

**UJI TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI SENYAWA METABOLIT  
SEKUNDER MIKROALGA *Chlorella sp.* HASIL EKSTRAKSI SONIKASI  
FRAKSI ETIL ASETAT, DIETIL ETER, DAN n-HEKSANA**

**SKRIPSI**

**Oleh :  
MUHAMMAD ZAKI IMAM  
NIM.18630038**



**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2022**

**UJI TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI SENYAWA METABOLIT  
SEKUNDER MIKROALGA *Chlorella sp.* HASIL EKSTRAKSI SONIKASI  
FRAKSI ETIL ASETAT, DIETIL ETER, DAN n-HEKSANA**

**SKRIPSI**

**Oleh :  
MUHAMMAD ZAKI IMAM  
NIM.18630038**

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

**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2022**

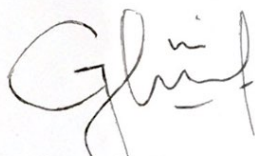
**UJI TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI SENYAWA METABOLIT  
SEKUNDER MIKROALGA *Chlorella sp.* HASIL EKSTRAKSI SONIKASI  
FRAKSI ETIL ASETAT, DIETIL ETER, DAN n-Heksana**

**SKRIPSI**

**Oleh :  
MUHAMMAD ZAKI IMAM  
NIM.18630038**

**Telah diperiksa dan Disetujui untuk Diuji  
Tanggal : 8 Desember 2022**

**Pembimbing I**



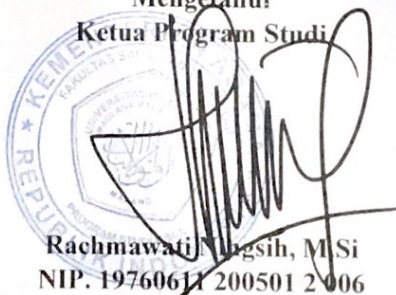
**A. Ghanaim Fasya, M.Si  
NIP. 19820616 200604 1 002**

**Pembimbing II**



**Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I  
NIPT. 201402011209**

**Mengetahui  
Ketua Program Studi**



**Rachmawati Ningsih, M.Si  
NIP. 19760611 200501 2 006**

**UJI TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI SENYAWA METABOLIT  
SEKUNDER MIKROALGA *Chlorella sp.* HASIL EKSTRAKSI SONIKASI  
FRAKSI ETIL ASETAT, DIETIL ETER, DAN n-Heksana**

**SKRIPSI**

Oleh :  
**MUHAMMAD ZAKI IMAM**  
NIM.18630038

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)  
Tanggal : 8 Desember 2022

**Penguji Utama** : Rachmawati Ningsih, M.Si  
NIP. 19760611 200501 2 006

(.....)

**Ketua Penguji** : Armeida Dwi Ridhowati Madjid, M.Si  
NIP. 19890527 201903 2 016

(.....)

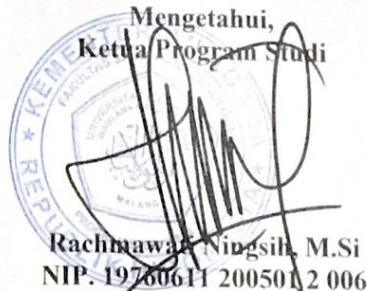
**Sekretaris Penguji** : A. Ghanaim Fasya, M.Si  
NIP. 19820616 200604 1 002

(.....)

**Anggota Penguji** : Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I  
NIPT. 201402011209

(.....)

Mengetahui,  
Ketua Program Studi

  
Rachmawati Ningsih, M.Si  
NIP. 19760611 200501 2 006

## PERNYATAAN ORISINALITAS TULISAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini :

Nama : Muhammad Zaki Imam  
NIM : 18630038  
Program Studi : Kimia  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : Uji Toksisitas dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Mikroalga *Chlorella Sp.* Hasil Ekstraksi Sonikasi Fraksi Etil Asetat, Dietil Eter, dan n-Heksana

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

Malang, 8 Desember 2022  
Yang membuat pernyataan



Muhammad Zaki Imam

MOTTO

FORTIS FORTUNA ADIUVAT

- John Wick -

*With a Great Power Comes a Great  
Responsibility*

- SPIDERMAN -

## HALAMAN PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirobbil 'alamin

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah memberikana saya nikmat untuk hidup dan menjalankan kewajiban saya sebagai manusia. Sebaik-baiknya manusia ialah yang bermanfaat bagi orang lain. Saya persembahkan karya saya yang masih jauh dari kata sempurna kepada :

Kedua orang tua saya, Bapak Aan Tohari dan Ibu Syamsiah yang selalu memanjatkan doa-doanya untuk anaknya yang sedang menjalani studi di daerah perantauan. Selalu memberikan dukungan baik materi maupun non-materi, serta selalu memberikan motivasi untuk menyelesaikan apa yang sudah dimulai.

Kakak saya Vera Widyastuti dan adik saya M. Ilham Rizqie yang selalu mensupport dan menghibur saya dengan candaan-candaannya dikala saya sedang jenuh akan lingkungan di daerah perantauan.

Seluruh dosen kimia UIN Malang khususnya Bapak Ahmad Ghanaim Fasya, M.Si dan Bapak Dr. Mukhlis Fahrudin, M.S.I selaku pembimbing saya yang telah membimbing dan memberikan motivasi untuk menyelesaikan tugas akhir ini. Tak lupa dengan laboran-laboran yang turut mendukung dan membantu saya khususnya Mas M. Chalid Al Ayubi, S.Si (Abi) yang sudah saya anggap seperti kakak saya sendiri.

Seluruh Kabinet Berlayar dan Pirates Crew Simfoni FM masa bakti 2021 yang selalu mengisi keseharian saya selama saya menjalani studi di UIN Malang, khususnya saat memasuki masa-masa akhir semester. Semoga kita dipertemukan kembali di kapal yang berbeda.

Teman-teman Kriptonian per organikan duniawi yang sudah membantu dan memberikan ilmu-ilmunya kepada saya. Tak lupa untuk teman-teman Sobat Misqueen dan Roasted yang selalu menjadi rumah kedua untuk saya.

## KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Syukur alhamdulillah kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan praktikum dengan judul **“Uji Toksisitas dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Ekstraksi Sonikasi Fraksi Etil Asetat, Dietil Eter, dan n-Heksana ”**

Shalawat dan salam kami haturkan kepada Nabi Muhammad SAW. yang telah menunjukkan kita jalan yang lurus dan diridhoi Allah. Penulis mengucapkan terima kasih banyak kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya laporan ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

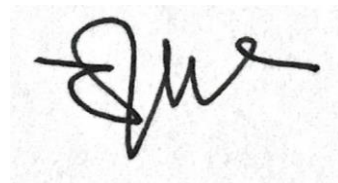
1. Ayah dan Ibunda tercinta yang senantiasa mendukung penulis tanpa henti serta Kakak, Adik dan seluruh keluarga yang senantiasa memberikan doa dan restunya kepada penulis dalam menuntut ilmu.
2. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si. selaku pembimbing yang telah memberikan banyak pengarahan dan saran.
3. Prof. DR. H. Zainuddin, M.A, selaku rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Ibu Dr. Sri Harini, M.Si., selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
5. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si, selaku ketua Prodi Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
6. Seluruh Dosen Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.



7. Seluruh Laboran Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
8. Teman-teman Kimia Angkatan 2018 yang telah menemani dan berjuang bersama.
9. Orang-orang yang bertanya kapan saya akan lulus, disusul kapan akan wisuda, dan setelah lulus mau ngapain.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan laporan ini masih terdapat kekurangan. Penulis hanya berharap semoga laporan ini dapat memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya penulis secara pribadi. *Amin Yaa Robbal Alamin.*

Malang, 20 November 2021

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J.M.', enclosed in a thin black rectangular border.

Penulis



## DAFTAR ISI

<b>PERNYATAAN ORISINALITAS TULISAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>MOTTO</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>vi</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xv</b>
<b>مُسْتَخْصِرُ البَحْثِ</b> .....	<b>xvi</b>
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	6
1.3 Tujuan .....	6
1.4 Manfaat .....	7
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>8</b>
2.1 Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	8
2.2 Kultivasi Mikroalga dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4% .....	9
2.3 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	11
2.4 Hidrolisis dan Partisi .....	13
2.5 Uji Toksisitas Senyawa Metabolit Sekunder dengan Metode BSLT ( <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> ) .....	14
2.6 Analisis Senyawa Metabolit Sekunder Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis .....	16
2.7 Analisis Senyawa Metabolit Sekunder Menggunakan Instrumen LC-MS/MS .....	17
<b>BAB III METODOLOGI</b> .....	<b>19</b>
3.1 Waktu dan Tempat .....	19
3.2 Alat dan Bahan .....	19
3.2.1 Alat .....	19
3.2.2 Bahan .....	19
3.3 Rancangan Percobaan .....	19
3.4 Tahapan Penelitian .....	20
3.5 Cara kerja .....	21
3.5.1 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	21
3.5.1.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	21
3.5.2 Ekstraksi Sonikasi Senyawa Metabolit Sekunder Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	22
3.5.3 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	22

3.5.4 Uji Toksisitas Menggunakan Metode <i>Brine Shrimp Lethaly Test</i> (BSLT).....	23
3.5.5 Uji Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder.....	24
3.5.6 Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis .....	26
3.5.7 Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Menggunakan Spektrometer LC-MS/MS .....	26
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>27</b>
4.1 Kultivasi dan Pemanenan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	27
4.2 Ekstraksi Sonikasi Senyawa Metabolit Sekunder Biomassa <i>Chlorella sp.</i> .....	28
4.3 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	29
4.4 Uji Toksisitas Menggunakan Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> .....	30
4.5 Uji Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder .....	34
4.6 Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Menggunakan Instrumen Spektrofotometer UV-Vis .....	36
4.7 Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Menggunakan Instrumen LC-MS/MS .....	37
4.8 Pembahasan Penelitian dalam Perspektif Islam.....	40
<b>BAB V PENUTUP .....</b>	<b>44</b>
5.1 Kesimpulan .....	44
5.2 Saran.....	44
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>45</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>50</b>

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan Penelitian .....	50
Lampiran 2. Skema Kerja .....	51
Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan .....	57
Lampiran 4 Data pengamatan dan Hasil Perhitungan .....	60
Lampiran 5 Data Hasil Uv-Vis .....	67
Lampiran 6 Dokumentasi Penelitian .....	70

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	8
Gambar 2.2 Kurva Pertumbuhan <i>Chlorella sp.</i> dalam MET .....	10
Gambar 2.3 Optimalisasi Rendemen Terhadap Waktu dan Suhu.....	12
Gambar 4.1 Perubahan Warna Kultur Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> pada (a) hari ke-1, (b) hari ke-4, (c) hari ke-7, dan (d) hari ke-10 .....	27
Gambar 4.2 Skema Partisi.....	29
Gambar 4.3 Kurva Mortalitas (a) Fraksi Etil Asetat, (b) Fraksi Dietil Eter, dan (c) Fraksi n-Heksana .....	33
Gambar 4.4 Hasil UV-Vis: Fraksi Etil Astat, Fraksi Dietil Eter, dan Fraksi n-Heksana .....	36
Gambar 4.5 Hasil Identifikasi fraksi etil asetat menggunakan LC-MS/MS .....	38
Gambar 4.6 Fragmentasi Senyawa Kolesterol .....	39

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Hasil Partisi dan Rendemen tiap Fraksi .....	30
Tabel 4.2 Hasil Uji Toksisitas Fraksi etil asetat mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	31
Tabel 4.3 Hasil Uji Toksisitas Fraksi dietil eter mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	31
Tabel 4.4 Hasil Uji Toksisitas Fraksi n-Heksana mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	32
Tabel 4.5 Nilai LC <sub>50</sub> Tiap Fraksi.....	34
Tabel 4.6 Hasil Fitokimia Tiap Fraksi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	35
Tabel 4.7 Serapan UV-vis tiap fraksi .....	37
Tabel 4.8 Senyawa steroid berdasarkan literatur .....	39
Tabel 4.9 Hasil identifikasi senyawa steroid.....	39

## ABSTRAK

Imam, Muhammad Zaki. **UJI TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER MIKROALGA *Chlorella sp.* HASIL EKSTRAKSI SONIKASI FRAKSI ETIL ASETAT, DIETIL ETER, DAN n-HEKSANA.** Pembimbing I : A. Ghanaim Fasya, M.Si. Pembimbing II : Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I

---

---

Kata Kunci : *Chlorella sp.*, toksisitas, metabolit sekunder

Mikroalga *Chlorella sp.* merupakan salah satu tumbuhan tingkat rendah yang mengandung senyawa senyawa aktif yang bisa dimanfaatkan sebagai obat. Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat toksisitas fraksi etil asetat, dietil eter, dan n-Heksana ekstrak metanol terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dan mengetahui golongan senyawa aktif yang memiliki tingkat toksisitas yang paling tinggi pada ekstrak.

Mikroalga *Chlorella sp.* dikultivasi menggunakan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%. Biomassa yang diperoleh dikeringkan dan dilakukan sonikasi menggunakan pelarut metanol. Selanjutnya dilakukan hidrolisis dengan penambahan asam dan dipartisi dengan pelarut etil asetat, dietil eter, dan n-Heksana. Masing-masing fraksi diuji tingkat toksisitasnya terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dan diidentifikasi menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

Hasil uji toksisitas mikroalga *Chlorella sp.* fraksi etil asetat, dietil eter, dan n-heksana masing-masing memiliki nilai  $LC_{50}$  berturut-turut 107,709; 163,884; dan 123,219 ppm. Uji fitokomia yang dilakukan pada masing-masing fraksi diperoleh senyawa metabolit sekunder berupa steroid diketiga fraksinya. Identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan adanya transisi elektron  $\pi \rightarrow \pi^*$  dari ikatan C=C yang tidak terkonjugasi. Berdasarkan analisis menggunakan LC-MS/MS senyawa steroid yang terkandung dalam fraksi etil asetat adalah kolesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, brassicasterol, campesterol, dan cycloartenol.



## ABSTRACT

Imam, Muhammad Zaki. **TOXICITY TEST AND IDENTIFICATION OF SECONDARY METABOLIT COMPOUNDS MICROALGAE *Chlorella sp.* EXTRACTION RESULT OF THE SONICATION FRACTION OF ETHYL ACETATE, DIETHYL ETHER, AND n-HEXANE.** Supervisor I : A. Ghanaim Fasya, M.Si. Supervisor II : Dr. M. Mukhlis Fahrudin, M.S.I

---

---

Keyword : *Chlorella sp.*, toxicity, secondary metabolit compound

Microalgae *Chlorella sp.* is one of the low-level plants that contain active compounds that can be used as medicine. The purpose of this study was to determine the level of toxicity of the ethyl acetate, diethyl ether, and n-hexane fractions of methanol extract against *Artemia salina* Leach shrimp larvae and classify the active compounds that had the highest level of toxicity in the extract.

Microalgae *Chlorella sp.* cultivated using 4% Bean sprout Extract Medium. The obtained biomass was dried and sonicated using methanol as a solvent. Furthermore, hydrolysis was carried out with the addition of acid and partitioned with ethyl acetate, diethyl ether, and n-hexane as solvents. Each fraction was tested for its toxicity level to *Artemia salina* Leach shrimp larvae and identified using UV-Vis spectrophotometry.

The results of the toxicity test of the microalgae *Chlorella sp.* the ethyl acetate, diethyl ether, and n-hexane fractions each had LC<sub>50</sub> values of 107,709; 163,884; and 123,219 ppm. Phytochemical tests performed on each fraction obtained secondary metabolites in the form of steroids in all three fractions. Identification by UV-Vis spectrophotometer shows the presence of electron transitions  $\pi \rightarrow \pi^*$  from unconjugated C=C bonds. Based on LC-MS/MS analysis Steroid compounds contained in the ethyl acetate fraction there are cholesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, brassicasterol, campesterol, and cycloartenol.

## مُسْتَخْلَصُ البَحْثِ

إمام، مُحَمَّدٌ رَبي. 2022. تَجْرِبَةُ السَّمِيَّةِ وَتَعْرِفُ مُسْتَحْضَرِ المُسْتَقْلِبَاتِ الثَّانَوِيَّةِ لِلطَّحَالِبِ الدَّقِيقَةِ *Chlorella sp* نَتَائِجِ اسْتِخْلَاصِ صَوْتِنَهُ الكِسْرِ الأَسِينَاتِ الإِيثِيلِ، وَالثَّنَائِي الأَثِيرِ، وَأَجْزَاءِ الهَكْسَانِ. قِسْمُ الكِيمِيَاءِ. كَلِيَّةُ العُلُومِ وَالتَّكْنُوْلُوجِيَا. جَامِعَةُ مَوْلَانَا مَالِكُ إِبْرَاهِيمِ الإِسْلَامِيَّةِ الحُكُومِيَّةِ مَالَانَج. المَشْرِفُ 1: عَنَائِمُ فَشِيَا، المَاجِسْتِيرُ. المَشْرِفُ 2: الدُّكْتُورُ، مُخْلِصُ فَخْرِ الدِّينِ، المَاجِسْتِيرُ.

الكَلِمَةُ الأَسَاسِيَّةُ : *Chlorella sp* ، السَّمِيَّةُ، المُسْتَقْلِبَاتِ الثَّانَوِيَّةُ

الطَّحَالِبِ الدَّقِيقَةِ *Chlorella sp*. هِيَ إِحْدَى النَّبَاتَاتِ مُنْخَفِضَةُ المِسْتَوَى الَّتِي تَحْتَوِي عَلَى الصَّوْتِنَةِ المُنْشِطَةِ يُمَكِّنُ اسْتِغَاذَهَا كَالدَّوَاءِ. كَأَنَّ العَرَضُ مِنْ هَذَا البَحْثِ هُوَ مَعْرِفَةُ مُسْتَوَى سَمِيَّةِ أُسِينَاتِ الإِيثِيلِ، وَالثَّنَائِي الأَثِيرِ، وَأَجْزَاءِ الهَكْسَانِ مِنْ مُسْتَخْلَصِ المِيثَانُولِ لِبِرْقَاتِ الجَمْبَرِي *Artemia salina* وَمَعْرِفَةُ أَيِّ مِجْمُوعَةٍ مِنَ الصَّوْتِنَةِ المُنْشِطَةِ الَّتِي تَحْتَوِي عَلَى أَعْلَى مُسْتَوَى مِنْ تَسْمُمٍ. تَمَّتِ الزَّرَاعَةُ لِلطَّحَالِبِ الدَّقِيقَةِ *Chlorella sp* بِاسْتِخْدَامِ 4% مِنْ مُسْتَخْلَصِ البَرَعَمِ المَتَوَسِّطِ (MET). يَتِمُّ تَجْفِيفُ الكِنَلَةِ الحَيَوِيَّةِ الَّتِي تَمَّ الحِصُولُ عَلَيْهَا وَصَوْنُهَا بِاسْتِخْدَامِ المِيثَانُولِ كَمُدْيَبٍ. عِلَاوَةً عَلَى ذَلِكَ، تَمَّ إِجْرَاءُ التَّحْلِيلِ المَائِي عَنِ طَرِيقِ إِضَافَةِ حَمْضٍ وَتَقْسِيمِهِ بِاسْتِخْدَامِ مُدْيَبَاتِ إِيثِيلِ أُسِينَاتِ وَالثَّنَائِي آثِيرِ وَن-هَكْسَانِ. تَمَّ تَجْرِبَةُ كُلِّ جُزْءٍ لِمَعْرِفَةِ مُسْتَوَى سَمِيَّتِهِ لِبِرْقَاتِ الجَمْبَرِي *Artemia salina* وَتَمَّ مُسْتَحْضَرُ بِاسْتِخْدَامِ مِقْيَاسِ الطَّيْفِ بِالأَشْعَةِ المَرْتَبَةِ وَفَوْقَ البَنْفَسَجِيَّةِ. نَتَائِجُ تَجْرِبَةِ السَّمِيَّةِ الطَّحَالِبِ الدَّقِيقَةِ *Chlorella sp*. لِلكِسْرِ الأَسِينَاتِ الإِيثِيلِ وَالثَّنَائِي الأَثِيرِ وَأَجْزَاءِ الهَكْسَانِ قِيَمَ التَّرْكِيزِ المَمَيَّتِ البِنْفِيفِيِّ لِكُلِّ مِنْ 107.709 ؛ 163,884 ؛ وَ 123.219 صَفْحَةٍ فِي الدَّقِيقَةِ. تَمَّ إِجْرَاءُ التَّجْرِبَةِ الكِيمِيَاءِي النَّبَاتِي الَّذِي تَمَّ إِجْرَاؤُهُ عَلَى كُلِّ جُزْءٍ وَتَمَّ الحِصُولُ عَلَى مُسْتَقْلِبَاتِ ثَانَوِيَّةٍ فِي شَكْلِ مُنْشِطَاتٍ فِي الكُسُورِ الثَّلَاثَةِ. يُظْهَرُ المُسْتَحْضَرُ بِاسْتِخْدَامِ مِقْيَاسِ الطَّيْفِ الضَّوْئِيِّ بِالأَشْعَةِ المَرْتَبَةِ وَفَوْقَ البَنْفَسَجِيَّةِ وَجُودِ انْتِقَالَاتِ الإِلِكْتَرُونِ  $\pi \rightarrow$  مِنْ رَوَابِطِ  $C = C$ . تَشْتَمِلُ مَرْكَبَاتُ السِّيَرُويدِ المَوْجُودَةِ فِي جُزْءِ أُسِينَاتِ الإِيثِيلِ عَلَى الكُولِيسْتِرُوْلِ وَسِتِيعَمَاسْتِرُوْلِ وَبَيْتَا سِيْتُوَسْتِرُوْلِ وَبِرَاسِيْنِكَاسْتِرُوْلِ وَكَامْبَسْتِرُوْلِ وَسِيْكُلُوْ أَرْتِينُوْلِ.

