

**PEMISAHAN SENYAWA STEROID FRAKSI PETROLEUM ETHER (PE)
MIKROALGA *Chlorella sp.* DENGAN METODE
KROMATOGRAFI KOLOM PEMBUATAN FASA DIAM CARA BASAH
DAN KERING**

SKRIPSI

Oleh:
SINGGIH HANDOKO
NIM. 12630041



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2016**

**PEMISAHAN SENYAWA STEROID FRAKSI PETROLEUM ETER (PE)
MIKROALGA *Chrorella sp.* DENGAN METODE
KROMATOGRAFI KOLOM PEMBUATAN FASA DIAM BASAH DAN
KERING**

SKRIPSI

**Oleh:
Singgih Handoko
NIM. 12630041**

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

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2016**

**PEMISAHAN SENYAWA STEROID FRAKSI PETROLEUM ETER (PE)
MIKROALGA *Chrorella sp.* DENGAN METODE
KROMATOGRAFI KOLOM PEMBUATAN FASA DIAM CARA BASAH
DAN KERING**

SKRIPSI

**Oleh:
SINGGIH HANDOKO
NIM: 12630041**

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

- | | | |
|-----------------------|----------------------------|-----------|
| 1. Penguji Utama | : Suci Amalia, M.Sc | (.....) |
| | NIP. 19821101 200901 2 007 | |
| 2. Ketua Penguji | : Rachmawati Ningsih, M.Sc | (.....) |
| | NIP. 19810811 200801 2 010 | |
| 3. Sekretaris Penguji | : A. Ghanaim Fasya, M.Si | (.....) |
| | NIP. 19820616 200604 1 002 | |
| 4. Anggota Penguji | : Ahmad Abtokhi, M.Pd | (.....) |
| | NIP. 19761003 200312 1 004 | |

Mengetahui
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas Sains Dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

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

**PEMISAHAN SENYAWA STEROID FRAKSI PETROLEUM ETHER (PE)
MIKROALGA *Chrorella* sp. DENGAN METODE
KROMATOGRAFI KOLOM PEMBUATAN FASA DIAM CARA BASAH
DAN KERING**

SKRIPSI

**Oleh:
SINGGIH HANDOKO
NIM: 12630041**

Telah Disetujui Oleh

Pembimbing I

Pembimbing II

A.Ghanaim Fasya, M.Si

NIP. 19820616 200604 1 002

Ahmad Abtokhi, M.Pd

NIP. 19761003 200312 1 004

Mengetahui
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas Sains Dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

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

LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini,

Nama : Singgih Handoko

NIM : 12630041

Jurusan : Kimia

Angkatan Tahun/Semester : 2012/8

Menyatakan bahwa penelitian yang berjudul:

Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter (PE) Mikroalga *Chlorella* sp. Dengan Metode Kromatografi Kolom Pembuatan Fasa Diam Basah dan Kering Merupakan karya yang dapat dipertanggung jawabkan orisinalitasnya. Apabila di kemudian hari ditemukan kecurangan maka saya bersedia penelitian ini dibatalkan, mengembalikan dana bantuan penelitian dan menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Malang, 30 Juni 2016

Singgih Handoko
NIM. 12630041

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penyusun ucapkan atas terselesaikannya skripsi dengan judul “**PEMISAHAN SENYAWA STEROID FRAKSI PETROLEUM ETHER (PE) MIKROALGA *Chrorella* sp. DENGAN METODE KROMATOGRAFI KOLOM PEMBUATAN FASA DIAM CARA BASAH DAN KERING**”. Skripsi ini mungkin belum sempurna, namun penyusun dengan segenap hati berharap semoga dari apa yang penyusun upayakan ini dapat bermanfaat bagi kita semua. Skripsi ini dimaksudkan sebagai salah satu syarat untuk memenuhi kewajiban jenjang S1.

Selama proses penyusunan skripsi ini penyusun mendapat banyak bimbingan, nasihat dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penyusun mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Mudjia Raharjo, M. Si, selaku rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Elok Kamilah Hayati, M. Si, selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. A. Ghanaim Fasya, M. Si, selaku dosen pembimbing skripsi yang telah memberikan bimbingan, pengarahan dan nasehat kepada penyusun dalam menyelesaikan laporan penelitian ini.
4. Rachmawati Ningsih, M. Si, selaku dosen konsultan yang telah memberikan pengarahan, bimbingan dan nasehat kepada penyusun selama menyelesaikan laporan penelitian ini.
5. Ahmad Abtokhi, M.Pd, selaku dosen pembimbing dua yang telah memberikan bimbingan, pengarahan dan nasehat kepada penyusun dalam menyelesaikan laporan penelitian ini.
6. Orang tua tercinta yang pernah maupun masih banyak memberikan nasihat, doa dan dukungan baik moril maupun materil yang tak mungkin terbalaskan juga keluarga besar penyusun.
7. Seluruh Dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah mengalirkan ilmu, pengetahuan,

pengalaman, wacana dan wawasannya sebagai pedoman dan bekal bagi penyusun.

8. Seluruh staf laboratorium dan staf administrasi Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang atas bantuan dan arahnya selama proses penelitian.
9. Teman-teman Jurusan Kimia angkatan 2012 khususnya grup Mikroalga, teman segrup seperjuangan dan grup makroalga yang siap sedia membantu, menyemangati dan memberi motivasi dalam suka maupun duka dalam penelitian ini.
10. Semua mahasiswa Kimia Angkatan 2012 Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberi motivasi, informasi dan masukannya kepada penyusun dalam menyelesaikan laporan penelitian ini.
11. Semua rekan-rekan dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala bantuan dan motivasinya kepada penyusun.

Semoga skripsi yang ditulis oleh penulis ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis sendiri dan umumnya bagi pembaca. Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis memohon saran dan kritik yang sifatnya membangun terutama dalam bidang ilmu pengetahuan, khususnya bidang kimia. Bagi para pihak yang telah membantu dalam penulisan skripsi ini semoga segala amal dan kebbaikannya mendapatkan balasan yang berlimpah dari Allah SWT, Amin.

Malang, 30 Juni 2016

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR PERSAMAAN REAKSI	xi
 BAB I PENDAHULUAN.....	 1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.4 Batasan Masalah	6
1.5 Manfaat Penelitian	6
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	 7
2.1 Tumbuhan dalam Al Qur'an.....	7
2.2 Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	10
2.3 Kultur <i>Chlorella sp.</i>	11
2.3.1 Kultivasi <i>Chlorella sp.</i> dalam MET	11
2.4 Manfaat dan Kandungan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	13
2.4.1 Steroid.....	14
2.4 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	15
2.4.1 Ekstraksi Maserasi	15
2.4.2 Hidrolisis dan Partisi	17
2.5 Kromatografi Kolom	18
2.5.1 Pengisian Kolom Cara Basah	20
2.5.2 Pengisian Kolom Cara Kering	20
2.6 Identifikasi Senyawa Aktif Menggunakan FTIR	22
 BAB III METODOLOGI PENELITIAN	 26
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan	26
3.2 Alat dan Bahan	26
3.2.1 Alat	26
3.2.2 Bahan.....	26
3.3 Rancangan Penelitian	26
3.4 Tahapan Penelitian.....	27
3.5 Cara Kerja	27
3.5.1Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	27

3.5.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge.....	27
3.5.1.2 Kultivasi <i>Chlorella sp</i> dalam Medium Ekstrak Tauge ...	28
3.5.2 Pemanenan Mikroalga <i>Chlorella sp</i>	28
3.5.3 Penentuan Kadar Air Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	28
3.5.4 Ekstraksi Maserasi Biomassa <i>Chlorella sp.</i>	30
3.5.5 Hidrolisis dan Partisi Ekstak Pekat Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	30
3.5.6 Pemisahan Senyawa Steroid <i>chlorella sp.</i> Dengan Kromatografi Kolom.....	31
3.5.7 Monitoring dengan KLT-Analitik	31
3.5.8 Identifikasi Senyawa Steroid dengan FTIR	31
3.6 Analisa Data	32
BAB IV PEMBAHASAN	
4.1 Kultivasi <i>Chlorella sp.</i> Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	33
4.2 Pemanenan Biomassa <i>Chlorella Sp.</i>	35
4.3 Analisi Kadar Air Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	35
4.4 Ekstraksi Maserasi Biomassa <i>Chlorella sp.</i> dengan pelarut metanol ..	37
4.5 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol Mikroalga <i>Chlorella</i> <i>sp.</i>	37
4.6 Pemisahan Senyawa Steroid <i>Chlorella sp.</i> dengan Kromatografi Kolom.....	38
4.7 Monitoring dengan KLT-Analitik.....	40
4.8 Identifikasi Gugus Fungsi Steroid dengan FTIR	43
4.9 Pemanfaatan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> Menurut Prospektif Islam	45
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	50
5.2 Saran.....	50
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Kurva pertumbuhan mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	12
Gambar 2.2 Struktur inti senyawa steroid	15
Gambar 2.3 Dugaan reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida	17
Gambar 2.4 Hasil spectra FTIR isolate <i>Chlorella sp.</i>	24
Gambar 2.5 Spektra IR Fitosterol	25
Gambar 4.2 Hasil FTIR Gugus Fungsi Steroid.....	44
Gambar 4.3 Jenis Steroid Fitosterol	45



DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Hasil Monitoring Kolom Basah	42
Tabel 4.2 Hasil Monitoring Kolom Kering.....	43
Tabel 4.3 Intepretasi Spektra IR Steroid Hasil Kromatografi Kolom.....	44



DAFTAR PERSAMAAN REAKSI

Persamaan 4.1 Reaksi penetralan dengan natrium bikarbonat.....	38
--	----



ABSTRAK

Handoko, S. 2016. **PEMISAHAN SENYAWA STEROID FRAKSI PETROLEUM ETHER (PE) MIKROALGA *Chlorella* sp. DENGAN METODE KROMATOGRAFI KOLOM PEMBUATAN FASA DIAM CARA BASAH DAN KERING**

Pembimbing I: A. Ghanaime Fasya, M.Si; Pembimbing II: Ahmad Abthoki, M.Pd;
Konsultan: Rachmawati Ningsih, M.Si

Kata Kunci: Steroid, *Chlorella* sp, Kromatografi Kolom, KLT-Analitik

Steroid merupakan salah satu metabolit sekunder yang terdapat pada mikroalga *Chlorella* sp. yang dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan, antibakteri, dan toksisitas. Tujuan dari penelitian ini untuk memisahkan senyawa steroid fraksi petroleum eter hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp. dengan metode kromatografi kolom basah dan kering, serta identifikasi senyawa steroid dengan spektrofotometer FTIR.

Kultivasi mikroalga *Chlorella* sp. dilakukan dengan menggunakan medium ekstrak tauge (MET). Biomassa yang dihasilkan diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak metanol kemudian dihidrolisis dengan HCl 2 N dan dipartisi menggunakan pelarut petroleum eter. Hasil hidrolisis ekstrak metanol dilakukan proses pemisahan senyawa yang terdapat pada *Chlorella* sp. dengan menggunakan metode kromatografi kolom variasi pembuatan fasa diam cara basah dan kering, dimana fasa diam berupa silika gel dan fase gerak berupa eluen n-heksana:etil asetat (4:1). Senyawa hasil isolat kromatografi kolom dimonitoring dengan metode KLT analitik untuk mengetahui jenis senyawa tiap vialnya. Senyawa yang murni mengandung spot steroid diidentifikasi gugus fungsinya dengan spektrofotometer FTIR.

Hasil penelitian diperoleh randemen ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp. sebesar 21,8926 %, sedangkan randemen ekstrak hasil hidrolisis dan partisi sebesar 50,6299 %. Hasil kromatografi kolom pembuatan fasa diam cara basah diperoleh 214 vial, dengan 1 fraksi murni senyawa steroid dan 4 fraksi murni senyawa triterpenoid. Sedangkan hasil kromatografi kolom pembuatan fasa diam cara kering diperoleh 160 vial, dengan 1 fraksi murni senyawa steroid dan 1 fraksi murni senyawa triterpenoid. Identifikasi senyawa steroid dengan spektrofotometer FTIR yang dihasilkan menunjukkan bahwa isolat diduga merupakan jenis senyawa steroid fitosterol yang memiliki gugus fungsi C=C, C=O, C-OH tersier, -OH dan gem dimetil.

ABSTRACT

Handoko, S. 2016. **SEPARATION STEROID COMPOUND OF PETROLEUM FRACTION MICROALGAE *Chlorella* sp. USING COLUMN CHROMATOGRAPHY METHOD WITH PHASE DIAM TO WET AND DRY**

Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Supervisor II: Ahmad Abthoki, M.Pd;
Consultan: Rachmawati Ningsih, M.Si

Key Word: Steroid, *Chlorella* sp, Column Chromatography, TLC-Analytic

Steroids are one of the secondary metabolites contained in microalgae *Chlorella* sp. which can be used as an antioxidant, antibacterial, and toxicity. The purpose of this study to separate the steroid compound fractions of petroleum ether hydrolysis methanol extract of microalgae *Chlorella* sp. by column chromatography wet and dry, as well as the identification of steroid compounds with FTIR spectrophotometer.

Cultivation of microalgae *Chlorella* sp. done using bean sprouts extract medium. The biomass is then extracted by maceration using methanol. The methanol extracts subsequently hydrolysed and partitioned using petroleum ether. Results hydrolysis methanol extract of the separation process is carried compound contained in *Chlorella* sp. using column chromatography stationary phases of making wet method and dry method of making stationary phase, followed by the compound of the results of monitoring by TLC analytical column fractions to determine the compound contained in steroids. Pure compounds containing steroid spot identified functional groups by FTIR spectrophotometer.

The results were obtained randemen methanol extract of microalgae *Chlorella* sp. amounted to 21.8926%, while randemen extract hydrolysis and partition of 50.6299%. The results of column chromatography stationary phases of making wet method obtained 214 vials, with a 1 purified fraction of steroid compounds and 4 fractions of pure compounds triterpenoids. While the results of column chromatography stationary phases of making obtained 160 vials of dry way, with the first purified fraction of steroid compounds and one compound purified fraction triterpenoids. Identification of steroid compounds produced by FTIR spectrophotometer showed that isolates suspected to be the type of steroid compounds phytosterols which have functional groups C = C, C = O, C-OH tertiary, -OH and dimethyl gem.

الملخص

هندوكو، سينجي. 2016. تفصل الستيريويدي من جزء بترول الإيثر (PE) في الطحالب *Chrorella sp.* بطريق لوني العمود و تجعل مرحلة الوقف بطريق الرطب والجاف
المشرف الأول: احمد غناعم فاشا الماجستير، المشرف الثاني: أحمد ابطاكي الماجستير، مستشارة: رحماتى نينسيه الماجستير.

كلمات البحث: الستيريويدي *Chrorella sp.*، لوني العمود، التحليلي TLC

الستيريويدي هي احد من المركبات الثانوية في الطحالب شلوريلا والتي يمكن استخدامها في مضاد للأكسدة و مضاد للجراثيم و سمية. والغرض من هذه الدراسة لتفصل الستيريويدي من أجزاء بترول الإيثر التحلل تخرج من الميثانول في الطحالب شلوريلا بطريق تحليل بالماء وتحصلها بطريق لوني عمود الرطب والجاف، ثم تعرفها بأداة FTIR.

زراعة الطحالب شلوريلا باستخدام براعم الفاصوليا استخراج المتوسطة . و تحصل الكتلة الحيوية بعدها بطريق النقع باستخدام الميثانول. ثم تحليلها بحمض الهيدروكلوريك ثم تفصلها باستخدام بترول الإيثر. وبعدها تفصل نتائجها لوني العمود يستخدم مرحلة الوقف بطريق الرطب والجاف المختلفة، وكان مرحلة الوقف مثل هلام السيليكا و مرحلة المتحرك في شكل شاطئ ن الهكسان: خلاص الإيثيل (4: 1). ثم رصدتها بأساليب التحليلية TLC لتحديد نوعه من مجمع في القارورة. حددت مركبات نقية تحتوي على بقعة الستيريويدي المجموعات الوظيفية التي كتبه FTIR.

و حصول الدراسة نتائج تفصل الميثانول من الطحالب شلوريلا هي 21.8926٪، و نتائج تفصل الميثانول من المائي والجزء هي 50.6299٪. و نتائج لوني العمود من مراحل الوقف بطريقة الرطب هي 214 قارورة، مع جزء 1 جزء من الستيريويدي و 4 جزء من triterpenoids و نتائج لوني العمود من مراحل الوقف بطريقة الجافة هي 160 قارورة، مع 1 جزء من الستيريويدي و 1 جزء من triterpenoids. حصل من تحديد الستيريويدي بالمطياف FTIR تزعم أن النتائج نوع من فيتوسترولس الستيريويدي التي لديها المجموعة الوظيفية C=C و C=O و C-OH القطع الثالث، OH، والأحجار الكريمة ثنائي ميثيل.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tumbuhan pada umumnya mengandung senyawa aktif dalam bentuk metabolit sekunder, salah satunya yaitu steroid. Steroid terdiri dari beberapa kelompok senyawa. β -sitosterol merupakan salah satu senyawa yang termasuk golongan steroid. Steroid juga banyak dimanfaatkan dalam dunia kedokteran sebagai antioksidan, antikanker, toksisitas, dan antibakteri. Sapor, dkk. (2004) melakukan uji bioaktivitas β -sitosterol terhadap *Artemia salina*. Nilai LC_{50} sebesar 76 ppm menunjukkan bahwa β -sitosterol mempunyai potensi toksisitas.

Steroid tidak hanya dihasilkan dari tumbuhan tingkat tinggi, tumbuhan tingkat rendah seperti mikroalga jenis *Chlorella sp.* juga mampu menghasilkan metabolit sekunder berupa senyawa steroid. Firman Allah dalam Surat asy Syu'ara ayat 7:



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

Berdasarkan ayat tersebut, Allah telah menciptakan bumi ini yang di dalamnya terdapat tumbuh-tumbuhan yang memiliki banyak manfaat, tidak hanya tumbuhan tingkat tinggi yang mempunyai manfaat, tumbuhan tingkat rendah seperti mikroalga *Chlorella sp.* juga mempunyai banyak manfaatnya. Oleh karena

itu, manusia dianjurkan untuk memikirkan, mempelajari, dan mengkaji semua yang diciptakanNya.

Chlorella sp. merupakan tumbuhan ganggang hijau bersel tunggal, hidup menyendiri atau kelompok, tidak mempunyai batang, akar, dan daun sebenarnya. Beberapa keunggulan mikroalga *Chlorella sp.* diantaranya berkembang biak dengan cepat dan mudah dalam membudidayakannya (Sidabutar, 1999). Keberlangsungan hidup *Chlorella sp.* tidak tergantung pada musim, tidak memerlukan tempat yang luas dan tidak memerlukan waktu yang lama untuk memanennya (Borowitzka dan Lesley, 1988). Karena tidak memerlukan tempat yang luas untuk membudidayakannya, maka teknik pembudidayaan *Chlorella sp.* ini akan dilakukan dalam skala laboratorium menggunakan teknik kultur dengan kondisi tertentu yang telah disesuaikan dengan kondisi sebenarnya.

