

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN IDENTIFIKASI SENYAWA
STEROID ISOLAT HASIL KLTP FRAKSI PETROLEUM ETHER
MIKROALGA *Chlorella sp.* MENGGUNAKAN UV-Vis**

SKRIPSI

Oleh:

**LAILI MAGHFIROH RAHMAWATI
NIM. 12630036**



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

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN IDENTIFIKASI SENYAWA
STEROID ISOLAT HASIL KLTP FRAKSI PETROLEUM ETHER
MIKROALGA *Chlorella sp.* MENGGUNAKAN UV-Vis**

SKRIPSI

Oleh:
LAILI MAGHFIROH RAHMAWATI
NIM. 12630036

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

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

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN IDENTIFIKASI SENYAWA
STEROID ISOLAT HASIL KLTP FRAKSI PETROLEUM ETHER
MIKROALGA *Chlorella* sp. MENGGUNAKAN UV-Vis**

SKRIPSI

Oleh:
LAILI MAGHFIROH RAHMAWATI
NIM. 12630036

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 13 September 2016

Pembimbing I


A. Ghannaim Fasya, M.Si
NIP. 19820616 200604 1 002

Pembimbing II


Ach. Nasichuddin, M.A
NIP. 19730705 200003 1 002

Mengetahui
Ketua Jurusan Kimia


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

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN IDENTIFIKASI SENYAWA
STEROID ISOLAT HASIL KLTP FRAKSI PETROLEUM ETER
MIKROALGA *Chlorella sp.* MENGGUNAKAN UV-Vis**

SKRIPSI

Oleh:
LAILI MAGHFIROH RAHMAWATI
NIM. 12630036

Telah dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 13 September 2016

Penguji Utama : Suci Amalia, M.Sc
NIP. 19821104 200901 2 007

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

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

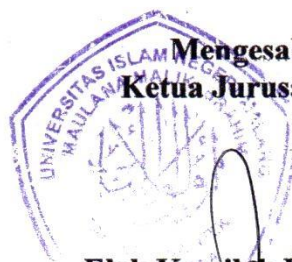
Anggota Penguji : Ach. Nasichuddin, M.A
NIP. 19730705 200003 1 002

(.....)

(.....)

(.....)

(.....)



Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia

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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Laili Maghfiroh Rahmawati

NIM : 12630036

Jurusan : Kimia

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Senyawa Steroid Isolat Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella* sp. Menggunakan UV-Vis.

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

Malang, 14 September 2016

Suat pernyataan,

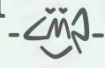


Laili Maghfiroh Rahmawati

NIM. 12630036

HALAMAN PERSEMBAHAN

I dedicate this thesis to my parents
who given support and prayers during
all of the time.

A big thanks to all my lecturer, my
family and my friends (especially
microalgae team) who helped in t' 
process of making this thesis.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur penyusun panjatkan kehadirat Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Yang Maha Penyayang, dimana dengan limpahan rahmat, taufik dan hidayah-Nya penyusun dapat menyusun laporan hasil penelitian ini dengan semaksimal mungkin, walaupun masih kurang dari kesempurnaan. Semoga dari apa yang penyusun upayakan ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Selain itu, sholawat serta salam akan selalu tercurah limpahkan kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW, yang merupakan pencetus kehidupan keadilan, revolusionis dunia, penuntun umatnya agar senantiasa berlandaskan Alqur'an dan Alhadits.

Penyusun juga bersyukur atas terselesaikannya laporan hasil penelitian dengan judul **“Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Senyawa Steroid Isolat Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella* sp. Menggunakan UV-Vis”**. Penyusunan laporan hasil penelitian ini dimaksudkan sebagai salah satu syarat untuk memenuhi kewajiban dalam melakukan penyusunan tugas akhir berupa skripsi.

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

1. Orang tua tercinta yang telah banyak memberikan perhatian, nasihat, doa, dan dukungan baik moril maupun materil yang tak mungkin terbalaskan.
2. Bapak Prof. Dr. Mudjia Raharjo, M.Si, selaku rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si, selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si, selaku dosen pembimbing pada penelitian ini yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat kepada penyusun dalam menyelesaikan laporan hasil penelitian ini.

5. Bapak Ach. Nashichuddin, M.A, selaku dosen pembimbing agama pada penelitian ini yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat kepada penyusun dalam menyelesaikan laporan hasil penelitian ini sehingga terdapat integrasi antara sains dan islam yang dilandaskan pada Alqur'an dan hadits.
6. Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc, selaku konsultan pada penelitian ini yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat kepada penyusun dalam menyelesaikan laporan hasil penelitian ini.
7. Seluruh dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah mengalirkan ilmu, pengetahuan, pengalaman, wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penyusun.
8. Seluruh staf Laboratorium dan staf administrasi Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang atau bantuan dan arahnya selama proses penelitian.
9. Teman-teman seperjuangan “Grup Mikroalga” Mila, Anike, Maya, Dany dan Singgih yang selalu membantu, menyemangati dan memberi motivasi dalam menjalankan aktivitas suka duka dan penuh tanggung jawab dalam melakukan penelitian hingga menyusun laporan hasil penelitian ini. Begitu juga dengan “Grup Makroalga” Rumzil, Ariska, Donardi, Wati dan Lely yang selalu membantu dan berbagi pengalaman dan pengetahuannya.
10. Teman-teman Jurusan Kimia angkatan 2012 khususnya dan semua mahasiswa Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberi motivasi, informasi, dan masukannya kepada penyusun dalam menyelesaikan laporan hasil penelitian ini.
11. Semua rekan-rekan dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala bantuan dan motivasinya kepada penyusun.

Teriring do'a dan harapan semoga apa yang telah mereka berikan kepada penyusun, mendapatkan balasan yang lebih baik dari Allah SWT. Aamiin.

Dengan menyadari atas tebatasnya ilmu yang penyusun miliki, laporan hasil penelitian ini tentu jauh dari sempurna. Untuk itu penyusun dengan senang hati mengharapkan kritik dan saran untuk perbaikan dalam penyusunan selanjutnya.

Terlepas dari segala kekurangan, semoga laporan hasil penelitian ini dapat memberikan informasi dan kontribusi positif serta bermanfaat bagi kita semua. Amin.

Malang, September 2016

Penyusun



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
ABSTRAK	xiii
 BAB I PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.4 Batasan Masalah.....	6
1.5 Manfaat Penelitian.....	7
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	 8
2.1 Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	8
2.2 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp</i> dalam Medium Ekstrak Tauge	10
2.3 Manfaat <i>Chlorella sp.</i>	13
2.4 Antioksidan.....	14
2.5 Uji Aktivitas Antioksidan.....	16
2.6 Steroid.....	21
2.7 Ekstraksi Steroid dengan Metode Maserasi... ..	23
2.8 Hidrolisis dan Partisi	25
2.9 Pemisahan Ekstrak Steroid dengan KLT.....	26
2.10 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometri UV-Vis.	27
2.11 Manfaat Tumbuhan dalam Al-quran	30
 BAB III METODE PENELITIAN	 35
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	35
3.2 Alat dan Bahan	35
3.2.1 Alat.....	35
3.2.2 Bahan	35
3.3 Rancangan Penelitian	36
3.4 Tahapan Penelitian	37
3.5 Cara Kerja.....	37
3.5.1 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp</i>	37
3.5.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%.....	37
3.5.1.2 Kultivasi <i>Chlorella sp.</i>	38
3.5.1.3 Pemanenan Biomassa <i>Chlorella sp.</i>	38

3.5.2 Analisis Kadar Air Biomassa <i>Chlorella sp.</i>	38
3.5.3 Ekstraksi Senyawa Steroid Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	39
3.5.4 Hidrolisis Ekstrak Pekat Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	39
3.5.5 Partisi Ekstrak Pekat Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	40
3.5.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT-Preparatif	40
3.5.7 Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH	40
3.5.7.1 Penentuan Panjang gelombang Maksimum DPPH	40
3.5.7.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada sampel ...	41
3.5.8 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	42
3.6 Analisis Data	42
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	43
4.1 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	43
4.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)	43
4.1.2 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam Medium Ekstrak Tauge (MET)	44
4.1.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	44
4.2 Analisis Kadar Air Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	45
4.3 Ekstraksi Senyawa Steroid Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	46
4.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol	47
4.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT-Preparatif	49
4.6 Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH	52
4.6.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH	52
4.6.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Isolat Steroid	53
4.7 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis	55
4.8 Pemanfaatan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam Prespektif Islam ...	57
BAB V PENUTUP	60
5.1 Kesimpulan	60
5.2 Saran	60
DAFTAR PUSTAKA	61
LAMPIRAN	68

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Interpretasi spektra IR steroid hasil kromatografi kolom.....	22
Tabel 2.2	Fungsi dan sumber fitosterol pada alga.....	23
Tabel 2.3	Sitasi warna senyawa pada lampu UV	26
Tabel 4.1	Hasil KLT preparatif senyawa steroid fraksi petroleum eter mikroalga <i>Chlorella sp.</i> pada eluen n-heksana:etil asetat (8:2) dideteksi dibawah lampu UV λ 366 nm.....	51



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Bentuk Umum <i>Chlorella sp.</i>	9
Gambar 2.2	Kurva Pertumbuhan <i>Chlorella sp.</i>	12
Gambar 2.3	Reaksi DPPH dengan Antioksidan	17
Gambar 2.4	Reaksi asam askorbat dengan DPPH	20
Gambar 2.5	Produk akhir reaksi asam askorbat dengan DPPH.....	20
Gambar 2.6	Reaksi BHT dengan DPPH	21
Gambar 2.7	Hasil identifikasi steroid kolom basah dengan spektrofotomer IR	22
Gambar 2.8	Spektrum UV hasil reaksi dengan Lieberman-Burchard (400-900 nm): larutan standart (β -sitosterol), obat alami dan ekstrak akar <i>Acanthospermum hispidum</i>	28
Gambar 2.9	Spektrum UV senyawa hasil isolasi steroid dari daun rimbang ...	29
Gambar 2.10	Spektrum UV-Vis fraksi petroleum eter	29
Gambar 2.11	Spektrum UV-Vis isolat tumbuhan paku <i>Chriistella arida</i>	30
Gambar 4.1	Dugaan reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida	47
Gambar 4.2	Reaksi HCl dan Natrium bikarbonat.....	48
Gambar 4.3	Hasil KLT Preparatif fraksi petroleum eter <i>Chlorella sp.</i> dengan eluen n-heksana dan etil asetat (4:1)	50
Gambar 4.4	λ_{maks} DPPH 0,2 mM	52
Gambar 4.5	Nilai EC_{50} aktivitas antioksidan dan pembanding	54
Gambar 4.6	Hasil spektra UV-Vis isolat senyawa steroid fraksi PE mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	55
Gambar 4.7	Dugaan senyawa steroid poriferasta-3,5-dien-7-on	57

ABSTRAK

Rahmawati, L.M. 2016. **Uji Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Senyawa Steroid Isolat Hasil KLTP Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan UV-Vis.**

Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Ach. Nasichuddin, M.A; Konsultan: Ahmad Hanapi, M.Sc

Kata Kunci: Steroid, *Chlorella sp.*, Fraksi Petroleum Eter, Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Aktivitas Antioksidan

Chlorella sp. merupakan salah satu jenis mikroalga yang bermanfaat dan memiliki senyawa aktif yang dapat berpotensi sebagai antioksidan, sebagaimana firman Allah Swt. dalam Alquran surat Luqman ayat 10 bahwa Allah menciptakan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang bermanfaat. Senyawa aktif yang terkandung dalam *Chlorella sp.* yaitu senyawa steroid. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan senyawa steroid fraksi petroleum eter hasil KLTP serta identifikasi senyawa steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis dari mikroalga *Chlorella sp.*.

Pengembangbiakan mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan medium ekstrak tauge (MET) 4 % dan pemanenan dilakukan pada hari ke-10. Biomassa yang diperoleh dimaserasi menggunakan pelarut metanol dan dihidrolisis dengan HCl 2 N. Kemudian dilakukan partisi menggunakan pelarut petroleum eter. Fraksi PE mikroalga *Chlorella sp.* selanjutnya diidentifikasi senyawa steroidnya menggunakan KLT preparatif untuk memperoleh isolat steroid yang lebih murni. Aktivitas antioksidan isolat KLTP dilakukan dengan metode DPPH secara spektrofotometer UV-Vis. Identifikasi senyawa steroid dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa randemen ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* sebesar 21,8926 %, sedangkan randemen ekstrak hasil hidrolisis dan partisi sebesar 50,6299 %. Fraksi PE hasil hidrolisis diidentifikasi dengan KLT preparatif dan menghasilkan 15 noda. Noda ke-4 pada Rf 0,7777 berwarna hijau kebiruan yang diduga senyawa steroid. Isolat hasil KLTP memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai EC₅₀ sebesar 73,82 ppm. Identifikasi senyawa steroid dengan spektrofotometer UV-Vis yang dihasilkan menunjukkan bahwa isolat yang diduga merupakan senyawa steroid memiliki panjang gelombang maksimum sebesar 276 nm.

ABSTRACT

Rahmawati, L.M. 2016. **Antioxidant Activity Test and Identification of Steroids Compounds from PTLC Isolates of Microalgae *Chlorella sp.* Petroleum Eter Fraction Using UV-Vis.**

Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Supervisor II: Ach. Nasichuddin, M.A; Consultor: Ahmad Hanapi, M.Sc

Key words: steroids, chlorella sp., petroleum ether fraction, thin layer chromatography (TLC), antioxidant activity

Chlorella sp. is one of microalgae types that is beneficial and having active compounds that is potentially as an antioxidant, as God said in the Quran surah Luqman ayah 10 that God had created various kinds of herbs that are useful. The active compounds in *Chlorella sp.* is known as steroid compounds. This research is conducted to determine the antioxidant activity of TLC result steroid compounds with Petroleum Ether fraction and to identify steroid compounds using UV-Vis spectrophotometer from microalgae *Chlorella sp.*

The breeding of microalgae *Chlorella sp.* uses bean sprouts extract medium (MET) 4 % and it is harvested on day 10. The biomass is macerated using methanol and hydrolyzed with 2 N HCl. Then the partition is done using petroleum ether. The extraction of microalgae *Chlorella sp.* followed by identification of steroid compounds with preparative TLC to obtain purer steroid isolates. The antioxidant activity of TLC isolates uses DPPH method with UV-Vis spectrophotometer. Identification of steroid compounds is done by UV-Vis spectrophotometer.

The results showed that the yield of the methanol extract of microalgae *Chlorella sp.* is 21.8926 % while the yield of hydrolysis and partition extract 50.6299 %. Hydrolysis extract is identified by preparative TLC and show 15 spots. The 4th spot observed at 0.7777 Rf with bluish green color and it is alleged as steroid compounds. Isolates of TLC result has antioxidant activity with EC₅₀ 73.82 ppm. Identification of steroid compounds with UV-Vis spectrophotometer shows that isolate is alleged as steroid compound with maximum wavelength of 276 nm.

ملخص البحث

رحموت, ل.م. ٢٠١٦. آخر اختبار مضادات الأكسدة وتحديد المركبات المنشطة عزل نتاج طبقة رقيقة اللوني (KLTP) جزء من البترول الأثير الطحالب شلوريلا ليرة سورية. (*Chlorella sp.*) باستخدام أشعة فوق البنفسجية فيس -UV (Vis). المشرف الأولى : أحمد غنائم فشا الماجستير, المشرف الثاني : أحمد ناصح الدين الماجستير, والماسنشار : أحمد حنفى الماجستير

الكلمات الرئيسية : الطحالب (*Chlorella sp.*), مضادات الأكسدة (Antioxidant), Petroleum, Eter, (إعدادي رقيقة اللوني طبقة) DPPH, KLTP.

شلوريلا ليرة سورية. هو نوع واحد من الطحالب التي تعود بالفائدة ويمكن أن تكون محتملة كمضاد للسموم, وكلمة الله. في خطاب القرآن الكريم الآية لقمان ١٠ أن الله خلق أنواعا مختلفة من الأعشاب التي هي مفيدة. المركبات النشطة الواردة في طحلب. أي مركبات الستيريود. وقد أجريت هذه الدراسة لتحديد النشاط المضاد للأكسدة لمركبات الستيريود الأثير للبترول كسور النتاج KLT وتحديد مركبات الستير ويد باستخدام مطياف أشعة فوق البنفسجية قيس من س الطحالب شلوريلا. تربة الطحالب شلوريلا. استخدام بر اعم المتوسطة استخراج ٤%, وكان الحصاد في يوم ١٠. ومتأ كلة الكتلة الحيوية باستخدام الميثانول ويتحلل مع ٢N حمض الهيدر وكلو ريك. ثم نفذ القسم باستخدام الأثير البترول. مستخرج من الطحالب من شلوريلا. تليها تحديد مركبات الستيريود عن طريق KLT للحصول على أنقى يعزل المنشطات. نشاط مضادات الأكسدة يعزل KLT مع DPPH التي يقوم بها معمل أشعة فوق البنفسجية فيس. وأظهرت النتائج أن مستخلص الميثانول ليرة سورية الطحالب شلوريلا. بلغت ٨٩٢٦%, ٢١. في حين أن مستخلص المائي وتقسيم ٥٠, ٦٢٩٩%, استخراج التحلل التي حدد ها KLT وتنتج ١٥ البقع. نودا ٤ في ٠, ٧٧٧٧, الترددات اللاسلكية الأخضر زعم مركبات الستيريود. يعزل يؤدي KLT فيه نشاط مضاد للأكسدة مع القيم EC₅₀ من ٧٣, ٨٢ جزء من المليون. تحديد مركبات الستيريود مع معمل إنتاج البرامج أشعة فوق البنفسجية فيس التي عزل مركب الستيريود يشبه التي لديها الطول الموجي الأقصمن ٢٧٦ نانومتر.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keanekaragaman hayati di daerah tropis seperti Indonesia sangat melimpah dari yang berukuran mikro hingga makro. Tumbuhan merupakan salah satu makhluk hidup ciptaan Allah SWT yang memiliki banyak sekali manfaat. Tumbuh-tumbuhan memiliki beberapa zat yang dapat dimanfaatkan oleh makhluk hidup lainnya, misalnya mulai beberapa vitamin-vitamin, minyak, komponen bioaktif dan masih banyak lainnya. Dalam firman-Nya Allah SWT menjelaskan QS al An'am ayat 99 :

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 مِنْ أَعْنَابٍ
وَالزَّيْتُونِ وَالرَّمَّانِ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ ۚ انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ۚ إِنَّ
فِي ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ [٩٩]

“Dan Dialah yang menurunkan air hujan 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 korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman” (QS al An'am: 99).

Berdasarkan surat al An'am ayat 99 Allah SWT telah menciptakan bumi beserta isinya, diantaranya adalah tumbuh-tumbuhan yang baik dan bermanfaat. Tumbuhan merupakan salah satu makhluk hidup ciptaan Allah SWT yang memiliki banyak sekali manfaat. Berdasarkan tafsir ash-Shiddieqy (2000), Allah telah menurunkan air dari awan, lalu dengan air hujan itulah dijadikan segala

macam tumbuhan-tumbuhan, akan tetapi bentuk dan rasa buah-buahan atau tanaman berbeda-beda. Allah mengeluarkan dari bibit itu batang yang hijau atau daun yang hijau. Allah mengeluarkan dari tumbuh-tumbuhan yang hijau itu kebun-kebun anggur serta buah zaitun dan buah delima. Ada diantaranya yang manis, ada yang masam dan ada yang pahit. Tumbuh-tumbuhan memiliki beberapa zat yang dapat dimanfaatkan oleh makhluk hidup lainnya, misalnya mengandung beberapa vitamin-vitamin, minyak, komponen bioaktif dan masih banyak lainnya tak terkecuali mikroalga. Manusia dianjurkan untuk memikirkan, mempelajari dan mengkaji apa-apa yang diciptakan-Nya dan salah satu bentuknya yaitu dengan melakukan penelitian untuk mencari obat dari bahan-bahan alam, seperti mikroalga.

Mikroalga adalah mikroorganisme fotosintetik dengan morfologi sel yang bervariasi, baik uniseluler maupun multiseluler (membentuk koloni kecil) (Becker, 1994). Salah satu jenis mikroalga tersebut adalah *Chlorella sp.* *Chlorella sp.* merupakan tumbuhan alga bersel tunggal dari golongan alga hijau (*chloreophyta*) yang telah dimanfaatkan secara komersial karena nilai gizinya yang tinggi (Srihati dan Carolina, 1995). *Chlorella sp.* memiliki beberapa keunggulan diantaranya berkembang biak dengan cepat serta mudah dalam membudidayakannya (Sidabutar, E.A. 1999). Dibandingkan dengan golongan makroalga dan tumbuhan tingkat tinggi pertumbuhan *Chlorella sp.* tidak tergantung dengan musim, tidak memerlukan tempat yang luas dan tidak memerlukan waktu yang lama untuk memanennya (Borowitzka, M. dan Lesley, J., 1988).

Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dapat dilakukan dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) karena MET merupakan salah satu sumber media alami yang dapat digunakan untuk media pertumbuhan mikroalga. MET mengandung nutrient organik seperti karbohidrat, protein, vitamin, dan lemak yang dibutuhkan sebagai sumber energi bagi pertumbuhan mikroalga. MET juga memberikan pertumbuhan yang pesat terhadap mikroalga dibandingkan pada MAL (Medium Air Laut) dan MG (Medium Guillard) (Wulandari, A., dkk., 2010). *Chlorella sp.* dikultur dalam MET selama 10 hari dengan foto periodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap (Bariyyah, S., dkk., 2013). Pemanenan *Chlorella sp.* dilakukan pada fase stasioner yaitu pada hari ke-10. Hal ini dikarenakan pada hari tersebut, pertumbuhan *Chlorella sp.* mencapai kepadatan sel tertinggi yang ditandai dengan kultur yang berwarna hijau tua dengan jumlah sel $4,6 \times 10^6$ sel/mL (Volshak, A., 1990). Menurut hasil penelitian Khamidah, U., dkk (2013), fase stasioner terjadi pada hari ke-8 sampai hari ke-11 ditandai dengan laju pertumbuhan *Chlorella sp.* yang cenderung konstan. fase awal stasioner terjadi pada hari ke-8 dengan kelimpahan sel 4.656.000 sel/mL. Hari ke-10 merupakan fase stasioner dengan kelimpahan sel 4.880.000 sel/mL. Hari ke 11 merupakan sudah memasuki fase akhir stasioner dengan kelimpahan sel 4.704.000 sel/mL.

Penelitian mengenai mikroalga *Chlorella sp.* cukup banyak menarik minat beberapa peneliti mengingat potensinya baik sebagai bahan makanan pelengkap nutrisi, bahan makanan alternatif, komponen bioaktif dan kegunaan lainnya. Beberapa penelitian melaporkan bahwa *Chlorella sp.* merupakan salah satu mikroalga yang memiliki beberapa bioaktivitas sebagai antikanker (Luo, Xuan., *et al.*, 2015), antibakteri (Khamidah, S., dkk., 2013), toksisitas (Amaliyah, S., dkk.,

2013) dan antioksidan (Anggraeni, O., dkk., 2014). Khamidah, S., dkk. (2013) melaporkan bahwa ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* mempunyai aktivitas antibakteri tertinggi pada fase stasioner dengan zona hambat 9,9 mm terhadap bakteri *E.Coli* dan 12,0 mm terhadap *S.aureus*. Anggraeni, O., dkk. (2014) juga melaporkan bahwa hasil ekstraksi senyawa aktif mikroalga *Chlorella sp.* secara maserasi menggunakan metanol yang dilanjutkan dengan reaksi hidrolisis untuk pemutusan ikatan glikosida dan dilakukan proses partisi dengan fraksi petroleum eter, memiliki persen (%) aktivitas antioksidan yang paling tinggi (64,8839 %) dibandingkan dengan ekstrak kasar (2,0957 %). Persen (%) aktivitas antioksidan pada konsentrasi 30 ppm lebih tinggi dibandingkan senyawa pembanding BHT (*Butylated Hydroxytoluene*) tetapi lebih kecil daripada vitamin C karena hasil ekstrak fraksi petroleum eter menunjukkan nilai EC_{50} terkecil (27,26 ppm). Hasil aktivitas tersebut berhubungan dengan senyawa aktif yang terkandung di dalamnya.

Ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* mengandung senyawa aktif golongan steroid karena ekstrak metanol *Chlorella sp.* menunjukkan adanya perubahan warna dari hijau kekuningan menjadi hijau kebiruan setelah penambahan asam sulfat pekat (Khamidah, 2014). Steroid adalah suatu golongan senyawa triterpenoid yang mengandung inti siklopentana perhidrofenantren yaitu terdiri dari tiga cincin sikloheksana dan sebuah cincin siklopentana. Steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan disebut fitosterol, sedangkan yang ditemukan dalam jaringan hewan disebut kolesterol. Beberapa senyawa ini jika terdapat dalam tumbuhan akan dapat berperan menjadi pelindung. Senyawa steroid dapat teridentifikasi dengan menghasilkan warna hijau kebiruan ketika

senyawa tersebut ditetesi asam sulfat pekat melalui dinding tabung reaksi (Harborne, 1987; Robinson, 1995).

Pemisahan senyawa aktif steroid salah satunya dapat dilakukan dengan metode KLT. Menurut Marlina, E. (2007) penggunaan metode KLT dengan fase gerak terbaik n-heksana dan etilasetat (4:1) memberikan hasil positif dalam pemisahan senyawa aktif steroid dengan ditandai timbulnya noda warna ungu hitam ($R_f = 0,06$), ungu merah ($R_f = 0,16$), ungu gelap ($R_f = 0,24$), ungu ($R_f = 0,37 ; 0,34$) (Marlina, 2007). Hidayah, H., dkk. (2015) juga melaporkan hasil KLTA senyawa steroid pada mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan eluen n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 8 : 2 menghasilkan spot lebih banyak yaitu 13 spot sedangkan 7:3 hanya menghasilkan 10 spot. Ke-13 spot tersebut diperoleh 8 spot yang tergolong senyawa steroid setelah disemprot dengan reagen Lieberman-Burchard diantaranya berwarna pink ($R_f 0,06$), Hijau kecoklatan ($R_f 0,11$), Ungu (0,14), pink (0,16), pink (0,25), ungu (0,74), ungu kebiruan (0,80) dan Hijau terang (0,91).

Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari penelitian sebelumnya yang telah melakukan uji aktivitas antibakteri (Khamidah, S., dkk., 2013), toksisitas (Amaliyah, S., dkk., 2013) dan antioksidan (Anggraeni, O., dkk., 2014) dengan dugaan identifikasi senyawa aktif dari golongan steroid. Pada penelitian ini akan ditekankan untuk identifikasi senyawa steroid yang terdapat dalam mikroalga *Chlorella sp.* dengan KLTP (Kromatografi Lapis Tipis Preparatif) untuk pemisahan senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan. Kemudian dilanjutkan dengan identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk

membuktikan adanya senyawa aktif golongan steroid dari spektrum dan panjang gelombang maksimum.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas antioksidan senyawa steroid hasil pemisahan menggunakan KLTP pada fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.*?
2. Bagaimana hasil identifikasi isolat senyawa steroid hasil KLTP menggunakan spektrofotometer UV-Vis?

1.3 Tujuan

1. Untuk mengetahui aktivitas antioksidan senyawa steroid hasil pemisahan menggunakan KLTP pada fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.*
2. Untuk mengetahui hasil identifikasi isolat senyawa steroid hasil KLTP menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

1.4 Batasan Masalah

1. Sampel berupa bibit mikroalga *Chlorella sp.* yang diperoleh dari Laboratorium Biologi UIN Maliki Malang.
2. Sampel yang digunakan adalah hasil kultivasi *Chlorella sp.* dalam MET.
3. Identifikasi senyawa aktif steroid hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan spektrofotometer UV-Vis.
4. Uji aktivitas antioksidan menggunakan DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) dan dinyatakan dalam nilai EC_{50} .

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi tentang senyawa aktif yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* dan meningkatkan ilmu pengetahuan untuk perkembangan penelitian tentang bahan alam dari mikroorganisme fotosintetik baik uniseluler maupun multiseluler sehingga dapat bermanfaat dibidang industri farmasi.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga *Chlorella sp.*

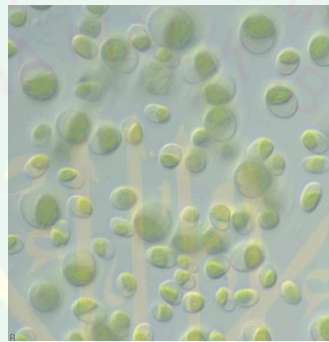
Mikroalga merupakan kelompok tumbuhan berukuran renik yang termasuk dalam kelas alga, diameternya antara 3 – 30 μm , baik sel tunggal maupun koloni yang hidup di seluruh wilayah perairan tawar maupun laut, yang lazim disebut fitoplankton (Romimohtarto, K., 2004). Mikroalga dapat melakukan fotosintesis dan hidup dari nutrien anorganik serta menghasilkan zat-zat organik dari CO_2 oleh fotosintesis. Mikroalga mempunyai zat warna hijau daun (pigmen) klorofil yang berperan pada proses fotosintesis dengan bantuan H_2O , CO_2 dan sinar matahari untuk menghasilkan energi. Energi ini digunakan untuk biosintesis sel, pertumbuhan dan pertambahan sel, bergerak atau berpindah dan reproduksi (Pranayogi, D., 2003).

Chlorella berasal dari zat bewarna hijau (chlorophyll) yang juga berfungsi sebagai katalisator dalam proses fotosintesis. (Steenblock, D., 2000 dalam Zahara, 2003). *Chlorella sp.* oleh Bold, H. dan Wynne, M. (1985) dikategorikan ke dalam kelompok alga hijau yang memiliki jumlah genera sekitar 450 dan jumlah spesies lebih dari 7500. Nama alga hijau diberikan karena kandungan zat hijau (chlorophyll) yang dimilikinya sangat tinggi, bahkan melebihi jumlah yang dimiliki oleh beberapa tumbuhan tingkat tinggi.

Proses reproduksi *Chlorella* dapat dibagi menjadi 4 tahap (Kumar dan Singh, 1979 dalam Zahara, 2003) yaitu:

1. Tahap pertumbuhan, pada tahap ini sel *Chlorella* tumbuh membesar.

2. Tahap pemasakan awal saat terjadi peningkatan aktivitas sintesa yang merupakan persiapan awal pembentukan autospora.
3. Tahap pemasakan akhir, pada tahap ini autospora terbentuk.
4. Tahap pelepasan autospora, dinding sel induk akan pecah dan diikuti oleh pelepasan autospora yang akan tumbuh menjadi sel induk muda.



Gambar 2.1. Bentuk Umum *Chlorella sp.* (Prabowo, 2009)

Chlorella sp. yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bibit *Chlorella sp.* yang diperoleh dari penelitian sebelumnya. Anggraeni, O., dkk. (2014) telah melakukan uji taksonomi terhadap sampel mikroalga dan hasil klasifikasi *Chlorella sp.* yaitu:

Familia : *Chlorellaceae*

Genus : *Chlorella*

Spesies : *Chlorella sp.*

Amaliyah, S., dkk. (2013) melakukan uji taksonomi mengenai ciri-ciri mikroalga *Chlorella sp.* dan hasilnya menunjukkan bahwa sel *Chlorella sp.* berbentuk bulat seperti cawan atau lonceng dengan posisi menghadap ke atas. *Chlorella sp.* hidup secara soliter dan berukuran 2 – 8 μm . Warna hijau pada *Chlorella sp.* disebabkan

karena selnya dominan mengandung klorofil a dan b, disamping karotin dan xantofil.

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

Menurut Bold, H. dan Wynne, M. (1985), faktor utama pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam kultur adalah medium. Medium dalam kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* yang digunakan dalam penelitian ini adalah Medium Ekstrak tauge. Medium Ekstrak Tauge merupakan medium alami yang umum digunakan bagi pertumbuhan mikroalga. Medium tersebut mengandung unsur makro dan mikro, vitamin, mineral, dan asam amino yang dibutuhkan bagi pertumbuhan mikroalga (Prihantini, N., dkk., 2005).

Hasil penelitian Wulandari, A., dkk. (2010) menunjukkan bahwa penggunaan Medium Ekstrak Tauge (MET) menghasilkan pertumbuhan mikroalga yang sangat pesat dibandingkan dengan medium lainnya yaitu Medium Air Laut (MAL) dan Medium Guillard (MG). Prihantini, N., dkk. (2007) menyebutkan bahwa konsentrasi Medium Ekstrak Tauge (MET) optimum bagi mikroalga *Schenedesmus* selama 10 hari pengamatan adalah MET 4 %. Media perlakuan tersebut menghasilkan kerapatan sel tertinggi (87.096 sel/mL). Khamidah, U., dkk. (2013) hasil penelitian juga menunjukkan bahwa *Chlorella sp.* yang dikultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 % dapat menghasilkan kelimpahan sel tertinggi sebesar 4.880.000 sel/mL pada fase stasioner dihari ke-10.

Menurut Isnansetyo, A. dan Kurniastuty (1995), selain faktor medium terdapat faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroalga

antara lain cahaya, temperatur, dan pH air. Oh-hama dan Miyachi (1988) menyatakan bahwa intensitas cahaya satu rasi untuk *Chlorella* berada pada intensitas 4000 lux. Penelitian Prihartini, N., dkk. (2005), kultur mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan pencahayaan 2 buah lampu TL 36 watt (intensitas cahaya 1000 – 4000 lux) dan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap.

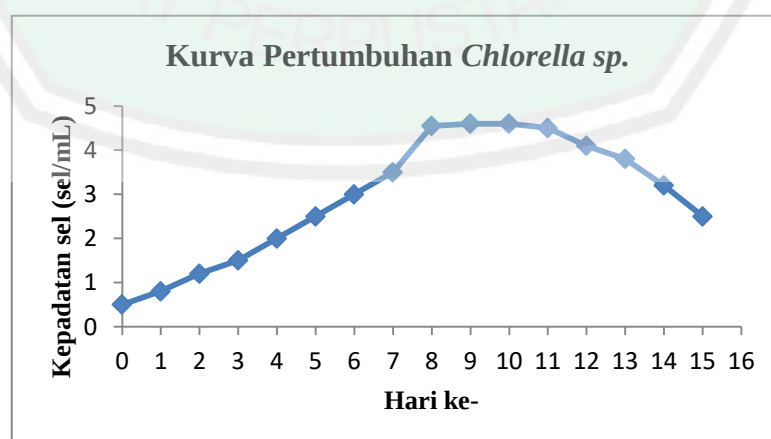
Kisaran pH media kultur yang sesuai bagi *Chlorella sp.* bergantung pada jenis media (Prihartini, N., dkk., 2005). Nilai pH yang terlalu tinggi akan mengurangi aktifitas fotosintesis mikroalga (De LaNoue dan De Pauw, 1988). Namun menurut Oh-hama dan Miyachi (1988), pada umumnya strain *Chlorella* mampu bertoleransi terhadap kisaran salinitas dan pH yang cukup lebar. Nielsan (1955) dalam Prihartini, N., dkk. (2005) menyatakan bahwa pH yang sesuai untuk pertumbuhan *Chlorella* berkisar antara 4,5 – 9,3.

Kisaran temperatur optimal bagi pertumbuhan *Chlorella* adalah antara 25 – 30 °C (Isnansetyo, A. dan Kurniastuty, 1995). Menurut Taw, N. (1990) untuk kultur *Chlorella* diperlukan temperatur antara 25 – 35 °C. Penelitian lain menunjukkan bahwa untuk jenis *Chlorella vulgaris* dapat beradaptasi pada media kultur dengan temperatur serendah 5 °C (Maxwell *et al.*, 1994). Temperatur mempengaruhi proses-proses fisika, kimia, biologi yang berlangsung dalam sel mikroalga. Peningkatan temperatur hingga batas tertentu akan merangsang aktifitas molekul, meningkatnya laju difusi dan laju fotosintesis (Sachlan, M., 1982).

Pertumbuhan mikroalga dalam medium kultur dapat diamati dengan melihat pertambahan jumlah sel dalam satuan tertentu atau perubahan warna inokulum. Prihartini, dkk (2007) menyatakan bahwa gradiasi warna hijau selain

menunjukkan peningkatan jumlah sel, juga mengindikasikan kadar klorofil yang terkandung dalam sel. Menurut Volesky (1970) dalam Rostini (2007) menyebutkan bahwa warna hijau pada *Chlorella sp.* ditimbulkan oleh pigmen yang terkandung di dalam sel *Chlorella sp.* Sel *Chlorella sp.* mengandung pigmen berupa karoten, xanthofil, serta klorofil a dan b dalam jumlah yang besar. Cara kedua menghitung kelimpahan atau kepadatan sel mikroalga dari waktu ke waktu. Menurut Isnansetyo, A. dan Kurniastuty (1995) ada dua cara penghitungan kepadatan mikroalga yaitu menggunakan *sedgwich rafter* dan menggunakan *haemocytometer*. Penggunaan *haemocytometer* untuk menghitung kepadatan sel mikroalga lebih sering digunakan dibandingkan *sedgwich rafter* karena faktor kemudahannya.

Menurut penelitian (Khamidah, U., dkk., 2013), penentuan hari panen didasarkan pada kurva pertumbuhan yang diperoleh pada saat kultivasi selama 15 hari. Mikroalga *Chlorella sp.* memiliki kurva pertumbuhan seperti yang nampak pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Kurva Pertumbuhan *Chlorella sp.* (Khamidah, U., dkk., 2013)

Kelimpahan sel pada hari ke-8 adalah 4.656.000 sel/mL sehingga pada hari ke-8 merupakan fase awal stasioner karena jumlah selnya tidak mengalami peningkatan yang signifikan dibandingkan hari ke-7. Kelimpahan sel pada hari ke-10 merupakan fase stasioner adalah 4.880.000 sel/mL sehingga hari ke-10 merupakan fase stasioner. Kurangnya ketersediaan nutrisi juga menyebabkan kelimpahan sel cenderung berkurang pada hari ke-11 yaitu 4.704.000 sel/mL, sehingga pada hari ke-11 sudah memasuki fase akhir stasioner.

2.3 Manfaat *Chlorella* sp.

Mikroalga *Chlorella* sp. memiliki potensi sebagai pakan alami, pakan ternak, suplemen, penghasil komponen bioaktif, bahan farmasi dan kedokteran. Hal tersebut disebabkan *Chlorella* sp. mengandung berbagai nutrisi seperti protein, karbohidrat, asam lemak tak jenuh, vitamin, klorofil, enzim dan serat yang tinggi (Kawaroe, M., dkk., 2010). *Chlorella* sp. mempunyai pigmen warna hijau dan kaya dengan warna biru yang disebut *Phycocyanin* merupakan protein kompleks. *Phycocyanin* merupakan pembentuk darah putih didalam tubuh manusia dan merupakan antibodi atau pembentuk imunitas dari serangan racun kimia dan radiasi.

Warna hijau dari klorofil pada *Chlorella* sp. disebut darah hijau (*greenblood*) mempunyai kandungan zat besi pembentuk hemoglobin yang berfungsi sebagai penambah makanan bagi penyandang anemia. Pada *Chlorella* sp. terdapat warna kuning orange merupakan kandungan karoten terdiri dari *xanthophyll*, *myxoxanthophyll*, *zeaxanthin*, *cryptoxanthin*, *echinenone*, *fucoxanthin*, *violaxanthin*, dan *asiavaxanthin*. Total karoten yang terdapat pada *Chlorella* sp. per

10 g yaitu 0,37 % (Pranayogi, D., 2003). Karoten mempunyai khasiat pada manusia sebagai antioksidan.

Hasil penelitian Bariyyah, S., dkk. (2013) tentang uji aktivitas antioksidan dan identifikasi golongan senyawa aktif dalam *Chlorella sp.* menunjukkan bahwa ekstrak kasar *Chlorella sp.* mengandung senyawa golongan steroid, tanin dan asam askorbat yang berperan sebagai antioksidan. Khamidah, U., dkk. (2013) dalam penelitiannya tentang uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* terhadap *escherichia coli* dan *staphylococcus aureus* mendapatkan hasil bahwa dalam ekstrak kasar *Chlorella sp.* mengandung senyawa golongan steroid dan tanin yang bersifat sebagai antibakteri. Amaliyah, S., dkk. (2013) melakukan uji toksisitas terhadap ekstrak *Chlorella sp.* dengan hasil bahwa ekstrak methanol *Chlorella sp.* berpotensi sebagai anti kanker dan ekstrak etil asetat *Chlorella sp.* sebagai antimikroba. Kusmiati, N., dkk. (2010) melakukan ekstraksi dan purifikasi senyawa lutein dari mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* Galur Lokal Ink dimana lutein ini merupakan kartenoid alami yang berfungsi sebagai antioksidan.

2.4 Antioksidan

Radikal bebas adalah atom atau gugus atom yang memiliki satu atau lebih elektron tak berpasangan. Adanya elektron tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan. Radikal ini akan merebut elektron dari molekul lain yang ada di sekitarnya untuk menstabilkan diri (Fessenden, R. dan Fessenden, J., 1986). Radikal bebas dalam jumlah berlebih di dalam tubuh sangat berbahaya karena menyebabkan kerusakan sel. Cara mengikat

radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif dibutuhkan senyawa antioksidan yang mampu menghambat reaksi oksidasi sehingga kerusakan sel dapat dicegah (Winarsi, H., 2007).

Antioksidan merupakan substansi nutrisi maupun non-nutrisi yang terkandung dalam bahan pangan sebagai senyawa pemberi elektron (elektron donor) atau reduktan/reduktor yang mampu mencegah atau memperlambat terjadinya kerusakan oksidatif dalam tubuh. Tubuh manusia mempunyai sistem antioksidan yang diproduksi secara kontinue untuk menangkal atau meredam radikal bebas, seperti enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase. Bila jumlah senyawa radikal bebas melebihi jumlah antioksidan alami dalam tubuh maka radikal bebas akan menyerang komponen lipid, protein dan DNA. Sehingga tubuh kita membutuhkan asupan antioksidan yang mampu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas tersebut (Prakash, A., 2001; Winarsi, H., 2007; Hapsari, F., 2008).

Komponen kimia yang berperan sebagai antioksidan adalah senyawa golongan fenolik dan polifenolik. Senyawa-senyawa golongan tersebut banyak terdapat di alam, terutama pada tumbuh-tumbuhan, dan memiliki kemampuan untuk menangkap radikal bebas (Ramle et al., 2008). Senyawa fenol ialah senyawa yang memiliki cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus hidroksi. Senyawa fenol merupakan senyawa yang mudah larut dalam air karena umumnya sering kali berikatan dengan glikosida (Harborne, 1987). Senyawa golongan fenol diketahui sangat berperan terhadap aktivitas antioksidan, semakin besar kandungan senyawa golongan fenolnya maka semakin besar aktivitas antioksidannya (Kristanti, A., dkk., 2008).

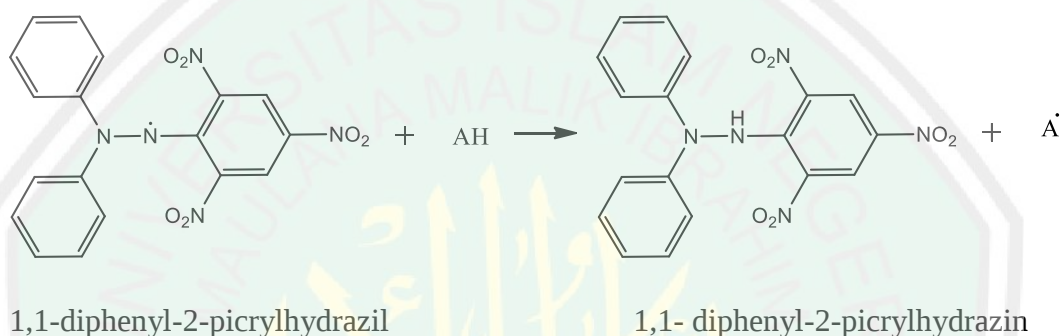
2.5 Uji Aktivitas Antioksidan

Aktifitas antioksidan senyawa fitosterol yang didapat dari mikroalga sangat langka. Namun, fitosterol yang berasal dari sumber daya lainnya telah dilaporkan menunjukkan hasil positif. Salah satunya yaitu fukosterol yang telah ditemukan di beberapa spesies mikroalga seperti *Chrysodema sp.*, *Chrysomeris*, dan *Giraudyopsis*, walaupun tidak ada penelitian yang dapat ditemukan secara khusus menganalisis aktivitas fukosterol dari mikroalga. Ekstrak lemak dari beberapa spesies mikroalga telah diidentifikasi aktivitas antioksidannya, seperti *Schizochytrium aggregatum*, namun senyawa penting yang terkandung masih belum ditentukan.

Salah satu metode yang paling umum digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan adalah menggunakan radikal bebas 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH). Pengukuran antioksidan dengan metode DPPH merupakan metode pengukuran antioksidan yang sederhana, cepat dan tidak membutuhkan banyak reagen seperti halnya metode lain. Hasil pengukuran dengan metode DPPH menunjukkan kemampuan antioksidan sampel secara umum, tidak berdasar jenis radikal yang dihambat (Juniarti, D. dan Yuhernita, 2009). Pada metode lain selain DPPH membutuhkan reagen kimia yang cukup banyak, waktu analisis yang lama, biaya yang mahal dan tidak selalu dapat diaplikasikan pada semua sampel (Badarinath, A., *et al.*, 2010). DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk uji aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam (Molyneux, P., 2003).

Larutan DPPH berperan sebagai radikal bebas yang akan bereaksi dengan senyawa antioksidan sehingga DPPH akan berubah menjadi bentuk tereduksi 1,1-

diphenyl-2-picrylhydrazin yang bersifat non-radikal. Peningkatan jumlah 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin akan ditandai dengan berubahnya warna ungu tua menjadi warna merah muda atau kuning pucat dan dapat diamati menggunakan spektrofotometer sehingga aktivitas peredaman radikal bebas oleh sampel dapat ditentukan (Molyneux, P., 2004).



Gambar 2.3. Reaksi DPPH dengan Antioksidan (Prakash, A., 2001)

Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menggunakan prinsip spektrofotometri. Senyawa DPPH dalam metanol berwarna ungu tua terdeteksi pada panjang gelombang sinar tampak sekitar 515 – 517 nm. Parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian DPPH adalah dengan nilai EC_{50} (Inhibitor Concentration). EC_{50} merupakan konsentrasi larutan substrat atau sampel yang mampu mereduksi aktivitas DPPH sebesar 50 %. Semakin kecil nilai EC_{50} berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan (Molyneux, P., 2004).

Panjang gelombang maksimum (λ_{max}) yang digunakan dalam pengukuran uji aktivitas antioksidan sampel uji sangat bervariasi. Panjang gelombang maksimum yang digunakan dalam pengukuran absorbansi yaitu 515 nm (Kuntorini, E. dan Astuti, 2010; Hanani, E., dkk., 2005), 516 nm (Julyasih, S.,

dkk., 2009), 517 nm (Yudiati, E., dkk., 2011), 518 nm (Bariyyah, S., dkk., 2013). Pada prakteknya, hasil pengukuran panjang gelombang yang memberikan serapan maksimum yaitu sekitar panjang gelombang yang disebutkan diatas. Nilai absorbansi yang beragam dari penelitian satu dengan penelitian lainnya adalah dikarenakan panjang gelombang dapat diatur untuk memberikan absorbansi maksimum sesuai dengan alat yang digunakan (Molyneux, P., 2003).

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

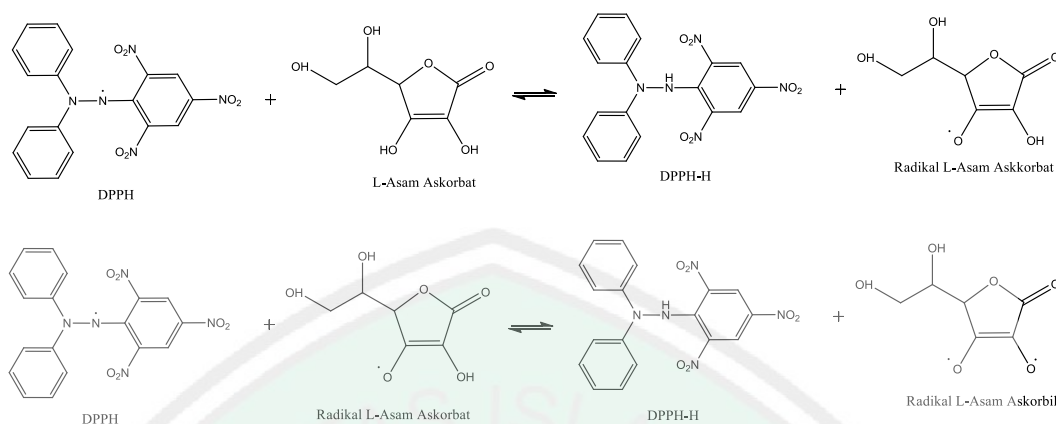
$$\% \text{ Aktivitas Antioksidan} = \frac{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel})}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Niali 0 % berarti sampel tidak mempunyai aktivitas antioksidan, sedangkan nilai 100 % berarti pengujian aktivitas antioksidan perlu dilanjutkan dengan pengenceran sampel untuk mengetahui batas konsentrasi aktivitasnya. Suatu bahan dapat dikatakan aktif sebagai antioksidan bila presentase aktivitas antioksidan lebih atau sama dengan 50 % (Parwata, I., dkk., 2009).

