

**IDENTIFIKASI ISOLAT STEROID DAN UJI AKTIVITAS  
ANTIOKSIDAN FRAKSI *n*-HEKSANA HASIL EKSTRAKSI SONIKASI  
PADA MIKROALGA *Chlorella sp.***

**SKRIPSI**

Oleh  
**RIA FEBRIYANTI**  
**NIM. 17630057**



**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2021**

**IDENTIFIKASI ISOLAT STEROID DAN UJI AKTIVITAS  
ANTIOKSIDAN FRAKSI *n*-HEKSANA HASIL EKSTRAKSI SONIKASI  
PADA MIKROALGA *Chlorella sp.***

**SKRIPSI**

Oleh  
**RIA FEBRIYANTI**  
NIM. 17630057

**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)**

**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2021**

**IDENTIFIKASI ISOLAT STEROID DAN UJI AKTIVITAS  
ANTIOKSIDAN FRAKSI *n*-HEKSANA HASIL EKSTRAKSI SONIKASI  
PADA MIKROALGA *Chlorella sp.***

**SKRIPSI**

Oleh:  
**Ria Febriyanti**  
**NIM. 17630057**

**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji**  
**Tanggal: 23 November 2021**

**Pembimbing I**



**Suci Amalia, M.Sc**  
**NIP. 19821104 200901 2 007**

**Pembimbing II**



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

**Mengesahkan,**  
**Ketua Program Studi**



**Rachmawati Ningsih, M.Si**  
**NIP. 19810811 200801 2 010**

**IDENTIFIKASI ISOLAT STEROID DAN UJI AKTIVITAS  
ANTIOKSIDAN FRAKSI *n*-HEKSANA HASIL EKSTRAKSI SONIKASI  
PADA MIKROALGA *Chlorella sp.***

**SKRIPSI**

Oleh:  
**Ria Febriyanti**  
**NIM. 17630057**

**Telah Diperiksa di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal: 23 November 2021**

<b>Penguji Utama</b>	<b>: Rachmawati Ningsih, M.Si</b> <b>NIP. 19810811 200801 2 010</b>	 (.....)
<b>Ketua Penguji</b>	<b>: Vina Nurul Istighfarini, M.Si</b> <b>LB. 63026</b>	 (.....)
<b>Sekretaris Penguji</b>	<b>: Suci Amalia, M.Sc</b> <b>NIP. 19821104 200901 2 007</b>	 (.....)
<b>Anggota Penguji</b>	<b>: A. Ghanaim Fasya, M.Si</b> <b>NIP. 19820616 200604 1 002</b>	 (.....)

**Mengesahkan,  
Ketua Program Studi**



**Rachmawati Ningsih, M.Si**  
**NIP. 19810811 200801 2 010**

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ria Febriyanti  
NIM : 17630057  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : Identifikasi isolat Steroid dan Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi *n*-Heksana Hasil Ekstraksi Sonikasi pada 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, 23 November 2021

Yang membuat pernyataan,

A 10,000 Rupiah postage stamp with a signature over it. The stamp features the Garuda Pancasila emblem and the text 'SEPLULUH RIBU RUPIAH', '10000', 'TEL', 'METERAI', 'TEMPEL', and the serial number '795FDAJX486796623'.

Ria Febriyanti  
NIM. 17630057

## PERSEMBAHAN

Dengan mengucap *Alhamdulillah robbil'aalamiin*, Maha Kuasa Allah yang menjadikan segala sesuatu, yang memberikan saya kekuatan dan kemampuan hingga saya berada di tahap ini, dengan rasa syukur kepada Allah SWT, saya persembahkan karya ini kepada:

Orangtua saya, Bapak Subairi dan Ibu Siti Ngaisah yang telah mengisi dunia saya dengan begitu banyak kebahagiaan sehingga seumur hidup tidak cukup untuk menikmati semuanya. Untuk keluarga besar tercinta, yang senantiasa memberikan segala nasehat, dukungan, do'a serta restu yang tiada kurangnya untuk saya. Selalu mendukung apapun keputusan yang saya pilih dan memberikan kekuatan baik secara rohani dan jasmani sehingga saya dapat menyelesaikan kewajiban saya pada pendidikan S1 ini. Semoga setiap langkah yang sudah dan sedang saya tentukan mendapat keridhoan dari bapak dan ibu.

Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si selaku dosen wali dan pembimbing yang telah memberikan motivasi dan menumbuhkan rasa percaya diri saat saya mengalami kesulitan dalam proses penelitian. Ibu Suci Amalia, M.Sc selaku dosen pembimbing yang dengan sabar memberikan nasehat serta arahan dalam menyelesaikan naskah ini. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si dan Ibu Vina Nurul Istighfarini, M.Si selaku dosen penguji yang selalu sabar membimbing saya dalam proses revisi. Untuk bapak ibu dosen serta laboran saya ucapkan banyak terimakasih, semoga ilmu yang diberikan bermanfaat dan penuh berkah.

Selanjutnya, saya persembahkan untuk Mbak Vita, Mbak Vinna serta teman-teman pengurus HIMASKA Helium yang telah memberikan pengalaman organisasi semasa kuliah. Teman seperbimbingan saya, Devi, Siti, Arif, Happy, teman-teman penelitian tim bahan alam, NEON 17, kelas Bar-bar Chemistry (Kimia B) serta anggota grup "Gogrokane Rengginang" yang selalu ramai, ceria, kompak dan heboh. Untuk sahabat tercinta Tita, Vivi, Lina, Lely, Ismail, Eriq yang senantiasa membuka lengan, hati serta dukungan terhadap diri yang tak bisa berdiri sendiri ini. Semoga Allah SWT selalu memberikan kelancaran dan kemudahan bagi kita semua.

Dan yang terakhir, saya persembahkan karya kecil ini untuk teman satu tim penelitian, teman kuliner sekaligus orang yang paling istimewa, Jeffrey Anggatra K.A. Terimakasih sudah melengkapi keseharianku, selalu bertahan dengan segala kekuranganku, selalu menjadi penyemangat, memberi inspirasi dan motivasi hingga saat ini. Semoga Allah SWT senantiasa mengabulkan segala harapan kita.

**Motto**

*“Hidup yang berharga adalah hidup yang dapat memberikan kehidupannya kepada orang lain”*

-Albert Einstein-

## KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyusun proposal penelitian ini. Sholawat serta salam semoga senantiasa mengalun indah dan tulus terucap kepada Nabi Muhammad SAW, keluarganya, sahabatnya dan para umat serta pengikutnya. Dalam menyelesaikan proposal penelitian ini, ternyata tidak semudah yang dibayangkan sebelumnya. Namun, berkat dorongan, semangat, dan dukungan dari berbagai pihak merupakan kekuatan yang sangat besar hingga terselesaikannya proposal penelitian ini.

Pada kesempatan kali ini penulis juga mengucapkan terimakasih yang tak terhingga kepada:

1. Ayah dan Ibu yang telah tulus, ikhlas dan selalu mendoakan agar penulis terus giat dan bersungguh-sungguh dalam belajar
2. Bapak Prof. Dr. H. Abdul Haris, M.Ag., selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malaik Ibrahim Malang.
3. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malaik Ibrahim Malang.
4. Rachmawati Ningsih M.Si selaku ketua jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Ibu Suci Amalia, M.Sc selaku dosen pembimbing I, Bapak A. Ghanaim Fasya M. Si selaku dosen pembimbing II yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan nasehat serta perhatiannya hingga selesainya proposal penelitian ini.
6. Jeffry selaku rekan penelitian serta seluruh teman-teman organik yang telah berusaha keras dalam menyelesaikan proposal penelitian di masa pandemi
7. Seluruh teman-teman kelas kimia B dan kimia angkatan 2017 yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, namun tidak mengurangi arti keberadaan mereka.

Sebagai seorang manusia dengan keterbatasan ilmu pengetahuan yang dikuasai, penulis menyadari bahwa proposal penelitian ini masih sangat jauh dari sempurna sehingga membutuhkan masukan dan kritikan yang bersifat membangun.

Oleh karena itu penulis membuka luas bagi yang ingin menyumbangkan masukan dan kritikan demi kesempurnaan proposal penelitian ini. Akhir kata penulis berharap semoga proposal penelitian ini bermanfaat bagi penulis sendiri maupun pembaca. Terima kasih.

Malang, 23 November 2021



Ria Febriyanti  
NIM. 17630057

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>PERSEMBAHAN</b> .....	<b>v</b>
<b>MOTTO</b> .....	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xv</b>
<b>مستخلص البحث</b> .....	<b>xvi</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	6
1.3 Tujuan .....	6
1.4 Batasan Masalah .....	7
1.5 Manfaat Penelitian .....	7
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>8</b>
2.1 Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	8
2.2 Steroid .....	12
2.3 Isolasi Senyawa Steroid .....	15
2.4 Hidolisis dan Partisi .....	17
2.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP .....	19
2.6 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Dua Dimensi .....	20
2.7 Uji Antioksidan .....	21
2.8 Identifikasi Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis .....	24
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b> .....	<b>26</b>
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian .....	26
3.2 Alat dan Bahan .....	26
3.2.1 Alat .....	26
3.2.2 Bahan .....	26
3.3 Tahapan Penelitian .....	27
3.4 Cara Kerja .....	27
3.4.1 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp</i> dengan MET .....	27
3.4.2 Pemanenan Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	28
3.4.3 Penentuan kadar air mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	28
3.4.4 Ekstraksi Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan Metode Sonikasi .....	29

3.4.5 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Peekat Metanol Mikroalga <i>Chlorella</i> <i>sp.</i> .....	29
3.4.6 Uji Fitokimia Senyawa Steroid Fraksi N-Heksana.....	30
3.4.7 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP.....	30
3.4.8 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT Dua Dimensi.....	31
3.4.9 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis .....	31
3.4.10 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH.....	32
3.4.11 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel.....	32
3.4.12 Analisis Data.....	33
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>34</b>
4.1 Kultivasi dan Pemanenan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	34
4.2 Penentuan Kadar Air Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	35
4.3 Ekstraksi Sonikasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	36
4.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Peekat Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	37
4.5 Uji Fitokimia Senyawa Steroid Fraksi N-Heksana.....	38
4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP.....	41
4.7 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT Dua Dimensi.....	43
4.8 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.....	44
4.9 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH.....	47
4.10 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel.....	48
4.11 Pemanfaatan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam Perspektif Islam.....	52
<b>BAB V PENUTUP.....</b>	<b>55</b>
5.1 Kesimpulan .....	55
5.2 Saran .....	55
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>56</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>66</b>

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan penelitian .....	66
Lampiran 2 Diagram alir .....	67
Lampiran 3 Perhitungan dan pembuatan larutan .....	72
Lampiran 4 Data pengamatan dan perhitungan .....	76
Lampiran 5 Dokumentasi penelitian .....	89

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Chlorella sp</i> .....	8
Gambar 2.2 Kurva pertumbuhan mikroalga <i>Chlorella sp</i> .....	11
Gambar 2.3 Kerangka dasar senyawa steroid .....	13
Gambar 2.4 Struktur steroid pada tumbuhan (a) Kampesterol, (b) Fukosterol, (c) $\beta$ -sitosterol, (d) $\Delta^5$ -Avenasterol.....	13
Gambar 2.5 Diagram reaksi LB dengan kolestrol.....	14
Gambar 2.6 Dugaan reaksi hidrolisis geranyl- $\beta$ -D-glucoopyranoside.....	18
Gambar 2.7 Reaksi antara antioksidan dengan DPPH .....	23
Gambar 4.1 Perubahan warna kultur mikroalga <i>Chlorella sp</i> .....	34
Gambar 4.2 Mekanisme reaksi steroid dengan reagen LB .....	39
Gambar 4.3 Hasil uji fitokimia <i>Chlorella sp</i> . .....	40
Gambar 4.4 Hasil pemisahan senyawa steroid dengan KLTP sebelum (a) dan sesudah (b) dideteksi di bawah sinar UV 366 nm .....	41
Gambar 4.5 Hasil spektra UV Vis isolat 15, 17 dan 18 mikroalga <i>Chlorella sp</i> . .	45
Gambar 4.6 Struktur senyawa steroid jenis kampesterol, stigmasterol dan $\beta$ -sitosterol .....	46
Gambar 4.7 Panjang gelombang DPPH 0,2 mM .....	47
Gambar 4.8 Struktur fitosterol dengan EC <sub>50</sub> yang berbeda (a) $\beta$ -sitosterol (b) sitostanol (c) fukosterol.....	50

## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Variasi eluen campuran n-heksana dan etil asetat .....	20
Tabel 2.2 Ketentuan kekuatan antioksidan .....	23
Tabel 4.1 Hasil pemisahan KLTP pada sinar UV $\lambda$ 366 nm .....	42
Tabel 4.2 Hasil pemisahan steroid menggunakan KLT 2 dimensi .....	44
Tabel 4.3 Nilai EC <sub>50</sub> isolat KLTP mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	49

## ABSTRAK

Febriyanti, Ria. 2021. **Identifikasi isolat Steroid dan Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi *n*-Heksana Hasil Ekstraksi Sonikasi pada Mikroalga (*Chlorella sp.*).** *Skripsi*. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Suci Amalia, M. Sc; Pembimbing II: A. Ghanaim Fasya, M.Si.

---

**Kata kunci :** Mikroalga, Steroid, Antioksidan, *Chlorella sp.* dan Ultrasonik

*Chlorella sp.* merupakan salah satu jenis alga hijau yang mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder seperti steroid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil identifikasi isolat steroid fraksi *n*-heksana hasil ekstraksi sonikasi mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan spektrofotometer UV-Vis serta aktivitas antioksidan terhadap DPPH. *Chlorella sp.* dikultivasi dalam MET 4% dan pemanenannya dilakukan pada hari ke-10. *Chlorella sp.* diekstraksi dengan gelombang ultrasonik 40 KHz menggunakan pelarut metanol. Ekstrak metanol dihidrolisis dengan katalis HCl 2N dan dipartisi menggunakan pelarut *n*-heksana. Hasil partisi dilakukan pemisahan dengan KLTP dan KLT dua dimensi. Aktivitas antioksidan diuji menggunakan metode DPPH dengan parameter EC<sub>50</sub> serta identifikasi senyawa steroid secara spektrofotometri UV Vis. Hasil identifikasi menggunakan spektrofotometer UV Vis didapat panjang gelombang pada isolat 15 sebesar 205, 224, dan 228 nm. Isolat 17 menghasilkan panjang gelombang 205 dan 220 nm sementara isolat 18 menghasilkan panjang gelombang 204 dan 221 nm. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas antioksidan pada isolat 15 menghasilkan nilai EC<sub>50</sub> 17,27 ppm, isolat 17 menghasilkan nilai EC<sub>50</sub> 13,83 ppm, sementara isolat 18 menghasilkan nilai EC<sub>50</sub> 10,81 ppm. Ketiga isolat hasil KLTP fraksi *n*-heksana memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori sangat kuat.

## ABSTRACT

Febriyanti, Ria. 2021. **Identification of Steroid Isolate and Antioxidant Activity Test of *n*-Hexane Fraction from Sonication Extraction of Microalgae (*Chlorella sp.*)**. *Bachelor Thesis*. Department of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang. Advisor I: Suci Amalia, M.Sc; Advisor II: A. Ghanaim Fasya, M.Si.

---

Keywords: Microalgae, Steroids, Antioxidants, *Chlorella sp.* and Ultrasonic

*Chlorella sp.* is one type of green algae that contains various secondary metabolites such as steroids. This study aims to determine the results of the identification of steroid isolates from the *n*-hexane fraction from the sonication extraction of the microalgae *Chlorella sp.* using UV-Vis spectrophotometer as well as antioxidant activity against DPPH. *Chlorella sp.* cultivated in 4% MET and harvested on day 10. *Chlorella sp.* extracted with 40 KHz ultrasonic waves using methanol as a solvent. The methanol extract was hydrolyzed with 2N HCl catalyst and partitioned using *n*-hexane as solvent. The results of the partition were separated by TLC Preparative and two-dimensional TLC. Antioxidant activity was tested using the DPPH method with EC<sub>50</sub> parameters and identification of steroid compounds by UV Vis spectrophotometry. The results of identification using UV Vis spectrophotometer obtained wavelengths on isolate 15 of 205, 224, and 228 nm. Isolate 17 produced wavelengths of 205 and 220 nm while isolate 18 produced wavelengths of 204 and 221 nm. The results showed that the antioxidant activity of isolate 15 resulted in an EC<sub>50</sub> value of 17.27 ppm, isolate 17 produced an EC<sub>50</sub> value of 13.83 ppm, while isolate 18 produced an EC<sub>50</sub> value of 10.81 ppm. The three isolates from the *n*-hexane fraction TLCP had antioxidant activity in a very strong category.

## مستخلص البحث

فيرياني، ربا. ٢٠٢١. تعرف عزلات المنشطات واختبار نشيطة المضادة للأكسدة ففة ن-الهكسان حصىلة استخراج الصوتنة في ميكرويف الطحالب (*Chlorella sp.*). البحث العلم. قسم الكيمياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرفة ١: سوجي أماليا الماجستير، المشرف ٢: أ. غنائم فشى الماجستير.

---

الكلمات المفتاح : ميكرويف الطحالب، المنشطات، المضادة للأكسدة، *Chlorella sp.*، وفوق صوتي.

*Chlorella sp.* هو واحدة من أجناس الطحالب الخضراء التي تتضمن أنواع مستحضر الأيضات الثانوية مثل المنشطات. يهدف هذا البحث لمعرفة حصىلة تعرف عزلات المنشطات ففة ن-الهكسان، تستخدم حصىلة استخراج الصوتنة في ميكرويف الطحالب *Chlorella sp.* مقياس الطيف الضوئي (UV-Vis) ونشيطة المضادة للأكسدة على (DPPH). يزرع *Chlorella sp.* في (MET) ٤ % ويستخدم نتاجه في يوم - ١٠. يستخرج *Chlorella sp.* بموج فوق صوتي ٤٠ (KHz) يستخدم مذيبي الميثانول. استخراج الميثانول تحليل الماء بمحتزرات (N<sub>2</sub> HCl) وينقسم باستخدام المذيب ن-الهكسان. تفعل حصىلة الأقسام إنفصالا ب (KLTP) واختبار الصافي ب (KLT) قياسين. تختبر نشيطة المضادة للأكسدة باستخدام طريقة (DPPH) بمعلمات (EC<sub>٥٠</sub>). وتعرف مستحضر المنشطات قياس الطيف الضوئي UV Vis. تستخدم حصىلة التعرف مقياس الطيف الضوئي (UV Vis) وتنال طول الموج في عزلات ١٥ هي ٢٠٥، ٢٢٤، و٢٢٨ ن م. تحصل عزلات ١٧ طول الموج ٢٠٥ و ٢٢٠ ن م. أما عزلات ١٨ تحصل طول الموج ٢٠٤ و ٢٢١ ن م. تدل حصىلة البحث نشيطة المضادة للأكسدة على عزلات ١٥ وتحصل قيمة EC<sub>٥٠</sub> ١٧,٢٧ ppm، تحصل عزلات ١٧ قيمة EC<sub>٥٠</sub> ١٣,٨٣ ppm، أما عزلات ١٨ تحصل قيمة EC<sub>٥٠</sub> ١٠,٨١ ppm. تملك ٣ عزلات من حصىلة (KLTP) ففة ن-الهكسان نشيطة المضادة للأكسدة بالطبقة القوة شديدا.

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Steroid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang banyak ditemukan pada hewan dan tumbuhan. Senyawa steroid yang terkandung dalam hewan berhubungan erat dengan aktifitas biologis dan kerja hormon, sedangkan steroid pada tumbuhan banyak ditemukan pada tumbuhan tingkat rendah maupun tumbuhan tingkat tinggi. Steroid pada tumbuhan tingkat tinggi mengandung fitosterol seperti: stigmasterol, sitosterol ( $\beta$ -sitosterol) dan kampesterol (Suryelita, dkk., 2017).

Senyawa steroid memiliki bioaktivitas yang dapat dimanfaatkan sebagai antiinflamasi (Kurnia, dkk., 2019), menurunkan kadar kolesterol, antikarsinogenik (Nasrudin, dkk., 2017), antibakteri (Suhara, dkk., 2020) dan antioksidan (Widowati, dkk., 2015). Steroid sebagai antioksidan dapat mengurangi jumlah metabolit  $\text{CCl}_4$  sehingga kerusakan sel-sel hati dapat terlindungi dan aktivitas serta stabilitas membran sel tetap terjaga (Wang, dkk., 2004). Antioksidan adalah suatu senyawa dengan kadar atau jumlah tertentu mampu menghambat proses oksidasi dengan mengikat radikal bebas (Kesuma, 2015). Peranan antioksidan dalam mencegah radikal bebas yaitu dapat melindungi tubuh dari berbagai penyakit degeneratif seperti rematik, kanker, katarak, infeksi, penyakit jantung, penyakit liver, dan penyakit respiratorik. Antioksidan juga berperan dalam menekan proses penuaan atau *antiaging* (Tamat, dkk., 2007).

Tubuh manusia mempunyai antioksidan alami yang berasal dari enzim-enzim seperti glutathione peroxidase, katalase, glutathione S-transferase dan superoksida dismutase (SOD) (Pratama dan Busman, 2020). Antioksidan alami yang berasal dari dalam tubuh belum sepenuhnya melindungi kerusakan sel yang disebabkan oleh oksidan dari luar, oleh karena itu tubuh memerlukan antioksidan dari luar yang aman saat dikonsumsi. Penggunaan senyawa antioksidan dari luar dapat berasal dari senyawa alami dan senyawa sintetik.

Penggunaan antioksidan sintetik tidak direkomendasikan oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) karena dapat menginduksi proses karsinogenik pada tubuh (Kesuma, 2015). Oleh karena itu, perlu dicari alternatif lain yaitu antioksidan alami dari bahan alam yang lebih sehat dan aman saat dikonsumsi daripada antioksidan sintetik. Salah satu bahan alam yang dapat digunakan sebagai antioksidan alami adalah mikroalga.

Jenis mikroalga yang terdapat di perairan Indonesia sangat beragam salah satunya adalah *Chlorella sp.*. Menurut Novianti, dkk., (2019) mikroalga *Chlorella sp.* memiliki potensi sebagai antioksidan yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah terjadinya proses oksidasi. *Chlorella sp.* sangat bermanfaat bagi kehidupan makhluk hidup lain sebagaimana yang difirmankan Allah SWT dalam al-Qur'an surat Abasa ayat 24-32:

فَلْيَنْظُرِ الْإِنْسَانُ إِلَىٰ طَعَامِهِ ۗ أَنَّا صَبَبْنَا الْمَاءَ صَبًّا ۚ ثُمَّ شَقَقْنَا الْأَرْضَ شَقًّا ۚ فَأَنْبَتْنَا فِيهَا حَبًّا ۚ وَعَيْنًا وَقَضْبًا ۚ وَزَيْتُونًا وَنَخْلًا ۚ وَحَدَائِقَ غُلْبًا ۚ وَفُكْهَةً وَأَنْبًا ۚ مَتَّعًا لَّكُمْ وَلِأَنْعُمِكُمْ ۚ

“Maka hendaklah manusia itu memperhatikan makanannya. Sesungguhnya Kami benar-benar telah mencurahkan air (dari langit), kemudian Kami belah bumi dengan sebaik-baiknya, lalu Kami tumbuhkan biji-bijian di bumi itu, anggur dan sayur-sayuran, zaitun dan kurma, kebun-kebun (yang) lebat, dan buah-buahan serta rumput-rumputan, untuk kesenanganmu dan untuk hewan-hewan ternakmu” (Q.S. Abasa (80): 24-32).

Tafsir Ibnu Katsir pada lafadz *أَنَا صَبَبْنَا الْمَاءَ صَبًّا ثُمَّ شَقَقْنَا الْأَرْضَ شَقًّا فَأَنْبَتْنَا فِيهَا حَبًّا*

menjelaskan tentang nikmat Allah SWT dan sekaligus menjadi bukti bahwa Allah SWT dapat menghidupkan tumbuh-tumbuhan dari tanah yang mati. Allah SWT menempatkan air dalam bumi dan masuk melalui celah-celahnya, kemudian meresap dalam biji-bijian yang telah tersimpan di dalam tanah. Maka tumbuhlah biji-bijian itu menjadi tetumbuhan yang muncul di permukaan bumi. Allah SWT menumbuhkan *Chlorella sp.* sebagai tumbuhan tingkat rendah dengan ukuran sangat kecil bahkan tidak terlihat oleh mata manusia. Namun tumbuhan tersebut sangat penting dan kaya manfaat bagi manusia, serta keduanya juga saling membutuhkan. Allah SWT menciptakan tumbuhan sebagai sumber makanan bagi manusia dan hewan. Melalui tumbuhan, tubuh manusia dan hewan mendapat semua elemen yang diperlukan bagi eksistensi biologisnya. Selanjutnya, Allah SWT menciptakan beragam rasa pada hasil tumbuhan yang dimakan itu (Ilmi, 2011).

Selain sebagai antioksidan, *Chlorella sp.* mampu menghasilkan aktivitas antikanker, menurunkan kadar kolesterol serta menurunkan tekanan darah tinggi (Hussein, dkk., 2020). Putri, dkk., (2019) menambahkan manfaat lain dari *Chlorella sp.* yaitu sebagai bioremediator dalam menetralkan pencemaran air oleh limbah industri karena kemampuan biabsorpsi yang kuat terhadap logam berat. *Chlorella sp.* memiliki beberapa kelebihan diantaranya mampu berkembangbiak dengan cepat, tidak memerlukan tempat yang luas, hidupnya tidak perlu bergantung musim,

tidak berkompetisi dengan bahan pangan, serta dapat tumbuh di air laut, air tawar maupun air limbah (Elystia, dkk., 2019).