Pembudidayaan *Chlorella sp.* dapat dilakukan dengan cara kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET). MET merupakan salah satu media alami untuk pertumbuhan mikroalga. MET mengandung nutrient organik seperti karbohidrat, protein, vitamin dan lemak yang dibutuhkan sebagai sumber energi bagi pertumbuhan mikroalga. MET juga memberikan pertumbuhan yang pesat terhadap mikroalga dibandingkan pada MAL (Medium Air Laut) dan MG (Medium Guillard). Kelimpahan sel mikroalga pada MAL dan MG menghasilkan 0 - 10 sel, sedangkan MET dengan konsentrasi 4 % frekuensi kelimpahan sel yang diperoleh yaitu antara 21 – tak terhingga sel. (Wulandari, dkk., 2010). Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan MET sebagai media kultur agar didapatkan biomassa yang cukup banyak, yang nantinya dapat dimanfaatkan metabolit sekundernya yang berupa steroid.

Muthukumar, dkk. (2012) melakukan penelitian tentang Mikroalga jenis *Chlorella marina* sebagai biodiesel berkualitas tinggi, dengan hasil yang diperoleh 60,26% biodiesel yang dihasilkan dari 0,752 g L⁻¹ yang mengandung kandungan minyak sebesar 30%. Bioaktivitas senyawa steroid dalam mikroalga *Chlorella sp.* dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan dan antibakteri, seperti penelitian yang dilakukan Bariyyah (2013) yang menggunakan perbandingan pelarut metanol dan pelarut etil asetat dalam proses maserasi. Ekstrak metanol *Chlorella sp.* yang mengandung senyawa steroid mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak etil asetat yang ditunjukkan dengan nilai EC₅₀ berturut-turut yaitu 18,610 ppm dan 27,320 ppm. Aktivitas antioksidan yang mempunyai nilai EC₅₀ kurang dari 50 ppm tergolong kuat. Kandungan senyawa metabolit sekunder seperti steroid telah terbukti bekerja sebagai derivat antikanker, antibakteri dan antioksidan (Hayati, dkk., 2010).

Isolasi senyawa steroid dapat dimulai dengan proses ekstraksi sampel menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol (Kristanti, 2008). Metode maserasi dipilih karena metode ini aman untuk digunakan dan dapat mengantisipasi senyawa yang rentan panas. Proses ini sangat menguntungkan dalam proses isolasi bahan alam karena proses perendaman mampu memecah dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel, sehingga senyawa metabolit sekunder akan larut dalam pelarut organik. Desianti, dkk., (2013) telah melakukan ekstraksi maserasi mikroalga *Chlorella sp.* dengan menggunakan variasi pelarut antara etil asetat (semi polar) dengan metanol (polar), dan didapat randemen metanol (polar) sebesar 7,001 % lebih besar dibandingkan dengan randemen etil asetat (semi polar) sebesar 3,673 %. Menurut

Lenny (2006) pelarut yang paling sering digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam adalah pelarut golongan alkohol, karena dapat melarutkan senyawa metabolit sekunder. Pelarut metanol dipilih karena memiliki titik didih yang rendah sehingga mudah diuapkan pada suhu yang lebih rendah.

Pemisahan yang lebih spesifik dilakukan pada penelitian ini yaitu dengan cara hidrolisis dan partisi untuk memutuskan ikatan antara glikosida dan steroid, serta memisahkannya dari senyawa-senyawa yang mempunyai sifat kepolaran yang berbeda. Partisi dapat dilakukan menggunakan pelarut nonpolar, sehingga diharapkan senyawa steroid akan lebih terdistribusi pada fase non-polar dan terpisah dengan senyawa polar (Handoko, 2006). Anggraeni (2014) telah melakukan penelitian hidrolisis dan partisi ekstrak metanol pekat mikroalga *Chlorella sp.* secara bertingkat dengan menggunakan pelarut etil asetat, petroleum eter, kloroform, dan n-heksana. Randemen terbesar terdapat pada pelarut n-heksana sebesar 8,1854 % (b/b). dari hasil tersebut maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan partisi dengan fraksi petroleum eter. Fraksi non-polar yang diperoleh dari hasil partisi biasanya masih berupa senyawa campuran, sehingga perlu dilakukan isolasi lebih lanjut.

Isolasi senyawa steroid lebih lanjut dapat dilakukan dengan metode kromatografi kolom. Pemisahan senyawa aktif steroid-alkaloid pada ekstrak n-heksana daun beringin menurut penelitian Sukandana (2011) menggunakan kromatografi kolom dengan adsorben silika gel 60. Fraksi yang diperoleh sebanyak 14 fraksi dan terdapat 11 fraksi yang menunjukkan positif steroid. Bogoriani (2008) juga melakukan isolasi senyawa steroid dari daun andong menggunakan kromatografi kolom dan diperoleh beberapa fraksi. Fraksi yang

menunjukkan positif steroid dimurnikan menggunakan KCKT sehingga dihasilkan isolat mayor 7,5 mg.

Pemilihan eluen merupakan salah satu faktor yang sangat penting untuk isolasi senyawa menggunakan kromatografi kolom. Penentuan eluen terbaik dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA). Eluen yang akan digunakan pada penelitian ini merujuk pada penelitian Hidayah (2015) yang menggunakan eluen terbaik campuran n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 4:1 pada ekstrak metanol *Chlorella sp.* Eluen terbaik dapat ditentukan berdasarkan banyaknya spot yang terbentuk. Berdasarkan eluen tersebut didapatkan 13 spot yang terbentuk 8 dinyatakan positif steroid.

Penelitian yang akan dilakukan ini menggunakan isolasi senyawa steroid fraksi petroleum eter menggunakan metode kromatografi kolom dengan pengisian adsorben cara kering dan basah. Tujuan dari pengisian kolom cara kering dan basah ini untuk mengetahui perbedaan hasil isolasi antara keduanya. Fraksi hasil kromatografi kolom selanjutnya dimonitoring dengan KLTA dan isolat yang menunjukkan positif steroid dianalisis menggunakan FT-IR.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana hasil pemisahan senyawa steroid fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* dengan metode kromatografi kolom fasa diam kering dan fasa diam basah?
2. Bagaimana hasil identifikasi gugus fungsi senyawa steroid dengan spektrofotometer inframerah (FTIR)?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk memisahkan senyawa steroid senyawa steroid fraksi petroleum eter hasil partisi ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* dengan metode kromatografi kolom pembuatan fasa diam cara kering dan cara basah
2. Untuk mengidentifikasi gugus fungsi senyawa steroid dengan spektrofotometer inframerah (FTIR)

1.4 Batasan Masalah

1. Isolat mikroalga *Chlorella sp.* yang digunakan berasal dari budidaya di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Hasil hidrolisis mikroalga *Chlorella sp.* dipartisi dengan fraksi petroleum eter
3. Pengisian kolom yang digunakan yaitu pengisian kolom cara kering dan cara basah
4. Isolat ditampung per 2 mL dalam satu vial
5. Vial yang mempunyai kesamaan spot, rf dijadikan satu fraksi
6. Identifikasi gugus fungsi senyawa steroid menggunakan FTIR

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk industri farmasi, masyarakat pada umumnya dan negara pada khususnya, bahwa mikroalga

Chlorella sp. ternyata memiliki senyawa aktif steroid yang dapat dimanfaatkan sebagai anti oksidan maupun anti bakteri



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tumbuhan dalam Alqur'an

Allah berfirman dalam Q.S. Ali-'Imron ayat 190:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَآخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِيَ الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾

“Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal,”

Ayat di atas menjelaskan bahwasanya, Allah SWT telah memberi pernyataan bahwa seluruh ciptaan-Nya yang ada di langit maupun di bumi terdapat suatu tanda-tanda kebesaran-Nya. Namun Allah SWT membatasi tanda-tanda kebesaran-Nya yang hanya bisa diketahui bagi orang-orang yang berakal. Kemudian pada Q.S. Ali-'Imron ayat selanjutnya (191), Allah SWT menafsirkan sendiri siapa yang dimaksud dengan orang-orang yang berakal tersebut.

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

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

Allah SWT memberi penjelasan bahwasanya yang dimaksud dengan orang-orang yang berakal adalah orang-orang yang selalu mengingat Allah dalam keadaan berdiri, duduk dan berbaring. Tidak hanya berhenti sampai di sana, Allah melanjutkan definisi di atas bahwa orang-orang berakal juga selalu

memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi. Prof. Dr. Imam Suprayogo menjelaskan bahwasanya keadaan manusia atau posisi manusia terbatas hanya pada tiga posisi yang telah disebutkan Allah pada surah Ali-‘Imron:191, yaitu posisi berdiri, duduk dan berbaring. Tidak ada posisi selain itu. Artinya “orang-orang berakal” merupakan orang yang selalu mengingat Allah di setiap tingkah lakunya yang juga berarti bahwa ia mengingat Allah di setiap waktu. Prof. Dr. Imam Suprayogo memberi kesimpulan bahwa ada dua aspek yang harus dipenuhi dalam rangka menjadi sosok “orang-orang yang berakal”, pertama: selalu berdzikir kepada Allah, kedua: selalu berfikir tentang ciptaan-Nya yang ada di langit dan bumi.

Manusia merupakan salah satu makhluk yang diciptakan Allah SWT di bumi. Allah juga menyebutkan secara langsung dalam Q.S. at-Tin: 8 bahwa manusia diciptakan dengan sebaik-baiknya penciptaan. Manusia diberi keistimewaan berupa akal dan nafsu yang membedakannya dengan makhluk ciptaan-Nya yang lain. Sebagai manusia sudah seharusnya bisa memanfaatkan dan mengoptimalkan kelebihan berupa “akal” tersebut. Selain manusia, Allah juga menciptakan makhluk hidup lain berupa tumbuhan dan binatang yang hidup berdampingan dengan manusia di bumi. Tumbuhan dan binatang yang ada di bumi diciptakan tidak lain melainkan untuk memberikan manfaat bagi makhluk hidup yang lain. Firman Allah SWT dalam surat Luqman ayat 10:

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۖ وَأَلْقَىٰ فِي الْأَرْضِ رَوَاسِيَ أَن تَمِيدَ
بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِن كُلِّ دَابَّةٍ ۖ وَأَنزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ

زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿١٠﴾

“Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang. Dan kami turunkan air hujan dari langit, lalu kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik”(QS. Luqman: 10).

Al Jazairi (2008) dalam tafsir al Aisar menjelaskan bahwa **مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ** pada surat Luqman ayat 10 menunjukkan setiap jenis dari tumbuh-tumbuhan yang indah, bermanfaat dan tidak membahayakan. Kata **زَوْجٍ** memiliki arti jenis (tumbuhan) dan **كَرِيمٍ** berarti mulia dan banyak manfaatnya (Al Maraghi, 1992). **مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ** memiliki arti jenis tumbuhan yang bermanfaat dan indah (Ar Rifa’i, 2008) yang beraneka ragam dengan warna yang indah dan manfaat yang banyak (DEPAG, 2010).

Kata **كَرِيمٍ** yang terdapat dalam surat Luqman ayat 10 ditujukan pada tumbuhan dan pohon yang lebih bermanfaat yang diciptakan Allah untuk manusia (Ali, 2009). Menurut Shihab (2002) dalam tafsir al Mishbah menunjukkan bahwa kata **كَرِيمٍ** digunakan untuk menyifati segala sesuatu yang baik sesuai obyeknya. Rizqi yang *kariim* adalah yang banyak, halal dan bermanfaat. Pasangan tumbuhan yang *kariim* adalah yang tumbuh subur dan menghasilkan apa yang diharapkan penanamannya.

Berdasarkan ayat Alqur’an tersebut, Allah SWT menciptakan segala sesuatu yang ada di dunia ini tidaklah sia-sia. Salah satu ciptaah yang memiliki banyak manfaat adalah tumbuh-tumbuhan. Dimana pada tumbuh-tumbuhan tersebut Allah ciptakan dengan bermacam-macam bentuk, ukuran, manfaat, warna, bau, rasanya

dan lainnya. Salah satu tumbuhan yang berukuran kecil memiliki manfaat yang banyak yang Allah ciptakan adalah mikroalga.

2.2 Mikroalga *Chlorella sp.*

Chlorella sp. merupakan tumbuhan ganggang hijau bersel tunggal, hidup menyendiri atau berkelompok, tidak mempunyai batang, akar, dan daun. *Chlorella* tumbuh pada air tawar, air payau dan air asin, tetapi sebagian besar hidup di air tawar. *Chlorella* juga dapat tumbuh pada tanah yang basah, batuan yang basah, dan pada dahan-dahan tumbuhan dan beberapa spesies hidup bersimbiosis dengan protozoa, hydra, sponge, atau mikroorganisme lainnya. Untuk tumbuh kembangnya yang baik, *Chlorella* memerlukan air jernih, sinar matahari, dan udara yang bersih (Sidabutar, 1999). Nama *Chlorella* berasal dari zat berwarna hijau (*Chlorophyll*) yang juga berfungsi sebagai katalisator dalam proses fotosintesis (Zahara, 2003).

Klasifikasi *Chlorella sp.* menurut Bold dan Wynne (1985) adalah sebagai berikut :

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

Ciri-ciri mikroalga *Chlorella sp.* berdasarkan hasil uji taksonomi pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Amaliyah (2013) menunjukkan bahwa sel *Chlorella sp.* berbentuk bulat seperti cawan atau lonceng dengan posisi menghadap ke atas. *Chlorella sp.* hidup secara soliter dan berukuran 2-8 μm .

Warna hijau pada *Chlorella sp.* disebabkan karena selnya dominan mengandung klorofil a dan b, di samping karotin dan xantofil.

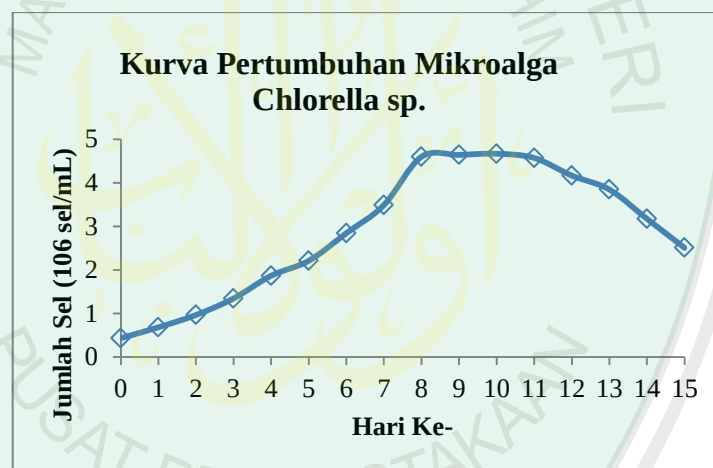
2.2 Kultur *Chlorella sp.*

2.2.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET)

Pembudidayaan *Chlorella sp.* dapat dilakukan dengan cara kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET). MET ini merupakan salah satu media alami untuk pertumbuhan mikroalga, karena mengandung nutrient organik seperti karbohidrat, protein, vitamin, dan lemak yang dibutuhkan sebagai sumber energy bagi pertumbuhan mikroalga (Wulandari, dkk. 2010). MET merupakan medium yang terbuat dari ekstrak tauge yang merupakan sayuran yang umum dikonsumsi, mudah diperoleh, ekonomis dan tidak menghasilkan senyawa yang berefek toksik (Richmond, 1986 dalam Prihantini, dkk., 2007).

Menurut Wulandari, dkk, (2010) penggunaan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 % menghasilkan pertumbuhan mikroalga yang sangat pesat dibandingkan dengan Medium Air Laut (MAL) dan Medium Guillard (MG) yang ditunjukkan pada hari ke-6. MAL dan MG menghasilkan kelimpahan sel antara 0 – 10 sel, sedangkan MET 4 % menghasilkan kelimpahan sel antara 21 – tak terhingga sel. Prihantini, dkk., (2007) melakukan penelitian mengenai pengaruh konsentrasi MET terhadap pertumbuhan *Scenedesmus* isolat subang dengan variasi konsentrasi MET 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 % dan 6 %. Konsentrasi 4 % (v/v) merupakan konsentrasi MET optimum yang menghasilkan kerapatan sel tertinggi yaitu 3.981.071 sel/mL terhadap mikroalga marga *Scenedesmus* selama 10 hari pengamatan.

Pertumbuhan mikroalga pada kultur dapat diamati dengan melihat pertambahan besar ukuran sel mikroalga atau dengan mengamati pertambahan jumlah sel dalam satuan tertentu. Cara kedua lebih sering digunakan untuk mengetahui pertumbuhan mikroalga dalam media kultur, yaitu dengan menghitung kelimpahan atau kepadatan sel mikroalga dari waktu ke waktu. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Khamidah, dkk., (2013), selama kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* mengalami empat fase pertumbuhan yaitu fase log atau eksponensial, fase penurunan laju pertumbuhan, fase stasioner dan fase kematian. Berikut kurva pertumbuhan dari mikroalga *Chlorella sp.* dalam MET 4 % yang ditunjukkan pada Gambar 2.1:



Gambar 2.1 Kurva pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* (Khamidah, dkk., 2013)

Hasil yang didapat pada kurva pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam MET 4 % berdasarkan penelitian Khamidah, dkk., (2013) menunjukkan bahwa fase log atau fase eksponensial dimulai pada hari ke-0 sampai hari ke-8 yang mengalami peningkatan yang cukup signifikan. Peningkatan jumlah sel *Chlorella sp.* tampak pada slope (kemiringan) kurva pada Gambar 2.1. Pada fase eksponensial *Chlorella sp.* mengalami pembelahan aktif karena tersedianya nutrisi dan

pencahayaannya yang cukup baik sehingga proses pertumbuhannya maksimal. Jumlah sel yang terbesar berada pada hari ke-8 sebesar 4.656.000 sel/mL.

Fase penurunan laju pertumbuhan merupakan fase dimana kelimpahan sel *Chlorella sp.* tidak mengalami peningkatan yang cukup signifikan. Fase ini terjadi pada hari ke-8. Pada hari ke-7 hingga hari ke-8 terjadi peningkatan jumlah sel sebesar 1.040.000 sel/mL, sedangkan pada hari ke-8 hingga hari ke-9 peningkatan jumlah sel yang terjadi hanya sebesar 128.000 sel/mL.

Fase stasioner yang terjadi pada hari ke-8 sampai hari ke-11 ditandai dengan kelimpahan sel *Chlorella sp.* yang cenderung tidak bertambah (konstan). Kelimpahan sel dari hari ke-8 sampai hari ke-11 dapat dilihat pada Lampiran 4.3. Pada fase ini, *Chlorella sp.* sudah tidak lagi mengalami pembelahan sel karena berkurangnya nutrisi yang tersedia. Kurangnya ketersediaan nutrisi ini juga menyebabkan kelimpahan sel cenderung berkurang sehingga pada hari ke-10 hingga hari ke-11 mulai terjadi penurunan sel sebesar 176.000 sel/mL, sehingga pada hari ke-11 disebut sebagai fase akhir stasioner.

Fase kematian yang terjadi mulai hari ke-11 dan seterusnya yang ditandai dengan menurunnya kelimpahan sel *Chlorella sp.* Fase ini ditandai dengan laju kematian yang lebih besar daripada laju reproduksi, sehingga jumlah sel mengalami penurunan secara geometrik. Penurunan kepadatan sel fitoplankton ditandai dengan perubahan kondisi optimum yang dipengaruhi oleh temperatur, cahaya, pH medium, ketersediaan hara, dan beberapa faktor lain yang saling terkait satu sama lain (Isnasetyo dan Kurniastuty, 1995).