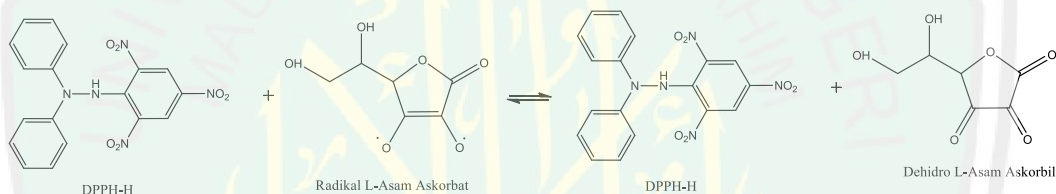
Nilai EC_{50} dihitung dalam persamaan $y = ax + b$ yang diperoleh dari kurva regresi linear dari hubungan persen aktivitas antioksidan dan konsentrasi (Yuhernita dan Juniarti, 2011). Untuk menentukan EC_{50} , diperlukan persamaan kurva standar dari % aktivitas antioksidan sebagai sumbu y dan konsentrasi fraksi antioksidan sebagai sumbu x. EC_{50} dihitung dengan cara memasukkan nilai 50% ke dalam persamaan kurva standar sebagai sumbu y kemudian dihitung nilai x sebagai konsentrasi EC_{50} .

Aktivitas antioksidan hasil penelitian Bariyyah, S., (2013) ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan pelarut metanol dan etil asetat memiliki potensi antioksidan yang kuat, walaupun lebih rendah jika dibandingkan dengan antioksidan asam askorbat dan BHT. Sedangkan hasil penelitian Anggraeni, O., dkk. (2014) ekstrak *Chlorella sp.* menggunakan pelarut metanol yang dilanjutkan dengan fraksi petroleum eter memiliki nilai EC_{50} terkecil dibandingkan dengan fraksi yang lainnya. Nilai EC_{50} ekstrak petroleum eter adalah 27,26 ppm. Hasil ini juga menunjukkan bahwa ekstrak *Chlorella sp.* setelah dihidrolisis dan dipartisi dengan petroleum eter memiliki potensi antioksidan yang lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak sebelum dihidrolisis (ekstrak metanol). Hal ini terlihat dari nilai EC_{50} ekstrak petroleum eter lebih kecil dibandingkan dengan EC_{50} ekstrak metanol (1335 ppm).

Senyawa pembanding yang digunakan adalah asam askorbat dan BHT. Asam askorbat mampu mereduksi radikal bebas DPPH dengan mendonorkan 1 atom hidrogen sehingga menghasilkan produk radikal L-asam askorbat dan DPPH-H. Radikal L-asam askorbat akan mendonorkan 1 atom hidrogen pada radikal DPPH dan membentuk radikal L-askorbil dan DPPH-H. Radikal L-askorbil bersifat stabil dengan mengubah dirinya menjadi dehidro-L-asam askorbat, selain itu pada Gambar 4.10 reaksi antara asam askorbat dengan radikal DPPH dengan satu molekul asam askorbat dapat meredam 2 molekul radikal DPPH. Mekanisme radikal DPPH dengan asam askorbat ditunjukkan pada Gambar 2.4 dan 2.5.

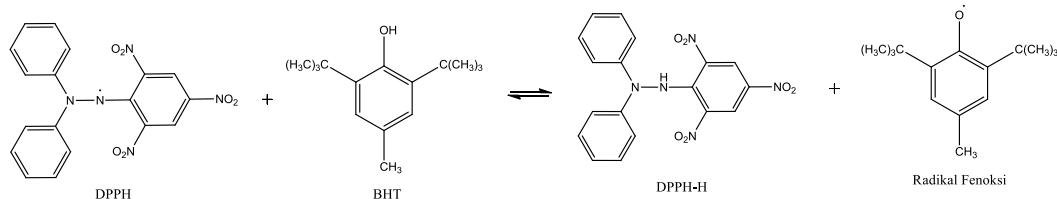


Gambar 2.4 Reaksi asam askorbat dengan DPPH (Nishizawa, 2005 dalam Arindah, 2010)



Gambar 2.5 Produk akhir reaksi asam askorbat dengan DPPH (Nishizawa, 2005 dalam Arindah, 2010)

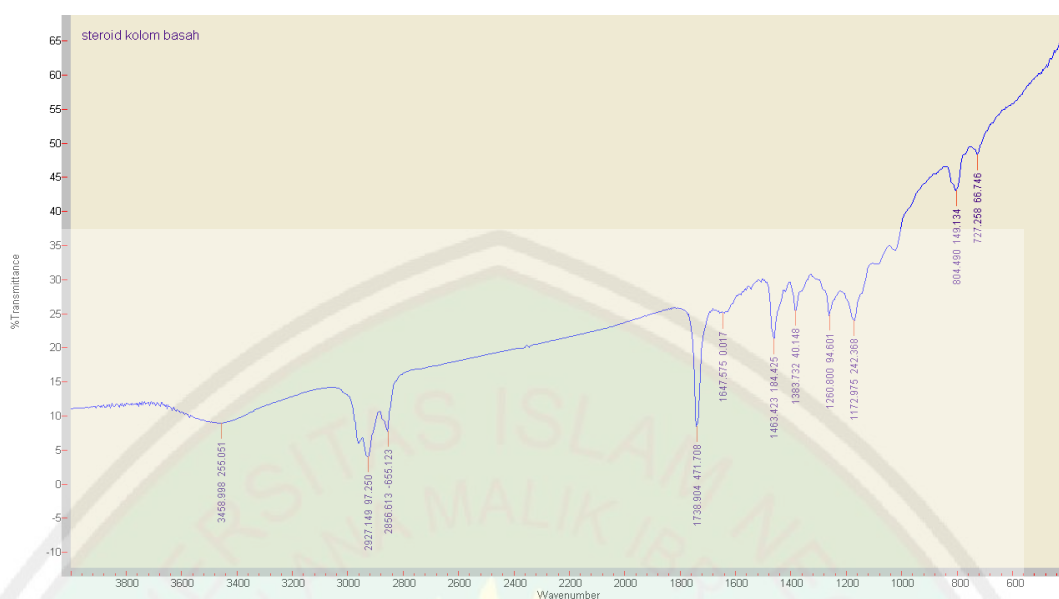
BHT bereaksi dengan radikal DPPH menghasilkan DPPH-H dan radikal fenoksi dengan mendonorkan 1 atom hidrogennya pada gugus hidroksil kepada DPPH sehingga radikal DPPH tereduksi menjadi DPPH-H. BHT yang menjadi radikal fenoksi dapat stabil karena radikal fenoksi dapat mendelokasikan elektronnya (Husnah, 2009). Adapun reaksi DPPH dengan BHT ditunjukkan pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Reaksi BHT dengan DPPH (Brand dan William, 1995 dalam Husnah, 2009)

2.6 Steroid

Steroid adalah suatu golongan senyawa triterpenoid yang mengandung inti siklopentana perhidrofenantren yaitu terdiri dari tiga cincin sikloheksana dan sebuah cincin siklopentana (Harborne, J., 1987; Robinson, T., 1995). Steroid yang paling banyak adalah sterol yang merupakan steroid alkohol. Kolesterol merupakan sterol utama pada jaringan hewan. Kolesterol dan senyawa turunan esternya, dengan lemaknya yang berantai panjang adalah komponen penting dari plasma lipoprotein dan dari membran sel sebelah luar. Membran sel tumbuhan mengandung jenis sterol lain terutama stigmasterol yang berbeda dari kolesterol hanya dalam ikatan ganda di antara karbon 22 dan 23 (Lehninger, A., 1982; Bhat, S., *et al.*, 2009). Steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan disebut fitosterol yang dapat berperan menjadi pelindung. Senyawa ini tidak hanya bekerja menolak beberapa serangga tetapi juga menarik beberapa serangga lain (Robinson, T., 1995).



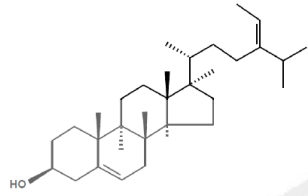
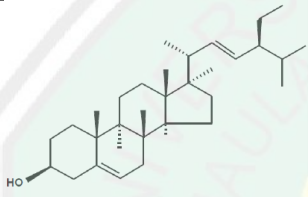
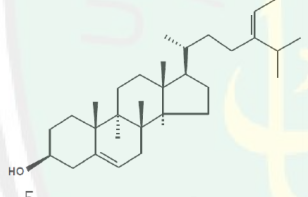
Gambar 2.7. Hasil identifikasi steroid kolom basah dengan spektrofotomer IR (Handoko, 2016).

Tabel 2.1 Interpretasi spektra IR steroid hasil kromatografi kolom (Handoko, 2016)

No	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Range Pustaka (Socrates, 1994)	Jenis Vibrasi	Intensitas Refrensi
1.	3458	3550 – 3230	O-H (<i>stretching</i>) dari ikatan hidrogen intermolekuler	m-s
2.	2927	3000 – 2800	C _{sp} ³ – H (<i>stretching</i>) CH ₂	m-s
3.	2856	2870 – 2840	C _{sp} ³ – H (<i>stretching</i>) CH ₃	M
4.	1738	1720-1749	C=O (<i>stretching</i>)	m-s
5.	1647	1600 – 1450	C = C (<i>stretching</i>)	w-m
6.	1463	1480 – 1440	–CH pada CH ₂ (<i>bending</i>)	W
7.	1383	1395 – 1365	–CH pada CH ₃ (<i>bending</i>)	M
8.	1172	1205 – 1125	C – OH (<i>bending</i>) alkohol tersier	M
9.	804	995 – 650	=C – H siklik (<i>bending</i>)	W

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

Tabel 2.2 Fungsi dan sumber fitosterol pada alga (Luo, Xuan., *et al.*, 2015)

Struktur fitosterol	Asal spesies	Bioaktivitas	Mikroalga yang memiliki sterol sama
 Fukosterol	- Macroalgae <i>Pelvetia siliquosa</i> - Brown alga <i>Turbinaria conoides</i> - Macroalgae <i>Himanthalia elongate</i>, <i>Undaria pinnatifida</i>, <i>Phorphyra</i> sp., <i>Chondus crispus</i>, <i>Cystoseira</i> sp. and <i>Ulva</i> sp.	Antioksidan Antidiabetes Antikanker	<i>Chrysoderma</i> sp. <i>Chrysomeris</i> <i>Chrysowaernella</i> <i>Giraudyopsis</i> <i>Olisthodiscus luteus</i>
 Stigmasterol	- <i>Butea monosperma</i> - <i>Parkia speciosa</i> seeds	Thyroid-inhibitory Antioxidant Hypoglycaemic	<i>Porphyridium cruentum</i>
 Δ ⁵ -Avenasterol	- Brown algae <i>Fucus vesiculosus</i> - Green algae <i>Ulva lactuca</i> - Marine sponge <i>Petrosia weinbergi</i>	Antioxidant Lipase-inhibitory Precursor of antiviral orthoesterol	Myxophyceae Chlorophyceae <i>Chattonella marina</i>

2.7 Ekstraksi Steroid dengan Metode Maserasi

Berdasarkan penelitian Anggraeni, O., dkk. (2014) semua ekstrak *Chlorella* sp. memberikan warna hijau kebiruan pada uji golongan senyawa steroid yang menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mengandung golongan senyawa steroid. Senyawa steroid cenderung bersifat non polar atau semi polar, namun dapat terekstrak dalam pelarut metanol yang bersifat polar. Hal ini diduga karena steroid masih terikat pada glikosidanya sehingga ikut terekstrak dalam pelarut metanol yang bersifat polar. Beberapa senyawaan steroid mengandung

gugus –OH yang sering disebut dengan sterol, sehingga sifatnya cenderung lebih polar.

Fitosterol merupakan salah satu jenis steroid yang bersifat amphipilik karena gugus hidroksil polar (OH) di C3 cincin A dan selebihnya struktur non-polar (Luo, Xuan., *et al.*, 2015). Steroid juga merupakan golongan senyawa yang sebagian besar bersifat nonpolar maka ekstraksinya biasanya juga menggunakan pelarut nonpolar misalnya n-heksana atau petroleum eter. Dapat juga digunakan pelarut metanol atau etanol terlebih dahulu sebagai pelarut universal karena steroid sering ditemukan sebagai glikosida atau sebagai glikon dan aglikon kemudian setelah diperoleh ekstrak metanol dilanjutkan dengan ekstraksi partisi menggunakan pelarut nonpolar (Kristanti, A., dkk., 2008).

Salah satu metode yang digunakan untuk ekstraksi bahan alam adalah maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman sampel pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi bahan alam karena dengan perendaman sampel akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa dapat sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan (Lenny,S., 2006).

Saksony, A. (2011) melaporkan bahwa metode ekstraksi terhadap *Tetraselmis chuii* pernah dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol, etanol, dan aseton. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstraksi terbaik dengan rendemen tertinggi menggunakan pelarut metanol. Bariyyah, S., dkk. (2013) juga melaporkan ekstraksi terhadap *Chlorella sp.* menggunakan

metode maserasi dengan pelarut metanol yang bersifat polar menghasilkan randemen lebih besar daripada pelarut etil asetat yang bersifat semipolar. Hal ini menyebabkan maserasi dengan pelarut metanol akan menghasilkan ekstrak dengan kandungan metabolit sekunder lebih banyak dan beragam.

2.8 Hidrolisis dan Partisi

Pemilihan asam kuat seperti HCl sebagai katalis disebabkan karena asam kuat akan lebih mudah melepas proton (H^+) secara sempurna didalam air, sedangkan asam lemah relatif lebih sukar sehingga asam lemah memiliki kecenderungan terionisasi sebagian dalam pelepasan ion H^+ . Semakin banyak proton yang terionisasi dalam air, maka semakin kuat peranan proton dalam pemutusan ikatan glikosida (Handoko, D., 2006).

Berdasarkan penelitian Anggraeni, O., dkk. (2014) hasil partisi menggunakan pelarut n-heksan dan petroleum eter memiliki randemen ekstrak tertinggi dibandingkan dengan pelarut yang lain. Namun, hasil partisi yang memiliki kemampuan antioksidan terbesar pada konsentrasi 30 ppm adalah ekstrak petroleum eter. Hidayah, H., dkk. (2015) juga melaporkan hasil partisi ekstrak metanol dengan hidrolisis HCl 2N mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan pelarut petroleum eter menghasilkan randemen lebih tinggi (78,0548 %) daripada hasil penelitian Imamah, N., dkk. (2014) yang melakukan partisi mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan pelarut etil asetat (49,32 %).

2.9 Pemisahan Ekstrak Steroid dengan KLT

Marliana, E. (2007) dalam penelitiannya menyatakan Identifikasi steroid memberikan hasil positif setelah disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard yang ditandai dengan timbulnya noda berwarna ungu hitam ($R_f = 0,06$), ungu merah ($R_f = 0,16$), ungu gelap ($R_f = 0,24$), ungu ($R_f = 0,37; 0,74$) dengan menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (4 : 1). Hidayah, H., dkk. (2015) juga melaporkan hasil KLTA senyawa steroid pada mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan eluen n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 8 : 2 menghasilkan spot lebih banyak yaitu 13 spot, sedangkan 7:3 hanya menghasilkan 10 spot. ke-13 spot tersebut diperoleh 8 spot yang tergolong senyawa steroid setelah disemprot dengan reagen Lieberman-Burchard diantaranya berwarna pink ($R_f 0,06$), Hijau kecoklatan ($R_f 0,11$), Ungu (0,14), pink (0,16), pink (0,25), ungu (0,74), ungu kebiruan (0,80) dan Hijau terang (0,91).

Tabel 2.3 Sitasi warna senyawa pada lampu UV

No	Warna	Dugaan Senyawa	Literatur
1	Hijau	Steroid	Heftman, E. (1976)
2	Hijau kebiruan	Steroid	Babu, Jhonson dan Patric (2015)
3	Merah muda - merah	Triterpenoid	Farnsworth (1996)
4	Jingga – kuning	Alkaloid	Svendsen dan Verpoorte (1983)
5	Lembayung (ungu)	Tanin	Harborne (1987)
6	Biru muda, coklat, kuning	Flavonoid	Harborne (1987)
7	Merah lembayung / merah	Antosianin	Hajnos, Joseph dan Teresa (2008)
8	Jingga	flavonoid golongan flavonol	Markham, K.R. (1988)

2.10 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometri ultraviolet merupakan suatu analisis yang berdasarkan atas pengukuran resapan suatu larutan yang dilalui radiasi monokromatis. Penyerapan cahaya oleh molekul dalam daerah spektrum ultraviolet tergantung pada struktur elektronik dari molekul. Spektrum ultraviolet dari senyawa-senyawa organik berkaitan erat dengan transisi-transisi diantara tingkatan-tingkatan tenaga elektronik (Sastrohamidjojo, H., 1998). Menurut Creswell, C. (1982) Spektrum ultraviolet merupakan suatu gambar antara panjang gelombang atau frekuensi serapan lawan intensitas serapan (transmisi atau absorbansi).

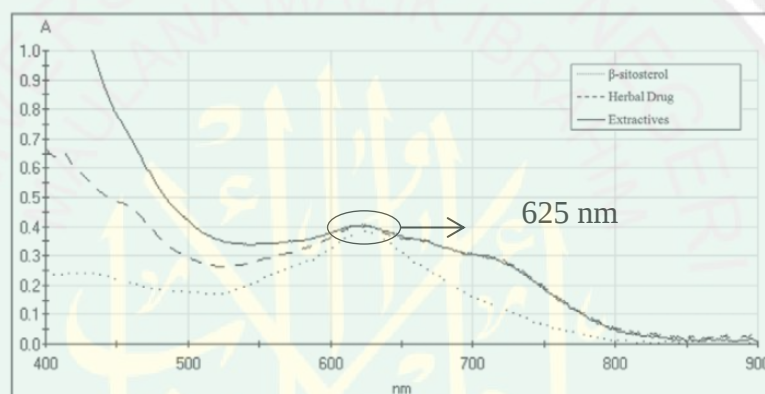
Molekul yang memerlukan energi yang lebih sedikit akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih panjang. Suatu spektrofotometer UV-Vis dapat mengukur dan merekam spektrum serapan senyawa tumbuhan dalam bentuk larutan. Spektrum tampak terentang panjang dari 400 nm (ungu) sampai 750 nm (merah), sedangkan spektrum ultraviolet terentang dari 100 nm sampai 400 nm (Fessenden, R. dan Fessenden, J., 1995; Noerdin, 1985).

Berdasarkan Oliveira, N., *et al.* (2015), identifikasi metabolit sekunder golongan steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis dari ekstrak *P. boergesenii* dan *S. stenophyllum* menunjukkan pita serapan UV-Vis yaitu $\lambda_{\max}$ 290 – 310 nm. Jenis steroid yang teridentifikasi adalah fukosterol dengan panjang gelombang tersebut.

Isolasi senyawa steroid dari alga merah *Gracilaria edulis* telah dilaporkan Dast, B. dan Srinivas, K. (1991) bahwa ekstraksi alga merah menggunakan pelarut heksana menunjukkan senyawa steroid 3 β -hidroksiporifera-5-en-7-on dan poriferasta-3,5-dien-7-on. Karakterisasi senyawa steroid teridentifikasi dengan

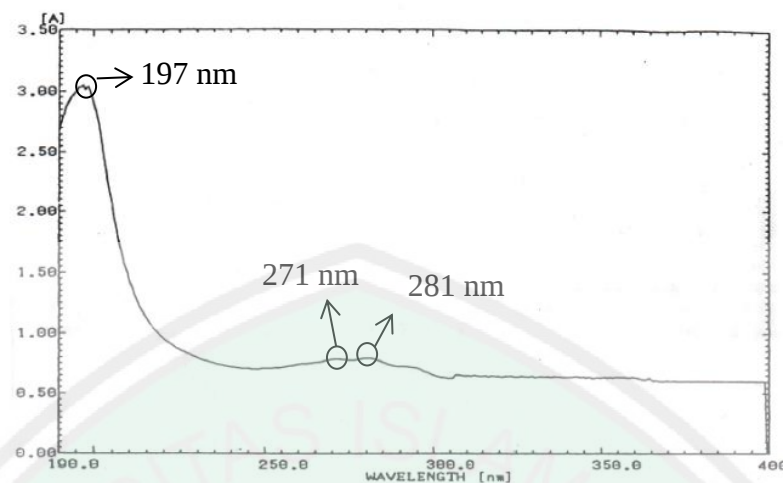
menggunakan instrumen UV dengan panjang gelombang maksimum 238 nm pada sterol 3β -hidroksiporifera-5-en-7-on dan panjang gelombang maksimum 278 pada poriferasta-3,5-dien-7-on.

Berdasarkan penelitian Araújo, L., dkk. (2013) spektra UV yang tampak pada larutan standar β -sitosterol, obat dan ekstrak *A. hispidum* diperoleh setelah bereaksi dengan Lieberman-Burchard dan semua larutan menunjukkan titik yang sama dengan panjang gelombang maksimum 625 nm.



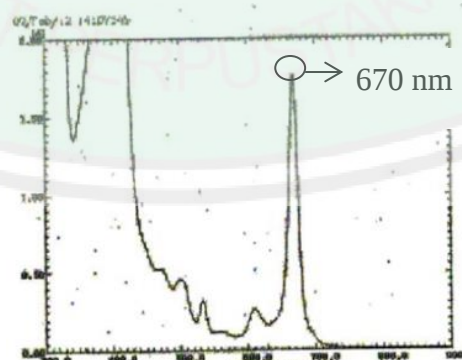
Gambar 2.8 Spektrum UV hasil reaksi dengan Lieberman-Burchard (400-900 nm): larutan standart (β -sitosterol), obat alami dan ekstrak akar *Acanthospermum hispidum*

Spektrum UV senyawa steroid penelitian Susilawati, dkk. (2010) dari hasil isolasi daun rimbang (Gambar 2.9) mempunyai serapan maksimum pada panjang gelombang 197 nm, 271 nm dan 281 nm. Maksimum pada panjang gelombang 197 nm berarti senyawa steroid hasil isolasi ini mempunyai ikatan rangkap yang tidak terkonjugasi dan pada panjang gelombang 271 nm dan 281 nm memiliki ikatan rangkap yang terkonjugasi hal ini sesuai dengan kaidah Woodward untuk meramalkan serapan maksimum untuk sistem diena menggunakan harga dasar 214 nm untuk ikatan rangkap terkonjugasi.



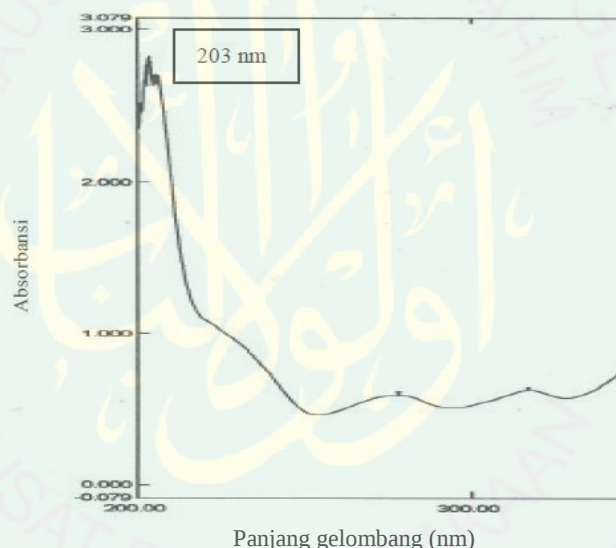
Gambar 2.9 Spektrum UV senyawa hasil isolasi steroid dari daun rimbang

Berdasarkan penelitian Jhonson, M., *et al.* (2012) ekstraksi senyawa metabolit sekunder dari *L. obtusa* menunjukkan hasil positif terdapat adanya senyawa steroid pada pelarut petroleum eter. Hasil spektrofotometer UV-Vis menunjukkan panjang gelombang maksimum pada pelarut petroleum eter dengan panjang gelombang 360 dan 670 nm.



