

**PEMISAHAN SENYAWA STEROID FRAKSI ETIL ASETAT  
MIKROALGA *Chlorella sp.*  
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI KOLOM  
CARA BASAH DAN KERING**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**DANY AULIA SAFITRI**  
NIM. 12630057



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

**PEMISAHAN SENYAWA STEROID FRAKSI ETIL ASETAT  
MIKROALGA *Chlorella sp.*  
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI KOLOM  
CARA BASAH DAN KERING**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**DANY AULIA SAFITRI**  
NIM. 12630057

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

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

**PEMISAHAN SENYAWA STEROID FRAKSI ETIL ASETAT  
MIKROALGA *Chlorella sp.*  
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI KOLOM  
CARA BASAH DAN KERING**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**DANY AULIA SAFITRI**  
NIM. 12630057

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji  
Tanggal: 29 Agustus 2016

**Pembimbing I**



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

**Pembimbing II**



**Ach. Nasiehuddin, M.A**  
NIP. 19730705 200003 1 002

**Mengetahui,**

**Ketua Jurusan Kimia**



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

**PEMISAHAN SENYAWA STEROID FRAKSI ETIL ASETAT  
MIKROALGA *Chlorella sp.*  
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI KOLOM  
CARA BASAH DAN KERING**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**DANY AULIA SAFITRI**  
NIM. 12630057

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi  
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana (S.Si)  
Tanggal: 29 Agustus 2016

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

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

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

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

( ..... )  
( ..... )  
( ..... )  
( ..... )

**Mengesahkan,**

**Ketua Jurusan Kimia**



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

**SURAT PERNYATAAN  
ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dany Aulia Safitri  
NIM : 12630057  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat  
Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan  
Kromatografi Kolom Cara Basah dan Kering

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 skripsi ini terdapat unsur-unsur hasil jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggung jawabkan serta bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 9 September 2016

Yang membuat pernyataan,



Dany Aulia Safitri  
NIM. 12630057

## KATA PENGANTAR



*Assalamu'alaikum Wr.Wb.*

Puji syukur Alhamdulillah, penulis panjatkan kehadirat Allah SWT Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang. Atas berkat limpahan rahmat, taufik dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Kromatografi Kolom Cara Basah dan Kering”** dengan baik dan maksimal. Penulis menyadari bahwasannya dalam penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Semoga apa yang penulis upayakan ini dapat memberikan kontribusi serta manfaat bagi kita semua.

Sholawat serta salam selalu tercurahkan kepada junjungan kita baginda Rasulullah SAW. Nabi akhir zaman, pencetus kehidupan keadilan, revolusionis dunia, penuntun umatnya agar senantiasa berlandaskan kepada al Qur'an dan al Hadist.

Penulis mengucapkan banyak terima kasih beriring do'a yang tidak terhingga kepada semua pihak yang telah membantu, baik berupa bimbingan, nasihat, serta do'a hingga terselesaikannya skripsi ini. Penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Mudjia Raharjo, M.Si, selaku rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Ibu Dr. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, drh., M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi 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, Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si., Ibu Suci Amalia, M. Sc., Bapak Ach. Nasichuddin, M.A selaku bapak ibu dosen yang

5. 2 telah memberikan bimbingan, pengarahan, serta nasehat kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
6. Orang tua, Adik dan seluruh keluarga tercinta yang senantiasa melantunkan doa dan memberi restu kepada penulis dalam menuntut ilmu.
7. 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, serta kritikan membangun kepada penyusun dalam menyelesaikan skripsi ini.
8. Semua rekan-rekan dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala bantuan dan motivasinya kepada penyusun.

Penulis menyadari atas terbatasnya penyusunan skripsi yang masih jauh dari sempurna. Terlepas dari segala kekurangan, penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan informasi dan kontribusi positif serta dapat memberikan manfaat bagi kita semua. *Amin Ya Robbal Alamin.*