2.3 Manfaat dan Kandungan Mikroalga *Chlorella sp.*

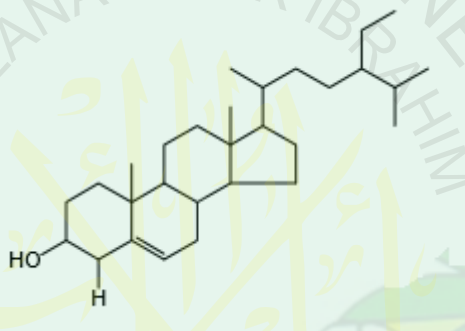
Chlorella sp. yang telah dibudidayakan dapat dimanfaatkan diberbagai keperluan diantaranya digunakan sebagai energi alternatif, pangan sehat dan suplemen. *Chlorella sp.* juga mengandung berbagai nutrient seperti protein, karbohidrat, asam lemak tak jenuh, vitamin, klorofil, enzim, dan serat yang tinggi (Borowitzka dan Lesley, 1998). Menurut penelitian yang dilakukan Sriwandani (2000) ekstrak kloroform mikroalga *Chlorella sp.* mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. Coli* sebesar 46,2%. Khamidah (2014) dalam penelitiannya juga menyebutkan bahwa pemberian ekstrak metanol dengan konsentrasi 20 % akan menghasilkan zona hambat terbesar terhadap bakteri *E. Coli* sebesar 16,5 mm, dan konsentrasi 25 % akan menghasilkan zona hambat terbesar terhadap bakteri *S. aureus* sebesar 13,1 mm.

Uji fitokimia mikroalga *Chlorella sp.* menurut penelitian Bariyyah (2013) pada ekstrak kasar mikroalga *Chlorella sp.* dengan menggunakan reagen *Liebermann-Burchard* menunjukan hasil positif terhadap senyawa steroid dengan ditandai adanya warna hijau biru. Uji fitokimia juga dilakukan pada senyawa tanin, ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* mengandung senyawa tanin dengan ditandai endapan putih setelah ditambahkan gelatin. Anggraeni (2014) juga melakukan uji fitokimia ekstrak kasar mikroalga *Chlorella sp.* yang menunjukan hasil positif terhadap senyawa steroid dan asam askorbat, dengan hasil berupa warna hijau biru.

2.3.1 Steroid

Steroid merupakan golongan lipid yang diturunkan dari senyawa jenuh yang dinamakan siklopentanoperhidrofenantrena, yang memiliki inti

dengan 3 cincin sikloheksana terpadu dan 1 cincin siklopentana yang tergabung pada ujung cincin sikloheksana tersebut (Poedjiadi, 1994). Steroid tersusun dari isopren-isopren dari rantai panjang hidrokarbon yang menyebabkan sifatnya non-polar. Beberapa senyawaan steroid mengandung gugus –OH yang sering disebut dengan sterol, sehingga sifatnya yang cenderung lebih polar. Beberapa turunan steroid yang penting ialah steroid alkohol atau sterol. Steroid lain antara lain asam-asam empedu, hormon seks (androgen dan estrogen) dan hormon kortikosteroid (Robinson, 1995).



Gambar 2.2 Struktur senyawa fitosterol (Saleh, 2007)

Saleh (2007), melakukan isolasi senyawa steroid dari tumbuhan cendana dengan menggunakan kromatografi kolom. Identifikasi hasil isolat fraksi kromatografi kolom dilakukan dengan spektrofotometer inframerah yang didapat pada gambar 2.5 yang menunjukkan steroid yang didapat merupakan jenis fitosterol. Robinson (1995) juga menyatakan bahwasanya jenis steroid yang ada di tumbuh-tumbuhan adalah fitosterol, sedangkan steroid yang terdapat pada jaringan hewan merupakan kolesterol.

2.4 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga *Chlorella sp.*

2.4.1 Ekstraksi Maserasi

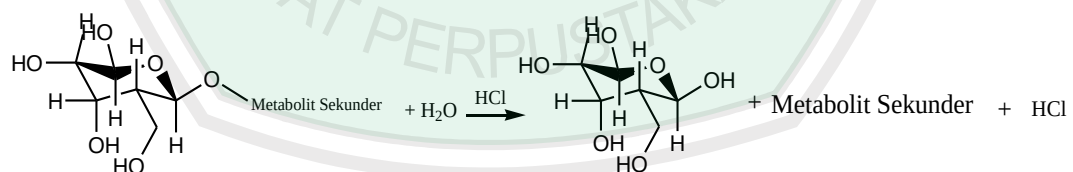
Ekstraksi merupakan salah satu metode yang digunakan untuk memisahkan komponen yang ada didalam suatu sampel. Pada penelitian ini proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Maserasi adalah proses perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada suhu ruang. Pada proses perendaman, dinding serta membran sel analit tumbuhan akan terpecah akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel. Hal tersebut mengakibatkan metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik. Lama perendaman yang diatur akan menghasilkan ekstraksi yang sempurna. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam pelarut tersebut (Indrayani, 2006).

Proses maserasi *Chlorella sp.* pada penelitian ini menggunakan pelarut metanol. Penggunaan metanol dikarenakan sifat kepolaran dari metanol polar dan universal. Selain itu, banyak ditemukan dalam jaringan tanaman yang terdapat sebagai glikosida. Pemilihan metanol sebagai pelarut utama dalam maserasi yang akan dilakukan juga tidak lepas dari hasil penelitian sebelumnya. Menurut Amaliyah (2013), melakukan penelitian untuk menguji toksisitas mikroalga *Chlorella sp.* dengan mengekstrak biomassa *Chlorella sp.* dengan menggunakan variasi pelarut yaitu metanol, etil asetat dan n-heksana. Randemen tertinggi dihasilkan oleh ekstrak metanol yaitu sebesar 7,001 %. Desianti, dkk., (2014) dalam penelitiannya juga menyatakan ekstrak metanol yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* yang memiliki toksisitas paling tinggi adalah golongan senyawa steroid.

Senyawa steroid yang terdapat pada *Chlorella sp.* tidak dalam keadaan bebas, akan tetapi berikatan dengan gugus glikosida. Glikosida merupakan senyawa yang terdiri dari gabungan gula (glikon) yang mempunyai sifat polar dan bagian bukan gula (aglikon) yang mempunyai sifat polar, semipolar dan nonpolar (Gunawan, 2004). Untuk memutuskan gugus glikosida yang terdapat pada steroid perlu dilakukan pemisahan secara berlanjut yaitu dengan hidrolisis dan partisi.

2.4.2 Hidrolisis dan Partisi

Hidrolisis merupakan reaksi antara senyawa dan air dengan membentuk reaksi kesetimbangan. Selain bereaksi, peran air adalah sebagai medium reaksi sedangkan senyawanya dapat berupa senyawa anorganik maupun senyawa organik (Mulyono, 2006). Reaksi hidrolisis dilakukan untuk memutuskan ikatan glikosida pada senyawa organik yang berada pada bentuk glikosidanya. Glikosida merupakan senyawa yang terdiri dari gabungan gula (glikon) yang mempunyai sifat polar dan bagian bukan gula (aglikon) yang mempunyai sifat polar, semipolar dan nonpolar (Gunawan, 2004). Adapun dugaan reaksi yang terjadi saat hidrolisis sebagai berikut:



Gambar 2.3 Dugaan reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida (Lailah, 2014)

Hidrolisis merupakan proses dekomposisi kimia yang terjadi dengan adanya pemutusan ikatan glikosida yang menjadi penghubung antar monomer melalui reaksi menggunakan air (H_2O) sehingga membentuk bagian-bagian yang lebih sederhana (Adhiatama, dkk., 2012). Namun, reaksi hidrolisis memerlukan bantuan katalisator karena hidrolisis menggunakan air berlangsung sangat lambat

(Nihlati, dkk., 2008). Oleh karena itu pada penelitian ini akan menggunakan HCl sebagai agen penghidrolisis. Pemilihan asam kuat seperti HCl sebagai katalis disebabkan karena asam kuat akan lebih mudah melepas proton (H^+) secara sempurna di dalam air, sedangkan asam lemah relatif lebih sukar sehingga asam lemah memiliki kecenderungan terionisasi sebagian dalam pelepasan ion H^+ . Semakin banyak proton yang terionisasi dalam air, maka semakin kuat peranan proton dalam pemutusan ikatan glikosida (Handoko, 2006).

Penggunaan asam kuat seperti HCL pada proses hidrolisis menurut Wahyudi, dkk., (2013) lebih baik dibanding menggunakan H_2SO_4 karena sifatnya yang lebih reaktif. Selain itu, katalisator asam klorida (HCl) akan membentuk garam yang tidak berbahaya yakni NaCl (Nihlati, dkk., 2008). Afif (2013) menggunakan metode hidrolisis dengan pelarut HCl 2 N sebagai katalis dan ekstraksi cair-cair untuk mengekstrak metabolit sekunder dari ekstrak metanol alga merah *E. contoni* dengan menggunakan variasi pelarut yaitu 1-butanol, etil asetat, kloroform, n-heksana dan petroleum eter. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak setelah dihidrolisis dan dipartisi memiliki nilai LC_{50} lebih rendah (70,32 ppm) dibandingkan ekstrak sebelum dihidrolisis (194,40 ppm). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak hasil hidrolisis dan partisi lebih bersifat toksik.

Hasil hidrolisis akan dilakukan partisi menggunakan pelarut petroleum eter. Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan Anggraeni (2014) nilai randemen yang terbaik dari hasil partisi variasi pelarut etil asetat, kloroform, n-heksana dan petroleum eter menunjukan nilai randemen terbaik yaitu pada pelarut n-heksana sebesar 45,61 % (b/b) dan petroleum eter sebesar 8,1854 % (b/b). akan

tetapi pada uji antioksidan aktivitas dan EC_{50} tertinggi ditunjukkan pada ekstrak petroleum eter sebesar 64,8839 % pada 30 ppm.

2.5 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan suatu metode pemisahan preparatif. Metode ini digunakan untuk memisahkan suatu sampel yang berupa campuran dengan berat beberapa gram. Prinsip dasar dari kromatografi kolom adalah suatu pemisahan yang didasarkan pada prinsip adsorpsi. Pemisahan dapat dilakukan dengan meletakkan sampel sampel pada ujung atas kolom dan pelarut yang digunakan dialirkan secara terus menerus. Eleuen/pelarut akan melewati kolom dengan adanya gravitasi bumi atau karena bantuan tekanan (Kristanti, dkk., 2008).

Pemilihan fasa gerak juga merupakan langkah yang penting untuk keberhasilan isolasi senyawa. Sifat-sifat pelarut juga sangat berpengaruh terhadap penentuan mobilitas komponen-komponen campuran. Kemampuan pelarut untuk menggerakkan suatu senyawa berhubungan dengan kekuatan elusi pelarut. Urutan kekuatan elusi beberapa pelarut air > metanol > etanol > aseton > etil asetat > kloroform > dietil eter > metilen diklorida > benzena > toluena > karbon tetraklorida > heksana > petroleum eter (atun, 2014).

Fase gerak yang digunakan harus sudah ditentukan sebelumnya agar diperoleh pola pemisahan yang diinginkan. Hal ini disebabkan karena kromatografi kolom memerlukan waktu lama dan bahan yang cukup banyak. Ada tiga pendekatan yang digunakan untuk memecahkan masalah ini yaitu dengan penelusuran pustaka, penerapan data KLT pada pemisahan dengan kolom dan

dengan pemakaian elusi landaian umum mulai dari pelarut non-polar sampai pelarut polar (Sastrohamidjojo, 1985).

Menurut Imamah (2015) eluen terbaik hasil KLT analitik untuk ekstrak metanol *Chlorella sp.* yaitu pelarut campuran antara n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 4:1 didapatkan 12 spot. Pengisian adsorben juga merupakan faktor yang mempengaruhi keberhasilan isolasi. Pada penelitian yang akan dilakukan ini dilakukan dua cara pengisian adsorben yaitu cara kering dan cara basah.

2.5.1 Pengisian Kolom Cara Basah

Kusmiyati (2011) mengisolasi zat aktif dari rimpang kunyit putih dengan metode kromatografi kolom menggunakan pembuatan fase diam cara basah. Pada pembuatan fase diam cara basah ini, silika gel yang telah diaktivasi kemudian dicampur dengan eluen yang akan digunakan hingga homogen dan tidak terbentuk gelembung udara. Campuran silika dan eluen ini dikenal dengan istilah bubur silika. Bubur inilah yang kemudian dimasukkan kedalam kolom, dimampatkan dengan cara diketok-ketok hingga diperoleh fase diam yang rapat. Selain fase diam dalam kolom harus memiliki kerapatan yang maksimal. Fase diam juga harus dijaga agar tidak kering dan selalu terendam eluen sehingga tidak terjadi retakan. Jika fase diam retak maka harus dikeluarkan karena tidak dapat digunakan untuk proses elusi.

Hasil fraksi dari kromatografi kolom cara basah yang telah dilakukan Kusmiyati (2011), dengan melakukan kromatografi kolom cara basah untuk memisahkan senyawa aktif pada ekstrak metanol rimpang kunyit putih fraksi etil asetat. Pemisahan senyawa aktif pada sampel dilakukan sebanyak tiga kali dengan hasil pengoloman yang pertama didapatkan 137 fraksi. pengoloman kedua

didapatkan 69 fraksi, pengoloman yang ketiga didapatkan 18 fraksi. Pengelompokan fraksi-fraksi ini didasarkan pada kesamaan Rf. Kadar zat aktif yang didapatkan 0,00149%.

2.5.2 Pengisian Kolom Cara Kering

Kolom diisi dengan pelarut paling nonpolar yang akan digunakan untuk elusi sebanyak 2/3 bagian. Adsorben yang akan digunakan dimasukkan secara perlahan setebal 2 cm sambil diketuk-ketuk dinding secara perlahan. Kran bagian bawah kolom dibuka agar semua pelarut keluar dan adsorben masuk ke dalam kolom. Setelah semua adsorben masuk dalam kolom, dibiarkan kolom beberapa saat sampai cairan yang berada di atas adsorben menjadi jernih. Jumlah eluen/pelarut harus selalu di atas batas adsorben (Kristanti, dkk., 2008).

Suryani (2011), telah melakukan identifikasi senyawa aktif triterpenoid pada kulit batang tumbuhan kecap (*Sandoricum koetjape* Merr) dengan menggunakan kromatografi kolom gravitasi dengan cara pengisian kolom kering, dimana kolom diisi dengan fasa diam silika gel 60 GF₂₅₄ ukuran 40-63 µm (230-400 mesh) sebanyak 125 g, sampel sebanyak 15 g dan dielusi dengan pelarut n-heksana:etil asetat:metanol secara bergradien. Hasil yang didapat dari pengoloman diperoleh 485 fraksi/10 mL, pada fraksi ke-57 terdapat endapan berwarna putih kekuningan. Setelah dimonitoring dengan KLT analitik dan diidentifikasi dengan menggunakan pereaksi Liebermann-burchard, hasil identifikasi menunjukkan bercak warna merah hal ini menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi merupakan senyawa golongan triterpenoid.

Pengisian adsorben dalam kolom dapat mempengaruhi hasil pemisahan dari kromatografi kolom. Pengisian harus dilakukan sampai homogen dan juga

terbebas dari gelembung udara. Selama proses elusi berjalan, dapat terjadi cacat kolom jika saat pengisian adsorben dalam kolom kurang maksimal. Permukaan adsorben harus benar-benar horizontal agar meminimalisir kemungkinan terjadinya cacat kolom. Hal yang harus diperhatikan saat pengisian kolom adalah posisi dari kolom. Posisi kolom harus benar-benar vertikal (Kristanti, dkk., 2008).

Bogoriani (2008) melakukan isolasi glikosida menggunakan kromatografi kolom gravitasi dengan menggunakan fasa diam silika gel 60 (70-230 mesh) dan fase gerak kloroform; metanol; air dengan perbandingan 3; 1; 0,1. Fraksi ditampung setiap 3 ml dan didapatkan 50 fraksi. Selanjutnya fraksi tersebut diuji kemurniannya menggunakan KLT sampai menghasilkan kelompok fraksi. Isolat mayor yang didapatkan setelah KLT sebesar 7,5 gr dengan sampel awal sebesar 11,0 gr. Pemisahan dengan kromatografi kolom gravitasi diperoleh hasil yang baik jika pada uji coba hasil KLT mempunyai Rf kurang dari 0,3 (Atun, 2014).

Hasil isolat kromatografi kolom diuji tingkat kemurniannya menggunakan KLTA. Pengelusian dilakukan menggunakan berbagai tingkat kepolaran eluen noda tunggal. Noda hasil KLTA dilihat di bawah lampu UV dan selanjutnya diuji menggunakan pereaksi *Lieberman-Burchard* (LB). Steroid akan memberikan warna hijau/biru dengan pereaksi LB (Ismarti, 2011)

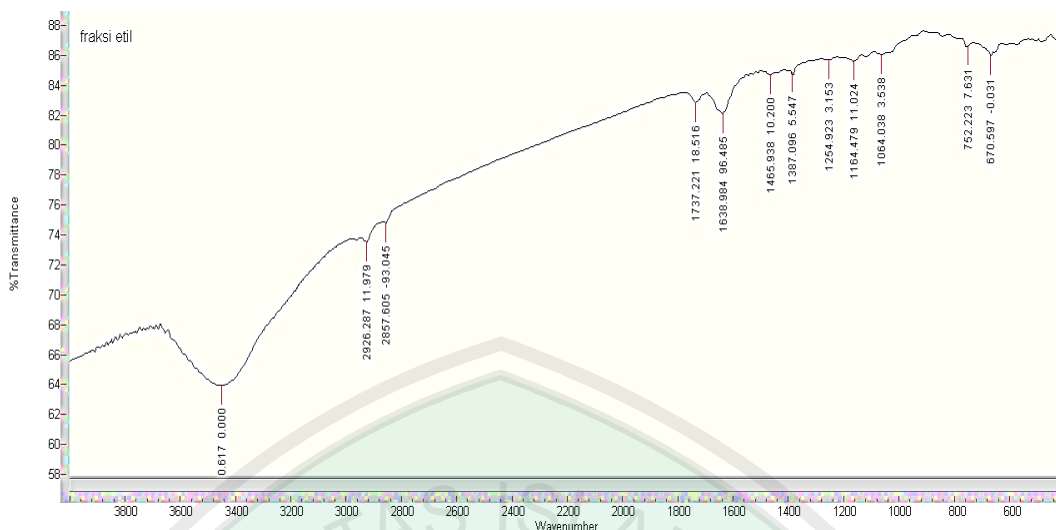
2.6 Identifikasi Senyawa Aktif Menggunakan FTIR

Spektroskopi IR biasa digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi suatu senyawa. Daerah spektra spektroskopi IR dibagi menjadi 3, yaitu IR dekat (antara 0,8-2,5 μm atau 12.500-4.000 cm^{-1}), IR tengah (antara 2,5-25 μm atau 4.000-400

cm^{-1}), dan IR jauh (antara 25-1.000 μm atau 400-10 cm^{-1}) (Rohman dan Gandjar, 2012).