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Tumbuh-tumbuhan dapat memproduksi dua jenis senyawa metabolit, diantaranya yaitu metabolit primer dan metabolit sekunder. Tumbuhan dapat memproduksi metabolit sekunder dalam jumlah tertentu dengan kondisi cekaman atau kondisi perubahan lingkungan yang bisa menghambat pertumbuhan perkembangan. Senyawa-senyawa metabolit sekunder memiliki fungsinya masing-masing dan berbeda-beda tiap senyawanya. Hal ini memberikan peluang untuk mengoptimalisasi pemanfaatan senyawa metabolit sekunder pada biota air dalam berbagai bidang. Al-Quran telah menyebutkan dalam surah Luqman ayat 10 bahwa Allah SWT menciptakan tanam-tanaman dan buah-buahan yang memiliki manfaat didalamnya dan dapat dimanfaatkan oleh makhluk hidup

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا وَالْأَرْضِ رَوَاسِيَ أَنْ تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ  
فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya: “*Dia menciptakan langit tanpa tiang sebagaimana kamu melihatnya, dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi agar ia (bumi) tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembangbiakkan segala macam jenis makhluk bergerak yang bernyawa di bumi. Dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik*” (QS. Luqman : 10)

Tumbuhan yang baik adalah tumbuhan yang subur dan bermanfaat (Shihab, 2002). Allah SWT telah memberikan bermacam-macam tumbuhan yang baik serta memiliki manfaat untuk makhluk-Nya yang berada di muka bumi ini. Salah satu tumbuhan yang dapat dimanfaatkan ialah mikroalga. Mikroalga dapat

dimanfaatkan sebagai tumbuhan yang memiliki berbagai macam khasiat khususnya dalam dunia medis.

Mikroalga termasuk kedalam organisme mikroskopis yang mampu melakukan biosintesis dengan sejumlah substansi berharga seperti lipid, asam lemak tak jenuh, pigmen, protein serta karbohidrat yang dianggap penting dan juga merupakan sumberdaya yang dapat diperbarui (Georgianna dan Mayfield, 2012). Mikroalga juga berpotensi sebagai sumber bahan bakar terbarukan karena memiliki kandungan minyak yang dapat dijadikan sebagai bahan bakar alternatif biodiesel. Keunggulan yang dimiliki mikroalga yaitu mudahnya dibudidayakan daripada tumbuhan makroalga dan tumbuhan tingkat tinggi lainnya. Keunggulan lainnya ialah produksi biomassa yang bisa dibilang cepat dan pertumbuhannya memanfaatkan CO<sub>2</sub> sehingga mampu mengurangi pencemaran udara (Gultom, 2018). *Chlorella sp.* merupakan tumbuhan tingkat rendah yang termasuk mikroalga alga hijau atau disebut dengan Chlorophyceae. Walaupun *Chlorella sp.* tidak memiliki akar, batang, dan daun sejati, tetapi *Chlorella sp.* memiliki pigmen klorofil sehingga mampu melakukan fotosintesis dan menghasilkan makanannya sendiri (fotoautotrof) (Damayanti, 2020). *Chlorella sp.* mampu hidup di air tawar maupun air laut.

*Chlorella sp.* memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder. Senyawa metabolit sekunder dihasilkan pada fase stationer (Anggraeni *et al.*, 2014). Fase stationer sendiri adalah fase dimana laju pertumbuhan sama dengan laju kematiannya, sehingga jumlah keseluruhannya adalah tetap (Riadi, 2016). *Chlorella sp.* dapat dimanfaatkan sebagai pilihan alternatif bahan baku bio diesel karena memiliki kandungan lipid mencapai 80% dari berat kering dan memiliki

karakteristik yang mirip dengan minyak nabati (Elystia *et al.*, 2019). Manfaat lain dari *Chlorella sp.* ialah sebagai bioremediator dalam menetralkan pencemaran air limbah karena memiliki kemampuan biabsorpsi yang cukup kuat terhadap logam berat (Putri *et al.*, 2018).

Ekstraksi merupakan teknik pemisahan bahan dari campurannya menggunakan pelarut yang sesuai. Ekstraksi mikroalga *Chlorella sp.* dapat dilakukan dengan berbagai metode diantaranya metode maserasi dan metode sonikasi. Maserasi merupakan salah satu metode yang biasa digunakan untuk mengekstrak senyawa metabolit sekunder dari biomasnya. Namun, metode ini membutuhkan waktu yang cukup lama dengan pelarut yang cukup banyak. Metode lainnya adalah metode sonikasi, dimana metode ini memanfaatkan gelombang ultrasonik untuk memisahkan senyawa metabolit sekunder dari biomasnya. Oleh karena itu, metode ini tidak membutuhkan waktu yang lama dan juga pelarut yang banyak, sehingga ekstrak yang diperoleh juga lebih banyak (Handaratri dan Yuniati, 2019). Pelarut yang digunakan adalah metanol, karena diketahui metanol mampu mengekstrak senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam *Chlorella sp.* (Susanty *et al.*, 2019). Selain dapat membuat lisis membran sel pada tanaman, metanol juga memiliki struktur molekul yang kecil sehingga memudahkan untuk menembus jaringan tumbuhan dan menarik senyawa metabolit sekunder yang berada dalam tumbuhan.

Penelitian yang dilakukan Novianti, *et al* (2019) dalam ekstraksi mikroalga *Chlorella vulgaris* menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol diperoleh rendemen lebih dari 50%. Ekstraksi mikroalga yang dilakukan Bariyyah (2013) menggunakan metode maserasi dengan variasi pelarut metanol

(polar) dan etil asetat (semipolar) diperoleh hasil rendemen masing-masing tiap pelarut sebesar 7,001% dan 3,673%. Rengga, *et al* (2019) melakukan ekstraksi minyak mikroalga dengan bantuan gelombang ultrasonik diperoleh rendemen sebesar 18,44%. Maligan, *et al* (2016) melakukan ekstraksi ultrasonik mikroalga dengan frekuensi 50 kHz sebanyak 3 kali siklus dengan pelarut aseton menghasilkan rendemen sebanyak 35,19%.

Uji toksisitas dilakukan supaya mengetahui kemampuan racun yang mampu menimbulkan kerusakan saat masuk ke dalam tubuh dengan lokasi yang rentan terhadap racun tersebut (Soemirat, 2005). Metode ini sering dimanfaatkan untuk skrining senyawa antikanker karena adanya korelasi positif antara metode BSLT dengan uji sitotoksik menggunakan kultur sel kanker (Carballo *et al.*, 2002). Keuntungan dari metode BSLT ialah cepat, tidak membutuhkan banyak biaya, mudah, tidak memerlukan kondisi aseptis, dan akurat. Senyawa dikatakan toksik apabila memiliki nilai  $LC_{50}$  kurang dari 1000  $\mu\text{g/mL}$  (Meyer *et al.*, 1982). Penelitian yang dilakukan Desianti (2014) uji toksisitas menggunakan fraksi etil asetat, kloroform, dan n-Heksana dari hasil ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* dengan metode BSLT menunjukkan ketiga fraksi bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Nilai  $LC_{50}$  yang dihasilkan tiap fraksi yaitu 43,3044 ppm untuk fraksi etil asetat, 32,9023 ppm untuk fraksi kloroform, dan 34,2133 untuk fraksi n-Heksana. Yudiati, *et al* (2011) dalam penelitiannya melakukan toksisitas terhadap mikroalga *Spirulina platensis* fraksi dietil eter diperoleh nilai  $LC_{50}$  yaitu 34,11 ppm. Berdasarkan nilai  $LC_{50}$  nya menunjukkan bahwa ekstrak bersifat toksik dan berpotensi antikanker.

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu sampel. Identifikasi senyawa metabolit sekunder yang dilakukan Desianti (2014) fraksi etil asetat dan n-Heksana *Chlorella sp.* mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu senyawa steroid. Nurhamidah, *et al* (2019) melakukan uji fitokimia pada daun surian ekstrak dietil eter, senyawa metabolit yang muncul diantaranya flavonoid, steroid, triterpenoid, fenolik, saponin, kumarin, dan karotenoid.

Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa senyawa *Chlorella sp.* memiliki kemampuan bioaktivitas seperti antikanker, antibakteri, antioksidan, dan antitumor yang dapat diketahui melalui pengujian awal yaitu uji toksisitas. Fasya, *et al* (2013) dalam penelitiannya menyebutkan mikroalga *Chlorella sp.* yang diekstraksi menggunakan metanol memiliki senyawa steroid yang terkandung didalamnya. Senyawa steroid memiliki bioaktivitas sebagai antibakteri terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Penelitian yang dilakukan Febriyanti (2021) menyebutkan ekstrak metanol dengan fraksi pelarut n-Heksana mengandung senyawa steroid yang memiliki aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengujian awal kemampuan bioaktivitas dengan melakukan uji toksisitas *Chlorella sp.* fraksi etil asetat, dietil eter, dan n-Heksana hasil ekstraksi sonikasi menggunakan pelarut metanol. Uji toksisitas dilakukan dengan metode BSLT yang mana memiliki korelasi dengan antikanker sebelum dimanfaatkan dan diproduksi massal untuk kepentingan dunia medis dan farmakologi.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana tingkat toksisitas ekstrak metanol fraksi etil asetat, dietil eter, dan n-Heksana mikroalga *Chlorella sp.* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach?
2. Bagaimana identifikasi senyawa metabolit sekunder fraksi etil asetat, dietil eter, dan n-Heksana mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan uji fitokimia, spektrofotometer UV-Vis, dan LC-MS/MS?

## 1.3 Tujuan

1. Mengetahui tingkat toksisitas ekstrak metanol fraksi etil asetat, dietil eter, dan n-Heksana mikroalga *Chlorella sp.* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach
2. Mengetahui identifikasi senyawa metabolit sekunder fraksi etil asetat, dietil eter, dan n-Heksana mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan uji fitokimia, spektrofotometer UV-Vis, dan LC-MS/MS.

## 3. Batasan Masalah

4. Sampel yang digunakan adalah mikroalga *Chlorella sp.* berasal dari budidaya di laboratorium Kimia Organik UIN Malang
5. Budidaya menggunakan Medium Ekstrak Tauge (MET)
6. Ekstraksi mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan metode ekstraksi sonikasi dengan frekuensi 42 kHz menggunakan pelarut metanol
7. Hidrolisis dan partisi menggunakan etil asetat, dietil eter, dan n-Heksana
8. Uji toksisitas menggunakan metode BSLT
9. Uji fitokimia senyawa metabolit sekunder
10. Identifikasi senyawa menggunakan UV-Vis dan LCMS/MS



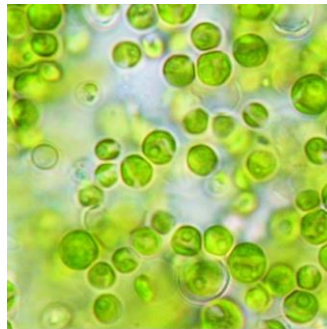
#### **1.4 Manfaat**

Penelitian ini diharapkan dapat menambah informasi mengenai tingkat toksisitas senyawa yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach serta kandungan golongan senyawa yang terkandung didalamnya, sehingga dapat dimanfaatkan dalam bidang farmakologi serta menambah rasa syukur kita terhadap kebesaran Allah SWT dengan segala ciptaannya yang memiliki keberagaman bentuk dengan manfaat yang sangat luar biasa.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Mikroalga *Chlorella sp.*

*Chlorella sp.* merupakan tumbuhan tingkat rendah, uniseluler berwarna hijau dengan ukuran mikroskopis dengan diameter selnya berukuran 3-8  $\mu\text{m}$ , dengan bentuk bulat seperti bola. *Chlorella sp.* tidak memiliki flagella sehingga tidak bebas bergerak aktif. Susunan dinding selnya terdiri dari pektin dan selulosa. Tiap selnya mengandung kloroplas yang menyebabkan *Chlorella sp.* memiliki warna hijau. *Chlorella sp.* termasuk mikroalga yang bersifat kosmopolit yaitu penyebarannya sangat luas. *Chlorella sp.* dapat ditemukan pada air payau, air laut, dan air tawar (Kumar dan Singh, 1976)



Gambar 2.1 Mikroalga *Chlorella sp.*

Mikroalga *Chlorella sp.* mengandung senyawa kimia berupa protein, karbohidrat, vitamin, asam lemak tak jenuh, serta enzim (Kawaroe, 2008). Penelitian yang dilakukan Khamidah, *et al* (2014) menyebutkan bahwa *Chlorella sp.* mengandung senyawa aktif berupa steroid. Senyawa aktif pada mikroalga *Chlorella sp.* biasanya digunakan untuk pertahanan diri dari lingkungan dan makhluk hidup yang ada di sekitarnya (Salempa & Muharram, 2016).

## 2.2 Kultivasi Mikroalga dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%

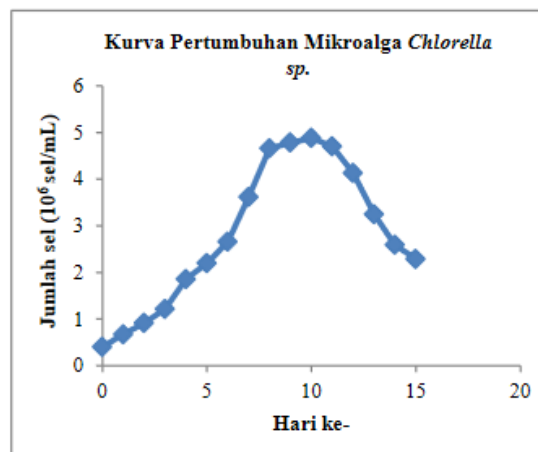
Pengembangbiakan mikroalga *Chlorella sp.* atau kultivasi menggunakan media tumbuh yang bertujuan untuk memenuhi kebutuhan biomassa mikroalga. Media tumbuh yang digunakan harus mengandung komponen-komponen yang dibutuhkan untuk berkembangnya mikroalga. Kultivasi berhasil apabila bertambahnya ukuran atau jumlah sel pada media tumbuh yang ditandai dengan perubahan warna hijau yang semakin pekat (Richmond, 1986).

Faktor-faktor yang memengaruhi pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* diantaranya adalah pH, suhu, intensitas cahaya, dan unsur hara (Dewi, 2009). Suhu merupakan salah satu faktor yang berpengaruh dalam pertumbuhan mikroalga. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Maharsyah, *et al* (2013) diperoleh yang tepat untuk melakukan kultivasi diantara 25 °C – 27 °C. Cahaya berperan penting dalam proses fotosintesis dimana pada proses ini mikroalga dapat membuat makanannya sendiri dengan bantuan klorofil. Prihantini, *et al* (2005) dalam penelitiannya kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan pencahayaan dari 2 buah lampu TL 36 watt (intensitas cahaya 1000-4000 *lux*) dengan waktu fotoperiodisitas 14 jam terang 10 jam gelap. Nilai pH merupakan salah satu faktor yang memengaruhi kemampuan biologis dari mikroalga dalam pemanfaatan unsur hara dalam medium kultur mikroalga (Prabowo, 2009). Nilai pH yang terlalu tinggi akan memengaruhi aktivitas fotosintesis. Penelitian yang dilakukan Prihantini, *et al* (2005) nilai pH awal pada medium ekstrak tauge memengaruhi kerapatan sel dari mikroalga *Chlorella sp.*

Penggunaan tauge sebagai media tumbuh dikarenakan tauge banyak mengandung unsur hara yang dibutuhkan mikroalga *Chlorella sp.* untuk berkembang biak. Kelebihan penggunaan MET diantaranya yaitu kemudahan

untuk memperolehnya, ekonomis, dan tidak menghasilkan senyawa yang bersifat toksik. Media kultur MET mengandung unsur hara makronutrient anorganik seperti K, P, Ca, Mg, dan Na yang dibutuhkan sebagai komponen penyusun sel. Mikronutrient yang terkandung pada media kultur MET adalah Fe, Zn, Mn, dan Cu yang dibutuhkan sebagai komponen pembentuk klorofil (Richmond, 1986).

Penelitian yang dilakukan Fasya, *et al* (2013) menyatakan proses kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* melalui empat fase pertumbuhan. Fase pertama adalah fase log atau eksponensial, selanjutnya fase penurunan laju pertumbuhan, selanjutnya fase stasioner dan yang terakhir adalah fase kematian.



Gambar 2.2 Kurva Pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam MET (Fasya, 2013)

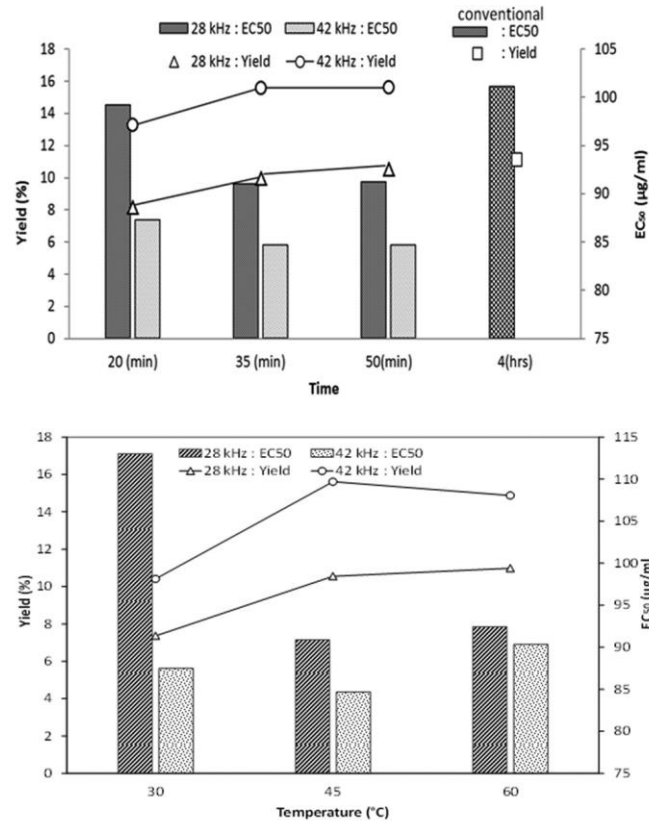
Fase eksponensial dimulai pada hari ke-0 sampai hari ke-8 ditandai dengan adanya perubahan pada jumlah sel yang semakin meningkat. Fase selanjutnya yaitu fase penurunan yang terjadi pada hari ke-8 dimana pada fase ini tidak terjadi peningkatan yang cukup signifikan. Kemudian dilanjutkan dengan fase stasioner pada hari ke-8 sampai hari ke-11 dimana laju pertumbuhan cenderung konstan. Memasuki hari ke-11 sel tidak mengalami pembelahan sel yang

signifikan karena kurangnya ketersediaan nutrient, sehingga biomassa akan mengalami kematian. Fase ini biasa disebut dengan fase kematian.

### **2.3 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga *Chlorella sp.***

Senyawa metabolit sekunder yang dipisahkan dengan cara ekstraksi. Ekstraksi adalah proses penarikan suatu komponen atau zat tertentu dari larutannya dalam air oleh suatu pelarut lain yang tidak bercampur dengan air (Soebagio *et al.*, 2005). Ekstraksi sonikasi adalah metode ekstraksi dengan memanfaatkan gelombang ultrasonik dan dapat mempercepat waktu kontak antara sampel dengan pelarut. Sonikasi mengandalkan energi gelombang yang menyebabkan proses kavitasi, yaitu proses pembentukan gelembung-gelembung kecil akibat adanya transmisi gelombang ultrasonik untuk membantu difusi pelarut kedalam dinding sel tanaman. Hal ini dapat menyebabkan terjadinya proses pemindahan massa senyawa bioaktif dari sel dalam tumbuhan ke pelarut (Ashley *et al.*, 2001). Keuntungan dari ekstraksi sonikasi adalah prosesnya memiliki waktu yang relatif singkat.

Pelarut yang digunakan pada proses ekstraksi akan memengaruhi proses keberhasilannya ekstraksi. Penelitian ini menggunakan metanol sebagai pelarut untuk ekstraksi sonikasi. Metanol juga dapat menarik analit berupa alkaloid, glukosa, steroid, saponin, dan flavonoid dari tanaman (Arief *et al.*, 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Hadiyanto (2016) yaitu mengekstraksi *Spirulina platensis* dengan metode UAE (*ultrasonic-assisted extraction*) menggunakan pelarut etanol dengan frekuensi 28 kHz dan 42 kHz. Hasil ekstraksi direpresentasikan melalui gambar berikut



Gambar 2.3 Optimalisasi Rendemen Terhadap Waktu dan Suhu

Berdasarkan grafik tersebut, rendemen terus meningkat pada menit ke-20 sampai menit ke-35 di frekuensi 28 kHz maupun 42 kHz. Menit ke-50 terjadi penambahan rendemen pada frekuensi 28 kHz dan tidak terjadi perubahan pada frekuensi 42 kHz. Hal ini disebabkan karena adanya gelombang ultrasonik pada saat dilakukannya ekstraksi, sehingga mampu memecahkan serbuk sampel yang berbentuk padatan dan memperbesar luas permukaannya sehingga laju ekstraksi meningkat (Rismiarti *et al.*, 2016). Semakin lama waktu sonikasi, maka ukuran partikel cenderung lebih homogen dan ukurannya menuju ukuran nanopartikel yang stabil dan tidak adanya gumpalan (Rengga *et al.*, 2019). Jika ditinjau dari suhu selama terjadi proses ekstraksi dari suhu 30 °C sampai 60 °C hasilnya menunjukkan suhu optimum rendemen yang dihasilkan ketika mencapai 45 °C karena adanya efek radiasi yang dihasilkan oleh gelombang ultrasonik. Suhu

dapat memengaruhi cepat lambatnya proses difusi. Semakin tinggi suhu maka proses difusi yang terjadi semakin besar, sehingga proses ekstraksi menjadi semakin cepat. Ketika suhu ditingkatkan, sifat fisik pelarut yaitu viskositas dan densitas dapat menurun sehingga terjadi peningkatan transfer massa (Shalmashi, 2009).