Gambar 2.10 Spektrum UV-Vis fraksi petroleum eter

Berdasarkan penelitian Hasil pengukuran spectra ultraviolet (UV) senyawa hasil isolasi menunjukkan puncak serapan maksimum pada panjang gelombang 203 nm seperti yang disajikan pada Gambar 2.11. Berdasarkan hasil pengukuran spectrum UVVis dengan munculnya puncak pada λ_{mak} 203 nm menunjukkan bahwa terdapat ikatan C=C tidak terkonjugasi akibat adanya transisi electron $\pi \rightarrow \pi^*$. Senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada isolat yang dari bagian daun tumbuhan paku *Christella arida* diduga merupakan senyawa steroid yaitu kampesterol dan β - sitosterol.



Gambar 2.11 Spektrum UV-Vis isolat tumbuhan paku *Chriistella arida*

2.11 Manfaat Tumbuhan dalam al-Quran

Allah SWT telah menciptakan segala sesuatu di bumi ini dengan manfaatnya masing-masing. Manusia sebagai khalifah di bumi mempunyai tugas untuk berfikir, mengkaji dan meneliti hasil ciptaan Allah. Firman Allah dalam al-Quran surat Ali Imron ayat 191:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمٰوٰتِ
وَالْاَرْضِ ۗ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هٰذَا بَطِلًا ۚ سُبْحٰنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ [١٩١]

“(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): “Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka” (Ali Imron, 191).

al-Jazair (2009) surat Ali Imron ayat 190 menjelaskan sifat-sifat orang-orang yang berakal yaitu mereka yang selalu berfikir tentang kebesaran penciptaan langit dan bumi, sehingga mereka mendapatkan jalan petunjuk untuk mengenal Allah Ta’ala. Mereka memikirkan keberadaan langit dan bumi, tentang keindahan dan kebesaran penciptaannya. Segala bentuk penciptaan Allah ini tidaklah sia-sia yakni tanpa adanya hikmah yang bisa dijadikan pelajaran dan tanpa ada tujuannya. Salah satu jenis ciptaan Allah adalah tumbuhan. Tumbuhan diciptakan dengan berbagai manfaat. Firman Allah SWT dalam surat Luqman ayat 10:

خَلَقَ السَّمٰوٰتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَّرَوْنَهَا ۚ وَالْاَرْضِ رَوٰسِي ۚ اَنْ تَمِيْدَ بِكُمْ وَبَتْ فِيْهَا
مِنْ كُلِّ دَآبَّةٍ ۗ وَاَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَآءِ مَآءً ۚ فَانۢبَتْنَا فِيْهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيْمٍ [١٠]

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

Tafsir al Misbah menjelaskan bahwa Allah telah menciptakan langit yang demikian tinggi dan besar tanpa tiang. Dia meletakkan gunung-gunung sangat kukuh di permukaan bumi yang merupakan hunian kamu yang tertancap kuat sehingga bumi itu tidak goncang bersama kamu. Dia mengembangkan disana segala jenis binatang yang berakal, menyusui, bertelur, melata dan lain-lain, dan Kami turunkan air hujan dari langit baik yang cair maupun yang membeku, lalu

Kami tumbuhkan padanya setelah percampuran tanah dengan air yang turun itu segala macam pasangan tumbuh-tumbuhan yang baik (Shihab, M., 2002). Menurut Savitri (2008) tumbuhan yang baik dalam hal ini adalah tumbuhan yang bermanfaat bagi makhluk hidup termasuk tumbuhan yang dapat digunakan dalam pengobatan.

Berdasarkan tafsir Al-Aisar jilid 5 menjelaskan salah satu tanda kekuasaan, ilmu, dan kebijaksanaan Allah yang harus diimani yaitu air hujan yang diturunkan Allah untuk menumbuhkan segala macam tumbuh-tumbuhan yang bermanfaat dan baik untuk manusia (Al-Jazairy, S., 2008). Sedangkan menurut tafsir al-Maraghiy diantara bukti kekuasaan Allah yang pertama ialah penciptaan langit berlapis tujuh tanpa tiang yang menyangganya, menjadikan gunung-gunung diatas permukaan bumi yang kokoh dan lautan yang ada menutupi sebagian besar permukaan bumi. Kedua yaitu mengembangkan berbagai jenis hewan yang tiada seorang pun dapat mengetahui jumlah, bentuk dan warnanya selain Allah. Kemudian yang ketiga yaitu menurunkan air dari langit, yakni air hujan yang dengan adanya air hujan tersebut tumbuhlah berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang banyak manfaatnya.

Firman Allah surat al-Anam ayat 99:

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً ۖ فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا
نُخْرِجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا ۖ وَمِنَ النَّخْلِ مِنَ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ
وَالزَّيْتُونِ وَالرُّمَّانِ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ ۚ انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ۚ إِنَّ
فِي ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ [٩٩]

“Dan Dialah yang menurunkan air hujan 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 korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan

pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman” (QS al An’am: 99).

Berdasarkan tafsir ash-Shiddieqy (2000), Allah telah menurunkan air dari awan, lalu dengan air hujan itulah dijadikan segala macam tumbuhan-tumbuhan, akan tetapi bentuk dan rasa buah-buahan atau tanaman berbeda-beda. Allah mengeluarkan dari bibit itu batang yang hijau atau daun yang hijau. Allah mengeluarkan dari tumbuh-tumbuhan yang hijau itu kebun-kebun anggur serta buah zaitun dan buah delima. Ada diantaranya yang manis, ada yang masam dan ada yang pahit.

Berbagai macam tumbuhan di dunia dapat dimanfaatkan oleh manusia. Karena adanya perbedaan letak geografis dari lingkungan hidup setiap tumbuhan, menyebabkan tumbuhan mempunyai manfaat sendiri-sendiri. Sesuai dalam tafsir Nurul Quran alasan Al-quran menekankan buah-buahan seperti zaitun, kurma, dan anggur bukan karena menunjang tumbuhnya buah tersebut di lingkungan turunnya wahyu Al-quran. Akan tetapi, kenyataan bahwa Al-quran bersifat universal dan mengandung penafsiran yang mendalam, bahwa masalah yang dibahasnya jauh melampaui batas redaksi kata-katanya (Imani, A., 2008).

Para ahli gizi mengatakan bahwa hanya ada sedikit buah-buahan yang keutamaannya mampu menandingi jenis buah-buahan yang disebutkan dalam ayat diatas. Mereka juga mengatakan bahwa minyak zaitun dapat menghasilkan jumlah kalori yang sangat besar dan sangat banyak dalam memberikan energi. Sedangkan buah kurma banyak terkandung kalsium yang merupakan faktor utama dalam memperkuat tulang dan fosforus yang merupakan sumber dan unsur utama

pembentukan otak dan mencegah kelemahan syaraf dan gejala keletihan. Buah anggur sangat efektif dalam obat alamiah yang mampu menetralkan racun dan sebagai vitamin untuk memperkuat syaraf dan tubuh (Imani, A., 2008). Adapun buah delima mengandung senyawa fitokimia dan polifenol antioksidan yang terbukti sebagai obat kanker. Selain itu, terdapat buah Tin yang mengandung senyawa flavonoid dan polyphenol yang berfungsi sebagai zat antioksidan bagi tubuh.



BAB III

METODOLOGI

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Kimia Organik, Bioteknologi Jurusan Kimia dan Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Februari – Juli 2016.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah labu kultur 1000 mL, lampu 36 Watt, *timer*, *hot plate*, neraca analitik, seperangkat alat gelas, corong *buchner*, desikator, pengaduk, gelas arloji, tabung reaksi, *shaker*, kertas whatman no. 42, aluminium foil, tisu, penggaris, plat KLT silika GF₂₅₄, oven, statif, corong pisah 250 mL, spatula, gunting, corong gelas, tabung reaksi, pipet ukur, pipet volume, bola hisap, labu ukur, lemari asam, *hairdryer*, gelas vial, pipet tetes, pipa kapiler, *cutter*, jarum, penggaris, *chamber*, lampu UV, cawan, porselen, *shaker*, *rotary evaporator vacuum*, kuvet, aluminium foil, *sentrifuse*, dan spektrofotometer UV-Vis *Varian Carry*.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah isolat mikroalga *Chlorella sp.* yang diperoleh dari Laboratorium Fisiologi Tumbuhan jurusan Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah metanol *p.a*, n-

heksana, etil asetat *p.a*, petroleum eter, taughe (kacang hijau), natrium bikarbonat, larutan DPPH 0,2 mM, HCl 2 N, asetat anhidrida, asam sulfat pekat, HCl 37 %, HCl 2 %, etanol 95 %, reagen Liebermann-Buchard, vitamin C, BHT dan akuades.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian experimental di laboratorium. Sampel yang diambil adalah mikroalga *Chlorella sp.*, sampel dikultivasi kemudian dipanen dan dikeringkan selama 48 jam. Selanjutnya sampel dimaserasi senyawa steroidnya menggunakan pelarut metanol *p.a* dengan perbandingan 1:5 (b/v) selama 24 jam dan *dishaker* selama 5 jam. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya dihidrolisis dan dipartisi menggunakan pelarut petroleum eter sehingga diperoleh ekstrak pekat. Hasil partisi tersebut dipisahkan senyawa steroidnya menggunakan KLTP dengan eluen terbaik n-heksana dan etil asetat (4:1). Selanjutnya hasil KLTP diidentifikasi di bawah sinar lampu UV 254 dan 366 nm sehingga akan muncul spot dari senyawa steroid. Spot yang dihasilkan dikerok serta dilarutkan dan dipekatkan kembali dengan *sentrifuse*. Selanjutnya isolat diuji aktivitas antioksidannya dengan berbagai variasi konsentrasi untuk mengetahui tingkat potensi antioksidan mikroalga *Chlorella sp.* melalui nilai EC_{50} . Uji antioksidan dilakukan dengan variasi konsentrasi isolat (ppm) yang terdiri dari 5 variasi yaitu 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, dan 5 ppm. Perlakuan ini dilakukan dengan pengulangan sebanyak 4 kali. Identifikasi senyawa steroid dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut :

1. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.*
 - a) Pembuatan Media Ekstrak Tauge
 - b) Kultivasi *Chlorella sp.*
 - c) Pemanenan biomassa *Chlorella sp.*
2. Penentuan kadar air.
3. Ekstraksi Biomassa *Chlorella sp.*
 - a) Ekstraksi senyawa steroid pada mikroalga *Chlorella sp.* dengan metode maserasi
 - b) Hidrolisis dan partisi ekstrak pekat metanol mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan fraksi petroleum eter.
4. Pemisahan senyawa steroid dengan KLTP
 - a) Dikerok spot steroid dan dilarutkan
 - b) *Disentrifuse* atau dipekatkan
5. Uji aktivitas antioksidan dengan variasi konsentrasi
6. Identifikasi senyawa steroid menggunakan Spektrofotometer UV-Vis.
7. Analisis data

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

3.5.1.1 Pembuatan Media Ekstrak Tauge 4%

Pembuatan medium ekstrak tauge diawali dengan pembuatan larutan stok MET yaitu 100 gram tauge direbus dalam 500 mL akuades yang mendidih selama

1 jam hingga volume ekstrak 200 mL. Medium ekstrak taube 4 % (v/v) sebanyak 900 mL dibuat dengan cara melarutkan 36 mL ekstrak taube kedalam akuades 864 mL dalam erlenmeyer 1000 mL, tanpa perlakuan PH (Prihantini, N., dkk., 2005).

3.5.1.2 Kultivasi *Chlorella* sp.

Sebanyak 150 ml isolat *Chlorella* sp. diinokulasikan kedalam masing-masing 900 mL MET dalam erlenmeyer 1000 mL yang ditempatkan pada rak yang telah dilengkapi dengan pencahayaan menggunakan lampu 36 watt (intensitas cahaya 1000 – 4000 lux) dan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap selama 10 hari (Prihantini, N., dkk., 2005).

3.5.1.3 Pemanenan Biomassa *Chlorella* sp.

Pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella* sp. dilakukan pada hari ke-10 kultivasi dengan cara media kultur *Chlorella* sp. disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Biomassa *Chlorella* sp. yang dihasilkan kemudian dipisahkan dari cairannya selanjutnya dilakukan penimbangan dan dicatat sebagai berat basah (Desianti, N., dkk., 2014).

Sampel biomassa *Chlorella* sp. diambil seluruhnya kemudian dikeringanginkan pada suhu ruang 25 – 30 °C selama 48 jam. Hasil yang diperoleh selanjutnya dicatat sebagai berat kering mikroalga *Chlorella* sp. (Desianti, N., dkk., 2014).

3.5.2 Analisis Kadar Air Biomassa Mikroalga *Chlorella* sp.

Analisis kadar air dilakukan pada sampel kering mikroalga *Chlorella* sp. dengan cara sampel ditimbang sebanyak 0,5 g, dimasukkan dalam cawan yang sebelumnya telah dihitung berat konstannya, kemudian dikeringkan didalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama 1 jam. Selanjutnya sampel didinginkan dalam

desikator, ditimbang, kemudian dioven kembali. Perlakuan ini diulangi sampai diperoleh berat konstan. Kadar air sampel biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dihitung menggunakan rumus berikut (AOAC, 1984):

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

Dimana :

a = bobot cawan kosong

b = bobot sampel + cawan sebelum dipanaskan

c = bobot cawan + sampel setelah dipanaskan

3.5.3 Ekstraksi Senyawa Steroid Mikroalga *Chlorella sp.*

Biomassa *Chlorella sp.* kering 30 g dimasukkan dalam erlenmeyer kemudian direndam dengan pelarut metanol p.a 150 mL selama 24 jam dan *dishaker* selama 5 jam dengan kecepatan 120 rpm. Maserasi diulangi sebanyak lima kali. Setelah itu dipisahkan antara filtrat dengan residu dan dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* hingga diperoleh ekstrak pekat metanol mikroalga *Chlorella sp.* (Imamah, N., dkk., 2015), dihitung randemennya dengan rumus (Khopkar, S., 2003):

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

3.5.4 Hidrolisis Ekstrak Pekat Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstrak pekat metanol sebanyak 2,5 g dihidrolisis dengan katalis HCl 2 N sebanyak 5 mL dan distirer selama 1 jam menggunakan *hot plate stirrer*. Selanjutnya ditambahkan natrium bikarbonat hingga pH-nya netral (Imamah, N., dkk., 2015).

3.5.5 Partisi Ekstrak Pekat Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

Partisi ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan pelarut petroleum eter. Ekstrak ditambahkan pelarut petroleum eter sebanyak 12,5 mL kemudian dikocok dan didiamkan sehingga terbentuk dua lapisan organik dan lapisan air. Hasil partisi dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* dan dialiri gas N₂. Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian ditimbang dan dihitung randemennya (Hidayah, H., dkk., 2015).

3.5.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP

Pemisahan senyawa steroid dilakukan pada ekstrak hasil partisi fraksi petroleum eter menggunakan KLTP. Pemisahan dengan KLTP menggunakan plat silika G₆₀F₂₅₄ berukuran 20x10 cm² yang telah diaktivasi dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100 °C selama 30 menit. Pemisahan senyawa steroid dilakukan dengan cara ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* ditotolkan pada jarak ± 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler sebanyak 7 kali totolan yang diselingi dengan pengeringangan. Kemudian dielusi menggunakan eluen n-heksan : etil asetat (4 :1) (Marliana, E., 2007). Noda/bercak hasil pemisahan selanjutnya diamati dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Desianti, N., dkk., 2014).

3.5.7 Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH

3.5.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Etanol 95 % dipipet sebanyak 4,5 mL kemudian ditambahkan larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1,5 mL, dimasukkan kedalam kuvet hingga penuh. Selanjutnya dicari $\lambda_{\max}$ DPPH dan dicatat hasil pengukuran $\lambda_{\max}$ untuk digunakan pada tahap selanjutnya (Hanani, E., dkk., 2005).

3.5.7.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Sampel

Masing-masing isolat dilarutkan dalam pelarut etanol 95 % dengan konsentrasi 50 ppm dan diuji aktivitas antioksidannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada $\lambda_{\max}$ yang telah didapatkan. Selanjutnya hasil uji aktivitas antioksidan yang terbaik divariasi konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm. Ekstrak masing-masing konsentrasi dipipet 4,5 mL dan ditambahkan 1,5 mL DPPH 0,2 mM kemudian diinkubasi dengan suhu 37 °C selama 90 menit, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada $\lambda_{\max}$ yang telah didapatkan. Data absorbansinya yang diperoleh dari tiap konsentrasi masing-masing ekstrak dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya (Arindah, D., dkk., 2010):

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

Selanjutnya dihitung nilai EC_{50} nya dengan memperoleh persamaan regresi menggunakan program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing doseresponse data*”.

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

3.5.8 Identifikasi Senyawa Steroid menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

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

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa grafik dan angka yang kemudian dideskripsikan hasilnya. Hasil aktivitas antioksidan berupa data angka yang dinyatakan dalam EC_{50} . Identifikasi senyawa steroid dapat diketahui dengan melakukan analisis hasil uji KLT dari pengukuran jarak migrasi dan bentuk bercak noda senyawa pada dua fasa yang berbeda menggunakan parameter nilai R_f dan memperhatikan profil hasil pemisahan dari KLTP. Hasil Identifikasi juga diperoleh dari spektrofotometer UV-Vis berupa spektra UV yang kemudian dibandingkan menggunakan literatur dan dihitung panjang gelombangnya berdasarkan woodward-fischer.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Chlorella sp.* hasil kultivasi dengan MET 4%. Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan, diantaranya adalah (1) kultivasi mikroalga *Chlorella sp.*; (2) pemanenan mikroalga *Chlorella sp.* dan preparasi sampel; (3) penentuan kadar air mikroalga *Chlorella sp.*; (4) ekstraksi senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.*; (5) hidrolisis asam dilanjutkan partisi ekstrak pekat metanol dengan pelarut petroleum eter; (6) pemisahan senyawa steroid dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) preparatif; (7) uji aktivitas antioksidan hasil isolasi dengan KLTP dan (8) Identifikasi UV-Vis.

4.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

4.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)

Teknik penumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan Medium Ekstrak Tauge (MET) ini berfungsi sebagai makanan bagi mikroalga *Chlorella sp.* Medium Ekstrak Tauge didapat dari hasil rebusan tauge dalam aquades menggunakan perbandingan 1:5 yang berwarna kekuningan keruh. Hal ini menunjukkan kandungan yang ada dalam tauge telah terekstrak ke dalam air yang kemudian diencerkan dengan aquades sehingga didapatkan ekstrak yang lebih encer dengan konsentrasi MET 4% (v/v) dan menghasilkan warna yang lebih bening.

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

Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan selama 10 hari untuk menumbuhkan *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) sehingga diperoleh biomassa yang lebih banyak. Hasil penelitian dari hari ke-0 hingga hari ke-10 menunjukkan terjadinya perubahan warna pada inokulum. Warna inokulum pada hari ke-0 yaitu hijau kekuningan, setelah beberapa hari hingga hari ke-10 menjadi hijau pekat dan terbentuk endapan hijau tua. Hal ini menunjukkan bahwa mikroalga *Chlorella sp.* dapat tumbuh dengan baik dalam medium ekstrak tauge dan jumlah kepadatan sel *Chlorella sp.* mengalami perubahan. Selain itu perubahan warna yang terjadi mengindikasikan bahwa terdapat peningkatan kadar klorofil pada mikrolaga dimana klorofil tersebut pigmen utama dari mikroalga tersebut. Hasil pengamatan perubahan warna mikroalga *Chlorella sp.* selama kultivasi ditunjukkan pada Lampiran 7.

4.1.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Pemanenan mikrolaga *Chlorella sp.* dilakukan dengan tujuan mendapatkan biomassa yang akan digunakan dalam penelitian lebih lanjut yaitu identifikasi senyawa aktif yang terdapat dalam mikroalga serta uji aktivitasnya. Pemanenan dilakukan di hari ke-10 yang merupakan fase stasioner dari fase pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.*. Proses pemanenan dilakukan dengan mengumpulkan endapan / biomassa yang berwarna hijau pekat yang dihasilkan. Campuran filtrat dan biomassa hasil pemanenan dipisahkan menggunakan *sentrifuge* yang kemudian filtrat dan biomassa dapat dipisahkan. Hasil yang diperoleh berupa

biomassa dengan tekstur yang lebih pekat dan masih mengandung sedikit air di dalamnya.

Biomassa mikroalga *Chlorella sp.* yang didapat dikeringanginkan pada suhu ruang selama $\pm 2 - 3$ hari. Hal ini bertujuan untuk mengurangi kadar air yang terkandung dalam biomassa mikroalga *Chlorella sp.* sehingga tidak akan mengganggu proses ekstraksi. Proses pengeringan biomassa tidak boleh langsung kontak dengan sinar matahari. Hal ini karena panas matahari dapat merusak komposisi senyawa aktif seperti terjadinya oksidasi senyawa aktif (Robinson, 1995). Selain itu, pengeringan juga bertujuan untuk mencegah tumbuhnya jamur saat penyimpanan sampel sehingga senyawa aktif yang ada di dalam sampel tidak terkontaminasi. Biomassa yang telah kering dikerok dan ditutup rapat dengan alumunium foil untuk mencegah terjadinya kontaminasi sampel oleh bakteri yang tidak diinginkan, sehingga diperoleh mikroalga berbentuk serbuk kering berwarna hijau tua dengan randemen sebesar 1,5705 %.

4.2 Analisis Kadar Air Mikroalga *Chlorella sp.*

Penentuan kadar air dilakukan untuk mengetahui kadar air yang terkandung dalam sampel mikroalga *Chlorella sp.* setelah dikeringkan. Hal ini dilakukan untuk mengetahui ketahanan sampel terhadap penyimpanan. Sampel yang kadar airnya rendah akan cenderung tidak mudah ditumbuhi mikroorganisme saat penyimpanan sampel. Selain itu pentingnya analisis kadar air karena kandungan air dalam sampel mikroalga *Chlorella sp.* dapat mempengaruhi proses ekstraksi. Hal ini dikarenakan semakin rendah kadar air

pada sampel maka metabolit sekunder yang ada dalam sampel akan mudah terakstrak oleh pelarut (Nurmilla, 2009).

Setyowati (2009) dalam Nurmilla (2009) menyatakan bahwa dalam proses ekstraksi, maksimum kadar air yang disyaratkan agar proses ekstraksi dapat berlangsung maksimal yaitu sebesar 11%. Analisis kadar air mikroalga *Chlorella sp.* dinyatakan dalam persen selisih berat sampel sebelum dan setelah dikeringkan. Analisis kadar air dilakukan pada biomassa *Chlorella sp.* kering untuk mengetahui kadar air sampel yang akan diekstraksi. Hasil analisis kadar air mikroalga *Chlorella sp.* kering diperoleh sebesar 10,25%. Hal ini menunjukkan bahwa proses pengeringan dengan diangin-anginkan cukup efektif untuk menurunkan kadar air dalam biomassa *Chlorella sp.* Serta proses pengeringan ini juga tidak merusak kandungan senyawa yang ada dalam sampel.

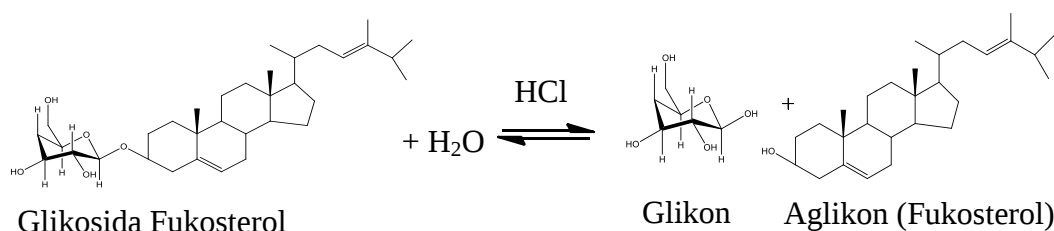
4.3 Ekstraksi Senyawa Steroid Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstraksi maserasi bertujuan untuk memisahkan senyawa aktif yang terdapat di dalam mikroalga *Chlorella sp.* dengan cara perendaman menggunakan pelarut metanol *p.a.* Pemilihan pelarut metanol dikarenakan kebanyakan senyawa steroid di alam masih berada dalam bentuk glikosidanya sehingga digunakan pelarut yang bersifat polar seperti metanol. Proses maserasi dilakukan hingga 5 kali ekstraksi untuk memaksimalkan ekstrak yang akan didapatkan karena dimungkinkan masih terdapat senyawa-senyawa aktif dalam residu sehingga dapat memperbesar nilai randemen. Warna filtrat yaitu hijau kehitaman dan filtrat yang diperoleh tersebut dikumpulkan menjadi satu untuk dipekatkan menggunakan *rotary evaporator vacuum*.

