrak yang telah dilarutkan dalam cairan lain yang tidak dapat bercampur dengan yang pertama, akan terbentuk dua lapisan. Satu komponen dari campuran akan memiliki kelarutan dalam kedua lapisan tersebut (biasanya disebut fasa) dan setelah beberapa waktu, dicapai kesetimbangan konsentrasi dalam kedua lapisan. Waktu yang diperlukan untuk tercapainya kesetimbangan biasanya dipersingkat oleh pencampuran keduanya dalam corong pisah. Senyawa-senyawa yang bersifat polar akan ditemukan di dalam fasa air. Sementara senyawa-senyawa yang bersifat hidrofobik akan masuk pada pelarut organik (Ditjen POM, 1986).

Proses partisi dalam penelitian ini menggunakan pelarut *n*-butanol sehingga akan didapatkan fraksi *n*-butanol. Rudiyanto (2013) melakukan uji fitokimia pada variasi fraksi pelarut terhadap alga merah *Eucheuma cottoni* yang hasilnya ditunjukkan pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Hasil uji fitokimia senyawa alga merah *E. cottoni*

Golongan Senyawa	Pelarut					
	Metanol	<i>n</i> -butanol	Etil Asetat	Kloroform	Petroleum eter	<i>n</i> -heksana
Flavonoid	+	+	-	+	-	-
Triterpenoid	-	+	+++	+++	+++	+
Steroid	+	++	+	-	-	-
Alkaloid						
- Mayer	+	+	+++	+++	-	+
- Dragendrof	-	-	-	-	-	-

Keterangan: +++ = Mengandung senyawa lebih banyak/warna pekat
 ++ = Mengandung senyawa/warna cukup pekat
 + = Mengandung senyawa berwarna
 - = Tidak mengandung senyawa

Berdasarkan Tabel 2.2, hasil uji fotokimia menunjukkan bahwa fraksi *n*-butanol memiliki kandungan steroid yang lebih banyak dari pada kandungan alkaloid, flavonoid, dan triterpenoid. Selain itu, Rudiyanto (2013) juga menyatakan bahwa fraksi *n*-butanol alga merah *E. cottoni* memiliki aktivitas antioksidan paling kuat dengan nilai EC₅₀ sebesar 3,71 ppm dibanding fraksi *n*-heksana 49,5 ppm; petroleum eter 18,20 ppm; kloroform 54,92 ppm, dan etil asetat 12,98 ppm. Semakin kecil nilai EC₅₀ menunjukkan aktivitas antioksidan yang semakin tinggi (Molyneux, 2003).

2.7 Pemisahan Ekstrak Steroid dengan KLTP

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah metode pemisahan komponen dari sampel berdasarkan pada perbedaan partisi atau adsorpsi oleh fasa diam yang dipengaruhi oleh pergerakan pelarut pengembang (Mulya dan Suharman, 1995). Media pemisahannya adalah sebuah lapisan yang memiliki ketebalan sekitar 0,1-

0,3 mm zat padat yang merupakan adsorben di atas sebuah lempeng plastik, kaca, atau alumunium. Adapun zat padat yang digunakan sebagai adsorben adalah gel silika, alumina, dan selulosa (Day, 2002).

Kromatografi lapis tipis seperti halnya kromatografi kertas, murah dan mudah dilakukan. Kromatografi ini mempunyai satu keunggulan dari segi kecepatan dari kromatografi kertas, yaitu proses elusi pada kromatografi lapis tipis hanya membutuhkan waktu setengah jam saja. KLT sangat terkenal dan rutin digunakan diberbagai laboratorium. KLT digunakan secara luas untuk analisis solut-solut 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. Pemisahan menggunakan KLT melalui dua tahap yaitu KLT Analitik (KLTA) dan KLT Preparatif (KLTP). KLTA digunakan untuk mengetahui eluen terbaik yang dapat memisahkan senyawa target, adapun KLTP digunakan untuk memisahkan senyawa dalam jumlah besar berdasarkan eluen terbaik yang diperoleh dari tahap KLTA (Sastrohamidjojo, 1991). Persamaan untuk mencari R_f (*retention factor*) adalah sebagai berikut (Day, 2002) :

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh bercak}}{\text{jarak yang ditempuh oleh larutan pengembang}} \dots\dots\dots (2.1)$$

Al-Quais (2015) dalam penelitiannya melakukan pemisahan senyawa steroid dari akar rumput bamboo (*Lophatherum gracile* Brongu) dengan KLT menggunakan variasi kombinasi eluen dengan kepolaran yang berbeda dimana hasil penelitian menunjukkan bahwa *n*-heksana dan etil asetat (8:2) merupakan

campuran eluen terbaik. Fikri (2019) memisahkan senyawa steroid dari *Chlorella* sp. dengan metode KLT menggunakan variasi perbandingan eluen *n*-heksana:etil asetat sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 KLTA pada variasi perbandingan volume eluen *n*-heksana:etil asetat

No.	Perbandingan Eluen (<i>n</i> -heksana:etil asetat)	Jumlah Spot	Banyaknya Dugaan Senyawa Steroid
1	3,50 : 1,50	14	1
2	3,75 : 1,25	14	2
3	4,00 : 1,00	12	2
4	4,25 : 0,75	11	1
5	4,50 : 0,50	10	2

Berdasarkan Tabel 2.3, eluen *n*-heksana:etil asetat dengan perbandingan volume 3,75:1,25 merupakan perbandingan terbaik kerana menghasilkan spot terbanyak yaitu 14 spot dengan 2 spot steroid tunggal yang ditandai dengan warna hijau/biru. Begitu juga dengan penelitian Azah (2019), fase terbaik dalam penggunaan metode KLTP adalah *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 3,75:1,25 kerana dalam penelitiannya memberikan hasil positif terhadap pemisahan senyawa aktif steroid dalam *Hydrilla verticillata* yaitu dengan terbentuknya 13 spot dengan 2 spot senyawa steroid tunggal.

2.8 Uji Aktivitas Antioksidan

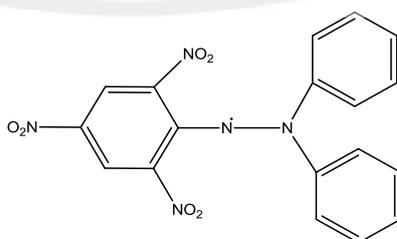
2.8.1 Antioksidan

Senyawa antioksidan secara kimia merupakan senyawa yang memberikan elektron (elektron donor). Adapun secara biologis, senyawa antioksidan merupakan senyawa yang memiliki kemampuan untuk menangkal ataupun

meredam dampak negatif dari oksidan. Senyawa antioksidan ini bekerja dengan cara memberikan atau mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa oksidan sehingga aktivitas dari senyawa oksidan tersebut dapat terhambat. Antioksidan sangat dibutuhkan oleh tubuh untuk melindungi tubuh dari serangan radikal bebas yang terdapat di dalam tubuh. Senyawa antioksidan dalam kadar tertentu mampu untuk menghambat ataupun memperlambat kerusakan-kerusakan akibat adanya proses oksidasi (Sayuti, dkk., 2015).

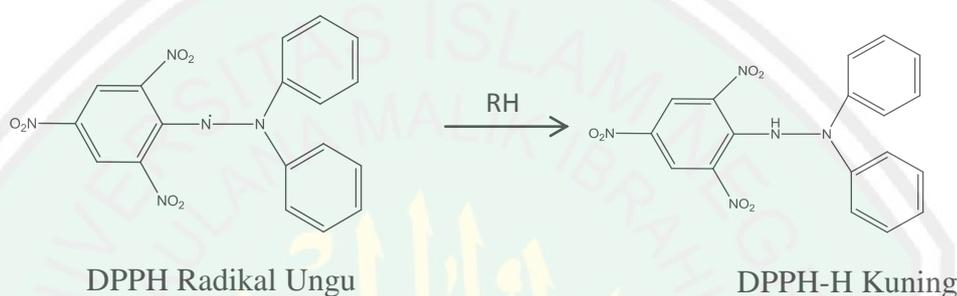
2.8.2 Uji Antioksidan Metode DPPH

Salah satu metode yang paling umum digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan dari suatu senyawa dengan menggunakan radikal bebas *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH). Molekul DPPH ditandai sebagai radikal bebas yang stabil dimana elektron bebas terdelokasi pada suatu molekul, sehingga molekul tersebut menjadi tidak reaktif sebagaimana radikal bebas yang lain (Molyneux, 2003). Metode DPPH merupakan metode pengujian antioksidan yang cepat, sederhana, dan tidak memerlukan banyak reagen kimia. Hasil pengujian dengan metode DPPH menunjukkan kemampuan antioksidan sampel secara umum, tidak berdasar jenis radikal yang dihambat (Yuhernita dan Juniarti, 2011). Struktur DPPH ditunjukkan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Struktur DPPH (Yuhernita dan Juniarti, 2011)

DPPH menerima elektron atau radikal hydrogen dan akan membentuk molekul diamagnetik yang sifatnya yaitu stabil. Interaksi antara DPPH dengan antioksidan secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH, akan membuat karakter radikal bebas DPPH menjadi netral (Simanjuntak, dkk., 2004). Mekanisme DPPH dengan akseptor ditunjukkan pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Mekanisme DPPH akseptor (Yuhernita dan Juniarti, 2011)

Aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menggunakan prinsip spektrofotometri. Senyawa DPPH berwarna ungu tua yang terdeteksi pada panjang gelombang sinar tampak 515-518 nm. Suatu senyawa memiliki aktivitas antioksidan jika senyawa tersebut mampu mendonorkan atom hidrogennya untuk berikatan dengan DPPH sehingga membentuk DPPH tereduksi yang ditandai dengan semakin berkurangnya intensitas warna ungu menjadi kuning pucat (Hanani, dkk., 2005). Parameter yang digunakan untuk menginterpretasikan hasil pengujian dengan DPPH adalah EC_{50} (*Efficiency concentration*).

EC_{50} adalah konsentrasi larutan sampel atau substrat yang akan menyebabkan reduksi terhadap 50% aktivitas DPPH. Semakin kecil nilai EC_{50} berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat apabila nilai EC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat

apabila nilai EC₅₀ antara 50-100 ppm, sedang apabila nilai EC₅₀ 101-150 ppm dan lemah apabila nilai EC₅₀ 150-200 ppm (Rohman dan Riyanto, 2005; Molyneux, 2003).

Aktivitas penangkapan radikal bebas dinyatakan dengan satuan persen (%) aktivitas antioksidan. Nilai ini diperoleh dengan persamaan sebagai berikut (Molyneux, 2003).

$$\% \text{Aktivitas Antioksidan} = \frac{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel})}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\% \dots \dots \dots (2.2)$$

Berdasarkan persamaan tersebut, semakin tinggi tingkat diskolorisasi (ditandai dengan nilai absorbansi semakin kecil) maka semakin tinggi nilai aktivitas penangkapan radikal bebas (Molyneux, 2003). Persen (%) aktivitas antioksidan yang didapatkan selanjutnya dianalisis menggunakan persamaan regresi non linear dengan aplikasi *GraphPad prism software, Regression for analyzing doerspondense data* sehingga didapatkan nilai EC₅₀.

2.9 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis adalah instrumen untuk mengukur transmisi atau absorben dengan prinsip interaksi antara sinar UV atau *visible* dengan materi yang berupa molekul, sehingga terjadi transisi tingkat elektronik suatu molekul antara orbital ikatan dengan orbital non ikatan yang dapat diukur dengan energi yang merambat berupa panjang gelombang dengan satuan nanometer. Jenis transisi elektronik yang dapat terjadi adalah transisi $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, dan $n \rightarrow \pi^*$ (Panji, 2012).

Spektrofotometer UV-Vis dapat digunakan untuk mengukur spektrum serapan kandungan tumbuhan dalam larutan yang sangat encer dengan pembanding blanko pelarut. Senyawa yang tidak memiliki warna diukur pada panjang gelombang 200-400 nm. Sementara senyawa berwarna diukur pada panjang gelombang 400-800 nm (Harbone, 1987).

Berdasarkan penelitian Laili (2016), serapan maksimum isolat steroid alga merah *Euchema spinosum* adalah pada panjang gelombang 202 nm. Adapun identifikasi senyawa steroid pada mikroalga *Chlorella* sp. yang dilakukan oleh Dinasti (2016), Fasya (2016), dan Maghfirah (2019) menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum isolat steroid adalah 204 nm pada fraksi etil asetat dan n-butanol mikroalga *Chlorella* sp. Begitu juga telah teridentifikasi serapan maksimum senyawa steroid pada panjang gelombang 203 nm dalam ekstrak etil asetat tumbuhan paku yang terdeteksi sebagai kampasterol dan β -sitosterol (Aprelia dan Suyatno, 2013). Panjang gelombang 202, 203, dan 204 nm menunjukkan bahwa terdapat ikatan C=C tidak terkonjugasi akibat adanya transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ (Aprelia dan Suyatno, 2013).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia. Penelitian juga dilaksanakan di Laboratorium Ekologi Tumbuhan Jurusan Biologi. Adapun waktu pelaksanaan yaitu pada bulan Februari sampai dengan Juli 2020.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat-Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah erlenmeyer 1000 mL, oven, timbangan analitik, *heater*, *hotplate*, kaca arloji, lampu TL 36 watt, *shaker*, *incubator*, spatula, pengaduk kaca, autoklaf, pipet mikro, pipet ukur, pipet tetes, pipet volume, penjepit, bola hisap, erlenmeyer, gelas kimia, corong pisah, statif, pipa kapiler, *chamber* KLT, *hairdryer*, gelas vial, corong gelas, gelas ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *macrotube*, seperangkat alat penyaring vakum, *centrifuge*, *rotary evaporator vacum*, *vortex mixer*, lampu UV 256 dan 366 nm, kuvet, dan spektrofotometer UV-Vis (*Merk* Varian Cary 50).

3.2.2 Bahan-Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat mikroalga *Chlorella* sp. yang didapatkan dari Laboratorium Ekologi Tumbuhan jurusan Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Bahan-bahan untuk membuat reagen *Lieberman Burchard* (LB) yaitu H₂SO₄ 97%, kloroform, dan asam asetat

anhidrida. Adapun bahan-bahan lain yang digunakan adalah tauge (kacang hijau), metanol p.a, *n*-heksana, etil asetat, *n*-butanol, HCl 2 N, Na₂CO₃ 5%, reagen DPPH 0,2 mM, gas N₂, etanol 95 %, KBr, akuades, tisu, *aluminium foil*, dan kertas whatman no.42, dan plat KLT silika gel 60 F₂₅₄.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan melalui tahap pengujian eksperimental di laboratorium. Sampel mikroalga *Chlorella* sp. berupa isolat dikultivasi dalam MET 4 % pada pH 7 hingga mencapai fase stasioner dengan fotoperioditas 14 jam terang dan 10 jam gelap, kemudian dipanen dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit serta disaring sehingga didapat biomassa basah *Chlorella* sp. Selanjutnya dikeringanginkan selama 2-3 hari pada suhu ruang dan didapatkan biomassa kering. Lalu biomassa kering hasil kultivasi diekstrak senyawa steroidnya dengan maserasi selama 24 jam menggunakan pelarut metanol pro analisis hingga didapatkan ekstrak biomassa *Chlorella* sp. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan menguapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator*. Lalu ekstrak pekat dihidrolisis dengan HCl 2 N dan dipartisi dengan pelarut *n*-butanol. Selanjutnya, diidentifikasi keberadaan senyawa steroid pada fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan reagen LB. Kemudian hasil partisi *n*-butanol dipisahkan senyawa steroidnya menggunakan KLTP dengan eluen *n*-heksana : etil asetat (3,75:1,25). Hasil KLTP diidentifikasi dibawah sinar lampu UV 254 dan 366 nm sehingga akan muncul spot senyawa steroid. Spot tersebut dikerok dan dilarutkan. Kemudian larutan dipekatkan kembali dengan *centrifuge*. Selanjutnya isolat hasil KLTP dan fraksi *n*-butanol

diuji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dengan variasi konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm. Terakhir dilakukan diidentifikasi pada isolat hasil KLTP dan fraksi *n*-butanol dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

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. Ekstraksi maserasi senyawa aktif pada Mikroalga *Chlorella* sp. dengan pelarut metanol p.a;
3. Hidrolisis asam ekstrak pekat metanol mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan HCl 2 N dan dipartisi dengan pelarut *n*-butanol;
4. Uji fitokimia golongan senyawa steroid menggunakan reagen LB;
5. Pemisahan senyawa steroid dengan KLTP menggunakan eluen *n*-heksana:etil asetat (3,75:1,25);
6. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH terhadap fraksi *n*-butanol dan isolat steroid mikroalga *Chlorella* sp.;
7. Identifikasi senyawa steroid dengan spektrofotomeer UV-Vis;
8. Analisis Data.

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella* sp.

3.5.1.1 Pembuatan Media Ekstrak Tauge (MET) 4 %

Tahap awal pembuatan MET yaitu pembuatan larutan stok MET dengan merebus 100 g tauge dalam 500 mL akuades yang mendidih selama 1 jam hingga volume ekstrak 200 mL. MET 4 % (v/v) sebanyak 900 mL dibuat dengan cara melarutkan 36 mL larutan stok MET ke dalam akuades 864 mL di dalam Erlenmeyer 1000 mL (Prihantini, dkk., 2010).

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

Sebanyak 150 ml isolat *Chlorella* sp. ditambahkan kedalam masing-masing 900 mL MET 4 % dalam erlenmeyer 1000 mL dan ditempatkan pada rak kultur yang telah dilengkapi pencahayaan menggunakan lampu TL 36 watt (intensitas cahaya 1000-4000 lux) dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap selama 10 hari (Prihantini, dkk., 2010).

3.5.1.3 Pemanenan Biomassa *Chlorella* sp.

Pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella* sp. dilakukan pada hari ke-10 kultivasi. Media kultur *Chlorella* sp. disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Selanjutnya, biomassa *Chlorella* sp. dipisahkan dari supernatannya dan dilakukan penimbangan serta dicatat sebagai berat basah (Desianti, dkk., 2014). Sampel biomassa *Chlorella* sp. seluruhnya diambil dan dikeringanginkan pada suhu ruang (25-30 °C) selama 2-3 hari. Hasil yang didapatkan selanjutnya ditimbang dan dicatat sebagai berat kering mikroalga *Chlorella* sp. (Desianti, dkk., 2014).