*Chlorella sp.* dapat dibudidayakan dengan medium yang nutrisinya cukup seperti karbon dan nitrogen untuk pertumbuhannya. Medium yang digunakan untuk kultur adalah terbuat dari ekstrak tauge yang dikenal dengan Medium Ekstrak Tauge (MET). Metode kultivasi *Chlorella sp.* menggunakan (MET) dipilih karena waktu pengerjaannya singkat, murah, mudah diperoleh serta tidak menimbulkan efek toksik (Dianita, dkk., 2020). Pemanenan *Chlorella sp.* sebaiknya dilakukan pada hari ke-10 ketika warna kultur menjadi hijau pekat Prihantini, dkk., (2007).

Menurut Xu, dkk., (2016) maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang umum digunakan untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder. Metode ini membutuhkan waktu yang cukup lama dan menggunakan banyak pelarut. Oleh karena itu, diperlukan metode ekstraksi yang lebih cepat salah satunya dengan *ultrasonic-assisted extraction* (UAE). Metode sonikasi dipilih karena akan mempercepat proses ekstraksi sehingga diperoleh ekstrak yang lebih banyak dengan volume pelarut yang lebih sedikit (Handaratri dan Yuniati, 2019). Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi sonikasi adalah metanol. Ekstraksi dengan pelarut metanol diketahui mampu mengekstrak senyawa metabolit sekunder yang ada pada *Chlorella sp.* (Susanty, dkk., 2019).

Berdasarkan penelitian Rengga, dkk., (2019) dalam ekstraksi minyak mikroalga berbantu ultrasonik dengan pelarut n-heksana diperoleh rendemen sebesar 18,44%. Hadiyanto dan Suttrisnorhadi, (2016) melakukan ekstraksi ultrasonik dengan pelarut etanol dari mikroalga *Spirulina platensis* selama 42 menit dengan frekuensi 40 KHz didapat rendemen sebesar 15,7% dan EC<sub>50</sub> 85,78 ppm.

Hasil ekstraksi yang diduga memiliki senyawa metabolit sekunder dapat diperoleh melalui hidrolisis dan partisi (Fasya, dkk., 2016). Hidrolisis dilakukan dengan penambahan HCl untuk mempercepat reaksi pemutusan ikatan glikosida. Hasil hidrolisis di partisi dengan pelarut n-heksana. Penggunaan n-heksana pada saat partisi sebagai pelarut non polar akan dengan mudah mengekstraksi steroid karena memiliki sifat kepolaran yang sama serta menghasilkan ekstrak yang optimal dengan rendemen tinggi. Pemisahan senyawa steroid dapat dilakukan menggunakan KLT preparatif. Senyawa steroid pada KLT preparatif ditunjukkan dengan warna hijau kebiruan (Millati, 2016). Isolat hasil KLTP dipisahkan kembali dengan KLT dua dimensi untuk meningkatkan resolusi pemisahan.

Hasil pemisahan senyawa steroid dari KLTP akan diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH (*1,1-Diphenyl-2-Picryl Hydrazyl*). Metode ini memberikan serapan yang kuat pada panjang gelombang 517 nm dengan warna violet gelap serta memberikan informasi reaktivitas radikal bebas dari suatu senyawa yang diuji. Metode DPPH dipilih karena mudah dikerjakan, cepat, sederhana, sampel yang digunakan sedikit, hasil uji dapat digunakan sebagai acuan penelitian lanjutan dan terbukti akurat (Kesuma, 2015). Uji aktivitas antioksidan *Chlorella sp.* dengan metode DPPH telah dilakukan oleh Megawati, dkk., (2020) dan didapat nilai  $EC_{50}$  sebesar  $2,26 \times 10^{19}$  ppm (C1), 163,10 ppm (C4) dan 38,96 ppm (C5). Fasya, dkk., (2020) melakukan uji aktivitas antioksidan dari mikroalga *Chlorella sp.* diperoleh nilai  $EC_{50}$  sebesar 73,82 ppm untuk isolat KLT. Penentuan aktivitas antioksidan pada *Chlorella sp.* juga dilakukan oleh Bariyyah, dkk., (2013) pada ekstrak metanol menghasilkan  $EC_{50}$  18,610 ppm.

Penelitian sebelumnya telah melakukan uji aktivitas antioksidan isolat steroid dari mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan metode konvensional. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan ekstraksi menggunakan metode ultrasonik dilanjutkan dengan partisi menggunakan pelarut n-heksana. Pemisahan senyawa steroid dilakukan menggunakan KLT preparatif dan KLT dua dimensi. Selanjutnya dilakukan uji antioksidan dan identifikasi senyawa steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk membuktikan adanya senyawa aktif golongan steroid dari spektrum dan panjang gelombang maksimum.

### **1.2 Rumusan Masalah**

1. Bagaimana hasil identifikasi isolat steroid fraksi n-heksana hasil ekstraksi sonikasi pada mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan spektrofotometer UV-Vis?
2. Bagaimana aktivitas antioksidan isolat steroid fraksi n-heksana hasil ekstraksi sonikasi pada mikroalga *Chlorella sp.* terhadap DPPH?

### **1.3 Tujuan**

1. Untuk mengetahui hasil identifikasi isolat steroid fraksi n-heksana hasil ekstraksi sonikasi pada mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan spektrofotometer UV-Vis.
2. Untuk mengetahui aktivitas antioksidan isolat steroid fraksi n-heksana hasil ekstraksi sonikasi pada mikroalga *Chlorella sp.* terhadap DPPH.

#### 1.4 Batasan Masalah

1. Bahan yang digunakan berupa mikroalga *Chlorella sp.* yang diperoleh dari Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Mikroalga *Chlorella sp.* dikultivasi pada media ekstrak taube (MET) 4%.
3. Metode ekstraksi yang digunakan adalah sonikasi frekuensi 40 KHz dengan pelarut metanol.
4. Hidrolisis ekstrak metanol menggunakan HCl 2 N.
5. Partisi menggunakan pelarut *n*-heksana.
6. Pemisahan isolat steroid menggunakan KLT preparatif
7. Pemisahan isolat steroid menggunakan KLT dua dimensi
8. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH
9. Identifikasi senyawa steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis

#### 1.5 Manfaat Penelitian

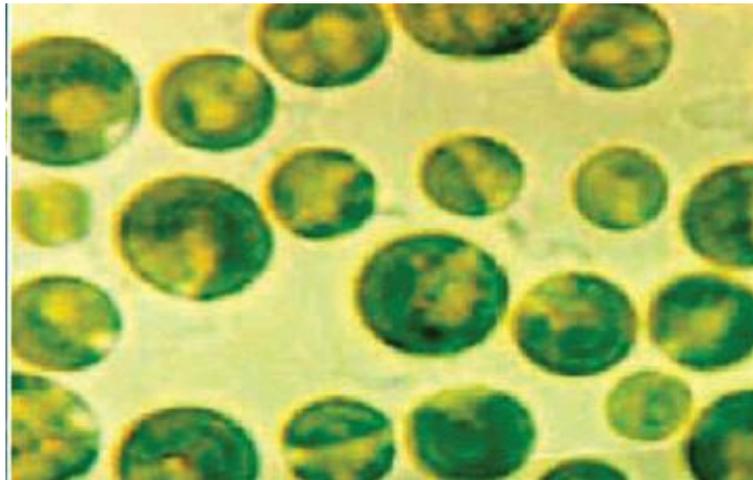
Diharapkan dari penelitian ini memberikan informasi ilmiah mengenai potensi dan pemanfaatan mikroalga *Chlorella sp.* sebagai antioksidan melalui ekstraksi dengan metode sonikasi serta mengetahui senyawa steroid yang terkandung di dalamnya. Penelitian ini diharapkan meningkatkan rendemen dan aktivitas antioksidan hasil ekstraksi sonikasi dibandingkan metode konvensional.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Mikroalga *Chlorella sp.*

Mikroalga merupakan tumbuhan tingkat rendah yang memiliki klorofil untuk melakukan fotosintesis (Rismiarti, dkk., 2016). Morfologi sel yang dimiliki mikroalga sangat bervariasi mulai dari uniseluler maupun multiseluler (koloni) dengan ukuran 1 mikrometer sampai ratusan mikrometer. *Chlorella sp.* merupakan salah satu jenis mikroalga bersel satu. Selnya berdiri sendiri berbentuk bulat atau bulat telur (lonjong) dengan diameter 3-8 mikron. *Chlorella sp.* memiliki kloroplas berbentuk seperti cawan dan dindingnya keras (Aprilliyanti, dkk., 2016). *Chlorella sp.* banyak tersebar diperairan dan merupakan salah satu dari sekian banyak mikroalga yang terdapat di dunia (Hadiyanto dan Azim, 2012).



Gambar 2.1 *Chlorella sp.* (Hadiyanto dan Azim, 2012)

Klasifikasi mikroalga *Chlorella sp.* sebagai berikut (Barsanti dan Paolo, 2014):

Divisi	: Chlorophyta
Kelas	: Chlorophyceae
Ordo	: Clorococcales
Familia	: Oocystaceae
Genus	: Chlorella
Spesise	: <i>Chlorella sp.</i>

*Chlorella sp.* merupakan mikroalga yang termasuk dalam kelas alga hijau atau *Chlorophyceae* yaitu mikroalga yang belum memiliki akar, batang, dan daun sejati, tetapi telah memiliki pigmen klorofil sehingga bersifat fotoautotrof (Kawaroe, 2010). *Chlorella sp.* memiliki kandungan gizi dan komponen kesehatan diantaranya karbohidrat 16,7%, lemak 11,6%, protein 59,8%, serat 1,5%, air 3,6%, kalori 421%, klorofil 2,8%, abu 4,6% dan lainnya terdiri atas Ca, P, Fe, karoten, asam askorbat, thiamin, riboflavin, niasin, asam panthotenat, asam folat, dan biotin. *Chlorella sp.* juga memiliki kandungan vitamin di dalamnya seperti vitamin A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, E dan K (Wirosaputro dan Sumarlina, 2018).

Pemanfaatan *Chlorella sp.* dapat dilakukan menggunakan teknik kultur. Kultivasi *Chlorella sp.* dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor eksternal. Faktor-faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi laju pertumbuhan *Chlorella sp.* terbagi atas faktor fisika dan faktor kimia (Dyuniari, dkk., 2019). Cahaya merupakan salah satu faktor fisika yang berperan sebagai sumber energi untuk menjalankan proses fotosintesis.

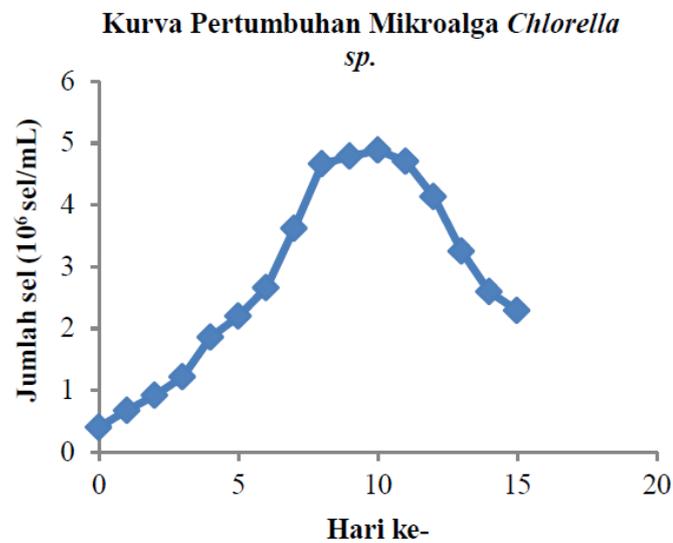
Intensitas cahaya yang optimal bagi pertumbuhan *Chlorella sp.* berkisar antara 3000-5000 *lux* menggunakan lampu TL 40 watt (Satriaji, dkk., 2016). Faktor kimia yang tak kalah penting dalam mempengaruhi pertumbuhan *Chlorella sp.*

adalah nutrien. *Chlorella sp.* dapat tumbuh pada media yang mengandung cukup unsur hara. Unsur hara yang diperlukan *Chlorella sp.* dalam jumlah besar diantaranya C, N, P, S, Na, Mg dan Ca (Mufidah, dkk., 2017). Media yang umum digunakan untuk kultur *Chlorella sp.* adalah Medium Ekstrak Tauge (MET). Penggunaan ekstrak tauge sebagai media kultur jaringan karena mengandung nutrien organik seperti karbohidrat, vitamin, unsur hara dan zat pengatur tumbuh auksin. Auksin bekerja sebagai stimulan dalam memperlancar metabolisme sehingga dapat meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Rupina, dkk., 2015).

Kandungan vitamin yang terdapat dalam tauge adalah vitamin A, C, E, K, folat, kolin, thiamin, riboflavin, dan niasin. Beberapa mineral yang terkandung dalam tauge kacang hijau diantaranya Mg, Mn, Fe, Na, K, Ca, P, Se, Cu dan Zn (Dianita, dkk., 2020). Penggunaan Medium Ekstrak Tauge (MET) mampu menghasilkan pertumbuhan mikroalga dengan sangat cepat dibandingkan dengan medium lainnya seperti Medium Guillard (MG), Medium Air Laut (MAL) dan Medium AF6 (Imelda, dkk., 2018).

Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan MET dengan konsentrasi 4%. Hal ini didasarkan pada penelitian Prihantini, dkk., (2007) dalam percobaannya untuk mengetahui pengaruh beberapa konsentrasi MET terhadap kerapatan sel mikroalga marga *Scenedesmus*. Konsentrasi dibuat dengan variasi mulai 1, 2, 3, 4, 5, dan 6%. Hasil yang diperoleh menunjukkan konsentrasi terbaik bagi kerapatan sel mikroalga terdapat pada MET 4% yaitu 3.981.071 sel/ml selama 10 hari pengamatan. Hal ini dimungkinkan kelengkapan komposisi nutrien dan konsentrasi yang terlarut dalam MET 4% sesuai dengan kebutuhan sel *Scenedesmus* sehingga

dapat tumbuh dengan baik. Hadiyanto dan Azim, (2012) menjelaskan fase pertumbuhan mikroalga terjadi melalui empat fase yaitu fase adaptasi, fase eksponensial (fase log), fase stasioner dan fase kematian.



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

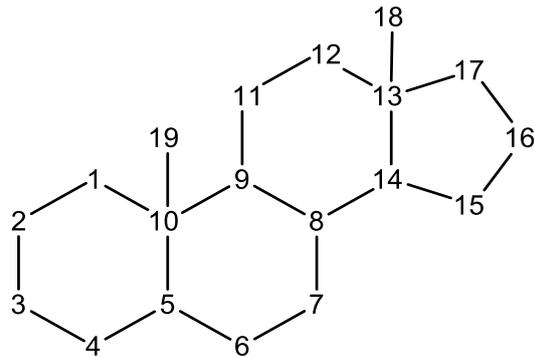
Berdasarkan Gambar 2.2 fase eksponensial dimulai pada hari ke-0 sampai hari ke-8. Fase ini ditandai dengan meningkatnya jumlah sel mikroalga *Chlorella* sp.. Pada hari ke-4 terjadi fase  $\frac{1}{2}$  eksponensial dengan kelimpahan sel 1.856.000 sel/ml dan pada hari ke-6 terjadi fase  $\frac{3}{4}$  eksponensial dengan kelimpahan sel 2.656.000 sel/ml. Hari ke-8 merupakan fase awal stasioner karena jumlah sel nya tidak mengalami peningkatan yang signifikan dengan kelimpahan sel 4.656.000 sel/ml. Hari ke-10 merupakan fase stasioner dengan kelimpahan sel 4.880.000 sel/ml. Kelimpahan sel pada hari ke-11 yaitu 4.704.000 sel/ml sehingga pada hari ke-11 merupakan fase akhir stasioner atau awal fase kematian. Kelimpahan sel pada fase ini cenderung menurun karena ketersediaan nutrien yang berkurang. Hari ke-

12 sampai hari ke-15 kelimpahan sel mengalami penurunan yang signifikan sehingga fase ini disebut fase kematian.

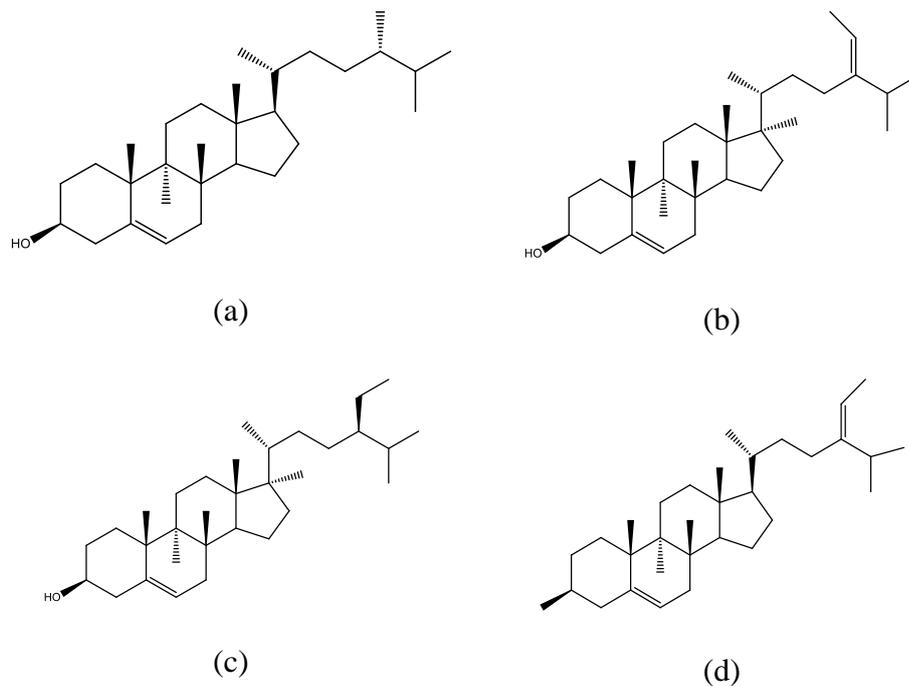
*Chlorella sp.* memiliki metabolit sekunder yang cukup banyak. Menurut Fithriani, dkk., (2015) dalam penelitiannya menyatakan pada uji fitokimia mikroalga *Chlorella sp.* ekstrak metanol mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu senyawa tanin, flavonoid, steroid, glikosida, alkaloid dan saponin. Pernyataan lain juga didukung oleh penelitian Jati, dkk., (2019) hasil skrining fitokimia pada mikroalga *Nannochloropsis oculata* menunjukkan adanya reaksi positif pada golongan steroid dan flavonoid.

## 2.2 Steroid

Steroid adalah senyawa organik lemak sterol tidak terhidrolisis yang dapat dihasilkan melalui reaksi pemurnian dari terpena atau skualena. Molekul bioaktif steroid memiliki kerangka dasar 17 atom C yang tersusun dari 4 buah gabungan cincin. Senyawa steroid termasuk dalam golongan triterpenoid karena mengandung inti siklopentana perhidrofenantren yang terdiri dari tiga cincin sikloheksana dan satu cincin siklopentana. Perbedaan jenis steroid yang satu dengan steroid yang lain terletak pada gugus fungsional yang diikat oleh keempat cincin dan tahap oksidasi tiap-tiap cincin (Heliawati, 2018). Steroid bersifat nonpolar karena tersusun dari isopren-isopren rantai panjang hidrokarbon (Robinson, 1995).



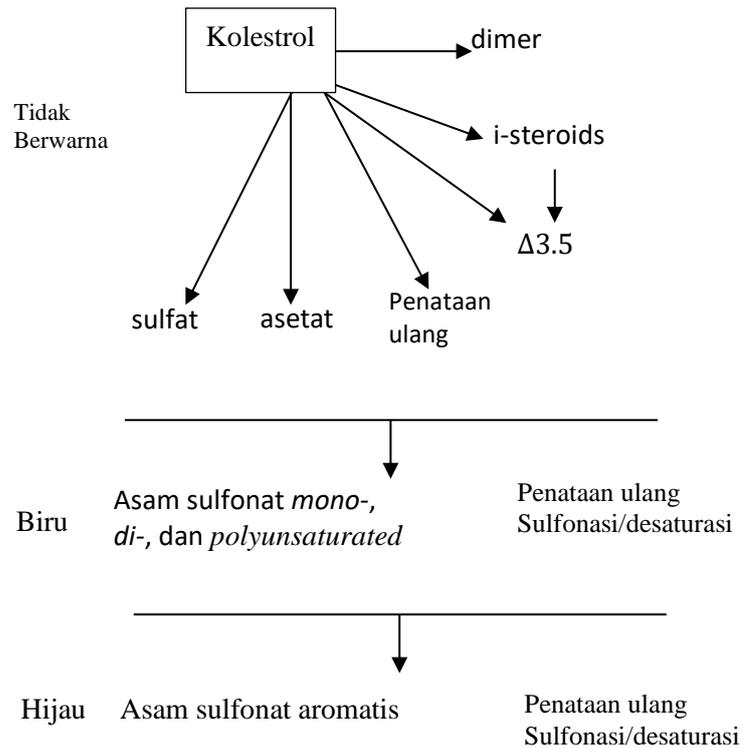
Gambar 2.3 Kerangka dasar senyawa steroid (Heliawati, 2018)



Gambar 2.4 Struktur steroid pada tumbuhan (a) Kampesterol, (b) Fukosterol, (c)  $\beta$ -sitosterol, (d)  $\Delta^5$ -Avenasterol (Luo, dkk., 2015)

Jenis steroid yang terdapat pada hampir semua tanaman dan banyak ditemukan pada mikroalga adalah fitosterol. Struktur fitosterol terdiri dari triterpena yang mirip dengan kolesterol pada hewan. Walaupun dikatakan mirip, namun keduanya tetap memiliki perbedaan yang terletak pada sisi samping kerangkanya. Keberadaan fitosterol dapat menurunkan kadar kolesterol dalam tubuh manusia

karena mampu berkompetisi dalam penyerapan oleh sistem pencernaan (Jati, dkk., 2019).



Gambar 2.5 Diagram reaksi LB dengan kolesterol (Xiong, dkk., 2007)

Xiong, dkk., (2007) menjelaskan bahwa reagen LB terdiri dari campuran asam sulfat dan asam asetat anhidrat dalam pelarut kloroform yang akan mengubah kolesterol menjadi turunan asetat dan sulfatnya sebagai produk mayor melalui proses asetilasi dan sulfonasi. Selain itu, dihasilkan produk minor berupa i-steroid, kolesta-3-5-diena dan senyawa tak jenuh lainnya. Produk-produk tersebut akan mengalami penataan ulang sulfonasi dan desaturasi membentuk senyawa *mono-, di-, dan polyunsaturated sulfonic acid*. Senyawa poliena secara bertahap akan membentuk senyawa steroid aromatik melalui penataan ulang sulfonasi dan

desaturasi. Adapun respon warna yang dihasilkan tergantung pada kinetika laju reaksi antara steroid dengan reagen LB.

Senyawa steroid dapat dideteksi melalui reaksi Liebermann-Buchard (LB). Berdasarkan penelitian Safitri (2016) dan Maghfiroh (2019) uji skrining fitokimia untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dalam sampel mikroalga *Chlorella sp.* menunjukkan positif mengandung steroid setelah di reaksikan dengan Liebermann-Buchard.

### **2.3 Isolasi Senyawa Steroid**

Isolasi senyawa steroid dapat dilakukan dengan metode ekstraksi. Ekstraksi merupakan proses pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan sifat tertentu, terutama kelarutannya terhadap dua cairan tidak saling larut yang berbeda. Ekstraksi bertujuan untuk memisahkan senyawa aktif yang terdapat pada bahan alam. Prinsip dasar ekstraksi yaitu senyawa yang akan diekstrak hanya dapat larut dalam pelarut yang digunakan, sedangkan zat yang lainnya tidak akan larut. Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian adalah metode ekstraksi dengan bantuan ultrasonik.

*Ultrasonic-assisted extraction* (UAE) merupakan metode maserasi yang dimodifikasi dengan menggunakan bantuan *ultrasound* (sinyal dengan frekuensi tinggi, di atas 20 KHz) (Mathialagan, dkk., 2017). Wadah yang berisi serbuk sampel ditempatkan dalam wadah *ultrasonic* dan *ultrasound*. Hal ini dilakukan untuk memberikan tekanan mekanik pada sampel. Kerusakan sel dapat menyebabkan peningkatan kelarutan dalam pelarut dan meningkatkan hasil ekstraksi. Prinsip ekstraksi ultrasonik yaitu mengamati sifat akustik gelombang ultrasonik yang

dirambatkan melalui medium yang dilewati. Pada saat gelombang merambat, medium yang dilewatinya akan mengalami getaran. Getaran tersebut akan memberikan pengadukan yang intensif terhadap proses ekstraksi. Pengadukan berfungsi untuk meningkatkan osmosis antara bahan dengan pelarut sehingga proses ekstraksi berjalan optimal (Keil, 2007).

Ekstraksi berbantu gelombang ultrasonik memiliki beberapa keunggulan diantaranya pelarut yang digunakan sedikit, ramah lingkungan, suhu dan energi rendah serta menghasilkan *yield* produk yang lebih banyak (Wen, dkk., 2018). Proses ekstraksi senyawa organik dengan gelombang ultrasonik pada tanaman dan biji-bijian menggunakan pelarut organik dapat berlangsung lebih cepat. Hal ini disebabkan dinding sel dari bahan dipecah dengan getaran ultrasonik sehingga kandungan yang ada di dalamnya dapat keluar dengan mudah (Mason, 1990).

Pelarut yang digunakan pada penelitian yaitu pelarut polar berupa metanol. Metanol sering digunakan karena mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder dengan jumlah banyak akibat penetrasi pelarut ke dalam dinding sel yang lebih efisien. (Firdayani, dkk., 2015) dalam penelitiannya mengungkapkan bahwa dalam memperoleh senyawa aktif suatu sampel, pelarut memiliki kemampuan yang berbeda-beda. Metanol termasuk dalam pelarut polar yang mampu memberikan rendemen dengan jumlah tinggi karena kemampuannya untuk mengekstrak senyawa kisaran senyawa polar hingga semi polar.