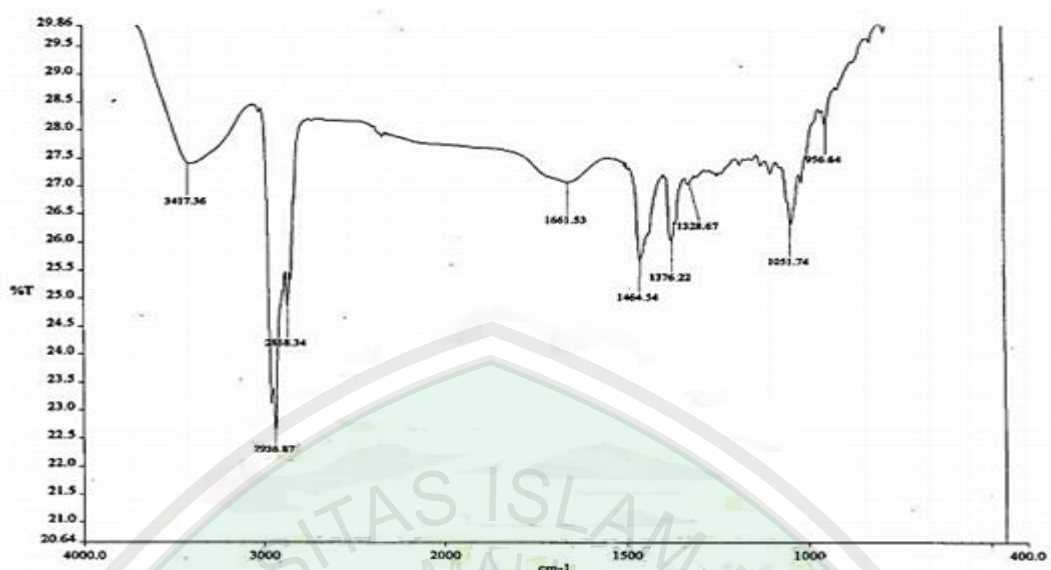
Absorpsi radiasi IR bersesuaian dengan perubahan energi yang berkisar antara 2-10 kkal/mol. Radiasi pada kisaran energi ini ekuivalen dengan frekuensi vibrasi ulur dan tekuk ikatan dalam kebanyakan ikatan kovalen molekul (Rohman dan Gandjar, 2012). Ketika suatu senyawa berinteraksi dengan radiasi IR, maka akan terjadi vibrasi ikatan-ikatan kovalen pada senyawa tersebut. Hal ini yang kemudian dijadikan dasar untuk mengidentifikasi gugus fungsi pada suatu senyawa. Sebab setiap gugus fungsi mempunyai tipe ikatan yang berbeda sehingga tiap gugus fungsi mempunyai serapan IR yang khas. Identifikasi menggunakan FT-IR hanya akan memberikan informasi mengenai gugus fungsi yang terdapat pada struktur steroid. Steroid yang diidentifikasi dengan FT-IR akan memberikan serapan yang khas untuk gugus fungsi OH, C-O alkohol, C=C, dan CH_3 . Hasil identifikasi steroid akan dinyatakan berhasil jika gugus fungsi yang telah disebutkan menimbulkan serapan pada daerahnya masing-masing (Mulyani, dkk., 2013).

Identifikasi menggunakan FT-IR hanya akan memberikan informasi mengenai gugus fungsi yang terdapat pada struktur steroid. Steroid yang diidentifikasi dengan FT-IR akan memberikan serapan yang khas untuk gugus fungsi OH, C-O alkohol dan CH_3 . Hasil identifikasi steroid akan dinyatakan berhasil jika gugus fungsi yang telah disebutkan menimbulkan serapan pada daerahnya masing-masing (Mulyani, dkk., 2013).



Gambar 2.4 Hasil spektra FTIR dari isolat fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella* sp. (Imamah, 2015)

Hasil analisis pola serapan FTIR yang dihasilkan dari isolat fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella* sp. menunjukkan adanya pita serapan pada daerah 3450,61 cm^{-1} yang melebar menunjukkan adanya gugus O-H pada isolat. Pita serapan 2926,28 cm^{-1} dan 2857,60 cm^{-1} diduga mengandung rentangan -CH alifatik. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan adanya gugus metil (CH_3) dan metilen (CH_2) (Socrates, 1994). Dugaan ini diperkuat dengan adanya vibrasi C-H tekuk pada pita serapan 1465,93 cm^{-1} dan 1387,09 cm^{-1} . Adanya vibrasi C-H tekuk pada spektra inframerah mengindikasikan adanya gugus gem dimetil yang lazim ditemukan pada senyawa terpenoid dan steroid (Astuti, 2014). Pita serapan 752,22 cm^{-1} dan 670,59 cm^{-1} merupakan serapan dengan intensitas lemah dari rentangan C-H pada gugus alkena.



Gambar 2.5 Spektra inframerah fitosterol isolate tumbuhan cendana dengan kromatografi kolom (Saleh, 2007)

Spectrum inframerah yang diperoleh berdasarkan gambar 2.5 memperlihatkan senyawa yang diperoleh menunjukkan serapan yang melebar pada bilangan gelombang ν 3417,36 cm^{-1} yang diduga adalah uluran (*stretching*) dari gugus O-H (3200-3550 cm^{-1}). Dugaan ini diperkuat oleh adanya serapan pada bilangan gelombang ν 1328,67 cm^{-1} yang menunjukkan adanya serapan tekukan (*bending*) dari gugus O-H (1330-1420 cm^{-1}) dan gelombang ν 1051,74 cm^{-1} yang menunjukkan adanya uluran C-OH siklik (990-1060 cm^{-1}). Adanya pita tajam dengan intensitas kuat pada bilangan gelombang 2936,87 cm^{-1} dan ν 2838,34 cm^{-1} merupakan uluran C-H pada CH_2 dan C-H pada CH_3 .

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimis Organik, Bioteknologi Jurusan Kimia dan Laboratorium Ekologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Februari – Mei 2016.

3.2 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, auto klaf, neraca analitik, cawan porselen, desikator, *shaker*, *rotary evaporator*, aluminium foil, *sentrifuse*, plat KLT, resin kolom.

3.1.2 Bahan

Isolat mikroalga *chlorella sp.* dari Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah metanol *p.a.* petroleum eter, taugé (kacang hijau), akuades, HCL 2 N, natrium karbonat, anhidrida asetat, asam sulfat pekat, kloroform, n-heksana, etil asetat.

3.3 Rancangan Penelitian

Sebelum dilakukan pengujian secara eksperimental di laboratorium, terlebih dahulu dilakukan kultivasi. Sampel isolat mikroalga *Chlorella sp.* diambil 10 mL, kemudian dikultivasi dalam 60 mL dalam medium Ekstrak Tauge (MET) 4 % (Prihantini, dkk., 2005). Pemanenan dilakukan pada fase stasioner yaitu pada

hari ke-7. Pemanenan dilakukan dengan cara disentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit untuk memisahkan biomassa dengan filtrat. Biomassa *Chlorella sp.* dikeringkan pada suhu ruang (25-30°C) selama $\pm$ 12 jam. Selanjutnya dilakukan analisis kadar air terhadap biomassa *Chlorella sp.* sebelum dan sesudah dikeringkan. Biomassa *Chlorella sp.* dari fase pertumbuhan yang telah dikeringkan tersebut kemudian diekstraksi maserasi dengan pelarut metanol dengan perbandingan 1:5 (b/v) selama $\pm$ 24 jam. Proses ekstraksi maserasi dilakukan dengan pengocokan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama $\pm$ 2 jam dalam suhu ruang. Selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan corong *buchner* sehingga terpisah antara filtrat dan residu. Bagian residu selanjutnya dimaserasi kembali dengan pelarut metanol hingga 5 kali pengulangan. Kemudian filtrat yang diperoleh dari 5 kali proses maserasi tersebut dikumpulkan menjadi satu dan selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator vacuum*. Kemudian ditimbang hasil ekstrak kasar *Chlorella sp.* tersebut.

Ekstrak kasar *Chlorella sp.* selanjutnya dihidrolisis dengan katalis asam HCl 2 N dan dipartisi dengan pelarut petroleum eter. Kemudian senyawa steroid pada sampel dipisahkan dengan kromatografi kolom, hasil yang didapat dari kromatografi kolom ini selanjutnya dimonitoring dengan KLT-A untuk membuktikan bahwa senyawa yang terpisah adalah senyawa steroid. Kemudian diidentifikasi dengan spektrofotometer IR.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan tahapan-tahapan sebagai berikut :

1. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.*
 - A. Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)
 - B. Kultivasi *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET)
2. Pemanenan biomassa *Chlorella sp.*
3. Analisis kadar air sampel kering dan basah
4. Ekstraksi maserasi biomassa *Chlorella sp.* dengan pelarut metanol
5. Hidrolisis ekstrak pekat metanol *Chlorella sp.* menggunakan pelarut petroleum eter
6. Pemisahan senyawa aktif (steroid) *Chlorella sp.* dengan metode Kromatografi Kolom
7. Monitoring dengan KLT-A
8. Identifikasi isolat steroid dengan Spektrofotometer Infrared (IR)
9. Analisa Data

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Kultivasi Mikroalga *chlorella sp.*

3.5.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)

Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan pembuatan larutan stok MET yaitu 100 gram direbus dalam 500 mL akuades yang mendidih sampai tauge layu. Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 % (v/v) sebanyak 1200 mL dibuat dengan cara melarutkan 48 mL ekstrak tauge ke dalam 1152 mL akuades dalam botol 1500 mL, dengan perlakuan pH.

3.5.1.2 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET)

Sebanyak 200 mL isolat *chlorella sp.* diinokulasi ke dalam masing-masing 1200 MET dalam botol 1500 mL yang ditempatkan pada rak yang telah dilengkapi dengan pencahayaan menggunakan lampu TL. 36 watt (intensitas cahaya 1000 – 4000 lux) dan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap selama 10 hari.

3.5.2 Pemanenan Biomassa *chlorella sp.* (Imamah, 2015)

Pemanenan biomassa *chlorella sp.* dilakukan pada fase akhir stasioner atau pada hari ke-10. Pemanenan dilakukan dengan cara media kultur *chlorella sp.* disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Biomassa *chlorella sp.* dipisahkan dari cairannya kemudian dilakukan penimbangan. Hasil penimbangan dicatat sebagai berat basah.

3.5.3 Penentuan Kadar Air Mikroalga *Chlorella sp.*

Cawan yang akan digunakan dipanaskan dahulu dalam oven dengan suhu 100 – 105 °C selama 15 menit, kemudian cawan disimpan dalam desikator selama 10 menit, lalu ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama hingga diperoleh berat cawan yang konstan. Biomassa *Chlorella sp.* ditimbang 0,5 gram dalam cawan dan dikeringkan didalam oven suhu 100 – 105 °C selama 30 menit, kemudian dimasukkan dalam desikator, ditimbang dan dioven sampai diperoleh berat konstan. Kadar air sampel biomassa *Chlorella sp.* dihitung menggunakan rumus (AOAC, 1984) :

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

Keterangan : a = berat cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat cawan + sampel setelah dikeringkan

3.5.4 Ekstraksi Maserasi Biomassa *Chlorella sp.*

Biomassa *Chlorella sp.* kering yang telah diperoleh dari fase pemanenan dimasukkan ke dalam beaker glass 500 mL dan ditambahkan pelarut metanol dengan perbandingan 1:5 (b/v) (30 gr : 150 mL), ditutup dengan alumunium foil dan dilakukan maserasi dengan pengocokan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama ± 2 jam pada suhu kamar. Setelah itu, disaring dengan menggunakan corong *buchner* sehingga terpisah antara residu dan filtrat. Bagian residu dimaserasi kembali hingga 3 kali proses ekstraksi. Filtrat yang diperoleh dari 3 kali proses maserasi tersebut dikumpulkan menjadi satu dan dihilangkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator vacuum* sehingga diperoleh ekstrak pekat *Chlorella sp.* Kemudian ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang untuk selanjutnya dihitung nilai randemen ekstrak yang dihasilkan dari fase pemanenan tersebut (Khopkar, 2003):

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

3.5.5 Hidrolisis dan Partisi Ekstak Pekat Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstrak pekat metanol sebanyak 3 gram dihidrolisis dengan katalis HCL 2 N sebanyak 6 mL dan distirer selama 1 jam dengan hot plate stirer. Selanjutnya ditambahkan natrium bikarbonat hingga pH-nya netral. Kemudian dipartisi dengan pelarut Petroleum Eter (PE) sebanyak 15 mL sebanyak 5 kali ekstraksi. Kemudian fraksi pelarut (hasil partisi) dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan dialiri gas N₂. Selanjutnya dihitung randemenya dengan rumus :

$$\text{Randemen} = \frac{\text{Fraksi yang diperoleh}}{\text{berat sampel yang dihidrolisis}} \times 100 \%$$

3.4.6 Pemisahan Senyawa Steroid *chlorella sp.* Dengan Kromatografi Kolom

3.4.6.1 Pembuatan Fase Diam Cara Basah (Kusmiyati, 2011)

Silika gel sebagai fasa diam dibuat dengan cara menimbang 20 gram silika gel yang sudah diaktivasi selama 2 jam. Kemudian distirer dengan pelarut n-heksana:etil asetat (4:1) sebanyak 20 mL, dan eluennya (fase gerak) berupa n-heksana dan etil asetat 300 mL. Kemudian ditampung hasil pemisahan kolom sebanyak 2 mL dalam botol vial.

3.4.6.1 Pembuatan Fase Diam Cara Kering (Suryani, 2011)

Ditimbang 20 g silika gel, diaktivasi dengan pemanasan dalam oven selama 2 jam. Dimasukkan dalam desikator selama 15 menit. Dimasukkan silika gel G-60 ke dalam kolom setebal 1,5 cm dan selama penambahan ini kolom diketok-ketok agar tidak terpecah. Selanjutnya ditambahkan eluen secara perlahan hingga silika dalam kolom terendam eluen. Sampel diambil 0,1 g dicampur dengan 1 mL eluen (1:10). Selanjutnya kran sedikit dibuka dan dikeluarkan eluen hingga tersisa di atas fase diam namun tidak melebihi fase diam. Setelah itu, kran ditutup dan dimasukkan campuran sampel dan eluen menggunakan pipet dan ditunggu hingga sampel turun. Selanjutnya ditambahkan eluen, kran dibuka dan dilakukan elusi dengan menjaga agar silika gel dalam kolom selalu terendam eluen.

3.5.7 Monitoring dengan KLT-A dan uji Lieberman Burchad

Vial hasil kromatografi kolom dianalisis dengan KLT-A dengan cara persepuluh jarak antara botol vial ditotolkan ke plat KLT sebanyak 5 totolan. Dimasukan plat KLT ke dalam bejana pengembang yang berisi pelarut campuran antara n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 4:1. Kemudian noda pada plat KLT disinari dengan sinar UV 254 nm dan 366 nm dengan ditambahkan pereaksi

Lieberman Burchard sebelum dan sesudah disinari. Vial yang memiliki noda yang sama atau mirip dijadikan satu fraksi yang besar.

3.5.8 Identifikasi dengan Spektrofotometer IR (FTIR)

Hasil yang didapatkan kemudian diidentifikasi dengan instrumen spektrofotometer IR. Senyawa yang dihasilkan dijadikan pellet KBR terlebih dahulu, kemudian pellet KBR diletakan diatas tempat sampel. Selanjutnya tempat sampel dimasukan dalam intrumen spektrofotometer IR, kemudian diidentifikasi hasil spektranya.

3.6 Analisa Data

Data yang diperoleh dianalisa secara deskriptif yaitu dengan memperhatikan pola pemisahan pada kromatografi kolom dari cara pembuatan fasa diam dengan cara basah dan fasa diam dengan cara kering. Identifikasi kemurnian senyawa steroid dapat diketahui dengan melakukan analisis hasil uji KLT analitik dari pengukuran jarak migrasi dan warna bercak noda senyawa pada plat KLT yang berbeda menggunakan parameter nilai R_f dan memperhatikan tiap warna yang terbentuk dari KLT analitik dan dengan spektrofotometer FTIR dengan memperhatikan gugus fungsinya.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemisahan senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan kromatografi kolom diawali dengan kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* yang bertujuan untuk meregenerasi sampel *Chlorella sp.* Pemurnian senyawa steroid dari sampel *Chlorella sp.* juga memerlukan beberapa tahapan, yaitu menggunakan ekstraksi maserasi untuk mendapatkan ekstrak kasar, kemudian ekstrak kasar mikroalga *Chlorella sp.* dihidrolisis dan dipartisi menggunakan katalis asam dan pelarut petroleum eter, pemisahan senyawa steroid dilakukan dengan kromatografi kolom variasi fasa diam basah dan kering. Hasil isolat kromatografi kolom diidentifikasi menggunakan KLT analitik untuk mengetahui isolat murni steroid, serta identifikasi gugus fungsi senyawa steroid *Chlorella sp.* menggunakan spektrofotometer inframerah.

4.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

4.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)

Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* diawali dengan pembuatan media pertumbuhan yang digunakan untuk proses pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* yaitu Medium Ekstrak Tauge (MET). MET ini dibuat dari ekstrak tauge yang direndam menggunakan air mendidih, untuk mengekstrak kandungan senyawa yang terdapat didalam tauge. Tauge yang berwarna putih akan berubah menjadi bening setelah proses perendaman, hal ini mengindikasikan kandungan senyawa yang terdapat pada tauge ikut terkestrak.

Media ekstrak tauge kemudian diencerkan dengan aquades, pengenceran ini bertujuan agar didapatkan media ekstrak tauge dengan kadar 4 %, menurut Prihantini (2005) dengan konsentrasi MET 4 % jumlah sel mikroalga *Chlorella sp* akan tumbuh lebih banyak. Media ekstrak tauge yang awalnya kental berwarna hijau berubah menjadi encer dan berwarna keruh setelah ditambahkan aquades, media ekstrak tauge dengan kadar 4 % ini yang selanjutnya digunakan untuk proses kultivasi sampel *Chlorella sp*.

4.1.2 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET)

Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* ini bertujuan untuk menumbuhkan atau meregenerasi *Chlorella sp.* di dalam Media Ekstrak Tauge 4 %. Pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* membutuhkan cahaya untuk proses fotosintesis agar *Chlorella sp.* mampu berkembang biak, sehingga digunakan lampu TL36 watt yang diindikasikan sebagai pengganti sinar matahari untuk proses fotosintesis. Tempat rak kultivasi *Chlorella sp.* juga diatur fotoperiodisitasnya, yaitu 14 jam terang dan 10 jam gelap yang dilakukan selama 10 hari. Proses fotoperioditas mengindikasikan adanya siang dan malam, sehingga mikroalga *Chlorella sp.* dapat melakukan proses fotosintesis.

Proses kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* terjadi perubahan warna pada inokulum setiap harinya, mulai dari warna hijau kekuningan pada hari ke-0 sampai hijau pekat pada hari ke-10. Perubahan warna tersebut mengindikasikan bahwa terjadi peningkatan kadar klorofil pada mikroalga yang merupakan pigmen utama pada mikroalga *Chlorella sp.* Hal ini menunjukkan bahwa mikroalga *Chlorella sp.* dapat tumbuh dengan baik pada medium ekstrak tauge sehingga kepadatan sel bertambah banyak.