Hasil pemekatan dengan *rotary evaporator vacuum* kemudian dialiri gas N_2 untuk menghilangkan sisa pelarut dalam ekstrak. Hasil ekstrak tersebut diperoleh dalam bentuk padatan pekat berwarna hijau tua karena diduga kandungan klorofil yang terdapat pada mikroalga *Chlorella sp.* bersifat tidak larut dalam air melainkan larut dalam pelarut organik, sehingga saat maserasi klorofil kontak dengan metanol dan ikut tertarik sehingga ekstrak berwarna hijau (Dwidjoseputro,D., 1994). Ekstrak pekat selanjutnya ditimbang untuk diketahui berat randemennya. Adapun nilai rendemen hasil ekstrak metanol pada penelitian ini sebesar 21,8926 % dari 30,0005 gram diperoleh 6,5679 gram.

4.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol

Hidrolisis dilakukan dengan menggunakan HCl berair untuk memutuskan ikatan glikosida antara glikon dan aglikon. HCl merupakan asam kuat yang mudah melepas ion H^+ dalam air, konsentrasi ion H^+ inilah yang mempengaruhi kecepatan proses pemutusan ikatan glikosida. Pemilihan HCl sebagai katalis karena sifat garam yang terbentuk pada penetralan (NaCl) tidak menimbulkan gangguan. Penetralan bertujuan menghentikan reaksi hidrolisis yang merupakan reaksi reversible (bolak-balik), sehingga apabila tidak dihentikan maka akan terbentuk kembali ikatan glikosida antara glikon dan aglikon. Dugaan reaksi pemutusan glikosida ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Dugaan reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida (Mardiyah, 2012).

Hasil hidrolisis ditambahkan dengan natrium bikarbonat untuk menetralkan HCl sisa hidrolisis hingga pH netral. Pengecekan kenetralan larutan diamati pada perubahan fisik larutan yaitu sampai gelembung-gelembung (gas CO₂) pada larutan menghilang dan penggunaan pH universal. Reaksi penetralan yang terjadi saat penambahan natrium bikarbonat ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Reaksi HCl dan Natrium bikarbonat (Mardiyah, 2012)

Hasil hidrolisis kemudian dipartisi menggunakan pelarut petroleum eter. Ekstraksi cair-cair (partisi) bertujuan untuk memisahkan metabolit sekunder yang telah terlepas ikatannya dari gugus gula akibat proses hidrolisis. Proses partisi perlu didiamkan sampai terjadi pemisahan sempurna dan terbentuk dua lapisan fase cair, dan komponen kimia akan terpisah ke dalam kedua fase tersebut sesuai dengan tingkat kepolarannya dengan perbandingan konsentrasi yang tetap.

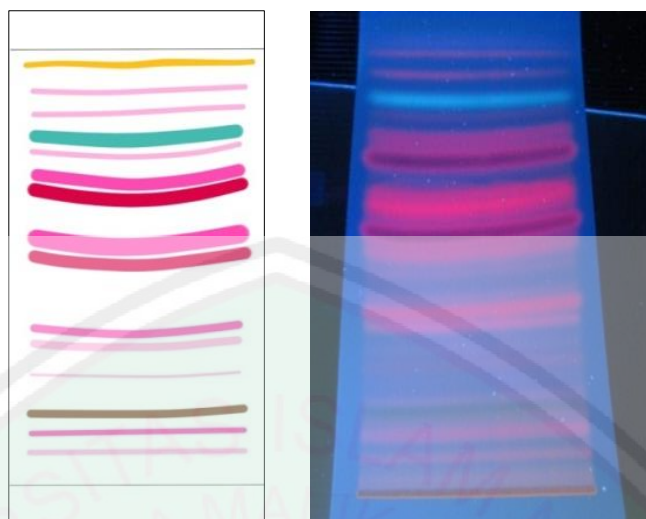
Hasil partisi ini terbentuk dua lapisan yang tidak saling bercampur yaitu lapisan fase air yang bersifat polar dan lapisan fase organik yang bersifat semi polar atau non polar. Fase air mengandung sisa-sisa pelarut metanol, NaCl, dan komponen gula (glikon) sedangkan fase organik mengandung metabolit sekunder (aglikon) yang terdistribusi dalam pelarut petroleum eter dan telah terpisah dengan komponen gulanya. Lapisan atas merupakan fase organik yang berwarna hijau tua sedangkan lapisan bawah merupakan fase air yang berwarna hijau pucat karena densitas petroleum eter (0,77 g/mL) lebih kecil daripada densitas air (1 g/mL). Proses partisi dilakukan 5 kali pengulangan sampai lapisan bawah

berwarna bening. Fraksi hasil partisi dipekatkan dengan diuapkan lalu dialiri dengan gas N₂ untuk menghilangkan sisa-sisa pelarut.

Warna fraksi PE yang dihasilkan yaitu hijau kehitaman dengan randemen hasil fraksi petroleum eter pada penelitian ini sebesar 50,6299 %. Hasil randemen yang diperoleh lebih sedikit dibandingkan penelitian sebelumnya (Hanif, 2015) yang mencapai 78,0548 %. Perbedaan hasil fraksi dikarenakan kadar air yang terdapat pada penelitian tersebut lebih kecil dibandingkan dengan kadar air penelitian ini yaitu 9,5503% dan lama waktu pengeringan sampel 5 – 7 hari.

4.5 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT-Preparatif

KLT Preparatif digunakan untuk memisahkan senyawa steroid dari sampel fraksi petroleum eter. Fraksi petroleum eter ditotolkan di sepanjang plat sebanyak 7 totolan di titik yang sama menggunakan pipa kapiler. Sebelum dilakukan pengelusan, eluen campuran n-heksana dan etil asetat (fase gerak) dilakukan penjenuhan terlebih dahulu. Hal ini bertujuan untuk menjenuhkan uap eluen dalam bejana agar campuran eluen dapat mengelusi sampel dengan baik dan dapat mempercepat pemisahan senyawa hingga terbentuk pemisahan noda yang baik. Setelah terelusi hingga batas atas, noda-noda pada permukaan plat diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. Hasil pemisahan senyawa steroid fraksi petroleum eter dengan KLT preparatif ditunjukkan pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Hasil KLT Preparatif fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* dengan eluen n-heksana dan etil asetat (4:1)

Berdasarkan Gambar 4.3 pemisahan senyawa pada fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* dengan eluen n-heksana dan etil asetat (8:2) menghasilkan 15 noda. Hasil noda ke-4 diduga merupakan senyawa steroid dimana noda tersebut menghasilkan warna hijau kebiruan ketika dideteksi di bawah lampu UV 366 nm (Babu, dkk., 2015) (Sulastry dan Kurniawati, 2010) (Aprelia, 2013) (Astuti, 2014). Warna yang dihasilkan jelas dan memiliki jarak dengan noda lainnya sehingga mudah untuk dikerok. Penampakan noda hijau kebiruan pada sinar UV 366 nm disebabkan karena adanya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh aksamokrom yang terdapat pada noda tersebut sehingga noda akan berfluoresensi. Fluoresensi warna yang tampak tersebut merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron yang tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi tinggi. Perbedaan energi emisi yang dipancarkan pada saat kembali ke energi dasar inilah

yang menyebabkan perbedaan fluoresensi warna yang dihasilkan oleh tiap noda (Rohman dan Gandjar, 2007).

Tabel 4.1 Hasil KLT preparatif senyawa steroid fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* pada eluen n-heksana:etil asetat (8:2) dideteksi dibawah lampu UV λ 366 nm

No	Warna noda di bawah sinar UV pada λ 366 nm	Nilai Rf	Dugaan Senyawa
1	Jingga	0,9638	-
2	Merah muda	0,8944	-
3	Merah muda	0,8388	-
4	Hijau kebiruan	0,7777	Steroid
5	Merah muda	0,7388	-
6	Merah muda menyala	0,6777	-
7	Merah hitam	0,6333	-
8	Merah muda menyala	0,5555	-
9	Merah hitam	0,4777	-
10	Merah muda menyala	0,3194	-
11	Merah muda	0,2888	-
12	Merah muda	0,2222	-
13	Coklat	0,1388	-
14	Merah muda menyala	0,0972	-
15	Merah muda	0,0583	-

Senyawa yang memiliki Rf rendah bersifat lebih polar karena tertahan oleh fase diamnya yang merupakan silika gel yang bersifat polar dari eluen. Sedangkan noda yang memiliki Rf yang lebih tinggi bersifat kurang polar karena cenderung terikat pada fase geraknya sebagaimana prinsip *like dissolve like*. Senyawa steroid ditunjukkan pada noda ke-4 yang bersifat non polar karena lebih tertarik pada eluen yang bersifat kurang polar dari fase diamnya.

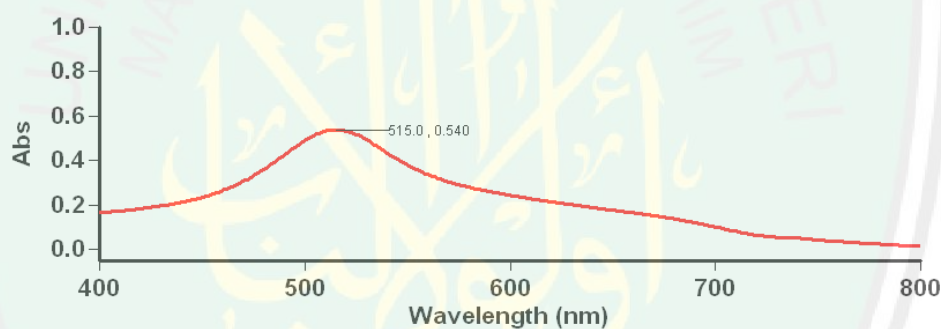
Isolat yang digunakan pada tahap selanjutnya adalah isolat nomer 4 dengan dugaan senyawa steroid yang berwarna hijau kebiruan. Isolat tersebut dikerok dan dilarutkan dengan pelarutnya yaitu petroleum eter kemudian disentrifuge hingga silika berwarna putih yang menandakan bahwa senyawa yang

ada telah larut dalam pelarutnya. Filtrat yang diperoleh didekantasi dan diuapkan hingga pelarut benar-benar telah menguap habis didalam botol vial. Kemudian dilanjutkan dengan menggunakan pelarut etil asetat. Hasil yang diperoleh dari pemisahan menggunakan KLTP sebesar 2 mg.

4.6 Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH

4.6.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Panjang gelombang maksimum larutan DPPH 0,2 mM ditunjukkan pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 λ_{maks} DPPH 0,2 mM

Pengujian aktivitas antioksidan terhadap isolat hasil KLTP fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* diawali dengan penentuan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) larutan DPPH 0,2 mM. Tujuan dilakukannya pengukuran panjang gelombang maksimum adalah untuk mengetahui panjang gelombang yang memiliki serapan tertinggi pada 515,0 nm dengan absorbansi sebesar 0,540. Panjang gelombang maksimum yang didapat akan digunakan untuk uji aktivitas antioksidan pada isolat hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.*. DPPH memiliki warna komplementer ungu karena memiliki elektron yang tidak

berpasangan dan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 515-520 nm (Mardiyah, 2012) (Kuntorini, 2010).

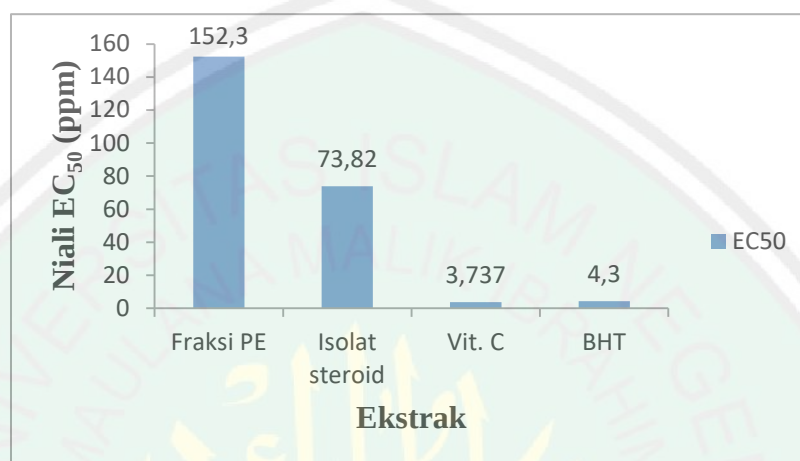
4.6.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan pada Isolat Steroid

Pengujian aktivitas antioksidan ini dilakukan pada fraksi petroleum eter dan isolat senyawa steroid hasil KLTP dengan variasi konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm, selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 515 nm. Pengukuran aktivitas antioksidan pada isolat menggunakan larutan kontrol 0,2 mM. Untuk menghindari terjadinya perubahan nilai yang signifikan maka dalam hal ini penggunaan larutan DPPH selalu dalam keadaan baru (*fresh*).

Absorbansi kontrol dan absorbansi isolat yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menentukan persen (%) aktivitas antioksidan. Persen aktivitas antioksidan menunjukkan kemampuan suatu antioksidan dalam menghambat radikal bebas (dalam bentuk %). Persen aktivitas antioksidan menunjukkan banyaknya atom hidrogen dari senyawa antioksidan yang menangkap radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyn*) (Rahayu *et al.*, 2010). Hasil pengukuran aktivitas antioksidan yang dilakukan tidak memberikan perubahan warna kuning akan tetapi memberikan gradasi warna menjadi ungu muda (memudar).

Parameter yang digunakan dalam penentuan aktivitas antioksidan adalah persen aktivitas antioksidan dan nilai EC_{50} . Persen (%) aktivitas antioksidan yang diperoleh dianalisis menggunakan persamaan regresi non linier dengan *GraphPad prism5 software, Regression for analyzing doseresponse data*, sehingga didapatkan nilai EC_{50} dari masing-masing isolat. EC_{50} merupakan konsentrasi

larutan substrat atau sampel yang mampu mereduksi aktivitas DPPH sebesar 50 %. Semakin kecil nilai EC_{50} berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan (Molyneux, 2004). Data nilai EC_{50} ditunjukkan pada Gambar 4.5.



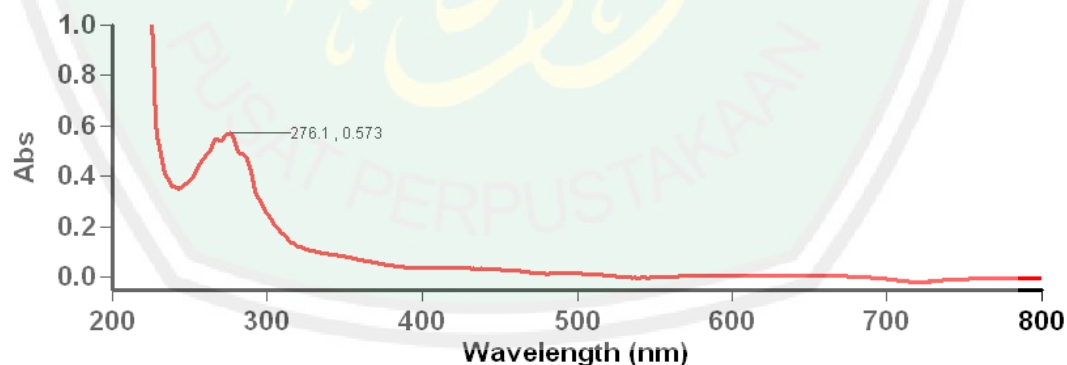
Gambar 4.5 Nilai EC_{50} aktivitas antioksidan dan pembanding

Nilai EC_{50} pada Gambar 4.5 menunjukkan bahwa fraksi PE merupakan hasil hidrolisis asam yang dilanjutkan dengan partisi menggunakan pelarut petroleum eter. Sedangkan isolat senyawa steroid merupakan hasil pemisahan senyawa yang diduga steroid dari fraksi PE menggunakan metode KLTP. Isolat senyawa steroid memiliki nilai EC_{50} lebih kecil dibandingkan dengan fraksi PE. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat senyawa steroid setelah dipartisi menggunakan pelarut petroleum eter yang kemudian dipisahkan dengan KLTP memiliki potensi aktivitas antioksidan yang lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak sebelum dipisahkan dengan KLTP. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai EC_{50} bernilai kurang dari 50 ppm, kuat jika bernilai 50 – 100 ppm, sedang jika bernilai 100 – 150 ppm dan lemah jika bernilai 150 – 200 ppm (Hidajat, 2005). Isolat senyawa steroid termasuk dalam

antioksidan yang kuat yaitu dengan penambahan antioksidan dari isolat sebanyak 73,82 ppm larutan uji akan menangkap radikal bebas sebanyak 50 % dari total radikal bebas. Sedangkan fraksi PE termasuk dalam antioksidan lemah karena memiliki EC_{50} 152,3 ppm. Hal ini menunjukkan adanya senyawa lain yang diduga bekerja secara antagonis dalam fraksi PE karena efek antagonis suatu senyawa tersebut dapat menyebabkan penurunan aktivitas senyawa lainnya sehingga aktivitas antioksidan fraksi PE menjadi lemah.

4.7 Identifikasi Senyawa Steroid Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Uji yang digunakan untuk mengidentifikasi adanya golongan senyawa steroid pada mikroalga *Chlorella sp.* yaitu menggunakan instrumen UV-Vis. Spektra UV-Vis dari isolat KLTP fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* dapat dilihat pada Gambar 4.6.

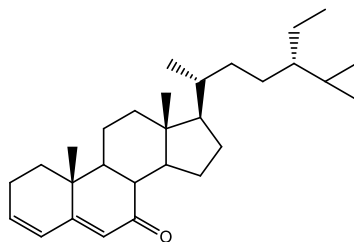


Gambar 4.6 Hasil spektra UV-Vis isolat senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.*

Hasil analisis pola serapan panjang gelombang maksimum yang dihasilkan dari isolat senyawa steroid fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* menunjukkan panjang gelombang maksimum 276 nm dengan absorbansi

maksimum sebesar 0,573. Panjang gelombang maksimum tersebut menunjukkan bahwa hasil penelitian ini sesuai dengan milik Susilawati (2010) bahwa spot warna hijau kebiruan hasil isolasi dengan KLT memberikan serapan panjang gelombang 271 nm dengan dugaan senyawa steroid. Selain itu, isolasi senyawa steroid juga teridentifikasi pada alga merah *Gracilaria edulis* oleh Dast, B. dan Srinivas, K. (1992) yang menunjukkan panjang gelombang maksimum 278 nm pada senyawa steroid poriferasta-3,5-dien-7-on. Hal ini menunjukkan bahwa pada serapan 276 nm memiliki ikatan rangkap terkonjugasi yang sesuai dengan kaidah Woodward-Fieser dalam meramalkan serapan maksimum untuk sistem diena menggunakan harga dasar 214 nm dan didapat panjang gelombang berdasarkan perhitungan Woodward-Fieser sebesar 279 nm (Lampiran 6).

Hasil panjang gelombang tersebut didukung dengan analisis FTIR mikroalga *Chlorella sp.* oleh Handoko, S. (2016) yang menunjukkan adanya ikatan C=C dengan pita serapan $1647,70\text{ cm}^{-1}$ dan rentangan C=O pada daerah serapan 1738 cm^{-1} . Selain itu, pita serapan $2927,49\text{ cm}^{-1}$ dan $2856,61\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan kemungkinan adanya gugus metil (CH_3) dan metilen (CH_2). Dugaan ini diperkuat dengan adanya vibrasi C-H tekuk pada pita serapan $1463,42\text{ cm}^{-1}$ dan $1383,73\text{ cm}^{-1}$. Adanya vibrasi C-H tekuk pada spektra inframerah mengindikasikan adanya gugus gem dimetil yang lazim ditemukan pada senyawa steroid. Berdasarkan hasil tersebut maka isolat senyawa steroid hasil KLTP pada penelitian ini diduga merupakan senyawa steroid dengan dugaan struktur seperti Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Dugaan senyawa steroid poriferasta-3,5-dien-7-on (Dast dan Srinivas, 1992)

4.8 Pemanfaatan Mikroalga *Chlorella sp.* dalam Prespektif Islam

Nikmat Allah yang diberikan kepada manusia salah satunya yaitu tumbuhan. Allah menciptakan berbagai macam tumbuhan yang banyak manfaatnya. Oleh karena itu, Allah menyuruh kita untuk terus mempelajarinya hingga muncullah berbagai eksperimen untuk mengetahui potensi dan manfaat yang telah diciptakan. Dalam Alqur'an terdapat banyak ayat yang menjelaskan tentang macam-macam tumbuhan dan manfaatnya. Salah satu ayat Alquran yang menjelaskan tentang tumbuhan terdapat dalam surat Luqman ayat 10.

Firman Allah SWT dalam surat Luqman ayat 10:

خَلَقَ السَّمَاوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا وَالْأَرْضِ رَوَاسِيَ أَنْ تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا
مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ ۚ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ [١٠]

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

Sebagaimana beberapa para ahli tafsir menjelaskan bahwa Allah telah menurunkan air hujan sebagai zat-zat yang dibutuhkan tumbuhan dan menciptakan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang memiliki manfaat, yang kemudian segala sesuatu tumbuhan tersebut tumbuh subur dan menghasilkan apa yang diharapkan dari penanamannya.

Tumbuh-tumbuhan yang baik dapat dimanfaatkan sebagai bahan obat-obatan yang dapat dikembangkan dalam ilmu farmasi. Proses memanfaatkan tumbuhan sebagai obat merupakan salah satu sarana untuk mengambil pelajaran dan memikirkan tentang kekuasaan Allah dan meneladani cara pengobatan Rasulullah SAW. Salah satu tumbuhan ciptaan Allah SWT yang memiliki manfaat sebagai tumbuhan obat adalah mikroalga *Chlorella sp.*

Manusia diperintahkan untuk memahami bahwa sesungguhnya Allah menciptakan penyakit tentu disertai dengan obatnya. Salah satunya menemukan obat-obatan untuk menyembuhkan penyakit dengan cara pemanfaatan mikroalga *Chlorella sp.* sebagai tumbuhan obat. Hasil pemanfaatan mikroalga *Chlorella sp.* dibuktikan dengan penelitian pengambilan senyawa aktif hasil penggunaan kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) yaitu senyawa steroid dari fraksi petroleum eter. Senyawa steroid ini ditunjukkan dengan noda tunggal yang berwarna hijau sehingga dapat diasumsikan bahwa isolat steroid tersebut sudah murni dengan menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (4 : 1) dan hasil identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan panjang gelombang maksimum 276 nm.

Berdasarkan penelitian, mikroalga *Chlorella sp.* mengandung senyawa steroid yang dapat berpotensi sebagai senyawa antibakteri (Khamidah, 2013) dan sebagai antioksidan (Anggraeni, 2013). Hasil EC_{50} uji aktivitas antioksidan pada penelitian ini sebesar 73,82 ppm sehingga dengan memisahkan senyawa murni dari mikroalga *Chlorella sp.* masih dapat berpotensi sebagai antioksidan yang cukup baik. Hal ini membuktikan bahwa tanda kebesaran Allah bagi manusia yang mau berpikir, selain itu membuktikan bahwa mikroalga *Chlorella sp.*

merupakan salah satu tumbuhan yang diciptakan Allah untuk memberikan manfaat yang besar bagi manusia.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Aktivitas antioksidan isolat senyawa steroid hasil pemisahan menggunakan KLTP pada fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* memiliki nilai EC_{50} sebesar 73,82 ppm.
2. Identifikasi isolat steroid hasil pemisahan dengan KLTP menggunakan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan bahwa isolat diduga merupakan senyawa steroid yang memiliki panjang gelombang maksimum sebesar 276 nm.

5.2 Saran

Adapun saran dari penelitian ini yaitu pemisahan senyawa steroid dilakukan dengan menggunakan metode kolom agar mendapatkan hasil isolat yang lebih banyak. Kemudian dilanjutkan dengan identifikasi struktur menggunakan alat instrumen yang lain seperti LC-MS, H-NMR dan C-NMR.