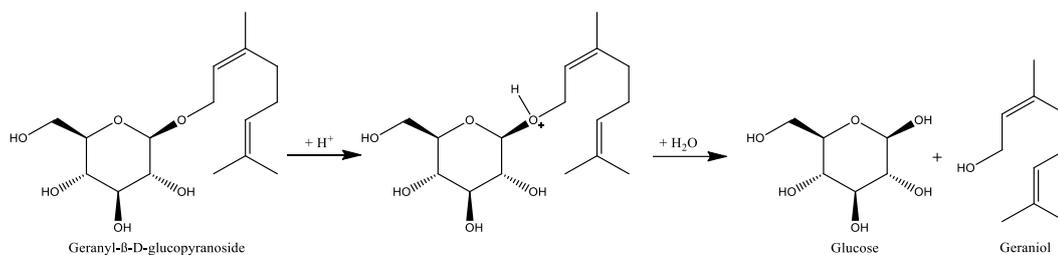
Amin, dkk., (2018) dalam penelitiannya menyatakan bahwa ekstraksi ultrasonik dengan pelarut metanol menunjukkan respon yang tinggi jika dibandingkan dengan pelarut aseton dan etanol dalam mengekstraksi klorofil pada mikroalga *Chlorella sp.*. Hal ini dibuktikan dengan perolehan rendemen sebesar

17,19  $\mu\text{g/ml}$  pada ekstraksi klorofil mikroalga *Chlorella sp.*. Diperkuat dengan penelitian Kulsum, dkk., (2017) dalam ekstraksi biodiesel dari mikroalga *Nannochloropsis occulata* berbantu ultrasonik selama 30 menit menggunakan pelarut metanol menunjukkan rendemen sebesar 30,3 %.

## 2.4 Hidrolisis dan Partisi

Glikosida merupakan senyawa yang terbentuk atas gabungan dari bagian gula (glikon) yang sifatnya polar dan bagian bukan gula (aglikon) yang bersifat polar, nonpolar maupun semipolar. Senyawa metabolit sekunder termasuk dalam golongan senyawa aglikon. Untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder maka dilakukan pemutusan ikatan glikosida yang dikenal dengan reaksi hidrolisis. Hidrolisis merupakan suatu reaksi antara air dengan suatu senyawa agar senyawa tersebut dapat terurai atau pecah. Penggunaan air dalam reaksi hidrolisis berjalan sangat lambat sehingga diperlukan katalisator untuk mempercepat reaksi (Saifudin, dkk., 2006).

Katalis asam yang sering digunakan adalah asam klorida (HCl). Konsentrasi asam yang digunakan dapat bervariasi mulai dari sangat pekat sampai dengan sangat encer. Asam kuat dipilih karena kemampuannya yang mudah melepas proton ( $\text{H}^+$ ) dalam air secara sempurna, sedangkan asam lemah lebih sukar melepas proton ( $\text{H}^+$ ). Kecepatan reaksi hidrolisis dipengaruhi oleh keberadaan ion  $\text{H}^+$  dalam larutan. Semakin besar jumlah ion  $\text{H}^+$ , maka kecepatan reaksi semakin meningkat dan memberikan produk hidrolisa yang semakin besar (Handoko 2006).



Gambar 2.6 Dugaan reaksi hidrolisis geranyl-β-D-glucopyranoside (Ferreira dan Lopez, 2019)

Konsentrasi HCl yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2 N. Hal ini didasarkan pada penelitian Artati, dkk., (2012) bahwa konsentrasi asam kuat yang paling optimum untuk hidrolisis adalah 2 N. Konsentrasi 2 N pada HCl memiliki konstanta 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 (0,0059/menit). Penggunaan HCl dibandingkan dengan  $H_2SO_4$  karena HCl memerlukan sedikit alkali hidroksida untuk proses netralisasi pada reaksi akhir.

Hasil hidrolisis kemudian dipartisi untuk memisahkan golongan kandungan senyawa yang satu dengan golongan yang lainnya dari suatu ekstrak. Prosedur pemisahan dengan partisi ini didasarkan pada perbedaan kepolaran kandungan senyawanya (Khopkar, 2008). Anggraeni, dkk., (2014) melakukan partisi secara bertingkat dengan pelarut n-heksana, petroleum eter, kloroform, etil asetat dan air pada ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.*. Rendemen yang diperoleh secara berturut-turut yaitu 45,6132%; 8,1854%; 7,5573%, 7,4377%; dan 10,0897%. Fasya, dkk., (2020) melakukan partisi menggunakan n-heksana pada sampel *Hydrilla verticillata* diperoleh rendemen sebesar 47,95%.

## 2.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP

Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan berdasarkan perbedaan distribusi molekul antara dua fase dengan kepolaran yang berbeda. Senyawa polar akan lebih terdistribusi pada fase diam dibandingkan pada fase geraknya sehingga nilai Rf yang dihasilkan kecil. Kromatografi Lapis Tipis bertujuan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang bersifat hidrofob seperti lipida-lipida dan hidrokarbon (Watson dan David, 2009). Metode KLT dapat dihitung dengan mencari nilai *Retention factor*. Harga Rf dari senyawa-senyawa yang susunannya hampir sama memberikan nilai Rf yang berdekatan satu sama lain (Sastrohamidjojo, 2002).

Bercak hasil pemisahan dapat dideteksi dengan beberapa cara. Untuk senyawa tak berwarna dapat dilakukan pengamatan dengan sinar ultraviolet. Beberapa senyawa organik bersinar atau berfluorosensi jika disinari dengan sinar ultraviolet gelombang pendek (254 nm) atau gelombang panjang (366 nm). Jika dengan cara itu senyawa tidak dapat dideteksi maka harus dicoba disemprot dengan pereaksi yang membuat bercak tersebut tampak yaitu pertama tanpa pemanasan, kemudian bila perlu dengan pemanasan (Gandjar dan Rohman, 2007).

Eluen yang digunakan dalam penelitian ini adalah n-heksana:etil asetat (4:1). Hal ini didasarkan pada penelitian Fasya, dkk., (2020) untuk mengetahui eluen terbaik dalam pemisahan senyawa steroid dari *Hydrilla verticillata*. Variasi eluen yang digunakan terdiri dari campuran n-heksana dan etil asetat.

### 2.1 Variasi eluen campuran n-heksana dan etil asetat (Fasya, dkk., 2020)

<b>Eluen</b>	<b>Perbandingan n-heksana:etil asetat</b>	<b>Jumlah Noda</b>
1	4,75:0,25	4
2	4,50:0,50	4
3	4,26:0,75	9
4	4,00:1,00	12
5	3,75:1,25	12

Hasil yang diperoleh menunjukkan variasi eluen 4,00:1,00 memiliki pemisahan noda yang diduga steroid lebih bagus dibandingkan dengan variasi eluen lainnya. Hal ini disebabkan perolehan jarak yang jelas antara senyawa yang diduga steroid dengan senyawa yang diduga triterpenoid. Senyawa yang diduga steroid ditandai dengan warna hijau pada plat KLT dengan Rf 0,725. Fasya, dkk., (2020) melakukan pemisahan senyawa steroid ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* dengan KLT menggunakan eluen n-heksana dan etil asetat (4:1) menghasilkan 15 noda. Senyawa yang diduga steroid terdapat pada noda ke-12 dengan warna hijau kebiruan dan Rf sebesar 0,7514.

### 2.6 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Dua Dimensi

KLT dua dimensi atau biasa disebut KLT dua arah merupakan salah satu metode untuk mengidentifikasi senyawa dalam sampel multikomponen. Tujuan KLT dua dimensi yaitu untuk meningkatkan pemisahan suatu sampel yang memiliki komponen dengan karakteristik kimia dan nilai Rf yang hampir sama. Penggunaan dua sistem fase gerak yang berbeda akan mempunyai tingkat polaritas yang berbeda pula dalam memisahkan suatu analit (Gandjar dan Rohman, 2007). Hidayah, dkk., (2016) melakukan pemisahan senyawa steroid pada sampel daun getih-getih menggunakan KLT dua dimensi. Hasil yang diperoleh terdapat satu

noda tunggal yang diduga isolat steroid. Isolat yang dihasilkan berbentuk kristal kecil-kecil berwarna putih.

Metode Kromatografi Lapis Tipis dua dimensi memiliki beberapa keuntungan diantaranya merupakan salah satu metode yang sederhana karena tidak memerlukan peralatan yang rumit. Lempeng yang digunakan sekali pakai sehingga tidak memerlukan langkah yang sulit dalam membersihkan sampel uji. Metode KLT dua dimensi mampu menganalisis senyawa campuran serta hasil pemisahannya mudah dilihat (Ciesla dan Waksmundzka, 2009).

## **2.7 Uji Antioksidan**

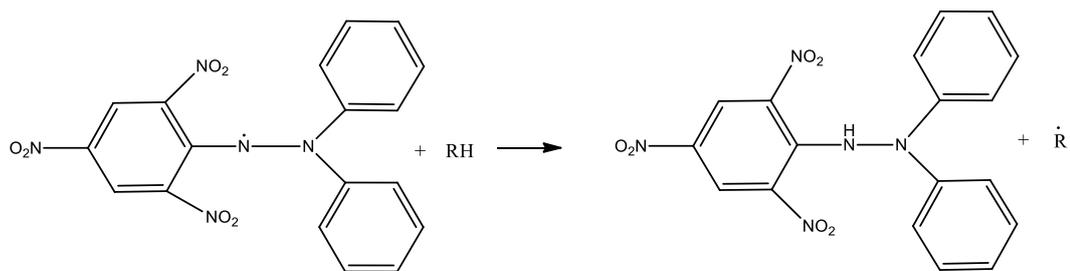
Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (donor elektron) yang mampu menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Winarsi, 2007). Antioksidan mampu menetralkan radikal bebas tanpa menjadi radikal bebas itu sendiri. Ketika antioksidan menetralkan radikal bebas dengan menerima atau mendonor elektron, mereka tidak akan berubah menjadi radikal bebas dan tetap stabil (Fatima, dkk., 2016).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan memiliki dua fungsi. Pertama, antioksidan berperan sebagai pemberi atom hidrogen atau biasa disebut antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida ( $R'$ ,  $ROO'$ ) atau mengubahnya ke dalam bentuk yang lebih stabil. Hasil reaksi radikal antioksidan tersebut keadaannya lebih stabil dibandingkan dengan radikal lipid. Kedua, antioksidan berfungsi sebagai antioksidan sekunder, artinya dapat memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme diluar

mekanisme pemutusan rantai autooksidasi dengan pengubahan radikal lipida ke bentuk yang lebih stabil (Gordon, 1990).

Antioksidan banyak ditemukan pada buah-buahan, sayuran dan tanaman obat. Senyawa-senyawa yang terkandung dalam antioksidan berbahan alami berupa flavonoid, fenol, polifenol, turunan asam sinamat, tokoferol dan asam organik polifungsi (Pratt dan Hudson, 1990). Untuk mendapatkan senyawa tersebut perlu dilakukan uji antioksidan. Salah satu metode yang sering digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan adalah menggunakan metode 1,1-difenil-2-piridridhidrazil (DPPH). Metode DPPH dipilih karena pengukuran antioksidan yang sederhana, mudah, sampel yang digunakan sedikit dengan waktu yang singkat.

Reaksi antara DPPH dengan antioksidan akan membentuk 1,1-difenil-2-piridridhidrazil yang sifatnya non radikal. Mekanisme penangkapan radikal DPPH oleh antioksidan yaitu dengan donasi proton kepada radikal. Ketika radikal DPPH bereaksi dengan suatu senyawa antioksidan yang dapat mendonorkan radikal hidrogen, radikal DPPH akan terus terinduksi membentuk DPPH-H. Terjadi perubahan warna dari ungu menjadi kuning ketika elektron radikal bebas DPPH berpasangan dengan sebuah hidrogen dari penangkap radikal bebas atau antioksidan. Perubahan warna yang semakin memudar ditunjukkan dengan adanya penurunan serapan dari DPPH pada panjang gelombang optimumnya yang diukur menggunakan spektrofotometer UV Vis dengan panjang gelombang sekitar 515-517 nm (Pokorni, 2001).



Gambar 2.7 Reaksi antara antioksidan dengan DPPH (Yuhernita dan Juniarti, 2011)

Aktivitas penangkapan radikal bebas dapat dinyatakan dalam satuan persen (%) aktivitas antioksidan. Nilai 0 % artinya sampel tidak memiliki aktivitas antioksidan. Nilai dengan persentase lebih atau sama dengan 50% dikatakan aktif sebagai antioksidan sedangkan nilai 100 % artinya uji aktivitas antioksidan perlu dilanjutkan dengan pengenceran sampel untuk mengetahui batas konsentrasi aktivitasnya. Aktivitas antioksidan dari suatu senyawa dapat digolongkan berdasarkan nilai *Effective Concentration* ( $EC_{50}$ ). Nilai  $EC_{50}$  merupakan konsentrasi efektif sampel yang dibutuhkan untuk meredam 50% dari total DPPH.

## 2.2 Ketentuan kekuatan antioksidan (Molyneux, 2004)

<b>Intensitas</b>	<b><math>EC_{50}</math> (ppm)</b>
Sangat kuat	< 50
Kuat	50-100
Sedang	100-150
Lemah	150-200
Sangat lemah	>200

Uji aktivitas antioksidan *Chlorella sp.* telah dilakukan oleh Anggraeni, dkk., (2014) dari fraksi etil asetat, kloroform, n-heksana, air dan ekstrak metanol didapat nilai  $EC_{50}$  berturut-turut 332; 182; 27,26; 173,7; 1.411; dan 1.334 ppm. Agustina,

dkk., (2018) dalam penelitiannya uji aktivitas antioksidan dari mikroalga *Spirulina sp.* menghasilkan kandungan antioksidan sebesar 452,87  $\mu\text{M}$  dengan aktivitas antioksidan sebesar 70,27%. Rosahdi, dkk., (2015) melakukan uji aktivitas antioksidan biopigmen pada fraksi aseton dari mikroalga *Chlorella vulgaris* menunjukkan nilai  $\text{IC}_{50}$  dari fraksi aseton sebesar 57,25 ppm. Hasil ini menunjukkan bahwa untuk meredam radikal bebas sebesar 50% membutuhkan konsentrasi antioksidan sebesar 57,25 ppm. Aktivitas antioksidan hasil penelitian Novianti, dkk., (2019) ekstrak mikroalga *Chlorella vulgaris* menghasilkan aktivitas antioksidan dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  38,90 ppm (antioksidan sangat kuat) dan memiliki komponen biokatif alkaloid, steroid, saponin, flavonoid dan kuinon.

## **2.8 Identifikasi Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis**

Spektrofotometri UV-Vis merupakan salah satu teknik analisis spektroskopi yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm) dengan memakai instrumen spektrofotometer. Spektrofotometri UV-Vis melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometri UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif daripada analisis kualitatif (Mulja dan Suharman, 1995).

Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis yaitu interaksi antara sinar tampak atau sinar ultraviolet dengan molekul sampel. Apabila cahaya monokromatik melewati suatu larutan, maka sebagian cahaya tersebut ada yang diserap, dipancarkan dan dipantulkan. Energi cahaya akan menyebabkan elektron terluar molekul tereksitasi ke orbital yang lebih tinggi. Kondisi tersebut menyebabkan

elektron tidak stabil sehingga kembali ke tingkat dasar untuk melepas energi yang disertai dengan emisi cahaya (Underwood dan Day, 1980).

Interaksi sinar ultraviolet menghasilkan transisi elektronik dari elektron-elektron ikatan, baik ikatan sigma ( $\sigma$ ) dan pi ( $\pi$ ) maupun elektron non ikatan (n) yang ada dalam molekul organik. Ada empat macam tipe transisi elektronik, yaitu  $\sigma\text{-}\sigma^*$  (senyawa alkana),  $\pi\text{-}\pi^*$  (senyawa alkena, alkuna, karbonil),  $n\text{-}\sigma^*$  (halogen, sulfur, oksigen, nitrogen),  $n\text{-}\sigma^*$  (senyawa karbonil) (Panji, 2012). Berdasarkan penelitian Megawati, dkk., (2020) identifikasi senyawa steroid pada mikroalga *Chlorella sp.* hasil KLT menunjukkan tiga puncak dengan panjang gelombang 250,5; 270,5 dan 281 nm. Selain itu, Fasya, (2016) mengidentifikasi senyawa steroid pada *Chlorella sp.* memiliki panjang gelombang maksimum 204 nm pada isolat KLTP fraksi etil asetat dan 276 nm pada fraksi pertoleum eter.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei-Juli 2021 di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Instrumen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

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

##### **3.2.1 Alat**

Alat- alat yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, ultrasonik frekuensi 40 KHz, neraca analitik, corong pisah, *shaker*, *rotary evaporator vacuum*, plat KLT, kolom, bejana pengembang, *sentrifuge*, dan spektrofotometer UV-Vis.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat *Chlorella sp.*, taugé (kacang hijau) sebagai bahan Medium Ekstrak Taugé (MET), sedangkan bahan kimia yang digunakan adalah akuades, *n*-heksana *p.a*, metanol *p.a*, HCl 2N, kloroform, benzena, asam sulfat pekat, etanol 95%, natrium bikarbonat, silika gel, asam asetat anhidrat dan DPPH.

### 3.3 Tahapan Penelitian

1. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dengan MET
2. Pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella sp.*
3. Penentuan kadar air mikroalga *Chlorella sp.*
4. Ekstraksi sonikasi mikroalga *Chlorella sp.* dengan pelarut metanol
5. Hidrolisis dan partisi ekstrak pekat metanol mikroalga *Chlorella sp.*
6. Uji fitokimia senyawa steroid fraksi n-heksana
7. Pemisahan senyawa steroid dengan KLTP
8. Pemisahan senyawa steroid dengan KLT dua dimensi
9. Identifikasi senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan Spektrofotometer UV-Vis
10. Uji aktivitas antioksidan terhadap DPPH

### 3.4 Cara Kerja

#### 3.4.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.* dengan MET

Pembuatan Media Ekstrak Tauge 4 % diawali dengan menimbang 100 gram tauge direbus dalam akuades 500 mL selama 1 jam hingga volume tersisa 200 mL. Diambil 36 mL ekstrak tauge kemudian dilarutkan dengan 864 ml akuades dalam erlenmeyer 1000 mL sehingga didapat MET dengan konsentrasi 4 %. Isolat *Chlorella sp.* sebanyak 150 mL diinokulasi ke dalam masing masing 900 mL Media Ekstrak Tauge 4 % dalam erlenmeyer. Kultivasi dilakukan pada suhu ruang antara suhu 25-27°C diletakkan pada rak yang sudah disiapkan pencahayaan berupa lampu TL 36 watt intensitas cahaya yang diperoleh sebesar 1000-4000 *lux*. Kultivasi akan

melalui inkubasi selama 10 hari dengan waktu terang 14 jam dan waktu gelap 10 jam (Prihantini, dkk., 2007).

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

Pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan pada hari ke-10 setelah kultivasi dengan cara media kultur *Chlorella sp.* disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Biomassa *Chlorella sp.* yang telah disentrifugasi dipisahkan dari cairannya kemudian ditimbang dan dicatat sebagai berat basah. Sampel biomassa *Chlorella sp.* dikeringkan dengan suhu 25-30 °C selama 48 jam. Hasil dari pengeringan dicatat sebagai berat kering mikroalga *Chlorella sp.*

### 3.4.3 Penentuan kadar air mikroalga *Chlorella sp.*

Analisis kadar air dilakukan pada sampel kering mikroalga *Chlorella sp.* dengan cara sampel ditimbang sebanyak 0,5 g, dimasukkan dalam cawan yang sebelumnya telah dihitung berat konstannya, kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 100-105°C selama 1 jam. Selanjutnya sampel didinginkan dalam desikator, ditimbang, kemudian dioven kembali. Perlakuan ini diulangi sampai diperoleh berat konstan. Kadar air sampel biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dihitung menggunakan rumus berikut (AOAC, 1984):

$$\text{Kadar air} = \frac{b-c}{b-a} \times 100 \% \dots\dots\dots(3.1)$$

Keterangan

a = bobot cawan kosong

b = bobot sampel + cawan sebelum dipanaskan

c = bobot cawan + sampel setelah dipanaskan

#### 3.4.4 Ekstraksi Sonikasi Mikroalga *Chlorella sp.*

Biomassa *Chlorella sp.* kering ditimbang sebanyak 6 gram diletakkan pada erlenmeyer 50 mL. Ditambahkan pelarut metanol sebanyak 36 mL. Erlenmeyer berisi larutan Biomassa *Chlorella sp.* diekstraksi dengan gelombang ultrasonik pada frekuensi 40 KHz selama 42 menit (Hadiyanto dan Sutrisnorhadi, 2016). Hasil dari ekstraksi disaring menggunakan corong *buchner* dan didapatkan filtrat hasil ekstraksi. Residu yang didapatkan diekstraksi kembali hingga 3 kali pengulangan. Filtrat ekstrak *Chlorella sp.* yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* lalu ditimbang dan dihitung rendemennya dengan persamaan 3.2:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstraksi kasar yang diperoleh}}{\text{Berat sampel yang digunakan}} \times 100\% \dots \dots \dots (3.2)$$

#### 3.4.5 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstrak pekat metanol sebanyak 0,821 gram dimasukkan ke dalam beaker glass, kemudian dihidrolisis menggunakan 8 mL HCl 2 N dan distirrer dengan *magnetic stirrer hot plate* selama 1 jam pada suhu ruang. Hidrolisat yang diperoleh ditambahkan dengan natrium bikarbonat hingga pH netral. Setelah netral dipartisi dengan pelarut n-heksana sebanyak 40 mL kemudian dihomogenkan dan didiamkan sampai terbentuk dua lapisan yaitu lapisan organik (atas) dan lapisan air (bawah). Masing-masing lapisan yang terbentuk dipisahkan. Proses partisi dilakukan sebanyak 5 kali. Lapisan organik diletakkan di dalam beaker glass dan diuapkan pelarutnya. Ekstrak yang sudah pekat dihitung dan ditimbang rendemennya menggunakan persamaan 3.2.

### 3.4.6 Uji Fitokimia Senyawa Steroid Fraksi N-Heksana

Sebanyak  $\pm 1$  mg isolat hasil partisi *Chlorella sp.* dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian dilarutkan dengan kloroform sebanyak 0,5 mL dan ditambahkan asam asetat anhidrat 0,5 mL. Selanjutnya ditambahkan 10 tetes  $H_2SO_4$  melalui dinding tabung reaksi. Senyawa steroid dapat ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau.

### 3.4.7 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP

Pemisahan senyawa steroid dilakukan pada ekstrak hasil partisi fraksi n-Heksana menggunakan KLTP. Pemisahan dengan KLTP menggunakan plat silika  $G_{60}F_{254}$  berukuran  $20 \times 10$  cm<sup>2</sup> yang telah diaktivasi dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100 °C selama 30 menit. Pemisahan senyawa steroid dilakukan dengan cara ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* ditotolkan pada jarak  $\pm 1$  cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler sebanyak 7 kali total yang diselingi dengan pengeringan. Kemudian dielusi menggunakan eluen n-heksan : etil asetat (4 :1). Noda atau bercak hasil pemisahan selanjutnya diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm (Desianti, dkk., 2014).

Noda yang diduga golongan senyawa steroid dikerok lalu dilarutkan dalam n-heksana dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit untuk mengendapkan silikanya. Supernatan yang diperoleh dipisahkan sehingga diperoleh ekstrak pekat berdasarkan harga Rf dari senyawa steroid. Berikut persamaan untuk mencari nilai *Retention factor*:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh eluen}} \dots\dots\dots(3.3)$$

### 3.4.8 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT Dua Dimensi

Isolat steroid hasil KLT preparatif dilakukan pemisahan kembali dengan KLT dua dimensi. Pemisahan dengan KLT dua dimensi menggunakan plat silika G<sub>60</sub>F<sub>254</sub> berukuran 10x10 cm. Isolat pekat ditotolkan pada plat dengan jarak 1 cm dari tepi bawah dan 1 cm dari tepi kiri plat. Dielusi dengan fase gerak pertama yaitu n-heksana:etil asetat (4:1) sehingga campuran terpisah berdasarkan jalur yang sejajar dengan salah satu sisi. Plat silika diangkat lalu dikeringkan selama 5-10 menit. Noda yang terbentuk diamati di bawah sinar UV dengan Panjang gelombang 366 nm. Plat di putar 90° dan diletakkan dalam bejana kromatografi yang berisi fase gerak kedua yaitu benzena:etil asetat (3:2) sehingga yang terpisah pada pengembangan pertama terletak di bagian bawah sepanjang lempeng. Amati kembali noda yang terbentuk di bawah sinar UV dengan panjang gelombang 366.

### 3.4.9 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Sampel murni yang diperoleh dari pemisahan dan pemurnian secara kromatografi kemudian dilarutkan dengan pelarut etanol hingga 9 mL. Selanjutnya dimasukkan ke dalam kuvet hingga sepertiganya dan dianalisis pada panjang rentang gelombang 200-800 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis, sehingga akan diperoleh spektrum dan panjang gelombang maksimum.

### 3.4.10 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Etanol 95 % dipipet sebanyak 3 mL kemudian ditambahkan larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 mL, dimasukkan ke dalam kuvet hingga penuh. Selanjutnya dicari  $\lambda_{\max}$  DPPH dan dicatat hasil pengukuran  $\lambda_{\max}$  untuk digunakan pada tahap selanjutnya.

### 3.4.11 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel

Sampel isolat dilarutkan dalam pelarut etanol 95 % dengan konsentrasi konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm. Ekstrak masing-masing konsentrasi dipipet 3 mL dan ditambahkan 1 mL DPPH 0,2 Mm. Perlakuan tersebut diulangi sebanyak tiga kali. Kemudian diinkubasi dengan suhu 37 °C selama 30 menit, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada  $\lambda_{\max}$  yang telah didapatkan. Data absorbansinya yang diperoleh dari tiap konsentrasi masing-masing ekstrak dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya (Megawati, dkk., 2020):

$$\% \text{ Aktivitas Antioksidan } \left( \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi DPPH sisa}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right) \times 100 \% \dots\dots (3)$$

Kontrol yang digunakan yaitu larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 mL dalam 3 mL etanol 95 %. Nilai  $EC_{50}$  juga dihitung dalam persamaan  $y = ax + b$  yang diperoleh dari kurva regresi linear dari hubungan persen aktivitas antioksidan dan konsentrasi ekstrak fraksi antioksidan.  $EC_{50}$  dihitung dengan cara memasukkan nilai 50% ke dalam persamaan kurva standar sebagai sumbu y kemudian dihitung nilai x sebagai konsentrasi  $EC_{50}$ .