3.5.2 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstraksi senyawa aktif dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol p.a. Sebanyak 6 g biomassa *Chlorella sp.* kering dari fase pemanenan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan direndam dengan pelarut metanol p.a dengan perbandingan 1:10 (b/v) (6 g : 60 mL) sambil di-shaker dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam pada suhu kamar. Kemudian, hasil perendaman disaring dengan corong buchner hingga terpisah antara filtrat dan residunya. Residu yang didapatkan diremaserasi kembali hingga 7 kali pengulangan. Filtrat yang didapatkan dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* hingga diperoleh ekstrak pekat (Imamah, dkk., 2015). Ekstrak pekat ditimbang dan dihitung nilai rendemennya dengan Persamaan 3.2 sebagai berikut (Khopkar, 2003):

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

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

Ekstrak pekat metanol dihidrolisis dengan katalis HCl 2 N dengan jumlah perbandingan 1:2 dan distirer selama 2 jam pada suhu ruang (Artati, dkk., 2012). Selanjutnya ditambahkan natrium bikarbonat jenuh hingga pH-nya netral (Imamah, dkk., 2015). Setelah dilakukan proses hidrolisis, dilanjutkan dengan partisi menggunakan pelarut *n*-butanol dengan jumlah perbandingan 1:10 (0,74 gr : 7,4ml). Proses partisi dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan. Ekstrak hasil partisi dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* dan dialiri dengan gas N₂. Selanjutnya, ekstrak pekat hasil partisi dihitung rendemennya menggunakan Persamaan 3.1.

3.5.4 Uji Fitokimia Golongan Senyawa Steroid dengan Reagen LB

Fraksi *n*-butanol dilarutkan kedalam 0,5 mL kloroform, 0,5 mL asam asetat anhidrida dan 1-2 mL asam sulfat pekat (melewati dinding tabung). Setelah itu diamati perubahan warnanya. Golongan steroid akan ditunjukkan oleh terbentuknya cincin warna hijau kebiruan.

3.5.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP

Pemisahan KLTP menggunakan plat silika gel GF₂₅₄ dengan ukuran 10 x 20 cm sebagai medium pemisahan dan fasa diamnya. Ekstrak pekat hasil partisi diencerkan dalam pelarut *n*-butanol dan ditotolkan sepanjang plat pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler. Selanjutnya dielusi dengan menggunakan eluen yang memberikan hasil pemisahan terbaik pada KLT kualitatif percobaan sebelumnya yaitu *n*-heksana : etil asetat (3,75 :1,25) (Fikri, 2019). Hasil pemisahan di bawah lampu UV 254 dan 366 nm. Noda yang didapat diamati dan noda yang diduga senyawa steroid dikerok kemudian dilarutkan dengan *n*-heksana. Selanjutnya larutan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit dan dibiarkan selama 4 jam untuk mengendapkan silikanya. Supernatan yang diperoleh diuapkan pelarutnya sehingga didapatkan isolat pekat yang didasarkan pada harga R_f dari senyawa steroid (Rahmawati, 2016).

3.5.6 Uji Aktivitas Antioksidan dengan metode DPPH

3.5.6.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Etanol 95 % dipipet sebanyak 3 mL kemudian ditambahkan larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 mL. Lalu dimasukkan kedalam kuvet hingga penuh dan di cari λ_{maks} larutan dengan spektrofotometer UV-Vis pada daerah panjang

gelombang sinar tampak, yaitu 400-800 nm dan dicatat hasil pengukuran λ_{maks} untuk dipakai di tahap selanjutnya (Anggraeni, dkk., 2014).

3.5.6.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Pada Sampel

Sampel fraksi butanol dan isolat hasil KLTP dibuat konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm dalam etanol 95%. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 3 mL dan ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,2 mM, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Setelah itu diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh sebelumnya. Data absorbansi yang didapatkan tiap konsentrasi ekstrak dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidan dengan menggunakan Persamaan 3.3 sebagai berikut (Arindah, 2010):

$$\% \text{ Aktivitas Antioksidan} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \% \dots\dots\dots(3.3)$$

Kontrol yang digunakan yaitu larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 mL dalam 3 mL etanol 95 %. Selanjutnya dihitung nilai EC_{50} dengan memperoleh persamaan regresi non linear menggunakan program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing doseresponse data*” .

Data X diinput sebagai konsentrasi sampel dan data Y sebagai % aktivitas antioksidan. Konsentrasi sampel dinyatakan dalam logaritma X. Selanjutnya, dipilih analisis regresi nonlinear dan diatur pada persamaan “log(agonist) vs. normalized response -- Variable slope” pada pilihan model “Dose-Response-Stimulation” serta diatur interval kepercayaan pada 95%.

3.5.7 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometri UV-Vis

Fraksi *n*-butanol dan isolat yang didapatkan dari pemisahan KLTP dibuat konsentrasinya menjadi 20 ppm. Selanjutnya dimasukkan kedalam kuvet hingga sepertiganya dan dianalisis pada panjang rentang gelombang 200-800 nm menggunakan spektrofotometer UV- Vis sehingga akan diperoleh spektrum dan panjang gelombang maksimum (Maghfiroh, 2019).

3.5.8 Analisis Data

Data yang didapatkan berupa grafik dan angka yang selanjutnya dideskripsikan hasilnya. Aktivitas antioksidan berupa data angka yang dinyatakan sebagai nilai EC₅₀. Identifikasi senyawa steroid dapat diketahui dengan melakukan analisis isolat steroid hasil dari pemisahan KLTP dengan menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis dimana spektra yang dihasilkan dibandingkan dengan literatur.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kultivasi dan Pemanenan Mikroalga *Chlorella* sp.

Kultivasi bertujuan untuk mengembangbiakkan mikroalga *Chlorella* sp. dalam lingkungan tertentu yang terkontrol. Pada penelitian ini, kultivasi dilakukan dalam Medium Ekstra Tauge (MET) yang merupakan medium kultur alami dengan kandungan-kandungan nutrisi yang dibutuhkan oleh mikroalga *Chlorella* sp. seperti nitrogen dan fosfor (Prihantini, dkk., 2010). Nutrisi dalam medium ini berasal dari tauge yang direbus dalam air pada titik didihnya sehingga didapatkan cairan berwarna kuning dan sedikit kental. Konsentrasi MET yang digunakan adalah sebesar 4%. Hal ini didasarkan pada penelitian Prihantini, dkk. (2010) yang menunjukkan bahwa MET 4% menghasilkan kerapatan sel paling banyak dengan jumlah 3.981.071 sel/mL.

Ketersediaan cahaya menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi proses pertumbuhan mikroalga dalam media kulturnya. Pada penelitian ini, pengganti sinar matahari untuk proses fotosintesis saat kultivasi berasal dari cahaya lampu. Selain itu, untuk tumbuh dengan optimum, mikroalga membutuhkan temperatur air dengan kisaran suhu 25 – 30 °C (Aprilliyanti, dkk., 2016).

Pemanenan *Chlorella* sp. dilakukan pada hari ke-10 kultivasi. Hal ini didasarkan pada penelitian Fasya, dkk. (2013) yang menyatakan bahwa hari ke-10 merupakan tahap stasioner dari pertumbuhan mikroalga *Chlorella* sp. dengan kelimpahan sel tertinggi sebesar 4.880.000 sel/mL yang ditandai dengan kultur berwarna hijau tua. Pada tahap ini juga berlangsung perombakan produk metabolit

primer serta proses metabolisme sekunder yang merupakan keseluruhan dari proses sintesis (Herbert, 1995). Perbandingan warna kultur yang mencolok dari awal kultivasi sampai hari ke-10 kultivasi yang menunjukkan terjadinya penambahan kepadatan sel mikroalga *Chlorella* sp. ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Perubahan warna kultur mikroalga *Chlorella* sp

Perubahan warna kultur yang terjadi menunjukkan bahwa mikroalga *Chlorella* sp. dapat tumbuh dalam MET 4% dengan baik sehingga terjadi penambahan jumlah sel dan klorofil pada mikroalga setiap harinya (Prihantini, dkk., 2010). Kepadatan sel yang terus meningkat menandakan kandungan MET 4% mampu memenuhi kebutuhan nutrient N dan P untuk tumbuh.

Proses pemanenan *Chlorella* sp. dilakukan dengan teknik sentrifugasi. Hasil sentrifugasi menunjukkan supernatan berwarna bening yang merupakan MET 4% dengan pelet berupa endapan berwarna hijau tua yang merupakan biomassa *Chlorella* sp. Kemudian, dilakukan proses dekantasi untuk mendapatkan biomassa basah *Chlorella* sp. agar terpisah dari mediumnya. Selanjutnya, biomassa basah dikering-anginkan hingga didapatkan biomassa kering *Chlorella* sp. Pengeringan bertujuan untuk menurunkan kadar air yang menjadi penyebab tumbuhnya mikroorganisme sehingga bahan menjadi lebih

awet (Risdianti, dkk., 2016). Kemudian biomassa kering dikerok dan diperoleh biomassa berwujud serbuk. Wujud serbuk akan memperbesar kontak antara sampel dengan pelarut sehingga proses pengekstrakan senyawa aktif saat maserasi berlangsung maksimal. Dari proses preparasi sampel ini, diperoleh biomassa kering mikroalga *Chlorella* sp. dengan berat 6 gram.

4.2 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga *Chlorella* sp.

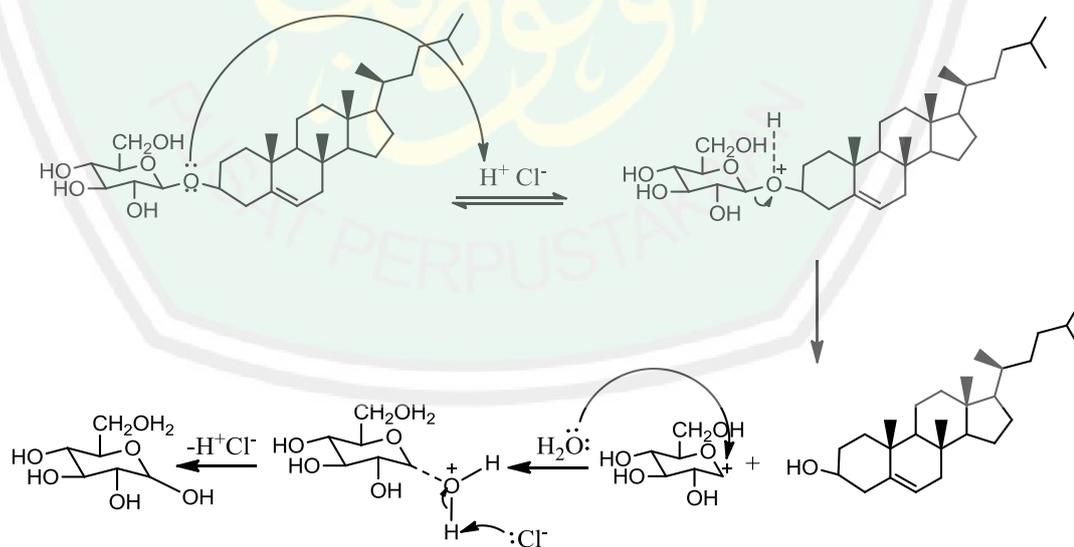
Ekstraksi bertujuan untuk memperoleh kandungan zat aktif dari suatu bahan alam dengan pelarut yang sesuai. Dalam penelitian ini, untuk mengekstrak metabolit sekunder dari mikroalga *Chlorella* sp. digunakan metode ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol p.a. Selama proses perendaman, metanol akan menembus jaringan mikroalga dan melisiskan membran sel mikroalga untuk menarik metabolit sekunder keluar dan terlarut dalam pelarut metanol berdasarkan prinsip *like dissolve like*. Pengocokan sampel saat perendaman berlangsung bertujuan untuk memaksimalkan proses terekstraknya metabolit sekunder oleh pelarut. Selanjutnya dilakukan penyaringan dengan penyaring vakum untuk memaksimalkan pemisahan filtrat dengan residu. Filtrat berwarna hijau tua menunjukkan senyawa aktif yang sudah terlarut dalam pelarut metanol.

Remaserasi pada residu hasil filtrasi dilakukan sebanyak 7 kali pengulangan. Intensitas warna hijau dari filtrat mengalami penurunan pada setiap pengulangannya. Hal ini dapat diasumsikan bahwa senyawa aktif mikroalga *Chlorella* sp. berangsur-angsur telah terekstrak ke dalam pelarut metanol dengan maksimal. Setelah itu, pelarut metanol diuapkan dengan *rotary evaporator* dan didapatkan ekstrak pekat berwarna hijau tua. Rendemen ekstrak kasar pekat

metanol mikroalga *Chlorella* sp. dalam penelitian ini adalah sebesar 14,17% (Perhitungan L.4.1) dengan berat 0,85 g.

4.3 Hidrolisis dan Partisi Mikroalga *Chlorella* sp.

Metabolit sekunder yang terkandung dalam sampel umumnya berada dalam bentuk glikosidanya (terikat dengan gugus gula), begitu juga halnya dengan steroid dalam mikroalga *Chlorella* sp. Untuk memperoleh senyawa steroid yang bebas dari gula perlu dilakukan pemutusan ikatan glikosida melalui proses hidrolisis dengan penambahan asam kuat sebagai katalis yang akan mempercepat reaksi. Asam kuat yang digunakan adalah HCl 2 N karena mampu terionisasi sempurna dan menghasilkan garam sebagai produk samping yang tidak berbahaya saat penetralan (Saleh, dkk., 2016; Fasya, dkk., 2016). Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis ikatan glikosida hingga steroid terputus dari glikonnya ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Dugaan mekanisme reaksi hidrolisis ikatan glikosida

Hidrolisat yang dihasilkan tampak berbentuk gumpalan-gumpalan kecil berwarna hijau tua yang tidak larut sebagian pada HCl. Proses reaksi hidrolisis berlangsung secara *reversible*, sehingga perlu diberhentikan dengan menambahkan basa NaHCO₃ dengan prinsip penetralan. Penetralan bertujuan untuk menyetabilkan glikosida sehingga tidak terbentuk kembali ikatan antara glikon dan aglikonnya (Fessenden dan Fessenden, 1986; Fasya, dkk., 2016). Saat penambahan NaHCO₃, gelembung-gelembung yang merupakan CO₂ muncul pada hidrolisat. Netralnya komponen ditandai dengan tidak munculnya CO₂ pada hidrolisat yang menunjukkan NaHCO₃ yang sudah tidak bereaksi lagi dengan HCl. Hal ini dapat dipastikan dengan pengukuran pH larutan yang menunjukkan kondisi netral (angka 7) pada indikator pH universal. Adapun reaksi yang terjadi saat penambahan NaHCO₃ adalah sebagai berikut:



Hasil hidrolisis selanjutnya di partisi menggunakan pelarut *n*-butanol berdasarkan prinsip *like dissolve like*. Dalam proses ini akan terbentuk 2 lapisan (fasa organik dan fasa air) akibat adanya perbedaan densitas pelarut *n*-butanol (0,8 g/mL) dan air (1 g/mL). Senyawa steroid akan terdistribusi ke dalam pelarut organik *n*-butanol, sementara glikon dan garam hasil hidrolisis akan tetap berada dalam fasa air. Proses partisi dilakukan sebanyak 5 kali agar senyawa steroid terdistribusi maksimal ke dalam fasa organik. Fraksi *n*-butanol pekat yang diperoleh berwarna coklat kehitaman dan memiliki rendemen sebesar 40,54% (Perhitungan L. 4.2) dengan berat 0,30 g.

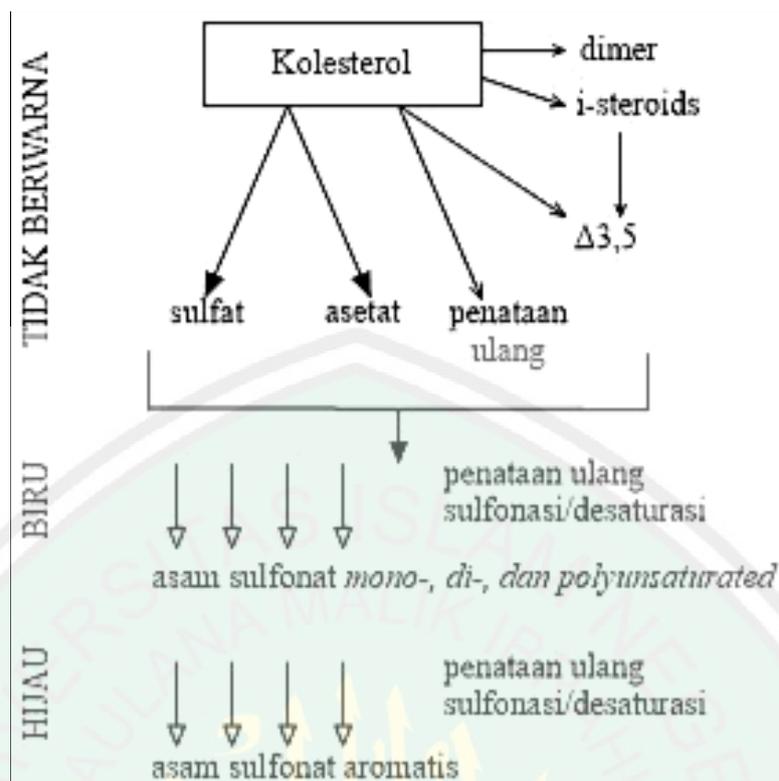
4.4 Uji Fitokimia Senyawa Steroid Fraksi *n*-butanol

Uji fitokimia bertujuan untuk mengetahui keberadaan senyawa steroid pada hasil partisi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp. Uji fitokimia dilakukan dengan menambahkan reagen LB (*Lieberman Burchard*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil partisi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp. positif mengandung golongan senyawa steroid yang ditandai dengan munculnya cincin berwarna hijau seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Uji fitokimia senyawa steroid

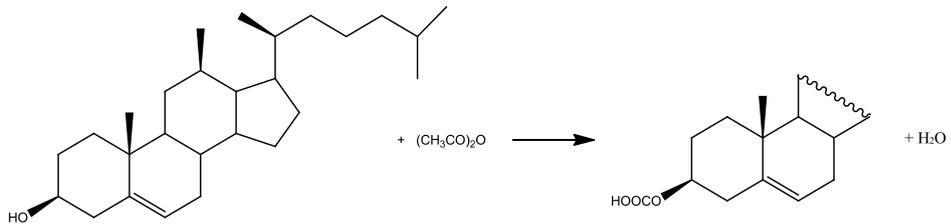
Hasil positif steroid pada penelitian ini sesuai dengan Fikri (2019) dan Fasya, dkk. (2020^a) yang menyatakan bahwa munculnya cincin berwarna hijau dari reaksi antara reagen LB dengan sampel merupakan tanda positif dari keberadaan senyawa steroid. Jalur reaksi reagen LB dengan senyawa sterol ditunjukkan oleh Gambar 4.4.