DAFTAR PUSTAKA

- al-Jazair, S.A. B. J. 2009. *Tafsir Al-quran Al-Aisar Jilid 2*. Jakarta: Darus Sunnah.
- Amaliyah, S., A. Ghanaim F., Siti Khoirul B., Umi K., A. Hanapi dan Romaidi. 2013. Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Anggraeni, O.N., A. Ghanaim F., Abidin, M., dan A. Hanapi. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan *n*-Heksan Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*. *Alchemy*, Vol. 3 No.2, hal: 173-188.
- AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist, Inc.* Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Aprelia, F. dan Suyatno. 2013. Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etil Asetat Tumbuhan Paku *Christella arida* dan Uji Pendahuluan Sebagai Antikanker. *Journal*. UNESA Journal of Chemistry Vol. 2 No. 3.
- Araújo, L., *et al.* 2013. Total Phytosterol Content in Drug Materials and Extracts from Roots of *Acanthospermum hispidum* by UV-Vis Spectrophotometry. *Journal*. Brazilian Journal of Pharmacognosy 23 (2013): 736-742.
- Arindah, D. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Golongan Senyawa Antioksidan pada Daging Buah Pepino (*Solanum Muricatum aiton*) yang Berpotensi sebagai Antioksidan. *Skripsi* Tida Diterbitkan. Malang: Universitas Islam Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Astuti, M., Abdi Maulana, dan Evi Mintorini. 2014. Isolasi Steroid dari Fraksi *n*-Heksan Batang Bajakah Tampala (*Spatholobus littoralis Hassk.*). *Journal*. Prosiding Seminar Nasional Kimia, ISBN: 978-602-0951-00-3.
- ash-Shiddieqy, T.M.H. 2000. *Tafsir Al-qur'anul Majid An-Nuur*. Semarang: Pustaka Rizki Putra.
- Babu, Johnson, dan Patric. 2015. Identification of green seaweeds *Caulerpa scalpelliformis* (R.Br.) Webervan-Bosse and *Caulerpa corynephora Montagne* Using TLC profile. *Journal of Pharmacognosy and phytochemistry*, 4 (4): 165-168.
- Badarinath, A. V., K. M. Rao, C. M. S. Chetty, S. Ramkanth, T. V. S. Rajan and K. Gnanaprakash. 2010. A review on In-vitro Antioxidant Methods:

Comparisons, Correlations and Considerations. *International Journal of Pharmaceutics Technology Research*, 2 (2) : 1276-1285.

- Bariyyah, S.K., A. Ghanaim F., Munirul A., dan A. Hanapi. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *Skripsi* Tidak diterbitkan. Malang : Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Becker. 1994. *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. London: Cambridge University Press.
- Bhat, S. V., B. A. Nagasampagi dan S. Meenakshi. 2009. *Natural Products: Chemistry and Application*. New Delhi: Narosa Publishing House.
- Bold, H.C.dan Wynne, M.J. 1985. *Introduction to the Algae, Second Edition*. New York : Prentice-Hall Me. Engelwood Cliffs.
- Borowitzka, M.A. dan Lesley, J.B. 1988. *Microalgae Biotechnology*. London: Cambridge University Press.
- Creswell, C. J. 1982. *Analisis Spektrum Senyawa Organik*. Edisi 2, terjemahan K. Padmawinata dan I. Soediro. Bandung: Penerbit ITB.
- Dast, B. dan Srinivas, K. 1991. Minor C₂₉ Steroid From The Marine Gracilaria Edulis. *Journal*. Vol. 31. No. 7.
- De LaNoue dan De Pauw. 1988. The Potential of Microalga Biotechnology : A Review of Production and Uses of Microalgae. *Journal of Biotechnology Advances*. Volume 6.
- Desianti, N., A. Ghanaim F., Tri Kustono A. 2014. Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan N-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Dwidjoseputro, D. 1994. *Pigmen Klorofil*. Erlangga: Jakarta.
- Fessenden, R.J., dan Fessenden, J.S. 1986. *Kimia Organik Cetaka Ketiga*. Pudjaatmaka AH, penerjemah. Bandung: ITB. Terjemahan dari: *Organic chemistry. Third Edition*.
- Hajnos, M., Joseph Sherma, Teresa Kowaiska. 2008. *TLC in Phytochemistry*. New York: CRC Press
- Hanani, E., M. Abdul dan Ryany, S. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dan Spons *Callispongia sp.* dari Kepulauan Seribu. *Majalah Kefarmasian*, II (3): 127-133.

- Handoko, D.S.P. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis. *Jurnal. Jember. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember. SIGMA.Vol.9 No.1 ISSN 1410-5888.*
- Hapsari, F.D. 2008. Analisis Minyak Atsiri dalam Daun Sirih dan Uji Aktivitas Antioksidannya. *Skripsi Program Studi Kimia Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA UPI, Bandung: Tidak Diterbitkan.*
- Harborne, J.B. 1987. *Metode fitokimia Edisi Kedua.* Padmawinata K, Soediro I, penerjemah. Bandung: Penerbit ITB.
- Heftman, E. 1976. *Chromatography of Steroids.* New York: Elsevier.
- Hidayah, H., A. Ghanaim F., A. Hanapi. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid pada Fraksi Petroleum Eter (PE) Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasinya menggunakan FTIR. *Skripsi Tidak Diterbitkan. Malang: Universitas Islam Maulana Malik Ibrahim Malang.*
- Husnah, M. 2009. Identifikasi dan Uji Aktivitas Golongan Senyawa Antioksidan Ekstrak Kasar Buah Pepino (*Solanum Muricatum Aiton*) Berdasarkan Variasi Pelarut. *Skripsi Tidak diterbitkan. Malang: UIN Malang*
- Imamah, N., A. Ghanaim F., Tri Kustono A. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella Sp.* Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (Klt) Dan Identifikasinya Menggunakan Spektrofotometer Ftir. *Skripsi Tidak Diterbitkan. Malang: Universitas Islam Maulana Malik Ibrahim Malang.*
- Imani, A.K.F 2008. Tafsir Nurul Qur'an. Jakarta: Al-Huda.
- Isnansetyo, A. dan Kurniastuty. 1995. *Pakan Alami untuk Pembenihan Organisme Laut.* Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Jhonson, M., et al. 2012. Phytochemical Studies On Laurencia Obtusa (Hudson) Lamourux. *Internatonal Journal of Biomedical and Advance Research.* Hal. 225 – 232.
- Julyasih, S.M, I.G.P Wirawan, W.S. Harijani, W. Widajati. 2009. Aktivitas Antioksidan Beberapa Jenis Rumput Laut (*seaweeds*) Komersial di Bali. *Seminar Nasional.* Fakultas Pertanian dan LPPM UPN "Veteran" Jawa Timur.
- Juniarti, D. Osmeli dan Yuhernita. 2009. Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (Brine Shrimp Lethality Test) dan Antioksidan (1,1-diphenyl-2-pikrilhydrazyl) dari Ekstrak Daun Saga (*Abrus precatorius l.*). *Makara Sains*, 13 (1) : 50-54.

- Kawaroe, M., Ayi R., Abdul H. 2010. Laju Pertumbuhan Spesifik *Chlorella sp.* dan *Dunaliella sp.* Berdasarkan Perbedaan Nutrien dan Fotoperiode. Jilid 16, Nomor 1: 73 – 77.
- Khamidah, U., A. Ghanaïm F. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge Terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Universitas Islam Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Khamidah, U., A. Ghanaïm F., dan Romaidi. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Pada Fase Stasioner Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET). *Alchemy*, Vol.3. No.1: 1-7.
- Khopkar, S.M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Kristanti, A.N, Aminah, N.S., Tanjung, M., Kurniadi, B. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Kumar dan Singh. 1979. *A Text Book on Algae*. London: Macmilan and Co Ltd.
- Kuntorini, E.M. dan M.D. Astuti. 2010. Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bulbus Bawabg Dayak (*Eleutherine americana* Merr). *Sains dan Terapan Kimia*, Vol. 4., No. 1: 15-22.
- Kusmiati, N.W.S., S.R. Agustini, Tamat, dan I. Mellia. 2010. Ekstraksi dan Purifikasi Senyawa Luthein dari Mikroalga *Chlorella pyreniodosa* Galur Lokal Ink. *Kimia Indonesia*, Vol. 5. No. 1: 30-34.
- Lehninger, A. L. 1982. *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers. New York.
- Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida dan Alkaloida. Karya Ilmiah Tidak Diterbitkan. Medan: MIPA Universitas Sumatera Utara.
- Luo, Xuan., *et al.* 2015. Advances in Microalgae-Derived Phytosterols for Functional Food and Pharmaceutical Applications. *Journal Marine Drugs*. 13, 4231-4254.
- Mardiyah, U. 2012. Ekstraksi Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Markham, K. R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: Penerbit ITB.
- Marliana, E. 2007. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Batang *Spatholobus ferrugineus* (Zoll & Moritzi) Bent yang berfungsi sebagai Antioksidan. *Jurnal Penelitian MIPA*. Vol. 7 (1-2): 12-24.

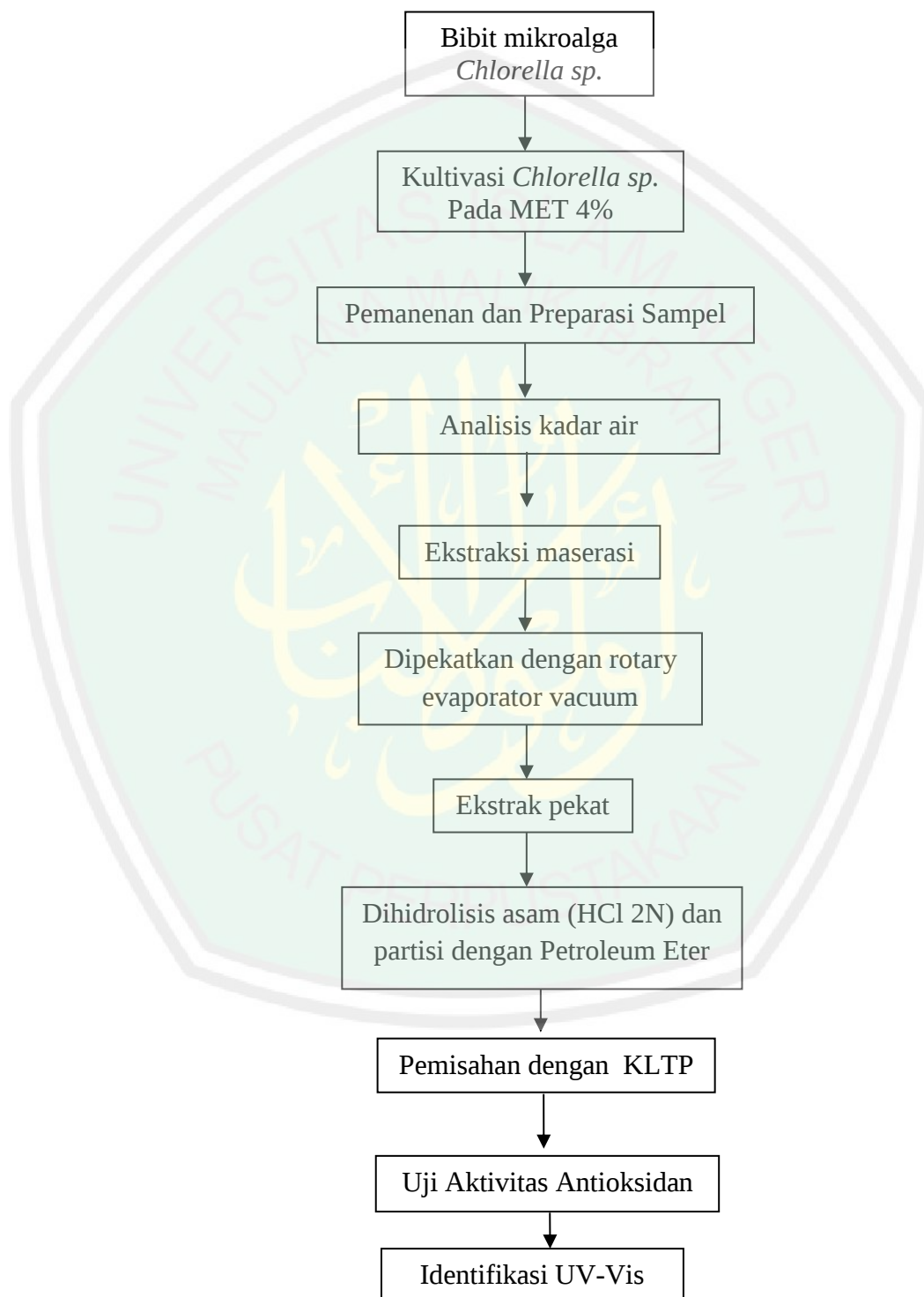
- Maxwell *et al.*, 1994. *Growth at low temperature mimics high-light acclimation in Chlorella vulgaris*. Plant Physiol. 105 : 535-543.
- Molyneux, P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin J. Science Technology*, 26 (2) : 211-219.
- Molyneux, P.. 2003. The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH), for Estimating Antioxidant Activity. *Science and Technology*, XXVI (2): 211-219.
- Noerdin. 1985. *Elusidasi Struktur Senyawa Organik*. Bandung: Penerbit Angkasa.
- Nurmillah, O.Y. 2009. Kajian Aktivitas ANtioksidan dan Antimikroba Ekstrak Biji, Kulit Buah, Batang dan Daun Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas L.*). *Skripsi*. diterbitkan. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian IPB.
- Oh Hama, T. dan S. Miyachi. 1988. *Chlorella. Ln* : M. A. Borowitzka & L. J. Borowitzka (Eds.) Microalga Biotechnology Cambridge Univ. Press
- Oliveira, N. M., Meira, C. L., Aguiar, R., De Oliveira, D. M., Moura, C., Vilho, S. 2015. Biological Activities Of Extracts From Padina Boergesenii And Sargassum Stenophyllum, Seaweeds Naturally Found In Baia De Todos Os Santo, Brazil. *Academic Sciences. Vol. 7. Issue 1*: 351-353.
- Parwata,I.M.O.A., Wiwik, S.R. dan Raditya, Y. 2009. Isolasi dan Uji Anti Radikal Bebas Minyak Atsiri pada Daun Sirih (*Piper betle, Linn*) secara Spektroskopi Ultra Violet-Tampak. *Jurnal Kimia*. III (1): 7-13.
- Prabowo, 2009. Optimasi Pengembangan Media untuk Pertumbuhan *Chlorella sp.* pada Skala Laboratorium. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Prakash, A. 2001. *Antioxidant Activity*. Analytical Chemistry Medallion Laboratories: Analytical Progress, X (2)
- Pranayogi, D. 2003. *Studi Potensi Pigmen Klorofil dan Karotenid dari Mikroalga Jenis Chlophyceae*. Lampung: Universitas Lampung.
- Prihantini, N.H, Putri B., dan Yuniati R.. 2005. Pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan Variasi pH awal. *Makara,Sains*, IX (1): 1-6.
- Prihantini, N. B., Damayanti, D., Dan Yuniati, R. 2007. Pengaruh Konsentrasi Medium Ekstrak Tauge (MET) terhadap Pertumbuhan *Scenedesmus* Isolat Subang. *Makara, Sains*, Vol. 11: 1-9.
- Rahayu.,dkk. 2010. Penentuan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun Ketapang (*Terminalia catappa L*) dengan Metode DPPH. *Skripsi* Diterbitkan. Semarang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro.

- Ramle., dkk. 2008. Study On Antioxidant Activities, Total Phenolic Compound, and Antifungal Properties of Some Malaysian Timbers From Selected Hardwoods Species. *International COnference of Environmental Research and Technology*. 472-475.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: ITB
- Romimohtarto, K.. 2004. *Meroplankton Laut*. Jakarta: Penerbit Djambatan.
- Sachlan, M. 1982. *Planktonologi*. Semarang: UNDP FAO.
- Saksony, A. K. 2011. Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Kasar Tetraselmis chuii Dengan Metode Ekstraksi dan Jenis Pelarut yang Berbeda. *Skripsi*. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya. Malang.
- Sastrohamidjojo, H. 1998. *Sintesis Bahan Alam*. Yogyakarta: UGM Press.
- Savitri. 2008. *Rahasia Tumbuhan Berkhasiat Obat Perspektif Islam*. Malang: UIN Malang
- Shihab, M.Q. 2002. *Tafsir Al Mishbah : pesan, kesan dan keserasian Al Quran*. Jakarta: Lentera Hati.
- Sidabutar, E.A. 1999. Pengaruh Medium Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella sp.* Terhadap Aktivitas Senyawa Pemacu Pertumbuhan yang Dihasilkan. *Skripsi*. TPB
- Srihati dan Carolina. 1995. *Pengaruh Berbagai Media Terhadap Kualitas Algae Bersel Tunggal (Scenedesmus sp.)* Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. LIPI.
- Sriwardani, T. 2000. Pemisahan Ekstrak Intraseluler dari Mikroalga *Chlorella sp.* dan Penentuan Konsentrasi Hambatan Minimum Terhadap Bakteri dan Kapang Patogen. *Skripsi Diterbitkan* . Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Steenblock, D. 2000. *Chlorella: Makanan Sehat Alami*. Terjemahan Muhilal dan U. L. Siagian. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Sulastry dan Kurniawati. 2010. Isolasi dari Ekstrak Metanol Daun Beluntas (*Plucea indica L*). *Jurnal Chemica* Vol.11 Nomor 1 Juni 2010. Hlm. 52 – 56.
- Susilawati, H. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid dari Daun Rimbang (*Solanum Torvum*). *Jurnal Repository university of Riau*.
- Svendsen, A., Verpoorte, R. 1983. *Chromatography of Alkaloids*. New York: Elviesier.

- Taw, N. 1990. *Petunjuk Pemeliharaan Kultur Murni dan Massal Mikroalga. Proyek Pengembangan Udang*. Food and agriculture Organizations of the United Nations.
- Volshak, A. 1990. *Recent Advances in Microalgal Biotechnology. Biotechnology adv*, VIII.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Wulandari, A.P., Frida N., Annisa E.P., dan Dilaekha R.P. 2010. Identifikasi Mikroalgae di Sekitar Pantai Pangandaran dan Potensi Pertumbuhannya pada Formulasi Medium Ekstrak Tauge (MET). *Prosiding Seminar Nasional Limnologi*, V.
- Yudiati, E., Sri S., Sunarsih dan Rani A.. 2011. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Metanol dan Pigmen Kasar *Spirulina sp.* *Ilmu Kelautan*, Vol.16 No. 4: 187-192.
- Yuhernita dan Juniarti. 2011. Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan Antioksidan (1,1-Diphenyl-2-Pikrilhydrazyl) dari Ekstrak Daun Saga (*Abrus Precatorius L.*). *Jurnal. Makara, Sains*, Vol.13, No. 1 : 50-54.

LAMPIRAN

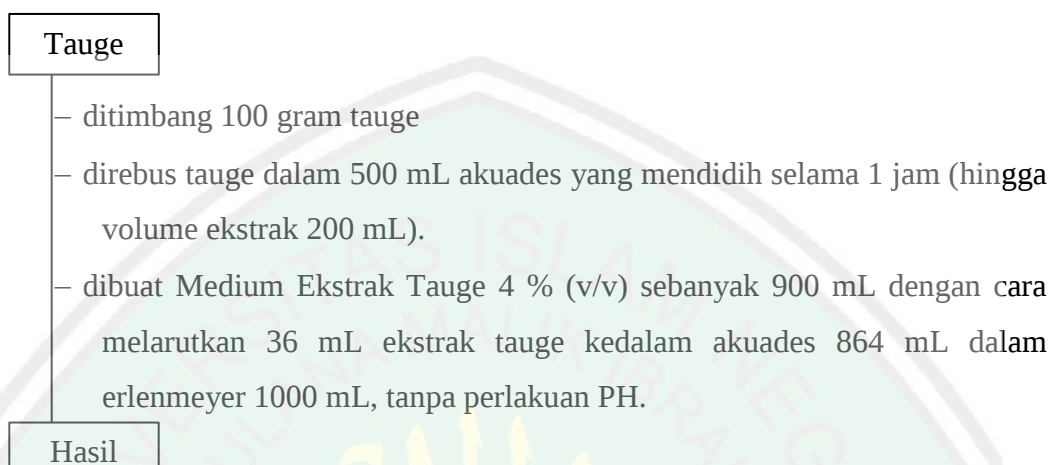
Lampiran 1. Rancangan Penelitian



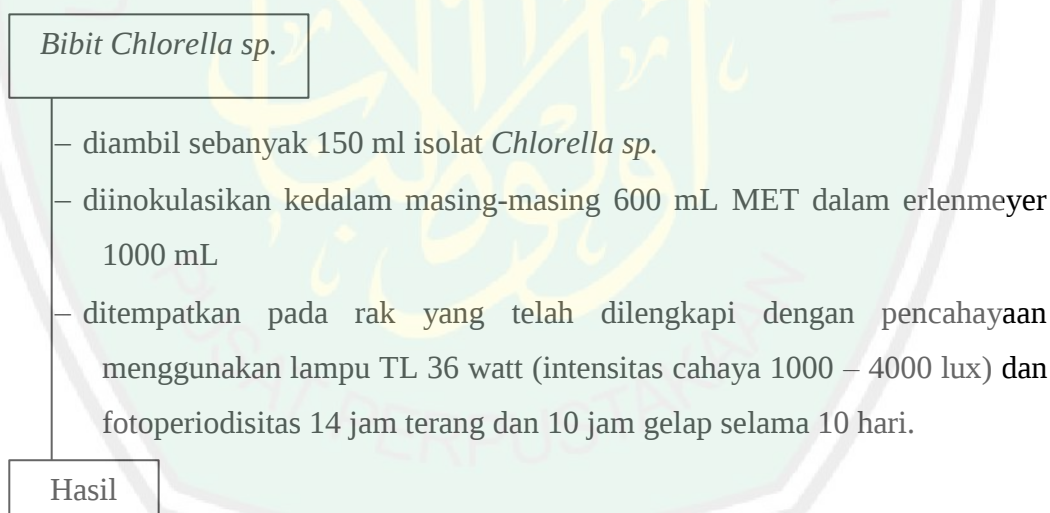
Lampiran 2. Skema Kerja

L.2.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

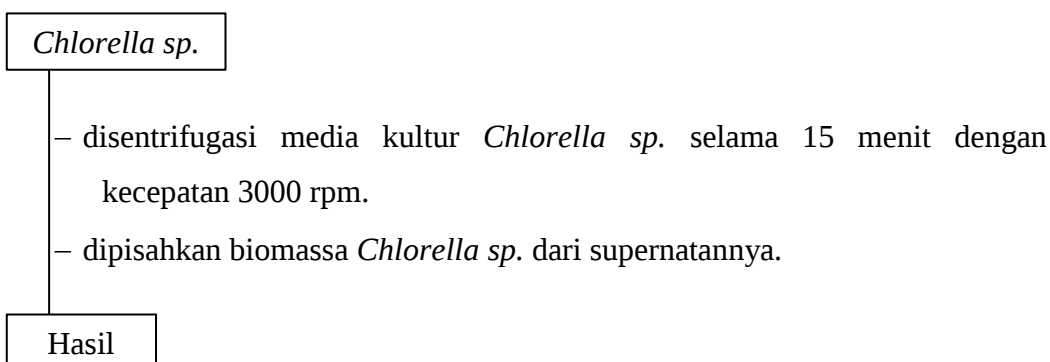
1. Pembuatan Media Ekstrak Tauge



2. Kultivasi *Chlorella sp.*



3. Pemanenan Biomassa *Chlorella sp.*



L.2.2 Preparasi Sampel dan Penentuan Kadar Air

Biomassa <i>Chlorella sp.</i>	Cawan
- diambil sampel biomassa <i>Chlorella sp.</i> seluruhnya - dikeringanginkan pada suhu ruang 25-30 °C selama 48 jam. - ditimbang 0,5 g biomassa <i>Chlorella sp.</i>	- dipanaskan dalam oven suhu 100-105 °C selama 15 menit - disimpan dalam desikator 10 menit - ditimbang - dilakukan perlakuan yang sama hingga diperoleh berat cawan yang konstan.
- dimasukkan biomassa <i>Chlorella sp.</i> kedalam cawan - dikeringkan didalam oven suhu 100-105°C selama 30 menit - dimasukkan dalam desikator - ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama hingga diperoleh berat cawan yang konstan. - dihitung kadar air menggunakan rumus : $\text{Kadar air} = \frac{(b-c)}{b-a} \times 100 \%$	
Hasil	

Dimana :