#### **2.4 Hidrolisis dan Partisi**

Hidrolisis merupakan teknik ekstraksi lanjutan yang dilakukan untuk memperoleh ekstrak yang lebih murni (Day dan Underwood, 2002). Glikosida merupakan senyawa yang terbentuk dari bagian glikon (gula) yang bersifat polar dan aglikon (bukan gula) yang bersifat polar, semipolar, maupun nonpolar. Metabolit sekunder merupakan golongan senyawa aglikon. Pemutusan ikatan glikosida dilakukan agar senyawa metabolit sekunder dapat diperoleh, proses ini biasa disebut dengan reaksi hidrolisis. Hidrolisis adalah reaksi antara suatu senyawa dengan air agar senyawa tersebut dapat terurai (Handoko, 2006). Penggunaan air dalam reaksi hidrolisis berjalan dengan sangat lambat, oleh karena itu dibutuhkan katalisator untuk mempercepat reaksi.

Katalis yang biasa digunakan adalah katalis asam yaitu HCl (asam klorida). Penggunaan asam kuat karena memiliki kemampuan yang mudah melepas proton ( $H^+$ ) dalam air dengan sempurna, sedangkan asam lemah lebih sukar untuk melepas proton ( $H^+$ ). Ion  $H^+$  berpengaruh pada cepat lambatnya reaksi hidrolisis, semakin besar jumlah ion  $H^+$ , maka jalannya reaksi semakin cepat dan produk hidrolisa yang dihasilkan semakin besar (Handoko, 2006). Penelitian ini menggunakan asam sebagai katalis untuk mempercepat proses hidrolisis. Asam yang digunakan adalah asam kuat HCl 2N. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Artati, *et al* (2012) konsentrasi paling optimum berada pada

konsentrasi 2N dengan konstanta reaksi sebesar  $0,00660 \text{ min}^{-1}$  jika dibandingkan dengan konsentrasi 1N; 1,5N; 2,5N; dan 3N dimana masing-masing konstanta reaksinya adalah  $0,00209 \text{ min}^{-1}$ ;  $0,00240 \text{ min}^{-1}$ ;  $0,000638 \text{ min}^{-1}$ ; dan  $0,0059 \text{ min}^{-1}$ . Selain itu pemilihan HCl karena dapat membentuk NaCl yang tidak berbahaya saat dinetralsir dengan basa  $\text{NaHCO}_3$  (Setiawan, 2015). Reaksi hidrolisis diberhentikan dengan cara penetralan. Penetralan dilakukan dengan menambahkan basa  $\text{NaHCO}_3$ . Penetralan dilakukan karena glikosida bersifat stabil pada kondisi netral (Fessenden, 1986). Hasil hidrolisis dapat dipisahkan lebih lanjut dengan metode partisi menggunakan pelarut yang berbeda kepolarannya.

Proses partisi berdasarkan pada ekstraksi cair-cair yang merupakan teknik pemisahan zat-zat terlarut diantar dua cairan yang berbeda kepolarannya (Septiandri, 2016). Desianti (2014) dalam penelitian uji toksisitas ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* yang dipartisi secara bertingkat menggunakan pelarut berturut-turut yaitu n-Heksana, petroleum eter, kloroform, dan etil asetat. Hasil penelitian menunjukkan rendemen masing-masing fraksi hasil partisi secara berturut-turut adalah 32,7809%; 12,0582%; 9,3531%; dan 8,1952%. Sehingga dapat dikatakan bahwa pelarut n-Heksana memiliki ekstrak rendemen tertinggi.

## **2.5 Uji Toksisitas Senyawa Metabolit Sekunder dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)**

Toksisitas merupakan ukuran relatif derajat racun antara satu bahan kimia terhadap bahan kimia lain pada organisme yang sama kemampuan racun (molekul) untuk menimbulkan kerusakan apabila masuk kedalam tubuh dan lokasi organ yang rentan terhadapnya (Soemirat, 2005). Uji toksisitas



menggunakan metode BSLT terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dianggap memiliki korelasi dengan daya sitotoksik senyawa-senyawa antikanker, sehingga sering dilakukan untuk screening awal pencarian senyawa antikanker. Beberapa kelebihan dari uji bioaktivitas dengan BSLT adalah memiliki waktu yang relatif singkat, prosesnya sederhana, biaya yang murah, kelimpahan organisme yang banyak, dan memenuhi kebutuhan validasi statistik dengan sedikit sampel (Meyer *et al.*, 1982).

Kematian hewan uji *Artemia salina* disebabkan adanya senyawa uji yang masuk ke dalam tubuh hewan uji melalui difusi dan transport aktif. Kemudian senyawa tersebut akan menyebabkan terjadinya kerusakan pada permeabilitas membran sehingga dapat mengacaukan transport ion dan menyebabkan penurunan pada produksi ATP (Connel dan Miller, 1995). Senyawa-senyawa tersebut menghambat daya makan dengan bertindak sebagai racun perut atau *stomach poisoning*, yaitu sebuah interaksi penyerangan yang dapat membunuh suatu hewan uji dengan menyerang sistem pencernaan, sehingga dapat memengaruhi metabolisme larva dan mengganggu reseptor perasa pada mulut *Artemia salina*. Hal ini dapat menyebabkan larva tidak mampu mengenali makanannya dan mengakibatkan larva mati kelaparan (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

Daya toksisitas senyawa dapat diketahui dengan menghitung jumlah kematian larva *Artemia salina* menggunakan parameter *Lethal Concentration 50* (LC<sub>50</sub>). LC<sub>50</sub> adalah kadar atau konsentrasi suatu zat yang dinyatakan dalam miligram bahan kimia per meter kubik media uji (*part per million* atau ppm), yang mampu menyebabkan 50% kematian pada binatang percobaan yang

terpapar dalam waktu tertentu (Cahyono, 2004). Suatu ekstrak dikatakan toksik terhadap larva udang apabila memiliki nilai  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ . Penentuan potensi bioaktif dilakukan dengan membandingkan nilai  $LC_{50}$  suatu ekstrak dengan sampel ketentuan (Meyer *et al.* , 1982):

- $LC_{50} \leq 30 \text{ ppm}$  = sangat toksik
- $LC_{50} 31 \text{ ppm} \leq 1000 \text{ ppm}$  = toksik
- $LC_{50} \geq 1000 \text{ ppm}$  = tidak toksik

Nilai  $LC_{50}$  yang berbeda memiliki potensi yang berbeda juga, seperti yang disebutkan dalam surat al-furqan ayat 2

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُنْ لَهُ شَرِيكٌ فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ  
فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا

Artinya : yang memiliki kerajaan langit dan bumi, tidak mempunyai anak, tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan-Nya, dan Dia menciptakan segala sesuatu, lalu menetapkan ukuran-ukurannya dengan tepat.

Berdasarkan tafsir Kementrian Agama RI (2006) ayat di atas menjelaskan bahwa Allah Swt. lah yang menciptakan segala sesuatu, dan menyempurnakan ukuran- ukurannya dengan tepat, teliti dan penuh hikmah. Seperti halnya potensi ekstrak sebagai senyawa bioaktif yang dapat dimanfaatkan sebagai antikaker/anti tumor, antibakteri dan pestisida.

## 2.6 Analisis Senyawa Metabolit Sekunder Menggunakan Spektrofotometer

### UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis adalah pengukuran panjang gelombang dan intensitas sinar ultra violet dan cahaya tampak yang diasorpsi oleh sampel. Sinar UV berada pada panjang gelombang 200-400 nm sedangkan sinar tampak berada pada panjang gelombang 400-800 nm. Spektrofotometer UV-Vis dapat memberikan informasi berupa struktur berdasarkan panjang gelombang

maksimal (Dachriyanus, 2004). Prinsip kerja dari spektrofotometer UV-Vis yaitu interaksi antara sinar monokromatis berasal dari sumber sinar dengan materi berupa molekul (sampel), sebagian cahaya dipantulkan, diserap, dan ada pula yang diteruskan. Cahaya yang diserap akan menyebabkan tereksitasinya eletron dari keadaan dasar (*ground state*) menuju keadaan tereksitasi dengan tingkat energi yang lebih tinggi. Suatu senyawa yang mengabsorpsi cahaya dinamakan gugus kromofor yang dapat menimbulkan pita-pita absorpsi yang khas (Triyati, 1985). Bagian molekul yang paling cepat bereaksi dengan sinar adalah elektron-elektron ikatan dan elektron-elektron non ikatan. Elektron-elektron akan mengalami eksitasi ke tingkat energi yang lebih tinggi (Suhartati, 2014). Analisis ini dapat memberikan informasi dari struktur berdasarkan panjang gelombang maksimum suatu senyawa.

Spektrum khas senyawa Flavonoid memiliki serapan di daerah UV pada dua panjang gelombang yaitu berkisar 310-350 nm pada pita I dan 250-280 pada pita II (Indarto, 2015). Spektrum khas senyawa Tanin berada pada rentang 600-850 nm (Ola *et al.*, 2020). Spektrum khas Terpenoid memiliki serapan pada panjang gelombang maksimum sebesar 207,03 nm (Atmoko *et al.*, 2018). spektrum khas Steroid berada pada panjang gelombang 203,8 nm (Fasya *et al.*, 2020). Spektrum khas Saponin diindikasikan berada pada panjang gelombang 211 nm (Rachman *et al.*, 2015). Spektrum khas senyawa Alkaloid berada pada rentang 203-230 nm (Hammado dan Illing, 2013).

## **2.7 Analisis Senyawa Metabolit Sekunder Menggunakan Instrumen**

### **LC-MS/MS**

Spektroskopi Massa (*Mass Spectroscopy*) adalah instrumen yang digunakan untuk menentukan struktur kimia dari molekul organik berdasarkan perhitungan

massa dari molekul tersebut serta pola fragmentasinya. LC-MS/MS adalah salah satu instrumen dengan teknik gabungan berdasarkan pemisahan secara fisik menggunakan kromatografi cair yang menghasilkan ion dan pemisahan massa yang memisahkan ion. Komponen utama tersebut memiliki beberapa jenis. Penggunaan komponen pada LC-MS/MS disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dianalisis dengan kekurangan dan kelebihan masing-masing (Fasya, *et al.*, 2020).

LC-MS/MS memiliki sensitivitas yang lebih tinggi karena memiliki 2 sistem detektor massa. Menurut Bowers (1989) LC-MS/MS memiliki beberapa kelebihan dibandingkan alat lain yaitu dapat diaplikasikan secara luas tidak terbatas untuk molekul volatil, sangat polar, dan persiapan sederhana tanpa derivatisasi dengan fleksibilitas yang tinggi dan waktu analisa yang singkat. Kemudian, hasil analisa sangat khas dan spesifik dari adanya spektrometer massa yang tandem dengan alat kromatografi cair. Keunggulan tandem spektrometri massa yang mempunyai selektivitas tinggi karena mampu mengenali dua sifat fisik analit yang dianalisa, yaitu rasio  $m/z$  dari ion induk dan ion produk. Penggabungan dengan kromatografi cair mampu mengidentifikasi analit dengan tepat berdasarkan waktu retensi sehingga dapat meningkatkan spesifitas.

## **BAB III METODOLOGI**

### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian dilaksanakan di laboratorium kimia organik dan laboratorium instrumen jurusan kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Juni - Oktober 2022.

### **3.2 Alat dan Bahan**

#### **3.2.1 Alat**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya neraca analitik, gelas arloji, corong pisah, desikator, statif, cawan petri, wadah penetasan, aerator, lampu penetasan, pengaduk gelas, spatula, pipet tetes, pipet ukur 1 mL, pipet ukur 5 mL, pipet ukur 10 mL, labu ukur 10 mL, penjepit kayu, beaker glass 1000 mL, erlenmeyer 500 mL, gelas ukur 500 mL, gelas ukur 100 mL, saringan, corong *buchner*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, heater, kertas saring, *rotary evaporator vaccum*, gelas, pinset, ultrasonik frekuensi 42 kHz, lampu UV, dan seperangkat instrumen UV

#### **3.2.2 Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya mikroalga *Chlorella sp.* (biomassa), tauge kacang hijau, *Artemia salina* Leach (larva udang), metanol p.a, etil asetat p.a, dietil eter, dan n-Heksana p.a, ragi roti, HCl pekat, HCl 2N, natrium bikarbonat, asam asetat anhidrat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, reagen Dragendorf, reagen Meyer, serbuk Mg, FeCl<sub>3</sub>, dimetil sulfoksida (DMSO), air laut, dan aquades.

### **3.3 Rancangan Percobaan**

Penelitian ini diawali dengan kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4% selama 10 hari dengan fase

stasioner dengan pencahayaan dilakukan selama dengan fotoperiodisitas 14 jam terang 10 jam gelap. Hasil kultivasi dipanen dan disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 3000 rpm sehingga diperoleh biomassa mikroalga *Chlorella sp.* beserta filtratnya. Biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dikeringkan dengan suhu ruang selama  $\pm 48$  jam. Selanjutnya biomassa mikroalga *Chlorella sp.* diekstraksi menggunakan metode ekstraksi sonikasi menggunakan pelarut metanol selama 42 menit, sehingga diperoleh ekstrak metanol.

Ekstrak metanol *Chlorella sp.* dihidrolisis menggunakan HCl 2N dilanjutkan dengan stirrer menggunakan hotplate stirrer dan ditambahkan natrium bikarbonat hingga mencapai pH netral. Ekstrak hasil hidrolisis selanjutnya dipartisi menggunakan variasi pelarut etil asetat, dietil eter, dan n-Heksana. Uji fitokimia kandungan fraksi senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan reagen Liebermen-Burchard. Fraksi senyawa metabolit sekunder dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan LC-MS/MS

### **3.4 Tahapan Penelitian**

1. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.*
  - a. Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) sebagai media tumbuh
  - b. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* pada MET
  - c. Pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella sp.*
2. Ekstraksi sonikasi senyawa aktif biomassa mikroalga *Chlorella sp.*
3. Hidrolisis dan partisi ekstrak pekat menggunakan variasi pelarut dietil eter, etil asetat, dan n-Heksana

4. Uji toksisitas menggunakan metode *Brine Shrimp Lethaly Test* (BSLT)
5. Uji fitokimia senyawa metabolit sekunder
6. Identifikasi senyawa metabolit sekunder menggunakan spektrofotometer UV-Vis
7. Identifikasi senyawa metabolit sekunder menggunakan LC-MS/MS

### **3.5 Cara kerja**

#### **3.5.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.***

##### **3.5.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) Sebagai Media Tumbuh**

MET dibuat dengan cara melarutkan ekstrak tauge menggunakan aquades dengan konsentrasi 4% (Prihantini *et al.*, 2005). Pembuatan larutan stok ekstrak tauge diawali dengan merebus tauge yang sudah bersih sebanyak 100 gram kedalam 500 mL akuades yang sudah mendidih selama satu jam.

##### **3.5.1.2 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.* dalam MET**

Mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan inokulasi sebanyak 150 mL dan dimasukkan kedalam erlenmeyer 1000 mL. Kemudian ditambahkan 36 mL MET 4% dan dilarutkan menggunakan akuades sebanyak 864 mL. Sampel ditempatkan pada rak yang sudah dilengkapi dengan cahaya menggunakan lampu TL 36 watt (intensitas cahaya 1000-4000 lux). Selanjutnya kultur diinkubasi selama 10 hari dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap (Prihantini *et al.*, 2005).

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

Pemanenan biomassa dilakukan pada hari ke-10 dengan cara disentrifugasi media kultur *Chlorella sp.* dengan kecepatan 3000 rpm

selama 15 menit. Endapan biomassa *Chlorella sp.* dipisahkan dari filtratnya. Selanjutnya ditimbang dan dicatat beratnya.

### 3.5.2 Ekstraksi Sonikasi Senyawa Metabolit Sekunder Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstraksi sonikasi biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan cara biomassa kering sebanyak 8 g dimasukkan kedalam erlenmeyer dan dilarutkan menggunakan metanol dengan perbandingan 1:6 g/mL. Selanjutnya dilakukan perendaman dengan rendaman ultrasonik yang dioperasikan pada 42 KHz selama 42 menit (Hadiyanto dan Sutrisnorhadi, 2016). Kemudian ekstrak disaring dan dipekatkan menggunakan corong *buchner* dan *rotary evaporator vaccum*. Ekstrak yang sudah pekat dihitung rendemennya.

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \dots\dots\dots(3.2)$$

### 3.5.3 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstrak metanol dihidrolisis menggunakan katalis HCl 2N yang selanjutnya diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam pada suhu ruang. Setelah pengadukan, ditambahkan natrium bikarbonat sampai pH mencapai netral. Partisi ekstrak metanol hasil hidrolisis selanjutnya dipartisi menggunakan variasi pelarut etil asetat, dietil eter, dan n-heksana dengan cara dimasukkan kedalam corong pisah, dikocok, dan didiamkan sampai terbentuk dua lapisan, yakni lapisan air dan lapisan organik. Lapisan air diambil dan dipartisi kembali dengan pelarut lainnya. Hasil partisi dipekatkan dengan rotary evaporator. Selanjutnya ditimbang dan dihitung hasil rendemen yang sudah dipekatkan.



### **3.5.4 Uji Toksisitas Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethaly Test* (BSLT)**

#### **3.5.4.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina* Leach**

Penetasan dilakukan dengan memasukkan 250 mL air laut dalam wadah penetasan. Selanjutnya dimasukkan telur *Artemia salina* Leach sebanyak 2,5 mg untuk diaerasi yang selanjutnya akan diberi pencahayaan dibawah lampu pijar. Telur akan menetas dalam waktu  $\pm 24$  jam. Larva udang yang sudah menetas dibiarkan selama  $\pm 48$  jam dan siap untuk digunakan untuk uji toksisitas.

#### **3.5.4.2 Uji Toksisitas**

Uji toksisitas mengacu pada penelitian yang dilakukan Ningdyah *et al* (2015) yang sudah divariasikan. Fraksi dari mikroalga *Chlorella sp.* dibuat larutan masing-masing fraksi dengan konsentrasi 10, 25, 50, 75, dan 100 ppm. Kontrol yang digunakan adalah kontrol DMSO dan kontrol pelarut. Kontrol DMSO dibuat dengan cara dimasukkan larutan DMSO sebanyak 100  $\mu$ L, setetes larutan ragi roti, dan 2 mL air laut kedalam masing-masing vial dan dikocok. Selanjutnya dimasukkan larva udang sebanyak 10 ekor dan ditambahkan air laut hingga mencapai volume 10 mL dan diamati kematian larva udang dalam kurun waktu 24 jam. Kontrol pelarut dibuat dengan cara dimasukkan 100  $\mu$ L pelarut kedalam masing-masing botol vial. Kemudian diuapkan hingga kering. Larutan ragi roti dimasukkan sebanyak 1 tetes dan ditambahkan 2 mL air, selanjutnya dikocok. Dimasukkan 10 ekor larva udang, ditambahkan air laut hingga

mencapai 10 mL dan diamati kematian larva udang dibawah lampu pijar selama 24 jam.

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{\text{kematian} - \text{kematian kontrol}}{\text{jumlah larva uji}} \times 100\% \dots\dots\dots (3.3)$$

$$\text{Mortalitas} = \% \text{ mortalitas} \times \text{jumlah keseluruhan larva} \dots\dots\dots (3.4)$$

### 3.5.5 Uji Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder

Uji fitokimia dilakukan pada semua hasil fraksinasi mikroalga *Chlorella sp.*, hasil fraksinasi dilakukan uji pada golongan flavonoid, tanin, triterpenoid dan steroid, saponin, dan alkaloid.

#### 3.5.5.1 Uji Flavonoid

Fraksi hasil ekstraksi mikroalga *Chlorella sp.* dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 3 mL etanol 70%, selanjutnya dikocok. Tabung reaksi dipanaskan, dikocok kembali, dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan 0.1 gram serbuk magnesium dan HCl 2M sebanyak 2 tetes. Perubahan warna menjadi merah pada lapisan etanol menandakan adanya senyawa flavonoid (Harbone, 1987).

#### 3.5.5.2 Uji Tanin

Fraksi hasil ekstraksi mikroalga *Chlorella sp.* dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan FeCl<sub>3</sub> sebanyak 2-3 tetes. Perubahan warna menjadi hijau biru atau hijau hitam menandakan adanya tanin (Harbone, 1987).

#### 3.5.5.3 Uji Triterpenoid dan Steroid

Fraksi hasil ekstraksi mikroalga *Chlorella sp.* dimasukkan kedalam tabung reaksi, dilarutkan kedalam 0,5 mL kloroform, dan ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Kemudian ditambahkan

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat sebanyak 1-2 tetes melalui dinding tabung . Perubahan warna menjadi cincin kecoklatan atau violet menandakan adanya senyawa triterpenoid. Apabila perubahan warna menjadi hijau kebiruan menandakan adanya senyawa steroid (Harbone, 1987).

#### **3.5.5.4 Uji Saponin**

Fraksi hasil ekstraksi mikroalga *Chlorella sp.* dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan air panas, selanjutnya didinginkan dan dikocok dengan kuat selama 10 detik. Apabila terbentuk buih selanjutnya ditambahkan HCl 2N sebanyak 1 tetes, adanya buih yang terbentuk dapat bertahan selama cukup lama menandakan adanya senyawa saponin (Harbone, 1987).

#### **3.5.5.5 Uji Alkaloid**

Fraksi hasil ekstraksi mikroalga *Chlorella sp.* dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 0,5 mL HCl 2N dan dipanaskan. Setelah dipanaskan, ekstrak didinginkan dan dibagi dalam 2 tabung reaksi. Tiap tabung ditambahkan reagen Mayer dan Dragendorf sebanyak 2-3 tetes. Apabila terbentuk endapan putih atau kuning ketika penambahan reagen Mayer, maka ekstrak mengandung senyawa alkaloid. Apabila terbentuk endapan jingga ketika penambahan reagen Dragendorf, maka ekstrak mengandung senyawa alkaloid (Harbone, 1987).

### 3.5.6 Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Fraksi yang diperoleh hasil fraksinasi dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Fraksi dimasukkan dalam kuvet dan dianalisis pada rentang panjang gelombang 200–800 nm. Spektra yang terbentuk diamati, dicatat panjang gelombang dan absorbansinya pada puncak yang terbentuk (Fasya, 2019).