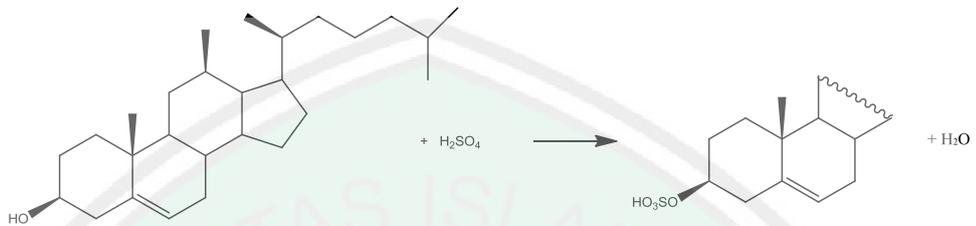
Gambar 4.4 Jalur reaksi LB dengan kolesterol (Xiong, dkk., 2007)

Xiong, dkk. (2017) menyatakan bahwa reagen *Liebermann-Burchard* yang terdiri dari asam sulfat dan asam asetat anhidrida dalam pelarut kloroform akan mengubah kolesterol menjadi turunan asetat dan sulfatnya sebagai produk mayor melalui proses asetilasi dan sulfonasi. Selain itu, dihasilkan pula produk minor berupa steroid-i, *cholesta-3,5-diene*, dan senyawa tak jenuh lainnya hasil penataan ulang. Selanjutnya, produk-produk tersebut mengalami penataan ulang sulfonasi dan desaturasi membentuk senyawa *mono-, di-, polyunsaturated sulfonic acids*. Kemudian, senyawa poliena secara bertahap akan mengalami penataan ulang kembali melalui sulfonasi dan desaturasi membentuk senyawa aromatik. Mekanisme reaksi dari kolesterol dengan LB ditunjukkan pada Gambar 4.5. Adapun respons warna yang dihasilkan tergantung pada kinetika laju reaksi antara steroid dengan reagen LB.

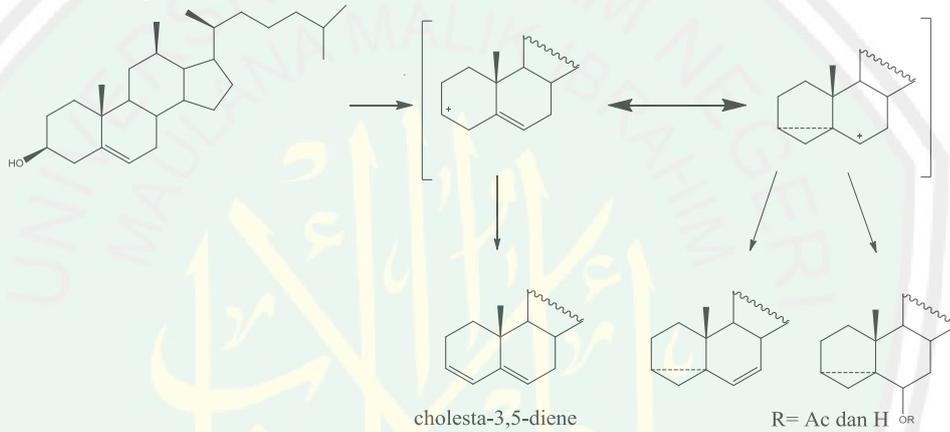
Asetilasi



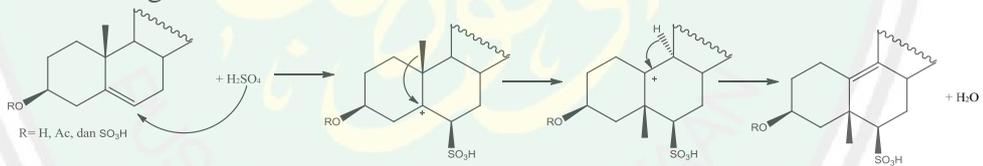
Sulfonasi



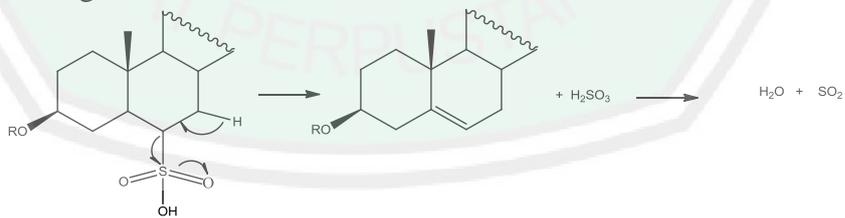
Penataan Ulang



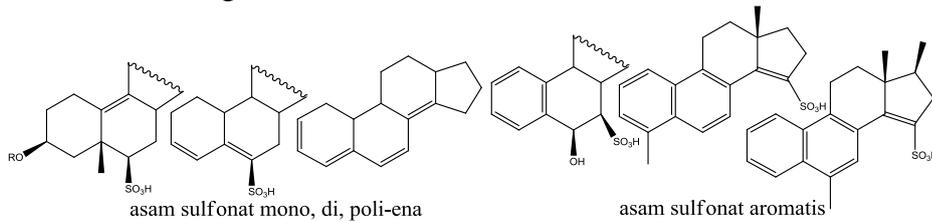
Penataan Ulang Sulfonasi



Penataan Ulang Desaturasi



Produk Penataan ulang hasil sulfonasi dan desaturasi

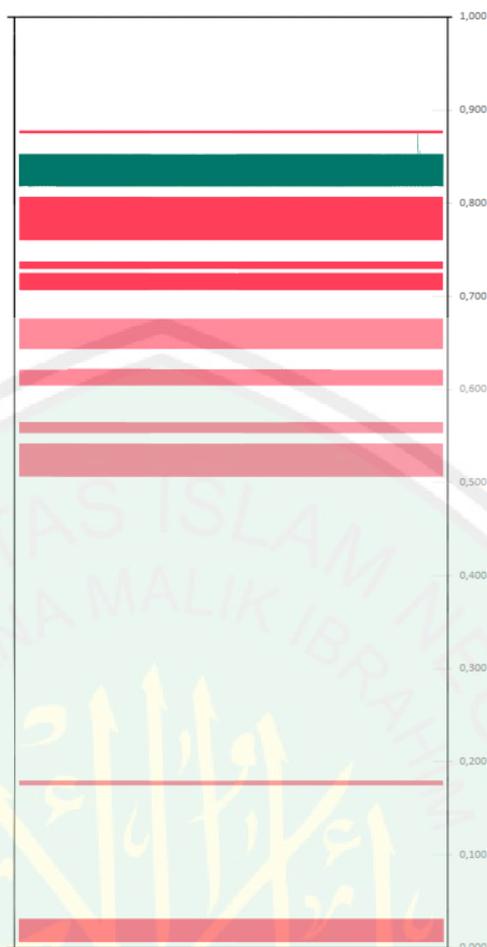


Gambar 4.5 Mekanisme reaksi kolesterol dengan LB (Xiong, dkk., 2007)

4.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP

Pemisahan dengan KLTP bertujuan untuk mendapatkan senyawa steroid yang lebih murni dari hasil partisi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp. Fasa diam yang digunakan dalam KLTP adalah plat silika gel G₆₀F₂₅₄ berukuran 10 x 20 cm. Adsorben yang menempel pada plat tersebut berbahan dasar gypsum dengan pori-pori berukuran 60 Å⁰ dan mempunyai kemampuan berfluorosensi pada panjang gelombang minimal 254 nm (Fasya, 2016). Adapun fasa geraknya merupakan campuran eluen yang terdiri dari 2 pelarut organik yaitu *n*-heksana:etil asetat (3,75:1,25). Fasa gerak yang dipilih merupakan campuran eluen dengan perbandingan terbaik dari 5 variasi eluen yang digunakan berdasarkan KLTA yang dilakukan oleh Fikri (2019). Dalam penelitiannya, Fikri (2019) menyatakan bahwa campuran eluen *n*-heksana:etil asetat (3,75:1,25) dapat memisahkan senyawa steroid dengan baik dan menunjukkan 14 spot yang tidak berekor dan di antaranya merupakan 2 spot senyawa steroid berwarna hijau dan biru.

Campuran eluen yang digunakan memiliki kepolaran yang lebih rendah dibandingkan dengan silika. Noda yang bersifat lebih polar akan memiliki R_f yang kecil karena lebih tertahan pada silika (fasa diam). Sementara noda yang bersifat lebih non polar akan memiliki R_f yang besar karena ikut terbawa oleh eluen yang sifatnya lebih non polar. Hasil KLTP fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp. dalam penelitian ini disajikan pada Gambar 4.6 dan Tabel 4.1.



Gambar 4.6 Visualisasi hasil KLTP fraksi *n*-butanol pada UV λ 366 nm

Tabel 4.1 Hasil pemisahan KLTP pada sinar UV λ 366 nm (Perhitungan L.4.3)

No.	Nilai R_f	Warna noda	Dugaan Senyawa
1.	0,02	Merah	Triterpenoid
2.	0,18	Merah	Triterpenoid
3.	0,53	Merah	Triterpenoid
4.	0,56	Merah	Triterpenoid
5.	0,62	Merah	Triterpenoid
6.	0,66	Merah	Triterpenoid
7.	0,72	Merah	Triterpenoid
8.	0,73	Merah	Triterpenoid
9.	0,77	Merah	Triterpenoid
10.	0,83	Hijau Kebiruan	Steroid
11.	0,88	Merah	Triterpenoid

Berdasarkan hasil KLTP, didapatkan 11 spot dengan 1 spot yang diduga senyawa steroid pada spot nomor 10 dan mempunyai nilai R_f 0,83. Dilihat dari nilai R_f -nya yang besar, spot tersebut memiliki kepolaran yang rendah sehingga cenderung berinteraksi lebih kuat dengan fasa gerak yang bersifat lebih nonpolar dibandingkan dengan fasa diamnya. Sebagaimana diketahui bahwa struktur dasar steroid bersifat non polar. Adanya penambahan gugus OH di rantai samping struktur sterol mengakibatkan kepolaran sterol meningkat sesuai dengan jumlah OH yang dikandungnya.

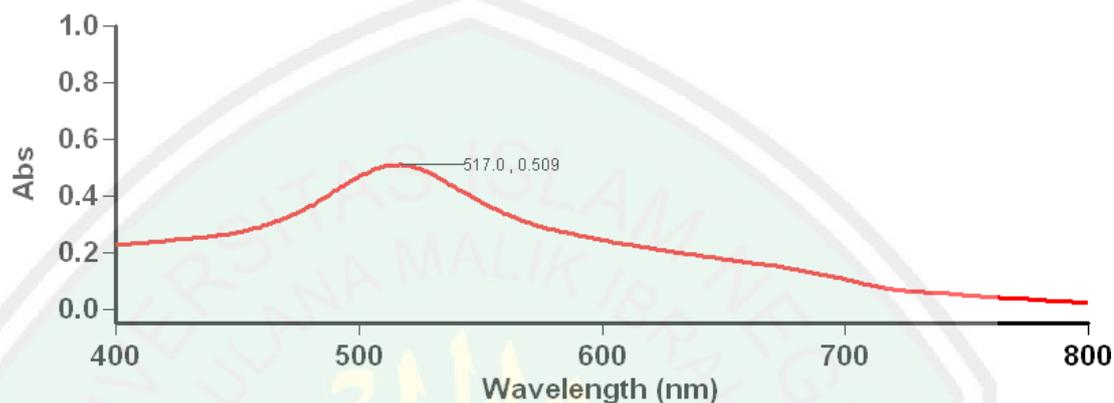
Spot terduga senyawa steroid berwarna hijau kebiruan dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm. Hal ini sesuai dengan penelitian Aprelia dan Suyatno (2013) bahwa noda hasil KLTP dengan warna hijau kebiruan menunjukkan positif senyawa steroid. Begitu juga dalam penelitian Fasya, dkk. (2020^a) yang menghasilkan spot KLTP dengan warna hijau kebiruan pada R_f 0,7514 dan menyatakan adanya keberadaan senyawa steroid yang dapat diperkuat analisisnya dengan penentuan struktur isolat dengan berbagai instrumentasi.

4.6 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

4.6.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang radikal DPPH yang mempunyai nilai absorbansi tertinggi. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh akan digunakan dalam pengukuran aktivitas antioksidan pada fraksi *n*-butanol dan isolat 10 KLTP fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp. Pengukuran aktivitas antioksidan pada panjang gelombang maksimum akan memaksimalkan kepekaan dan meminimalkan kesalahan (Rohman dan Gandjar, 2007). Reagen DPPH memiliki warna

komplementer ungu karena memiliki elektron yang tidak berpasangan dan memiliki panjang gelombang maksimum pada daerah 515-520 nm (Prakash, 2001). Hasil spektra UV-Vis menunjukkan panjang gelombang maksimum DPPH 0,2 mM pada daerah 517 nm seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.7.



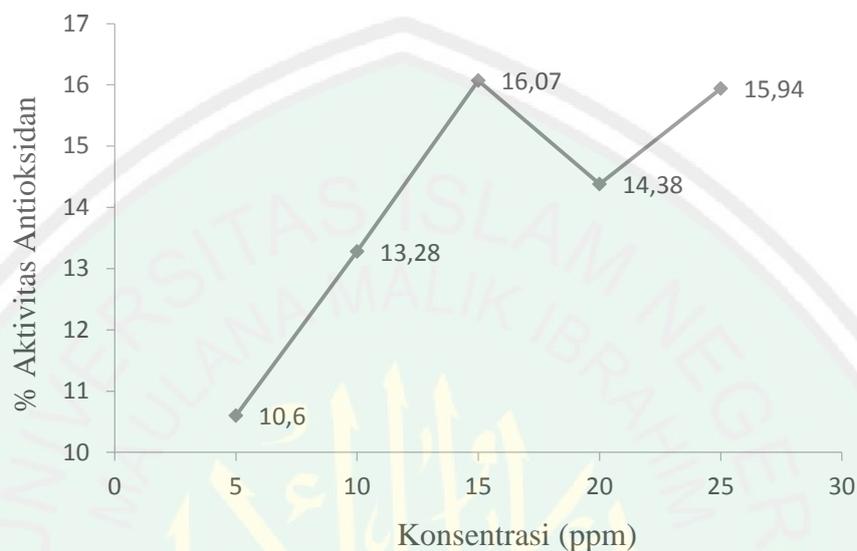
Gambar 4.7 Spektra UV-Vis DPPH 0,2 mM

Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini sesuai dengan penelitian Yudiati, dkk. (2011) yang menunjukkan bahwa radikal DPPH memiliki panjang gelombang maksimum 517 nm.

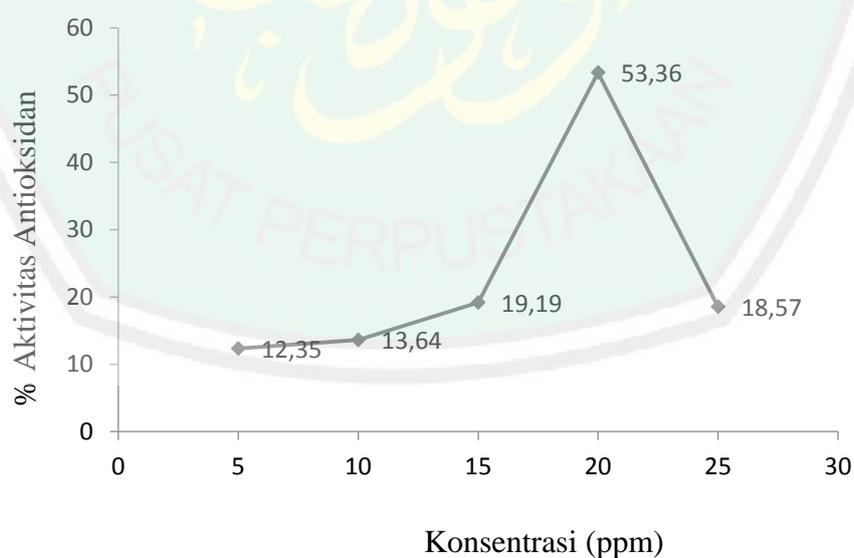
4.6.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel

Fraksi *n*-butanol dan isolat 10 KLTP selanjutnya diuji aktivitas antioksidan dalam larutan kontrol DPPH 0,2 mM dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum DPPH yang telah diperoleh sebelumnya, yaitu 517 nm. Kemampuan fraksi *n*-butanol dan isolat 10 KLTP dalam menghambat radikal bebas dinyatakan dalam persen (%) aktivitas antioksidan. Persentasi ini diperoleh dari perbedaan serapan antara absorban DPPH dengan absorban sampel yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil pengukuran persen (%)

aktivitas antioksidan sampel fraksi *n*-butanol dan isolat 10 KLTP pada konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ditunjukkan oleh grafik pada Gambar 4.8 (Perhitungan L.4.4) dan Gambar 4.9 (Perhitungan L.4.4).



Gambar 4.8 Grafik % aktivitas antioksidan fraksi *n*-butanol



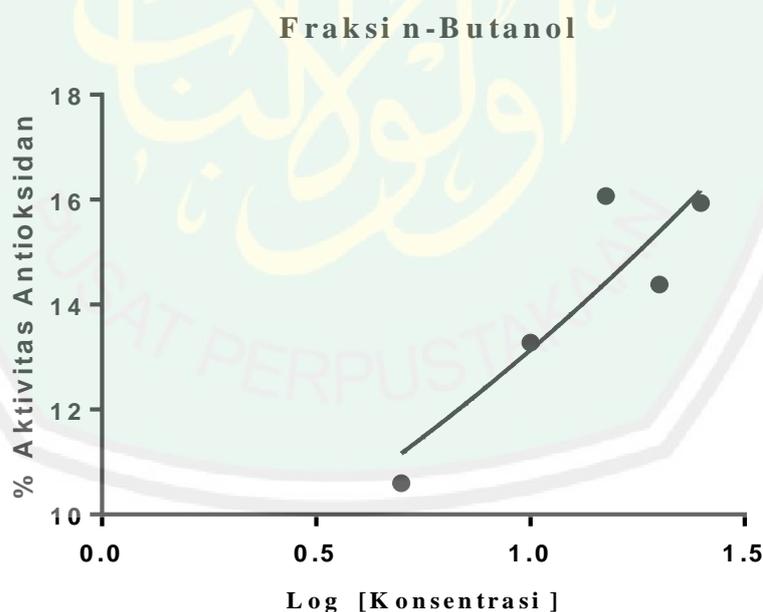
Gambar 4.9 Grafik % aktivitas antioksidan isolat 10 KLTP

Konsentrasi sampel berbanding lurus dengan nilai persen aktivitas antioksidan. Artinya, semakin besar konsentrasi dengan kandungan senyawa aktif antioksidan yang semakin melimpah, maka kemampuan dalam menghambat radikal bebas DPPH akan semakin meningkat. Namun, hal tersebut tumpang tindih dengan hasil yang ada pada kedua sampel. Fraksi *n*-butanol mengalami tren persen aktivitas antioksidan yang turun naik setelah konsentrasi 15 ppm (Gambar 4.8). Ketidaklinearan persen aktivitas antioksidan tersebut menunjukkan senyawa antioksidan pada sampel yang tidak optimal dalam menstabilkan radikal bebas. Adapun untuk isolat 10 KLTP, terjadi penurunan persen aktivitas antioksidan pada konsentrasi 25 ppm (Gambar 4.9). Kemungkinan yang terjadi dari keadaan ini adalah senyawa telah bersifat prooksidan.