A=bobot cawan kosong

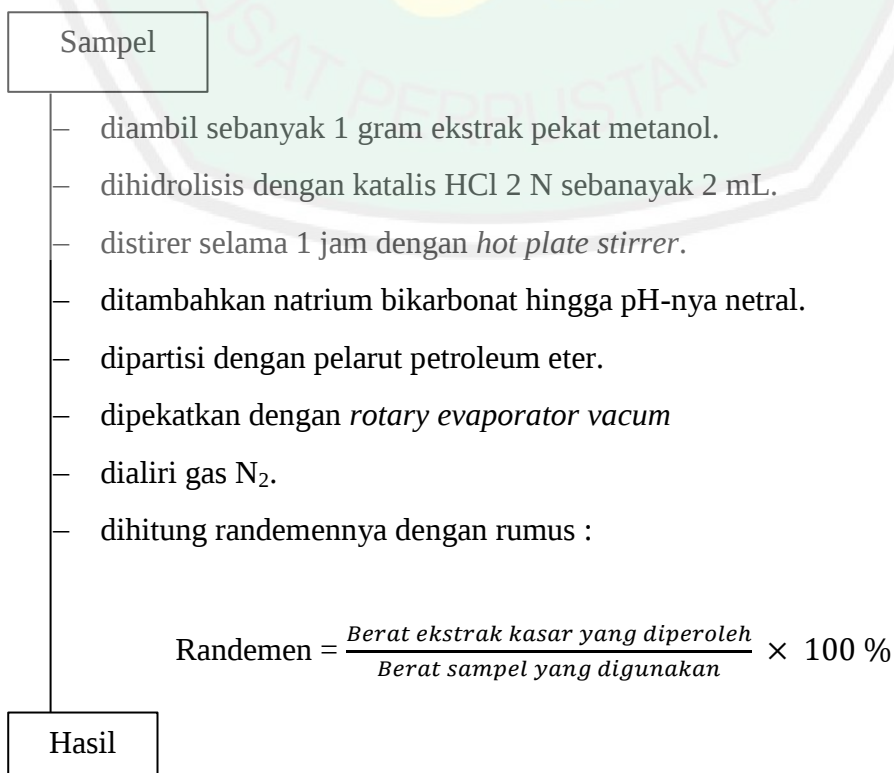
B=bobot sampel + cawan sebelum dipanaskan

C=bobot cawan + sampel setelah dipanaskan

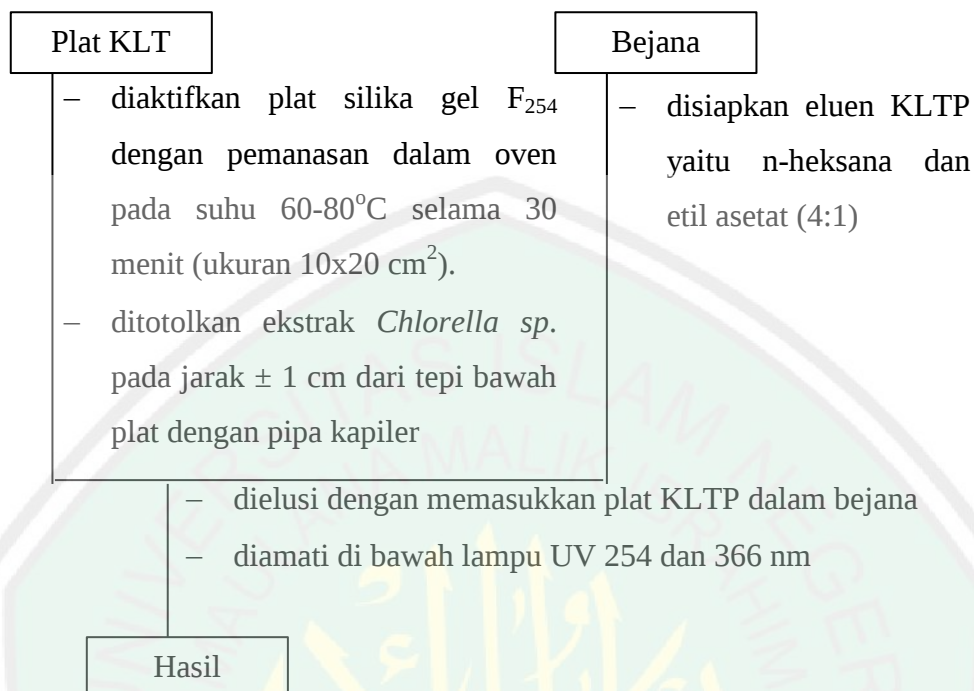
L.2.4 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga *Chlorella sp.*



L.2.5 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

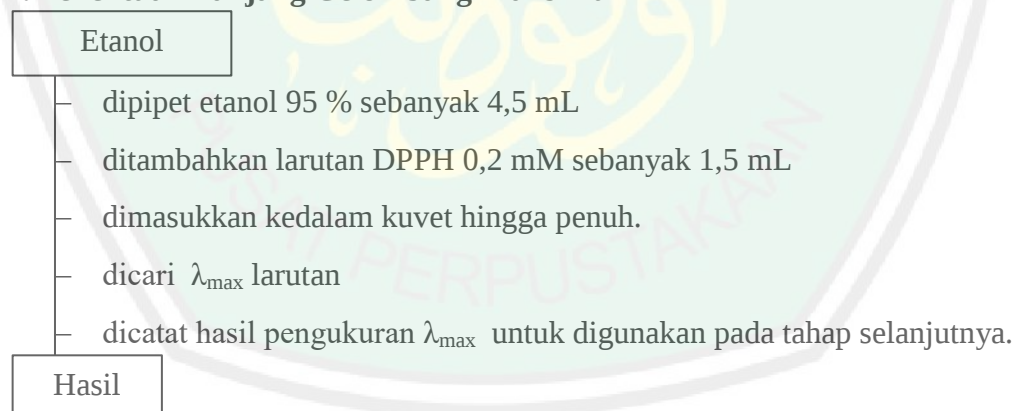


L.2.6 Pemisahan senyawa steroid dengan KLTP

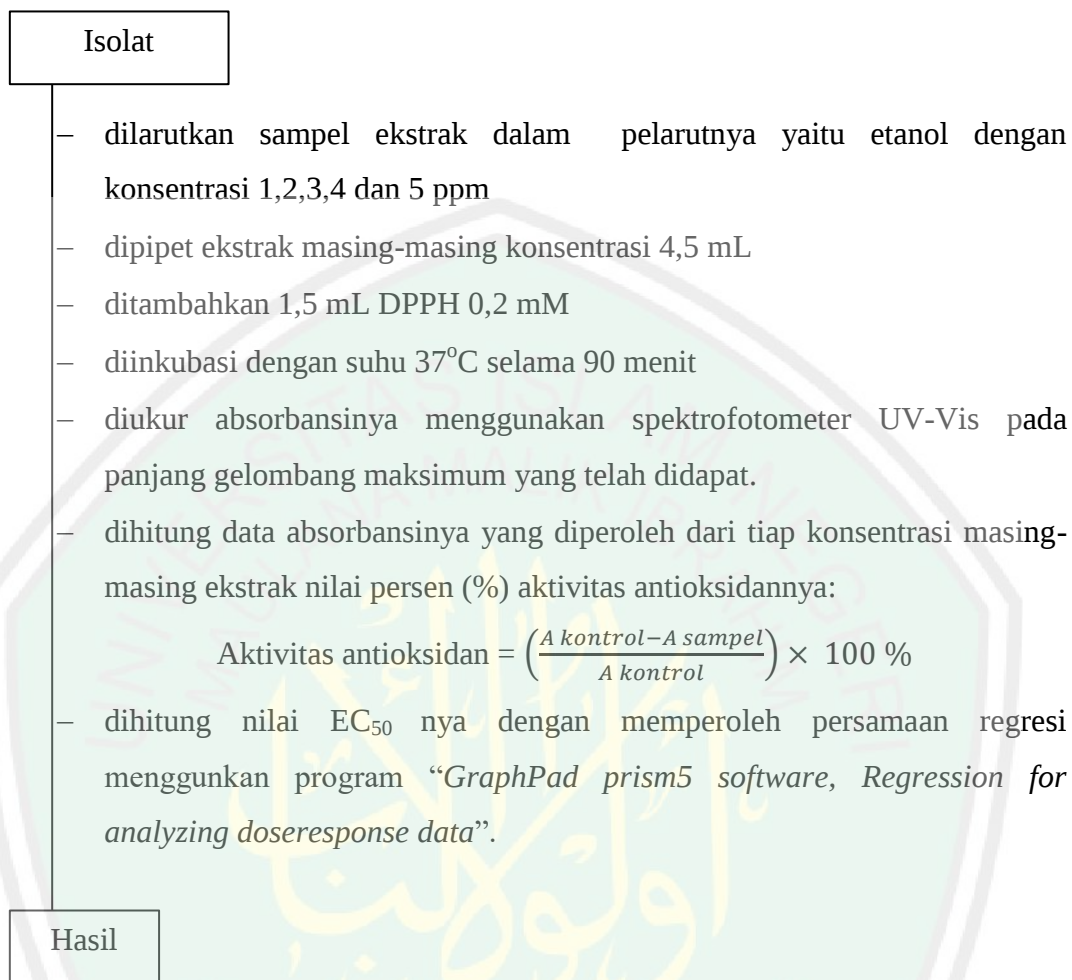


L.2.7 Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH

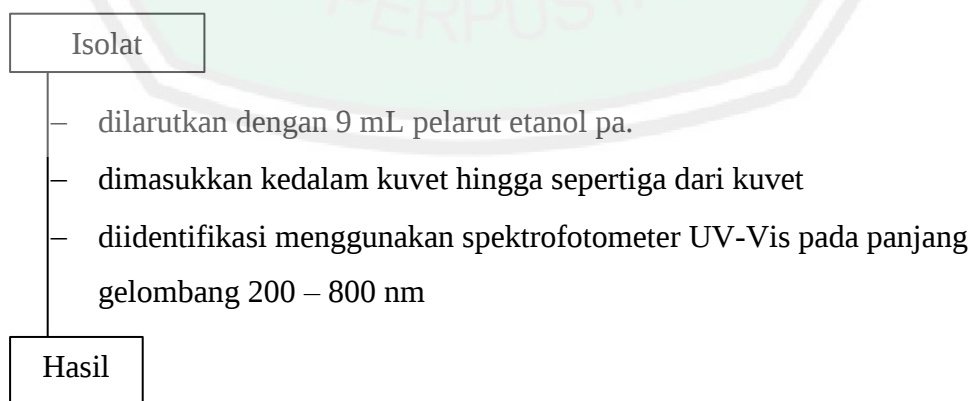
1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum



2. Pengukuran Potensi Antioksidan Pada Sampel



L.2.8 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis



Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Reagen dan Larutan

L.3.1 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam MET

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

- a. Kultivasi dalam Erlenmeyer 1000 ml dengan Memaksimalkan Daya

Tampung Erlenmeyer

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

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

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

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

- b. Pembuatan MET 4% sebanyak 900 ml

MET = (aquades + ekstrak taugé)

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

$$= 36 \text{ mL ekstrak taugé}$$

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

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

$$= 864 \text{ mL}$$

- c. Kultivasi dalam Botol 1500 mL dengan Memaksimalkan Daya Tampung

Erlenmeyer

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

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

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

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

- d. Pembuatan MET 4% sebanyak 1200 ml

MET = (aquades + ekstrak taugé)

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

$$= 48 \text{ mL ekstrak taugé}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume Aquades} &= \text{MET 4\%} - (\text{Volume ekstrak taugé}) \\ &= 1200 \text{ mL} - 48 \text{ mL} \\ &= 1152 \text{ mL} \end{aligned}$$

L.3.2 Pembuatan larutan HCl 2 N

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

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

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

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

$$\begin{aligned}
 \text{Normalitas HCl} &= n \times \text{Molaritas HCl} \\
 &= 1 \times \frac{37 \% \times \text{BJ HCl}}{\text{BM HCl pekat}} \\
 &= \frac{37 \% \times 1190 \text{ g/L}}{36,42 \text{ g/mol}} = 12,09 \text{ N}
 \end{aligned}$$

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

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

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

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

L.3.3 Pembuatan reagen Lieberman-Burchard

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

Cara pembuatannya adalah asam sulfat pekat 5 mL dan anhidrida asetat 5 mL dicampur ke dalam etanol absolut 50 mL, kemudian didinginkan dalam lemari pendingin. Penggunaan reagen ini digunakan langsung setelah pembuatan (Wagner, 2001).

L.3.4 Pembuatan larutan DPPH 0,2 mM

$$\text{Volume} = 50 \text{ mL} = 0,05 \text{ L}$$

$$\text{BM DPPH} = 394,33 \text{ g/mol} = 394,33 \text{ mg/mmol}$$

$$\begin{aligned} \text{massa DPPH} &= \text{Volume} \times \text{BM DPPH} \times \text{Konsentrasi} \\ &= 0,05 \text{ L} \times 394,33 \text{ mg/mmol} \times 0,2 \text{ mmol/L} \\ &= 3,9433 \text{ mg} \end{aligned}$$

Cara pembuatannya adalah ditimbang serbuk DPPH sebanyak 3,9 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol ± 10 mL dan dimasukkan dalam labu ukur 50 mL. Selanjutnya ditambahkan etanol sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.3.5 Pembuatan larutan stok 400 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm} &= \frac{\text{mg}}{\text{L}} \\ 400 \text{ ppm} &= \frac{\text{mg}}{0,005 \text{ L}} \\ \text{mg} &= 2 \text{ mg} \end{aligned}$$

Jadi untuk membuat larutan stok 400 ppm yaitu sebanyak 2 mg isolat dilarutkan dalam 0,005 L / 5 ml etanol. Kemudian di vortex hingga homogen.

L.3.6 Pembuatan larutan sampel uji aktivitas antioksidan 1,2,3,4 dan 5 ppm

a. 1 ppm

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

$$400 \text{ ppm} \times V_1 = 1 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,0125 \text{ mL} = 12,5 \mu\text{L}$$

Jadi untuk membuat larutan 1 ppm yaitu diambil sebanyak 12,5 μ l dari larutan 400 ppm kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 5 ml dan diencerkan dengan pelarut etanol hingga tanda batas.

b. 2 ppm

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

$$400 \text{ ppm} \times V_1 = 2 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,025 \text{ mL} = 25 \mu\text{l}$$

Jadi untuk membuat larutan 1 ppm yaitu diambil sebanyak 25 μ l dari larutan 400 ppm kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 5 ml dan diencerkan dengan pelarut etanol hingga tanda batas.

c. 3 ppm

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

$$400 \text{ ppm} \times V_1 = 3 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,0375 \text{ mL} = 37,5 \mu\text{l}$$

Jadi untuk membuat larutan 1 ppm yaitu diambil sebanyak 37,5 μ l dari larutan 400 ppm kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 5 ml dan diencerkan dengan pelarut etanol hingga tanda batas.

d. 4 ppm

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

$$400 \text{ ppm} \times V_1 = 4 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,05 \text{ mL} = 50 \mu\text{l}$$

Jadi untuk membuat larutan 1 ppm yaitu diambil sebanyak 50 μl dari larutan 400 ppm kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 5 mL dan diencerkan dengan pelarut etanol hingga tanda batas.

e. 5 ppm

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

$$400 \text{ ppm} \times V_1 = 5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,0625 \text{ mL} = 62,5 \mu\text{l}$$

Jadi untuk membuat larutan 1 ppm yaitu diambil sebanyak 62,5 μl dari larutan 400 ppm kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 5 mL dan diencerkan dengan pelarut etanol hingga tanda batas.

Lampiran 4. Perhitungan Randemen, Kadar Air dan Nilai Rf

L.4.1 Perhitungan Randemen Hasil Pengeringan

No.	Berat botol kosong (gr)	Berat Botol + <i>Chlorella sp.</i> basah (gr)	Berat <i>Chlorella sp.</i> basah (gr)	Berat <i>Chlorella sp.</i> kering (gr)
1.	150,23	269,29	119,06	8,3
2.	200,69	309,21	108,52	
3.	145,06	280,68	135,62	
4.	202,31	367,59	165,28	
Total			528,48	

$$\begin{aligned}
 \text{Randemen} &= \frac{\text{Berat kering}}{\text{Berat basah}} \times 100 \% \\
 &= \frac{8,3 \text{ gr}}{528,48 \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= 0,029473 \times 100 \% \\
 &= 1,5705 \%
 \end{aligned}$$

L.4.2 Perhitungan Kadar Air

1. Sampel Kering

Pengulangan ke-	Kadar Air Kering (%)	Rata-rata (%)
1	11,08 %	10,25 %
2	9,63 %	
3	10,05 %	

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

Keterangan : a = berat konstan cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

➤ Pengulangan 1

No.	Berat cawan kosong (g)	Berat cawan + sampel sebelum dioven (g)	Berat cawan + sampel setelah dioven (g)
1	57,6887	58,1871	58,1326
2	57,6889		58,1319
3	57,6871		58,1309
rata-rata	57,6882		58,1318

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{b-c}{b-a} \times 100\% \\
 &= \frac{58,1871 \text{ g} - 58,1318 \text{ g}}{58,1871 \text{ g} - 57,6882 \text{ g}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,0553 \text{ g}}{0,4989 \text{ g}} \times 100\% \\
 &= 11,08 \%
 \end{aligned}$$

➤ **Pengulangan 2**

No.	Berat cawan kosong (g)	Berat cawan + sampel sebelum dioven (g)	Berat cawan + sampel setelah dioven (g)
1	57,4519	57,9503	57,9028
2	57,4514		57,9024
3	57,4503		57,9013
rata-rata	57,4512		57,9022

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{b-c}{b-a} \times 100\% \\
 &= \frac{57,9503 \text{ g} - 57,9022 \text{ g}}{57,9503 \text{ g} - 57,4512 \text{ g}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,0481 \text{ g}}{0,4991 \text{ g}} \times 100\% \\
 &= 9,63 \%
 \end{aligned}$$

➤ **Pengulangan 3**

No.	Berat cawan kosong (g)	Berat cawan + sampel sebelum dioven (g)	Berat cawan + sampel setelah dioven (g)
1	53,7919	54,2912	54,2409
2	53,7927		54,2421
3	53,7912		54,2400
rata-rata	53,7919		54,2410

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{b-c}{b-a} \times 100\% \\
 &= \frac{54,2912 \text{ g} - 54,2410 \text{ g}}{54,2912 \text{ g} - 53,7919 \text{ g}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,0502 \text{ g}}{0,4993 \text{ g}} \times 100\% \\
 &= 10,05 \%
 \end{aligned}$$

L.4.3 Perhitungan Randemen Hasil Maserasi

Berat sampel (gr)	Berat wadah (gr)	Berat wadah + ekstrak pekat (gr)	Berat ekstrak pekat (gr)
30,0005	68,1975	72,5202	3,984

$$\text{Randemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \%$$

$$= \frac{3,984 \text{ gr}}{30,0005 \text{ gr}} \times 100 \%$$

$$= 0,132797 \times 100 \%$$

$$= 13,2797 \%$$

L.4.4 Perhitungan Randemen Hasil Partisi

Berat ekstrak metanol yang dihidrolisis (gr)	Berat wadah (gr)	Berat wadah + fraksi (gr)	Berat fraksi (gr)
2,4922	114,0527	115,3145	1,2618

$$\text{Randemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \%$$

$$= \frac{1,2618 \text{ gr}}{2,4922 \text{ gr}} \times 100 \%$$

$$= 0,506299 \times 100 \%$$

$$= 50,6299 \%$$

L.4.5 Perhitungan berat senyawa steroid hasil KLTP

Berat vial kosong (gr)	Berat vial + senyawa (gr)	Berat senyawa (gr)
10,4296	10,4316	0,0020

$$\text{Berat Senyawa} = (\text{Berat vial} + \text{senyawa}) - \text{Berat vial kosong}$$

$$= 10,4316 - 10,4296$$

$$= 0,0020 \text{ gr} = 2 \text{ mg}$$

L.4.6 Perhitungan Nilai Rf KLT Preparatif

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

1. Eluen terbaik n-Heksana : Etil asetat (4:1)

$\text{Rf noda 1} = \frac{17,35\text{cm}}{18\text{ cm}} = 0,9638$	$\text{Rf noda 9} = \frac{8,6\text{ cm}}{18\text{ cm}} = 0,4777$
$\text{Rf noda 2} = \frac{16,1\text{cm}}{18\text{ cm}} = 0,8944$	$\text{Rf noda 10} = \frac{5,75\text{ cm}}{18\text{ cm}} = 0,3194$
$\text{Rf noda 3} = \frac{15,1\text{ cm}}{18\text{ cm}} = 0,8388$	$\text{Rf noda 11} = \frac{5,2\text{ cm}}{18\text{ cm}} = 0,2888$
$\text{Rf noda 4} = \frac{14\text{ cm}}{18\text{ cm}} = 0,7777$	$\text{Rf noda 12} = \frac{4\text{ cm}}{18\text{ cm}} = 0,2222$
$\text{Rf noda 5} = \frac{13,3\text{ cm}}{18\text{ cm}} = 0,7388$	$\text{Rf noda 13} = \frac{2,5\text{ cm}}{18\text{ cm}} = 0,1388$
$\text{Rf noda 6} = \frac{12,2\text{ cm}}{18\text{ cm}} = 0,6777$	$\text{Rf noda 14} = \frac{1,75\text{ cm}}{18\text{ cm}} = 0,0972$
$\text{Rf noda 7} = \frac{11,4\text{ cm}}{18\text{ cm}} = 0,6333$	$\text{Rf noda 15} = \frac{1,05\text{ cm}}{18\text{ cm}} = 0,0583$
$\text{Rf noda 8} = \frac{10\text{ cm}}{18\text{ cm}} = 0,5555$	

2. Eluen terbaik n-Heksana : Etil asetat (4:1)

$\text{Rf noda 1} = \frac{16,85\text{cm}}{17,7\text{ cm}} = 0,9519$	$\text{Rf noda 9} = \frac{8,1\text{ cm}}{17,7\text{cm}} = 0,4576$
$\text{Rf noda 2} = \frac{15,5\text{cm}}{17,7\text{cm}} = 0,8757$	$\text{Rf noda 10} = \frac{5,3\text{ cm}}{17,7\text{cm}} = 0,2994$
$\text{Rf noda 3} = \frac{14,4\text{ cm}}{17,7\text{cm}} = 0,8135$	$\text{Rf noda 11} = \frac{4,6\text{ cm}}{17,7\text{cm}} = 0,2598$
$\text{Rf noda 4} = \frac{13,3\text{ cm}}{17,7\text{cm}} = 0,7514$	$\text{Rf noda 12} = \frac{3,4\text{ cm}}{17,7\text{cm}} = 0,1920$
$\text{Rf noda 5} = \frac{12,65\text{ cm}}{17,7\text{cm}} = 0,7146$	$\text{Rf noda 13} = \frac{2,25\text{ cm}}{17,7\text{cm}} = 0,1271$
$\text{Rf noda 6} = \frac{11,7\text{ cm}}{17,7\text{cm}} = 0,6610$	$\text{Rf noda 14} = \frac{1,5\text{ cm}}{17,7\text{cm}} = 0,0847$
$\text{Rf noda 7} = \frac{10,85\text{ cm}}{17,7\text{cm}} = 0,6129$	$\text{Rf noda 15} = \frac{0,9\text{ cm}}{17,7\text{cm}} = 0,0508$
$\text{Rf noda 8} = \frac{9,2\text{ cm}}{17,7\text{cm}} = 0,5197$	

3. Eluen terbaik n-Heksana : Etil asetat (4:1)

$$\begin{aligned}
 \text{Rf noda 1} &= \frac{17 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,9604 & \text{Rf noda 9} &= \frac{6,5 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,3672 \\
 \text{Rf noda 2} &= \frac{16 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,9039 & \text{Rf noda 10} &= \frac{5 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,2824 \\
 \text{Rf noda 3} &= \frac{14,8 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,8361 & \text{Rf noda 11} &= \frac{4,1 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,2316 \\
 \text{Rf noda 4} &= \frac{14,1 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,7966 & \text{Rf noda 12} &= \frac{3,2 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,1807 \\
 \text{Rf noda 5} &= \frac{12,3 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,6949 & \text{Rf noda 13} &= \frac{2,25 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,1073 \\
 \text{Rf noda 6} &= \frac{10,7 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,6045 & \text{Rf noda 14} &= \frac{1,9 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,0819 \\
 \text{Rf noda 7} &= \frac{9,6 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,5423 & \text{Rf noda 15} &= \frac{1 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,0564 \\
 \text{Rf noda 8} &= - & &
 \end{aligned}$$

4. Eluen terbaik n-Heksana : Etil asetat (4:1)

$$\begin{aligned}
 \text{Rf noda 1} &= \frac{16,7 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,9542 & \text{Rf noda 9} &= \frac{5,9 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,3371 \\
 \text{Rf noda 2} &= \frac{15,15 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,8657 & \text{Rf noda 10} &= \frac{3,6 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,2057 \\
 \text{Rf noda 3} &= \frac{13,5 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,7714 & \text{Rf noda 11} &= \frac{3,3 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,1885 \\
 \text{Rf noda 4} &= \frac{12,7 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,7254 & \text{Rf noda 12} &= \frac{2,25 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,1285 \\
 \text{Rf noda 5} &= \frac{10,8 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,6171 & \text{Rf noda 13} &= \frac{1,2 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,0685 \\
 \text{Rf noda 6} &= \frac{9,5 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,5428 & \text{Rf noda 14} &= \frac{1 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,0571 \\
 \text{Rf noda 7} &= \frac{8,6 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,4914 & \text{Rf noda 15} &= \frac{0,5 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,0285 \\
 \text{Rf noda 8} &= - & &
 \end{aligned}$$

Lampiran 5. Data Uji Aktivitas Antioksidan

Ekstrak	Nilai EC ₅₀ (ppm)
Fraksi PE	152,3
Isolat	73,82
Vitamin C	3,737
BHT	4,3

1. Data Hasil Analisis Kapasitas Antioksidan Isolat Hasil KLTP

Konsentrasi (ppm)	Ulangan (absorbansi sampel)			Rerata	Log []	Absorbansi Kontrol	Aktivitas Antioksidan (%)
	1	2	3				
1	0,2650	0,2657	0,2654	0,2654	0,0000	0,2674	0,7479
2	0,2683	0,2680	0,2680	0,2681	0,3010	0,2703	0,8139
3	0,2657	0,2656	0,2658	0,2657	0,4771	0,2727	2,5669
4	0,2649	0,2649	0,2650	0,2649	0,6020	0,2734	3,1089
5	0,2668	0,2669	0,2670	0,2669	0,6989	0,2773	3,7504

Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Nilai EC₅₀ dihitung menggunakan program “GraphPad prism5 software, Regression for analyzing doseresponse data” dengan konsentrasi ekstrak 1-5 ppm.