### 3.5.7 Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Menggunakan Spektrometer LC-MS/MS

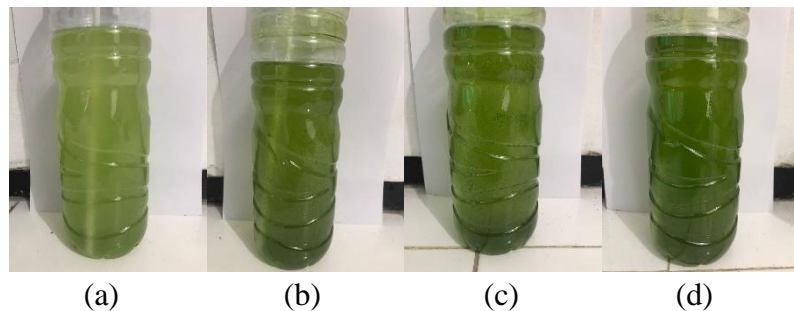
Fraksi mikroalga *Chlorella sp.* yang memiliki tingkat toksisitas yang paling baik dianalisis menggunakan LC-MS/MS dengan spesifikasi sebagai berikut.

<b>Nama</b>	<b>Spesifikasi</b>
Kolom	hypersil gold (50 mm x 2,1 mm x 1,9 $\mu$ m).
UHPLC	ACCELLA
Fase gerak	0,01% asam asetat dalam air (fase A) dan 0,01% asam asetat dalam asetonitril (fase B).
Laju alir	300 $\mu$ L/menit
Tipe MS	MS triple Q ( <i>Quadrupole</i> ) TSQ QUANTUM ACCESS MAX
Software	TSQ Tune
Kontrol suhu kolom	30°C
Volume injeksi	2 $\mu$ L
Sumber ionisasi	APCI

## BAB IV PEMBAHASAN

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

Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* bertujuan untuk memperoleh biomassa *Chlorella sp.*. Sel-sel *Chlorella sp.* mampu beregenerasi dengan adanya media tumbuh. Media yang digunakan untuk kultivasi ialah Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%. Terjadi perubahan warna selama masa kultivasi dihari ke-10 yang semula berwarna hijau kekuningan menjadi hijau pekat dan menghasilkan endapan (Gambar 4.1). Perubahan warna mengindikasikan adanya peningkatan populasi sel *Chlorella sp.* serta menunjukkan *Chlorella sp.* mampu tumbuh dan berkembang dengan baik menggunakan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%. Pemanenan dilakukan pada hari ke-10 karena pertumbuhan *Chlorella sp.* sudah memasuki fase stasioner yaitu fase dimana laju pertumbuhan sama dengan laju kematiannya serta pada fase tersebut terjadi proses pembentukan metabolit sekunder yang merupakan keseluruhan proses sintesis dan perombakan metabolit primer.



Gambar 4.1 Perubahan Warna Kultur Mikroalga *Chlorella sp.* pada (a) hari ke-1, (b) hari ke-4, (c) hari ke-7, dan (d) hari ke-10

Pemanenan *Chlorella sp.* dilakukan dengan teknik sentrifugasi yaitu memanfaatkan gaya sentripetal untuk memisahkan substansi dengan kepadatan yang berbeda, maka diperoleh supernatan yang berwarna bening dan pelet yaitu

biomassa *Chlorella sp.*. Biomassa yang diperoleh selanjutnya dilakukan pengeringan pada suhu ruang. Pengeringan sendiri bertujuan untuk mengurangi kadar air dan menghindari adanya mikroorganisme yang tumbuh. Pengeringan tidak dilakukan menggunakan oven dengan suhu tinggi karena dikhawatirkan akan merusak senyawa target yang diinginkan ketika dilakukannya ekstraksi. Biomassa yang sudah kering selanjutnya dikerok dan diperoleh biomassa dalam bentuk serbuk berwarna hijau tua sebanyak 8 gram.

#### **4.2 Ekstraksi Sonikasi Senyawa Metabolit Sekunder Biomassa *Chlorella sp.***

Ekstraksi senyawa aktif *Chlorella sp.* menggunakan metode ekstraksi sonikasi dimana metode ini memanfaatkan gelombang ultrasonik. Umumnya ekstraksi dengan metode ini menggunakan dua macam alat, yaitu *waterbath* dan *probe system*. Alat yang digunakan untuk ekstraksi kali ini yaitu *waterbath*. Pemilihan *waterbath* dilakukan untuk menghindari perubahan panas secara signifikan yang berpotensi merusak senyawa aktif yang terkandung didalamnya.

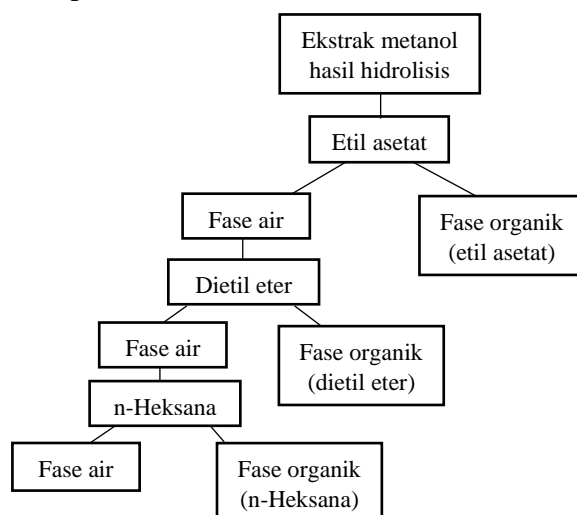
Selama berlangsungnya proses ekstraksi, gelombang-gelombang ultrasonik menyebabkan terjadinya proses kavitasi, yaitu proses pembentukan gelembung-gelembung kecil akibat adanya transmisi gelombang ultrasonik untuk membantu difusi pelarut kedalam dinding sel tanaman. Hal ini dapat menyebabkan terjadinya proses pemindahan massa senyawa bioaktif dari sel dalam tumbuhan ke pelarut (Ashley *et al.*, 2001). Pelarut yang digunakan selama proses ekstraksi adalah metanol. Penggunaan metanol sebagai pelarut dikarenakan metanol bersifat polar dan mampu melarutkan senyawa metabolit sekunder yang memiliki ikatan glikosidanya. Hal ini sesuai dengan prinsip *like dissolve like* yaitu suatu pelarut cenderung melarutkan senyawa dengan tingkat kepolaran

yang serupa. Filtrat selanjutnya diuapkan dan diperoleh rendemen ekstrak metanol hasil sonikasi sebesar 13,936%.

#### 4.3 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

Senyawa metabolit sekunder pada ekstrak metanol memiliki ikatan glikosida yang tersusun atas senyawa glikon dan aglikon. Senyawa glikon dapat larut dalam metanol karena memiliki tingkat kepolaran yang serupa. Hidrolisis bertujuan untuk memutus ikatan glikosida sehingga senyawa glikon dan aglikon dapat terpisah (Fasya *et al.*, 2018).

Partisi senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan berbagai macam pelarut. Penggunaan variasi pelarut ini dikarenakan senyawa metabolit sekunder dapat bersifat nonpolar, semipolar, maupun polar, sehingga dibutuhkan variasi pelarut saat dilakukannya partisi. Senyawa metabolit sekunder akan larut pada tiap-tiap pelarut dengan tingkat kepolarannya yang serupa seperti yang diilustrasikan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Skema Partisi

Terbentuknya dua lapisan yang tidak saling bercampur ketika dilakukannya partisi yaitu lapisan atas berupa fasa organik dan lapisan bawah berupa fasa air. Pembentukan dua lapisan tersebut dikarenakan adanya perbedaan pada sifat

kepolarannya. Tingkat kepolaran suatu pelarut dapat diketahui dari konstanta dielektriknya, semakin tinggi nilai konstanta dielektrik maka kepolaran suatu pelarut semakin besar.

Tabel 4.1 Hasil Partisi dan Rendemen tiap Fraksi

Pelarut	Warna Filtrat	Rendemen (%)
Etil asetat	Hijau pekat	42,46
Dietil eter	Hijau pekat	11,16
n-Heksana	Hijau kekuningan	2,907

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, rendemen fraksi etil asetat dan dietil eter cenderung lebih besar dibandingkan fraksi n-Heksana. Hal ini menunjukkan bahwa diduga senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam *Chlorella sp.* terdistribusi ke pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang lebih tinggi.

#### 4.4 Uji Toksisitas Menggunakan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Uji toksisitas dilakukan pada fraksi dari masing-masing pelarut terhadap larva udang *Artemia salina* L. Larva udang *Artemia salina* L. digunakan sebagai parameter uji untuk mengetahui aktivitas biologis dari suatu senyawa dengan menghitung persen kematian larva udang tersebut. Tujuan dari pengujian ini adalah untuk mengetahui efek toksik dari tiap senyawa uji.

Ekstrak yang sudah kering ditambahkan dimetil sulfoksida (DMSO) sebagai surfaktan yang dapat melarutkan sampel dengan air laut karena perbedaan tingkat kepolaran antara sampel dengan air laut. DMSO memiliki struktur dengan ikatan S=O yang bersifat polar yang mampu melarutkan air laut dan memiliki dua alkil CH<sub>3</sub> yang bersifat nonpolar yang mampu melarutkan sampel dengan pelarut organik.



Kematian larva udang diamati setelah 24 jam. Larva udang yang mati ditandai dengan tidak Bergeraknya larva udang dan keberadaannya berada di dasar vial. Data hasil pengamatan kematian larva udang masing-masing fraksi ditunjukkan dalam Tabel 4.2, Tabel 4.3, dan Tabel 4.4

Tabel 4.2 Hasil Uji Toksisitas Fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.*

Konsentrasi	Jumlah larva udang yang mati						%mortalitas	mortalitas
	I	II	III	IV	V	modus		
Kontrol pelarut	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol DMSO	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1	0	1	1	1	1	10	5
25	2	1	2	2	1	2	20	10
50	1	2	2	2	2	2	20	10
75	3	4	3	3	3	3	30	15
100	5	4	5	3	5	5	50	25

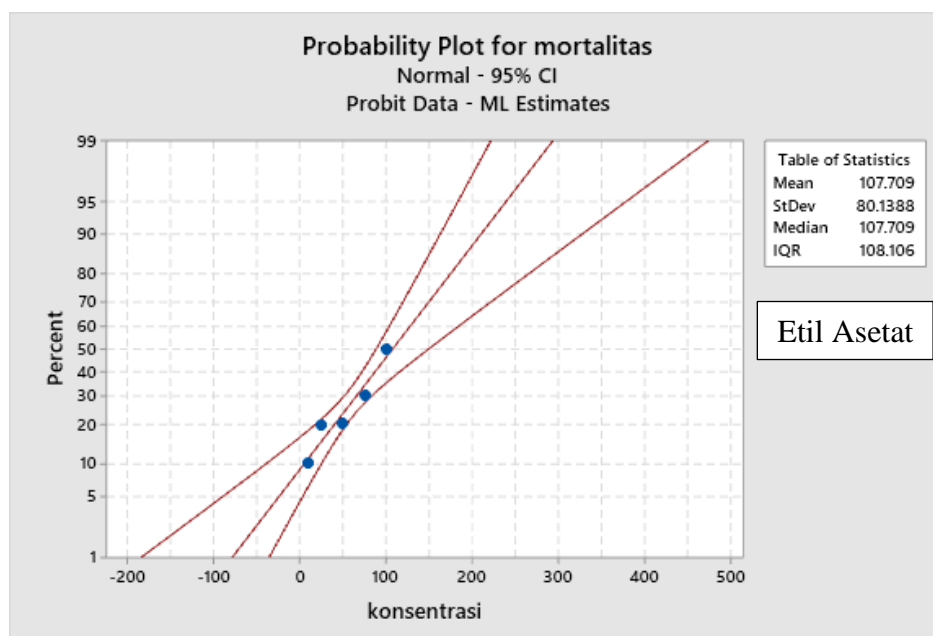
Tabel 4.3 Hasil Uji Toksisitas Fraksi dietil eter mikroalga *Chlorella sp.*

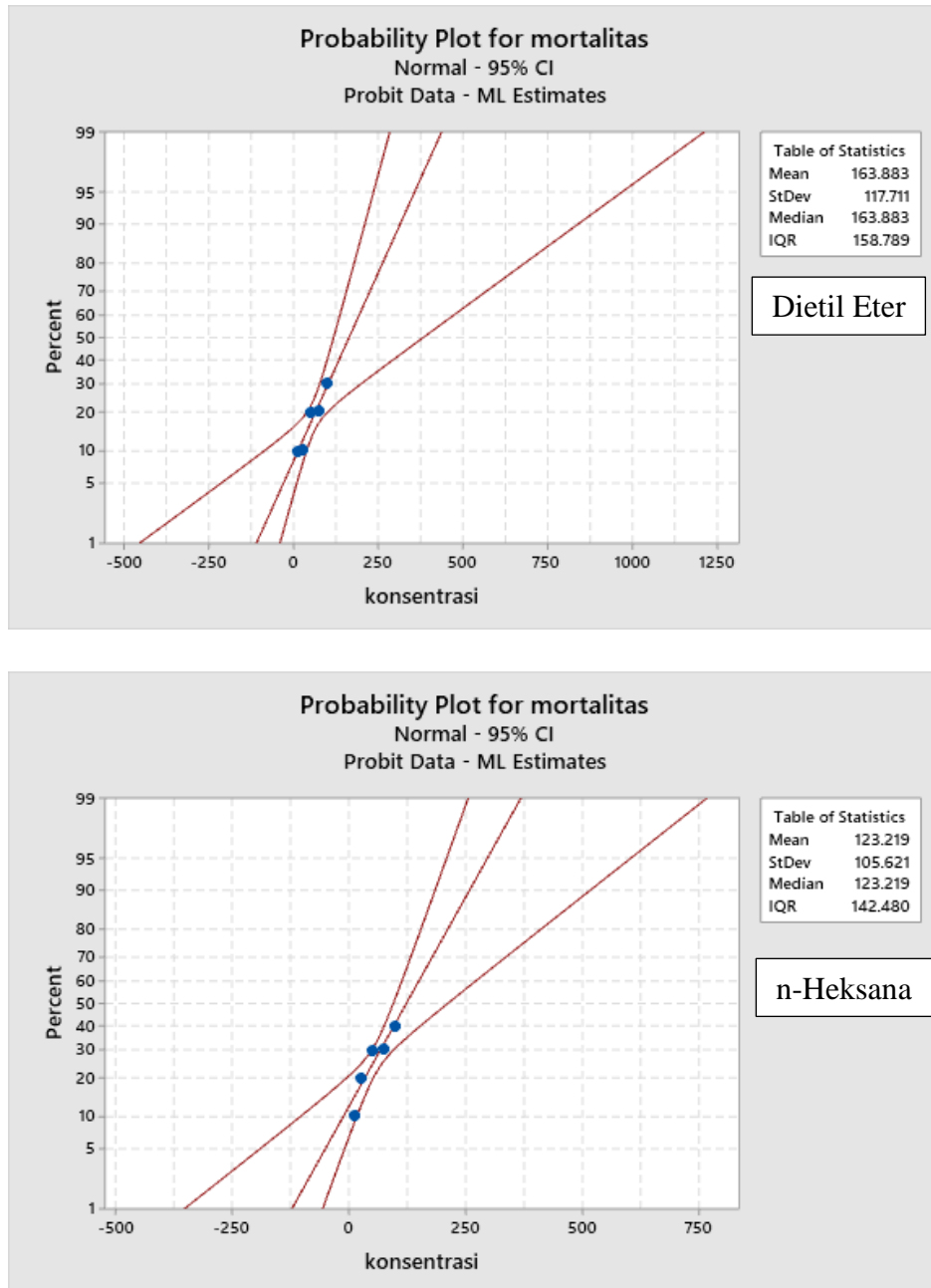
Konsentrasi	Jumlah larva udang yang mati						%mortalitas	mortalitas
	I	II	III	IV	V	modus		
Kontrol pelarut	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol DMSO	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	1	1	1	1	1	10	5
25	1	2	2	1	1	1	10	5
50	2	2	3	2	1	2	20	10
75	2	2	1	2	3	2	20	10
100	3	2	3	3	2	3	30	15

Tabel 4.4 Hasil Uji Toksisitas Fraksi n-Heksana mikroalga *Chlorella sp.*

Konsentrasi	Jumlah larva udang yang mati						%mortalitas	mortalitas
	I	II	III	IV	V	modus		
Kontrol pelarut	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol DMSO	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1	1	1	2	1	1	10	5
25	2	2	1	3	2	2	20	10
50	3	3	2	2	3	3	30	15
75	2	3	3	4	3	3	30	15
100	4	3	4	3	4	4	40	20

Berdasarkan perhitungan analisis probit berdasarkan data mortalitas larva udang *Artemia salina* L.dalam larutan sampel fraksi etil asetat, dietil eter, dan n-heksana menggunakan minitab 19, diperoleh kurva mortalitas seperti Gambar 4.3.





Gambar 4.3 Kurva Mortalitas Fraksi Etil Asetat, Fraksi Dietil Eter, dan Fraksi n-Heksana

Kurva tersebut menunjukkan perbedaan pengaruh kematian larva udang *Artemia salina* L terhadap berbagai konsentrasi ekstrak mikroalga *Chlorella sp.*. Hasil uji dengan metode BSLT menunjukkan jumlah kematian larva udang berbanding lurus dengan semakin tingginya konsentrasi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Harborne (1997) semakin tinggi konsentrasi suatu ekstrak maka sifat

tokisknya semakin tinggi. Kematian hewan uji juga dipengaruhi oleh jenis ekstrak serta komponen yang terkandung dalam ekstrak.

Tabel 4.5 Nilai LC<sub>50</sub> Tiap Fraksi

Sampel	LC <sub>50</sub> (ppm)
Etil asetat	107,709
Dietil eter	163,884
n-Heksana	123,219

Berdasarkan Tabel 4.5, diperoleh hasil fraksinasi etil asetat (107,709) cenderung lebih rendah dibandingkan dua fraksi lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat bersifat lebih toksik dibandingkan dengan fraksi dietil eter dan n-Heksana. Hal ini dibuktikan dari nilai rendemen ketika dilakukannya partisi, senyawa metabolit sekunder terdistribusi pada pelarut etil asetat dengan presentase rendemen paling tinggi diantara dua fraksi lainnya. Sampel dikatakan bersifat toksik jika nilai LC<sub>50</sub> <1000 ppm. Ekstrak atau fraksi senyawa dengan nilai LC<sub>50</sub> <30 ppm berpotensi sebagai antikanker, jika nilai LC<sub>50</sub> 30-200 ppm berpotensi sebagai antibakteri, dan jika nilai LC<sub>50</sub> 200-1000 ppm berpotensi sebagai pestisida (Meyer *et al.*, 1982). Oleh karena itu, ketiga fraksi tergolong bersifat toksik.

#### 4.5 Uji Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder

Uji fitokimia merupakan uji kualitatif untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tiap fraksi mikroalga *Chlorella sp.*. pengujian yang dilakukan dalam penelitian ini diantaranya senyawa flavonid, tanin, steroid, saponin, dan alkaloid. Hasil pengujian fitokimia tiap fraksi mikroalga *Chlorella sp.* dapat dilihat pada Tabel 4.6

Tabel 4.6 Hasil Fitokimia Tiap Fraksi Mikroalga *Chlorella sp.*

Golongan senyawa	Hasil Pengujian Tiap Fraksi		
	Etil asetat	Dietil eter	n-Heksana
Flavonoid	-	-	-
Tanin	-	-	-
Steroid	+	+	+
Saponin	-	-	-
Alkaloid	-	-	-

Keterangan : + : terdeteksi mengandung senyawa  
 - : tidak terdeteksi mengandung senyawa

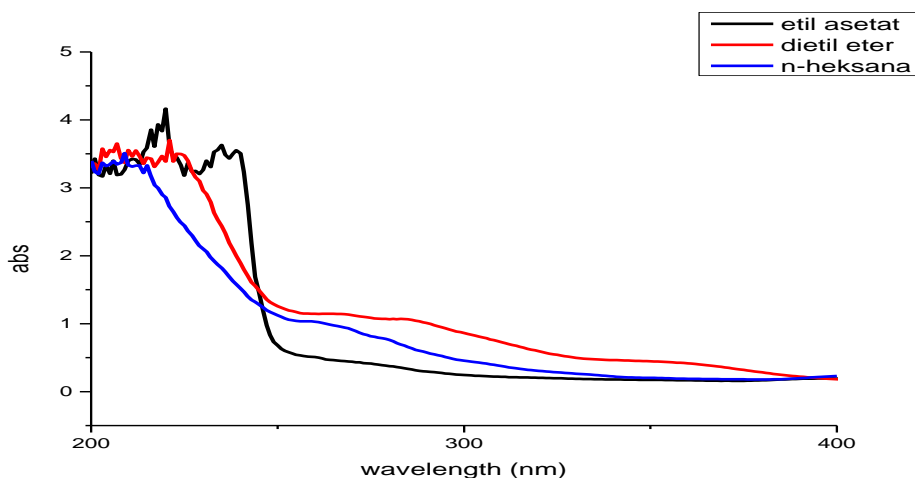
Identifikasi senyawa metabolit sekunder yang terkandung dapat diketahui secara kualitatif dengan melakukan uji fitokimia. Metode Lieberman-Buchard dilakukan untuk mengetahui kandungan triterpenoid dan steroid yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.*. Ekstrak yang mengandung senyawa steroid akan ditunjukkan dengan adanya perubahan larutan menjadi hijau kebiruan. Sedangkan ekstrak yang mengandung senyawa triterpenoid akan menghasilkan cincin kecoklatan (Harborne, 1987). Reagen Lieberman Buchard dapat dibuat dengan menambahkan kloroform sebagai pelarut yang tidak mengandung air, asam asetat anhidrat yang berperan dalam proses asetilasi gugus hidroksil dan membentuk turunan asetil, dan asam sulfat pekat yang berfungsi untuk mendehidrasi senyawa steroid dan membentuk garam kolestadiene yang terkonjugasi dan menghasilkan warna hijau.