### 3.4.12 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan mendeskripsikan pola yang diperoleh dari hasil kromatogram pada KLT hingga diperoleh isolat senyawa steroid. Isolat tersebut kemudian di uji aktivitas antioksidannya dengan menghitung % aktivitas antioksidan dari data masing-masing isolat. Nilai  $EC_{50}$  dihitung dengan menggunakan software “*graphPad prism6 software*” dengan persamaan non regresi linier “*Regression for analyzing dose-response data*” yang menyatakan hubungan antara log konsentrasi ekstrak (x) dengan persen (%) antioksidan (y) (Bariyyah, dkk., 2013). Semakin kecil nilai  $EC_{50}$  maka semakin tinggi kemampuan antioksidannya. Untuk identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan analisis data dilakukan dengan membandingkan panjang gelombang maksimum dari referensi yang ada.

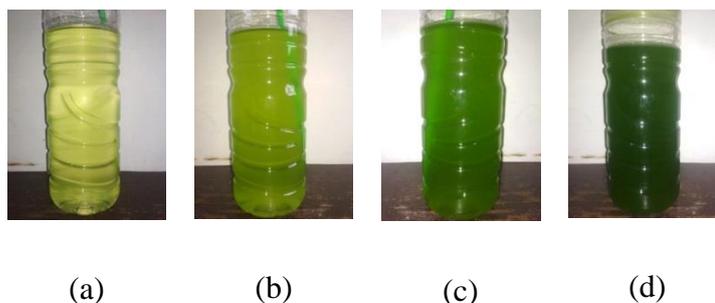
## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

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

Mikroalga *Chlorella sp.* dapat dikembangbiakkan dengan cara kultivasi. Media yang digunakan dalam kultivasi terbuat dari ekstrak taugé atau dikenal dengan Medium Ekstrak Taugé (MET). Selama kultivasi berlangsung, ketersediaan cahaya menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi dalam pertumbuhan mikroalga. Penelitian ini menggunakan cahaya yang berasal dari lampu sebagai pengganti sinar matahari untuk proses fotosintesis.

Pemanenan *Chlorella sp.* bertujuan untuk mengumpulkan biomassa yang akan digunakan untuk tahap ekstraksi. Pemanenan *Chlorella sp.* dilakukan pada hari ke-10 yang merupakan fasa stasioner dalam pertumbuhan mikroalga. Pada fasa stasioner terjadi perombakan produk metabolit primer serta proses metabolisme sekunder dari proses sintesis secara keseluruhan. Selain itu, fasa stasioner juga ditandai dengan perubahan warna kultur yang semakin pekat dengan kelimpahan sel tertinggi yang ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Perubahan warna kultur mikroalga *Chlorella sp.* pada (a) hari ke-1, (b) hari ke-4, (c) hari ke-7 dan (d) hari ke-10

Pemanenan mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan teknik sentrifugasi. Teknik ini menghasilkan supernatan berwarna hijau bening dan pelet berupa endapan hijau pekat yang merupakan biomassa dari *Chlorella sp.*. Pelet hasil sentrifugasi didekantasi dan dikering-anginkan dalam suhu ruang. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air yang menjadi penyebab pertumbuhan mikroorganisme. Pengeringan tidak dilakukan di bawah sinar matahari langsung atau dalam oven karena dikhawatirkan metabolit sekunder dalam *Chlorella sp.* dapat rusak. Biomassa basah mikroalga *Chlorella sp.* diperoleh sebanyak 334,90 gram sementara biomassa kering diperoleh sebanyak 14,38 gram.

#### **4.2 Penentuan Kadar Air Mikroalga *Chlorella sp.***

Penentuan kadar air bertujuan untuk mengetahui kadar air yang terkandung dalam sampel *Chlorella sp.*. Sampel yang digunakan adalah biomassa kering hasil pemanenan *Chlorella sp.*. Kadar air maksimum yang diperbolehkan dalam sampel tidak boleh melebihi dari 11% (Kumalasari, dkk., 2014). Banyaknya air yang terkandung dalam sampel dapat berpengaruh terhadap proses penyimpanan sampel. Sampel dengan kadar air rendah dapat mencegah tumbuhnya mikroorganisme sehingga sampel bisa di simpan dalam jangka waktu yang lama.

Hasil penentuan kadar air biomassa kering *Chlorella sp.* yaitu sebesar 10,33% (Perhitungan L.4.1). Nilai tersebut masih lebih besar jika dibandingkan dengan penelitian Iyani (2017), Nisa (2018) dan Rofiqoh (2019) dalam menganalisis kadar air biomassa *Chlorella sp.* yaitu 10,26%, 8,02% dan 8,29%. Perbedaan nilai kadar air dapat diduga karena beberapa faktor seperti suhu dan kelembaban ruang kerja serta ukuran dari sampel. Menurut Khoiriyah, dkk., (2014)

sampel dengan kadar air rendah dapat memudahkan pelarut untuk menembus dinding sel sehingga zat aktif dalam sampel akan lebih mudah terekstrak tanpa adanya gangguan dari molekul air. Sedangkan sampel dengan kadar air tinggi menyebabkan konsentrasi pelarut semakin rendah karena bercampur dengan kadar air yang terkandung dalam sampel sehingga menyebabkan proses ekstraksi berlangsung cukup lama.

#### **4.3 Ekstraksi Sonikasi Mikroalga *Chlorella sp.***

Ekstraksi bertujuan untuk memperoleh senyawa aktif dari suatu sampel dengan bantuan pelarut. Senyawa aktif dari mikroalga *Chlorella sp.* dapat diperoleh melalui ekstraksi berbantu ultrasonik. Alat sonikasi yang digunakan adalah tipe *water bath* karena perubahan suhunya tidak terlalu signifikan dan di bawah 40 °C sehingga tidak merusak senyawa aktif di dalamnya.

Selama ekstraksi berlangsung, gelombang ultrasonik akan memberikan efek ganda yaitu memecah dinding sel dan memberikan pemanasan pada cairan. Energi kinetik yang dilewatkan ke seluruh bagian cairan akan menimbulkan gelembung kavitasi pada dinding atau permukaan sehingga meningkatkan difusi ekstrak. Feng, dkk., (2015) menyatakan efek mekanik yang ditimbulkan oleh ledakan kavitasi dapat meningkatkan penetrasi dari cairan menuju dinding membran sel, lalu mendukung pelepasan komponen sel sehingga pelarut dapat mengambil senyawa target. Ekstraksi sonikasi dilakukan menggunakan pelarut metanol yang bersifat polar sehingga senyawa metabolit sekunder yang masih terikat dengan gugus glikosidanya dapat larut maksimal sesuai dengan prinsip *like dissolves like*.

Hasil dari ekstraksi sonikasi biomassa *Chlorella sp.* sebesar 0,82 gram dengan rendemen sebesar 13,68% (Perhitungan L.4.2). Rendemen yang diperoleh lebih rendah dibandingkan dengan ekstraksi maserasi yang dilakukan oleh Mahbubi, (2020) yaitu 14,17 %. Hal ini dikarenakan dalam perbandingan sampel dan pelarut yang sama (1:6), ekstraksi dengan metode maserasi memiliki kontak dengan pelarut yang lebih lama karena waktu perendaman sampel mencapai 24 jam dengan 5 hingga 7 kali pengulangan (total 120-168 jam). Sedangkan dalam penelitian ini hanya menggunakan waktu selama 42 menit dengan 3 kali pengulangan (total  $\pm$  2 jam) sehingga waktu dan banyaknya pelarut yang digunakan relatif lebih singkat dan sedikit.

#### **4.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Mikroalga *Chlorella sp.***

Senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak metanol *Chlorella sp.* umumnya masih berikatan dengan gugus gulanya dalam bentuk ikatan glikosida. Hidrolisis bertujuan untuk memutus ikatan glikosida dengan penambahan HCl sebagai katalis yang dapat mempercepat reaksi. Dugaan reaksi pemutusan ikatan glikosida ditunjukkan pada Gambar 2.6. Reaksi hidrolisis bersifat *reversible* (dapat balik), sehingga harus dihentikan agar ikatan glikosidanya tidak terbentuk kembali. Reaksi hidrolisis dapat dihentikan dengan menambahkan  $\text{NaHCO}_3$  hingga pH netral. Penambahan  $\text{NaHCO}_3$  akan menghasilkan gelembung  $\text{CO}_2$  dan produk garam NaCl.

Hasil hidrolisis selanjutnya dipartisi dengan pelarut n-heksana. Proses partisi akan menghasilkan dua lapisan yang tidak saling bercampur, yaitu fase organik (lapisan atas) dan fase air (lapisan bawah). Hal ini dikarenakan perbedaan

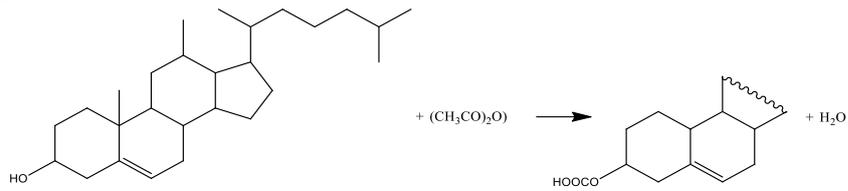
massa jenis n-heksana ( $\rho = 0,6548 \text{ g/mL}$ ) lebih kecil daripada massa jenis air ( $\rho = 0,997 \text{ g/mL}$ ). Senyawa steroid lebih terdistribusi ke dalam fase organik karena memiliki sifat kepolaran yang sama dengan n-heksana, sementara garam hasil hidrolisis dan glikon berada dalam fase air. Proses partisi akan menghasilkan fraksi n-heksana pekat dengan warna sedikit coklat kehitaman.

Hasil fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella sp.* diperoleh 0,67 gram dengan rendemen sebesar 82,33% (Perhitungan L.4.3). Rendemen yang diperoleh lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi etil asetat (Majidah, 2018), n-butanol (Mahbubi, 2010) dan kloroform (Yudiawan, 2020) dengan rendemen berturut-turut yaitu 29,55%, 40,40% dan 40,66%. Hal ini diduga senyawa steroid yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* lebih terdistribusi ke dalam pelarut n-heksana karena memiliki sifat kepolaran yang sama yaitu non polar.

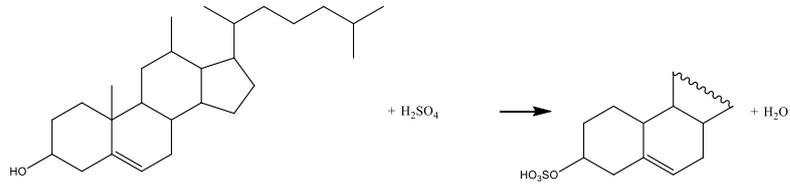
#### **4.5 Uji Fitokimia Senyawa Steroid Fraksi N-Heksana**

Uji fitokimia bertujuan untuk mengetahui keberadaan senyawa steroid yang terdapat pada sampel hasil partisi *Chlorella sp.*. Uji fitokimia dapat dilakukan menggunakan reagen *Lieberman Burchard*. Reagen ini dibuat dengan menambahkan kloroform, asam asetat anhidrat dan asam sulfat. Kloroform berfungsi sebagai pelarut dan tidak mengandung air. Asam asetat berperan dalam proses asetilasi gugus hidroksil membentuk turunan asetil. Asam sulfat berfungsi untuk mendehidrasi senyawa steroid membentuk garam *cholestadiene* yang terkonjugasi sehingga menghasilkan warna hijau kebiruan. Gambar 4.2 merupakan dugaan mekanisme reaksi steroid dengan reagen LB.

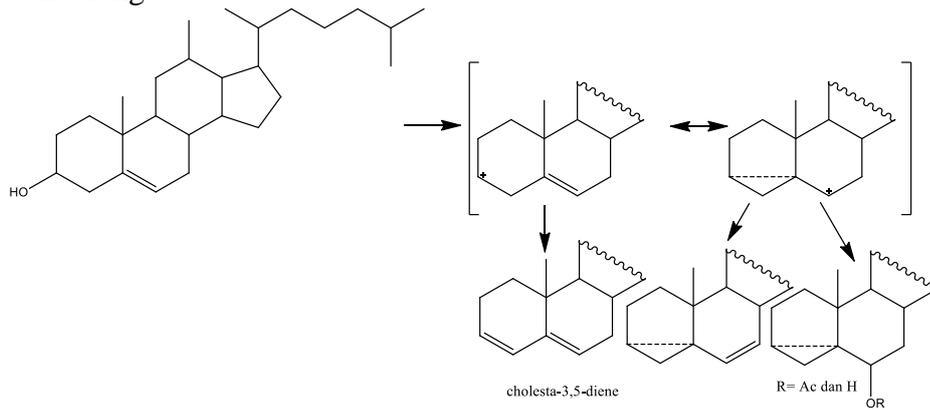
## Asetilasi



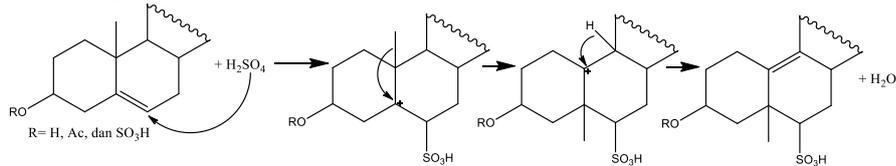
## Sulfonasi



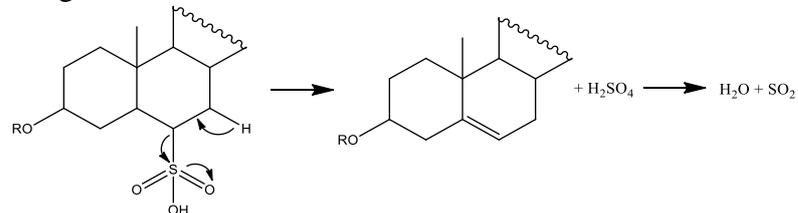
## Penataan Ulang



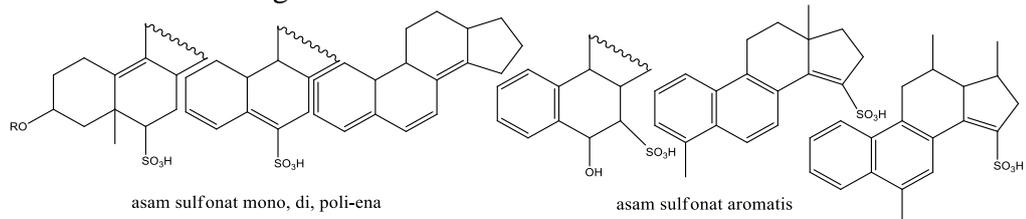
## Penataan Ulang Sulfonasi



## Penataan Ulang Desaturasi



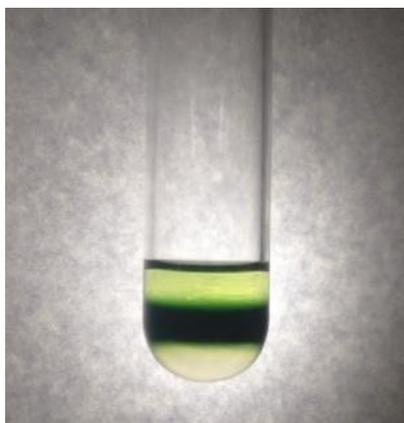
## Produk Penataan Ulang Hasil Sulfonasi dan Desaturasi



Gambar 4.2 Mekanisme reaksi steroid dengan reagen LB (Xiong, dkk., 2007)

Reaksi senyawa steroid dengan reagen LB diawali dengan proses asetilasi gugus hidroksil menggunakan asam asetat anhidrat. Gugus asetil yang terbentuk dalam proses ini merupakan gugus pergi yang baik sehingga membentuk ikatan rangkap. Selanjutnya terjadi pelepasan gugus hidrogen beserta elektronnya yang mengakibatkan ikatan rangkap berpindah. Senyawa ini bertindak sebagai elektrofil atau karbokation dan mengalami resonansi. Adanya serangan karbokation menyebabkan adisi elektrofilik diikuti dengan pelepasan hidrogen. Akibat pelepasan gugus hidrogen senyawa ini akan mengalami perpanjangan konjugasi yang akan memunculkan warna (Siadi, 2012).

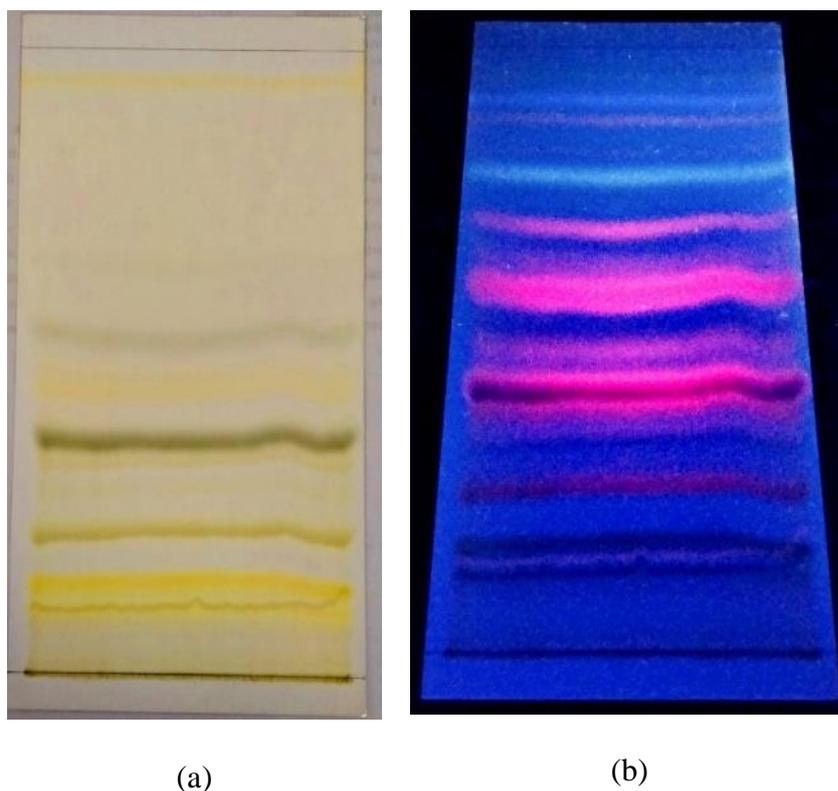
Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil partisi n-heksana *Chlorella sp.* diduga positif mengandung steroid yang ditandai dengan munculnya cincin hijau kebiruan setelah ditambahkan reagen *Lieberman Burchard*. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Fikri, (2019), Mahsunah (2019) dan Wahdaniyah (2019) pada ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* fraksi n-heksana dan etil asetat positif diduga mengandung steroid setelah ditambahkan dengan reagen LB. Hasil uji fitokimia senyawa steroid dapat ditunjukkan pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Hasil uji fitokimia *Chlorella sp.*

#### 4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP

Tujuan dilakukan pemisahan dengan KLTP yaitu untuk mendapatkan senyawa steroid yang lebih murni dari hasil partisi n-heksana *Chlorella sp.*. Fasa diam yang digunakan adalah plat silika gel G<sub>60</sub>F<sub>254</sub> dengan ukuran 10 x 20 cm. Pemilihan eluen merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Amalia, dkk., (2018) bahwa berdasarkan hasil KLT analitik didapatkan hasil eluen terbaik untuk memisahkan senyawa steroid terdapat pada campuran n-heksana:etil asetat (4:1).



Gambar 4.4 Hasil pemisahan senyawa steroid dengan KLTP (a) sebelum dan (b) sesudah dideteksi di bawah sinar UV 366 nm

Berdasarkan Gambar 4.4 hasil pemisahan KLTP fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella sp.* menghasilkan 18 noda dengan 3 noda diantaranya diduga sebagai steroid. Spot yang diduga sebagai senyawa steroid ditandai dengan warna hijau

kebiruan setelah diamati di bawah sinar UV 366 nm. Hal ini sesuai dengan penelitian Fauzi (2020) bahwa noda hasil KLTP berwarna hijau kebiruan positif menunjukkan senyawa steroid. Hasil perhitungan nilai  $R_f$  dari masing-masing noda ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil pemisahan KLTP fraksi n-heksana

No.	Nilai $R_f$	Warna Noda	Dugaan Senyawa
1	0,0167	Merah	Triterpenoid
2	0,0722	Merah	Triterpenoid
3	0,1056	Merah	Triterpenoid
4	0,1361	Merah	Triterpenoid
5	0,1633	Merah	Triterpenoid
6	0,2111	Merah	Triterpenoid
7	0,2889	Merah	Triterpenoid
8	0,3250	Merah	Triterpenoid
9	0,3633	Merah	Triterpenoid
10	0,4389	Merah	Triterpenoid
11	0,4722	Merah	Triterpenoid
12	0,5333	Merah	Triterpenoid
13	0,5889	Merah	Triterpenoid
14	0,650	Merah	Triterpenoid
<b>15</b>	<b>0,7472</b>	<b>Hijau Kebiruan</b>	<b>Steroid</b>
16	0,8444	Merah	Triterpenoid
<b>17</b>	<b>0,8861</b>	<b>Biru</b>	<b>Steroid</b>
<b>18</b>	<b>0,950</b>	<b>Hijau Kebiruan</b>	<b>Steroid</b>

Berdasarkan Tabel 4.1 noda yang diduga sebagai steroid hasil KLTP fraksi n-heksana *Chlorella sp.* muncul pada noda ke-15, 17 dan 18 dengan nilai  $R_f$  berturut turut sebesar 0,7472; 0,8861 dan 0,950. Nilai  $R_f$  yang diperoleh sesuai dengan penelitian Megawati, dkk., (2020) bahwa hasil pemisahan steroid *Chlorella sp.* fraksi kloroform menghasilkan 13 noda, akan tetapi hanya 3 noda yang menunjukkan senyawa steroid yaitu pada noda 9, 10 dan 13 dengan  $R_f$  berturut turut 0,6869; 0,7670 dan 0,9400.

Noda hasil KLTP memiliki nilai  $R_f$  yang berbeda-beda. Hal ini mengindikasikan bahwa masing-masing noda yang diduga sebagai senyawa steroid memiliki tingkat kepolaran yang berbeda pula. Noda dengan nilai  $R_f$  kecil akan bersifat polar karena lebih tertahan pada fasa diam (silika). Noda ke-18 memiliki nilai  $R_f$  paling besar yang menunjukkan bahwa noda ini memiliki kepolaran yang paling rendah (non polar). Noda dengan kepolaran rendah menandakan bahwa komponen senyawa tersebut lebih terdistribusi ke fasa geraknya. Hal ini dikarenakan fasa gerak yang digunakan dalam penelitian ini berupa n-heksana:etil asetat (4:1) memiliki sifat kepolaran yang lebih rendah daripada fase diam yang berupa silika.

#### **4.7 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT Dua Dimensi**

Hasil pemisahan KLTP pada spot ke-15, 17 dan 18 selanjutnya dipisahkan kembali dengan KLT dua dimensi untuk meningkatkan resolusi (pemisahan) sampel ketika komponen-komponen solut mempunyai  $R_f$  yang berdekatan. Fasa diam yang digunakan adalah plat silika gel G<sub>60</sub>F<sub>254</sub> dengan ukuran 10 x 10 cm. Fase gerak yang digunakan terdiri dari dua eluen, yaitu eluen pertama merupakan campuran pelarut n-heksana:etil asetat dengan perbandingan (4:1) sedangkan eluen kedua campuran pelarut benzene:etil asetat dengan perbandingan 3:2 (Baderos, 2017). Penggunaan dua eluen bertujuan untuk memisahkan suatu senyawa dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Hasil pemisahan KLT 2 dimensi dapat ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil pemisahan steroid menggunakan KLT 2 dimensi

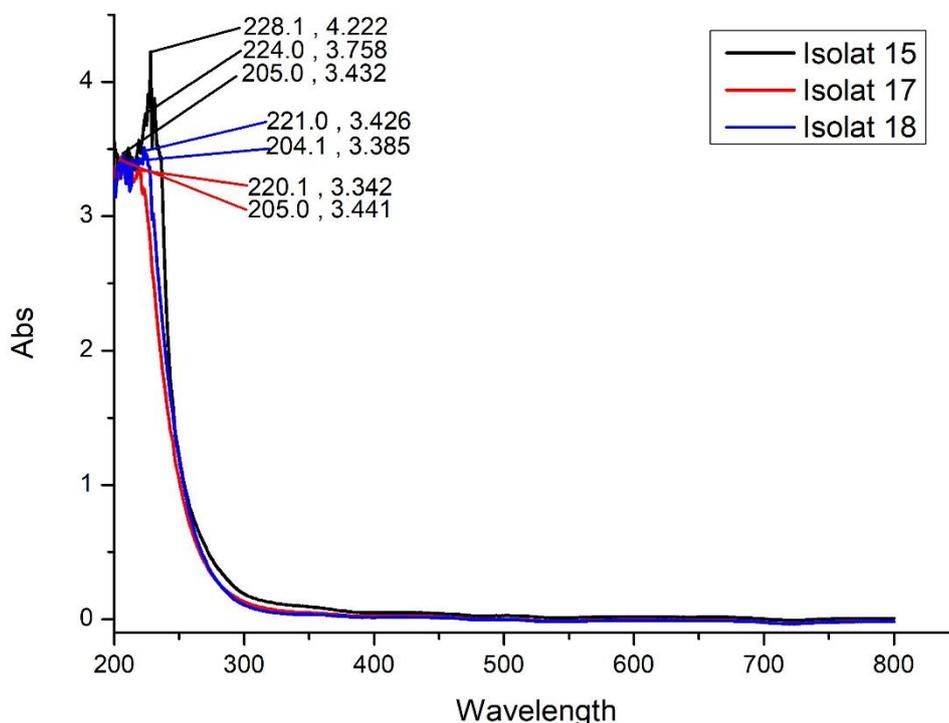
Isolat Steroid	Eluen 1		Eluen 2	
	Jumlah Spot	Warna	Jumlah Spot	Warna
15	1	Biru	1	Biru
17	1	Biru	1	Biru
18	1	Biru	1	Biru

Berdasarkan Tabel 4.2 hasil pemisahan dari KLT dua dimensi pada isolat ke-15, 17 dan 18 menunjukkan pada elusi pertama dengan eluen n-heksana:etil asetat (4:1) menghasilkan noda berwarna biru. Begitu juga setelah elusi kedua dengan pelarut benzene:etil asetat (3:2) menghasilkan satu noda dengan warna yang sama yaitu biru. Berdasarkan hal tersebut hasil uji KLT dua dimensi menghasilkan satu noda pada setiap elusinya. Hidayah, dkk., (2016) melakukan pemisahan senyawa steroid menggunakan KLT dua dimensi dan menghasilkan satu noda pada setiap elusinya. Isolat tersebut diidentifikasi menggunakan GC-MS dan diperoleh 50 puncak senyawa. Berdasarkan hal tersebut isolat steroid hasil pemisahan dengan KLT dua dimensi belum murni.