Dalam sebuah sistem normal terdapat keseimbangan prooksidan dan antioksidan yang tepat. Keseimbangan ini dapat bergeser ke arah prooksidan ketika produksi spesies antioksidan sangat meningkat. Hal ini sesuai dengan Gordon (1990) yang mengemukakan bahwa besar konsentrasi antioksidan yang ditambahkan dapat berpengaruh pada laju oksidasi. Keberadaan prooksidan dapat mengakibatkan penghambatan aktivitas senyawa antioksidan pada sampel. Hal ini dapat terlihat pada Gambar 4.9 yang menunjukkan adanya penurunan kemampuan antioksidan saat terjadi peningkatan konsentrasi sampel di atas 20 ppm. Di dalam tubuh, ketidakseimbangan antara prooksidan dengan antioksidan menyebabkan terjadinya stress oksidatif yang dapat merusak sel-sel tubuh (Langseth, 1995; Masrifah, dkk., 2017).

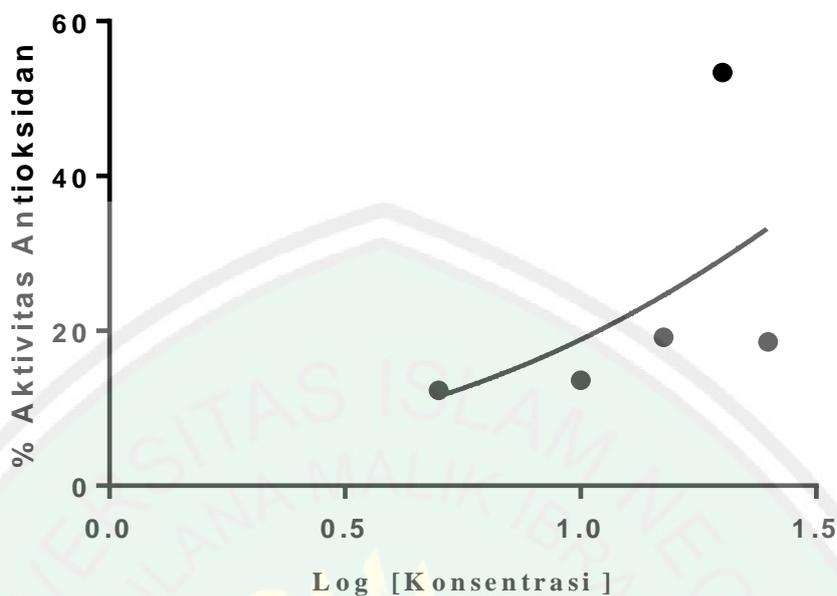
Hasil yang diperoleh dari penelitian ini didukung penelitian sebelumnya oleh Farvin dan Jacobsen (2015) yang melakukan uji antioksidan terhadap ekstrak

etanol dan air makroalga *Fucus serratus* and *Polysiphonia fucooides*. Hasil penelitiannya menyatakan adanya penurunan kemampuan penghambatan radikal bebas pada peningkatan konsentrasi sampel di atas 0,5 mg. Berdasarkan pola tersebut dapat disimpulkan bahwa telah terjadi aktivitas prooksidan pada sampel sehingga aktivitas antioksidannya terhambat. Pola serupa juga ditemukan pada penelitian Masrifah, dkk. (2017) yang melakukan uji aktivitas antioksidan dari labu air (*Lagenaria siceraria*). Hasil penelitiannya menyatakan adanya aktivitas prooksidan pada ekstrak etanol labu air yang ditandai dengan menurunnya aktivitas antioksidan sampel ketika terjadi peningkatan konsentrasi di atas 15 ppm. Adapun grafik yang menghubungkan antara persen (%) aktivitas antioksidan dengan logaritma konsentrasi sampel hasil analisis dari regresi non linear dapat dilihat pada Gambar 4.10 dan Gambar 4.11.



Gambar 4.10 Grafik analisis non linear % aktivitas antioksidan terhadap log konsentrasi fraksi *n*-butanol

Isolat 10 KLTP



Gambar 4.11 Grafik analisis non linear % aktivitas antioksidan terhadap log konsentrasi isolat 10 KLTP

Grafik yang ditampilkan pada Gambar 4.10 dan Gambar 4.11 menunjukkan adanya respon stimulasi yang digambarkan sebagai kurva yang menanjak seiring dengan pertambahan konsentrasi. Pengolahan data untuk mengetahui aktivitas antioksidan yang dinyatakan sebagai EC_{50} dilakukan dengan model analisis regresi non linear. Analisis yang digunakan didasarkan pada fungsinya dalam menyesuaikan data dengan model yang mendefinisikan Y (respon) sebagai fungsi dari X (dosis/konsentrasi) (Motulsky dan Chrishtopolous, 2003). Fungsi transformasi logaritma pada variabel X bertujuan untuk meningkatkan kesesuaian model dan membuat variabel lebih normal terdistribusi (Motulsky dan Chrishtopolous, 2003). Nilai EC_{50} dari fraksi n -butanol dan isolat 10 KLTP mikroalga *Chlorella* sp. ditunjukkan pada Tabel 4.2 (Perhitungan L.4.4).

Tabel 4.2 Nilai EC₅₀ fraksi *n*-butanol dan isolat KLTP

Sampel	EC ₅₀ (ppm)
Fraksi <i>n</i> -butanol	11891
Isolat 10 KLTP	57,62

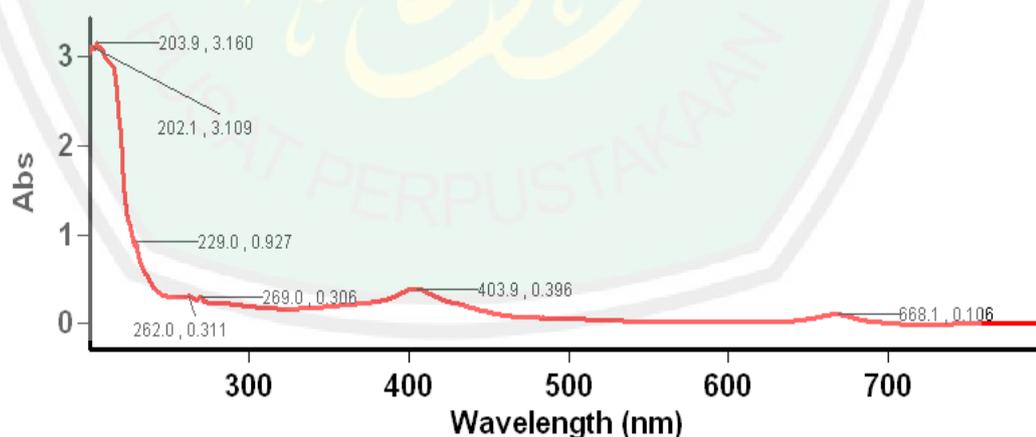
Berdasarkan Tabel 4.2 aktivitas antioksidan isolat 10 KLTP mikroalga *Chlorella* sp. ditunjukkan dengan nilai EC₅₀ sebesar 57,62 ppm dan tergolong sebagai antioksidan kuat. Adapun fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp. memiliki nilai EC₅₀ sebesar 11891 ppm dan tergolong sebagai antioksidan sangat lemah. Isolat 10 hasil pemisahan KLTP yang diduga senyawa steroid memiliki potensi sebagai senyawa antioksidan yang lebih kuat dibandingkan dengan fraksi *n*-butanol. Lemahnya aktivitas antioksidan pada fraksi *n*-butanol disebabkan oleh efek antagonis dari senyawa campuran yang terkandung dalam fraksi *n*-butanol sehingga akan menurunkan aktivitas antioksidan pada sampel itu sendiri. Adapun pemisahan dengan KLTP akan meningkatkan kemurnian suatu senyawa aktif yang akan berkontribusi lebih baik dalam memberikan aktivitas antioksidan suatu isolat, dimana dalam hal ini dugaan senyawa aktif yang berperan sebagai antioksidan adalah senyawa steroid.

Beberapa penelitian terdahulu yang telah mengungkapkan potensi antioksidan isolat terduga senyawa steroid hasil KLTP dalam berbagai fraksi yang berbeda di antaranya; Dinasti (2016) menyatakan bahwa nilai EC₅₀ isolat KLTP fraksi etil asetat adalah 77,78 ppm dan tergolong antioksidan kuat; Fasya, dkk. (2020^a) melaporkan bahwa nilai EC₅₀ isolat KLTP fraksi petroleum eter adalah 73,82 ppm dan tergolong antioksidan kuat; Fikri (2019) menunjukkan bahwa nilai EC₅₀ isolat KLTP fraksi *n*-heksana adalah 35,09 ppm dan tergolong antioksidan

sangat kuat; serta Megawati, dkk. (2020) menyatakan bahwa nilai EC_{50} dari isolat KLTP fraksi kloroform adalah 38,96 ppm dan tergolong antioksidan sangat kuat.

4.7 Identifikasi Sampel dengan Spektrofotometer UV-Vis

Keberhasilan senyawa target yang terisolasi dari suatu sampel dapat dipastikan dengan berbagai langkah identifikasi menggunakan instrumentasi. Spektrofotometri UV-Vis menjadi langkah awal dalam pengidentifikasian senyawa target dengan tujuan untuk mengetahui adanya gelombang maksimum yang diakibatkan oleh transisi elektronik yang terjadi. Identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dilakukan terhadap fraksi *n*-butanol dan isolat 10 KLTP fraksi *n*-butanol pada panjang gelombang 200-800 nm. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa fraksi *n*-butanol memiliki beberapa panjang gelombang maksimum diantaranya terdapat pada daerah 202,1; 203,9; 229; 262; 269; 403,9; dan 668,1 nm seperti yang disajikan dalam spektra pada Gambar 4.12.



Gambar 4.12 Spektra UV-Vis fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp.

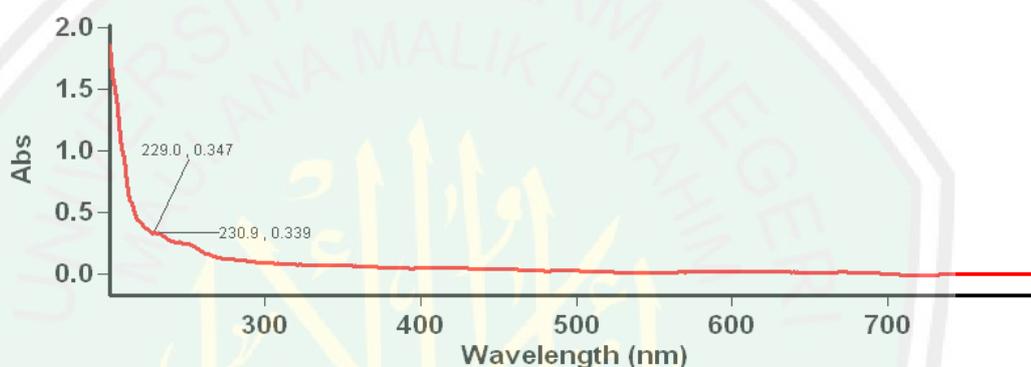
Berdasarkan Gambar 4.12 fraksi *n*-butanol memiliki serapan pada panjang gelombang maksimum 202,1 dan 203,9 nm. Serapan ini menunjukkan transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ yang dapat diakibatkan oleh keberadaan ikatan C=C tidak terkonjugasi. Serapan tersebut dapat menjadi serapan dari senyawa steroid dimana pada penelitian isolasi senyawa steroid yang dilakukan Laili (2016) dan Anggraini (2018) didapatkan hasil serapan steroid yang serupa yaitu 202 nm, serta pada penelitian Fasya, dkk. (2020^b) didapatkan hasil serapan steroid serupa juga pada 203,9 nm.

Serapan lainnya terdeteksi pada panjang gelombang maksimum 262 nm dan 269 nm. Serapan tersebut berasal dari transisi elektronik $n \rightarrow \pi^*$ yang menunjukkan keberadaan gugus kromofor tunggal C=O, sebagaimana hasil penelitian Widayanti, dkk. (2016) dan Dewi, dkk. (2017) yang menyatakan bahwa panjang gelombang maksimum 262 nm dan 269 nm merupakan serapan dari gugus karbonil dan menjadi salah satu ciri dari keberadaan senyawa golongan flavonoid.

Lalu, terdapat pula serapan yang terdeteksi pada panjang gelombang maksimum 403,9 nm dan 668,1 nm. Serapan pada panjang gelombang maksimum 403,9 nm menunjukkan terjadinya transisi elektronik $n \rightarrow \pi^*$ akibat adanya ikatan dengan atom yang memiliki pasangan elektron bebas. Sukadana, dkk. (2018) dalam penelitiannya melakukan isolasi dan identifikasi golongan senyawa aktif antimakan daun Tenggulun (*Protium javanicum* Burn. F) dan ditemukan serapan 403 nm pada isolat yang selanjutnya diduga merupakan senyawa golongan triterpenoid alkohol, dimana serapan pada panjang gelombang tersebut berasal dari transisi elektron gugus jenuh O-H yang mempunyai elektron non bonding.

Harbone (1987) mengungkapkan bahwa serapan yang terdapat di atas panjang gelombang maksimum 625 nm mengindikasikan adanya kandungan senyawa klorofil, sehingga serapan pada 668,1 nm merupakan serapan dari gugus yang terdapat klorofil.

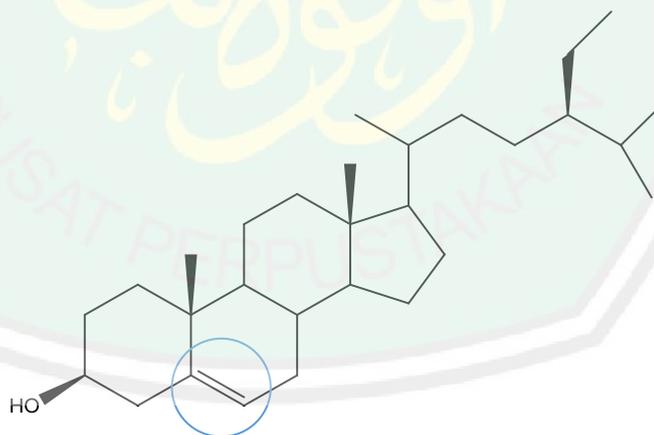
Serapan yang terdeteksi pada fraksi *n*-butanol yang juga terdeteksi pada isolat 10 KLTP adalah serapan pada panjang gelombang maksimum 229,0 nm, sebagaimana yang ditunjukkan pada spektra dalam Gambar 4.13.



Gambar 4.13 Spektra UV-Vis isolat KLTP mikroalga *Chlorella* sp.

Gambar 4.13 menunjukkan adanya dua serapan terdeteksi di panjang gelombang maksimum 229,0 dan 230,9 nm pada hasil isolat 10 KLTP. Panjang gelombang maksimum pada daerah tersebut merupakan karakteristik untuk gugus kromofor dari suatu alkena ($C=C$) yang menyebabkan terjadinya transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ (Silverstein, 1986). Gugus tersebut dapat menjadi gugus karakteristik yang menunjukkan keberadaan senyawa steroid. Hal ini dapat menjadi informasi dasar sebagai langkah awal dalam penentuan struktur senyawa dugaan steroid secara lebih pasti.

Penelitian sebelumnya oleh Santoso, dkk (2017) juga mendapatkan panjang gelombang maksimum 230 nm pada hasil UV dalam mengidentifikasi senyawa steroid dari ekstrak *n*-heksana daun mimba (*Azadirachta indica* A.). Dalam jurnalnya, Santoso, dkk (2017) menetapkan senyawa yang berhasil diisolasi sebagai β -sitosterol. Hasil UV tersebut didukung dengan hasil analisis spektra IR yang memberikan bilangan gelombang 3230 cm^{-1} (gugus hidroksil) dan 2920 cm^{-1} (alkena). Hasil analisis diperkuat dengan spektra RMI proton yang menunjukkan pergeseran kimia proton (δ_{H}) dari hidrogen berikatan tunggal, gugus metil ($-\text{CH}_3$), hidrogen yang berdekatan dengan gugus metil, dan ikatan rangkap dua pada alkena ($-\text{CH}=\text{}$). Selain itu, spektra RMI karbon menunjukkan terdapat 29 atom karbon dan hasil analisis DEPT memberikan 6 karbon untuk CH_3 ; 11 karbon untuk CH_2 ; 9 karbon untuk CH ; dan 3 karbon untuk karbon kuartener (C). Adapun struktur dari senyawa β -sitosterol beserta gugus fungsi yang menjadi ciri dari keberadaan senyawa steroid tersebut ditunjukkan pada Gambar 4.14.



Gambar 4.14 Struktur senyawa β -sitosterol (Santoso, dkk., 2017)

Berdasarkan uraian di atas, hasil analisis fraksi *n*-butanol menampilkan serapan yang lebih banyak dibandingkan dengan isolat 10 KLTP, diantaranya

pada daerah 202,1; 203,9; 229,0; 262,0; 269,0; 403,9; dan 668,1 nm. Hasil ini menunjukkan bahwa pada fraksi *n*-butanol terdapat lebih dari 1 dugaan senyawa yang terkandung didalamnya. Sedangkan pada isolat 10 KLTP hanya terdapat dua puncak serapan pada daerah 229,0 dan 230,9 nm akibat keberadaan senyawa isolat target yang lebih murni setelah dilakukan pemisahan KLTP. Hal ini dapat dibuktikan dengan tidak munculnya serapan senyawa-senyawa lain yang terdapat pada fraksi sehingga dugaan yang muncul pada hasil identifikasi isolat 10 KLTP adalah serapan dari gugus karakteristik pada steroid saja, yaitu di daerah 229,0 dan 230,9 nm yang berasal dari gugus C=C akibat adanya transisi $\pi \rightarrow \pi^*$.

4.8 Pemanfaatan Mikroalga *Chlorella* sp. Sebagai Bahan Obat dalam Perspektif Islam

Allah Swt. tidak menciptakan segala apa yang ada di langit dan bumi melainkan ada kemaslahatan yang terdapat padanya. Semua makhluk Allah Swt. dapat mengambil manfaat dari apa yang telah Allah Swt. turunkan di alam semesta untuk kelangsungan hidupnya.

Allah Swt. berfirman dalam QS. Shaad/38:27:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَطْلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا ۚ فَوَيْلٌ لِلَّذِينَ كَفَرُوا
مِنَ النَّارِ ۗ

Artinya: “Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya tanpa hikmah. Yang demikian itu adalah anggapan orang-orang kafir, maka celakalah orang-orang kafir itu karena mereka akan masuk neraka” (QS. Shaad/38:27).