4.2 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Pemanenan *Chlorella sp.* pada penelitian ini dilakukan pada hari ke-10, yang merupakan fase pertumbuhan jumlah sel *Chlorella sp.* paling tinggi seperti pada Gambar 2.1 kurva pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* (Khamidah, dkk., 2014). Fase ini disebut juga dengan fase stasioner, fase antara pertumbuhan sel telah mencapai batas maksimal pertumbuhan. Proses pemanenan biomassa *Chlorella sp.* dilakukan dengan cara mengendapkan *Chlorella sp.* menggunakan *sentrifuge*, isolat mikroalga *Chlorella sp.* hasil *sentrifuge* akan terpisah ditandai dengan perbedaan warna hijau pada bagian bawah dan bening pada bagian atas. Kemudian untuk mendapatkan sampel mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dekantasi yaitu memisahkan dua larutan yang terpisah.

Isolat basah *Chlorella sp.* yang didapat kemudian dikering anginkan, untuk mendapatkan isolat kering. Proses pengeringan juga bertujuan untuk mencegah sampel dari timbulnya jamur pada saat penyimpanan sampel sehingga tidak merusak komposisi dan kandungan sampel mikroalga *Chlorella sp.* Winarno (2002) menyebutkan bahwasanya sampel dengan kadar air 36,10 % rentan terhadap pertumbuhan mikroba.

4.3 Analisis Kadar Air

Penentuan kadar air pada mikroalga *Chlorella sp.* bertujuan untuk mengetahui kandungan air dalam sampel *Chlorella sp.* Semakin tinggi kadar air maka konsentrasi pelarut yang digunakan akan semakin rendah karena telah bercampur dengan kadar air sampel, perubahan konsentrasi ini dapat merubah kepolaran dari pelarut tersebut sehingga akan mempengaruhi hasil ekstraksi.

Selain itu, kadar air sampel juga dapat mempengaruhi aktivitas mikroorganisme dalam sampel. Jika kadar air sampel tinggi maka kelembaban yang ada pada sampel juga tinggi, sehingga sampel mudah terdegradasi oleh mikroorganisme seperti jamur dan penguraian oleh enzim.

Selisih berat sampel sebelum pemanasan dan sesudah pemanasan menunjukkan jumlah air yang teruapkan. Hasil analisis kadar air mikroalga *Chlorella sp.* basah diperoleh sebesar 97,66 %, dan pada sampel mikroalga *Chlorella sp.* kering 10,25 %. Menurut (puspita, 2011) kestabilan optimum bahan dapat tercapai dan pertumbuhan sampel dapat dikurangi jika suatu sampel memiliki kadar air dibawah 11 % untuk sampel kering.

4.4 Ekstraksi Maserasi Biomassa *Chlorella sp.* dengan Pelarut Metanol

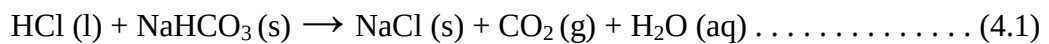
Pemisahan senyawa aktif mikroalga *Chlorella sp.* dimulai dengan metode maserasi yang bertujuan untuk mengekstrak senyawa aktif yang terdapat pada mikroalga *Chlorella sp.* melalui proses perendaman dengan menggunakan pelarut metanol. Pada saat proses perendaman ini terjadi proses difusi, karena adanya perbedaan konsentrasi larutan. Pelarut metanol yang mempunyai konsentrasi yang lebih tinggi akan masuk kedalam sel mikroalga *Chlorella sp.* melalui dinding sel, sehingga seluruh isi sel akan ikut larut ke dalam pelarut metanol. Ekstrak metanol yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum*. Ekstrak metanol yang awalnya dalam bentuk cairan berwarna hijau pekat berubah menjadi ekstrak kering dengan warna hijau pekat.

Ekstrak pekat mikroalga *Chlorella sp.* dialiri gas N₂ untuk menguapkan sisa-sisa pelarut yang masih terdapat pada sampel. Pengaliran gas N₂ dihentikan

sampai diperoleh berat ekstrak pekat mikroalga *Chlorella sp.* telah konstan. Hasil randemen mikroalga *Chlorella sp.* yang diperoleh pada penelitian ini yaitu sebesar 21,8926 %. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan Imamah (2015) hasil randemen ekstrak metanol *Chlorella sp.* diperoleh 13,07 %. Hal ini dikarenakan pada saat proses maserasi pada penelitian ini dilakukan sebanyak lima kali, karena setelah tiga kali maserasi sampel masih berwarna hijau pekat, sehingga hasil randemen pada penelitian ini lebih baik dari sebelumnya.

4.5 Hidrolisis ekstrak pekat metanol *Chlorella sp.* menggunakan pelarut petroleum eter

Senyawa aktif (metabolit sekunder) steroid yang ada di alam kebanyakan berikatan dengan gugus glikosida (mengandung komponen gula (glikon) dan bukan gula (aglikon)), sehingga dilakukan hidrolisis untuk memutuskan ikatan glikosida yang terdapat pada senyawa aktif steroid dengan reaksi hidrolisis dengan menggunakan katalis asam. Hidrolisis ekstrak pekat metanol mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan menambahkan larutan HCl 2 N pada ekstrak pekat dan dinetralkan menggunakan larutan natrium bikarbonat. Pemilihan HCl sebagai katalis karena sifat garam yang terbentuk pada penetralan (NaCl) tidak menimbulkan gangguan. Penambahan natrium bikarbonat bertujuan untuk menetralkan suasana larutan yang menjadi asam setelah penambahan larutan HCl 2 N. Penetralan bertujuan menghentikan reaksi hidrolisis. Reaksi hidrolisis merupakan reaksi *reversible* (dapat balik), sehingga apabila tidak dihentikan maka akan terbentuk kembali ikatan glikosida antara glikon dan aglikon. Reaksi penetralan dengan natrium bikarbonat ditunjukkan pada Gambar 4.1



Persamaan 4.1 Reaksi penetralan dengan natrium bikarbonat

Setelah ikatan glikon (gula) dan aglikon (bukan gula) sudah terputus, maka dilakukan proses partisi untuk memisahkan gugus aglikonya (yang mengandung steroid) dengan menggunakan pelarut petroleum eter. Penggunaan pelarut petroleum eter ini dimaksudkan untuk mengekstrak senyawa yang memiliki sifat kepolaran yang sama dengan pelarut petroleum eter yaitu non polar. Ekstrak pekat yang diperoleh dialiri gas N₂ dan dihitung randemen ekstrak. Hasil randemen partisi yang diperoleh yaitu sebesar 50,6299 %. Hal ini menunjukkan bahwasanya senyawa metabolit sekunder (steroid) yang terdapat pada sampel sudah cukup banyak terkestrak ke pelarut petroleum eter, karena steroid merupakan senyawa non polar, sehingga mampu terkestrak oleh pelarut petroleum eter yang bersifat non polar.

4.6 Pemisahan Senyawa Steroid *Chlorella sp.* dengan Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan suatu metode pemisahan preparatif. Pemisahan dengan metode kromatografi kolom didasarkan pada dua fasa gerak, yakni fasa diam berupa silika gel dan fasa gerak berupa eluen n-heksan:etil asetat (4:1). Penggunaan silika gel dan eluen n-heksana:etil asetat didasarkan pada penelitian sebelumnya (Hidayah, 2015) yang mengisolasi senyawa steroid dengan menggunakan plat KLT silika gel 60. Proses pemisahan senyawa steroid dilakukan dengan menggunakan perbandingan antara kromatografi kolom pembuatan fasa diam cara basah dan kromatografi kolom pembuatan fasa diam cara kering.

4.6.1 Kromatografi Kolom Pembuatan Fasa Diam Cara Basah

Pembuatan fasa diam cara basah dikenal dengan bubur silika (*slury process*), pembuatan bubur silika ini bertujuan untuk menghomogenkan antara fasa diam berupa silika gel dengan fasa geraknya berupa eluen n-heksana:etilasetat agar fasa diam yang terbentuk kerapatannya lebih tinggi dibandingkan dengan fasa diam cara kering.

Pemisahan senyawa steroid yang dilakukan dengan kromatografi kolom pembuatan fasa diam cara basah ini ditampung ke dalam botol vial berukuran 8 mL, setiap penampungan hasil elusi kromatografi kolom pembuatan fasa diam cara basah ini sebanyak 2 mL. Rata-rata waktu yang dibutuhkan untuk satu kali proses elusi tiap fraksi yaitu 2 menit 30 detik, semakin lama waktu elusi maka interaksi antara fasa diam (silika gel) dengan sampel yang didapat semakin banyak, karena proses pemisahan akan semakin maksimal.

Hasil dari proses elusi kromatografi kolom pembuatan fasa diam cara basah dilakukan hingga diperoleh isolat sebanyak 214 vial, yang dijadikan dalam 11 fraksi besar. Pengelompokan fraksi ini didasarkan pada jumlah spot, nilai R_f , serta warna spot (Kusmiyati, 2011). Dari 11 fraksi yang didapat, diperoleh 1 fraksi murni yang diduga senyawa steroid pada vial ke-6 sampai vial ke-10. Senyawa yang diduga murni steroid ini ditandai dengan muncul spot warna hijau, mempunyai spot tunggal (Saleh, 2007).

4.6.2 Pemisahan Steroid dengan Kromatografi Kolom Pembuatan Fasa diam Cara Kering

Proses elusi yang terjadi pada kromatografi kolom pembuatan fasa diam cara kering rata-rata waktu yang dibutuhkan yaitu 1 menit 25 detik tiap vial, lebih cepat dibandingkan kromatografi kolom cara basah. Hal ini dikarenakan perbedaan proses pembuatan fasa diam cara basah dan kering, dimana pembuatan fasa diam cara basah melalui proses penjenuhan (*slury*). Akan tetapi pada proses pembuatan fasa diam cara kering tidak dilakukan proses penjenuhan (*slury*), sehingga ada perbedaan yang terjadi pada saat proses elusi.

Hasil kromatografi kolom cara kering yang dilakukan pada penelitian ini diperoleh 160 vial. Pada saat proses penggolongan senyawa diperoleh 2 fraksi murni, dimana 1 fraksi diduga senyawa steroid pada vial ke-4 sampai vial ke-6, dan 1 fraksi diduga senyawa triterpenoid pada vial ke-30. Ditandai dengan muncul spot tunggal warna hijau untuk steroid dan warna merah pada triterpenoid, pengelompokan fraksi fraksi ini juga didasarkan pada kesamaan nilai R_f (Saleh, 2007).

4.7 Monitoring Hasil Kromatografi Kolom dengan Metode KLT Analitik

4.7.1 Monitoring Hasil Fraksi Kolom Pembuatan Fasa Diam Cara Basah

Hasil yang diperoleh dari kromatografi kolom fasa diam cara basah diidentifikasi menggunakan metode KLT analitik dengan eluen n-heksana:etil asetat (4:1), untuk mengetahui senyawa yang terdapat pada kolom basah. Identifikasi hasil kromatografi kolom disebut juga dengan monitoring, yang dilakukan dari vial 1 sampai 214 untuk menentukan jenis senyawa yang terekstrak pada kromatografi kolom basah. Istilah vial pada penelitian ini yaitu isolat yang

diperoleh tiap 2 mL dari proses elusi kromatografi kolom. Hasil monitoring kromatografi kolom cara basah seperti pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil monitoring kolom basah

Fraksi	Vial	Warna UV	Rf	Keterangan
1	1-5	Kosong	Kosong	Kosong
2	6-10	Hijau	0,662	Steroid
3	11-14	Hijau + Merah	0,662, 0,6	Campuran
4	15	Merah + Merah	0,625, 0,437	Campuran
5	16-18	Merah + Merah	0,55, 0,387	Campuran
6	20-26	Merah + Merah	0,412, 0,297	Campuran
7	30-40	Merah	0,275	Triterpenoid
8	41-44	Merah + Merah	0,387, 0,212	Campuran
9	45-49	Merah	0,156	Triterpenoid
10	50-60	Merah	0,212	Triterpenoid
11	65-214	Kosong	Kosong	Kosong

Identifikasi hasil monitoring pada Tabel 4.1 menggunakan lampu Uv dengan panjang gelombang 366 nm menunjukkan spot awal pada proses elusi muncul pada fraksi 2 vial ke-6. Hal ditunjukkan dengan muncul spot warna hijau yang diduga senyawa steroid terekstrak terlebih dahulu. Senyawa steroid merupakan senyawa yang non polar dan eluen yang digunakan untuk proses elusi yaitu n-heksana:etil asetat (4:1) cenderung non polar, sehingga steroid yang terdapat pada mikroalga *Chlorella sp.* terekstrak terlebih dahulu. Senyawa steroid muncul pada spot warna hijau setelah penambahan reagen Liebermann-Burchard. Menurut Saleh (2007) munculnya spot warna hijau pada proses elusi merupakan senyawa steroid serta warna merah merupakan senyawa triterpenoid setelah penambahan reagen Liebermann-Burchard. Begitu juga menurut Khamidah (2014) adanya perubahan warna hijau kebiruan menunjukkan senyawa tersebut adalah steroid.

Senyawa yang terekstrak pada kromatografi kolom pembuatan fasa diam cara basah sudah cukup baik, hal ini ditunjukkan banyak senyawa murni dengan spot tunggal. Pada fraksi 2 vial ke-6 sampai ke-10 merupakan senyawa murni steroid, dan vial nomor 30-40, 45-49, dan fraksi 50-60 juga merupakan senyawa murni triterpenoid dengan ditandai spot warna merah. Pengelompokan fraksi ini didasarkan pada jumlah spot yang sama, warna, dan nilai Rf (Kusmiyati, 2011).

4.7.2 Monitoring Hasil Fraksi Kromatografi Kolom Cara Kering

Monitoring yang dilakukan pada hasil kromatografi kolom pembuatan fasa diam cara kering ini juga dilakukan untuk mengetahui jenis senyawa apa saja yang terekstrak dengan metode kromatografi kolom fasa diam cara kering. 160 vial dimonitoring dengan menggunakan metode KLT analitik. Hasil monitoring yang diperoleh seperti Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil monitoring kromatografi kolom cara kering

Fraksi	Vial	Warna UV	Rf	Keterangan
1	1-3	Kosong	-	-
2	4-6	Hijau	0,48	Steroid
3	8-12	Hijau Merah Merah Merah	0,48 0,32 0,21 0,12	campuran
4	14-16	Merah Merah	0,19 0,07	Campuran
5	20	Merah Merah	0,43 0,40	Campuran
6	30	Merah	0,29	triterpenoid
7	40-160	Kosong		

Hasil monitoring di atas menunjukkan senyawa yang diduga steroid murni pada kromatografi kolom pembuatan fasa diam cara kering ini terisolasi pada fraksi 2 vial ke-4 sampai ke-6, sedangkan pada fraksi ke-3 sampai ke-5

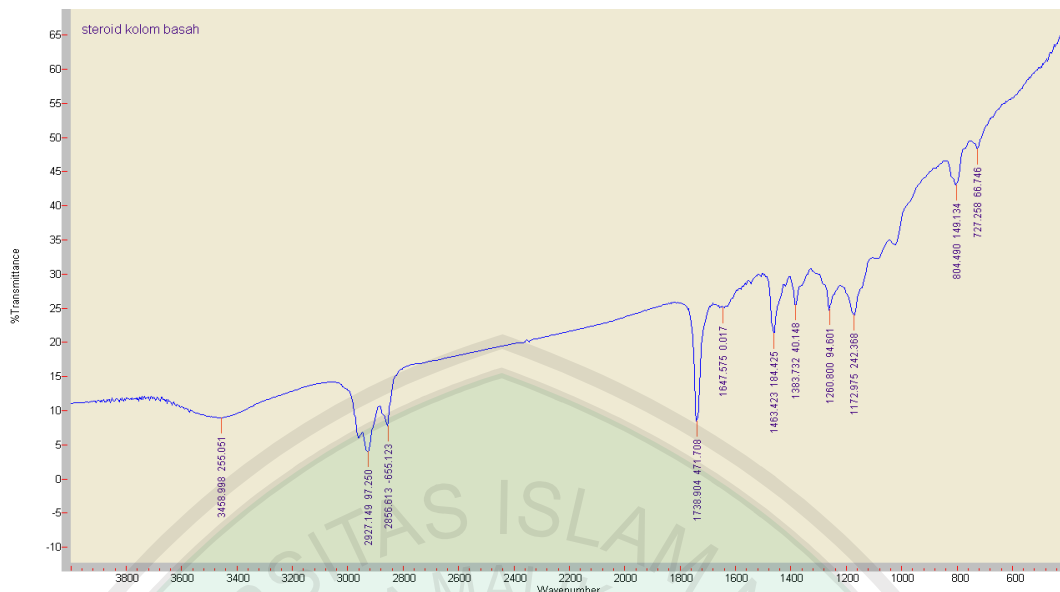
merupakan senyawa campuran. Hasil senyawa yang terisolasi pada kromatografi kolom pembuatan fasa diam cara kering ini terdapat beberapa senyawa campuran tiap fraksinya, hal ini yang membedakan kerapatan fasa diam pada saat proses elusi antara fasa diam cara basah dan kering, sehingga ada perbedaan diantara jenis kromatografi kolom tersebut.

Hasil yang diperoleh pada fraksi 11 Tabel 4.1 dan fraksi 7 Tabel 4.2 menunjukkan tidak terdapat senyawa yang terekstrak. Hal ini dibuktikan dari tidak ada noda atau spot yang muncul pada saat proses KLT analitik. Menurut Etika dan Suryelita (2014), untuk mendapatkan ekstrak senyawa yang murni pada kromatografi kolom, perlu adanya variasi pelarut agar dapat mengekstrak senyawa yang ada didalam sampel. Hal ini dikarenakan perbedaan kepolaran yang ada di setiap senyawa, sehingga jika menggunakan satu pelarut maka hasil yang didapat kurang maksimal.

Senyawa steroid hasil kromatografi kolom cara basah diperoleh sebanyak 7,7 mg dari 5 vial yang murni senyawa steroid, sedangkan pada hasil kromatografi kolom cara kering satu fraksi murni senyawa steroid 7 mg dari 3 vial yang diperoleh.