#### 4.8 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Tujuan identifikasi sampel menggunakan spektrofotometer UV-Vis yaitu untuk mengetahui panjang gelombang maksimum yang diakibatkan oleh transisi elektronik. Identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dilakukan terhadap isolat 15, 17 dan 18 hasil KLTP. Hasil identifikasi senyawa steroid pada isolat 15 menghasilkan panjang gelombang 205 nm, 224 nm dan 228 nm. Isolat 17 menghasilkan panjang gelombang 205 nm dan 220 nm, sementara isolat 18

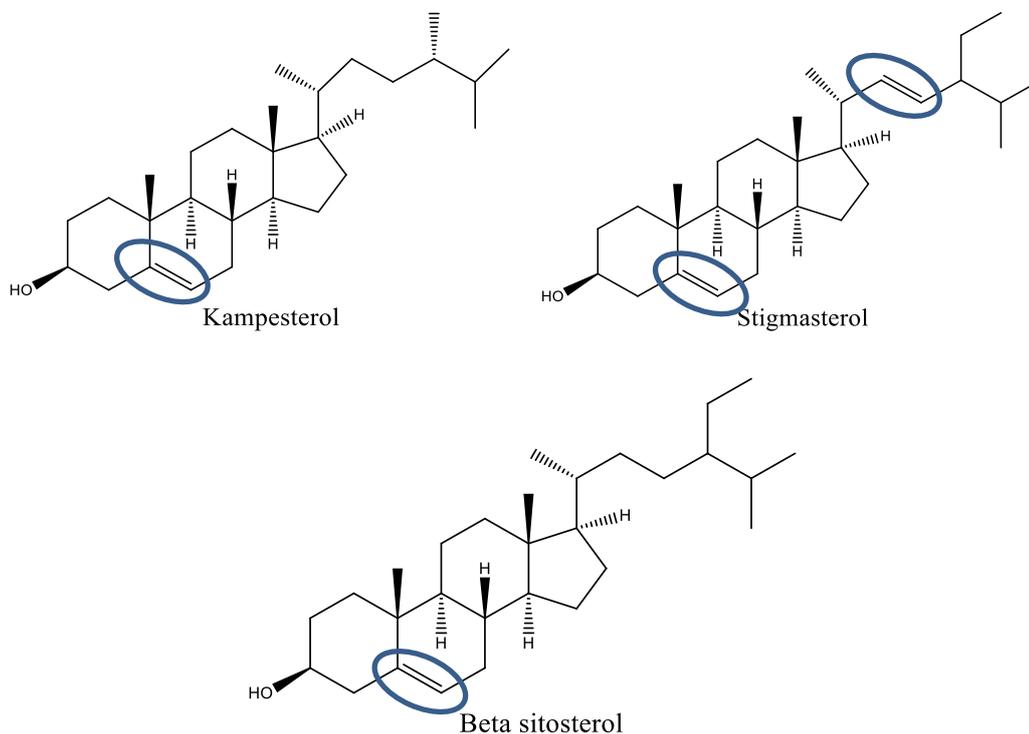
menghasilkan panjang gelombang sebesar 204 nm dan 221 nm. Hasil pengukuran panjang gelombang isolat 15, 17 dan 18 ditunjukkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Hasil spektra UV Vis isolat 15, 17 dan 18 mikroalga *Chlorella sp.*

Berdasarkan Gambar 4.5 isolat hasil KLTP menghasilkan serapan pada panjang gelombang 204 nm dan 205 nm. Menurut Johnson dan Oehlschlager (1985) puncak serapan pada daerah 190-210 nm terjadi akibat gugus kromofor dari suatu alkena (C=C) tidak terkonjugasi yang menyebabkan terjadinya transisi elektronik  $\pi - \pi^*$ . Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Wahdaniyah (2019) bahwa hasil isolat steroid dari mikroalga *Chlorella sp.* didapatkan panjang gelombang maksimum 203 nm dan 205 nm. Serapan lain juga terdeteksi pada panjang gelombang 224 nm dan 228 nm. Hasil tersebut tidak jauh berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Fauzi, (2020) dalam identifikasi senyawa steroid

fraksi *n*-butanol mikroalga *Chlorella sp.* diperoleh panjang gelombang maksimum 229 nm.



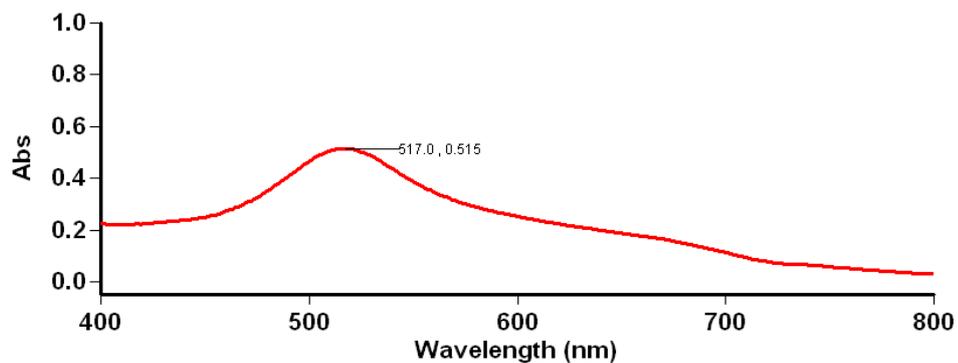
Gambar 4.6 Struktur senyawa steroid jenis kampesterol, stigmasterol dan  $\beta$ -sitosterol

Panjang gelombang yang diperoleh sesuai dengan penelitian Iyani, (2017) yang menyatakan bahwa hasil interpretasi antara spektra UV Vis dengan LC-APCI-MS pada isolat hasil partisi mikroalga *Chlorella sp.* positif mengandung steroid jenis kampesterol, stigmasterol dan  $\beta$ -sitosterol (Gambar 4.6). Hal ini dikarenakan isolat yang diperoleh memiliki ikatan C=C tidak terkonjugasi. Penelitian lain juga dilakukan oleh Mahsunah (2019) bahwa identifikasi isolat steroid dari mikroalga *Chlorella sp.* didapatkan senyawa steroid jenis kampesterol dengan kelimpahan tertinggi dibandingkan stigmasterol dan  $\beta$ -sitosterol. Hal ini dikarenakan hasil identifikasi dengan LC-MS menunjukkan bahwa kampesterol memiliki luas puncak

yang paling besar. Luas puncak senyawa menandakan kelimpahan setiap senyawa yang berhasil dideteksi.

#### 4.9 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan hasil KLTP fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella sp.* diawali dengan menentukan panjang gelombang maksimum larutan DPPH. Hal ini bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang yang memiliki nilai absorbansi tertinggi. Pengukuran aktivitas antioksidan harus dilakukan pada panjang gelombang maksimum agar setiap satuan konsentrasi sampel yang akan diuji memiliki tingkat kepekaan tertinggi dan memiliki perubahan absorbansi terbesar. Hasil spektrum UV-Vis larutan DPPH 0,2 mM dapat dilihat pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Panjang gelombang DPPH 0,2 mM

Berdasarkan Gambar 4.7 perolehan panjang gelombang larutan DPPH 0,2 mM yaitu sebesar 517 nm. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Rumangu, dkk., (2019) dalam menentukan panjang gelombang DPPH yaitu 517 nm. Hal ini dikarenakan reagen DPPH memiliki warna komplementer ungu dengan panjang gelombang maksimum berada pada daerah 515 – 520 nm (Molyneux, 2004).

#### 4.10 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan pada isolat hasil KLTP dengan variasi konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm. Sampel diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum DPPH yang sudah ditentukan sebelumnya yaitu 517 nm. Pengukuran antioksidan menggunakan kontrol DPPH 0,2 mM yang berfungsi untuk menentukan absorbansi radikal DPPH sebelum direduksi oleh sampel. Selisih antara absorbansi kontrol dengan absorbansi sampel yang sudah direduksi DPPH merupakan sisa radikal DPPH yang terbaca pada spektrofotometer UV Vis. Sampel untuk uji aktivitas antioksidan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C karena reaksi antara radikal DPPH dengan senyawa metabolit sekunder berlangsung lebih optimal pada suhu tersebut.

Pengukuran aktivitas antioksidan secara fisik dapat diamati dengan terjadinya perubahan warna dari ungu menjadi ungu muda atau kuning ketika DPPH dicampur dengan sampel yang dapat mendonorkan atom hidrogennya (Syarifuddin, 2014). Hal ini sesuai dengan pernyataan Prakash (2001) bahwa intensitas warna yang berkurang berhubungan dengan jumlah elektron DPPH yang menangkap elektron hidrogen dari senyawa antioksidan. Intensitas warna yang berkurang mengindikasikan terjadinya peningkatan kemampuan antioksidan dalam menangkal radikal bebas.

Kemampuan antioksidan dalam sampel dapat diketahui dengan menghitung nilai persen (%) aktivitas antioksidan yang diperoleh melalui data absorbansi kontrol dan absorbansi isolat. Selanjutnya, data % aktivitas antioksidan dapat digunakan untuk menghitung nilai  $EC_{50}$  yang merupakan parameter utama dalam menentukan aktivitas antioksidan. Nilai  $EC_{50}$  dapat diperoleh melalui persamaan

regresi non linier dengan *GraphPad prism software, Regression for analyzing dose response data*.

Analisis regresi non linier didasarkan pada fungsinya dalam menyesuaikan data dengan model yang mendefinisikan Y (respon % aktivitas antioksidan) sebagai fungsi dari X (dosis atau konsentrasi). Variabel X dilakukan transformasi logaritma untuk meningkatkan kesesuaian model serta membuat variabel lebih normal terdistribusi (Motulsky dan Chrisopolous, 2003). Nilai EC<sub>50</sub> dari isolat 15, 17 dan 18 hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* dapat ditunjukkan pada Tabel 4.3.

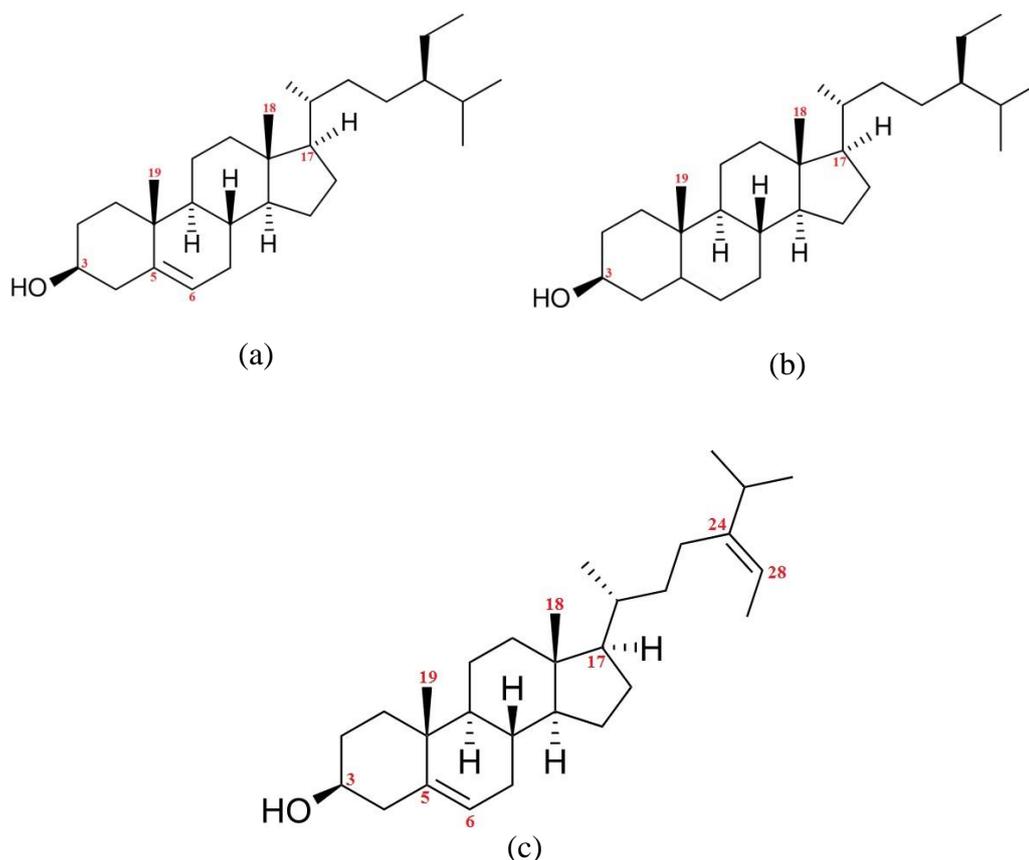
Tabel 4.3 Nilai EC<sub>50</sub> isolat KLTP mikroalga *Chlorella sp.*

<b>Isolat</b>	<b>EC<sub>50</sub> (ppm)</b>
15	17,27
17	13,83
18	10,81

Berdasarkan Tabel 4.3 aktivitas antioksidan isolat 18 hasil KLTP menunjukkan nilai EC<sub>50</sub> terendah yaitu 10,81 ppm, sementara isolat 15 dan 17 menghasilkan nilai EC<sub>50</sub> berturut-turut sebesar 17,27 ppm dan 13,83 ppm. Nilai EC<sub>50</sub> yang diperoleh untuk ketiga isolat menunjukkan aktivitas antioksidan dengan kategori sangat kuat. Urutan potensi isolat steroid hasil KLTP fraksi n-heksana sebagai antioksidan dari yang tertinggi yaitu isolat 18 > isolat 17 > isolat 15.

Perbedaan hasil aktivitas antioksidan dapat dipengaruhi oleh struktur dari sampel yang diteliti. Komati, dkk., (2017) meneliti EC<sub>50</sub> dari beberapa senyawa tunggal fitosterol dan didapatkan nilai EC<sub>50</sub> β-sitosterol, fukosterol dan sitostanol berturut-turut 42, 33, dan 136 nM. Senyawa β-sitosterol dan sitostanol memiliki perbedaan nilai EC<sub>50</sub> yang cukup signifikan, sementara nilai EC<sub>50</sub> β-sitosterol dan

fukosterol tidak berbeda jauh. Struktur ketiga steroid tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.8.



Gambar 4.8 Struktur fitosterol dengan  $EC_{50}$  yang berbeda (a)  $\beta$ -sitosterol (b) sitostanol (c) fukosterol (Komati, dkk., 2017)

Berdasarkan Gambar 4.8 dapat dilihat bahwa  $\beta$ -sitosterol memiliki struktur yang hampir sama dengan sitostanol. Perbedaan kedua struktur tersebut hanya terletak pada ikatan rangkap  $C_5=C_6$  yang dimiliki  $\beta$ -sitosterol dan tidak terdapat pada struktur sitostanol. Keberadaan ikatan rangkap  $C=C$  berkontribusi terhadap aktivitas antioksidan dengan cara menstabilkan radikal bebas. Hal inilah yang menyebabkan  $\beta$ -sitosterol memiliki nilai antioksidan yang lebih tinggi daripada sitostanol. Perbedaan struktur  $\beta$ -sitosterol dan fukosterol terletak pada substituen yang terikat pada rantai utama. Substituen  $\beta$ -sitosterol dan fukosterol sama-sama

tersusun atas 10 rantai karbon namun pada fukosterol terdapat ikatan rangkap C=C pada C<sub>24</sub>. Ikatan rangkap yang terdapat pada substituen fukosterol memberikan perbedaan yang tidak terlalu signifikan terhadap aktivitas antioksidan jika dibandingkan dengan  $\beta$ -sitosterol.

Faktor lain yang dapat mempengaruhi hasil aktivitas antioksidan yaitu adanya efek sinergis dan antagonis. Campuran senyawa yang memiliki efek sinergis dapat meningkatkan aktivitas antioksidan, sedangkan campuran senyawa yang memiliki efek antagonis dapat menurunkan aktivitas antioksidan (Sonam dan Guleria, 2017). Isolat 18 hasil KLTP diduga memiliki efek sinergis yang besar sehingga menghasilkan aktivitas antioksidan paling tinggi. Wang, dkk., (2002) menyatakan bahwa senyawa fitosterol beserta turunannya mampu meningkatkan aktivitas antioksidan. Berdasarkan hal tersebut diduga nilai aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh banyaknya kandungan fitosterol, semakin banyak kandungan fitosterol yang terdapat dalam sampel maka semakin tinggi nilai antioksidannya.

Beberapa penelitian terdahulu yang telah menguji isolat steroid hasil KLTP sebagai antioksidan dari sampel mikroalga *Chlorella sp.* dalam berbagai fraksi berbeda diantaranya; Dinasti (2016) menyebutkan isolat KLTP fraksi etil asetat menghasilkan nilai EC<sub>50</sub> sebesar 77,78 ppm yang tergolong sebagai antioksidan kuat; Fikri (2019) menyebutkan isolat KLTP fraksi n-heksana menghasilkan nilai EC<sub>50</sub> sebesar 35,09 ppm yang tergolong sebagai antioksidan sangat kuat; sementara Fauzi (2020) menyatakan bahwa nilai EC<sub>50</sub> fraksi n-butanol sebesar 57,62 ppm dan tergolong sebagai antioksidan kuat.

#### 4.11 Pemanfaatan Mikroalga *Chlorella sp.* dalam Perspektif Islam

Al-Quran menegaskan bahwa tumbuhan adalah anugerah khusus yang diciptakan Allah SWT untuk umat manusia. Semua makhluk Allah SWT dapat mengambil manfaat dari apa yang telah Allah SWT turunkan di alam semesta untuk kelangsungan hidupnya. Salah satu ayat yang menjelaskan tentang tumbuhan terdapat dalam Al-Quran surat Luqman ayat 10:

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا وَأَلْقَى فِي الْأَرْضِ رَوْسِي أَنْ تَمِيدَ بِكُمْ  
وَبَثَّ فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

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

Tafsir Ibnu Katsir pada lafadz وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

menjelaskan bahwa langit tercipta begitu tinggi tanpa tiang dan jaraknya jauh dari manusia. Demikian juga bumi yang di atasnya terdapat hewan dan berbagai jenis tumbuh-tumbuhan yang tumbuh subur karena siraman air hujan (Ar-Rifa’i, 2000). Allah SWT menciptakan alam semesta beserta isinya agar manusia bisa meyakini Maha Kebesaran Allah SWT dan mensyukuri nikmat-Nya (Muliati, 2018).

Mikroalga *Chlorella sp.* termasuk jenis tumbuhan tingkat rendah yang diciptakan Allah SWT yang bisa dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Menurut Savitri (2008) bagian tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai obat terletak pada bagian akar, batang, daun, bunga, buah, biji serta bagian rimpang.

Allah SWT berfirman dalam QS. asy-Syu'ara ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya: “*Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan (tumbuh-tumbuhan) yang baik?*”

Kata tumbuhan dalam ayat tersebut menggunakan kata “زَوْجٍ كَرِيمٍ”

menunjukkan arti tumbuh-tumbuhan yang baik. Tumbuhan yang baik dalam hal ini adalah tumbuhan yang subur dan bermanfaat bagi makhluk hidup (Shihab, 2002). Tumbuhan yang baik dapat berasal dari bermacam-macam jenis kemudian dipilah dan digunakan sebagai obat dari berbagai penyakit (Savitri, 2008). Segala macam penyakit yang Allah SWT berikan pasti ada obat atau penawarnya dan obat tersebut tak lain berasal dari Allah SWT. Hal ini sesuai dengan sabda Rasulullah SAW dalam HR. Bukhari: 5354:

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

Artinya: “*Tidaklah Allah menurunkan suatu penyakit, kecuali Allah juga menurunkan obatnya*”

Hadits tersebut menjelaskan bahwa segala penyakit yang Allah SWT turunkan senantiasa selalu ada penawarnya bagi mereka yang berfikir dengan keimanannya (Farooqi, 2005). Hal ini mengajarkan kita bahwa Allah SWT senantiasa selalu berbuat adil kepada umatnya. Sebagai umat manusia yang

mempunyai akal pikiran dan mampu merenungkan ciptaan Allah SWT sudah sepatutnya menggali berbagai potensi dari ciptaan Allah SWT melalui ilmu pengetahuan dan penelitian.

Penelitian ini dilakukan terhadap sampel mikroalga *Chlorella sp.* yang bermanfaat sebagai tumbuhan obat (antioksidan). Kandungan steroid yang didapat dalam *Chlorella sp.* menjadi usaha dalam mendapatkan bukti atas apa yang diberikan Allah SWT. Senyawa steroid yang terdapat dalam mikroalga *Chlorella sp.* memiliki kadar tertentu yang dapat digunakan sebagai antioksidan.

Allah berfirman dalam surat al Qamar ayat 49:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

Artinya: “*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran*”

Dalam tafsir Al-Maragi menjelaskan bahwa sesungguhnya semua yang ada dalam kehidupan ini adalah sesuai dengan ketentuan dan pembentukan Allah SWT (Bakar, dkk., 1989). Artinya, segala sesuatu yang telah Allah SWT ciptakan pasti sesuai dengan ukuran (kadar) masing-masing. Berdasarkan penjelasan surat Al Qamar ayat 49, kadar antioksidan senyawa steroid fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella sp.* menunjukkan nilai  $EC_{50}$  sebesar 17,27 ppm pada isolat 15, 13,83 ppm pada isolat 17 dan 10,81 ppm pada isolat 18. Kadar tersebut tergolong sebagai antioksidan sangat kuat karena memiliki nilai  $EC_{50} < 50$ ppm.

## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil identifikasi isolat fraksi *n*-heksana yang diduga mengandung steroid menggunakan spektrofotometer UV Vis didapat panjang gelombang pada isolat 15 (205, 224, dan 228 nm), isolat 17 ( 205 dan 220 nm) dan isolat 18 (204 dan 221 nm).
2. Aktivitas antioksidan pada isolat 15 menghasilkan nilai  $EC_{50}$  17,27 ppm, isolat 17 menghasilkan nilai  $EC_{50}$  13,83 ppm, sementara isolat 18 menghasilkan nilai  $EC_{50}$  10,81 ppm. Ketiga isolat hasil KLTP fraksi *n*-heksana memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori sangat kuat.

#### **5.2 Saran**

Saran dari penelitian ini yaitu perlu dilakukan metode pemisahan senyawa steroid yang lain seperti kromatografi cair vakum untuk pemisahan lebih maksimal. Selain itu, perlu dilakukan identifikasi dengan LC-MS/MS untuk mengetahui jenis steroid yang didapatkan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, S., Aidha, N. N., dan Oktarina, E. 2018. Ekstraksi Antioksidan *Spirulina sp.* dengan Menggunakan Metode Ultrasonik dan Aplikasinya Untuk Krim Kosmetik. *Jurnal Kimia Dan Kemasan*, 40(2), 105–116.
- Amalia, S., Fasya, A.G., Hasanah, F., dan Yuliani, D. 2018. Pemisahan Senyawa Aktif Fraksi Petroleum Eter dan Etil Asetat Hasil Hidrolisis Ekstrak Etanol *Hydrilla verticillata* dari Ranu Grati Pasuruan. *Alchemy*. 6:2.
- Amin, M., Chetpattananondh, P., Khan, M.N., Mushtaq, F., dan Sami. S. K. 2018. Extraction and Quantification of Chlorophyll from Microalgae *Chlorella sp.* *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* 414.
- Anggraeni, O. N., Fasya, A. G., Abidin, M., dan Hanapi, A. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* *Alchemy*, 3(2).
- AOAC. 1984. *Official Method of Analysis. Association of Official Analytical Chemist, Inc.* Washington DC: Association of Official Analytical Chemist.
- Aprilliyanti, S., Soeprobowati, T. R., dan Yulianto, B. 2016. Hubungan Kemelimpahan *Chlorella sp.* dengan Kualitas Lingkungan Perairan pada Skala Semi Masal di BBBPBAP Jepara. *Jurnal Ilmu Lingkungan*, 14(2), 77.
- Ar-Rifa'i, M, S. 2000. *Kemudahan dari Allah, Ringkasan Tafsir Ibnu Katsir. Terjemahan Syihabudin, jilid 4.* Jakarta: Gema Insani Press.
- Artati, E. K., Feliciano I. W.H., dan Fatimah. 2012. Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Asam Terhadap Kinetika Reaksi Hidrolisis Pekepah Pisang (*Musa Paradisiaca L.*). *Ekuilibrum*. Vol. 11, No. 2: 73-77.
- Baderos, A. 2017. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Alga Merah (*Eucheuma cottonii*) dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan Identifikasi Menggunakan LC-MS. *Skripsi*. Malang: Malang. Jurusan Kimia. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Bakar, Bahrin A. 1989. *Tafsir Terjemah Al-Maragi*. Smarang: PT Toha Putra.
- Bariyyah, S. K., Hanapi, A., Fasya, A. G., dan Abidin, M. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tuauge. *Alchemy*, Vol. 2 No.1.
- Barsanti, L., dan Paolo, G. 2014. *Algae Anatomy, Biochemistry and Biotechnology. 2nd ed.* CRC Press Taylor Francis.