Berdasarkan tafsir *an-Nafahat al-Makkiyah* oleh Syaikh Muhammad bin Shalih asy-Syawi, dalam ayat ini Allah Swt. mengabarkan tentang sempurnanya

hikmah, faedah dan maslahat dalam penciptaan langit dan bumi. Manusia sebagai hamba-Nya harus senantiasa merenungi dan mempelajari lebih lanjut ciptaan Allah Swt. sebagai tanda syukur dan dalam rangka meningkatkan keimanan.

Fakhri (2010) mengungkapkan bahwa tidak kurang dari 750 ayat – sekitar seperdelapan al-Quran – yang mendorong orang beriman untuk menelaah alam, merenungkan alam dan menyelidiki dengan kemampuan akal budinya serta berusaha memperoleh pengetahuan dan pemahaman alamiah sebagai bagian dari hidupnya. Allah Swt. memberi gelar *Ulul Albaab* bagi orang yang dapat mengambil faedah dan hikmah dari segala ciptaan Allah Swt. (al-Maraghi, 1992).

Sebagaimana Allah Swt. berfirman dalam QS. Ali ‘Imran/3: 190-191:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ۗ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هٰذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ۗ

Artinya: “Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal. (Yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk 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”(QS. Ali ‘Imran/3: 190-191).

Menurut tafsir Kementrian Agama RI (2006), dalam QS. Ali ‘Imran ayat 191 dijelaskan bahwa orang-orang berakal (*Ulul Albaab*) yaitu orang-orang yang senantiasa memikirkan ciptaan Allah Swt., kemudian mengambil manfaat dari ayat-ayat kauniyah yang terbentang di jagat raya, seraya berzikir kepada Allah Swt. dan bersaksi bahwa tidak ada satupun yang Allah Swt. ciptakan di alam ini dengan sia-sia.

Mikroalga *Chlorella* sp. merupakan salah satu ciptaan Allah Swt. dengan ukuran mikroskopis namun mempunyai banyak manfaat dikarenakan senyawa-senyawa aktif yang dikandungnya. Mikroalga sering dibudidayakan untuk berbagai keperluan seperti penghasil komponen senyawa bioaktif untuk bahan farmasi, kosmetik, dan biodiesel (Aprilliyanti, dkk., 2016). Manfaat-manfaat tersebut dapat diketahui dengan melakukan penelitian-penelitian yang berkesinambungan sebagai bentuk usaha manusia yang dikategorikan sebagai insan *Ulul Albaab* dalam mengeksplorasi bahan alam yang tersedia dalam rangka mengimani QS. Ali 'Imran ayat 190-191.

Salah satu senyawa aktif yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella* sp. dan telah banyak dilakukan penelitian mengenai potensi bioaktivitasnya adalah steroid. Senyawa steroid memiliki peran yang penting terutama dalam dunia farmasi dan kedokteran sebagai bahan pengobatan penyakit karena memiliki berbagai potensi bioaktivitas, salah satunya adalah sebagai senyawa antioksidan yang dapat melindungi tubuh dari berbagai penyakit degeneratif dan kanker, serta membantu menekan proses penuaan/antiaging (Tapan, 2005). Hal ini dapat menjadi renungan kembali akan hal-hal luar biasa pada penciptaan Allah Swt. yang selalu terdapat hikmah di dalamnya meskipun memiliki ukuran yang mata manusia tak mampu melihatnya kecuali dengan penggunaan alat bantu.

Pemanfaatan bahan obat yang berasal dari alam seperti halnya steroid yang dapat diperoleh dari mikroalga *Chlorella* sp. juga merupakan salah satu upaya mengikuti perintah Nabi Muhammad saw. untuk mencari bahan yang berpotensi sebagai obat dan melakukan pengobatan.

Sebagaimana dalam sebuah riwayat hadits disebutkan:

حَدَّثَنَا هَارُونُ بْنُ مَعْرُوفٍ وَأَبُو الطَّاهِرِ وَأَحْمَدُ بْنُ عِيسَى قَالُوا حَدَّثَنَا ابْنُ وَهَبٍ أَخْبَرَنِي عَمْرُو وَهُوَ ابْنُ الْحَارِثِ عَنْ عَبْدِ رَبِّهِ بْنِ سَعِيدٍ عَنْ أَبِي الزُّبَيْرِ عَنْ جَابِرٍ عَنْ رَسُولِ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ أَنَّهُ قَالَ لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ

Artinya : *Telah menceritakan kepada kami Harun bin Ma'ruf dan Abu Ath Thahir serta Ahmad bin 'Isa mereka berkata; Telah menceritakan kepada kami Ibnu Wahb; Telah mengabarkan kepadaku 'Amru, yaitu Ibnu al-Harits dari 'Abdu Rabbih bin Sa'id dari Abu Az Zubair dari Jabir dari Rasulullah shallallahu 'alaihi wasallam, beliau bersabda: "Setiap penyakit ada obatnya. Apabila ditemukan obat yang tepat untuk suatu penyakit, akan sembuhlah penyakit itu dengan izin Allah 'azza wajalla."* (HR Muslim).

Berdasarkan kitab *ath-Thibb an-Nabawi*, ungkapan nabi “*setiap penyakit pasti ada obatnya*” memberikan dorongan positif kepada orang yang sakit dan juga dokter yang mengobatinya, selain juga mengandung anjuran untuk mencari obat dan menyelidikinya. Namun, kesembuhan tetap milik Allah Swt. sesuai dengan yang dikehendaki-Nya (al-Jauziyyah, 2004).

Allah berfirman dalam QS. al-Qamar/54:49:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

Artinya: “*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*” (QS. Al-Qamar/54:49).

Menurut Tafsir *al-Misbah*, ayat ini menjelaskan bahwa Allah Swt. menciptakan segala sesuatu menurut ukuran yang sesuai dengan hikmah (Shihab, 2012). Steroid berperan sebagai antioksidan merupakan salah satu dari hikmahnya sebagai senyawa bioaktif. Dalam hal ini, senyawa antioksidan mempunyai ukuran kemampuan dalam menghambat reaksi oksidasi yang disebut dengan EC₅₀.

Nilai EC_{50} merupakan konsentrasi larutan sampel atau substrat yang akan menyebabkan reduksi terhadap 50% aktivitas DPPH. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, isolat hasil pemisahan KLTP fraksi *n*-butanol memiliki nilai EC_{50} sebesar 57,62 ppm dan tergolong sebagai senyawa antioksidan yang kuat. Isolat terduga senyawa steroid hasil KLTP fraksi *n*-butanol dapat dikembangkan sebagai agen kemopreventif karena memiliki nilai EC_{50} yang lebih kecil dari 100 ppm (Rollando dan Priianti, 2017).



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Aktivitas antioksidan fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp. ditunjukkan oleh nilai EC₅₀ sebesar 11891 ppm. Adapun isolat 10 hasil KLTP fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp. memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai EC₅₀ sebesar 57,62 ppm. Nilai tersebut menunjukkan aktivitas antioksidan isolat 10 KLTP yang diduga lebih kuat dibanding dengan fraksi *n*-butanol.
2. Identifikasi fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella* sp. dengan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan serapan pada panjang gelombang maksimum 202,1; 203,9; 229,0; 262,0; 269,0; 403,9; dan 668,1 nm. Adapun pada isolat 10 hasil KLTP, muncul serapan pada panjang gelombang maksimum 229,0 dan 230,9 nm dengan transisi elektronik $\pi \rightarrow \pi^*$ yang berasal dari gugus C=C. Gugus ini merupakan gugus karakteristik senyawa steroid.

5.2 Saran

Penelitian lanjutan sebagai upaya untuk mendapatkan senyawa steroid yang lebih murni perlu dilakukan. Salah satunya melakukan pemisahan lebih lanjut terhadap isolat 10 hasil pemisahan KLTP dengan KLT 2 dimensi atau dilakukan pemisahan dengan menggunakan metode kromatografi kolom. Disamping itu, pengidentifikasian isolat 10 KLTP dengan instrumentasi yang lebih lengkap seperti spektrofotometer, FTIR, LC-MS/MS, serta H-NMR juga perlu dilakukan untuk mengetahui struktur senyawa yang berhasil diisolasi secara lebih akurat.

DAFTAR PUSTAKA

- Adhiatama, I., Zainudin, M., dan Rokhati, N. 2012. Hidrolisis Kitosan Menggunakan Katalis Asam Klorida (HCl). *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*, 1(1): 245-251.
- Ahmad, dan Ahmad, B.M. 1994. *Ekologi Air Tawar*. Kuala Lumpur: Dewan Bahasa dan Pustaka.
- Al-Jauziyyah, I. Q. 2004. *Metode Pengobatan Nabi Saw*. Jakarta: Griya Ilmu.
- Al-Mahalli, J. A. 2007. *Tafsir Jalalain. Terj. Bahrin Abu Bakar*. Jakarta: Sinar Baru Algensindo.
- Al-Maraghi, A. M. 1992. *Terjemahan Tafsir Al-Maraghi*. Semarang: CV. Toha.
- Al-Quais, K. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak *n*-heksana dan Identifikasi Senyawa Steroid Akar Rumput Bambu (*Lophatherum gracile* Brongn). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Amaliyah, S., Fasya, A.G., Hanapi, A., dan Romaidi. 2013. Uji Toksisitas. Antioksidan dan Antibakteri dari ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. Hasil Kultivasi Pada Media Ekstrak Tauge. *Jurnal Green Technology*.
- Andrade, L.M., Andare, C. J., Dias, M., Nascimento, C. A. O., and Mendes, M. A. 2018. *Chlorella* and *Spirulina* Microalgae as Sources of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements; an Overview. *MOJ Food Processing & Technology*, 6(2): 1-14.
- Anggraeni, O. N. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan *n*-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Anggraini, V. 2018. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom dengan Variasi Gradien Eluen Fraksi Etil Asetat Makroalga *Euchema cottonii*. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Ansel, H.C. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi, diterjemahkan oleh Farida Ibrahim, Asmanizar, Iis Aisyah, Edisi keempat*. Jakarta: UI Press.
- Aprelia, F. dan Suyatno. 2013. Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etil Asetat Tumbuhan Paku *Christella arida* dan Uji Pendahuluan sebagai Antikanker. *Journal of Chemistry*, 2(3): 94-99.

- Aprilliyanti, S., Soeprbowati, T.R., dan Yulianto, B. 2016. Hubungan Kelimpahan *Chlorella* sp. dengan Kualitas Lingkungan Perairan Pada Skala Semi Masal di BBBPBAP Jepara. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 14(2): 77-81.
- Arifin, F. 2012. Uji Kemampuan *Chlorella* sp. Sebagai Bioremediator Limbah Cair Tahu. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Arindah, D., 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Golongan Senyawa pada Daging Buah Pepimo (*Solonium Muricatum Aiton*) yang Berpotensi Sebagai Antioksidan. *Skripsi*. Malang: Universitas Negeri Malang.
- Artati, E. K., Irvina, F., dan Fatimah. 2012. Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Asam terhadap Kinetika Reaksi Hidrolisis Pelepah Pisang (*Musa paradisiaca* L). *EKUILIBRIUM*, 11(2): 73-77.
- 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: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Aziz, S. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder*. Yogyakarta: Deepublish.
- Bariyyah, S.K., Fasya, A.G., dan Hanapi, A. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella* sp. Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *Alchemy*, 2(3): 150-204.
- Bialangi, N., Mustapa, M. A., Salimi, Y. K., dan Widianoro, A. 2017. Senyawa Steroid dari Tumbuhan *Peperomia pellucida* dan Uji Aktivitas Fraksi terhadap *Plasmodium falciparum*. *ITEKIMIA*. 2(1): 27-35.
- Bold, H.C. and Wynne, M.J. 1985. *Introduction to the Algae, Second Edition*. Prentice-Hall Me. Newyork: Engelwood Cliffs.
- Chen, Y.C., Yeh, K.L., Aisyah, R., Lee, D.J., Chang, J.S. 2011. Cultivation, Photobioreactor Design And Harvesting Of Microalgae For Biodiesel Production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102: 71-81.
- Day, R.A. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif Edisi Keenam*. Jakarta: Erlangga.
- 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: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.

- Dewi, N. W. R. K., Gunawan, I. W., dan Puspawati, N. M. 2017. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Antioksidan Golongan Flavonoid dari Ekstrak Etil Asetat Daun Pranajiwa (*Euchresta horsfieldii* Lesch Benn.). *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*,5(1): 26-34.
- Dinasti, A. R. 2016. Isolasi dengan KLTP dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella* sp. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Ditjen POM. 1986. *Materia Medika Indonesia. Jilid V*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Fakhri. 2010. Sains dan Teknologi dalam al-Quran dan Implikasinya dalam Pembelajaran. *Ta'dib*, 17 (1): 121-142.
- Farvin, K.H.S dan Jacobsen,C. 2015. Antioxidant Activity of Seaweed Extracts: In Vitro Assays, Evaluation in 5 % Fish Oil-in-Water Emulsions and Characterization. *J Am Oil Chem Soc*, 95: 571-587.
- Fasya, A.G., Khamidah, U., Amaliyah, S., Bariyyah, S.K., dan Romaidi. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) pada Tiap Fase Pertumbuhan. *ALCHEMY*, 2(3): 162-169.
- Fasya, A. G. 2016. Potensi Antikanker dan Antioksidan Serta Identifikasi Isolat Steroid Mikroalga *Chlorella* sp. *Laporan Penelitian Kompetitif Individual*. Malang: Kementerian Agama Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Fasya, A. G., Dinasti, A. R., Shofiyah, M., Rahmawati, L. M., Millati, N., Safitri, D. A., Handoko, S., Hanapi, A., dan Ningsih, R. 2016. Ekstraksi, Hidrolisis, dan Partisi Metabolit Sekunder dari Mikroalga *Chlorella* sp. *ALCHEMY Journal of Chemistry*, 5 (1): 5-9.
- Fasya, A. G., Millati, N., Rahmawati, L. M., Iyani, R., Hanapi, A., Ningsih, R., Yuliani, D., and Megawati, D. S. 2020^a. Isolation and Bioactivity of Steroids Isolates From Petroleum Ether Fraction of *Chlorella* sp. *AIP Conference Proceedings*.
- Fasya, A. G., Purwantoro, B., Ulya, L. H., dan Ahmad, M. 2020^b. Aktivitas Antioksidan Isolat Hasil Kromatografi Lapis Tipis dari Fraksi *n*-heksana *Hydrilla verticillata*. *ALCHEMY: JOURNAL OF CHEMISTRY*, 8(1): 23-34.
- Fessenden, R. J. dan J.S. Fessenden. 1986. *Kimia Organik Dasar Edisi Ketiga. Jilid 1. Terjemahan oleh A. H Pudjaatmaka*. Jakarta: Erlangga.

- Fikri, F. M. 2019. Uji Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Fraksi *n*-heksana Mikroalga *Chlorella* sp. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Fithriani, D., Amini, S., Melanie, S., dan Susilowati, R. 2015. Uji Fitokimia, Kandungan Total Fenol, dan Aktivitas Antioksidan Mikroalga *Spirulina* sp., *Chlorella* sp., dan *Nannochloropsis* sp. *JPB Kelautan dan Perikanan*, 10(2): 101–109.
- Gordon, M. H. 1990. *The Mechanism Of Antioxidant Action In Vitro*. London: Elsevier Applied Science.
- Groggins, P.H. 1958. *Unit Process In Organic Synthesis*. New York: Mc Graw Hill Book Company.
- Gunawan, I. W. G., Bawa, I. G. G., dan Sustrinayanti, N. L. 2004. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpenoid yang Aktif Antibakteri pada Herba Meniran (*Phyllanthusniruni* Linn). *Jurnal Kimia*, 2, 31–39.
- Hanani, E., Mun'im, A., dan Sekarini, R. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia* sp. dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 2 (3): 127 - 133.
- Handoko, D. S. P. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis. *SIGMA*, 9 (1).
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Herbert, R. 1995. *Biosintesis Metabolit Sekunder Edisi Kedua. Diterjemahan oleh Srigandono B*. Semarang: IKIP Semarang Press.
- Herlina, T., Supratman, U., dan Udin, Z. 2011. Steroids from the Leaves of *Erythrina variegata* against Breast Cancer T479 Cell. *Proceedings of The Second International Symposium on Temulawak*, 165-168.
- Hildani, A. 2018. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi *n*-Heksan, Etil Asetat dan Air dari Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes* (Martius) Solms) dengan Metode DPPH (1,1-deiphenyl-2-picrylhydrazyl). *Skripsi*. Medan: Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara.
- Hongayo, M. C. 2011. The Effect Brown Alga *Cystoseira moniliformis* (Kützing) Hauck Extract on The Blood Glucose Level of Alloxan-Induced Hyperglycemic Albino Mice (Mus Musculus Linne, 1758). *JPCS*, 3: 1-12.
- Imamah, N. 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: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.

Isnansetyo, A. dan Kurniastuty. 1995. *Teknik Kultur Phytoplankton Zooplankton Pakan Alam untuk Pembenihan Organisme Laut*. Yogyakarta: Kanisius.

Jati, B.N., Yunilawati, R., Nuraeni, C., Oktarina, E., Aviandharie, S.A., dan Rahmi, D. 2019. Ekstraksi dan Identifikasi Fitosterol pada Mikroalga *Nannochloropsis oculata*. *Jurnal Kimia Kemasan*, 41(1): 31-36.

Kawaroe, M., Prartono, T., Sunuddin, A., Sari, D. W., dan Augustine, D. 2009. Laju Pertumbuhan Spesifik *Chlorella* sp. dan *Dunaliella* sp. Berdasarkan Perbedaan Nutrien dan Fotoperiode. *Jurnal Ilmu-Ilmu Perairan dan Perikanan Indoneisa*, 16(1): 73-77.

Kementrian Agama RI. 2006. *Al-Quran dan Terjemahnya*. Bandung: Diponegoro.

Khopkar, S. M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.

Koleva, Van Beek, T.A., Linsenn, J.P.H., De Groot, A., and Evstatieva, L.N. 2002. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: A Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochem Analysis*, 13(1): 8–17.

Kumar and Singh. 1976. *A Text Book on Algae*. London: Macmilan and Co Lt.

Laili, R. 2016. Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah (*Euchema spinosum*). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam negeri Maulana Malik Ibrahim

Langseth, L. 1995. *Oxidants, Antioxidants, and Disease Prevention*. Belgium: ILSI Europe.

Lawoko, Martin, and Sagar, D. 2009. Pre-Hydrolysis of The Phenyl Glycosidic Bond in a Model Compound. *Lenzinger Berichte*: 77-87.

Luo, X. 2015. Advances in Microalgae-Derived Phytosterols for Functional Food and Pharmaceutical Applications. *Journal Marine Drugs*, 13: 4321–4254.

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

Majidah, B. 2019. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella* sp. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.