4.8 Identifikasi Gugus Fungsi Steroid dengan Spektrofotometer IR

Spektrofotometer IR merupakan suatu metode yang digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi suatu senyawa. Setiap gugus fungsi mempunyai tipe ikatan yang berbeda sehingga tiap gugus fungsi mempunyai serapan IR yang khas. Spektra FTIR dari hasil kromatografi kolom mikroalga *Chlorella sp.* dapat dilihat pada Gambar 4.1



Gambar 4.1 Hasil identifikasi steroid kolom basah dengan spektrofotomer IR

Tabel 4.3 Interpretasi spektra IR steroid hasil kromatografi kolom

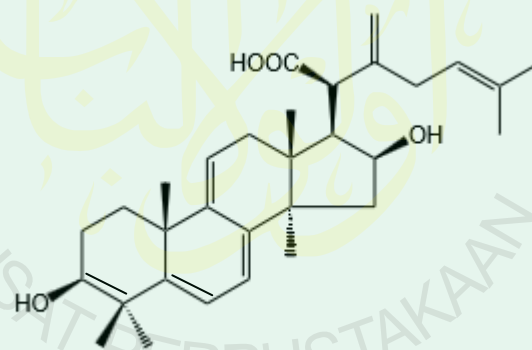
No	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Range Pustaka (Socrates, 1994)	Jenis Vibrasi	Intensitas Refrensi
1.	3458	3550 – 3230	O-H (stretch) dari ikatan hidrogen intermolekuler	m-s
2.	2927	3000 – 2800	C _{sp} ³ – H (stretch)	m-s
3.	2856	2870 – 2840	-CH ₂ - stretch (sym)	M
4.	1738	1720-1749	C=O	m-s
5.	1547	1600 – 1450	C = C stretch	w-m
6.	1463	1480 – 1440	-CH ₂ (bend)	W
7.	1383	1395 – 1365	-C(CH ₃) ₃ (stretch)	M
8.	1172	1205 – 1125	C – O (stretch) alkohol tersier	M
9.	804	995 – 650	=C – H siklik (bend)	W

Keterangan: s= strong; m= medium; w= weak

Hasil analisis pola serapan FTIR yang dihasilkan dari kromatografi kolom basah mikroalga *Chlorella sp.* berdasarkan Gambar 4.2 dan Tabel 4.3 menunjukkan adanya pita serapan pada daerah 3458,99 cm⁻¹ yang melebar menunjukkan adanya gugus O-H pada isolat. Pita serapan 2927,49 cm⁻¹ dan 2856,61 cm⁻¹ diduga mengandung rentangan –CH alifatik. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan adanya gugus metil (CH₃) dan metilen (CH₂) (Socrates,

1994). Dugaan ini diperkuat dengan adanya vibrasi C-H tekuk pada pita serapan $1463,42\text{ cm}^{-1}$ dan $1383,73\text{ cm}^{-1}$. Adanya vibrasi C-H tekuk pada spektra inframerah mengindikasikan adanya gugus gem dimetil yang lazim ditemukan pada senyawa terpenoid dan steroid (Astuti, 2014).

Vibrasi pada bilangan gelombang $1647,70\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya ikatan rangkap C=C dan rentangan C=O pada daerah serapan $1738,90\text{ cm}^{-1}$. Bilangan gelombang $1260,80\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi C-O dan vibrasi pada bilangan gelombang $1172,97\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi C-OH tersier. Berdasarkan hasil ini maka isolat diduga merupakan steroid jenis fitosterol yang memiliki gugus fungsi C=C, C=O, C-OH tersier, OH dan gem dimetil seperti Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Steroid jenis fitosterol (Saleh, 2007)

4.9 Pemanfaatan Mikroalga *Chlorella sp.* dalam Perspektif Islam

Allah SWT menciptakan “akal” dan “pikiran” buat kita umat manusia agar digunakan untuk memikirkan hal baru yang baik dan benar. Salah satu hal yang diperintahkan Allah SWT yaitu memikirkan ciptaan yang sudah dibuat Allah SWT. Oleh karena itu, Allah menyuruh kita untuk terus mempelajarinya hingga

munculah berbagai eksperimen untuk mengetahui potensi dan manfaat yang telah diciptakan, salah satu potensi yang dapat dipelajari yaitu ilmu sains, dengan memikirkan hal baru yang mampu dipikirkan manusia. Seperti dalam firman Allah SWT dalam Q.S. Ali ‘Imron ayat 190:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَآخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾

“Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal,”

Ayat di atas menjelaskan bahwasanya, Allah SWT telah memberi pernyataan bahwa seluruh ciptaan-Nya yang ada di langit maupun di bumi terdapat suatu tanda-tanda kebesaran-Nya. Namun Allah SWT membatasi tanda-tanda kebesaran-Nya yang hanya bisa diketahui bagi orang-orang yang berakal. Salah satu yang dapat dipikirkan dalam dunia sains adalah membuat metode baru, seperti halnya metode dalam penelitian ini yang mampu memberikan hasil yang baik untuk mengisolasi suatu bahan yang ada pada tumbuhan di alam.

Tumbuhan merupakan salah satu nikmat Allah yang diberikan kepada manusia. Salah satu ayat Alqur’an yang menjelaskan tentang pemanfaatan tumbuhan terdapat dalam surat Thaahaa ayat 53.

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَّكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ

مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِّن نَّبَاتٍ شَتَّى ﴿٥٣﴾

“Yang Telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang Telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam” (QS. Thaahaa: 53)

Allah SWT menciptakan alam beserta isinya seperti hewan dan tumbuhan yang merupakan rahmat yang besar, tidak ada segala sesuatu yang diciptakan Allah SWT menjadi suatu yang sia-sia, melainkan Allah menciptakan setiap sesuatu dengan hikmah-hikmah tertentu. Manusia berhak untuk memanfaatkan segala sesuatu yang ada di bumi baik hewan maupun tumbuhan. Allah menumbuhkan berbagai macam tanaman dengan berbagai jenis bentuk dan ukuran, tidak hanya dalam skala makro, jenis tumbuhan berukuran mikro juga mempunyai banyak manfaat. Sebagaimana dalam firman Allah SWT QS asy Syu'ara ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

“Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik” (QS. asy Syu'ara:7).

Shihab (2002) menjelaskan bahwa Allah SWT menumbuhkan berbagai macam tumbuhan yang baik, yaitu subur dan bermanfaat. Salah satu tumbuhan yang bermanfaat sebagaimana dalam penelitian ini yang menggunakan mikroalga *Chlorella sp.* yang di dalamnya banyak manfaatnya bagi manusia, yaitu sebagai antioksidan, antibakteri, dan toksisitas. Pemanfaatan mikroalga juga dijelaskan pada QS al A'laa ayat 4-5:

وَالَّذِي أَخْرَجَ الْمَرْعَىٰ ﴿١﴾ فَجَعَلَهُ غُثَاءً أَحْوَىٰ ﴿٢﴾

“Dan (Allah) yang menumbuhkan rumput-rumputan, lalu dijadikan-Nya rumput-rumput itu kering kehitam-hitaman.”

Menurut tafsir Al-Maghribi yang dinyatakan dalam Subandi (2010) bahwa *al-mar'aa* adalah segala sesuatu (tumbuh-tumbuhan) yang hidup di bumi. *Al-Ghutsa* adalah endapan arus banjir berupa rumput-rumputan, dan *ahwaa* berarti

kehitam-hitaman. *Al-Ghutsa* dapat juga ditafsirkan sebagai hasil perubahan kimiawi dari rerumputan jenis pertama yang tumbuh di bumi (rumput golongan alga). Sehingga Subandi (2010) menafsirkan *al-Ghutsa* sebagai cairan minyak kasar (*crude oil*). Telah diketahui bahwa jenis rumput-rumputan yang kandungan minyak dieselnya tinggi adalah alga atau disebut juga ganggang. Banyak penelitian yang menyebutkan mikroalga *Chlorella sp.* mempunyai banyak manfaat, seperti penelitian Khamidah (2014) menyebutkan bahwasanya senyawa steroid yang berada didalam *Chlorella sp.* mampu sebagai antioksidan. Allah SWT menciptakan segala sesuatu pasti ada ukurannya, begitu juga senyawa steroid yang ada dalam *Chlorella sp.* mempunyai kadar tertentu. Sebagaimana dalam firman Allah SWT QS al Qomar ayat 49 :

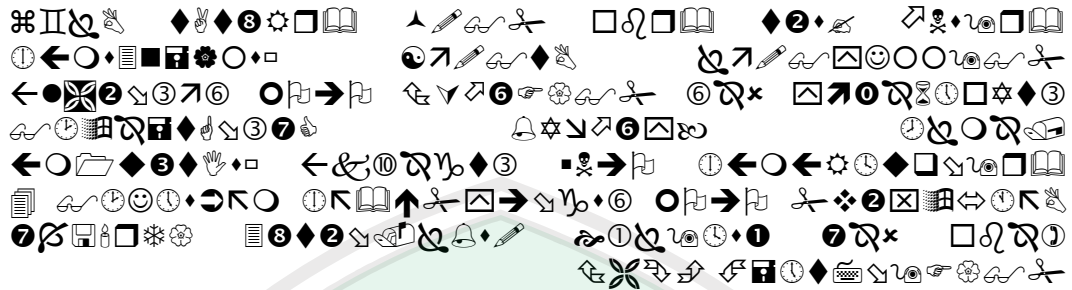
إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

“Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran” (al-Qomar : 49).

Ayat tersebut melukiskan keteraturan penciptaan segala sesuatu yaitu dengan ketentuan yang berupa ukuran. Dalam suatu riwayat disebutkan bahwa turunya ayat ini berkenan dengan bantahan kaum musyrikin quraisy terhadap perjalanan Rasulullah SAW tentang takdir.

Pada dasarnya ayat tersebutlah yang mendasari perlakuan para ahli kimia dalam menangani proses-proses alamiah. Mereka selalu menentukan ukuran terhadap jumlah komponen beserta kadar senyawa yang terdapat dalam suatu hal yang hendak mereka teliti. Dengan pengetahuan tersebut maka segala sesuatu yang sudah diteliti akan lebih efisien dalam pemanfaatannya. Pemilihan suatu

metode dalam penelitian ilmiah juga sangat mempengaruhi kadar yang dihasilkan, seperti firman Allah SWT dalam QS. az Zumar ayat 21:



“Apakah kamu tidak memperhatikan, bahwa Sesungguhnya Allah menurunkan air dari langit, Maka diaturnya menjadi sumber-sumber air di bumi kemudian ditumbuhkan-Nya dengan air itu tanam-tanaman yang bermacam-macam warnanya, lalu menjadi kering lalu kamu melihatnya kekuning-kuningan, kemudian dijadikan-Nya hancur berderai-derai. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat pelajaran bagi orang-orang yang mempunyai akal.”(Qs. az Zumar:21).

Semua manusia diberikan akal oleh Allah SWT, tapi tidak semuanya memanfaatkan dengan baik, seperti halnya metode kromatografi kolom pada penelitian ini yang digunakan untuk proses pemisahan senyawa steroid. Kadar yang diperoleh dengan menggunakan metode kromatografi kolom lebih banyak dibandingkan dengan metode yang lain seperti kromatografi lapis tipis preparatif. Kadar steroid murni yang diperoleh pada penelitian ini sebesar 7,7 mg, sedangkan kadar yang diperoleh dari hasil kromatografi lapis tipis hanya 0,001 mg.

Manfaat senyawa steroid juga telah dibuktikan pada penelitian Amaliyah (2013) yang melakukan uji antibakteri terhadap senyawa steroid dari mikroalga *Chlorella sp.*, dan juga penelitian Desianti (2014) yang menyatakan senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* mengandung toksisitas.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian isolasi pemisahan senyawa steroid dengan menggunakan kromatografi kolom cara kering dan basah yang telah dilakukan dapat disimpulkan:

1. Hasil yang diperoleh dari kromatografi kolom pembuatan fasa diam basah sebanyak 214 vial, dan diperoleh 4 fraksi murni, 1 fraksi salah satunya diduga steroid. Sedangkan kromatografi kolom fasa diam kering diperoleh 160 vial, 2 fraksi murni, yang diduga senyawa triterpenoid dan steroid. Kromatografi kolom basah lebih baik dibandingkan dengan kromatografi kolom kering, karena dihasilkan fraksi murni yang lebih banyak.
2. Identifikasi senyawa steroid hasil pemisahan dengan kromatografi kolom pembuatan fasa diam cara basah dan kering menggunakan spektrofotometer FTIR menunjukkan bahwa isolat diduga merupakan senyawa steroid jenis fitosterol karena memiliki C=C, C=O, C-OH primer, C-OH tersier, OH dan gem dimetil.

5.2 Saran

1. Diperlukan pemisahan dengan variasi gradien agar didapat hasil yang lebih optimal untuk memisahkan senyawa yang berada pada sampel sehingga dapat diketahui semua senyawa yang terdapat pada sampel.

DAFTAR PUSTAKA

- Adhiatama I., Zainuddin M., dan Rokhati N. 2012. Hidrolisis Kitosan Menggunakan Katalis Asam Klorida (HCL). *Jurnal Teknik Kimia dan Industri*. Semarang: UNDIP Semarang. Vol. 1. No.1.
- Afif. S. 2013. Ekstraksi, Uji Toksisitas dengan Metode BLT dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Alga Merah *Euchirum spinosum* dari Sumenep Madura. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Amaliyah S., Khamidah U., Bariyyah S.K., Romaidi. Fasya A. G. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) Pada Tiap Fase Pertumbuhan, *Jurnal Kimia Alchemy*. Vol. 2. No.3.
- Anggraeni O.N. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* *Alchemy*. Vol 3. No.2
- Astuti, M.D., Maulana, A., dan Kuntowati, E.M. 2014. Isolasi Steroid dari Fraksi N-Heksana Batang Bajakah Tampala (*Spatholobus littoralis Hassk.*). *Prosiding Seminar Nasional Kimia*. Surabaya: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya. ISBN : 978-602-0951-00-3
- Atun S. 2014. Metode Isolasi dan Identifikasi Struktur Senyawa Organik Bahan Alam. *Jurnal Kimia*. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta. Vol. 8 No.2, Hal 53-61.
- Bariyyah S.K. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Bogoriani N. W. 2008. Isolasi dan Identifikasi Glikosida Steroid dari Daun Andong (*Cordyline terminalis Kunth*). *Jurnal Kimia* 2. Bukit Jimbaran: Universitas Udayana.
- Bold, H.C. dan Wynne, M.J. 1985. *Introduction to the Algae, Second Edition*. New York : Prentice Hall Mc. Engelwood Cliffs.
- Borowitzka, M. A. dan Lesley, J. B. 1988. *Microalgae Biotechnology*. London: Cambridge University Press.
- Desianti N. 2014. Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-Heksana Hasil Hidrolisis

Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Skripsi. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Etika, S.B. dan Suryelita. 2014. Isolasi Steroid Dari Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Jurnal kimia*. Padang: Jurusan Kimia Universitas Negeri Padang. *Eksakta*. Vol. 1 Tahun XV Februari 2014

Gandjar, I.G. dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka belajar.

Gunawan I. W. G., Gede B., dan Sutrisnayati. 2008. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpenoid yang aktif antibakteri pada Herba Meniran (*phyllanthusniruri linn*). *Jurnal Kimia*: 31-39 ISSN 1907-9850

Handoko D.S.P. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis. *Jurnal*. Jember: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember. *Sigma*. Vol. 9 No.1.

Imamah N. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasinya Menggunakan Spektrofotometer FTIR. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Universitas Islam Negeri Maullana Malik Ibrahim Malang.

Indrayani L., Soetjipto H., dan Sihasale L. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Starchytarpheta jamaicensis* L. Vahl) terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach Berk. Penelitian. *Hayati*. Vol. XII:57-61.

Isanansetyo, A., dan Kurniastuty. 1995. *Teknik Kultur phitoplankton dan zooplankton pakan alami untuk pembenihan organisme laut*. Yogyakarta: Kanisius.

Ismarti. 2011. Isolasi Triterpenoid dan Uji Aantioksidan dari Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Meranti Merah (*Shorea singkawang* (Miq).Miq). *Artikel*. Pascasarjana Universitas Andalas.

Kristanti A.N. 2008.*Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press

Kusmiyati, Aznam N., dan Handayani S. 2011. Isolation and Identification of Active Compound Methanol Extract of *Curcuma mangga* Val Rhizomes of Ethyl Acetate Fraction. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. Yogyakarta: Universitas Ahmad Dahlan. Vol. 1, No. 2.

Lenny, S. 2006. Uji Bioaktifitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metode Brine Shrimp. *Jurnal*. Medan: USU.

- Mulyani M., Arifin B., dan Nurdin H., 2013. Uji Antioksidan dan Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Daun Srikaya (*Annona squamosa* L). *Jurnal Kimia*. Universitas Andalas. Vol. 2 No.1.
- Mulyono. 2006. *Kamus Kimia*. Jakarta: PT Bumi Aksara.
- Nihlati L., Abdul R., Triana H. 2008. Daya Antioksidan Ekstrak Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* (roxb)) dengan Metode Penangkapan DPPH. *Skripsi Diterbitkan*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- Poedjiadi, A. dan Supriyanti. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Prihantini N.H., Putri B., dan Yulianti R. 2005. Pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam Media Ekstrak Tauge (MET) dengan Variasi pH Awal. *Makara, sains*, IX (1): 1-6.
- Puspita, M.D.A. 2009 pengoptimuman Fase Gerak KLT Menggunakan Desain Campuran untuk Pemisahan Komponen Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri*). *Skripsi Diterbitkan*. Bogor: Departemen Kimia Fakultas MIPA. IPB.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Sapar A., Kumanireng A. S., dan Noor Alfian. 2004. *Isolasi dan Penentuan Struktur Metabolit Sekunder Aktif Dari Spon Biemna triraphis Asal Pulau Kaposadang (Kepulauan Spermonde)*. Makasar : Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Hasanuddin. Vol. 5 No.1
- Sastrohamidjojo. 1985 *Kromatografi*. Edisi ke-1. Yogyakarta: Liberty
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an* Vol.7 dan 10. Jakarta: Penerbit Lentera Hati.
- Sidabutar, E.A., 1999. Pengaruh Medium Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella sp.* terhadap Aktivitas Senyawa Pemacu Pertumbuhan yang Dihasilkan. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Institut Pertanian Bogor.
- Socrates. 1994. *Infrared Characteristic group Frequencies -2nd Edition*. England: John Wiley and Sons Ltd.
- Sukandana I.M. 2011. Kandungan Senyawa Steroid-Alkaloid pada Ekstrak n-Heksana Daun Beringin (*Ficus benjamina* L). *Jurnal Kimia* 5. Bukit Jimbaran: Universitas Udayana.
- Wahyudi, Setiyono,. A, dan Jayanthi,. W.O. 2014. Studi Kualitas dan Potensi Pemanfaatan Air Tanah Dangkal di Pesisir Surabaya Timur. *Explorium*. Vol. 35, No. 1: 43 – 56.