- Burke, R.W., Diamondstore, B.I., Velapoldi, R.A., Menis, O. 1974. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions of Cholesterol. *Clin. Chem.* 20, 794-801.
- Ciesla, L., dan Waksmundzka-hajnos, M. 2009. Two-dimensional Thin-Layer Chromatography in the Analysis of Secondary Plant Metabolites. *Journal of Chromatography A*, 1216, 1035–1052.
- 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.
- Dianita, I., Hasibuan, S., dan Syafriadiman. 2020. Pengaruh Pupuk Tauge Kacang Hijau (*Phaseolus radiatus*) terhadap Kepadatan dan Kandungan Karotenoid *Dunaliella salina*. *Jurnal Perikanan Dan Kelautan*, 25(1), 18–26.
- Dinasti, A.R. 2016. Isolasi dengan KLTP dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.*. *Skripsi*. Malang. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Dyniari, P.Y.I., Farikhah, F., dan Rahim, A. R. 2019. Dinamika Populasi *C. Vulgaris* dalam Paparan Logam Berat Timbal (Pb) dengan Konsentrasi yang Berbeda Skala Laboratorium. *Jurnal Perikanan Pantura (JPP)*, 2(1), 42.
- Elystia, S., Muria, S. R., dan Pertiwi, S. I. P. 2019. Pemanfaatan Mikroalga *Chlorella sp.* untuk Produksi Lipid dalam Media Limbah Cair Hotel dengan Variasi Rasio C:N dan Panjang Gelombang Cahaya. *Jurnal Sains dan Teknologi Lingkungan*, 11(1), 25–43.
- Farooqi, M.I.H. 2005. *Terapi Herbal Cara Islam, Manfaat Tumbuhan Menurut Al-Quran dan Sunah Nabi*. Penj. Ahmad Y. Samantho. Jakarta: Penerbit Hikmah (PT Mizan Publika).
- Fasya, A. G., Millati, N., Rahmawati, L. M., Iyani, R., Hanapi, A., Ningsih, R., Yuliani, D., dan Megawati, D. S. 2020. Isolation and Bioactivity of Steroids Isolates from Petroleum Ether Fraction of *Chlorella sp.* *AIP Conference Proceedings*, 2243.
- Fasya, A.G., Purwanto, B., Ulya, L.H., Ahmad, M., 2020. Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis dari Fraksi n-Heksana *Hydrilla verticillata*. *ALCHEMY: JOURNAL OF CHEMISTRY*, 8 : 1. 23-34
- 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*, 5(1), 5.

- 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., Khamidah, U., Amaliyah, S., B., 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, March*.
- Fatima, Z., Abderrahmane, B., Seddik, K., dan Arrar, L. 2016. Antioxidant Activity Assessment of *Tamus Communis* L. Roots. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, 8(12).
- Fauzi, V.S.H. 2020. Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Pemisahan KLTP Fraksi *n*-butanol Mikroalga *Chlorella sp.*. *Skripsi*. Malang. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Feng, D., Luo, Z., Tao, B., Chen, C. 2015. Ultrasonic Assisted Extraction and Purification of Phenolic Compounds from Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rinds. *LWT-Food Science and Technology*. 60(2):970-976.
- Ferreira, V., dan Lopez, R. 2019. The Actual and Potential Aroma of Winemaking Grapes. *Article in Biomolecules*. 9(818).
- Fikri, F.M. 2019. Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Fraksi *n*-heksana Mikroalga *Chlorella sp.*. *Skripsi*. Malang. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Firdayani, F., Winarni Agustini, T., dan Ma'ruf, M. 2015. Ekstraksi Senyawa Bioaktif sebagai Antioksidan Alami *Spirulina Platensis* Segar dengan Pelarut yang Berbeda. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 18(1), 28–37.
- 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.* *Jurnal Pascapanen Dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 10(2), 101.
- Gandjar, I. G., dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gordon, M.H . 1990. *The Mechanism of Antioxidants Action in Vitro*. Di dalam *B.J.F. Hudson, editor. Food Antioxidants*. London: Elsevier Applied Science.
- Hadiyanto, dan Azim, M. 2012. *Mikroalga Sumber Pangan dan Energi Masa Depan*. Semarang: UPT UNDIP Press.

- Hadiyanto, H., dan Sutrisnorhadi. 2016. Response Surface Optimization of Ultrasound Assisted Extraction (UAE) of Phycocyanin from Microalgae *Spirulina platensis*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(4), 227–234.
- Handaratri, A., dan Yuniati, Y. 2019. Kajian Ekstraksi Antosianin dari Buah Murbei dengan Metode Sonikasi dan Microwave. *Reka Buana : Jurnal Ilmiah Teknik Sipil Dan Teknik Kimia*, 4(1), 63.
- Handoko, D. S. P. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis. *SIGMA : Jurnal Sains Dan Teknologi*, Vol. 9(Issue 1 0000).
- Heliawati, leny. 2018. *Kimia Organik 3*. Bogor: Pascasarjana-UNPAK.
- Hidayah, W.W., Kusriani, D., dan Fachriyah. 2016. Isolasi, Identifikasi Senyawa Steroid dari Daun Getih-Getihan (*Rivina humilis* L.) dan Uji Aktivitas sebagai Antibakteri. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 19 (1): 32-37.
- Hussein, H. A., Mohamad, H., Mohd Ghazaly, M., Laith, A. A., dan Abdullah, M. A. 2020. Anticancer and Antioxidant Activities of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella sp.* Extracts in Co-Application with Silver Nanoparticle. *Journal of King Saud University - Science*, 32(8), 3486–3494.
- Ilmi, T. P. T. 2011. *Tumbuhan dalam Perspektif Al-Qur'an dan Sains Jilid 4*. Jakarta: Lajnah Pentashihan Mushaf Al-Qur'an.
- Imelda, S., Claudia, C., Lambui, O., dan Suwastika, I. N. 2018. Kultivasi Mikroalga Isolat Lokal pada Medium Ekstrak Tauge. *Natural Science: Journal of Science and Technology*, 7(2), 148–157.
- Iyani, R. 2017. Variasi Rasio Sampel terhadap Silika Gel pada Pemisahan Steroid dan Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Kromatografi Kolom Basah. *Skripsi*. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- 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 Dan Kemasan*, 41(1), 31.
- Johnson, P. A dan Oehlschlager, A.C. 1989. *Analysis of Sterol and other Biologically Significant Steroids*. Academic Press.
- Kawaroe, M. (2010). *Mikroalga Potensi dan pemanfaatannya untuk Produksi Bio Bahan Bakar*. Bandung: ITB Press.
- Keil, F.J . 2007. *Modeling of Process Intensification*. AIDIC Conference.

- Kesuma, Y. 2015. *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Padang: Andalas University Press.
- Khoiriyah, S., Hanapi, A., dan Fasya, A.G. 2014. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat, Kloroform dan Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga Coklat *Sargassum vulgare* dari Pantai Kapong Pamekasan Madura. *ALCHEMY*, Vol. 3, No. 2, pp. 133-144,.
- Khopkar, S.M . 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Komati, R., Spadoni, D., Zheng, S., Sridhar, J., Riley, K.E., dan Wang, G. 2017. Ligands of Therapeutic Utility for The Liver X Receptors. *Molecules*, 22: 1-24.
- Kulsum, U., Mahfud., dan Roestadi, A. 2017. Ultrasonic Assisted Biodiesel Production of Microalgae by Direct Transesterification. *AIP Conference Proceedings*, 1823.
- Kumalasari, D., Fasya, G.A., Adi, K.T., Maunatin, A. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Asam Lemak Hasil Hidrolisis Minyak Mikroalga *Chlorella sp.*. *Alchemy*. 3, 163-172.
- Kurnia, D., Prisdyananti, N., Marliani, L., Idar, I., & Nurochman, Z. 2019. Antiinflammatory Activity from Marine Microalgae *Chlorella vulgaris* Extract Using Human Red Blood Cells (HRBC) Stability Method. *Jurnal Kartika Kimia*, 2(2), 57–62.
- Luo, X, Su, P., dan Zhang, W. 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*. Jurusan Kimia. Malang. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Mahbubi, Hasan A. 2020. Toksisitas Senyawa Steroid Hasil Pemisahan Metode KLTP Fraksi *n*-butanol Mikroalga *Chlorella sp.*. *Skripsi*. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Mahsunah. 2019. Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.*. *Laporan Hasil Penelitian*. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Majidah, B. 2018 Uji Toksisitas Isolat Steroid Hasil Kromatografi Kolom fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.*. *Skripsi*. Malang. Jurusan Kimia. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Mangurana, W. O. I., Yusnaini, Y., dan Sahidin, S. (2019). Analisis LC-MS/MS (*Liquid Chromatograph Mass Spectrometry*) dan Metabolit Sekunder serta Potensi Antibakteri Ekstrak *n*-Heksana Spons *Callyspongia aerizusa* yang diambil pada kondisi tutupan Terumbu Karang yang berbeda di Perairan Teluk Staring. *Jurnal Biologi Tropis*, 19(2), 131.
- Mason, T.J. 1990. *Introduction, Chemistry with Ultrasound. Edited by T.J Mason.* London. Elsevier Applied Science.
- Mathialagan, R., Mansor, N., Shamsuddin, M. R., Uemura, Y., dan Majeed, Z. 2017. Optimisation of Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE) of Allicin from Garlic (*Allium sativum* L.). *Chemical Engineering Transactions*, 56, 1747–1752.
- Megawati, D. S., Fasya, A. G., Pratiwi, R. A., dan Maghfiroh, N. 2020. Pharmacology Potency of Thin Layer Chromatography Steroid Isolates of *Chlorella sp.* Chloroform Fraction. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 456(1).
- Millati, N. 2016. Uji Toksisitas dengan Metode BSLT Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella sp.* *Skripsi.* Malang. Jurusan Kimia. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Molyneux, P. 2004. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 26, 211–219.
- Motulsky, H dan Christopolus, A. 2003. *Fitting Models to Biological Data using Linear and Nonlinear Regression. A Practical Guide to Curve Fitting.* San Diego: Graphpad Software Inc.
- Mufidah, A., Agustono, Sudarno, dan Nindarwi, D. D. 2017. Teknik Kultur *Chlorella sp.* Skala Laboratorium dan Intermediet di Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo Jawa Timur. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 7(2), 50–56.
- Muliati, Binti. 2018. Media Pendidikan (Seri Tafsir Tarbawi). *Jurnal Al-Hikmah.* Vol. 6, No.2: 57-61.
- Mulja, M., dan Suharman. 1995. *Analisis Instrumental.* Surabaya: Airlangga University Press.
- Nasrudin, Wahyono, Mustofa, dan Asmah Susidarti, R. 2017. Isolasi Senyawa Steroid dari Kukit Akar Senggugu (*Clerodendrum Serratum* L.Moon). *Pharmacon*, 6(3).

- Nisa, Zahrotun. 2018. Variasi roEluen pada Pemisahan Steroid dan Triterpenoid Fraksi Petrokeum Eter Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Kromatografi Kolom. *Skripsi*. Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Novianti, T., Zainuri, M., dan Widowati, I. 2019. Aktivitas Antioksidan Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella vulgaris* yang Dikultivasi Berdasarkan Sumber Cahaya yang Berbeda. *Barakuda*, 1(2), 72–87.
- Panji, T. 2012. *Teknik Spektroskopi untuk Elusidasi Struktur Molekul*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Pokorni. 2001. *Antioxidant In Food; Practical Applications*. New York: Crs Press.
- Prakash, A. 2001. Antioxidant Activity. Analytical Chemistry Medallion Laboratories. *Analytical Progress*, 10 (2).
- Pratama, A. N., dan Busman, H. 2020. Potensi Antioksidan Kedelai (*Glycine Max L*) Terhadap Penangkapan Radikal Bebas Pendahuluan. *Jurnal Ilmiah Kesehatan Sandi Husada*. 11(1), 497–504.
- Pratt. D.E, dan Hudson, B.J.F. 1990. Natural Antioxidant not Exploited Comercially. Food Antioxidant. *London: Elvisier Applied Science*.
- Prihantini, N. B., Damayanti, D., dan Yuniati, R. 2007. Pengaruh Konsentrasi Medium Ekstrak Tauge (MET) Terhadap Pertumbuhan Scenedesmus Isolat Subang. *MAKARA of Science Series*, 11(1), 1–9.
- Putri, D. S., Marianah, M., dan Ihromi, S. 2019. Isolasi Mikroalga Laut Dari Pantai Mapak Pulau Lombok. *Jurnal Agrotek UMMat*, 5(2), 91.
- Rafaelina, M., Rusram, Y., dan Amini, S. 2016. Pertumbuhan dan Aktivitas Antioksidan dari Mikroalga *Porphyridium cruentum* dan *Chlorella sp.* *Bioma*, 11(1), 12.
- Rengga, W. D. P., Prayoga, A. B., Asnafi, A., dan Triwibowo, B. 2019. Ekstraksi Minyak Mikroalgae *Skeletonema costatum* dengan Bantuan Gelombang Ultrasonik. *Jurnal Rekayasa Bahan Alam Dan Energi Berkelanjutan*, 3(1), 1–5.
- Rismiarti, A., Kusumaningrum, H. P., dan Zainuri, M. 2016. Karakterisasi dan Identifikasi Molekuler Fusan Hasil Fusi Protoplas Interspesies *Chlorella pyrenoidosa* dan *Chlorella vulgaris* Menggunakan 18SrDNA. *Bioma : Berkala Ilmiah Biologi*, 18(2), 30.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB Press.

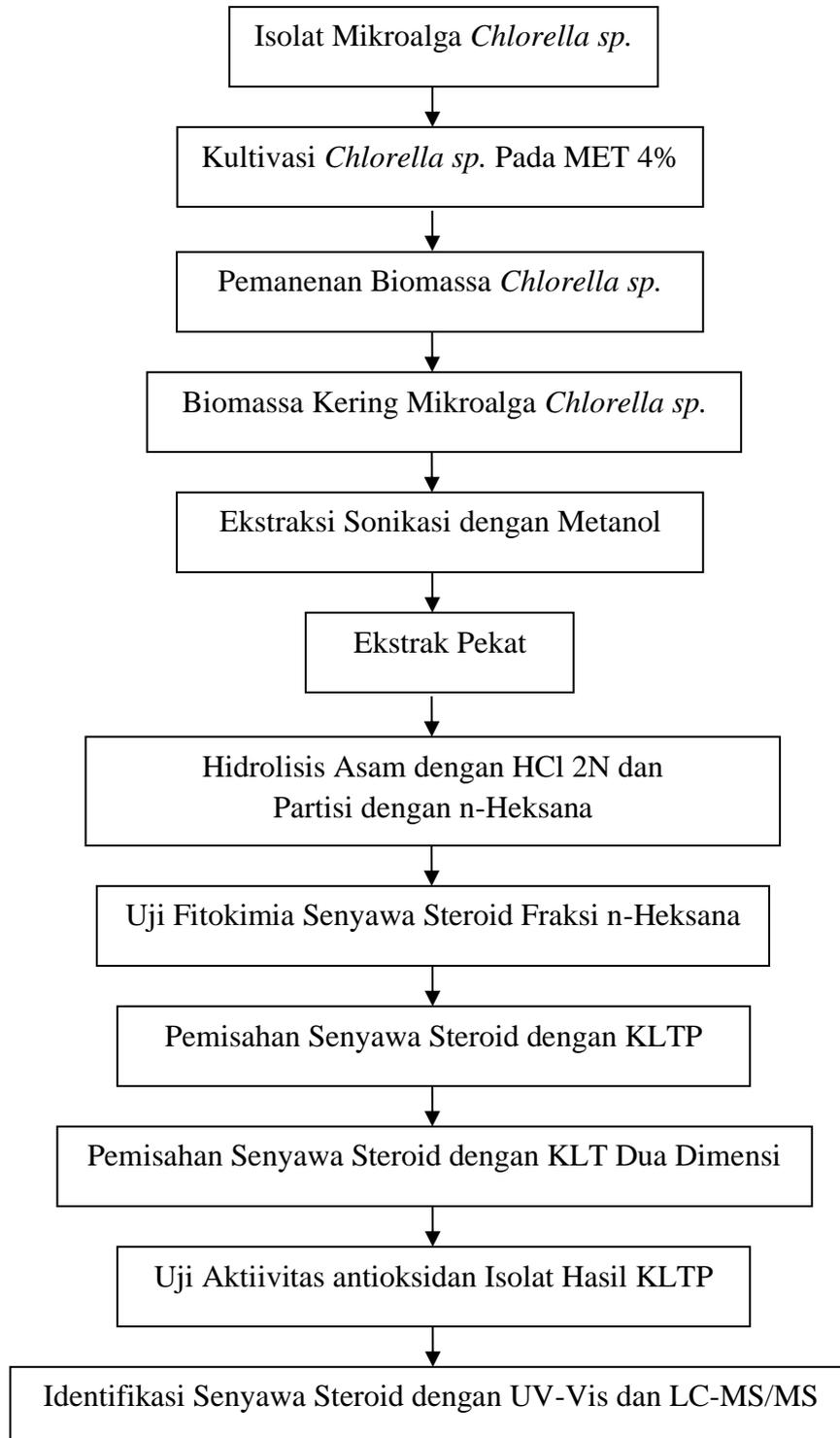
- Rofiqoh, Ainur. 2019. Variasi Diameter kolom pada Pemisahan Steroid dan Triterpenoid Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Kromatografi Kolom. *Skripsi*. Malang. Jurusan Kimia. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Rohmah, J., Rini, C. S., dan Wulandari, F. E. 2019. Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Selada Merah (*Lactuca sativa* var. *Crispa*) pada Berbagai Pelarut Ekstraksi dengan Metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test). *Jurnal Kimia Riset*, 4(1), 18.
- Rosahdi, T. D., Susanti, Y., dan Suhendar, D. 2015. Uji Aktivitas Daya Antioksidan Biopigmen Pada Fraksi Aseton dari Mikroalga *Chlorella vulgaris*. *Jurnal ISTEK*, IX(1), 1–16.
- Rumangu, A.V., Yudistira, A., dan Rotinsulu, H. 2019. Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Bunga Kana Merah (*Canna coccinea* Mill) Menggunakan DPPH. *Pharmacon*. Vol. 8, No. 3.
- Rupina, P., Mukarlina, dan Linda, R. 2015. Kultur Meristem Mahkota Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) dengan Penambahan EkstrakTauge dan Benzyl Amino Purin (BAP). *Protobiont*, 4(3), 31–35.
- Safitri, D.A. 2016. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Kromatografi Kolom Cara Basah dan Kering. *Skripsi*. Malang. Jurusan Kimia. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Saifudin, Aziz. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian*. Yogyakarta: Deepublish Publisher.
- Saifudin, A., Suparti, Fuad, A., dan Da'i, M. 2006. Biotransformasi Kurkumin Melalui Kultur Suspensi Sel Daun *Catharanthus roseus* [L] G. Don Berbunga Merah. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*, 7(2), 92–102.
- Sastrohamidjojo, H. 2002. *Kromatografi Cetakan Keempat*. Yogyakarta: Liberty.
- Satriaji, D. E., Zainuri, M., dan Widowati, I. 2016. Study of Growth and N, P Content of Microalgae *Chlorella vulgaris* Cultivated in Different Culture Media and Light Intensity. *Jurnal Teknologi*, 78(4–2), 27–31.
- Savitri, Evika Sandi. 2008. *Rahasia Tumbuhan Berkhasiat Obat Perspektif Islam*. Malang: UIN Malang Press.
- Shihab, M. Quraish. *Tafsir Al-Mishbah, Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Quran*. Jakarta: Lentera Hati.

- Siadi, K. 2016. Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) sebagai Biopestisida yang Efektif dengan penambahan Larutan NaCl. *Jurnal MIPA*. 35 (1).
- Sonam, K.S dan Guleria, S. 2017. Synergistic Antioxidant Activity of Natural Product. *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics*, 2(8): 1-6.
- Suhara, N. A., Mauludiyah, E. N., Albab, L. U., dan Maulana, I. T. 2020. Isolasi Fraksi Senyawa Aktif Antibakteri Staphylococcus epidermidis dari *Chlorella vulgaris* B Sebagai Bahan Aktif antiseptik. *Jurnal Ilmiah Farmasi Farmasyifa*, 3(1), 18–25.
- Suryelita, Etika, S.B., dan Kurnia, N.S . 2017. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Steroid dari Daun Cemara Natal (*Cupressus funebris* Endl.). *Eksakta*, 37(3), 193–203.
- Susanty, D., Oksari, A. A., dan Izani, R. 2019. Metabolit Sekunder pada Ekstrak *Chlorella sp.* yang Dikultur pada Media Limbah Ternak Ayam. *Chempublish Journal*, 4(2), 52–61.
- Tamat SR, Wikanta T, Maulina LS. 2007. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Rumput Laut Hijau *Ulva reticulata* Forsskal. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* 5(1), 31-36
- Underwood, A. L., dan Day. 1980. *Analisis Kimia Kuantitatif Ed ke-4*. Jakarta: Erlangga.
- 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 Malang.
- Wang, B.J., Liu, C.T., Tseng, C.Y., Wu, C.P., dan Yu, Z.R. 2004. Hepatoprotective and Antioxidant Effects of *Blumea kanoi* Liu (Chao et Chuang) Extract and its Fractions Fractioned Using Supercritical CO<sub>2</sub> on CCL<sub>4</sub>-induced Liver Damage. *Food and Chemical Toxicology*, 42:609-617.
- Wang, T., Hicks, K. B., dan Moreau, R. 2002 Antioxidant Activity of Phytosterols, Oryzanol, and other Phytosterol Conjugates. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **79** 12 1201-6.
- Watson, dan David, G. 2009. *Analisis Farmasi, Edisi 2*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., Ma, H., dan Luo, X. 2018. Advances in Ultrasound Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Cash Crops – A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 48(July), 538–549.

- Widowati, I., Zainuri, M., Kusumaningrum, H., dan Mouget, J. 2015. Salina Sustainable Valorization of Indonesian Phytoplankton in Aquaculture: New Approaches to Control Infection Deseas. *Laporan Penelitian Kerjasama Luar Negeri Dan Publikasi Internasional*. Fakultas Kelautan Dan Perikanan. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kasinus.
- Wirosaputro, S., dan Sumarlina, T. 2018. *CHLORELLA: Makanan Kesehatan Global Alami*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Xiong, Q., Wilson, W.K., dan Pang, J. 2007. The Liebermann-Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangment of Cholestrol in Acid. *Lipids*. 42(1); 87-96.
- Xu, D. P., Zhou, Y., Zheng, J., Li, S., Li, A. N., dan Li, H.B. 2016. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Antioxidants from the Flower of *Jatropha Integerrima* by Response Surface Methodology. *Molecules*, 21(1), 1-12.
- Yudiawan, M.N. 2020. Uji Antioksidan Fraksi n-Heksana, Kloroform dan n-Butanol Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol *Hydrilla verticillata*. *Skripsi*. Malang. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- 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.