- Mardiyah, U., Fasya, A.G., Fauziyah, B., Amalia, S. 2012. Ekstraksi. Uji Aktivitas Antioksidan terhadap 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Euchema spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Masrifah, Rahman N, dan Abram, P. H. 2017. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun dan Kulit Labu Air (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.). *J. Akad. Kim.*, 6(2): 98-106.
- Megawati, D. S., Fasya, A.G., Pratiwi, R. A., and Maghfiroh, N. 2020. Pharmacology Potency of Thin Layer Chromatography Steroid Isolates of *Chlorella* sp. Chloroform Fraction. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*.
- Molyneux, P. 2003. The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Science and Technology*, 26(2): 211-219.
- Mondal, M., Ghosh, A., Gayen, K., Halder, G., and Tiwari, O.N. 2017. Carbondioxide Biofixation by *Chlorella* sp. BTA 9031 Towards Biomass and Lipid Production: Optimization Using Central Composite Design approach. *Journal of CO₂ Utilization* , 22: 317–329.
- Motulsky, H. And Christopolous, A. 2003. *Fitting Models To Biological Data Using Linear And Nonlinear Regression. A Practical Guide to Curve Fitting*. San Diego: Graphpad Software Inc.
- Mulya, M., Suharman, 1995. *Analisis Instrumen, 1*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Mutmainnah, P.A., Hakim, A., dan Savalas, L.R.T. 2017. Identifikasi Senyawa Turunan Hasil Fraksinasi Kayu Akar *Artocarpus odoratissimus*. *Jurnal Penelitian IPA (JPPIPA)*, 3(2): 26-32.
- Nabris, K. J. 2012. Development of Cheap and Simple Culture Medium for the Microalgae *Nannochloropsis* sp. Based on Agricultural Grade Fertilizers Available in the Local Market of Gaza Strip (Palestine). *Journal of Al Azhar University-Gaza (Natural Sciences)*, 14: 61-76.
- Nasrudin, Wahyono, Mustofa, dan Susidarti, R.A. 2019. Isolasi Senyawa Steroid dari Kulit Akar Senggugu (*Cleodendrum serratum* L. Moon). *PHARMACON Jurnal Ilmiah farmasi-UNSRAT*, 6: 332–340.
- Nihlati, I., Abdul. R., dan Triana, H. 2008. Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* (roxb) Schlechth) dengan metode Penangkapan Radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). *Skripsi*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.

- Ningsi, E., Fasya, A.G., dan Hanapi, A. 2015. Pemisahan dan Identifikasi senyawa Steroid pada Fraksi *n*-heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma spinosum*. *Skripsi*. Tidak diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Nur, M. M. A. 2014. Potensi Mikroalga sebagai Sumber Pangan Fungsional di Indonesia. *Eksergi* , 11(2): 1-6.
- Panji, T. 2012. *Teknik Spektroskopi Untuk Elusidasi Struktur Molekul*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Prakash, A. 2001. Antioxidant Activity. Analytical Chemistry Medallion Laboratories. *Analytical Progress*, 10 (2).
- Pranayogi, A. J. 2003. Studi Potensi Pigmen Klorofil dan Karatenoid dari Mikroalga Jenis *Chlophyceae*. *Skripsi*. Lampung: Universitas Lampung.
- Pratama, I. 2011. Pengaruh Metode Pemanenan Mikroalga Terhadap Biomassa dan Kandungan Esensial *Chlorella vulgaris*. *Skripsi*. Depok: Fakultas Teknik Universitas Indonesia.
- Prihantini, N.B., Putri, B. dan Yuniati, R. 2010. Pertumbuhan *Chlorella* sp. dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan Variasi pH Awal. *Makara Journal of Science*, 9 (1): 1-6.
- Rahmawati, L. M. 2016. Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Senyawa Steroid Isolat Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella* sp. Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- 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*. Terjemahan Prof. Dr. Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Rohman, A. dan Gandjar, I.G. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka belajar.
- Rohman, A. dan Riyanto. 2005. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia* L.). *Agritech*, 25 (3): 131-136.
- Rollando dan Prilianti, K. R. 2017. Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) Menginduksi Apoptosis Dan Siklus Sel Pada Sel Kanker Payudara T47D. *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*.14 (1): 1-14.

- Romimohtarto, K. 2004. *Meroplankton Laut*. Jakarta: Djambata.
- Rudiyanto. 2013. Kajian Kapasitas Antioksidan terhadap DPPH dan Kandungan Senyawa Fenolik Total Ekstrak Alga Merah Jenis *Eucheuma cottonii* dari Perairan Sumenep. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Saifuddin, A. V., Rahayu., dan Teruna, H.Y. 2011. *Standarisasi Bahan Obat Alam*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Salamah, N., dan Widyasari, E. 2015. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kelengkeng (*Euphoria longan* (L) Steud.) dengan Metode Penangkapan Radikal 2,2'-Difenil-1-Pikrilhidrazil. *Pharmaciana*, 5(1): 25-34.
- Saleh, H. A., Saokani, J., dan Rijal, S. 2016. Penentuan Nilai Kalor Serta Pengaruh Asam Klorida (HCl) terhadap Kadar Bioetanol Bonggol Pisang (*Musa paradisiacal*). *Al-Kimia*, 4(1): 68-77.
- Santoso, I., Simanjuntak P., dan Rahmaniar. 2017. Identifikasi Senyawa β -Sitosterol dari Ekstrak *n*-heksan Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) dan Uji Penghambatan Enzim α -Glukosidase. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 15 (2): 223-227.
- Sari, I. P. 2017. Pemisahan dan Identifikasi Senyawa Steroid Fraksi Hidrolisis Ekstrak Metanol Alga Merah *Eucheuma cottonii* Perairan Wongsorejo Banyuwangi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dan LC-MS/MS. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Sastrohamidjojo, H. 1991. *Kromatografi*. Yogyakarta: Liberty.
- Sayuti, K. 2015. *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Padang: Universitas Andalas.
- Shiau, Y. J., Sagare, A. P., Chen, U.C., Yang, S. R., dan Tsay. H. S. 2002. Conservation of *Anoectochilus formosanus* Hayata by Artificial Eros-Pollination and In Vitro Culture of Seeds. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 43: 123-130.
- Shihab, M. Q. 2012, *Tafsir al-Misbah*. Jakarta: Lentera Hati.
- Silverstein, Bassler and Moril. 1986. *Penyidikan Spetrofotometrik Senyawa Organik Edisi Ke-4*. Jakarta : Erlangga.
- Simanjuntak, P., Parwati, T., Lenny, L. E., Tamat, S. R., dan Murwani, R. 2004. Isolasi dan Identifikasi Antioksidan dari Ekstrak Benalu The (*Scurrula oortiana* (Korth) Danser). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 5(1): 19-24.

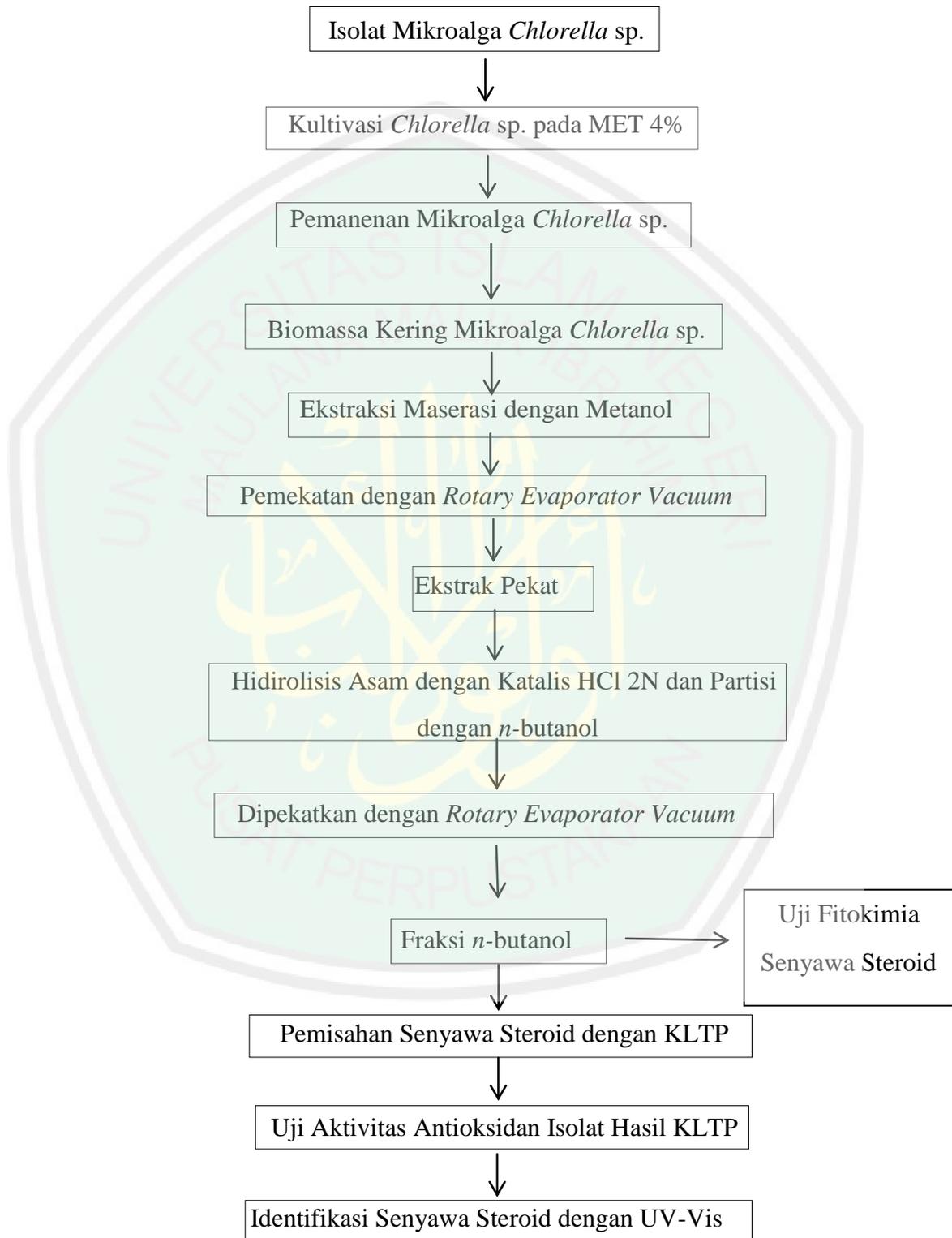
- Simatupang, D., Restuhadi, F., dan Dahril, T. 2017. Pemanfaatan Simbiosis Mikroalga *Chlorella* sp. dan EM4 untuk Menurunkan Kadar Polutan Limah Cair Sagu. *Jom FAPERTA*, 4(1): 1-13.
- Sopiah, N., Mulyanto, A., dan Sehabudin, S. 2013. Pengaruh Kelimpahan Sel Mikroalga Air Tawar (*Chlorella* sp.) Terhadap Penambatan Karbondioksida. *Jurnal Teknologi Lingkungan*, 14(1): 1-6.
- Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi. 1996. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Suhartati, T. 2017. *Dasar-Dasar Spektrofotometri UV-Vis dan Spektrofotometri Massa untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Lampung: Aura CV. Anugrah Utama Raharja.
- Sukadana, I. M., Santi, S. R., dan Monikayani, N. W. 2018. Aktivitas Antimakan Daun Tenggulun (*Protium javanicum* Burm. F.) terhadap Ulat Kubis *Plutella xylostella*. *Jurnal Media Sains*, 2(2): 90-95.
- Tapan, E. 2005. *Kanker, Antioksidan, dan Terapi Komplementer*. Jakarta: PT Gramedia
- Tasic, P., Okanovic, D. J. M. Ristic, M. Popovic and J. Guvic. 2009. Chemical Characteristic of Cattle Slaughtering by-products for Technical Processing. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25 (5): 785-790.
- Wahdaniyah, N. A. 2019. Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Fraksi *n*-heksana Mikroalga *Chlorella* sp. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Wang, B. J., Liu, C. T., Tseng, C. Y., Wu, C. P., and Yu, Z. R. 2004. Hepatoprotective and Antioxidant Effects of *Bupleurum kaoi* Liu (Chao et Chuang) Extract and Its Fractions Fractioned Using Supercritical CO₂ on CCl₄-induced Liver Damage. *Food and Chemical Toxicology*, 42: 609-617.
- Widayanti, N. P., Puspawati, N. M., Suarsana, I. N., Asih, A. I. A. R., dan Rita, S. R. 2016. Aktivitas Antioksidan Fraksi *n*-butanol Ekstrak Kulit Terong Belanda (*Solanum betaceum* Cav.) secara *In Vitro* dan Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoidnya. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*, 4(1): 30-38.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Wulandari, A.P., Naderia, F., Pattalia, A.E., dan Permata, D.R. 2010. Identifikasi Mikroalga di Sekitar Pantai Pangandaran dan Potensi Pertumbuhannya pada Formulasi Medium Ekstrak Tauge (MET). *Prosiding Seminal Nasional Limnologi V*.

- Xiong, Q., Wilson, W. K., and Pang J. 2007. The Liebermann-Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangment of Cholestrol in Acid. *Lipids*. 42(1); 87-96
- Yu, J. H., Wang, Y., Bian, F., Chen, G., Zhang, Y., Bi, Y. P., and Wu, Y. J. 2017. Antioxidant Activity of Alcohol Aqueous Extracts of *Cryptocodinium cohnii* and *Schizochytrium* sp. *Biomed & Biotechnol*, 18 (9): 797-806.
- Yudiati, E., Sedjati, S. dan Agustian, R. 2011. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Metanol dan Pigmen Kasar *Spirulina* sp. *Jurnal Ilmu Kelautan*, 16 (4): 187-192.
- Yuhernita dan Juniarti 2011. Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan Antioksidan (*1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazyl*) dari Ekstrak Daun Saga (*Abrus precatorius* l.). *Makara Sains*, 13 (1): 50-54.



LAMPIRAN

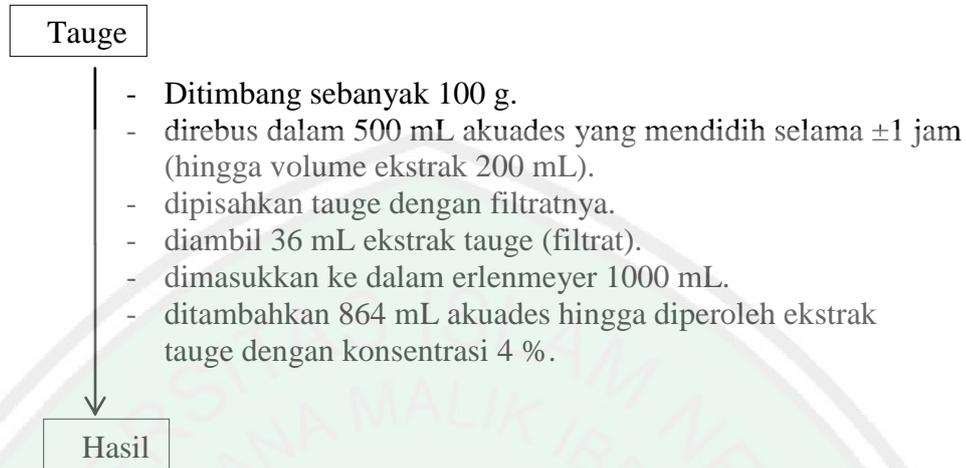
Lampiran 1. Rancangan Penelitian



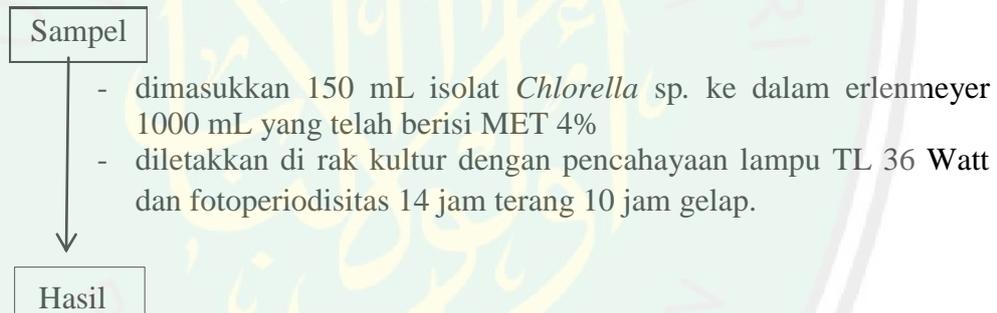
Lampiran 2. Diagram Alir

L.2.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella* sp.