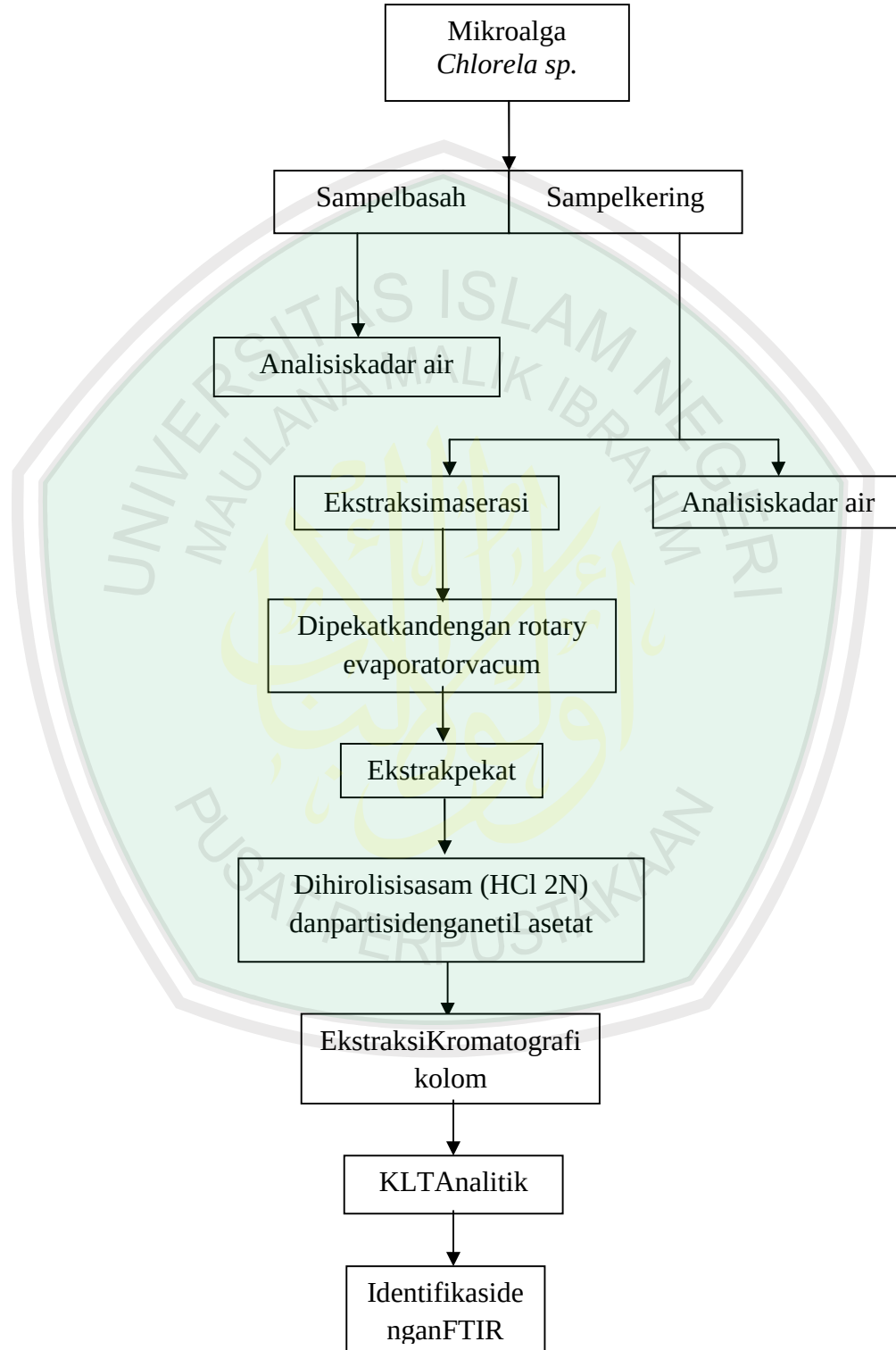
Wulandari A.P., Frida N., Annisa E.P., dan Dilaekha R.P.. 2010 Identifikasi Mikroalga di Sekitar Pantai Pengandaran dan Potensi Pertmbuhsnys pada Formulasi Medium Ekstrak Tauge (MET). *Prosiding Seminar Nasional Limnologi*. V.

Zahara, T.L.. 2003. *Metode Pemisahan*. Yogyakarta: Kanisius.



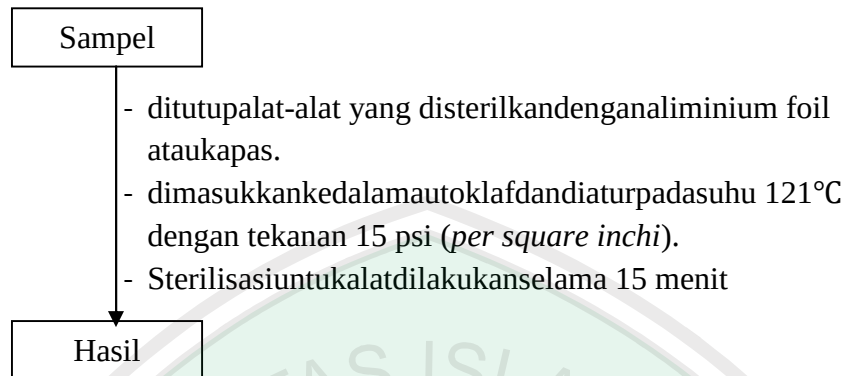
LAMPIRAN

Lampiran1. Diagram Alir Penelitian

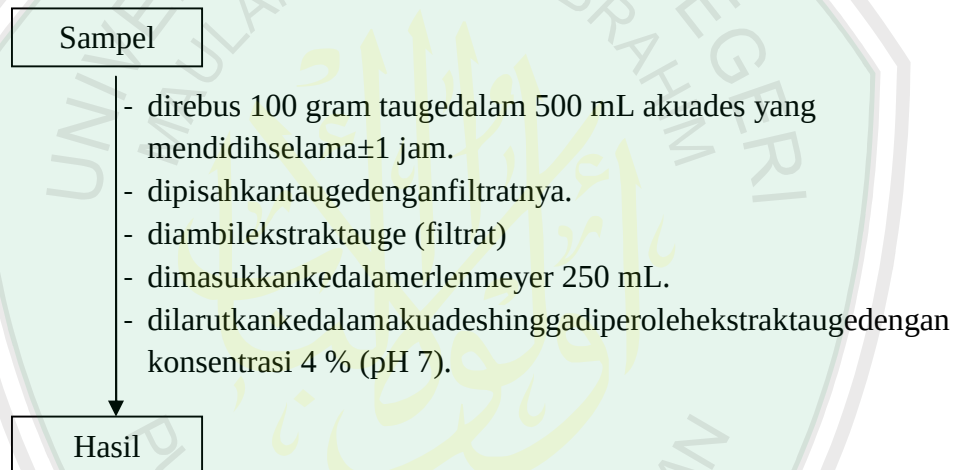


L.1.2 Kultivasi Mikroalga *Chlorella* sp.

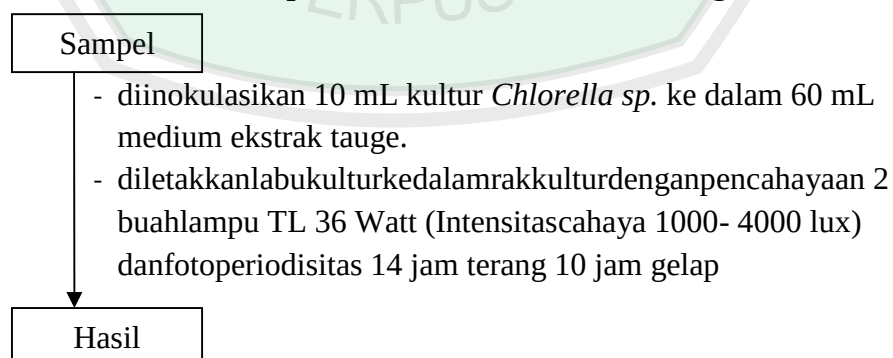
L.1.2.1 Sterilisasi Alat



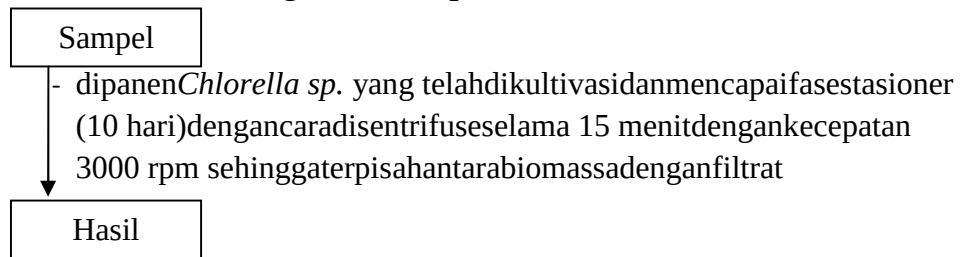
L.1.2.2 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)



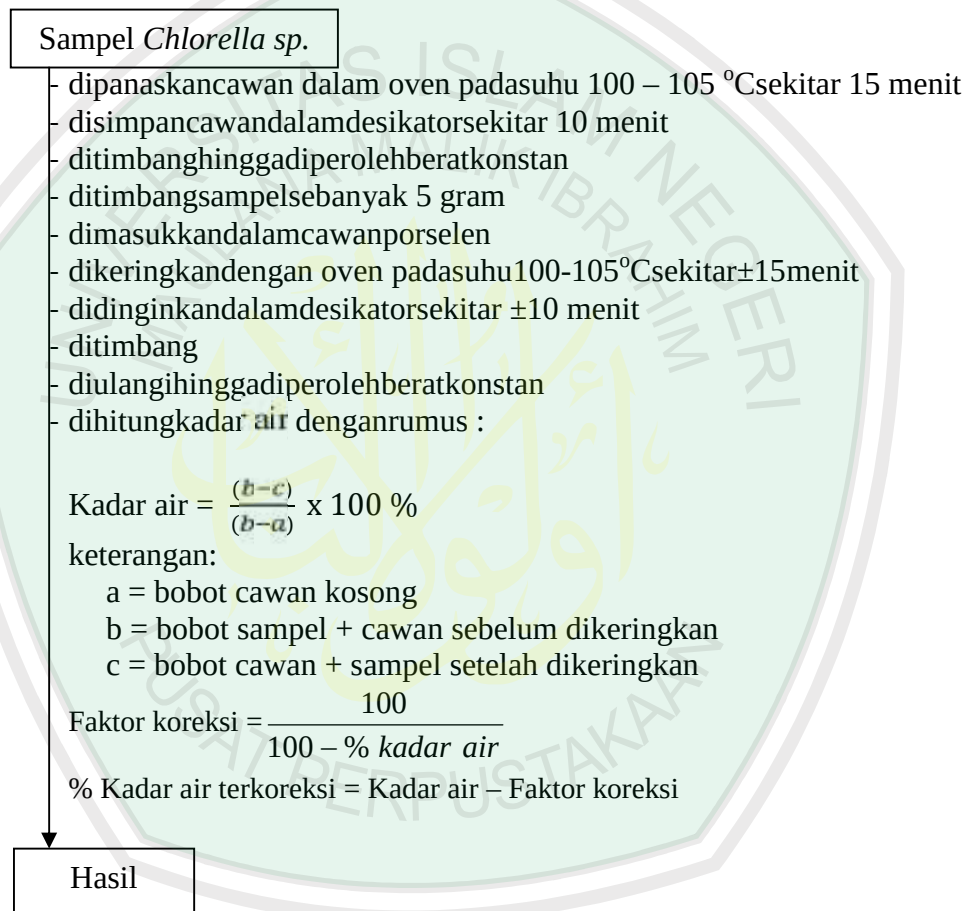
L.1.2.3 Kultivasi *Chlorella* sp. dalam Medium Ekstrak Tauge



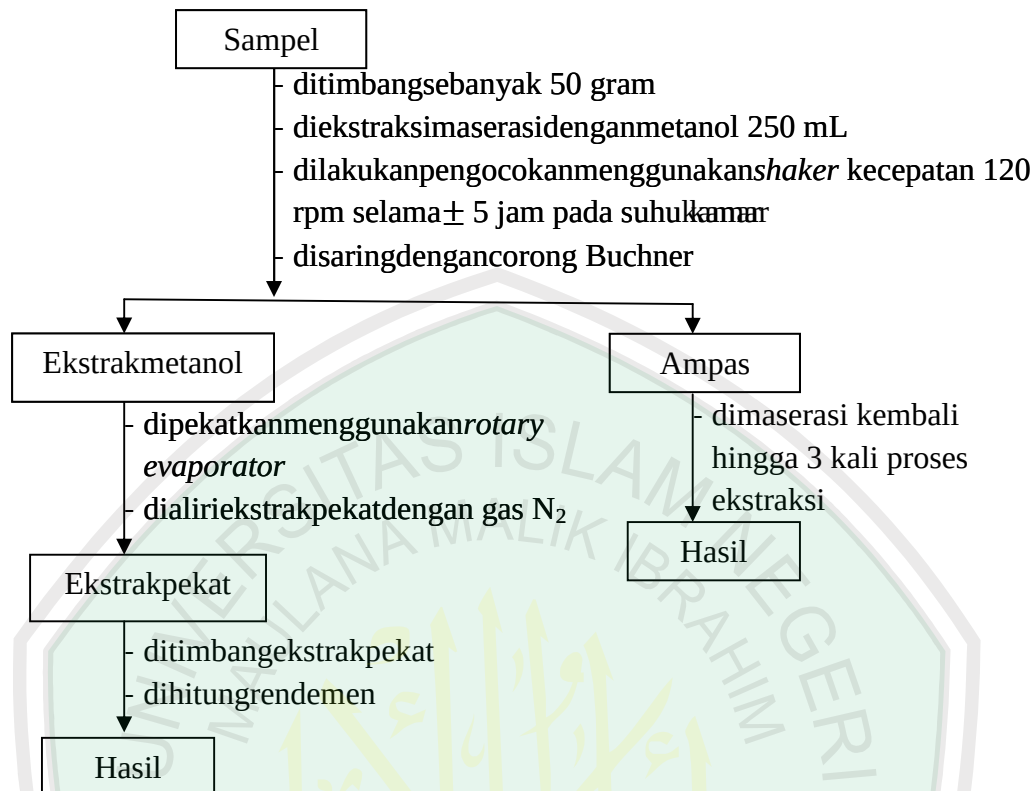
L.1.2.4 Pemanenan Mikroalga *Chlorella* sp.



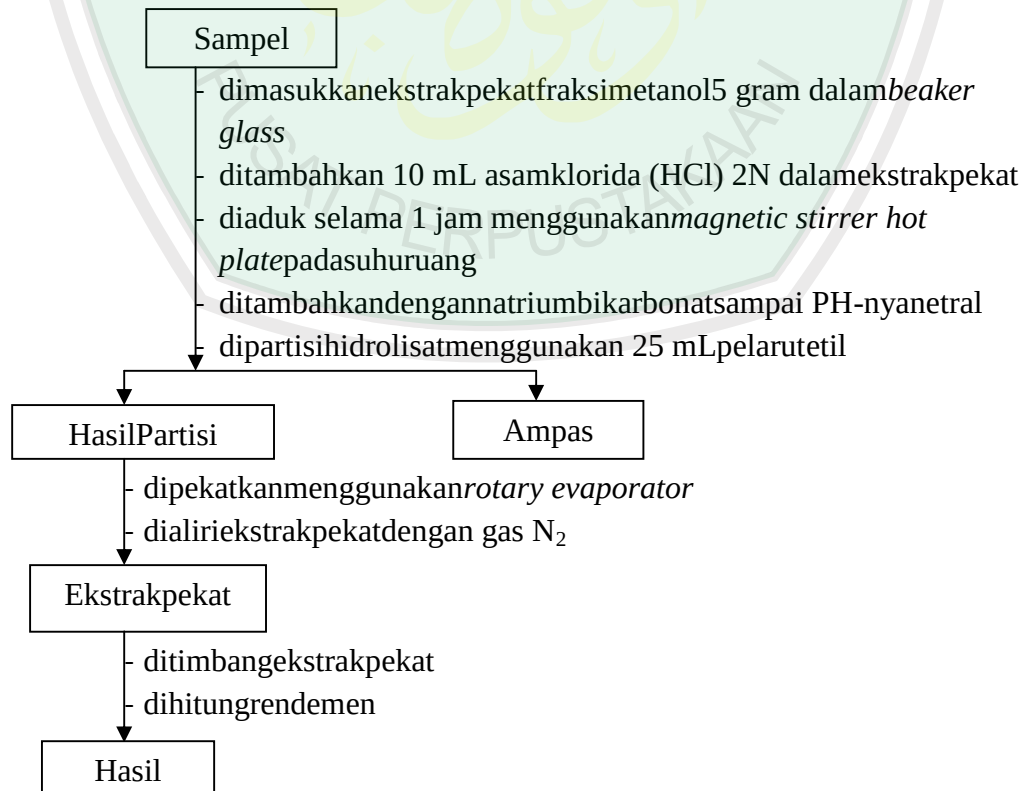
L.1.3 Penentuan Kadar Air Secara Thermogravimetri (AOAC, 1984)



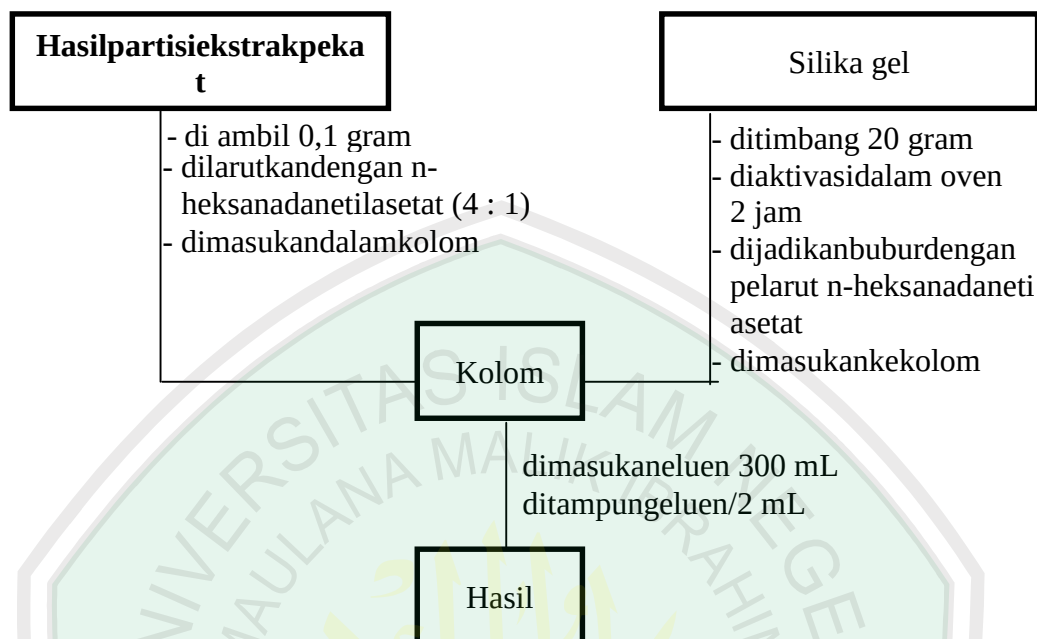
L.1.4 Ekstraksi Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Maserasi



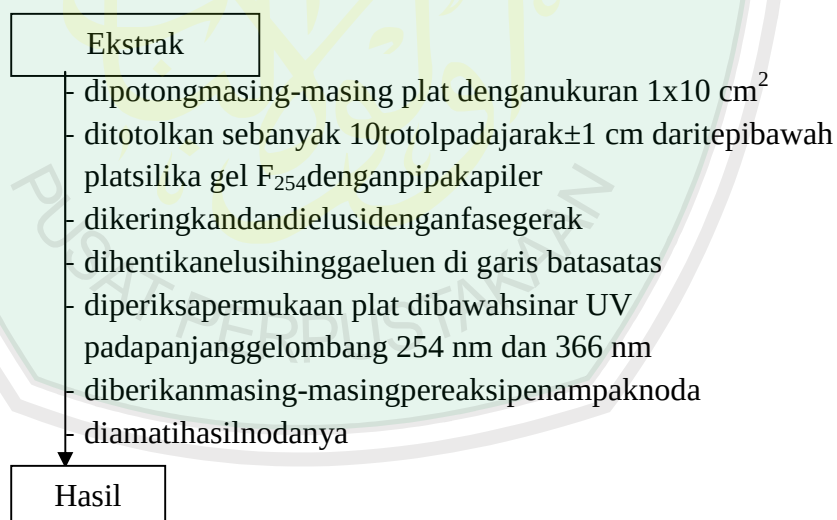
L.1.5 Hidrolisis Dan Ekstraksi Cair-Cair (Partisi) Ekstrak Pekat Metanol