Reagen LB yang terdiri dari kloroform, asam asetat, dan asam sulfat dapat mengubah kolesterol menjadi senyawa turunan asetat dan sulfatnya, dan diikuti terbentuknya sejumlah kecil i-steroid, kolesta-3,5-diena, serta senyawa tak jenuh lainnya. Jenis yang dominan perlahan berubah menjadi asam sulfonat tak jenuh tunggal, tak jenuh ganda, dan tak jenuh jamak dari proses penataan ulang melalui sulfonasi atau desaturasi, selanjutnya kembali tertata ulang dengan membentuk senyawa steroid aromatis (Xiong *et al.*, 2007).

Uji fitokimia yang dilakukan pada penelitian ini menunjukkan bahwa adanya senyawa steroid yang terkandung dalam tiap fraksi. Terjadi pembentukan cincin berwarna hijau kebiruan ketika ditambahkan reagen LB. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan Mahbubi (2020) bahwa terjadi pembentukan cincin berwarna hijau kebiruan yang menandakan adanya senyawa steroid yang terkandung dalam sampel. Hartini (2021) melaporkan dalam jurnalnya bahwa mikroalga *Chlorella sp.* mengandung beberapa jenis senyawa metabolit sekunder diantaranya alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, kuinon, dan terpenoid. Perbedaan hasil uji fitokimia dengan penelitian ini disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya perbedaan habitat, perbedaan media tumbuh, dan perbedaan variasi pencahayaan ketika dilakukannya kultivasi.

#### 4.6 Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Menggunakan Instrumen Spektrofotometer UV-Vis

Hasil fraksinasi ekstrak metanol dari masing-masing pelarut diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 200-800 nm. Berdasarkan hasil identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis diperoleh serapan panjang gelombang yang ditunjukkan pada Gambar 4.4



Gambar 4.4 Hasil UV-Vis: Fraksi Etil Astat, Fraksi Dietil Eter, dan Fraksi n-Heksana

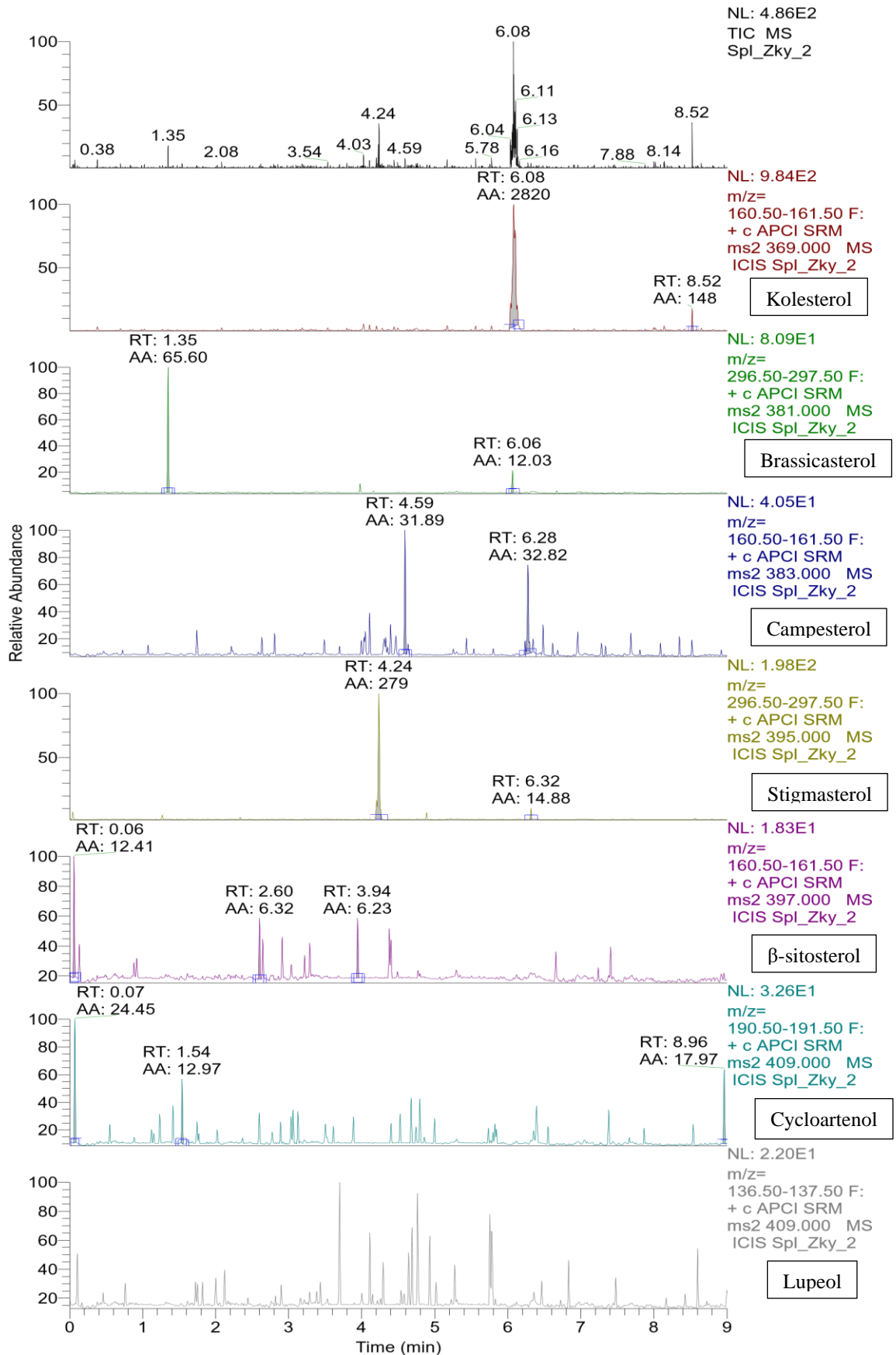
Tabel 4.7 Serapan UV-Vis tiap fraksi

Panjang gelombang			Transisi electron	Gugus fungsi
Etil asetat	Dietil eter	n-Heksana		
203	203	203	$\pi \rightarrow \pi^*$	C=C tidak terkonjugasi

Hasil identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada fraksi etil asetat, dietil eter dan n-heksana diperoleh panjang gelombang maksimum steroid pada panjang gelombang 203 nm (Lampiran 5). Adanya transisi elektron  $\pi \rightarrow \pi^*$  dari ikatan C=C yang tidak terkonjugasi pada panjang gelombang 203 nm. Berdasarkan uji fitokimia diketahui senyawa metabolit sekunder yang terdeteksi ialah senyawa steroid, sehingga dugaan senyawa steroid yang juga memiliki serapan UV pada  $\lambda$  max 203 nm adalah steroid yang memiliki gugus sterol. Oleh karena itu, pada analisis selanjutnya menggunakan LC-MS/MS senyawa steroid yang ditargetkan adalah kampesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, brassicasterol, kolesterol, cycloartenol, dan lupeol.

#### 4.7 Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Menggunakan Instrumen LC-MS/MS

Identifikasi menggunakan LC-MS/MS dilakukan pada fraksi dengan nilai LC<sub>50</sub> paling rendah yakni fraksi etil asetat. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui jenis senyawa steroid yang terkandung dalam fraksi etil asetat ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.*, beberapa jenis senyawa steroid yang ditargetkan diantaranya kampesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, brassicasterol, kolesterol, cycloartenol, dan lupeol. Tabel 4.8 menunjukkan senyawa target yang akan diuji.



Gambar 4.5 Hasil Identifikasi fraksi etil asetat menggunakan LC-MS/MS



Tabel 4.8 Senyawa steroid berdasarkan literatur

Jenis steroid	Parent mass (m/z)	Daughter mass (m/z)
Kolesterol <sup>b</sup>	369	161
Brassicasterol <sup>a</sup>	381	297
Campesterol <sup>a</sup>	383	161
Stigmasterol <sup>a</sup>	395	297
$\beta$ -sitosterol <sup>a</sup>	397	161
Cycloartenol <sup>a</sup>	409	191
Lupeol <sup>a</sup>	409	137

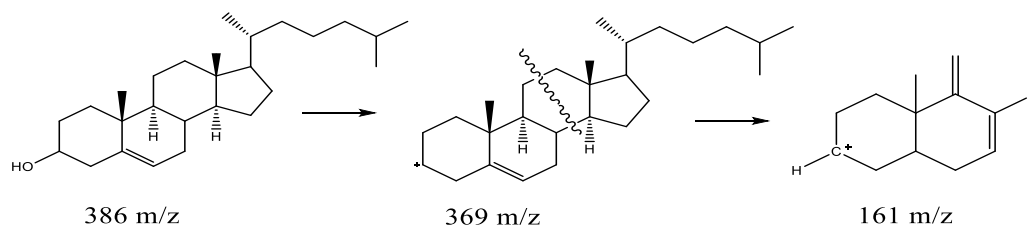
a Mo *et al.*, 2013

b Fu dan Joseph, 2012

Tabel 4.9 Hasil identifikasi senyawa steroid

Jenis steroid	Waktu retensi (menit)	Parent mass (m/z)	Daughter mass (m/z)	Luas area	NL ( <i>Neutral loss</i> )
Kolesterol	6,08	369	161	2820	$9,84 \cdot 10^2$
Stigmasterol	4,24	395	297	279	$1,98 \cdot 10^2$
Brassicasterol	1,35	381	297	65,6	$8,09 \cdot 10^1$
Campesterol	4,59	383	161	31,89	$4,05 \cdot 10^1$
Cycloartenol	8,96	409	191	17,97	$3,26 \cdot 10^1$
$\beta$ -sitosterol	2,6	397	161	6,32	$1,83 \cdot 10^1$

Hasil identifikasi menunjukkan bahwa dalam fraksi etil asetat mengandung senyawa steroid jenis kolesterol, brassicasterol, campesterol,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, dan cycloartenol (Tabel 4.9). Kelimpahan jenis senyawa steroid dapat dilihat dari luas areanya (*Ambundance Area*) semakin besar luas areanya maka kelimpahan semakin banyak. Jenis senyawa steroid dengan kelimpahan yang paling besar adalah kolesterol dengan luas areanya sebesar 2820. Gambar 4.6 menunjukkan pola fragmentasi dari senyawa kolesterol.

Gambar 4.6 Fragmentasi Senyawa Kolesterol (Munger *et al.*, 2018)

#### 4.8 Pembahasan Penelitian dalam Perspektif Islam

Allah menciptakan langit dan bumi beserta isinya dengan begitu sempurna. Segala sesuatu yang diciptakan-Nya memiliki manfaat dan hikmahnya masing-masing. Manusia diciptakan dengan tujuan menjadi khalifah di bumi yang diberi bekal berupa akal untuk berfikir. Sebagaimana yang disebutkan dalam surah Al-Baqarah ayat 30

وَإِذْ قَالَ رَبُّكَ لِلْمَلَائِكَةِ إِنِّي جَاعِلٌ فِي الْأَرْضِ خَلِيفَةً

Artinya : *Dan ketika Tuhanmu berkata kepada para malaikat, “Aku akan menciptakan di bumi ini seorang Khalifah”*

Salah satu ikhtiar kita dalam berfikir ialah dengan memikirkan dan mengungkap manfaat dan keistimewaan salah satu ciptaan-Nya salah satunya adalah tumbuh-tumbuhan. Allah SWT berfirman dalam surat al-An'am ayat 99 yang berbunyi

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرِجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ

Artinya : *“Dan Dialah yang menurunkan air dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan, maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau, Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang kurma, mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya pada waktu berbuah, dan menjadi masak. Sungguh, pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman”*

Ayat ini menjelaskan bahwa Allah SWT menurunkan air dari langit (hujan) dan dari air tersebut Allah SWT mengeluarkan beragam jenis tumbuhan dengan bentuk, ciri khas, serta manfaatnya yang berbeda-beda. *Chlorella sp.* merupakan salah satu tumbuhan yang memiliki ukuran yang sangat kecil (mikro) dengan berbagai manfaat yang ada didalamnya seperti bahan makanan, bahan dalam pembuatan

obat-obatan, dan lain sebagainya. Sungguh maha besar Allah dengan segala ciptaan-Nya. Salah satu bukti untuk menunjukkan rasa syukur kita atas ciptaan-Nya dengan mengkaji manfaat tujuan penciptaannya.

Sebagaimana yang dilakukan dalam penelitian ini yang mengkaji senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tumbuhan mikroalga *Chlorella sp.*. Senyawa metabolit sekunder yang diekstrak memiliki bioaktivitas seperti antikanker, antibakteri, antioksidan, dan masih banyak lainnya. Sebagaimana firman Allah SWT dalam surat asy Syu'ara ayat 80 :

وَإِذَا مَرِضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ

Artinya: "Dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan Aku"

Ayat ini menjelaskan bahwa segala penyakit pasti ada obatnya bagi mereka yang mau mencarinya. Penelitian ini mengkaji senyawa metabolit sekunder hasil ekstraksi *Chlorella sp.* dimana senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroalga *Chlorella sp.* ini dapat dimanfaatkan sebagai obat-obatan dan berbagai boaktivitas seperti antikanker, antiinflamasi, antioksidan, antibakteri, dan masih banyak yang lainnya.

Pemanfaatan mikroalga *Chlorella sp.* diawali dengan mengekstrak senyawa yang ada didalamnya menggunakan metode sonikasi dimana metode ini memanfaatkan gelombang ultrasonik. Salah satu kelebihan dari ekstraksi sonikasi ialah limbah yang dihasilkan lebih sedikit daripada ekstraksi konvensional lainnya, sehingga penggunaan metode ini lebih ramah lingkungan sebagaimana yang disebutkan dalam surat al-A'raf ayat 56

وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا إِنَّ رَحْمَتَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ الْمُحْسِنِينَ

Artinya : *Dan janganlah kamu membuat kerusakan di muka bumi, sesudah (Allah) memperbaikinya dan berdoalah kepada-Nya dengan rasa takut (tidak akan diterima) dan harapan (akan dikabulkan). Sesungguhnya rahmat Allah amat dekat kepada orang-orang yang berbuat baik.*

Tafsir Ibnu Katsir “*dan janganlah kamu membuat kerusakan*“ menjelaskan bahwa Allah melarang perbuatan yang dapat menimbulkan kerusakan di muka bumi dan segala hal yang dapat mengganggu kelestariannya, karena perbuatan tersebut dapat membuat terjadinya perubahan pada keseimbangan alam. Akibatnya alam menjadi rusak dan kelestarian ekosistem yang ada di dalamnya menjadi terganggu.

Fraksi etil asetat menunjukkan nilai LC<sub>50</sub> terendah yaitu 107,709. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina*. Hasil daripada penelitian ini adalah bukti bahwa segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah SWT tidak ada yang sia-sia dan setiap apa yang diciptakan memiliki berbagai macam manfaat. Seperti yang sudah dijelaskan dalam Qs. Ali Imron ayat 191

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya : “*(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri, duduk atau dalam keadaan berbaring, dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata), “Ya Tuhan kami, tidaklah Engkau menciptakan semua ini sia-sia; Mahasuci Engkau, lindungilah kami dari azab neraka.”*”

Tafsir Kementerian Agama RI menjelaskan bahwa Allah SWT menciptakan segala sesuatu pasti memiliki hikmah dan berbagai manfaat yang ada didalamnya. Oleh sebab itu kita sebagai manusia yang ditugaskan sebagai khalifah dengan akal

dan kecerdasan yang diberikan oleh-Nya dapat merenungi tanda-tanda kebesaran Allah serta mengambil hikmah dan manfaat yang terbentang di jagat raya ini. Maha besar Allah sang “*Rahman dan Rahiim*” dengan segala ciptaan-Nya yang memiliki beragam macam manfaat sehingga mengharuskan kita untuk selalu bersyukur atas kebesaran-Nya.

Adanya penelitian ini kita mengetahui bahwa makhluk sekecil mikroalga memiliki banyak manfaat yang bisa kita ambil, dengan ini kita sudah menjalankan salah satu kewajiban kita sebagai seorang khalifah di bumi yang diberikan bekal berupa akal untuk berfikir dan mengungkap kebesaran-kebesaran Allah. Akal bukan ditunjukkan untuk mengetahui segalanya, tapi akal ditunjukan untuk mengakui yang punya segalanya.

## **BAB V PENUTUP**

### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

1. Hasil uji toksisitas mikroalga *Chllorella sp.* ekstrak metanol fraksi etil asetat, dietil eter, dan n-Heksana memiliki nilai LC<sub>50</sub> berturut-turut sebesar 107,709 ppm, 163,884 ppm, dan 123,219 ppm dimana fraksi etil asetat memiliki tingkat toksisitas yang lebih tinggi dibandingkan dua fraksi lainnya.
2. Hasil uji fitokimia mikroalga *Chllorella sp.* ekstrak metanol fraksi etil asetat, dietil eter, dan n-heksana mengandung senyawa steroid. Hasil uji fitokimia didukung dengan spektrofotometer UV-Vis yang menunjukkan adanya senyawa steroid yang berada pada panjang gelombang 203 nm dengan transisi elektron  $\pi \rightarrow \pi^*$  dari ikatan C=C yang tidak terkonjugasi. Hasil LC-MS/MS menunjukkan senyawa steroid yang terkandung dalam fraksi etil asetat diantaranya kolesterol, stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, brassicasterol, campesterol, dan cycloartenol.

### **5.2 Saran**

Hasil uji fitokimia menunjukkan setiap fraksi mengandung senyawa steroid, maka perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut seperti isolasi senyawa steroid dari beberapa fraksi untuk mengetahui potensi bioaktivitas dari senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anggraeni, O. N., Fasya, A. G., & Hanapi, A. (2014). Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, Dan N-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* *Alchemy*, 1.
- Aprelia, F., & Suyatno. (2013). Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etil Asetat Tumbuhan Paku *Christella arida* dan Uji Pendahuluan Sebagai Antikanker. *UNESA Journal of Chemistry*, 2(3).
- Arief, I. I., Jenie, B. S. L., Astawan, M., Fujiyama, K., & Witarto, A. B. (2015). Identification and probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from Indonesian local beef. *Asian Journal of Animal Sciences*, 9(1), 25–36.
- Artati, E. K., H., F. I. W., & Fatimah. (2012). Pengaruh Jenis Dan Konsentrasi Asam Terhadap Kinetika Reaksi Hidrolisis Pelepah Pisang (*Musa Paradisiaca* L). *Ekuilibrium*, 11(2), 73–77.
- Ashley, K., Andrews, R. N., Cavazos, L., & Demange, M. (2001). Ultrasonic extraction as a sample preparation technique for elemental analysis by atomic spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16(10), 1147–1153.
- Atmoko, D. P., Marlina, E., & Erwin, E. (2018). Isolation And Characterization of Terpenoid Compounds From Leaves Of *Macaranga beccariana* Merr. *Jurnal Kimia Mulawarman*, 16(1), 22.
- Bariyyah, S. K., Hanapi, A., Fasya, A. G., & Abidin, M. (2013). Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap Dpph Dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi Dalam Medium Ekstrak Tauge. *Alchemy*, 2(3), 195–204.
- Carballo, J. L., Hernández-Inda, Z. L., Pérez, P., & García-Grávalos, M. D. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 2, 1–5.
- Dachriyanus. (2004). *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi*. Universitas Andalas.
- Damayanti, M. A. (2020). *Hidrolisis Mikroalga dengan Enzim*. CV Budi Utama.
- Day, R., & Underwood, A. L. (2002). *Analisis Kimia Kuantitatif Edisi Keenam*. Erlangga.