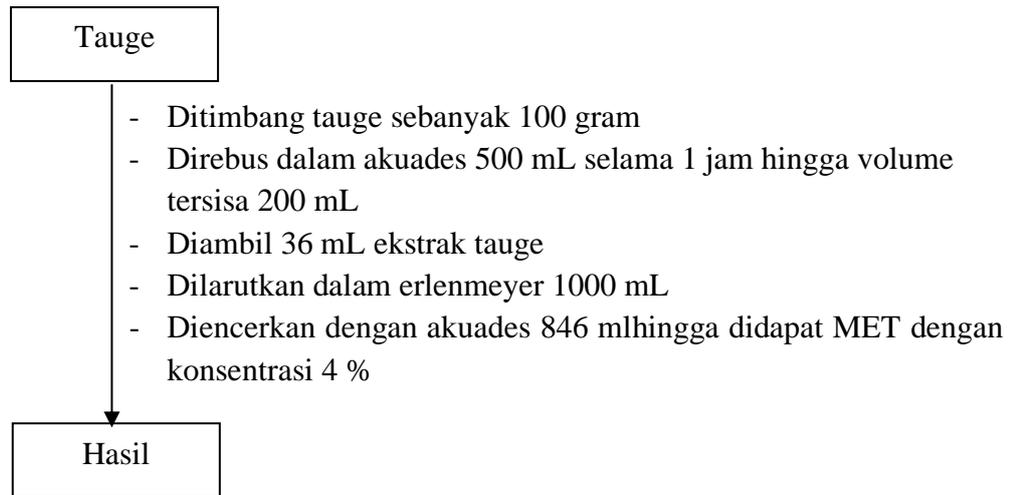
## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Rancangan Penelitian

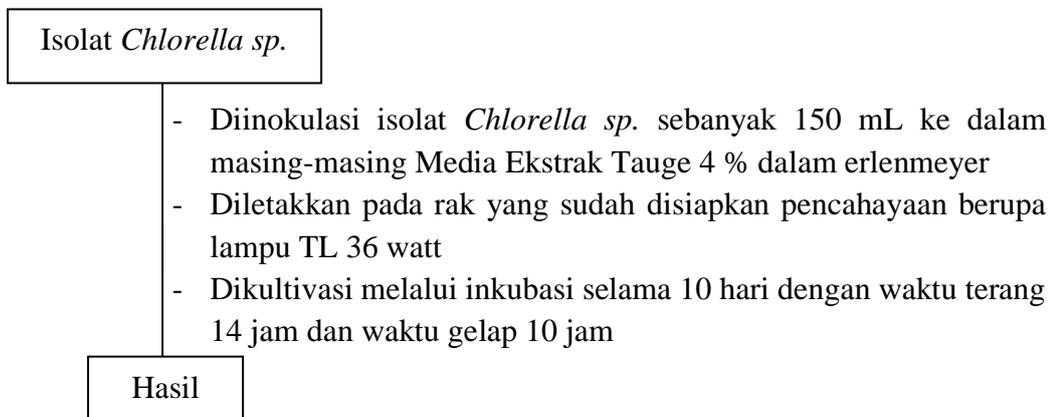


## Lampiran 2. Diagram Alir

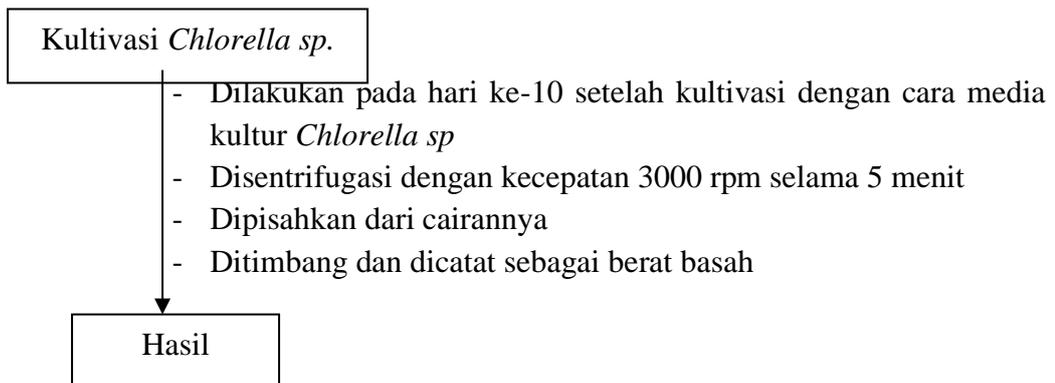
### L.2.1 Pembuatan Media Ekstrak Tauge 4 %



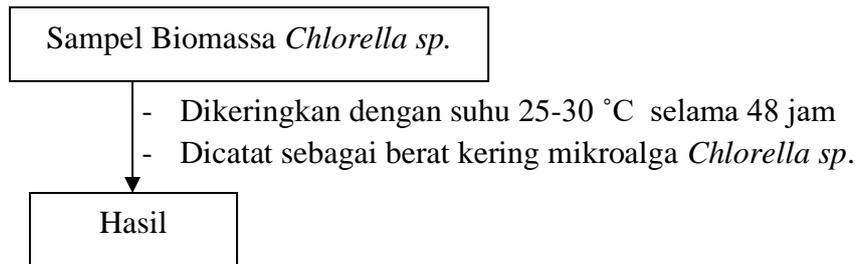
### L.2.2 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*



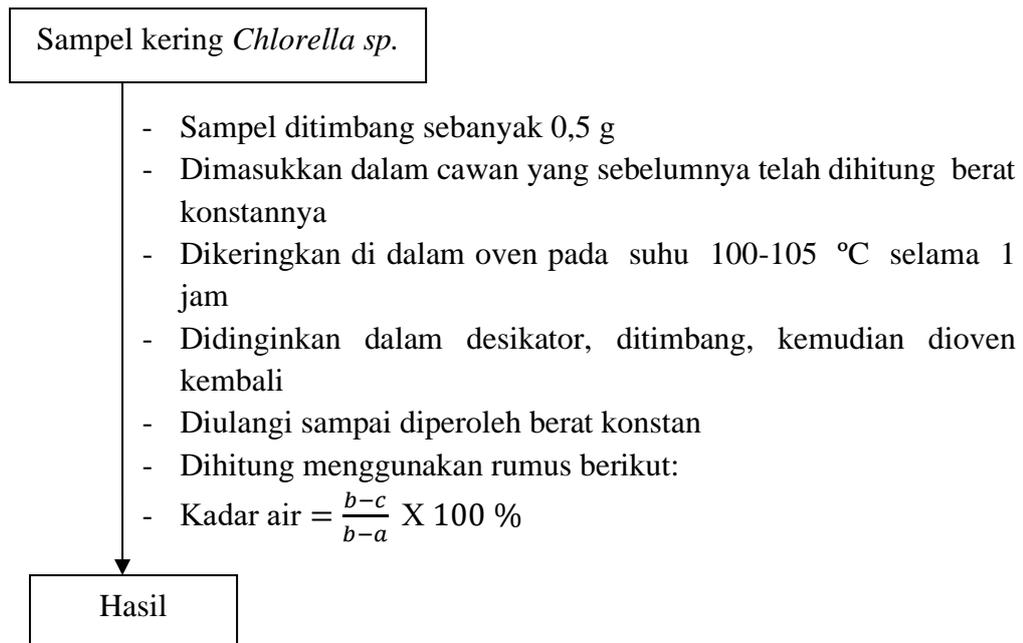
### L.2.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*



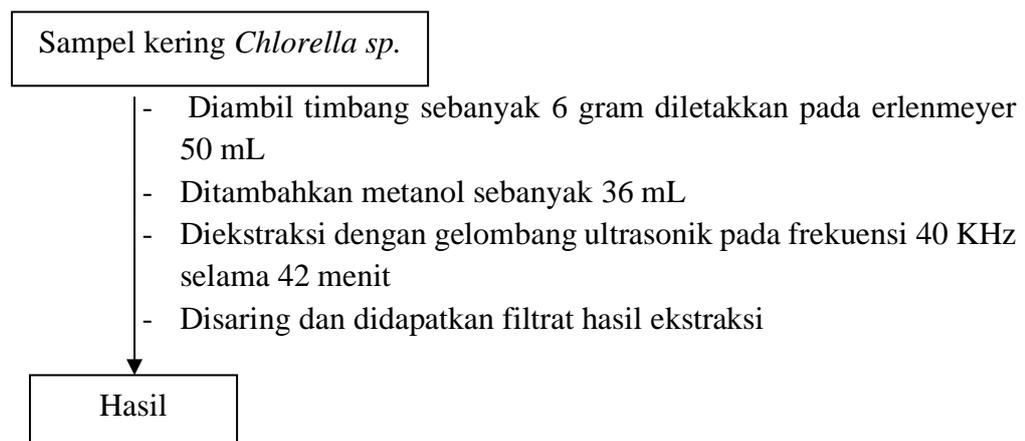
#### L.2.4 Preparasi Sampel Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*



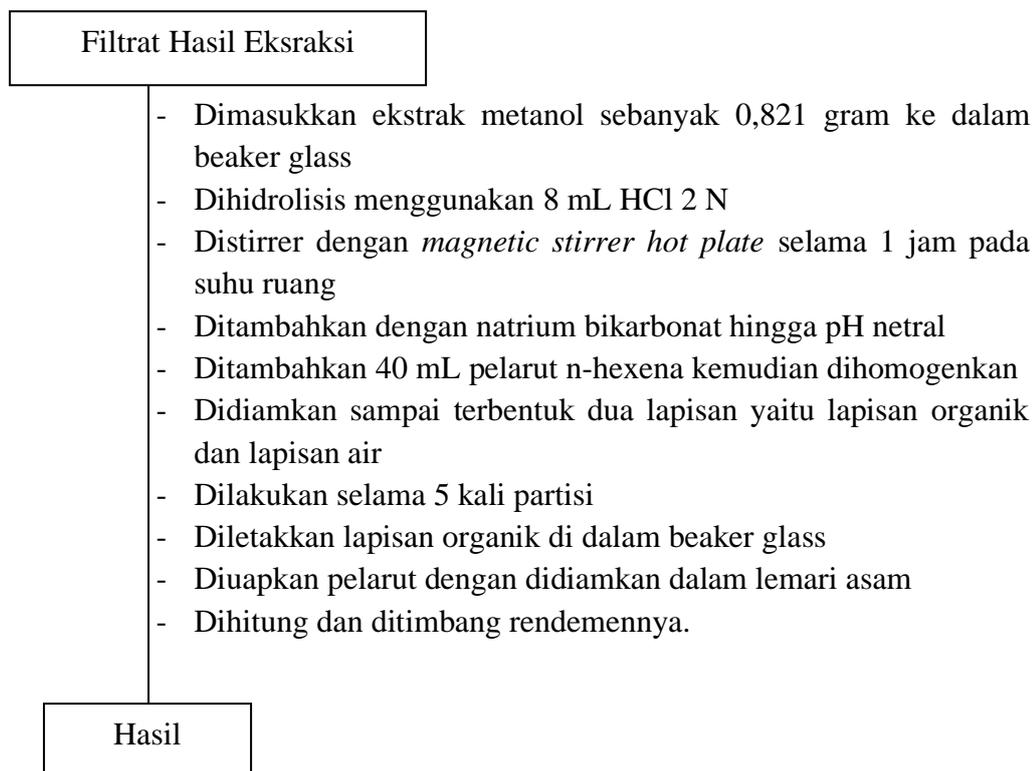
#### L.2.5 Penentuan kadar air mikroalga *Chlorella sp.*



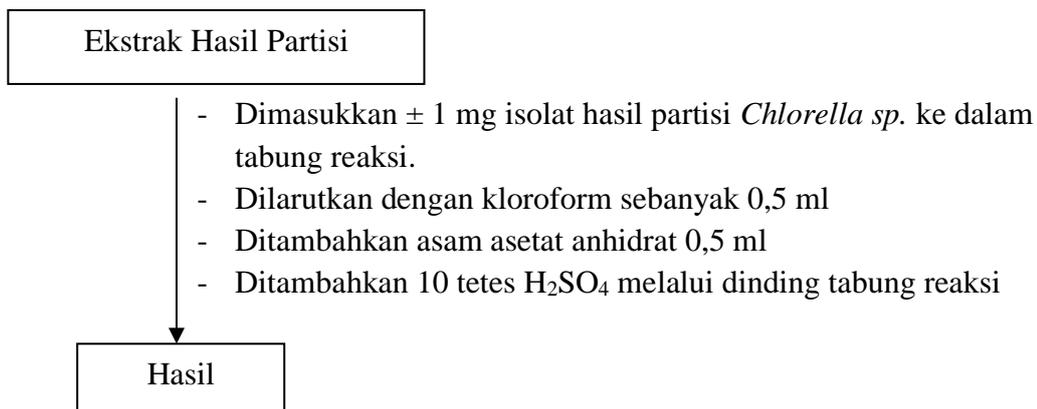
#### L.2.6 Ekstraksi Senyawa Steroid pada Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Metode Sonikasi



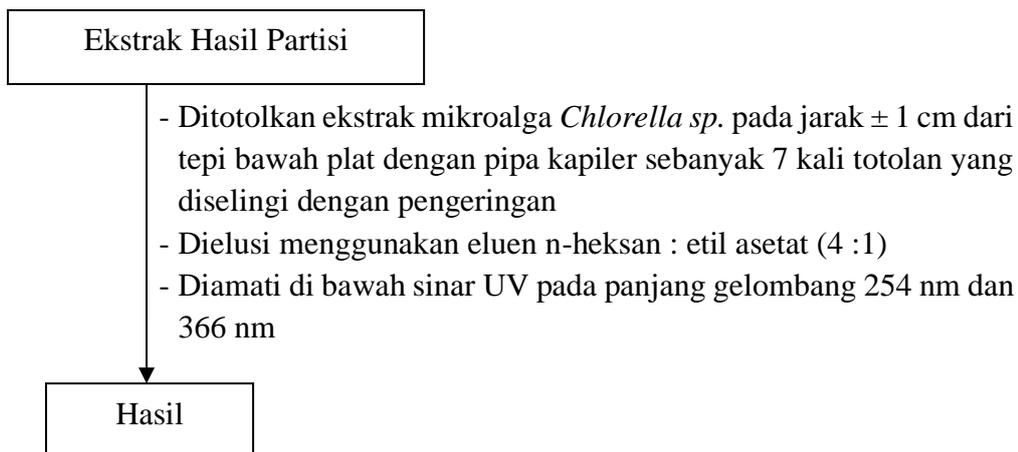
### L.2.7 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Peekat Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Fraksi n-Hexana



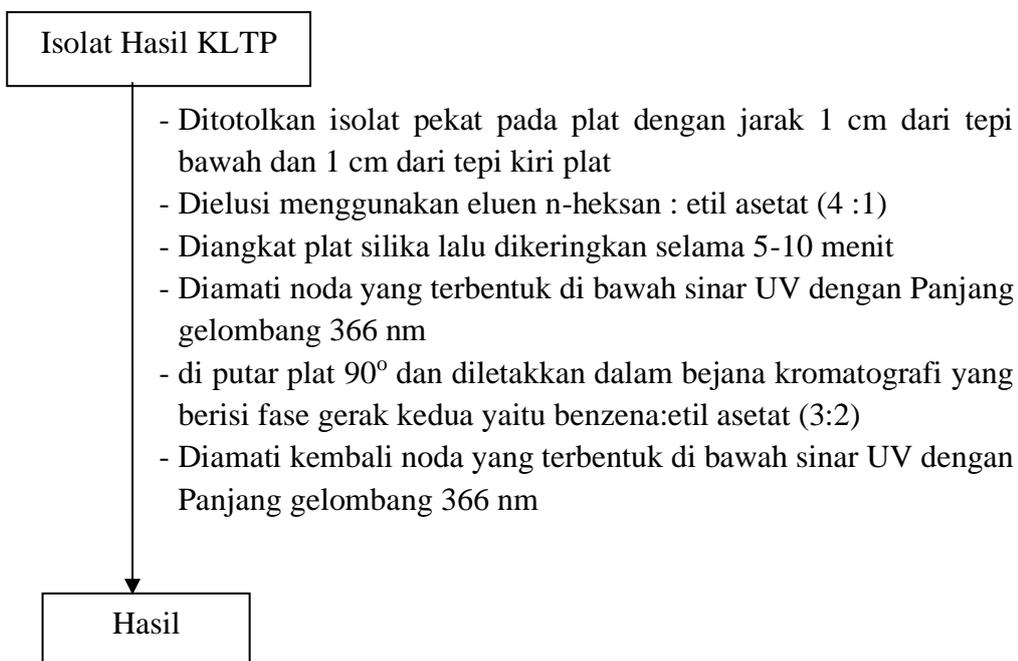
### L.2.8 Uji Fitokimia Senyawa Steroid Fraksi N-Heksana



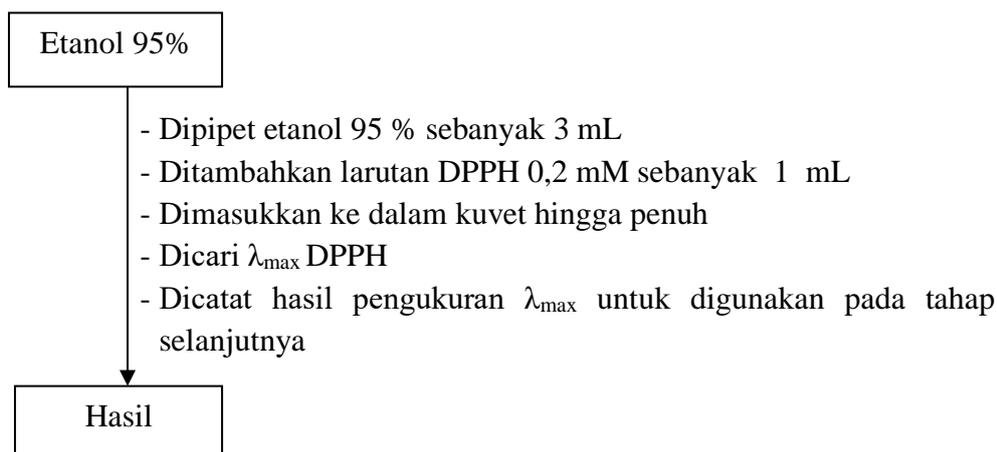
### L.2.9 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP



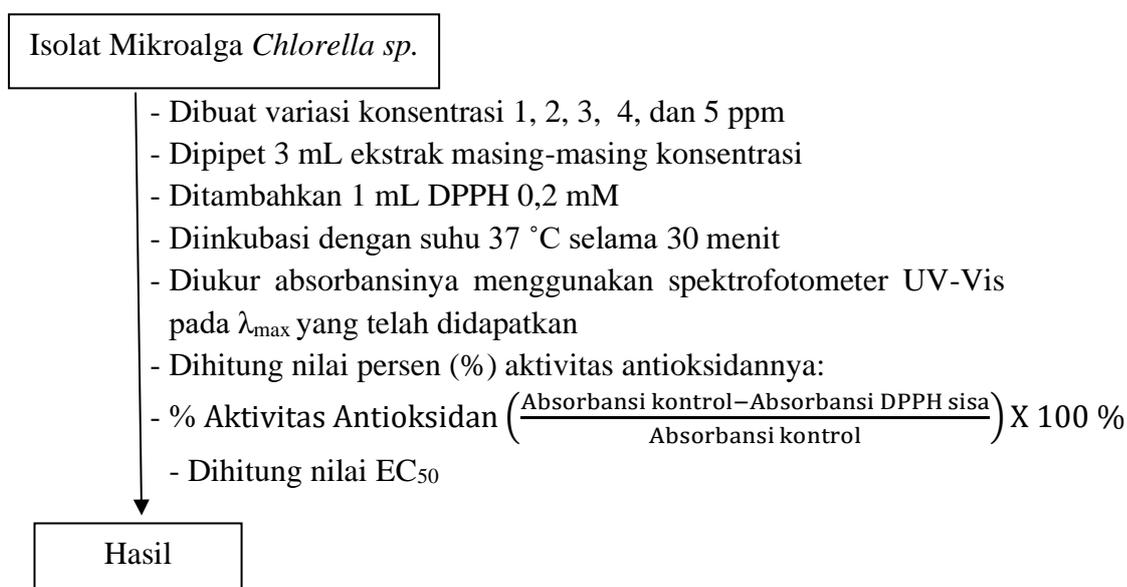
### L.2.10 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT Dua Dimensi



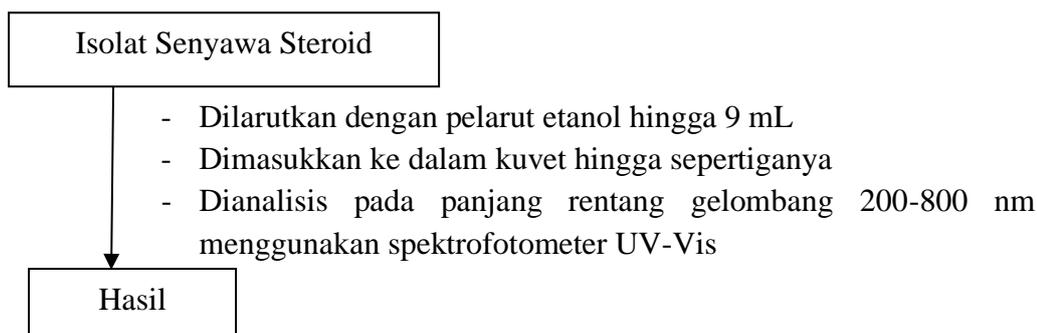
### L.2.11 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH



### L.2.12 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel



### L.2.13 Identifikasi Senyawa Steroid Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis



### Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan

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

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

##### a. Kultivasi dalam Botol Minuman 1000 mL

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

$$60x = 900 \text{ mL}$$

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

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

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

$$\text{Volume total} = 1050 \text{ mL}$$

##### b. Pembuatan MET 4% sebanyak 900 mL

MET = (akuades + ekstrak tauge)

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

$$\text{MET 4\%} = 36 \text{ mL ekstrak tauge}$$

$$\text{Volume Akuades} = \text{MET 4\%} - (\text{Volume Ekstrak Tauge})$$

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

$$\text{Volume Akuades} = 864 \text{ mL}$$

#### L.3.2 Pembuatan Larutan HCl 2 N

Pembuatan larutan HCl 2 N dapat dilakukan dengan menggunakan persamaan L.3.1.

- Berat jenis larutan HCl pekat = 1,267 g/mL
- Konsentrasi HCl = 37%
- Berat Molekul HCl = 36,5 g/mol
- $n = 1$  (jumlah ion  $H^+$ )
- $\text{mol} = \frac{\text{g HCl}}{\text{Mr HCl}} = \frac{37 \text{ g}}{36,5 \text{ g/mol}} = 1,014 \text{ mol}$
- Konversi ke mL =  $\frac{\text{berat larutan}}{\text{BJ HCl pekat}} = \frac{100 \text{ g}}{1,267 \text{ g/mL}} = 78,9 \text{ mL} = 0,0789 \text{ L}$

$$\bullet \quad M = \frac{\text{mol}}{\text{L}} = \frac{1,014 \text{ mol}}{0,0789 \text{ L}} = 12,85 \text{ M}$$

$$N \text{ HCl} = n \times \text{Molaritas HCl} \dots \dots \dots (\text{L.3.1})$$

$$N = 1 \times 12,85 \text{ N} = 12,85 \text{ N}$$

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

$$12,85 \text{ N} \times V_1 = 2 \text{ N} \times 100 \text{ ml}$$

$$V_1 = 15,6 \text{ mL}$$

Adapun prosedur pembuatannya adalah diambil HCl pekat 37% sebanyak 15,6 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL yang berisi 15 mL akuades. Selanjutnya ditambahkan akuades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen.

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

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

### L.3.4 Pembuatan Eluen n-heksana dan Etil Asetat untuk KLTP

Eluen n-heksana dan etil asetat yang digunakan untuk KLTP dibuat sebanyak 20 ml dengan perbandingan 4:1. Volume n-heksana yang digunakan adalah 16 ml dan etil asetat adalah 4 ml. selanjutnya, campuran dijenuhkan dalam *chamber* KLT.

### L.3.5 Pembuatan Larutan DPPH 0,2 mM

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

$$Mr \text{ DPPH} = 394,33 \text{ g/mol}$$

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

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

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

$$\begin{aligned}
 \text{mg DPPH} &= 0.004 \text{ mmol} \times \text{Mr DPPH} \\
 &= 0.004 \text{ mmol} \times 394.33 \text{ mg/mmol} \\
 &= 1.6 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

Prosedur pembuatannya yaitu ditimbang DPPH sebanyak 1,6 mg (0,0016 gram) dalam gelas beaker dan dilarutkan dalam etanol 95%. Masukkan DPPH ke dalam labu ukur 20 ml lalu ditandabatkan dengan etanol 95% kemudian dihomogenkan.

### **L.3.6 Pembuatan Larutan Stok Isolat 15 220 ppm**

$$\begin{aligned}
 \text{ppm} &= \frac{\text{mg}}{L} \\
 220 &= \frac{\text{mg}}{0.01 L} \\
 \text{mg} &= 2.2
 \end{aligned}$$

Untuk membuat larutan stok dengan konsentrasi 220 ppm sebanyak 10 ml diperlukan isolat sebanyak 2,2 mg. Prosedur pembuatan diawali dengan melarutkan 2,2 mg isolat dalam labu ukur 10 ml, lalu ditandabatkan dan dihomogenkan.

### **L.3.7 Pembuatan Larutan Stok Isolat 17 200 ppm**

$$\begin{aligned}
 \text{ppm} &= \frac{\text{mg}}{L} \\
 200 &= \frac{\text{mg}}{0.01 L} \\
 \text{mg} &= 2
 \end{aligned}$$

Untuk membuat larutan stok dengan konsentrasi 200 ppm sebanyak 10 ml diperlukan isolat sebanyak 2 mg. Prosedur pembuatan diawali dengan melarutkan 2 mg isolat dalam labu ukur 10 ml, lalu ditandabatkan dan dihomogenkan.

### **L.3.8 Pembuatan Larutan Stok Isolat 18 290 ppm**

$$\begin{aligned}
 \text{ppm} &= \frac{\text{mg}}{L} \\
 290 &= \frac{\text{mg}}{0.01 L} \\
 \text{mg} &= 2.9
 \end{aligned}$$

Untuk membuat larutan stok dengan konsentrasi 290 ppm sebanyak 10 ml diperlukan isolat sebanyak 2,9 mg. Prosedur pembuatan diawali dengan melarutkan 2,9 mg isolat dalam labu ukur 10 ml, lalu ditandabatkan dan dihomogenkan.

### L.3.9 Pengukuran Potensi Antioksidan pada Sampel

Konsentrasi larutan sampel yang digunakan untuk pengukuran potensi antioksidan dibuat dengan variasi konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm. Variasi konsentrasi isolat steroid dapat diperoleh dari mengencerkan larutan stok sampel 220 ppm pada isolat 15.

- **Larutan Sampel 1 ppm**

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

$$220 \text{ ppm} \times V_1 = 1 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{5 \text{ ml} \times 1 \text{ ppm}}{220 \text{ ppm}} = 0,02 \text{ mL}$$

- **Larutan Sampel 3 ppm**

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

$$220 \text{ ppm} \times V_1 = 3 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{5 \text{ ml} \times 3 \text{ ppm}}{220 \text{ ppm}} = 0,06 \text{ mL}$$

- **Larutan Sampel 5 ppm**

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

$$220 \text{ ppm} \times V_1 = 5 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{5 \text{ ml} \times 5 \text{ ppm}}{220 \text{ ppm}} = 0,11 \text{ mL}$$

- **Larutan Sampel 2 ppm**

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

$$220 \text{ ppm} \times V_1 = 2 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{5 \text{ ml} \times 2 \text{ ppm}}{220 \text{ ppm}} = 0,04 \text{ mL}$$

- **Larutan Sampel 4 ppm**

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

$$220 \text{ ppm} \times V_1 = 4 \text{ ppm} \times 5 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{5 \text{ ml} \times 4 \text{ ppm}}{220 \text{ ppm}} = 0,09 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya yaitu dengan memipet sebanyak volume masing-masing konsentrasi larutan ke dalam vial, lalu diuapkan dan ditambahkan 5 ml etanol 95% dan dihomogenkan. Ulangi perlakuan di atas untuk menentukan potensi antioksidan pada isolat 17 dan 18.