[Isolat] (ppm)	Log [Isolat] (ppm)	Aktivitas antioksidan (%)
1	0,0000	0,7479
2	0,3010	0,8139
3	0,4771	2,5669
4	0,6020	3,1089
5	0,6989	3,7504

Sehingga diperoleh persamaan:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$$

$$Y = 0,0 + (100 - 0,0) / (1 + 10^{(0,2717 - X)}) \cdot 0,2544)$$

	%Aktivitas Antioksidan	Global (shared) Can't calculate
Comparison of Fits		
Null hypothesis		LogEC50 different for each data set
Alternative hypothesis		LogEC50 same for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		LogEC50 different for each data set
F (DFn, DFd)		

LogEC50 different for each data set

Best-fit values

Bottom = 0,0

Top = 100,0

LogEC50 1,868

HillSlope 1,190

EC50 73,82

Span = 100,0

Std. Error

LogEC50 0,2717

HillSlope 0,2544

95% Confidence Intervals

LogEC50 1,003 to 2,733

HillSlope 0,3806 to 2,000

EC50 10,08 to 540,7

Goodness of Fit

Degrees of Freedom 3

R square 0,9326

Absolute Sum of Squares 0,4986

Sy.x 0,4077

Constraints

Bottom Bottom = 0,0

Top Top = 100,0

LogEC50 same for all data sets

Best-fit values

Bottom = 0,0

Top = 100,0

LogEC50 1,868 1,868

HillSlope 1,190

EC50 73,82 73,82

Span = 100,0

Std. Error

LogEC50 0,2717 0,2717

HillSlope 0,2544

95% Confidence Intervals

LogEC50 1,003 to 2,733 1,003 to 2,733

HillSlope 0,3806 to 2,000

EC50 10,08 to 540,7 10,08 to 540,7

Goodness of Fit

Degrees of Freedom 3

R square 0,9326 0,9326

Absolute Sum of Squares 0,4986 0,4986

Sy.x 0,4077

Constraints

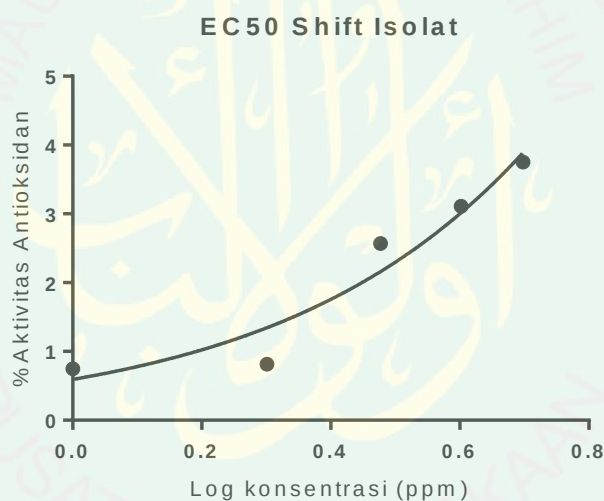
Bottom Bottom = 0,0

Top Top = 100,0

LogEC50 LogEC50 is shared

Number of points

Analyzed 5



Gambar L.5.1. Grafik isolat hasil KLTP

2. Data Hasil Analisis Kapasitas Antioksidan Fraksi PE

Konsentrasi (ppm)	Ulangan (absorbansi sampel)			Rerata	Log []	Absorbansi Kontrol	Aktivitas Antioksidan (%)
	1	2	3				
1	0,4643	0,4642	0,4644	0,4643	0,0000	0,4652	0,1934
2	0,4672	0,4674	0,4672	0,4673	0,3010	0,4674	0,0213
3	0,4615	0,4618	0,4618	0,4617	0,4771	0,4640	0,4956
4	0,4601	0,4605	0,4601	0,4602	0,6020	0,4635	0,7197
5	0,4629	0,4627	0,4629	0,4629	0,6989	0,4665	0,7717

Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Nilai EC_{50} dihitung menggunakan program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing doseresponse data*” dengan konsentrasi ekstrak 1-5 ppm.

[Fraksi] (ppm)	Log [Fraksi] (ppm)	Aktivitas antioksidan (%)
1	0,0000	0,1934
2	0,3010	0,0213
3	0,4771	0,4956
4	0,6020	0,7197
5	0,6989	0,7717

Sehingga diperoleh persamaan:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$$

$$Y = 0,0 + (100 - 0,0) / (1 + 10^{(0,6129 - X) \cdot 0,5462})$$

%Aktivitas
Antioksidan

Global (shared)
Can't calculate

Comparison of Fits

Null hypothesis

LogEC50 different for each data set

Alternative hypothesis

LogEC50 same for all data sets

P value

Conclusion (alpha = 0.05)

Models have the same DF

Preferred model

LogEC50 different for each data set

F (DFn, DFd)

LogEC50 different for each data set

Best-fit values

Bottom

= 0,0

Top

= 100,0

LogEC50

2,183

HillSlope

1,396

EC50

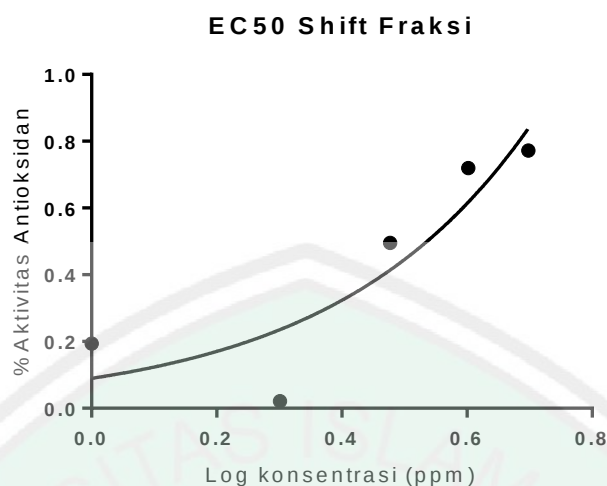
152,3

Span

= 100,0

Std. Error

LogEC50	0,6129	
HillSlope	0,5462	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	0,2322 to 4,133	
HillSlope	-0,3422 to 3,134	
EC50	1,707 to 13588	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	
R square	0,8169	
Absolute Sum of Squares	0,07828	
Sy.x	0,1615	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0,0	
Top	Top = 100,0	
LogEC50 same for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0,0	
Top	= 100,0	
LogEC50	2,183	2,183
HillSlope	1,396	
EC50	152,3	152,3
Span	= 100,0	
Std. Error		
LogEC50	0,6129	0,6129
HillSlope	0,5462	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	0,2322 to 4,133	0,2322 to 4,133
HillSlope	-0,3422 to 3,134	
EC50	1,707 to 13588	1,707 to 13588
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R square	0,8169	0,8169
Absolute Sum of Squares	0,07828	0,07828
Sy.x		0,1615
Constraints		
Bottom	Bottom = 0,0	
Top	Top = 100,0	
LogEC50	LogEC50 is shared	
Number of points		
Analyzed	5	



Gambar. L.5.2. Grafik fraksi petroleum eter

3. Data Hasil Analisis Kapasitas Antioksidan Vitamin C

Konsentrasi (ppm)	Ulangan (absorbansi sampel)			Rerata	Log []	Absorbansi Kontrol	Aktivitas Antioksidan (%)
	1	2	3				
1	0,3699	0,3697	0,3697	0,3697	0,0000	0,4097	9,7632
2	0,3194	0,3187	0,3185	0,3189	0,3010	0,4076	21,7615
3	0,2595	0,2594	0,2595	0,2595	0,4771	0,4155	37,5451
4	0,2036	0,2036	0,2034	0,2035	0,6020	0,4091	50,2566
5	0,1301	0,1300	0,1291	0,1297	0,6989	0,4100	68,3658

Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Nilai EC_{50} dihitung menggunakan program “GraphPad prism5 software, Regression for analyzing doseresponse data” dengan konsentrasi ekstrak 1-5 ppm.

[Vit. C] (ppm)	Log [Vit. C] (ppm)	Aktivitas antioksidan (%)
1	0,0000	9,7632
2	0,3010	21,7615
3	0,4771	37,5451
4	0,6020	50,2566
5	0,6989	68,3658

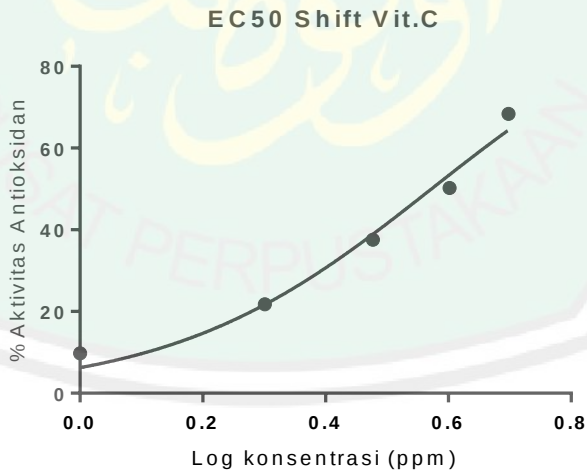
Sehingga diperoleh persamaan:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{HillSlope}))}$$

$$Y = 0,0 + (100 - 0,0) / (1 + 10^{(0,01760 - X) * 0,2388})$$

	%Aktivitas Antioksidan	Global (shared)
Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		LogEC50 different for each data set
Alternative hypothesis		LogEC50 same for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		LogEC50 different for each data set
F (DFn, DFd)		
LogEC50 different for each data set		
Best-fit values		
Bottom	= 0,0	
Top	= 100,0	
LogEC50	0,5725	
HillSlope	2,053	
EC50	3,737	
Span	= 100,0	
Std. Error		
LogEC50	0,01760	
HillSlope	0,2388	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	0,5165 to 0,6285	
HillSlope	1,293 to 2,813	
EC50	3,285 to 4,251	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	
R square	0,9812	
Absolute Sum of Squares	40,15	
Sy.x	3,658	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0,0	
Top	Top = 100,0	
LogEC50 same for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0,0	
Top	= 100,0	
LogEC50	0,5725	0,5725
HillSlope	2,053	
EC50	3,737	3,737

Span	= 100,0	
Std. Error		
LogEC50	0,01760	0,01760
HillSlope	0,2388	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	0,5165 to 0,6285	0,5165 to 0,6285
HillSlope	1,293 to 2,813	
EC50	3,285 to 4,251	3,285 to 4,251
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R square	0,9812	0,9812
Absolute Sum of Squares	40,15	40,15
Sy.x		3,658
Constraints		
Bottom	Bottom = 0,0	
Top	Top = 100,0	
LogEC50	LogEC50 is shared	
Number of points		
Analyzed	5	



Gambar L.5.3. Grafik vitamin C

4. Data Hasil Analisis Kapasitas Antioksidan BHT

Konsentrasi (ppm)	Ulangan (absorbansi sampel)			Rerata	Log []	Absorbansi Kontrol	Aktivitas Antioksidan (%)
	1	2	3				
1	0,3178	0,3179	0,3183	0,3180	0,0000	0,4168	23,7044
2	0,2820	0,2822	0,2820	0,2821	0,3010	0,4094	31,0942
3	0,2411	0,2432	0,2411	0,2418	0,4771	0,4184	42,2084
4	0,2186	0,2186	0,2186	0,2186	0,6020	0,4164	47,5024
5	0,1901	0,1899	0,1902	0,1901	0,6989	0,4224	54,9952

Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Nilai EC_{50} dihitung menggunakan program “GraphPad prism5 software, Regression for analyzing doseresponse data” dengan konsentrasi ekstrak 1-5 ppm.

[BHT] (ppm)	Log [BHT] (ppm)	Aktivitas antioksidan (%)
1	0,0000	23,7044
2	0,3010	31,0942
3	0,4771	42,2084
4	0,6020	47,5024
5	0,6989	54,9952

Sehingga diperoleh persamaan:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top}-\text{Bottom}) / (1+10^{((\text{LogEC}_{50}-X) \cdot \text{HillSlope}))}$$

$$Y = 0,0 + (100-0,0) / (1+10^{(0,02678-X) \cdot 0,08837})$$

	%Aktivitas Antioksidan	Global (shared)
Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		LogEC50 different for each data set
Alternative hypothesis		LogEC50 same for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		LogEC50 different for each data set
F (DFn, DFd)		

LogEC50 different for each data set

Best-fit values

Bottom	= 0,0
Top	= 100,0
LogEC50	0,6335
HillSlope	0,8834
EC50	4,300
Span	= 100,0
Std. Error	
LogEC50	0,02678
HillSlope	0,08837
95% Confidence Intervals	
LogEC50	0,5483 to 0,7187
HillSlope	0,6022 to 1,165
EC50	3,534 to 5,233
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	3
R square	0,9762
Absolute Sum of Squares	14,99
Sy.x	2,236
Constraints	
Bottom	Bottom = 0,0
Top	Top = 100,0

LogEC50 same for all data sets

Best-fit values

Bottom	= 0,0	
Top	= 100,0	
LogEC50	0,6335	0,6335
HillSlope	0,8834	
EC50	4,300	4,300
Span	= 100,0	
Std. Error		
LogEC50	0,02678	0,02678
HillSlope	0,08837	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	0,5483 to 0,7187	0,5483 to 0,7187
HillSlope	0,6022 to 1,165	
EC50	3,534 to 5,233	3,534 to 5,233
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		3
R square	0,9762	0,9762
Absolute Sum of Squares	14,99	14,99
Sy.x		2,236

Constraints

Bottom

Bottom = 0,0

Top

Top = 100,0

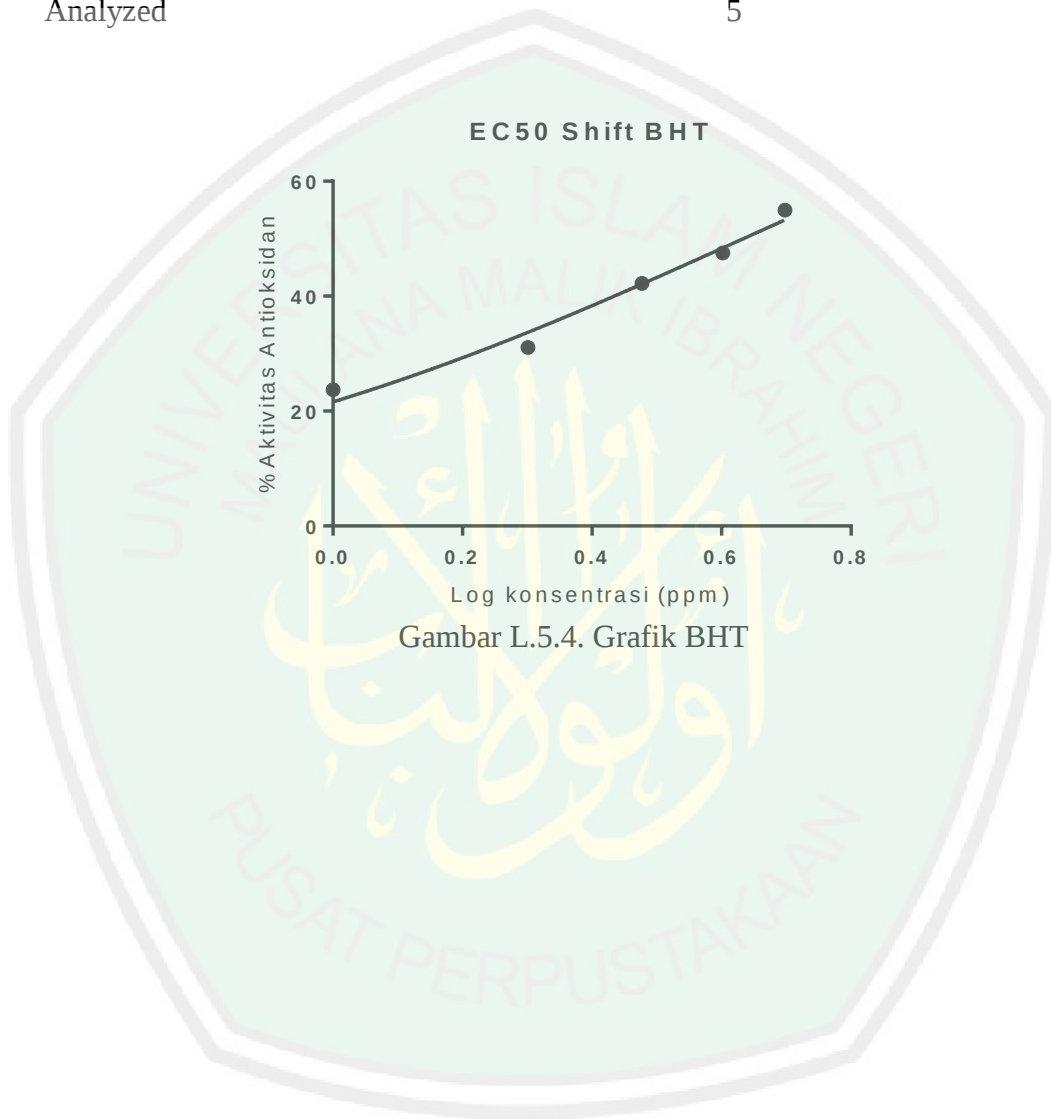
LogEC50

LogEC50 is shared

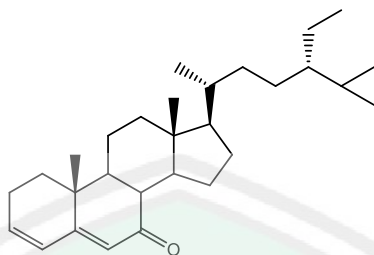
Number of points

Analyzed

5



Lampiran 6. Perhitungan Woodward-Fieser



senyawa steroid poriferasta-3,5-dien-7-on (Dast dan Srinivas, 1992)

Harga dasar enon siklik lingkaran 6	= 214 nm
Gugus alkil β	= 12 nm
Gugus alkil δ	= 18 nm
Exosiklis	= 5 nm
Perpanjangan konjugasi	= 30 nm +
	279 nm

Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian

1. Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)



Medium Ekstrak Tauge
(MET)

2. Kultivasi Mikroalga *Chlorella* sp. dalam MET 4%



Hari ke-0

Hari ke-2

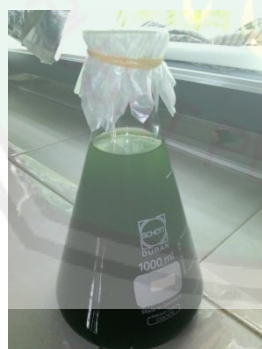
Hari ke-4

Hari ke-7

Hari ke-8

Hari ke-10

3. Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella* sp.

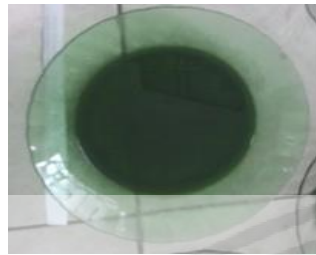


Biomassa sebelum
disentrifuge



Hasil pemisahan dengan
sentrifuge

4. Preparasi Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

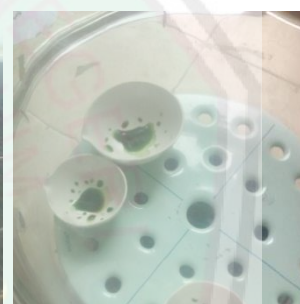


Pengeringan biomassa
Mikroalga *Chlorella sp.*



Mikroalga *Chlorella sp.* hasil
pengeringan dan pengerokan

5. Analisis Kadar Air Biomassa *Chlorella sp.*



Proses analisis kadar air mikroalga *Chlorella sp.*

6. Ekstraksi Maserasi



Penyaringan dengan corong
Buchner

Proses Maserasi

7. Hidrolisis



Pengadukan ekstrak dalam HCl dengan magnetik stirrer



Penetralan ekstrak dengan menambahkan natrium bikarbonat

8. Partisi ekstrak methanol *Chlorella* sp.

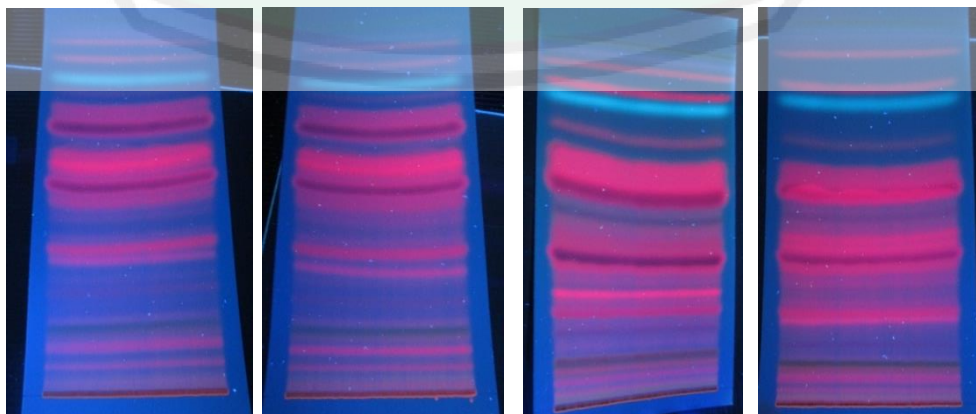


Proses partisi



Hasil Partisi

9. Identifikasi Senyawa Steroid Fraksi Petroleum Eter dengan KLT Preparatif



KLTP 1

KLTP 2

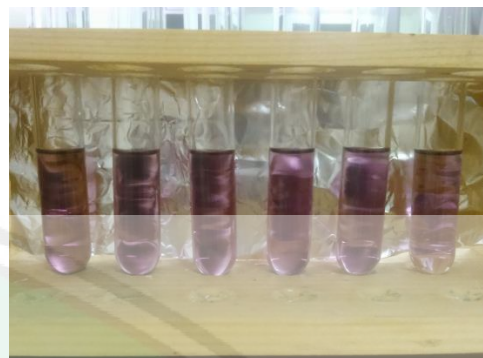
KLTP 3

KLTP 4

10. Uji Aktivitas Antioksidan



Isolat hasil KLTP dengan larutan
DPPH 0,2 mM



Fraksi PE dengan larutan DPPH 0,2
mM



Pembanding BHT dengan larutan
DPPH 0,2 mM



Pembanding Vitamin C dengan
larutan DPPH 0,2 mM