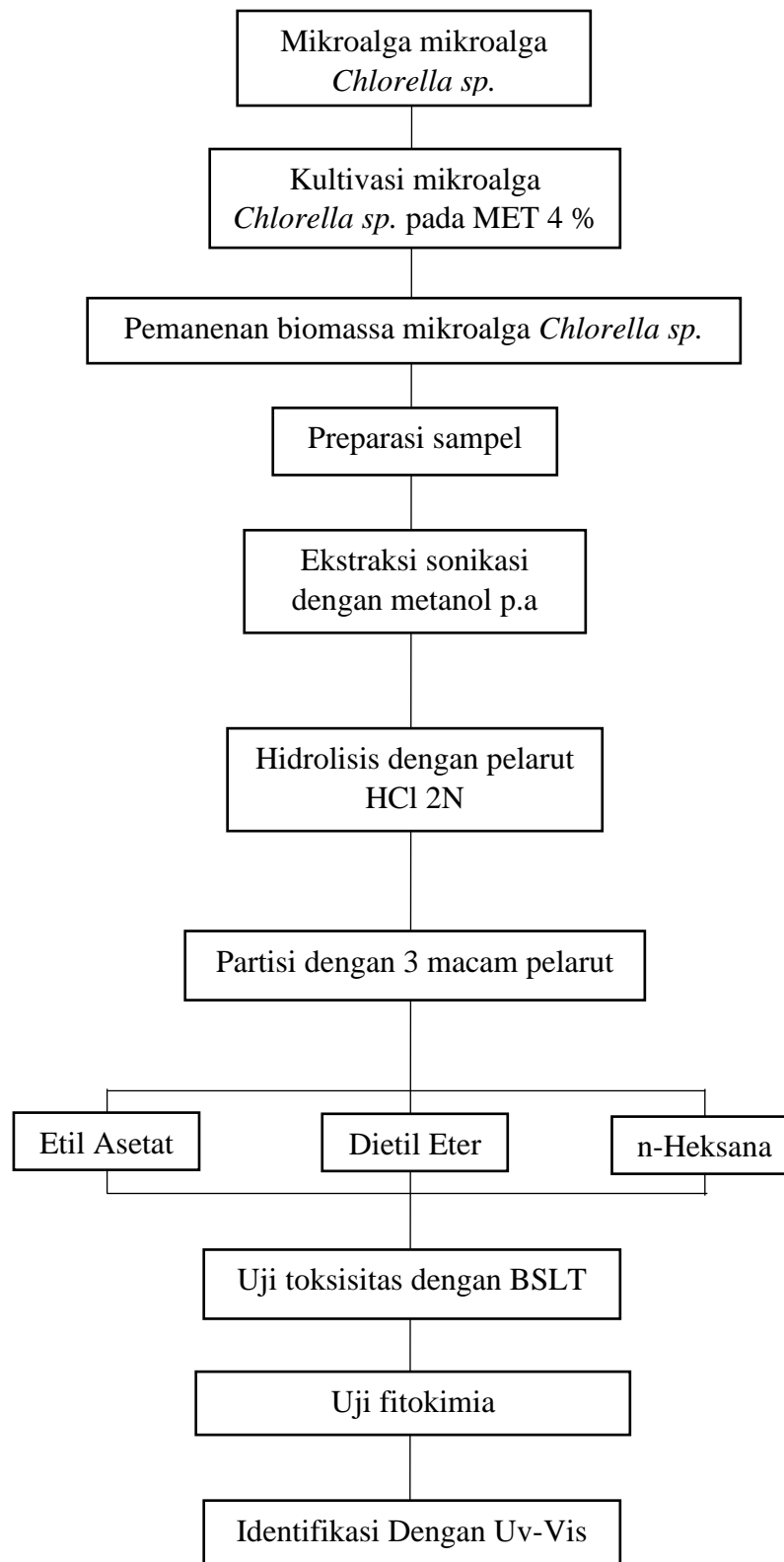
- Desianti, N. (2014). *Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter dan n-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga Chlorella sp.* UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Elystia, S., Muria, S. R., & Pertiwi, S. I. P. (2019). Pemanfaatan Mikroalga Chlorella Sp Untuk Produksi Lipid Dalam Media Limbah Cair Hotel Dengan Variasi Rasio C:N Dan Panjang Gelombang Cahaya. *Jurnal Sains & Teknologi Lingkungan*, 11(1), 25–43.
- Fasya, A. G., Dinasti, A. R., Shofiyah, M., Rahmawati, L. M., Millati, N., Safitri, D. A., Handoko, S., Hanapi, A., & Ningsih, R. (2018). Ekstraksi, Hidrolisis dan Partisi Metabolit Sekunder dari Mikroalga Chlorella sp. *Alchemy*, 5(1), 5.
- Fasya, A. G., Khamidah, U., Amaliyah, S., B., S. K., & Romaidi, R. (2013). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi Dalam Medium Ekstrak Tauge (Met) Pada Tiap Fase Pertumbuhan. *Alchemy*, 2(3).
- Fasya, A. G., Millati, N., Rahmawati, L. M., Iyani, R., Hanapi, A., Ningsih, R., Yuliani, D., & Megawati, D. S. (2020). Isolation and bioactivity of steroids isolates from petroleum ether fraction of Chlorella sp. *AIP Conference Proceedings*, 2243(June).
- Fasya, A. G., Purwantoro, B., Ulya, L. H., & Ahmad, M. (2020). Aktivitas Antioksidan Isolat Steroid Hasil Kromatografi Lapis Tipis dari Fraksi n-Heksana Hydrilla verticillata. *Alchemy*, 8(1), 23–34.
- Febriyanti, R. (2021). *Identifikasi Isolat Steroid dan Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi n-Heksana Hasil Ekstraksi Sonikasi pada Mikroalga Chlorella sp.* UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Fu, R., & Joseph, M. (2012). LC/ELSD and LC/MS/MS of Cholesterol and Related Sterols on a Poroshell 120 Column. *Biopharma*, 24.
- Gultom, S. O. (2018). Mikroalga: Sumber Energi Terbarukan Masa Depan. *Jurnal Kelautan: Indonesian Journal of Marine Science and Technology*, 11(1), 95.
- Hadiyanto, S. H. (2016). Response surface optimization of ultrasound assisted extraction (UAE) of phycocyanin from microalgae Spirulina platensis. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(4), 227–234.



- Hammado, N., & Illing, I. (2013). Identifikasi senyawa bahan aktif alkaloid pada tanaman Lahuna (*Eupatorium odoratum*). *Jurnal Dinamika*, 04(2), 1–18.
- Handaratri, A., & Yuniati, Y. (2019). Kajian Ekstraksi Antosianin dari Buah Murbei dengan Metode Sonikasi dan Microwave. *Reka Buana : Jurnal Ilmiah Teknik Sipil Dan Teknik Kimia*, 4(1), 63.
- Handoko, D. S. P. (2006). Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam Sebagai Katalis. *SIGMA : Jurnal Sains Dan Teknologi*, 9(1).
- Hartini, H., Rosmiati, K., & Sihombing, A. F. R. (2021). Analisis Kandungan Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Mikroalga *Chlorella* sp. Berdasarkan Variasi Waktu Pencahayaan. *JURNAL KESEHATAN PERINTIS (Perintis's Health Journal)*, 8(2), 139–146.
- Indarto, I. (2015). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Fenolik dari Kulit Akar Tumbuhan *Artocarpus Dadah* Miq 63-74. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Fisika Al-Biruni*, 4(2), 205–217.
- Isnansetyo, A., & Kurniastuty. (1995). *Teknik Kultur Phytoplankton Zooplankton. Pakan Alam untuk Pembenihan Organisme Laut*. Kanisius.
- Khamidah, U., Fasya, A. G., & Romaidi, R. (2014). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. Pada Fase Stasioner Hasil Kultivasi Dalam Medium Ekstrak Tauge (MET). *Alchemy*, 3(1), 1–7.
- Kumar, H. D., & Singh, H. N. (1976). *A Text Book on Algae*. Macmilan and Co Ltd.
- Maharsyah, T., Musthofa, L., & Wahyunato, A. N. (2013). Eferktivitas Penambahan Plant Growth Promoting Bacteria (*Azospirillum* sp.) dalam Meningkatkan Pertumbuhan Mikroalga (*Chlorella* sp.) pada Media Limbah Cair Tahu Setelah Proses Anaerob. *Jurnal Keteknikan Pertanian Tropis Dan Biosistem*, 1(3).
- Mahbubi, H. A. (2020). Toksisitas Senyawa Steroid Hasil Pemisahan KLTP Fraksi n-Butanol Mikroalga *Chlorella* sp. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 2507, Issue 1).
- Maligan, J. M., Adhianata, H., & Zubaidah, E. (2016). Production and Identification of Antimicrobial Compounds from Microalgae *Tetraselmis chuii* with Ultrasound Assisted Extraction Method (Study Type of Solvent and Total Cycle Extraction). *Jurnal Teknologi Pertanian*, 17(3), 203–212.

- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., & Nichols, D. E. (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45(5).
- Mo, S., Dong, L., Hurst, W. J., & Van Breemen, R. B. (2013). Quantitative analysis of phytosterols in edible oils using APCI liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Lipids*, 48(9), 949–956.
- Munger, L. H., Boulos, S., & Nyström, L. (2018). UPLC-MS/MS based identification of dietary steryl glucosides by investigation of corresponding free sterols. *Frontiers in Chemistry*, 6(AUG), 1–19.
- Novianti, T., Zainuri, M., & Widowati, I. (2019). Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella Vulgaris* Yang Dikultivasi Berdasarkan Sumber Cahaya Yang Berbeda. *Barakuda 45: Jurnal Ilmu Perikanan Dan Kelautan*, 1(2), 72–87.
- Nurhamidah, Nurdin, H., Manjang, Y., & Dharma, A. (2019). Identifikasi Profil Fitokimia Dan Uji Aktifitas Antioksidan Ekstrak Dietil Eter Daun Surian (*Toona sinensis* (A.Juss) M.Roem) Dengan Metode DPPH. *Jurnal Pendidikan Dan Ilmu Kimia*, 3(1), 65–69.
- Ola, P. D., Sandri, M. I., Ola, A. R. B., & Kadang, D. L. (2020). Determination Of Total Tanin Contents of *Terminalia Catappa*, L. Leaf Extract And Test Of Its Ability As A Complexion Agent of Fe (III). *Chem. Notes*, 2020(2), 94–107.
- Prabowo, D. A. (2009). *Optimasi Pengembangan Media untuk Pertumbuhan Chlorella sp. pada Skala Laboratorium*. Institut Pertanian Bogor.
- Prihantini, N. B., Putri, B., & Yuniati, R. (2005). Pertumbuhan *Chlorella sp.* Dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) Dengan Variasi pH Awal. *MAKARA of Science Series*, 9(1).
- Putri, D. S., Marianah, M., & Ihromi, S. (2018). Isolasi Mikroalga Laut Dari Pantai Mapak Pulau Lombok. *Jurnal Agrotek UMMat*, 5(2), 91.
- Rengga, W. D. P., Prayoga, A. B., Asnafi, A., & Triwibowo, B. (2019). “Ekstraksi Minyak Mikro-Algae *Skeletonema Costatum* dengan Bantuan Gelombang Ultrasonik.” *Jurnal Rekayasa Bahan Alam Dan Energi Berkelanjutan*, 3(1), 1–5.
- Richmond, A. E. (1986). *Microalgae Culture*. CRC Press.

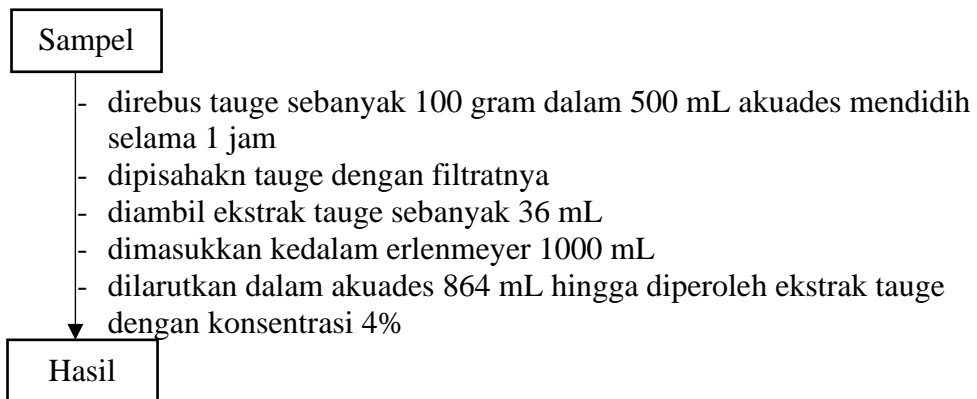
- Rismiarti, Z., Yuniati, Y., & Alfanaar, R. (2016). Penerapan Metode Sonikasi terhadap Adsorpsi Fe(III) pada Zeolit Alam Teraktivasi. *Alchemy*, 5(2).
- Ryan Georgianna, D., & Mayfield, S. P. (2012). Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels. *Nature*, 488(7411), 329–335.
- Salempa, P., & Muharram. (2016). *Senyawa Steroid dalam Tumbuhan Bayur*. Badan Penerbit Universitas Negeri Makassar.
- Shalmashi, A. (2009). Ultrasound-Assisted Extraction of Oil from Tea Seeds. *Journal of Food Lipids*, 16(4).
- Shihab, M. Q. (2002). *Tafsir Al Mishbah : pesan, kesan dan keserasian Al Quran*. Lentera Hati.
- Soebagio, B. E., Ibnu, M. S., Widarti, H. R., & Munzil. (2005). *Kimia Analitik II*. UM Press.
- Soemirat, J. (2005). *Toksikologi Lingkungan*. UGM Press.
- Suhartati, T. (2014). *Dasar-Dasar Spektrofotometri UV-Vis dan Spektrometri Massa untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. AURA.
- Susanty, D., Oksari, A. A., & Izani, R. (2019). Ekstrak chlorella sp. yang dikultur pada media limbah ternak ayam. *Chempublish Journal*, 4(2), 52–61.
- Triyati, E. (1985). Spektrofotometer Ultra-Violet dan Sinar Tampak Serta Aplikasinya dalam oseanologi. *Osema*, 10(1).
- Wahyu Ningdyah, A., Hairil Alimuddin, A., & Jayuska, A. (2015). Uji Toksisitas Dengan Metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test) Terhadap Hasil Fraksinasi Ekstrak Kulit Buah Tampoi (*Baccaurea macrocarpa*). 4(1), 75–83.
- Xiong, Q., Wilson, W. K., & Pang, J. (2007). The Liebermann-Burchard reaction: Sulfonation, desaturation, and rearrangement of cholesterol in acid. *Lipids*, 42(1), 87–96.
- Yudiati, E., Sedjati, S., & Agustian, R. (2011). Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Metanol dan Pigmen Kasar Spirulina sp. *Ilmu Kelautan: Indonesian Journal of Marine Sciences*, 16(4), 187-192–192.

**LAMPIRAN****Lampiran 1. Rancangan Penelitian**

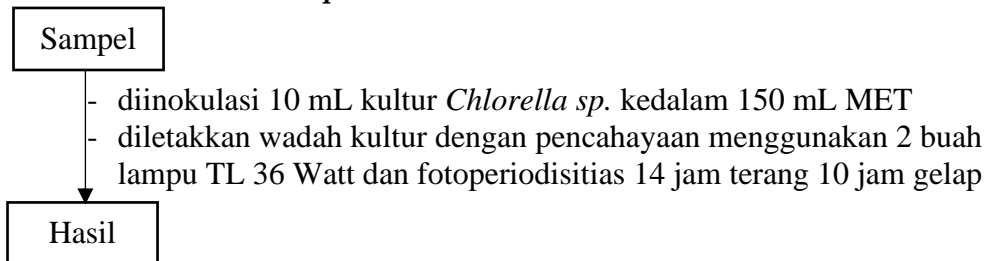
## Lampiran 2. Skema Kerja

### L.2.1 Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.*

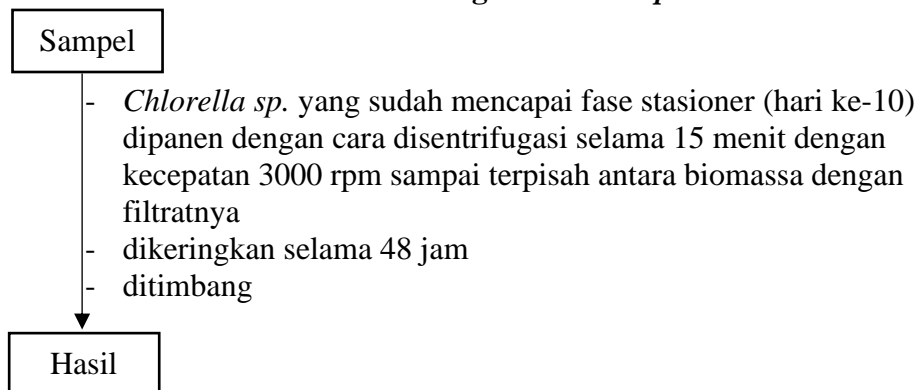
#### L.2.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%



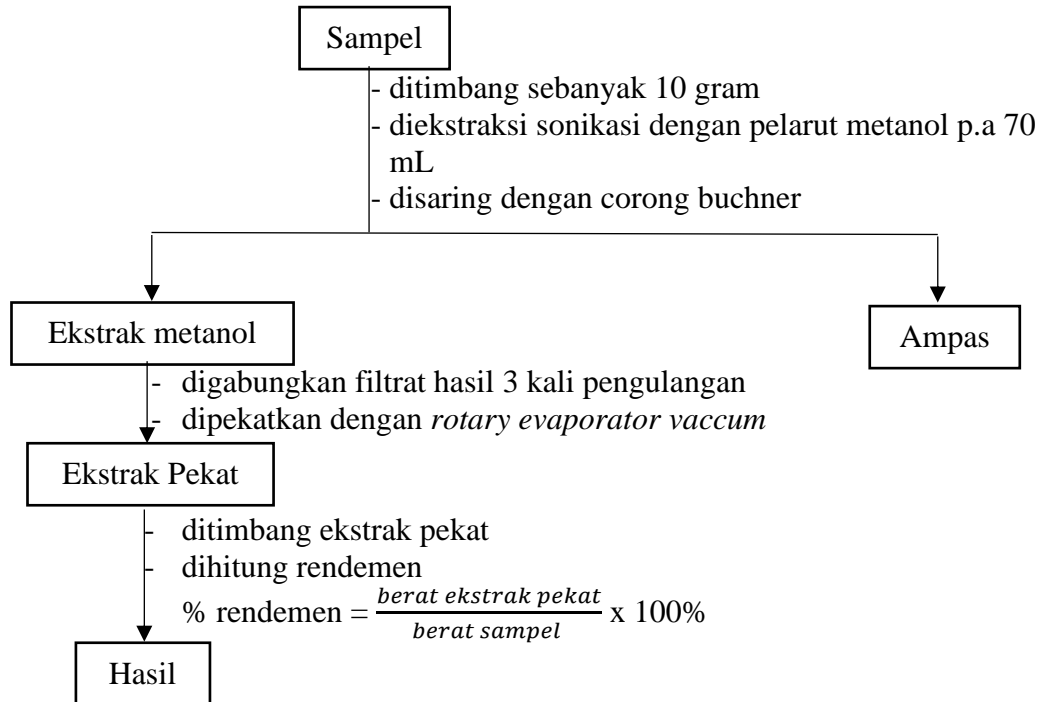
#### L.2.1.2 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam MET 4%