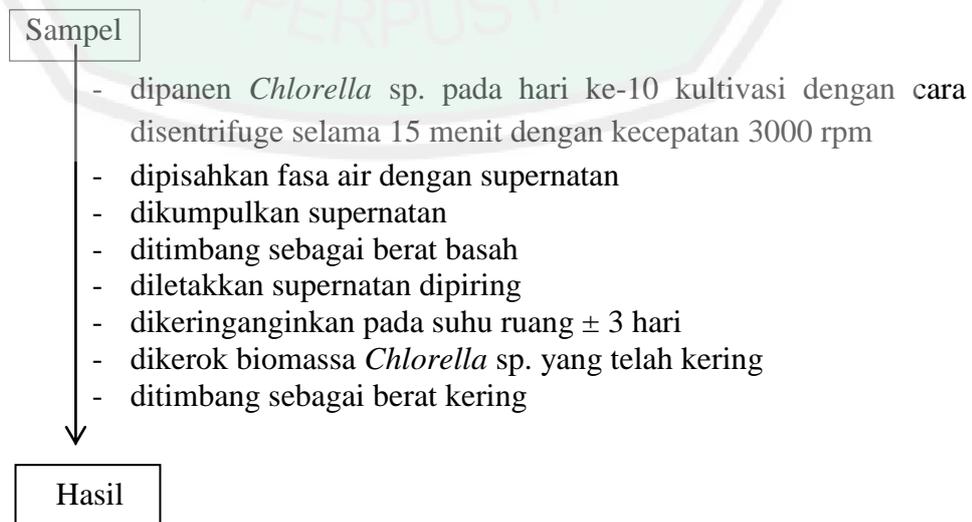
L.2.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%



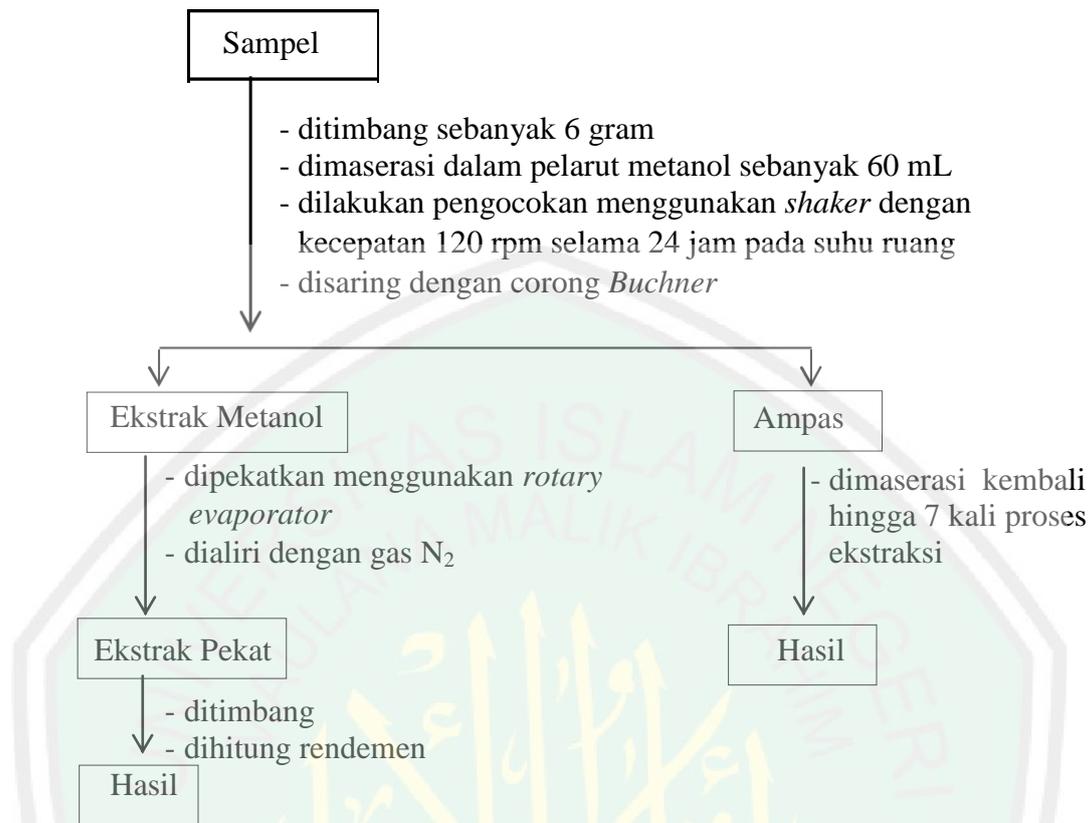
L.2.1.2 Kultivasi *Chlorella* sp. dalam Medium Ekstrak Tauge



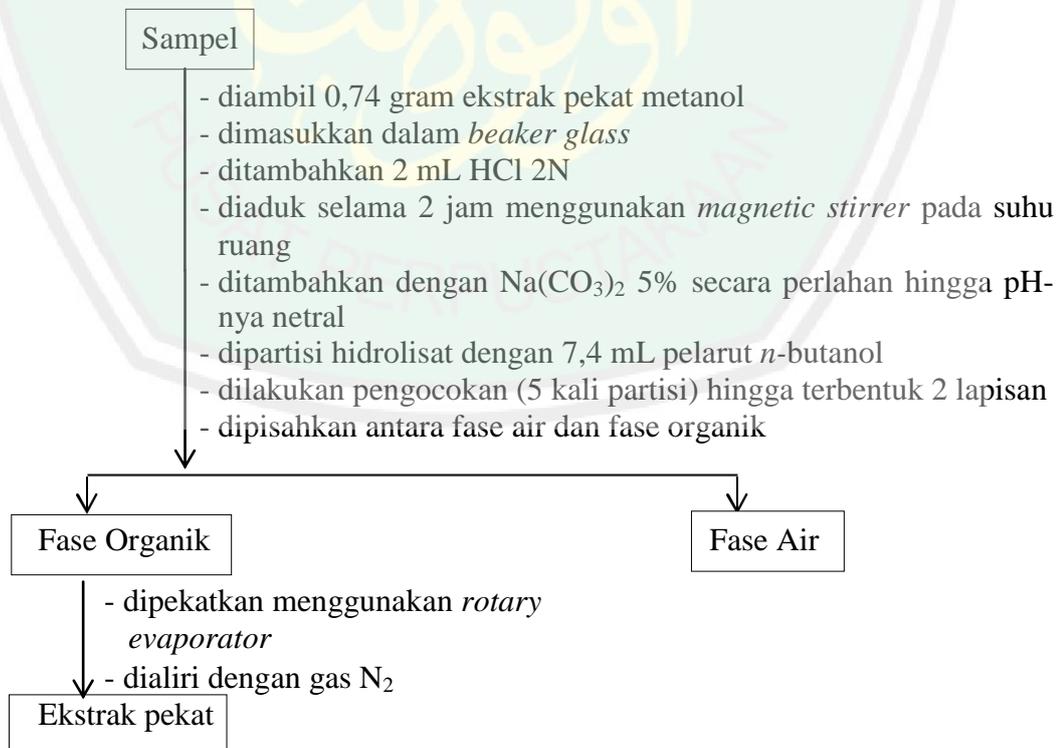
L.2.1.3 Pemanenan Mikroalga *Chlorella* sp.



L.2.2 Ekstraksi Maserasi Mikroalga *Chlorella* sp.

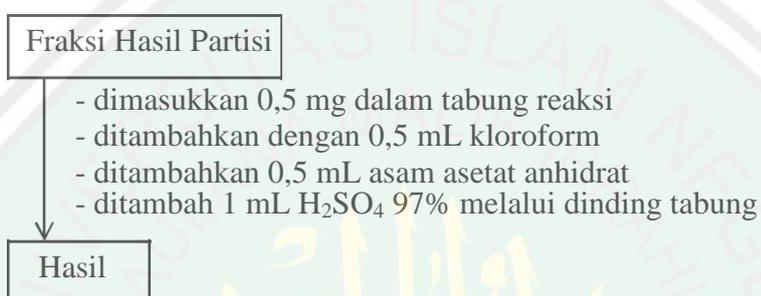


L.2.3 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol *Chlorella* sp.



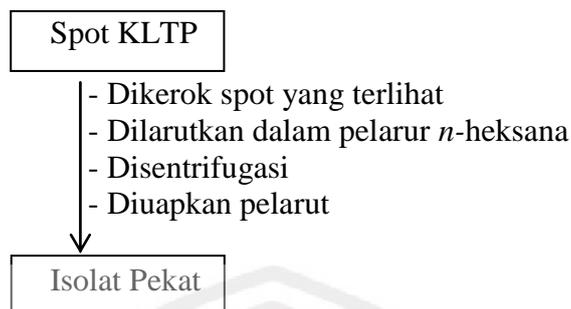


L.2.4 Uji Fitokimia Senyawa Steroid



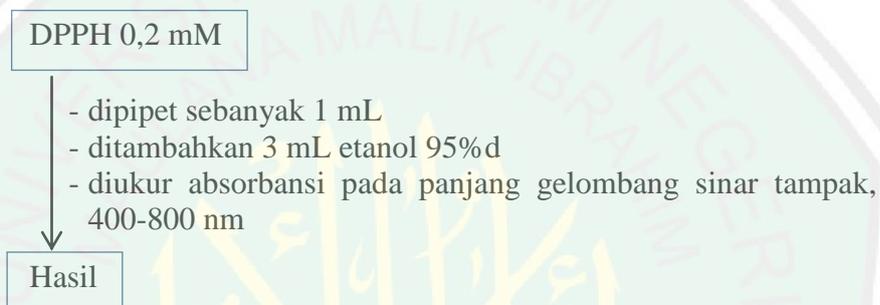
L.2.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP



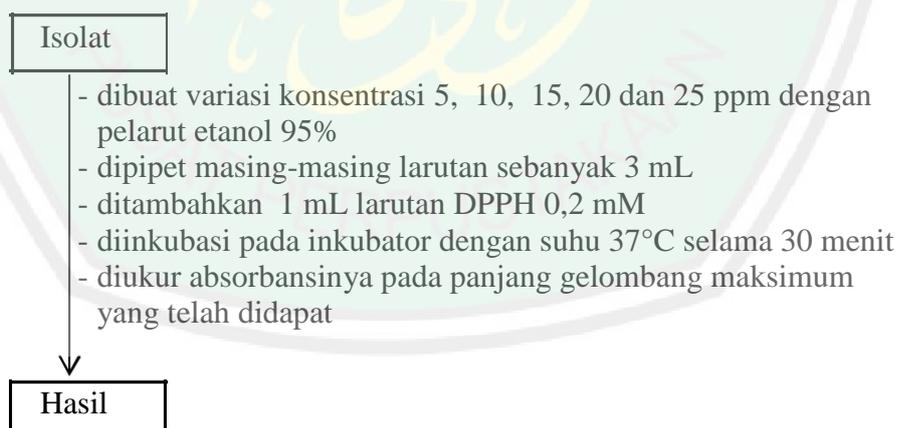


L.2.6 Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH 0,2 mM

L.2.6.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH 0,2 mM



L.2.6.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel Fraksi *n*-butanol dan Isolat 10 KLTP



L.2.7 Identifikasi Steroid Mikroalga *Chlorella* sp. Dengan Spektrofotometer

UV-Vis



Lampiran 3. Perhitungan Pembuatan Reagen dan Pembuatan Larutan

L.3.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella* sp. dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%

a. Pembuatan MET 4% dalam erlenmeyer 1000 mL

$$\text{Volume MET 4\%} = 900 \text{ mL}$$

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

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

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

b. Kultivasi dalam Erlenmeyer 1000 mL

$$\text{Ketentuan} = \frac{\text{Volume isolat } Chlorella \text{ sp.}}{\text{Volume MET 4\%}} = \frac{1}{6}$$

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

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

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

$$= 150 \text{ mL}$$

Dimana x = Volume isolat *Chlorella* sp. = 150 mL

$$\begin{aligned} \text{Jadi, volume total pada kultivasi} &= \text{Volume isolat } Chlorella \text{ sp.} + \text{Volume MET 4\%} \\ &= 150 \text{ mL} + 900 \text{ mL} \\ &= 1050 \text{ mL} \end{aligned}$$

L.3.2 Pembuatan Larutan HCl 2N

Konsentrasi larutan HCl = 37%

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

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

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

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

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

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

$$\begin{aligned} \text{Volume HCl dalam larutan HCl 37\%} &= \frac{m}{\rho} \\ &= \frac{100 \text{ g}}{1,19 \text{ g/ml}} \\ &= 84,033 \text{ mL} = 0,084 \text{ L} \end{aligned}$$

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

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

Untuk membuat larutan HCl 2N sebanyak 20 mL, maka :

$$\begin{aligned} N_1 \times V_1 &= N_2 \times V_2 \\ 12,094 \text{ N} \times V_1 &= 2 \text{ N} \times 20 \text{ mL} \\ V_1 &= \frac{2 \text{ N} \times 20 \text{ mL}}{12,094 \text{ N}} \\ V_1 &= 3,3 \text{ mL} \end{aligned}$$

Cara pembuatan larutan HCL 2N yaitu dengan memipet larutan HCl pekat 37% sebanyak 3,3 mL, lalu di masukkan ke dalam 20 mL. kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.3 Pembuatan Larutan Na(CO₃)₂ 5 % (b/v)

Larutan Na(CO₃)₂ 5% dibuat dengan cara melarutkan 5 gram padatan Na(CO₃)₂ dengan sedikit akuades dalam gelas kimia 10 mL. kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan ditambahkan akuades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

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

Pembuatan reagen LB yaitu dengan memipet 0,5 mL kloroform, kemudian ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat, dan selanjutnya ditambahkan 1 mL H₂SO₄ 95%.

L.3.5 Pembuatan 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 vetil asetat adalah 5 mL. Selanjutnya, campuran dijenuhkan dalam *chamber* KLT.

L.3.6 Pembuatan Larutan DPPH 0,2 mM

Konsentrasi DPPH = 0,2 mM

Volume DPPH = 50 mL

Mr DPPH = 349,33 g/mol = 349,33 mg/mmol

Mol DPPH = $V \times C$

$$= 50 \text{ mL} \times 0,2 \text{ mM}$$

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

$$= 0,01 \text{ mmol}$$

Massa DPPH = Mol DPPH x Mr DPPH

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

$$= 3,9433 \text{ mg}$$

Cara pembuatan larutan DPPH 0,2 mL sebanyak 50 mL yaitu dengan menimbang 3,9433 mg padatan DPPH, kemudian dilarutkan dengan 50 mL etanol dalam labu ukur 50 mL. Selanjutnya dikocok hingga homogen.

L.3.7 Pembuatan Larutan isolat KLTP untuk Uji Antioksidan

L.3.7.1 Pembuatan larutan stok isolat KLTP 100 ppm

Larutan stok sampel 100 ppm dibuat dengan melarutkan 2,5 mg isolat steroid hasil KLTP dalam 25 mL *n*-heksana lalu dihomogenkan.

L.3.7.2 Pembuatan larutan fraksi *n*-butanol dan isolat hasil KLTP variasi konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm sebanyak 10 mL dari larutan stok 100 ppm

- 5 ppm

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

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

$$V_1 = 50 \text{ ppm.mL} / 100 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

- 20 ppm

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

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 20 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 200 \text{ ppm.mL} / 100 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

- 10 ppm

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

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

$$V_1 = 100 \text{ ppm.mL} / 100 \text{ ppm}$$

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

- 25 ppm

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

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 25 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 250 \text{ ppm.mL} / 100 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 2,5 \text{ mL}$$

- 15 ppm

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

$$100 \text{ ppm} \times V_1 = 15 \text{ ppm} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 150 \text{ ppm.mL} / 100 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 1,5 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya yaitu dengan memipet sebanyak volume masing-masing konsentrasi larutan sampel dalam vial, lalu diuapkan dan ditambahkan 10 mL etanol 95% dan dihomogenkan.

L.3.8 Pembuatan Larutan Fraksi *n*-butanol untuk Uji Antioksidan

L.3.8.1 Pembuatan larutan stok fraksi *n*-butanol 100 ppm

Larutan stok sampel 100 ppm dibuat dengan melarutkan 2,5 mg fraksi *n*-butanol dalam 25 mL *n*-butanol lalu dihomogenkan.

Lampiran 4. Perhitungan Hasil Penelitian dan Data Pengamatan

L.4.1 Rendemen Hasil Maserasi

Tabel L.4.1 Data Hasil Rendemen Maserasi

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

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

L.4.2 Rendemen Hasil Hidrolisis dan Partisi

Tabel L.4.2 Data Hasil Rendemen Fraksi

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

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

L.4.3 Perhitungan Nilai R_f Pemisahan Isolat dengan KLTP

Nilai R_f KLTP dapat dihitung menggunakan rumus:

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

Tabel L.4.3 Data R_f Pemisahan dengan KLTP

No. Spot	Jarak tempuh spot (cm)	Jarak tempuh fasa gerak (cm)	Nilai R_f
1	0,36		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	18	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 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi *n*-butanol dan Isolat KLTP

a. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi *n*-butanol

Persen (%) aktivitas antioksidan dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Aktivitas Antioksidan} = \frac{\text{Abs.kontrol} - \text{Abs.sampel}}{\text{Abs.kontrol}} \times 100\%$$

Tabel L.4.4 Aktivitas Antioksidan Fraksi *n*-butanol

Pengukuran ke-1									
Kons.(ppm)	Absorbansi Sampel				Absorbansi Kontrol				% Aktivitas Antioksidan
	Pembacaan ke-			Mean	Pembacaan ke-			Mean	
	1	2	3		1	2	3		
5	0,3058	0,3061	0,3066	0,3062	0,3175	0,3177	0,3174	0,3175	3,56
10	0,2898	0,2897	0,2897	0,2898	0,3178	0,3178	0,3179	0,3178	8,81
15	0,2671	0,2671	0,2662	0,2668	0,3167	0,3168	0,3169	0,3168	15,78
20	0,2723	0,2721	0,2725	0,2723	0,3175	0,3174	0,3175	0,3175	14,23
25	0,2697	0,2696	0,2694	0,2696	0,3171	0,3170	0,3172	0,3171	14,98

Pengukuran ke-2									
Kons.(ppm)	Absorbansi Sampel				Absorbansi Kontrol				% Aktivitas Antioksidan
	Pembacaan ke-			Mean	Pembacaan ke-			Mean	
	1	2	3		1	2	3		
5	0,2985	0,2994	0,2984	0,2988	0,3624	0,3628	0,3631	0,3628	17,64
10	0,2969	0,2967	0,2966	0,2967	0,3611	0,3604	0,3605	0,3607	17,74
15	0,3030	0,3026	0,3027	0,3028	0,3619	0,3619	0,3621	0,3620	16,35
20	0,3099	0,3101	0,3102	0,3101	0,3624	0,3628	0,3631	0,3628	14,53
25	0,3010	0,3001	0,3002	0,3005	0,3615	0,3617	0,3615	0,3616	16,90

Tabel L.4.5 Nilai Rata-Rata % Aktivitas Antioksidan dan EC₅₀ Fraksi *n*-butanol

Konsentrasi (ppm)	% Aktivitas Antioksidan		
	Pengukuran ke-		Mean
	1	2	
5	3,56	17,64	10,60
10	8,81	17,74	13,28
15	15,78	16,35	16,07
20	14,23	14,53	14,38
25	14,98	16,90	15,94

Hasil Analisa Perhitungan Nilai EC₅₀ Fraksi *n*-butanol

Comparison of Fits
Null hypothesis

Can't calculate
Different curve for each data set

Alternative hypothesis	One curve for all data sets	
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)	Models have the same DF	
Preferred model	Different curve for each data set	
F (DFn, DFd)		
Different curve for each data set		
set		
Best-fit values		
LogEC50	4,075	
HillSlope	0,2668	
EC50	11891	
Std. Error		
LogEC50	0,9059	
HillSlope	0,08281	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	2,607 to 46,24	
HillSlope	0,01742 to 0,5419	
	404,5 to	
EC50	1,738e+046	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	
R square	0,7951	
Absolute Sum of Squares	4,15	
Sy.x	1,176	
One curve for all data sets		
Best-fit values		
LogEC50	4,075	4,075
HillSlope	0,2668	0,2668
EC50	11891	11891
Std. Error		
LogEC50	0,9059	0,9059
HillSlope	0,08281	0,08281
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	2,607 to 46,24	2,607 to 46,24
HillSlope	0,01742 to 0,5419	0,01742 to 0,5419
	404,5 to	
EC50	1,738e+046	404,5 to 1,738e+046
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R square	0,7951	0,7951
Absolute Sum of Squares	4,15	4,15
Sy.x		1,176
Constraints		
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	

Number of points

of X values 5

Y values analyzed 5

b. Uji Aktivitas Antioksidan Isolat 10 KLTP

Persen (%) aktivitas antioksidan dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Aktivitas Antioksidan} = \frac{\text{Abs.blanko} - \text{Abs.sampel}}{\text{Abs.blanko}} \times 100\%$$