*Wassalamu'alaikum Wr.Wb.*

Malang, 9 September 2016

Penyusun

## DAFTAR ISI

<b>JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	iii
<b>PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN</b> .....	iv
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	v
<b>DAFTAR ISI</b> .....	vii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	ix
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	x
<b>ABSTRAK</b> .....	xi
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	7
1.3. Tujuan Penelitian .....	8
1.4. Batasan Masalah .....	8
1.5. Manfaat Penelitian .....	8
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1. Tumbuhan dalam Al-Qur'an .....	9
2.2. Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	13
2.3. Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam MET 4 % .....	14
2.2.1 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> ..	15
2.2.2 Fase Pertumbuhan <i>Chlorella sp.</i> .....	17
2.4. Isolasi Senyawa Steroid Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	19
2.4.1 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	19
2.4.2 Hidrolisis dan Partisi .....	20
2.5. Steroid .....	22
2.6. Identifikasi Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat dalam Ekstrak Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	25
2.7. Kromatografi Kolom.....	27
2.8. Identifikasi Menggunakan FTIR .....	30
<b>BAB III METODOLOGI PENELITIAN</b>	
3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian .....	35
3.2. Alat dan Bahan Penelitian.....	35
3.2.1. Alat-alat Penelitian .....	35
3.2.2. Bahan-bahan Penelitian .....	35
3.3. Rancangan Penelitian.....	36
3.4. Tahapan Penelitian.....	37
3.5. Prosedur Penelitian .....	38
3.5.1. Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	38
3.5.1.1. Sterilisasi Alat .....	38
3.5.1.2. Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 % .....	38
3.5.1.3. Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam MET 4 % .....	38

3.5.1.4. Pemanenan Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	38
3.5.2. Preparasi Sampel Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	39
3.5.3. Analisis Kadar Air Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	39
3.5.4. Maserasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan Maserasi .....	40
3.5.5. Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	40
3.5.6. Identifikasi Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat dalam Ekstrak Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	41
3.5.7. Pemisahan Senyawa Steroid Menggunakan Kromatografi Kolom .....	41
3.5.8. Monitoring Senyawa Steroid Secara KLTA .....	42
3.5.9. Identifikasi dengan FTIR .....	43
3.6. Analisis Data .....	43
 <b>BAB IV PEMBAHASAN</b>	
4.1 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	44
4.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 % .....	44
4.1.2 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam MET 4 % .....	45
4.1.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	45
4.2 Preparasi Sampel Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	46
4.3 Analisis Kadar Air Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	47
4.4 Ekstraksi Senyawa Aktif Biomassa <i>Chlorella sp.</i> .....	47
4.5 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Peekat Metanol .....	48
4.6 Identifikasi Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat dalam Ekstrak Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> .....	49
4.7 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi kolom dan Monitoring Secara KLTA .....	50
4.6.1 Kromatografi Kolom Cara Basah .....	52
4.6.2 Kromatografi Kolom Cara Kering .....	55
4.8 Identifikasi Menggunakan FTIR .....	57
4.9 Pemanfaatan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam Prespektif Islam .....	59
 <b>BAB V PENUTUP</b>	
5.1 Kesimpulan .....	61
5.2 Saran .....	61
 <b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	62
<b>LAMPIRAN</b> .....	70

## DAFTAR TABEL

2.1	Aktivitas antibakteri terhadap fase pertumbuhan mikroalga <i>Chlorella sp.</i> ...	19
4.1	Hasil monitoring pemisahan steroid kromatografi kolom cara basah .....	54
4.2	Hasil monitoring pemisahan steroid kromatografi kolom cara kering .....	56
4.3	Interpretasi Spektra FTIR .....	58



## DAFTAR GAMBAR

2.1	Kurva pertumbuhan mikroalga <i>Chlorella sp</i> .....	18
2.2	Dugaan reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida dan penetralan dengan natrium bikarbonat .....	21
2.3	<b>Struktur Stophanthidin</b> .....	22
2.4	Struktur 17 $\beta$ -estradiol 17-stearate .....	22
2.5	Struktur 12 $\alpha$ -Hydroxy-5 $\beta$ -cholestane-3 $\alpha$ -yl benzoate .....	23
2.6	Struktur $\beta$ -sitosterol dari Spong <i>Biemna triraphis</i> .....	23
2.7	Struktur Kolesterol .....	23
2.8	Struktur Antheridiol .....	23
2.9	Dugaan mekanisme reaksi pembentukan warna pada uji steroid .....	26
2.10	Struktur dasar silika gel .....	28
2.11	Spektrum IR senyawa steroid hasil isolasi dari isolat fraksi etil asetat mikroalga <i>Chlorella sp</i> . .....	31
2.12	Spektrum IR senyawa steroid hasil isolasi dari akar tumbuhan cendana ...	32
2.13	Spektrum IR senyawa steroid hasil isolasi dari kulit batang tumbuhan kedoya ( <i>Dysoxylum gaudichaudianum</i> )(A. Juss.) Miq.) (Maliaceae) .....	33
2.14	Spektra IR (a) fukosterol hasil isolasi <i>Fucus spiralis</i> (b) sterol (28-isofukosterol) hasil isolasi <i>Enteromorpha intensitinalis</i> .....	33
2.15	Spektrum IR senyawa steroid jenis 5-hydroxy-5 $\alpha$ -cholestan-6one .....	34
2.16	Spektrum IR senyawa steroid jenis 5-hydroxy-5 $\beta$ -cholestan-6-one .....	34
2.17	Spektrum IR senyawa steroid jenis 17 $\alpha$ -ethynyl-17 $\beta$ -hydroxy-18-homoandosta-4,9,11-trien-3-one .....	34
4.1	Hasil monitoring pemisahan senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga <i>Chlorella sp</i> . metode kromatografi kolom cara basah .....	53
4.2	Hasil monitoring pemisahan senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga <i>Chlorella sp</i> . metode kromatografi kolom cara kering .....	56
4.3	Spektra hasil identifikasi FTIR kolom basah dan kering.....	57
4.4	Dugaan struktur senyawa steroid dalam mikroalga <i>Chlorella sp</i> . fraksi etil asetat .....	59