## Lampiran 4. Data Pengamatan dan Perhitungan

### L.4.1 Data Pengukuran Kadar Air

Tabel L.4.1.1 Data berat cawan kosong

Ulangan Cawan	Berat Cawan Kosong (g)				Berat Konstan (g)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
1	57,175	57,146	57,144	57,146	57,145
2	53,726	53,628	53,626	53,625	53,626
3	56,290	56,273	56,274	56,270	56,272

Tabel L.4.1.2 Data berat cawan + sampel 0,5 gr

Ulangan Cawan	Berat Cawan Kosong (g)				Berat Konstan (g)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
1	57,675	57,623	57,624	57,622	57,623
2	54,126	54,077	54,074	54,075	54,075
3	56,790	56,738	56,737	56,739	56,738

#### 1. Kadar Air Sampel 1

$$\text{Kadar Air} = \frac{b-c}{b-a} \times 100\%$$

a = bobot cawan kosong

b = bobot sampel + cawan sebelum dipanaskan

c = bobot cawan + sampel setelah dipanaskan

$$\begin{aligned}\text{Kadar Air} &= \frac{(57,675-57,623)\text{gr}}{(57,675-57,145)\text{gr}} \times 100\% \\ &= \frac{0,052 \text{ gr}}{0,5 \text{ gr}} \times 100\% \\ &= 10,4\%\end{aligned}$$

#### 2. Kadar Air Sampel 2

$$\begin{aligned}\text{Kadar Air} &= \frac{(54,126-54,075)\text{gr}}{(54,126-53,626)\text{gr}} \times 100\% \\ &= \frac{0,051 \text{ gr}}{0,5 \text{ gr}} \times 100\% \\ &= 10,2\%\end{aligned}$$

#### 3. Kadar Air Sampel 3

$$\begin{aligned}\text{Kadar Air} &= \frac{(56,790-56,738)\text{gr}}{(56,790-56,272)\text{gr}} \times 100\% \\ &= \frac{0,052 \text{ gr}}{0,5 \text{ gr}} \times 100\% \\ &= 10,4\%\end{aligned}$$

Tabel 4.1.3 Hasil Analisis Kadar Air

Ulangan Cawan	Kadar Air (%)
Sampel 1	10,4
Sampel 2	10,2
Sampel 3	10,4
Rata-rata	10,33

#### L.4.2 Rendemen Hasil Sonikasi

Tabel L.4.2 Data Hasil Rendemen Sonikasi

Berat sampel (gr)	Berat wadah (gr)	Berat wadah + ekstrak pekat (gr)	Berat ekstrak pekat (gr)
6	63,260	64,081	0,821

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel awal}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,821 \text{ gr}}{6 \text{ gr}} \times 100\% \\
 &= 13,68 \%
 \end{aligned}$$

#### L.4.3 Rendemen Hasil Hidrolisis dan Partisi

Tabel L.4.3 Data Hasil Rendemen Fraksi

Berat ekstrak metanol yang dihidrolisis (gr)	Berat wadah (gr)	Berat wadah + fraksi n-heksana (gr)	Berat fraksi n- heksana (gr)
0,821	128,510	129,186	0,676

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{Berat fraksi n-heksana}}{\text{Berat ekstrak metanol}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,676 \text{ gr}}{0,821 \text{ gr}} \times 100\% \\
 &= 82,33 \%
 \end{aligned}$$

#### L.4.4 Perhitungan Nilai $R_f$ Pemisahan Isolat dengan KLTP

Contoh perhitungan nilai  $R_f$  pada spot 1

$$R_f = \frac{\text{Jarak tempuh spot}}{\text{Jarak tempuh fase gerak}} = \frac{0,30 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,0167$$

Tabel L.4.4 Data  $R_f$  Pemisahan dengan KLTP

No spot	Jarak tempuh spot (cm)	Jarak tempuh fase gerak (cm)	Nilai $R_f$
1	0,30		0,0167
2	1,30		0,0722
3	1,90		0,1056
4	2,45		0,1361
5	3,30		0,1633
6	3,80		0,2111
7	5,20		0,2889
8	5,85		0,3250
9	6,55	18	0,3633
10	7,90		0,4389
11	8,50		0,4722
12	9,60		0,5333
13	10,60		0,5889
14	11,70		0,650
15	13,45		0,7472
16	15,20		0,8444
17	15,95		0,8861
18	17,10		0,950

## L.4.5 Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Isolat KLTP

### L.4.5.1 Uji Aktivitas antioksidan isolat 15

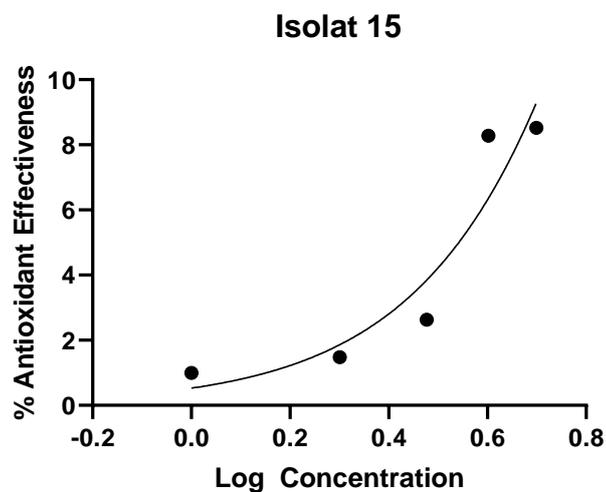
$$\begin{aligned} \text{\% Aktivitas Antioksidan} &= \left( \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs DPPH sisa}}{\text{Abs kontrol}} \right) \times 100 \% \\ &= \frac{(0.4834 - 0.4786)}{0.4834} \times 100\% \\ &= 0.993\% \end{aligned}$$

Kons (ppm)	Abs. Kontrol			Mean	Abs. Sampel			Mean	% Aktivitas Antioksidan
	Ulangan ke-				Ulangan ke-				
	1	2	3		1	2	3		
1	0.4835	0.4835	0.4834	<b>0.4834</b>	0.4790	0.4786	0.4783	<b>0.4786</b>	0.993
2	0.4863	0.4865	0.4870	<b>0.4866</b>	0.4792	0.4791	0.4799	<b>0.4794</b>	1.48
3	0.4869	0.4871	0.4864	<b>0.4868</b>	0.4749	0.4736	0.4734	<b>0.4740</b>	2.629
4	0.4850	0.4848	0.4849	<b>0.4849</b>	0.4448	0.4447	0.4445	<b>0.4447</b>	8.28
5	0.5882	0.5880	0.5881	<b>0.5881</b>	0.5381	0.5381	0.5378	<b>0.5380</b>	8.519

### Hasil Analisa Perhitungan Nilai EC<sub>50</sub> isolat 15

Comparison of Fits	Global (shared)
Null hypothesis	Can't calculate
Alternative hypothesis	Different curve for each data set
P value	One curve for all data sets
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	
Bottom	= 0.000
Top	= 100.0
LogEC50	1.237
HillSlope	1.839
<b>EC50</b>	<b>17.27</b>
Span	= 100.0
95% CI (profile likelihood)	
LogEC50	0.8978 to 2.960
HillSlope	0.5187 to 4.584
EC50	7.902 to 911.9
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	3
R squared	0.8892
Sum of Squares	6.125
Sy.x	1.429
Constraints	

Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
One curve for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0.000	
Top	= 100.0	
LogEC50	1.237	1.237
HillSlope	1.839	1.839
EC50	17.27	17.27
Span	= 100.0	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	0.8978 to 2.960	0.8978 to 2.960
HillSlope	0.5187 to 4.584	0.5187 to 4.584
EC50	7.902 to 911.9	7.902 to 911.9
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R squared	0.8892	0.8892
Sum of Squares	6.125	6.125
Sy.x		1.429
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
# of X values	5	
# Y values analyzed	5	



Gambar L.4.5.1 Grafik % aktivitas antioksidan terhadap log konsentrasi isolat 15

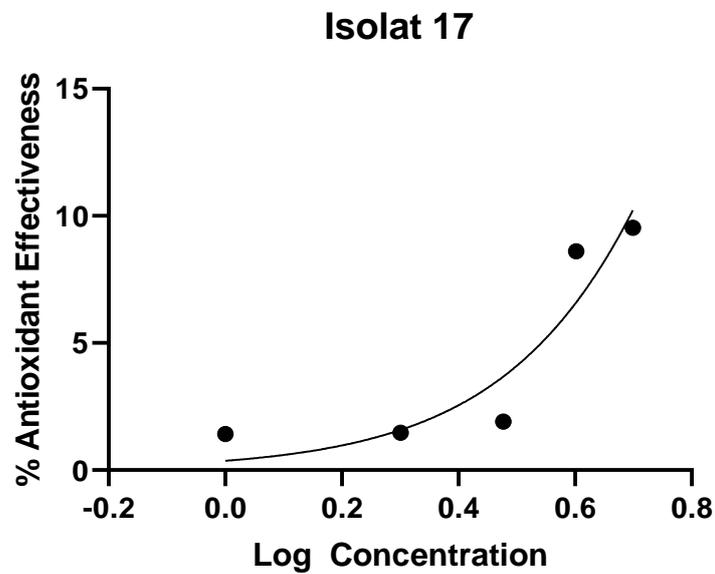
### L.4.5.2 Uji Aktivitas antioksidan isolat 17

Kons (ppm)	Abs. Kontrol			Mean	Abs. Sampel			Mean	% Aktivitas Antioksidan
	Ulangan ke-				Ulangan ke-				
	1	2	3		1	2	3		
1	0.4025	0.4025	0.4025	<b>0.4025</b>	0.3966	0.3970	0.3969	<b>0.3968</b>	1.416
2	0.3890	0.3892	0.3892	<b>0.3891</b>	0.3836	0.3833	0.3833	<b>0.3834</b>	1.465
3	0.5869	0.5866	0.5864	<b>0.5866</b>	0.5748	0.5757	0.5756	<b>0.5754</b>	1.909
4	0.5865	0.5865	0.5869	<b>0.5866</b>	0.5359	0.5359	0.5364	<b>0.5361</b>	8.609
5	0.5879	0.5872	0.5875	<b>0.5873</b>	0.5313	0.5314	0.5318	<b>0.5315</b>	9.532

### Hasil Analisa Perhitungan Nilai EC<sub>50</sub> isolat 17

Comparison of Fits	Global (shared)	
Null hypothesis	Can't calculate	
Alternative hypothesis	Different curve for each data set	
P value	One curve for all data sets	
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		
Bottom	= 0.000	
Top	= 100.0	
LogEC50	1.141	
HillSlope	2.136	
<b>EC50</b>	<b>13.83</b>	
Span	= 100.0	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	0.8424 to 3.158	
HillSlope	0.4731 to 6.071	
EC50	6.957 to 1440	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	
R squared	0.8703	
Sum of Squares	8.769	
Sy.x	1.710	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
One curve for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0.000	
Top	= 100.0	
LogEC50	1.141	1.141
HillSlope	2.136	2.136
EC50	13.83	13.83

Span	= 100.0	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	0.8424 to 3.158	0.8424 to 3.158
HillSlope	0.4731 to 6.071	0.4731 to 6.071
EC50	6.957 to 1440	6.957 to 1440
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R squared	0.8703	0.8703
Sum of Squares	8.769	8.769
Sy.x		1.710
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
# of X values	5	
# Y values analyzed	5	



Gambar L.4.5.2 Grafik % aktivitas antioksidan terhadap log konsentrasi isolat 1

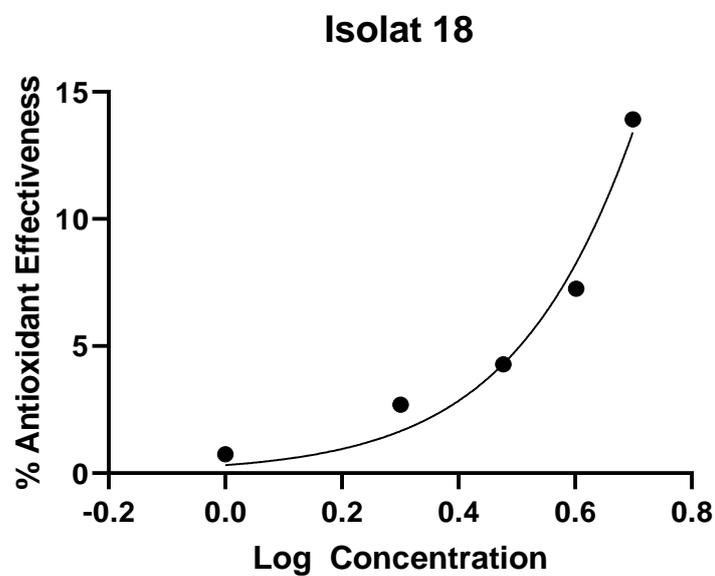
### L.4.5.3 Uji Aktivitas antioksidan isolat 18

Kons (ppm)	Abs. Kontrol			Mean	Abs. Sampel			Mean	% Aktivitas Antioksidan
	Ulangan ke-				Ulangan ke-				
	1	2	3		1	2	3		
1	0.4866	0.4867	0.4866	<b>0.4867</b>	0.4832	0.4833	0.4827	<b>0.4831</b>	<b>0.7397</b>
2	0.3853	0.3854	0.3854	<b>0.3854</b>	0.3755	0.3750	0.3744	<b>0.3750</b>	<b>2.69985</b>
3	0.3857	0.3854	0.3857	<b>0.3856</b>	0.3691	0.3692	0.3691	<b>0.3691</b>	<b>4.279</b>
4	0.5868	0.5865	0.5871	<b>0.5868</b>	0.5443	0.5439	0.5444	<b>0.5444</b>	<b>7.2597</b>
5	0.4016	0.4018	0.4015	<b>0.4016</b>	0.3461	0.3450	0.3460	<b>0.3457</b>	<b>13.9193</b>

### Hasil Analisa Perhitungan Nilai EC<sub>50</sub> isolat 18

Comparison of Fits		Global (shared)
Null hypothesis		Can't calculate
Alternative hypothesis		Different curve for each data set
P value		One curve for all data sets
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		
Bottom	= 0.000	
Top	= 100.0	
LogEC50	1.034	
HillSlope	2.420	
<b>EC50</b>	<b>10.81</b>	
Span	= 100.0	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	0.8867 to 1.324	
HillSlope	1.424 to 4.019	
EC50	7.703 to 21.08	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	
R squared	0.9757	
Sum of Squares	2.562	
Sy.x	0.9242	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
One curve for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0.000	
Top	= 100.0	
LogEC50	1.034	1.034
HillSlope	2.420	2.420
EC50	10.81	10.81

Span	= 100.0	
95% CI (profile likelihood)		
LogEC50	0.8867 to 1.324	0.8867 to 1.324
HillSlope	1.424 to 4.019	1.424 to 4.019
EC50	7.703 to 21.08	7.703 to 21.08
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R squared	0.9757	0.9757
Sum of Squares	2.562	2.562
Sy.x		0.9242
Constraints		
Bottom	Bottom = 0	
Top	Top = 100	
LogEC50	LogEC50 is shared	
HillSlope	HillSlope is shared	
Number of points		
# of X values	5	
# Y values analyzed	5	

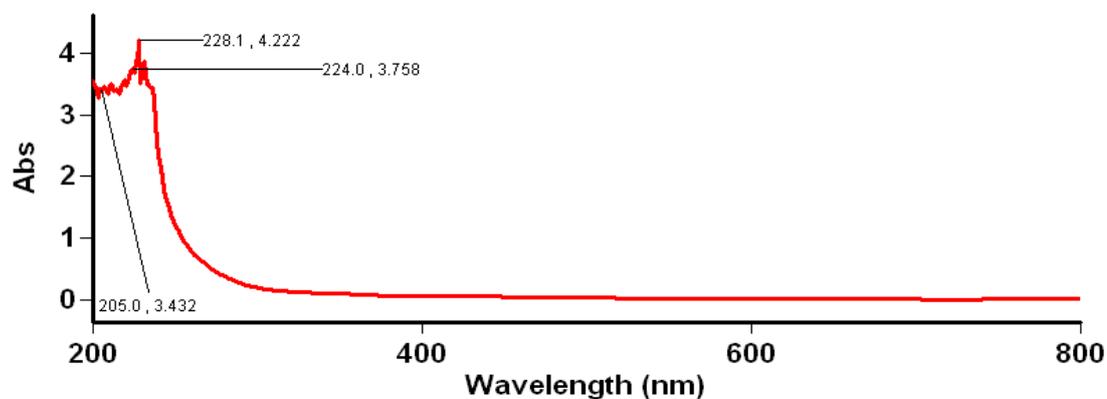


Gambar L.4.5.2 Grafik % aktivitas antioksidan terhadap log konsentrasi isolat 18

## L.4.6 Hasil Identifikasi Menggunakan UV Vis

# Lamdha Maks Chlorella Spot 15

Tanggal Analisa : 02 Juli 2021



## Scan Analysis Report

Report Time : Fri 02 Jul 02:32:26 PM 2021

Method:

Batch: D:\Ria\Lamdha Maks Chlorella Spot 15 Ulang (02-07-2021).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

Sample Name: Chlorella Spot 15

Collection Time 7/2/2021 2:32:34 PM

Peak Table

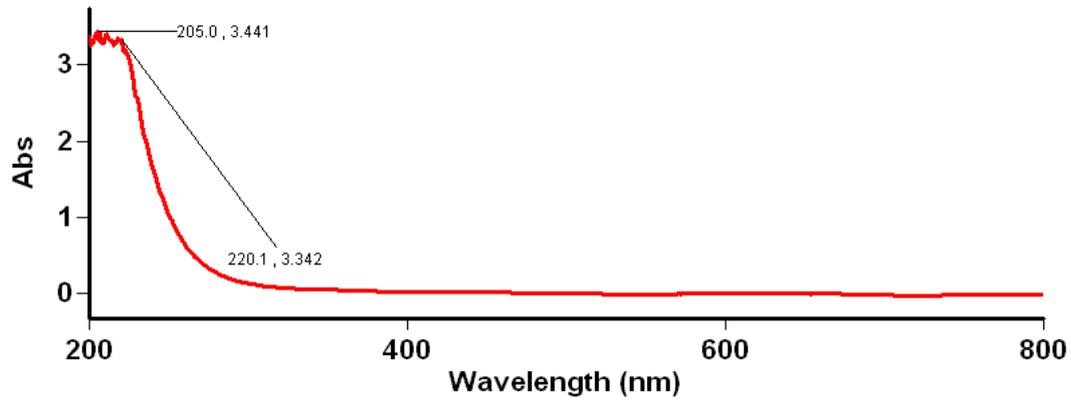
Peak Style	Peaks
Peak Threshold	0.0100
Range	800.0nm to 200.0nm

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

234.0	3.521
231.0	3.877
228.1	4.222
226.0	3.909
224.0	3.758
219.0	3.567
213.9	3.436
211.0	3.508
207.0	3.468
205.0	3.432

# Lamdha Maks Chlorella Spot 17

Tanggal Analisa : 02 Juli 2021



## Scan Analysis Report

Report Time : Fri 02 Jul 02:13:17 PM 2021

Method:

Batch: D:\Ria\Lamdha Maks Chlorella Spot 17 (02-07-2021).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

### Sample Name: Chlorella Spot 17

Collection Time 7/2/2021 2:13:19 PM

#### Peak Table

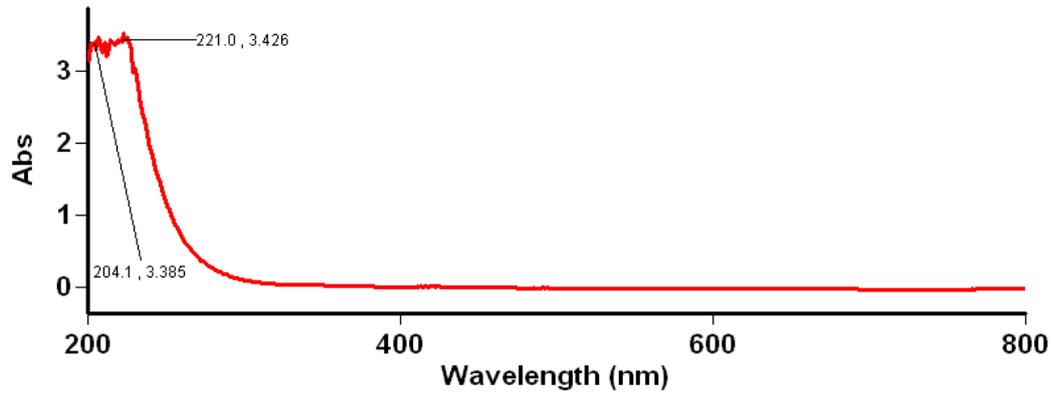
Peak Style	Peaks
Peak Threshold	0.0100
Range	800.0nm to 200.0nm

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

223.0	3.205
220.1	3.342
218.0	3.363
211.0	3.404
207.0	3.417
205.0	3.441

# Lamdha Maks Chlorella Spot 18

Tanggal Analisa : 02 Juli 2021



## Scan Analysis Report

Report Time : Fri 02 Jul 02:16:55 PM 2021  
 Method:  
 Batch: D:\Ria\Lamdha Maks Chlorella Spot 18 (02-07-2021).DSW  
 Software version: 3.00(339)  
 Operator: Rika

### Sample Name: Chlorella Spot 18

Collection Time 7/2/2021 2:16:58 PM

Peak Table  
 Peak Style Peaks  
 Peak Threshold 0.0100  
 Range 800.0nm to 200.0nm

Wavelength (nm)	Abs
595.0	-0.008
229.9	3.020
224.9	3.463
223.0	3.510
221.0	3.426
219.0	3.429
213.9	3.424
211.0	3.387
207.0	3.454
204.1	3.385
202.0	3.362

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



Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*



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 sesudah  
disentrifugasi

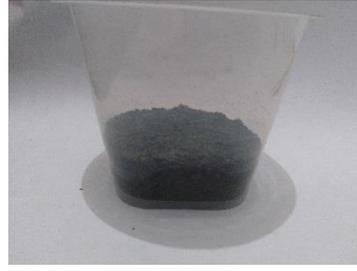


Biomassa pekat  
*Chlorella sp.*

### L.5.3 Preparasi Mikroalga *Chlorella sp.*



Pengeringan biomassa  
*Chlorella sp.*



Biomassa kering *Chlorella sp.*

### L.5.4 Penentuan Kadar Air Mikroalga *Chlorella sp.*



Penentuan kadar air *Chlorella sp.*



Penimbangan kadar air *Chlorella sp.*

### L.5.5 Ekstraksi Sonikasi Mikroalga *Chlorella sp.*



Sampel dilarutkan dengan metanol



Ekstraksi sonikasi dengan frekuensi 40 KHz



Penyaringan sampel



Filtrat hasil penyaringan



Ekstrak pekat mikroalga *Chlorella sp.*

### L.5.6 Hidrolisis dan Partisi



Hidrolisis dengan  
HCL 2N

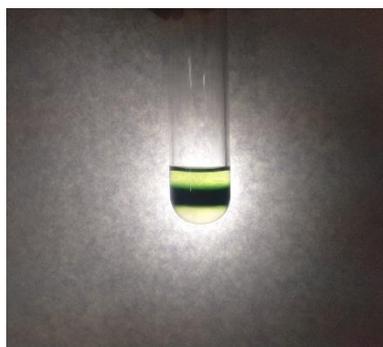


Partisi dengan pelarut  
n-heksana



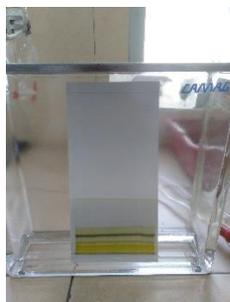
Fraksi n-heksana  
mikroalga *Chlorella sp*

### L.5.7 Uji Fitokimia Steroid



Pembentukan cincin hijau setelah  
direaksikan dengan LB

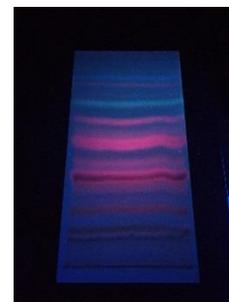
### L.5.8 Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)



Proses elusi plat KLT  
dalam eluen n-heksana:  
etil asetat (4:1)

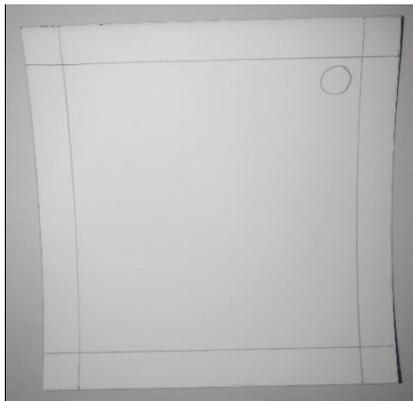


Visual hasil KLTP

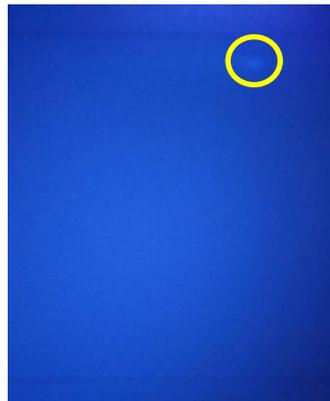


Visual hasil KLTP di  
bawah lampu UV 366 nm

### L.5.9 Pemisahan Isolat Steroid dengan KLT 2 Dimensi



Hasil pemisahan isolat 15



Isolat 15 di bawah sinar UV 366 nm



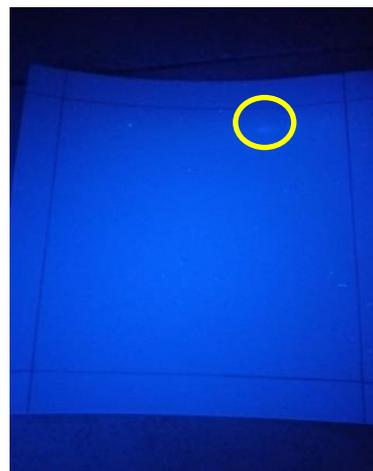
Hasil pemisahan isolat 17



Isolat 17 di bawah sinar UV 366 nm



Hasil pemisahan isolat 18



Isolat 18 di bawah sinar UV 366 nm