#### L.2.1.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

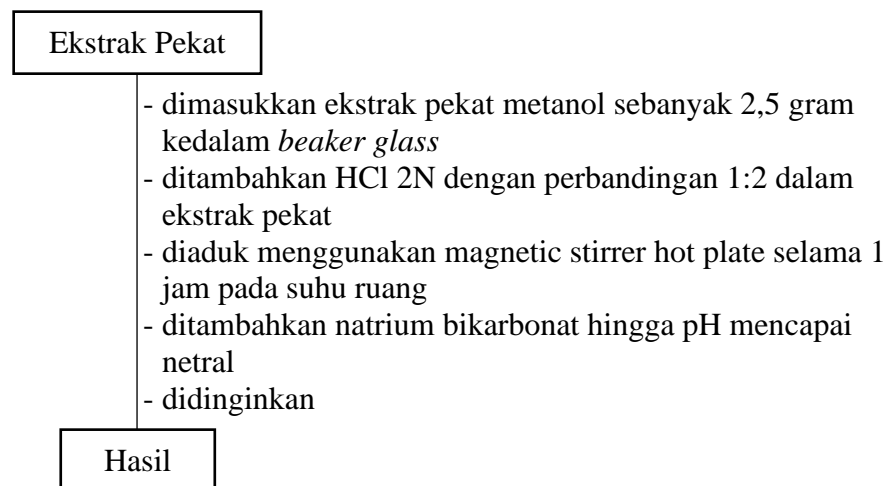


### L.2.3 Ekstraksi Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Sonikasi

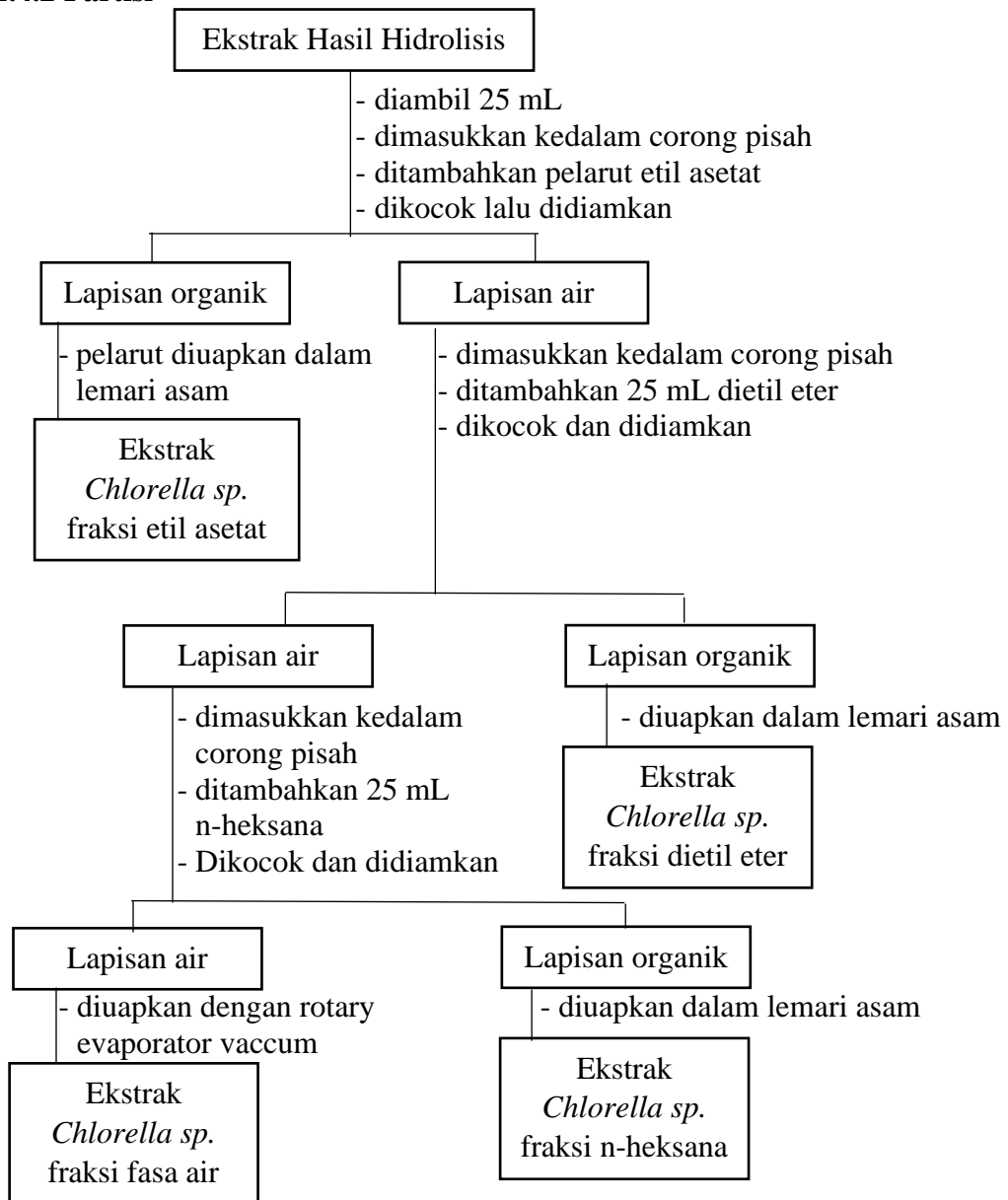


### L.2.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

#### L.2.4.1 Hidrolisis

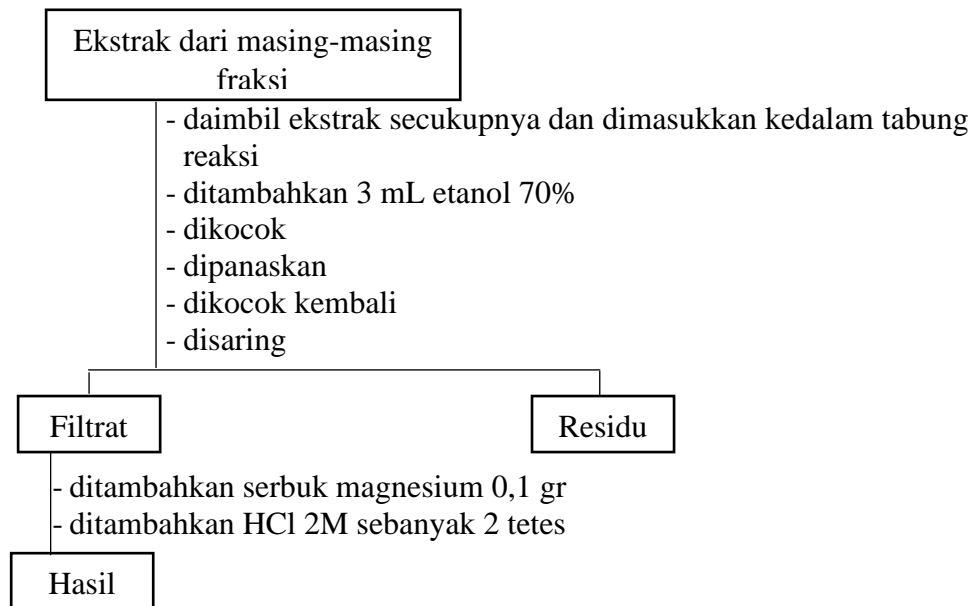


### L.2.4.2 Partisi

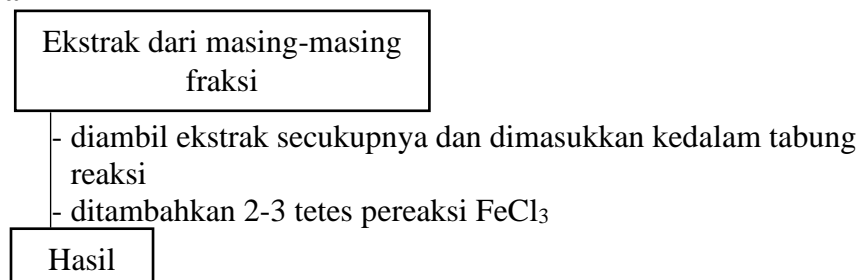


## L.2.5 Uji Fitokimia

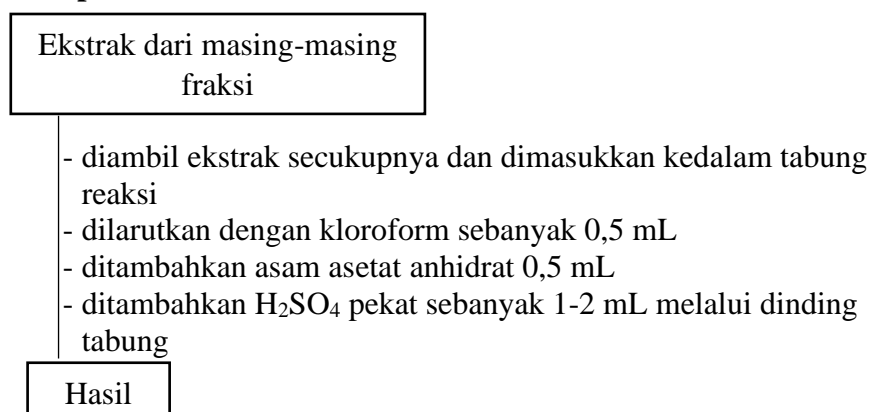
### L.2.5.1 Flavonoid



### L.2.5.2 Tanin

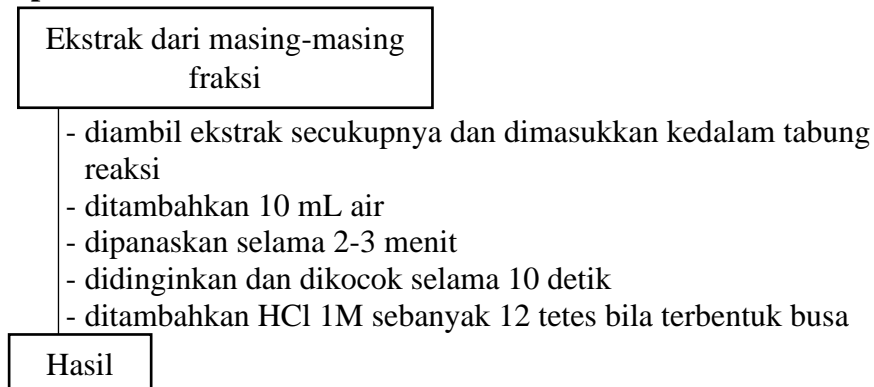


### L.2.5.3 Triterpenoid dan Steroid

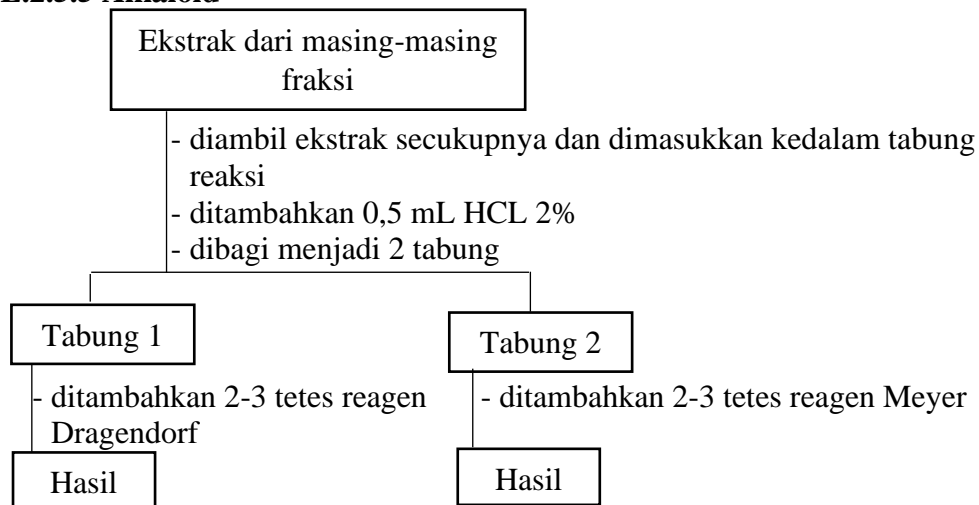




#### L.2.5.4 Saponin

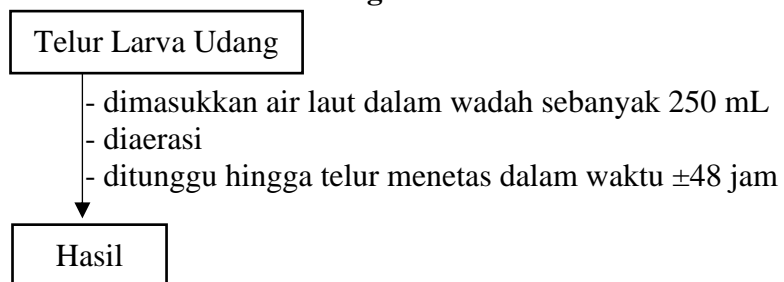


#### L.2.5.5 Alkaloid

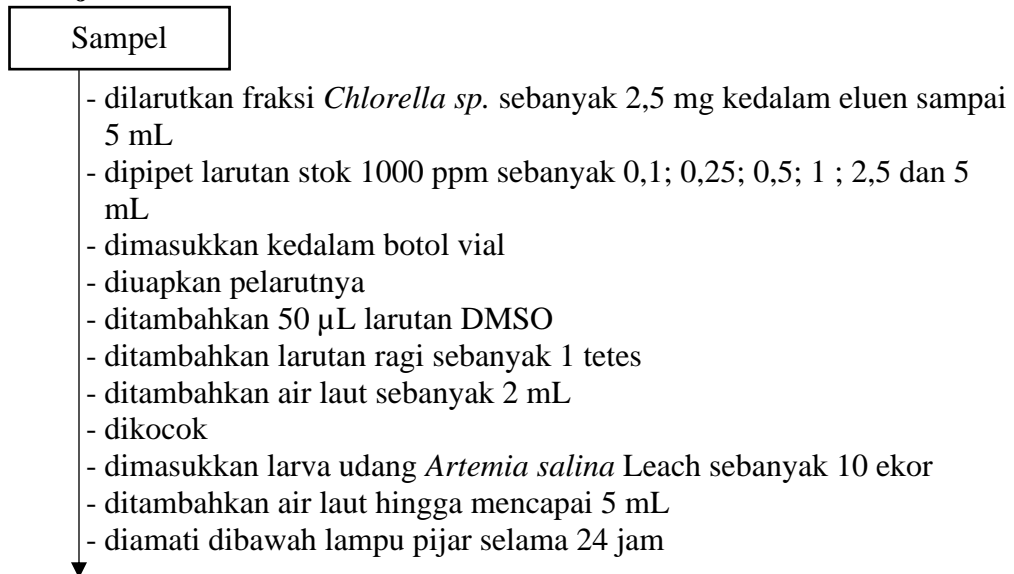


#### L.2.6 Uji Toksisitas Senyawa Metabolit Sekunder terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

##### L.2.6.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina* Leach

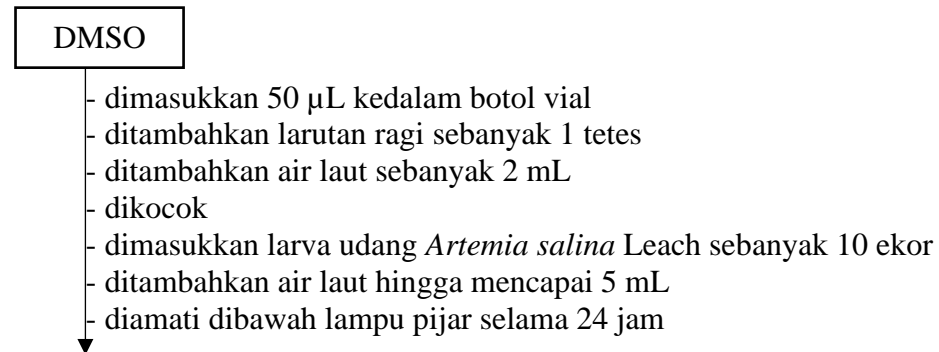


### L.2.6.2 Uji Toksisitas



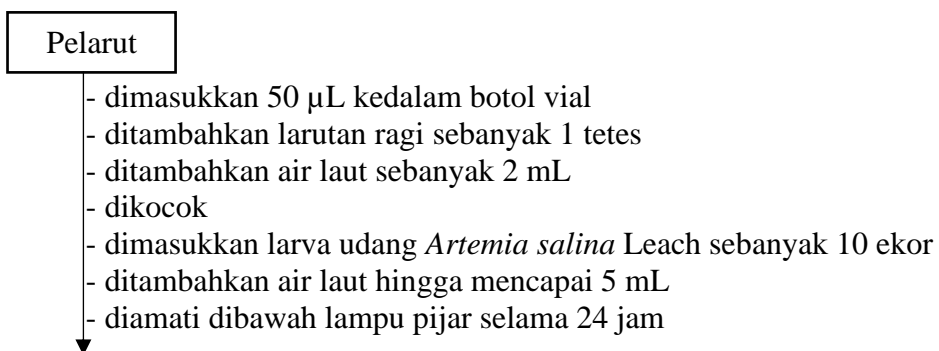
Hasil

#### a. Kontrol DMSO



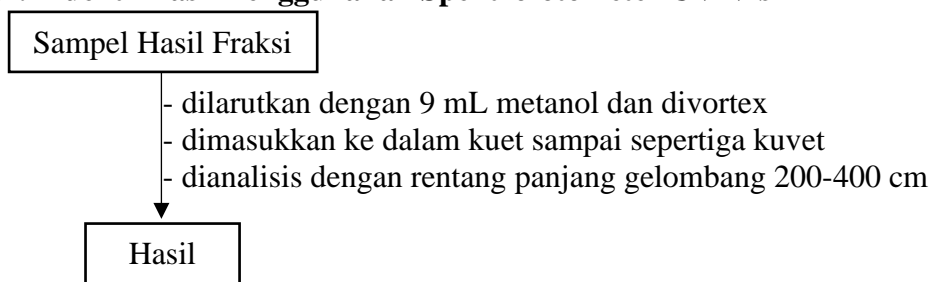
Hasil

#### b. Kontrol Pelarut



Hasil

### L.2.7 Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis



## Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan

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

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

#### L.3.1.1 Kultivasi dalam Botol Minuman 1500 mL

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

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

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

$$= 150 \text{ mL isolat } Chlorella \text{ sp.}$$

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

#### L.3.1.2 Pembuatan MET 4% sebanyak 900 mL

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

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

$$\begin{aligned} \text{Volume akuades} &= \text{MET 4\%} - (\text{volume ekstrak tauge}) \\ &= 900 \text{ mL} - 35 \text{ mL} \\ &= 864 \text{ mL} \end{aligned}$$

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

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

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

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

$$n = 1$$

$$\begin{aligned} \text{mol} &= \frac{\text{g HCl}}{\text{Mr HCl}} = \frac{37 \text{ g}}{36,5 \text{ g/mol}} = 1,014 \text{ mol} \\ \text{konversi ke mL} &= \frac{\text{berat larutan}}{\text{berat jenis HCl pekat}} = \frac{100 \text{ g}}{1,267 \text{ g/mL}} = 78,9 \text{ mL} \\ \text{M} &= \frac{\text{mol}}{\text{L}} = \frac{1,014 \text{ mol}}{0,0789 \text{ L}} = 12,85 \text{ M} \\ \text{N HCl} &= n \times \text{Molaritas HCl} \\ \text{N} &= 1 \times 12,85 \text{ N} = 12,85 \text{ N} \\ \text{N}_1 \times \text{V}_2 &= \text{N}_2 \times \text{V}_2 \\ 12,85 \text{ N} \times \text{V}_1 &= 2 \text{ N} \times 100 \text{ mL} \\ \text{V}_1 &= 15,6 \text{ mL} \end{aligned}$$

Cara pembuatannya dengan cara diambil larutan HCl pekat 37% sebanyak 15,6 mL, dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL yang sudah diisi dengan aquades sebanyak  $\pm 15$  mL. Selanjutnya ditambahkan aquades hingga mencapai tanda batas dan dikocok sampai homogen.

### L.3.3 Perhitungan Uji Toksisitas

- Pembuatan larutan stok 1000 ppm

$$\frac{x \text{ mg}}{\text{L}} = 1000 \text{ ppm}$$

$$\frac{x \text{ mg}}{0,01 \text{ L}} = 1000 \text{ ppm}$$

$$x = 10 \text{ mg}$$

larutan stok 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 10 mg ekstrak sampel kedalam 10 mL pelarutnya

- Pembuatan larutan ekstrak 10 ppm

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

$$V_1 \times 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 10 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{100 \text{ mL} \times \text{ppm}}{1000 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 0,1 \text{ mL}$$

Untuk pembuatan larutan ekstrak larutan 10 ppm dengan memipet larutan stok 0,1 mL

- Pembuatan larutan ekstrak 25 ppm

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

$$V_1 \times 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 25 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{250 \text{ mL} \times \text{ppm}}{1000 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 0,25 \text{ mL}$$

Untuk pembuatan larutan ekstrak larutan 25 ppm dengan memipet larutan stok 0,25 mL

- Pembuatan larutan ekstrak 50 ppm

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

$$V_1 \times 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 50 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{500 \text{ mL} \times \text{ppm}}{1000 \text{ ppm}}$$

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

Untuk pembuatan larutan ekstrak larutan 50 ppm dengan memipet larutan stok 0,5 mL

- Pembuatan larutan ekstrak 75 ppm

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

$$V_1 \times 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 75 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{750 \text{ mL} \times \text{ppm}}{1000 \text{ ppm}}$$

$$V_1 = 0,75 \text{ mL}$$

Untuk pembuatan larutan ekstrak larutan 75 ppm dengan memipet larutan stok 0,75 mL

- Pembuatan larutan ekstrak 100 ppm

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

$$V_1 \times 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \times 100 \text{ ppm}$$

$$V_1 = \frac{1000 \text{ mL} \times \text{ppm}}{1000 \text{ ppm}}$$

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

Untuk pembuatan larutan ekstrak larutan 100 ppm dengan memipet larutan stok 1 mL

## Lampiran 4 Data pengamatan dan Hasil Perhitungan

### L.4.1 Rendemen Ekstraksi Sonikasi

$$\begin{aligned} \% \text{ rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{1,114 \text{ g}}{8 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 13,936 \% \end{aligned}$$

### L.4.2 Rendemen Fraksinasi

#### 1. Rendemen Fraksi Etil Asetat

$$\begin{aligned} \% \text{ rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{0,4191 \text{ g}}{0,987 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 42,46 \% \end{aligned}$$

#### 2. Rendemen Fraksi Dietil Eter

$$\begin{aligned} \% \text{ rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{0,1102 \text{ g}}{0,987 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 11,165 \% \end{aligned}$$

#### 3. Rendemen Fraksi n-Heksana

$$\begin{aligned} \% \text{ rendemen} &= \frac{\text{berat ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{0,0287 \text{ g}}{0,987 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 2,907 \% \end{aligned}$$

### L.4.3 Uji Toksisitas Mikroalga *Chlorella sp.*

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{\text{kematian}}{\text{jumlah larva uji (10)}} \times 100\%$$

$$\text{Mortalitas} = \% \text{ mortalitas} \times \text{jumlah larva keseluruhan (50)}$$

### L.4.3.1 Hasil Uji Toksisitas Fraksi Etil Asetat

Konsentrasi	Jumlah larva udang yang mati						%mortalitas	mortalitas
	I	II	III	IV	V	modus		
Kontrol pelarut	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol DMSO	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1	0	1	1	1	1	10	5
25	2	1	2	2	1	2	20	10
50	1	2	2	2	2	2	20	10
75	3	4	3	3	3	3	30	15
100	5	4	5	3	5	5	50	25

ETIL ASETAT

### Probit Analysis: mortalitas; jumlah hewan uji versus konsentrasi

Distribution: Normal

#### Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	65
	Non-event	185
jumlah hewan uji	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood

#### Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1.34404	0.183178	-7.34	0.000
konsentrasi	0.0124784	0.0027526	4.53	0.000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -132.488

#### Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	2.03499	3	0.565
Deviance	1.98659	3	0.575

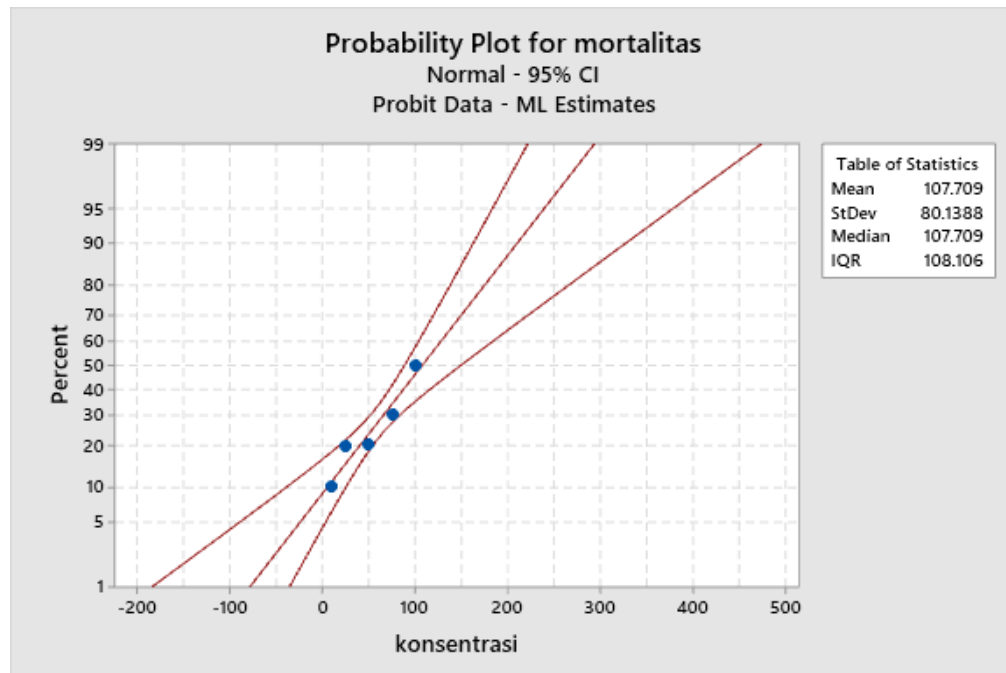
#### Tolerance Distribution

#### Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI Lower	95.0% Normal CI Upper
Mean	107.709	13.0148	82.2009	133.218
StDev	80.1388	17.6775	52.0091	123.483

#### Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard	95.0% Fiducial CI	
		Error	Lower	Upper
1	-78.7212	31.0371	-184.660	-35.7606
2	-56.8755	26.3690	-146.474	-20.2108
3	-43.0151	23.4388	-122.310	-10.2817
4	-32.5884	21.2582	-104.179	-2.76481
5	-24.1071	19.5047	-89.4724	3.39051
6	-16.8882	18.0308	-76.9925	8.66750
7	-10.5587	16.7563	-66.0866	13.3309
8	-4.89129	15.6329	-56.3581	17.5429
9	0.262955	14.6289	-47.5476	21.4107
10	5.00745	13.7232	-39.4760	25.0095
20	40.2629	8.13150	17.9749	54.2792
30	65.6846	7.28417	51.4681	83.3177
40	87.4065	9.57738	72.2387	115.978
50	107.709	13.0148	88.5906	149.567
60	128.012	16.9457	103.876	184.222
70	149.734	21.3911	119.734	221.795
80	175.156	26.7459	137.984	266.077
90	210.411	34.3060	163.026	327.755
91	215.156	35.3306	166.382	336.070
92	220.310	36.4451	170.025	345.105
93	225.977	37.6721	174.027	355.044
94	232.307	39.0442	178.493	366.146
95	239.526	40.6111	183.584	378.813
96	248.007	42.4544	189.559	393.700
97	258.434	44.7237	196.899	412.007
98	272.294	47.7448	206.647	436.353
99	294.140	52.5150	221.994	474.741





### L.4.3.2 Hasil Uji Toksisitas Fraksi Dietil Eter

Konsentrasi	Jumlah larva udang yang mati						%mortalitas	mortalitas
	I	II	III	IV	V	modus		
Kontrol pelarut	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol DMSO	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	1	1	1	1	1	10	5
25	1	2	2	1	1	1	10	5
50	2	2	3	2	1	2	20	10
75	2	2	1	2	3	2	20	10
100	3	2	3	3	2	3	30	15

DIETIL ETER

### Probit Analysis: mortalitas; jumlah hewan uji versus konsentrasi

Distribution: Normal

#### Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	45
	Non-event	205
jumlah hewan uji	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood

#### Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1.39226	0.194206	-7.17	0.000
konsentrasi	0.0084954	0.0029104	2.92	0.004
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -113.476

#### Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	0.774644	3	0.856
Deviance	0.768839	3	0.857

#### Tolerance Distribution

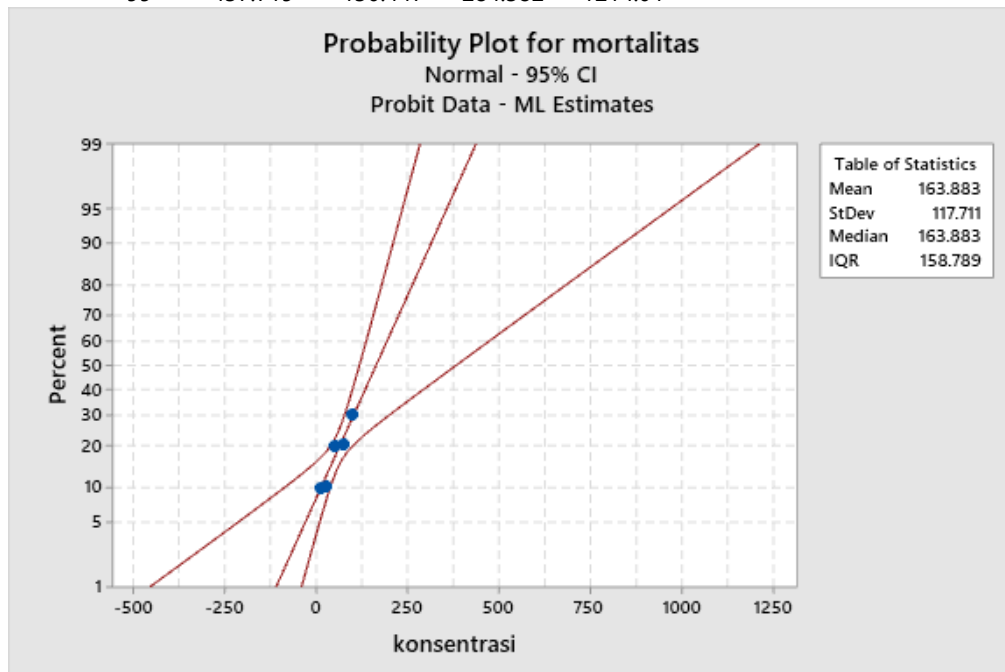
#### Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	163.883	37.8280	89.7419	238.025
StDev	117.711	40.3258	60.1461	230.369

#### Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper

1	-109.952	58.7097	-455.952	-40.2659
2	-77.8646	47.9604	-358.771	-20.5838
3	-57.5059	41.2070	-297.248	-7.96063
4	-42.1909	36.1821	-251.081	1.64932
5	-29.7333	32.1469	-213.637	9.57570
6	-19.1299	28.7653	-181.879	16.4351
7	-9.83280	25.8564	-154.156	22.5716
8	-1.50837	23.3131	-129.470	28.2031
9	6.06237	21.0688	-107.178	33.4834
10	13.0312	19.0814	-86.8461	38.5322
20	64.8157	11.3240	39.7218	100.562
30	102.156	18.6745	77.0299	199.247
40	134.062	28.2214	99.0928	293.384
50	163.883	37.8280	118.181	382.906
60	193.705	47.6887	136.737	472.960
70	225.611	58.3743	156.313	569.585
80	262.951	70.9746	179.033	682.857
90	314.736	88.5402	210.360	840.128
91	321.704	90.9093	214.565	861.303
92	329.275	93.4840	219.132	884.309
93	337.600	96.3162	224.151	909.608
94	346.897	99.4807	229.753	937.865
95	357.500	103.091	236.140	970.095
96	369.958	107.335	243.640	1007.97
97	385.273	112.555	252.856	1054.53
98	405.631	119.498	265.099	1116.43
99	437.719	130.447	284.382	1214.01



### L.4.3.3 Uji Toksisitas Fraksi n-Heksana

Konsentrasi	Jumlah larva yang mati						%mortalitas	mortalitas
	I	II	III	IV	V	modus		
Kontrol pelarut	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol DMSO	0	0	0	0	0	0	0	0
10	1	1	1	2	1	1	10	5
25	2	2	1	3	2	2	20	10
50	3	3	2	2	3	3	30	15
75	2	3	3	4	3	3	30	15
100	4	3	4	3	4	4	40	20

N HEKSANA

### Probit Analysis: mortalitas; jumlah hewan uji versus konsentrasi

Distribution: Normal

#### Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	65
	Non-event	185
jumlah hewan uji	Total	250

Estimation Method: Maximum Likelihood

#### Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1.16662	0.177234	-6.58	0.000
konsentrasi	0.0094678	0.0027086	3.50	0.000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -136.989

#### Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	1.92882	3	0.587
Deviance	1.95572	3	0.582

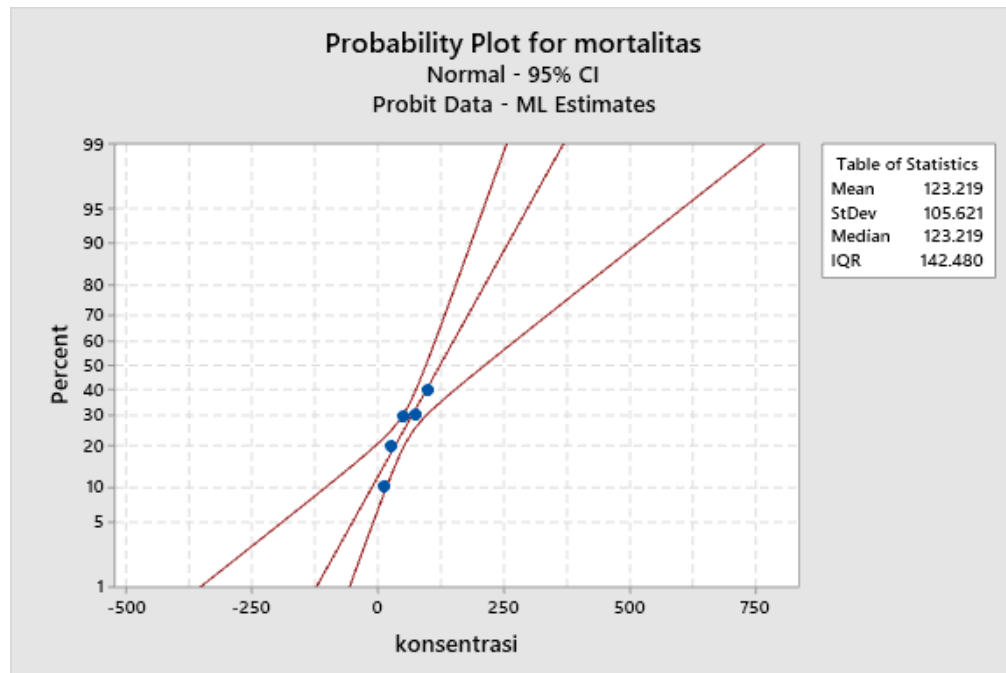
#### Tolerance Distribution

#### Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI Lower	95.0% Normal CI Upper
Mean	123.219	21.0798	81.9039	164.535
StDev	105.621	30.2161	60.2888	185.039

#### Table of Percentiles

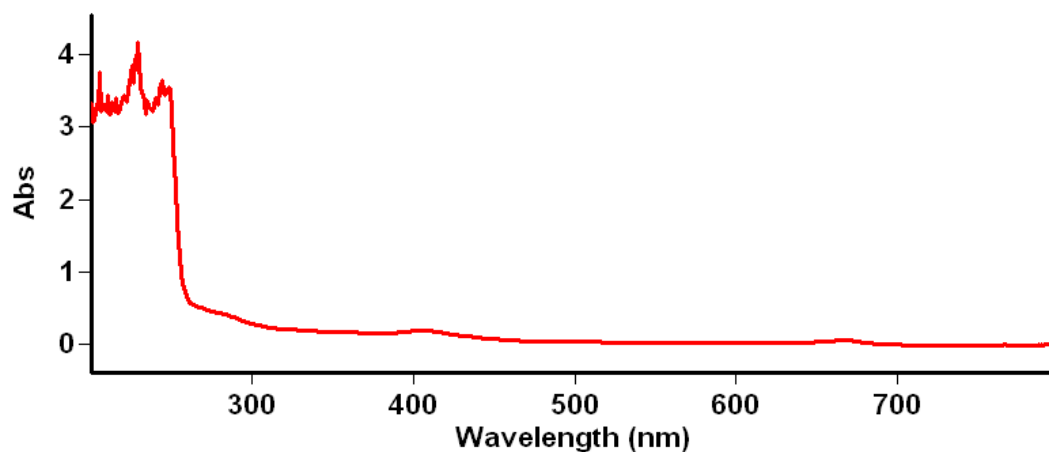
Percent	Percentile	Standard	95.0% Fiducial CI	
		Error	Lower	Upper
1	-122.491	52.1564	-353.145	-56.4105
2	-93.6993	44.0732	-287.907	-37.6584
3	-75.4316	38.9781	-246.582	-25.6941
4	-61.6895	35.1705	-215.546	-16.6428
5	-50.5114	32.0954	-190.345	-9.23567
6	-40.9971	29.4985	-168.937	-2.88911
7	-32.6549	27.2417	-150.208	2.71685
8	-25.1854	25.2412	-133.480	7.77827
9	-18.3923	23.4428	-118.310	12.4251
10	-12.1391	21.8093	-104.393	16.7491
20	34.3267	11.2631	-4.65684	52.5595
30	67.8318	9.72867	49.2581	96.3834
40	96.4607	14.5845	75.5901	153.565
50	123.219	21.0798	95.1850	212.029
60	149.978	28.1639	113.491	271.782
70	178.607	36.0030	132.537	336.251
80	212.112	45.3352	154.507	412.019
90	258.578	58.4131	184.704	517.369
91	264.831	60.1802	188.753	531.561
92	271.624	62.1014	193.150	546.981
93	279.094	64.2154	197.981	563.939
94	287.436	66.5781	203.373	582.882
95	296.950	69.2748	209.518	604.491
96	308.128	72.4455	216.734	629.883
97	321.870	76.3465	225.599	661.106
98	340.138	81.5368	237.374	702.620
99	368.930	89.7257	255.916	768.068



**Lampiran 5 Data Hasil Uv-Vis**  
**L.5.1 Hasil Spektrofotometer Fraksi Etil Asetat**

## **Lamdha Maks Fraksi EA Chlorella**

Tanggal Analisa : 31 Oktober 2022



### Scan Analysis Report

Report Time : Mon 31 Oct 10:33:11 AM 2022

Method:

Batch: D:\Mahasiswa On Going\Zaki Imam\Lamdha Maks Fraksi EA Chlorella (31-10-2022).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

#### Sample Name: Fraksi EA Chlorella

Collection Time 10/31/2022 10:33:38 AM

Peak Table

Peak Style

Peaks

Peak Threshold

0.0100

Range

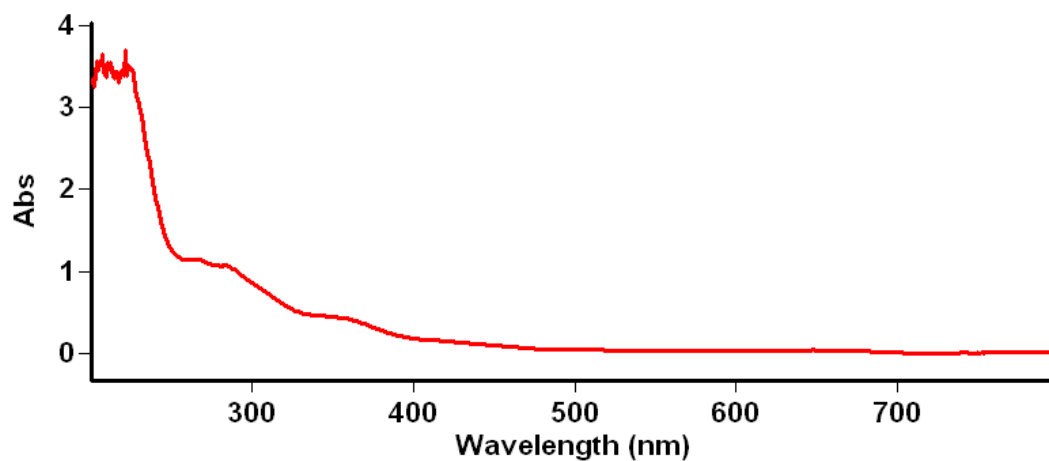
799.9nm to 200.0nm

Wavelength (nm)	Abs
667.0	0.062
406.0	0.195
248.0	3.553
243.9	3.631
240.0	3.400
235.0	3.363
229.1	4.166
227.0	3.933
225.0	3.854
220.0	3.427
214.9	3.400
213.1	3.334
209.9	3.429
208.0	3.297
205.1	3.755
203.0	3.326

### L.5.1 Hasil Spektrofotometer Fraksi Dietil Eter

## Lamdha Maks Fraksi Dietil Eter Chlorella

Tanggal Analisa : 31 Oktober 2022



### Scan Analysis Report

Report Time : Mon 31 Oct 10:52:06 AM 2022

Method:

Batch: D:\Mahasiswa On Going\Zaki Imam\Lamdha Maks Fraksi Dietil Eter Chlorella (31-10-2022).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

#### Sample Name: Fraksi Dietil Eter Chlorella

Collection Time 10/31/2022 10:52:35 AM

Peak Table

Peak Style Peaks

Peak Threshold 0.0100

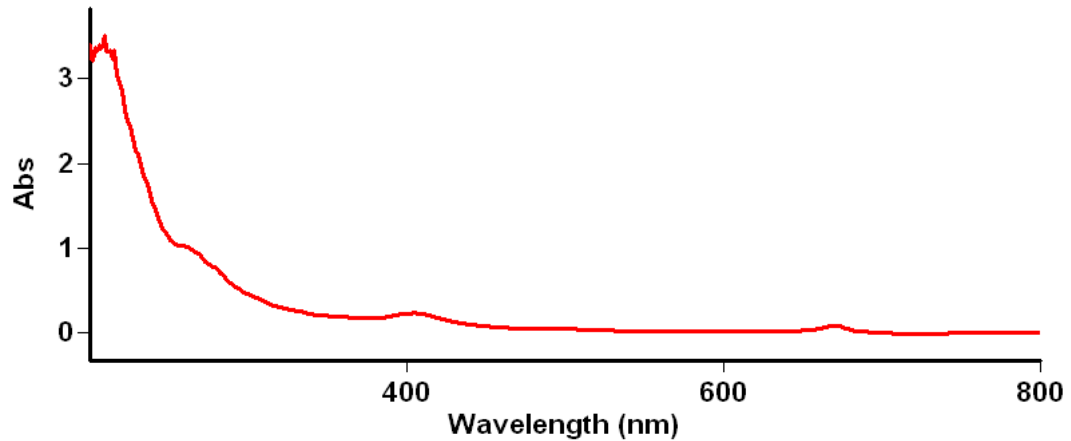
Range 799.9nm to 200.0nm

Wavelength (nm)	Abs
664.9	0.039
222.9	3.501
221.1	3.704
219.0	3.468
214.9	3.445
212.0	3.549
209.9	3.555
206.9	3.651
205.1	3.556
203.0	3.575
201.0	3.357

### L.5.1 Hasil Spektrofotometer Fraksi n-Heksana

## Lamdha Maks Fraksi n-Heksana Chlorella

Tanggal Analisa : 25 Oktober 2022



### Scan Analysis Report

Report Time : Tue 25 Oct 02:58:07 PM 2022

Method:

Batch: D:\Mahasiswa On Going\Zaki Imam\Lamdha Maks Fraksi n-Heksana Chlorella (25-10-2022).DSW

Software version: 3.00(339)

Operator: Rika

#### Sample Name: Fraksi n-heksana Chlorella

Collection Time 10/25/2022 2:58:18 PM

Peak Table

Peak Style Peaks

Peak Threshold 0.0100

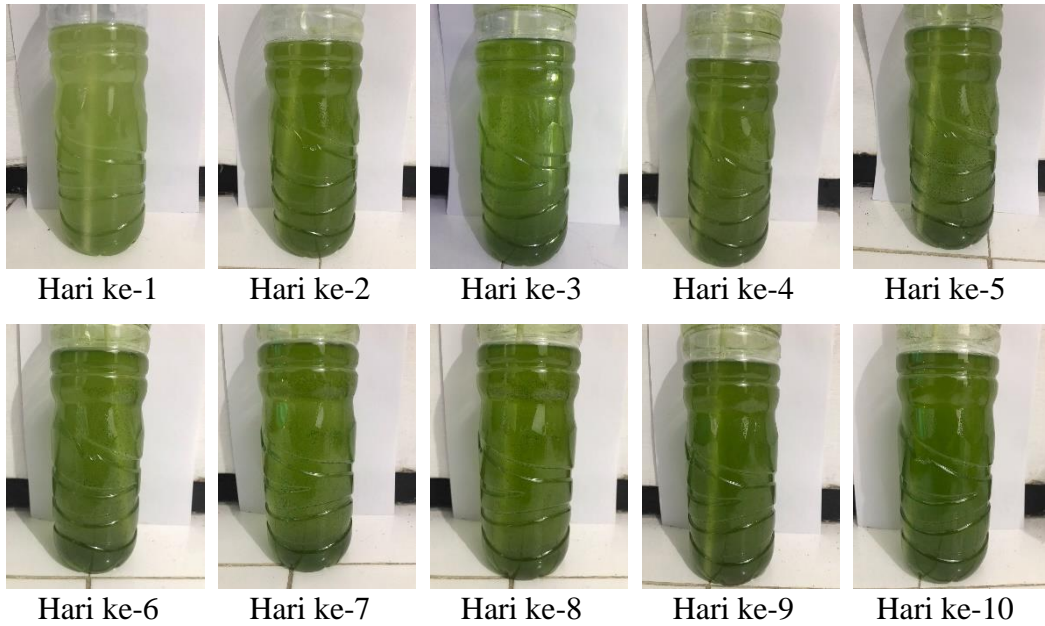
Range 800.1nm to 200.1nm

Wavelength (nm)	Abs
671.0	0.087
406.1	0.235
215.0	3.329
212.9	3.330
209.0	3.509
206.0	3.392
203.0	3.368

**Lampiran 6 Dokumentasi Penelitian**  
**L.6.1 Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.***



Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*



**L.6.2 Pemanenan Biomassa**



Biomassa Cair



Biomassa  
Sebelum  
disentrifugasi



Biomassa setelah  
disentrifugasi



Biomassa pekat



### L.6.3 Pengeringan biomassa



Pengeringan biomassa



Biomassa kering

### L.6.4 Ekstraksi sonikasi mikroalga *Chlorella* sp



Ekstraksi sonikasi selama 42 menit menggunakan pelarut metanol



Penyaringan sampel dengan buchner



Ekstrak metanol

### L.6.5 Partisi ekstrak metanol

#### L.6.5.1 Partisi dengan etil asetat

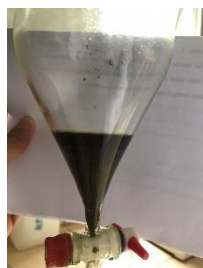


Lapisan atas : fraksi etil asetat  
Lapisan bawah : fasa air



Fraksi etil asetat

#### L.6.5.2 Partisi dengan dietil eter

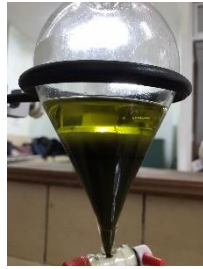


Lapisan atas : fraksi dietil eter  
Lapisan bawah : fasa air



Fraksi dietil eter

### L.6.5.3 Partisi dengan N-Heksana



Lapisan atas : fraksi N-heksana  
Lapisan bawah : fasa air



Fraksi N-Heksana

### L.6.6 Uji toksisitas



Penetasan larva udang



Pengamatan kematian larva udang

### L.6.7 Uji fitokimia

#### L.6.7.1 Ekstrak N-Heksana



Flavonoid



Tanin



Triterpenoid  
dan steroid



Saponin

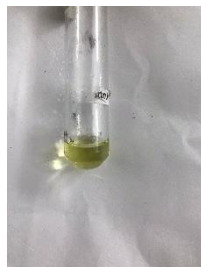


Alkaloid

#### L.6.7.2 Ekstrak dietil eter



Flavonoid



Tanin



Triterpenoid  
dan steroid



Saponin



Alkaloid

**L.6.7.3 Ekstrak etil asetat**

Flavonoid



Tanin

Triterpenoid  
dan steroid

Saponin



Alkaloid