Tabel L.4.6 Persen (%) Aktivitas Antioksidan Isolat KLTP

Pengukuran ke-1									
Kons.(ppm)	Absorbansi Sampel				Absorbansi Kontrol				% Aktivitas Antioksidan
	Pembacaan ke-			Mean	Pembacaan ke-			Mean	
	1	2	3		1	2	3		
5	0,3951	0,3943	0,3947	0,3947	0,4486	0,4482	0,4482	0,4483	11,96
10	0,3906	0,3900	0,3897	0,3901	0,4486	0,4480	0,4483	0,4483	12,98
15	0,3831	0,3836	0,3833	0,3833	0,4484	0,4484	0,4485	0,4484	14,52
20	0,1719	0,1717	0,1717	0,1718	0,4479	0,4477	0,4481	0,4479	61,64
25	0,3627	0,3628	0,3627	0,3627	0,4494	0,4489	0,4496	0,4493	19,27
Pengukuran ke-2									
Kons.(ppm)	Absorbansi Sampel				Absorbansi Kontrol				% Aktivitas Antioksidan
	Pembacaan ke-			Mean	Pembacaan ke-			Mean	
	1	2	3		1	2	3		
5	0,3909	0,3912	0,3906	0,3909	0,4479	0,4477	0,4481	0,4479	12,73
10	0,3841	0,3838	0,3837	0,3839	0,4477	0,4481	0,4479	0,4479	14,29
15	0,3420	0,3410	0,3412	0,3414	0,4483	0,4482	0,4482	0,4483	23,85
20	0,2468	0,2469	0,2465	0,2467	0,4494	0,4491	0,4488	0,4491	45,07
25	0,3693	0,3687	0,3689	0,3690	0,4494	0,4489	0,4496	0,4493	17,87

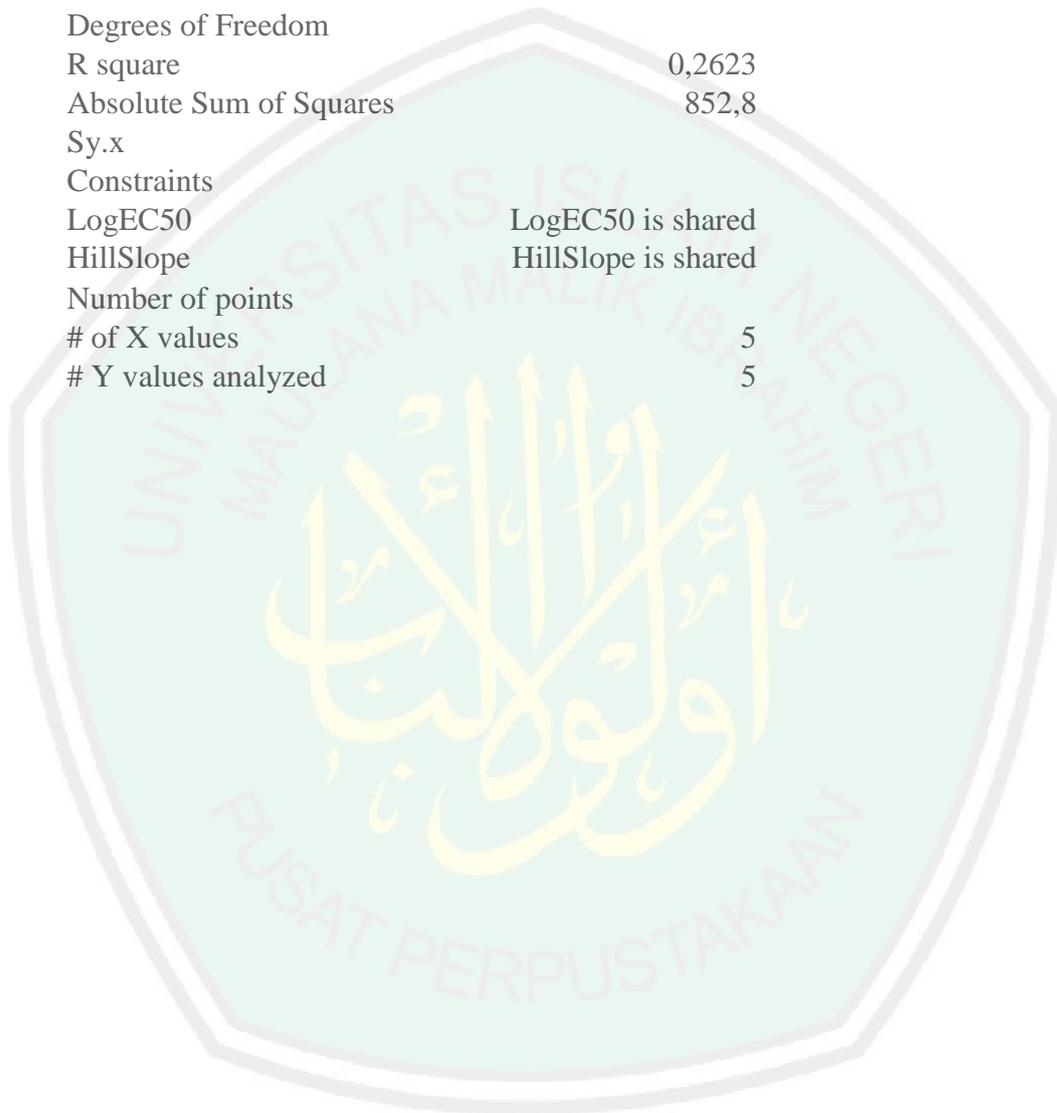
Tabel L.4.7 Nilai Rata-Rata % Aktivitas Antioksidan dan EC₅₀ Isolat KLTP

Konsentrasi (ppm)	% Aktivitas Antioksidan		Mean
	Pengukuran ke-		
	1	2	
5	11,96	12,73	12,35
10	12,98	14,29	13,64
15	14,52	23,85	19,19
20	61,64	45,07	53,36
25	19,27	17,87	18,57

Hasil Analisa Perhitungan Nilai EC₅₀ Isolat KLTP

Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		Different curve for each data set
Alternative hypothesis		One curve for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		Different curve for each data set
F (DFn, DFd)		
Different curve for each data set		
Best-fit values		
LogEC50	1,761	
HillSlope	0,8328	
EC50	57,62	
Std. Error		
LogEC50	0,6568	
HillSlope	0,9553	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	1,177 to ???	
HillSlope	-5,137 to ???	
EC50	15,04 to ???	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	
R square	0,2623	
Absolute Sum of Squares	852,8	
Sy.x	16,86	
One curve for all data sets		
Best-fit values		
LogEC50	1,761	1,761
HillSlope	0,8328	0,8328
EC50	57,62	57,62

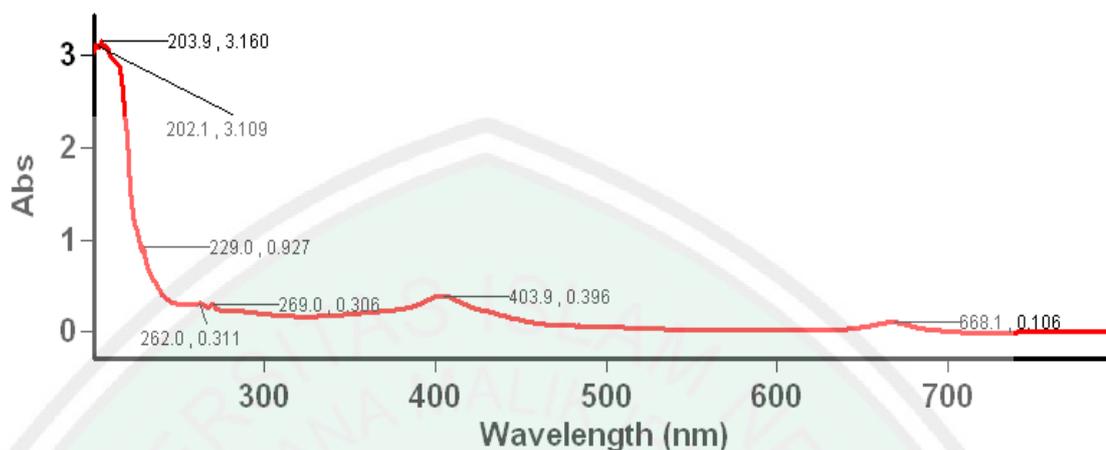
Std. Error		
LogEC50	0,6568	0,6568
HillSlope	0,9553	0,9553
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	1,177 to ???	1,177 to ???
HillSlope	-5,137 to ???	-5,137 to ???
EC50	15,04 to ???	15,04 to ???
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R square	0,2623	0,2623
Absolute Sum of Squares	852,8	852,8
Sy.x		16,86
Constraints		
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
# of X values	5	
# Y values analyzed	5	



L.4.5 Hasil Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

a. Data UV-Vis Fraksi *n*-butanol Mikroalga *Chlorella* sp.

Lamdha Maks Fraksi *n*-butanol *Chlorella* sp.



Scan Analysis Report

Report Time : Mon 16 Mar 04:17:16 PM 2020

Method:

Batch: D:\Vinna\Lamdha Maks Fraksi *n*-butanol *Chlorella* 20 ppm (16-03-2020).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: Fraksi *n*-butanol *Chlorella* 20 ppm

Collection Time 3/16/2020 4:18:39 PM

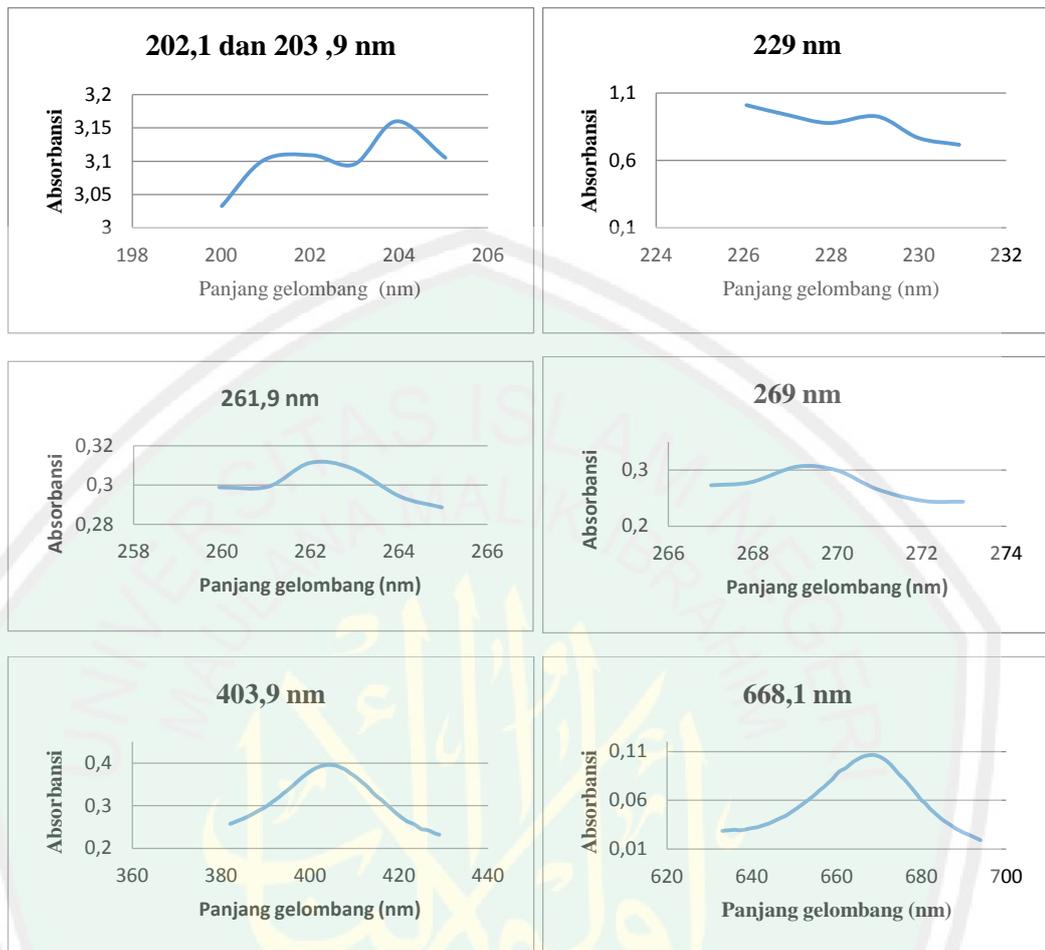
Peak Table

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

Wavelength (nm)	Abs
-----------------	-----

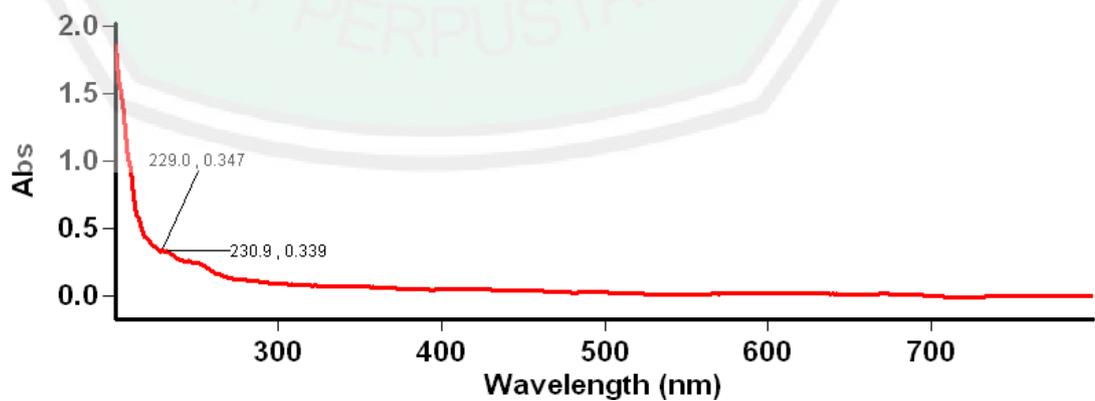
668.1	0.106
403.9	0.396
269.0	0.306
262.0	0.311
229.0	0.927
203.9	3.160
202.1	3.109

Pembesaran pada daerah puncak berdasarkan hasil identifikasi UV-Vis



b. Data UV-Vis Isolat KLTP Mikroalga *Chlorella* sp.

Lamdba Maks Isolat KLTP *Chlorella* sp.



Scan Analysis Report

Report Time : Mon 16 Mar 04:13:04 PM 2020

Method:

Batch: D:\Vinna\Lamdha Maks Isolat KLTP Chlorella 20 ppm (16-03-2020).DSW

Software version: 3.00(339)

Sample Name: Isolat KLTP Chlorella 20 ppm

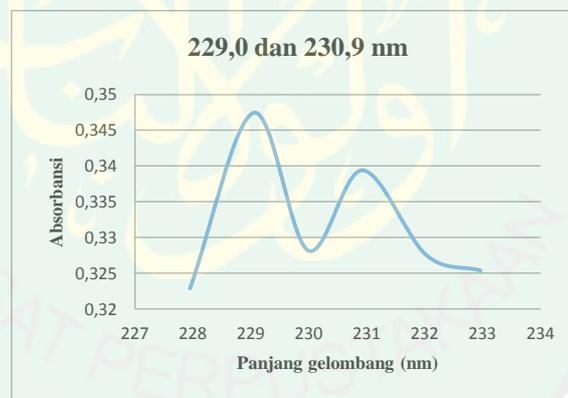
Collection Time 3/16/2020 4:14:17 PM

Peak Table

Peak Style	Peaks
Peak Threshold	0.0100
Range	799.9nm to 200.0nm
Wavelength (nm)	Abs

230.9	0.339
229.0	0.347

Pembesaran pada daerah puncak berdasarkan hasil identifikasi UV-Vis



Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian
L.5.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella* sp.



Kultivasi dengan fotoperiodisitas
 14 jam terang dan 10 jam gelap



Hari ke-0



Hari ke-1



Hari ke-2



Hari ke-3



Hari ke-4



Hari ke-5



Hari ke-6



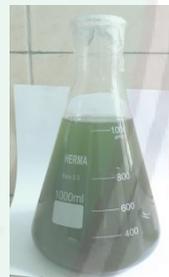
Hari ke-7



Hari ke-8



Hari ke-9



Hari ke-10

L.5.2 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella* sp.



Biomassa cair
 mikroalga
Chlorella sp



Biomassa
 sebelum
 disentrifugasi



Biomassa
 setelah
 disentrifugasi



Biomassa pekat
Chlorella sp

L.5.3 Preparasi Mikroalga *Chlorella* sp.



Pengeringan
Biomassa *Chlorella* sp.



Biomassa Kering
Chlorella sp.

L.5.4 Ekstraksi Maserasi



Perendaman
sampel dalam
metanol



Pengadukan
dengan *shaker*
selama 24 jam



Penyaringan
sampel



Filtrat hasil
penyaringan



Ekstrak metanol
pekat mikroalga
Chlorella sp.

L.5.5 Hidrolisis dan Partisi



Hidrolisis ekstrak pekat dengan HCl 2N



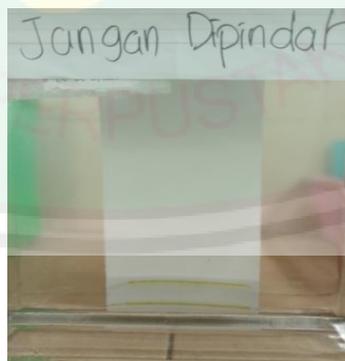
Partisi hidrolisat dengan pelarut n-butanol

L.5.6 Uji Fitokimia Steroid

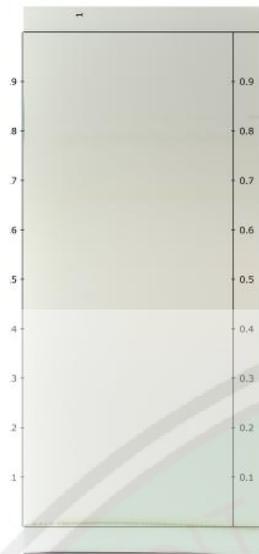


Pembentukan cincin hijau setelah direaksikan dengan LB

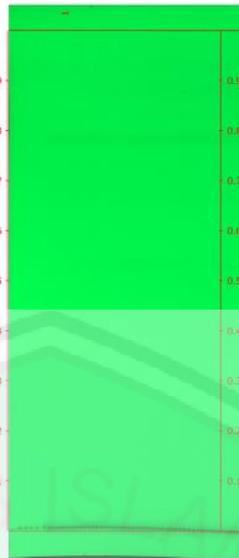
L.5.7 Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)



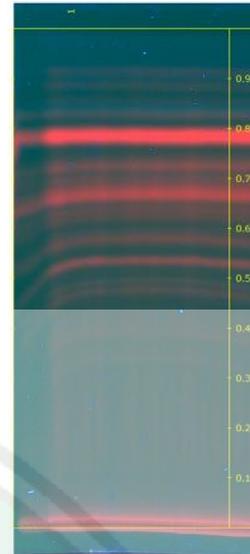
Proses elusi plat KLTP dalam eluen n-heksana:etil asetat (3,75:1,25)



Visual hasil KLTP



Visual hasil KLTP di bawah lampu UV 256 nm



Visual hasil KLTP di bawah lampu UV 366 nm

L.5.8 Uji Aktivitas Antioksidan



Preparasi sampel untuk uji antioksidan