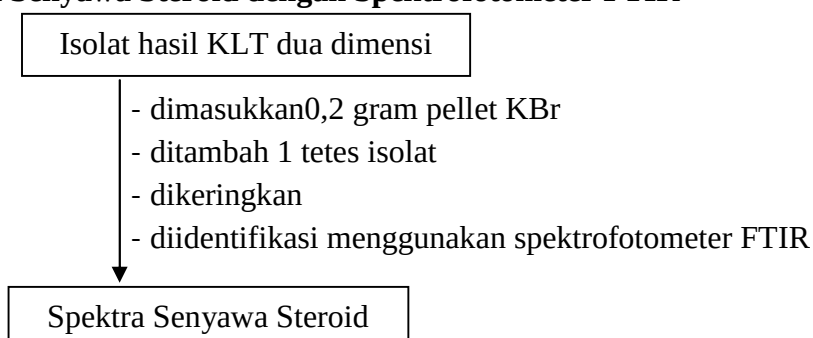
L.1.6 Pemisahan Senyawa Steroid *chlorella sp.* Dengan Kromatografi Kolom



L.1.7 Monitoring Senyawa Steroid dengan KLT Analitik (Bawa, 2007)



L.1.8 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer FTIR



Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Reagen dan Larutan

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

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

- a. Kultivasi dalam Erlenmeyer 1000 ml dengan Memaksimalkan Daya

Tampung Erlenmeyer

$$\frac{10}{60} = \frac{x}{900 \text{ ml MET 40\%}}$$

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

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

$$\text{Volume total} = \text{Isolat } \textit{Chlorella sp.} + \text{MET 4\%}$$

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

$$= 1050 \text{ mL}$$

- b. Pembuatan MET 4% sebanyak 900 ml

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

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

$$= 36 \text{ mL ekstrak taugé}$$

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

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

$$= 864 \text{ mL}$$

- c. Kultivasi dalam Erlenmeyer 1500 ml dengan Memaksimalkan Daya

Tampung Erlenmeyer

$$\frac{10}{60} = \frac{x}{1200 \text{ ml MET 40\%}}$$

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

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

$$\text{Volume total} = \text{Isolat } \textit{Chlorella sp.} + \text{MET 4\%}$$

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

$$= 1050 \text{ mL}$$

- d. Pembuatan MET 4% sebanyak 1200 ml

MET = (aquades + ekstrak taugé)

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

$$= 48 \text{ mL ekstrak taugé}$$

Volume Aquades = MET 4% - (Volume ekstrak taugé)

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

$$= 1152 \text{ mL}$$

L.3.2 Pembuatan larutan HCl 2 N

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

L.3.3 Pembuatan reagen Lieberman-Burchard

- Asamsulfatpekat = 5 mL
- Anhidridaasetat = 5 mL
- Etanolabsolut = 50 mL

Cara pembuatannya adalah disiapkan 5 mL anhidrida asetat dan 5 mL asam sulfat pekat masing-masing dalam beaker glass 50 mL (diakukan dalam lemari asam). Kemudian ditambahkan secara hati-hati melalui dinding erlenmeyer yang berisi

etanol 50 mL, kemudian didinginkan dalam lemari pendingin. Penggunaan reagen ini digunakan langsung setelah pembutan (Wagner, 2001).



Lampiran 3. Perhitungan Rendemen

1. Rendemen Hasil Pengeringan

▪ Pemanenan

No	Berat botol kosong (gr)	Berat botol + <i>Chlorella sp.</i> basah (gr)	Berat <i>Chlorella sp.</i> basah (gr)	Berat <i>Chlorella sp.</i> kering (gr)
1	150,23	269,29	119,06	19,37
2	145,06	280,68	131,62	
3	150,19	385,15	234,96	
4	200,69	309,21	108,52	
5	149,34	292,74	143,40	
Total			737,56	

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{berat kering}}{\text{berat basah}} \times 100 \% \\
 &= \frac{19,37 \text{ gr}}{737,56 \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= 0,0263 \times 100 \% \\
 &= 2,63 \%
 \end{aligned}$$

2. Rendemen Hasil Maserasi

Berat sampel (gr)	Berat wadah (gr)	Berat wadah + ekstrak pekat (gr)	Berat ekstrak pekat (gr)
30,0005	73,8140	75,5675	1,7535
	88,0165	88,7685	0,7520
Total			2,5055

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\
 &= \frac{2,5055 \text{ gr}}{18,2720 \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= 0,137122 \times 100 \% \\
 &= 13,7122 \%
 \end{aligned}$$

3. Perhitungan Rendemen Hasil Partisi

▪ Partisi Petroleum Eter

Berat ekstrak metanol yang akandihidrolisis (gr)	Berat gelaskosong (gr)	Berat gelas + ekstrak petroleum eter (gr)	Berat ekstrak pekat petroleum eter (gr)
2,4922	129,5239	131,5513	1,2618

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\
 &= \frac{1,2618 \text{ gr}}{2,4922 \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= 0,5062 \times 100 \% \\
 &= 50,62 \%
 \end{aligned}$$

Lampiran 4. Perhitungan Kadar Air Kering
Data Pengukuran Kadar Air

Ulangan Cawan	Berat Cawan Kosong (gr)				Rata-Rata Berat Konstan (gr)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
A1	65,4845	65,4823	65,4812	65,4811	65,4811
A2	57,6928	57,6887	57,6889	57,6871	57,6882
A3	58,1379	58,1339	58,1328	58,1326	58,1331

Ulangan Sampel	Berat Cawan + Sampel (gr)				Rata-Rata Berat Konstan (gr)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
A1	65,9811	65,9295	65,9267	65,9257	65,9273
A2	58,1871	58,1326	58,1319	58,1309	58,1318
A3	58,6327	58,5759	58,5770	58,5795	58,5774

Keterangan: P = Perlakuan

1. Kadar air ulanganke-1

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dikeringkan})-(\text{berat cawan+sampel setelah dikeringkan})}{(\text{berat cawan + sampel sebelum dikeringkan})-(\text{berat cawan kosong})} \times 100 \% \\
 &= \frac{(65,9811-65,9273) \text{ gr}}{(65,9811-65,4811) \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,0538 \text{ gr}}{0,5 \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= 10,76\%
 \end{aligned}$$

2. Kadar air ulanganke-2

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dikeringkan})-(\text{berat cawan+sampel setelah dikeringkan})}{(\text{berat cawan + sampel sebelum dikeringkan})-(\text{berat cawan kosong})} \times 100 \% \\
 &= \frac{(58,1871-58,1318) \text{ gr}}{(58,1871-57,6882) \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,0553 \text{ gr}}{0,4989 \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= 11,08 \%
 \end{aligned}$$

3. Kadar air ulangan ke-3

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan} + \text{sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan} + \text{sampel setelah dikeringkan})}{(\text{berat cawan} + \text{sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan kosong}}} \times 100\% \\
 &= \frac{(58,6327 - 58,5774) \text{ gr}}{(58,6327 - 58,1331) \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,0553 \text{ gr}}{0,4996 \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= 11,06 \%
 \end{aligned}$$

Kadar air rata-rata pada sampel mikroalga *Chlorella sp.* adalah:

P1 (%)	P2 (%)	P3 (%)	Total (%)	Rata-rata (%)
10,76	11,08	11,06	32,9	10,96

Lampiran 5. Perhitungan Kadar Air Basah
Data Pengukuran Kadar Air

Ulangan Cawan	Berat Cawan Kosong (gr)				Rata-Rata Berat Konstan(gr)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
A1	19,1440	19,1437	19,1433	19,1435	19,1436
A2	24,9161	24,9155	24,9152	24,9156	24,9143
A3	17,4934	17,4930	17,4923	17,4927	17,4929

Ulangan Sampel	Berat Cawan + Sampel (gr)				Rata-Rata Berat Konstan (gr)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
A1	19,6448	19,1545	19,1552	19,1559	19,1434
A2	25,4173	24,9266	24,9273	24,9275	24,9271
A3	17,9942	17,5035	17,5045	17,5048	17,5042

Keterangan: P = perlakuan

1. Kadar air ulanganke-1

$$\text{Kadar air} = \frac{(\text{berat cawan} + \text{sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan} + \text{sampel setelah dikeringkan})}{(\text{berat cawan} + \text{sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100$$

%

$$= \frac{(19,6448 - 19,1552) \text{ gr}}{(19,6448 - 19,1436) \text{ gr}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,4896 \text{ gr}}{0,5015 \text{ gr}} \times 100 \%$$

$$= 97,62\%$$

2. Kadar air ulanganke-2

$$\text{Kadar air} = \frac{(\text{berat cawan} + \text{sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan} + \text{sampel setelah dikeringkan})}{(\text{berat cawan} + \text{sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100\%$$

$$= \frac{(25,4173 - 24,9271) \text{ gr}}{(25,4173 - 24,9154) \text{ gr}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,4902 \text{ gr}}{0,5019 \text{ gr}} \times 100 \%$$

$$= 97,66 \%$$

3. Kadar air ulanganke-3

$$\text{Kadar air} = \frac{(\text{berat cawan} + \text{sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan} + \text{sampel setelah dikeringkan})}{(\text{berat cawan} + \text{sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100\%$$

$$= \frac{(17,9942 - 17,5042) \text{ gr}}{(19,9942 - 17,4926) \text{ gr}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,49 \text{ gr}}{0,5016 \text{ gr}} \times 100\%$$

$$= 97,68\%$$

Kadar air rata-rata pada sampel mikroalga *Chlorella sp.* adalah:

P1 (%)	P2 (%)	P3 (%)	Total (%)	Rata-rata (%)
97,62	97,66	97,68	292,96	97,65

Lampiran 6. Perhitungan Nilai R_f KLT Analitik

$$\text{Harga R}_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh noda}}{\text{Jarak yang ditempuh eluen}}$$

Hasil nilai R_f monitoring kolombasah

➤ Eluenn-Heksana : Etilasetat(4:1)

➤ Noda 1

Noda 2

$$\text{Rf fraksi 8-13} = \frac{5,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,662 \quad \text{Rf fraksi 11-13} = \frac{4,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,6$$

$$\text{Rf fraksi 18} = \frac{4,4 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,55 \quad \text{Rf fraksi 18} = \frac{3,1 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,3875$$

$$\text{Rf fraksi 20-28} = \frac{3,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,41 \quad \text{Rf fraksi 20-28} = \frac{2,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,28$$

$$\text{Rf fraksi 30-40} = \frac{2,2 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,275 \quad \text{Rf fraksi 41-44} = \frac{1,7 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,21$$

$$\text{Rf fraksi 41-44} = \frac{3,1 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,387$$

$$\text{Rf fraksi 45} = \frac{1,25 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,156$$

$$\text{Rf fraksi 50-60} = \frac{1,7 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,212$$

Hasil nilai R_f monitoring kolom kering

$$\text{Rf fraksi 4-6} = \frac{4 \text{ cm}}{8,2 \text{ cm}} = 0,487 \quad \text{Rf fraksi 8-12} = \frac{2,7 \text{ cm}}{8,2 \text{ cm}} = 0,329$$

$$\text{Rf fraksi 8-12} = \frac{4 \text{ cm}}{8,2 \text{ cm}} = 0,487 \quad \text{Rf fraksi 8-12} = \frac{1,8 \text{ cm}}{8,2 \text{ cm}} = 0,219$$

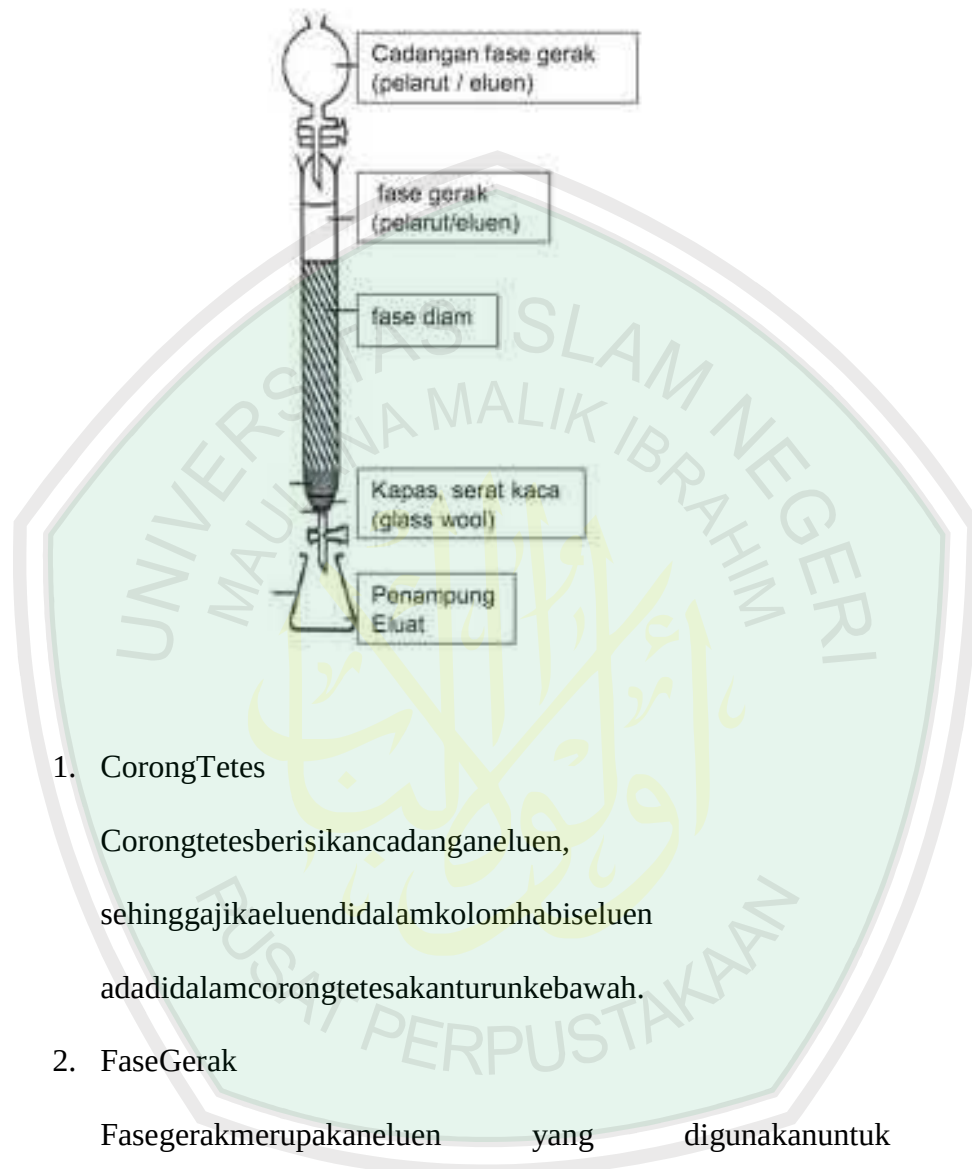
$$\text{Rf fraksi 10} = \frac{5,6 \text{ cm}}{8,2 \text{ cm}} = 0,68 \quad \text{Rf fraksi 10} = \frac{4,6 \text{ cm}}{8,2 \text{ cm}} = 0,575$$

$$\text{Rf fraksi 14-16} = \frac{1,6 \text{ cm}}{8,2 \text{ cm}} = 0,19 \quad \text{Rf fraksi 14-16} = \frac{0,6 \text{ cm}}{8,2 \text{ cm}} = 0,07$$

$$\text{Rf fraksi 20} = \frac{3,6 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,45 \quad \text{Rf fraksi 20} = \frac{3,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,412$$

$$\text{Rf fraksi 30} = \frac{2,4 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,3$$

Lampiran 7 Bagian-bagian Kromatografikolom



1. Corong Tetes

Corong tetes berisi kancadangan eluen, sehingga jika eluen dididalam kolom habis eluen yang adadidalam corong tetes akan turun kebawah.

2. Fase Gerak

Fase gerak merupakan eluen yang digunakan untuk proses elusi dimana pada penelitian ini eluen yang digunakan n-heksana:etilasetat (4:1).

3. Fase Diam

Fase diam yang digunakan dalam Kromatografi kolom pembuatan fase diam cara basah dan cara kering sama yaitu silika gel 60. Yang

membedakanyaituhanyapadasaatpreparasidan proses penjenuhan. Dimanapembuatanfasadiamcarabasah, silika gel 60 dijenuhkandenganeluenyaselama 1 jam dandidiamkandalamkolomselama 24 jam. Sedangkanpreparasifasadiamcarakering, silika gel 60 sesudahdiaktifasidimasukankedalamkolomdan di vakumkankemudiandilakukan proses elusi.

4. Glass wool

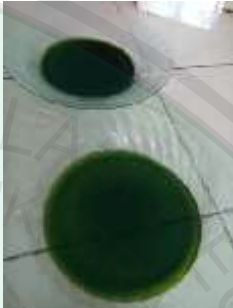
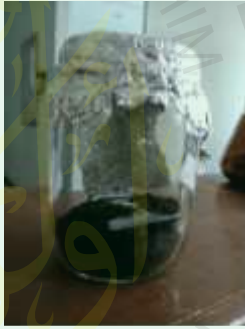
Merupakanbahan yang digunakanuntukmenahanfasadiam agar tidakturunkebawahpadasaat proses elusi, sehinggafasadiamtermampatkanoleh glass wool.

5. Penampunganeluen

Proses penampunganpadapenelitianinimenggunakanbotol vial berukuran 8 mL.Fraksi yang keluadarikolomditampungsebanyak 2 mL kedalam vial.

Lampiran 8 Dokumentasi Penelitian

Tahapan	Dokumentasi
1. Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)	 Ekstraktaugehasilperebusansebelumdiencerkan  MET 4 %
2. Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam MET 4 %	 Perubahan warna kultur mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dari hari ke-0 sampai hari ke-10
3. Pemanenan Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	 Hasil pengumpulan panen biomassa mikroalga <i>Chlorella sp.</i>  Biomassamikroalga <i>Chlorella sp.</i> sebelum

		Hasilbiomassasetelahd isentrifugasi yang siauntukdikering- anginkan
4. Preparasi Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	 	Proses pengeringan- anginanmikroalga <i>Chlorella sp.</i> Hasilkerokanbiomassami kroalga <i>Chlorella</i> <i>sp.</i> yangberupaserbuk
5. Ekstraksi Maserasi	 	Proses perendamansampelmikro Penyaringanhasilmaseras imikroalga <i>Chlorella</i> <i>sp.</i> menggunakancorongb uchner

6. Hidrolisis	 	Proses hidrolisis dengan penambahan HCl 2 N dan diaduk dengan Pengukuran pH setelah hidrolisis yang telah dinetralkan dengan natrium bikarbonat
7. Partisi ekstrak metanol mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan pelarut etil asetat	 	Proses partisi ter bentuk 2 lapisan (organik dan air) Hasil penguapan pelarut menggunakan gas N_2

8. Pemisahandengankromatografikolom



Proses
penjenuhanFasadiamcara
basah



Proses
elusikromatografikolomf
asadiamcarabasah



Proses
elusikromatografikolomf
asadiamcarakering

9. Monitoring
fraksikromatorafikolombasah

Monitoring fraksi 1-45

10. Monitoring kolomkering



Monitoring fraksi 9-20

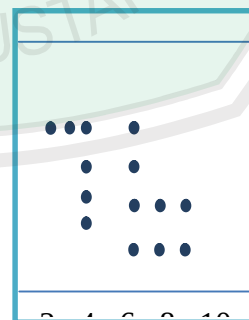


Monitoring fraksi 50-200

Dan 6-40



Monitoring fraksi 1-160



Monitoring fraksi 2-20