## ABSTRAK

Safitri, D. A. 2016. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Kromatografi Kolom Cara Basah dan Kering. Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Ach. Nasichuddin, M.A; Konsultan: Rachmawati Ningsih, M.Si.

**Kata Kunci :** *Chlorella sp.*, steroid, kromatografi kolom, FTIR

Senyawa steroid merupakan metabolit sekunder yang memiliki efek toksisitas serta berpotensi sebagai antioksidan dan antibakteri. Senyawa steroid yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* fraksi etil asetat dapat diisolasi melalui metode pemisahan kromatografi kolom. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil pemisahan senyawa steroid menggunakan kromatografi kolom variasi pengisian fase diam cara basah dan cara kering.

Isolasi senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* diawali dengan ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol. Ekstrak pekat dihidrolisis dengan HCl 2 N dan dipartisi dengan pelarut etil asetat. Ekstrak hasil partisi diisolasi senyawa steroid menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub> (0,063-0,200 mm) untuk kolom kromatografi dan fase gerak n-heksana:etil asetat (4:1). Pemisahan dilakukan berdasarkan dua metode pengisian fase diam, cara basah dan cara kering. Senyawa steroid hasil kolom baik metode pengisian cara basah maupun kering dimonitoring secara KLTA. Spot noda yang mempunyai harga R<sub>f</sub> sama dan bercak yang sama dikumpulkan menjadi satu sebagai fraksi yang sama. Fraksi yang menunjukkan positif steroid diidentifikasi menggunakan FTIR.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemisahan senyawa steroid yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* fraksi etil asetat metode pengisian cara basah dari 117 vial diperoleh dua kelompok fraksi steroid. Sedangkan metode pengisian fase diam cara kering dari 107 vial diperoleh satu kelompok fraksi steroid. Hasil analisis FTIR senyawa steroid baik cara basah maupun cara kering memberikan informasi adanya gugus -OH, -CH, C=O, C-O stretching, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> geminal dimetil dan C-OH alkohol.

## ABSTRACT

Safitri, D. A. 2016. Separation of Steroid Compound Ethyl Acetate Fraction Microalgae *Chlorella sp.* Using Column Chromatography Slurry Packing and Dry Packing Method. Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Supervisor II: Ach. Nasichuddin, M.A; Consultant: Rachmawati Ningsih, M.Sc.

**Keywords:** *Chlorella sp.*, Steroid, column chromatography, FTIR

Steroidal compounds are secondary metabolites that have the effect of toxicity, potential as an antioxidant and antibacterial. Steroid compounds contained in microalgae *Chlorella sp.* fraction of ethyl acetate can be isolated by column chromatographic methods. This study aimed to determine the profile of steroid compounds separation using column chromatography stationary phase variation slurry packing column and dry packing column method.

Isolation of steroid compounds microalgae *Chlorella sp.* begins with macerated with methanol solvent extraction. Concentrated extracts hydrolyzed with 2 N HCl and partitioned with ethyl acetate solvent. Extract the results of steroid compounds isolated partition chromatography column with the stationary phase silica gel 60 F<sub>254</sub> (0.063 to 0.200 mm) for the chromatography column and mobile phase n-hexane : ethyl acetate (4:1). Separation is done by two methods of packing the stationary phase, the slurry method and dry method. Steroid compounds result column packing method of slurry and dry it KLTA monitored. Spot stain that has the same R<sub>f</sub> and patches that were collected into one as the same fraction. Which showed positive steroid fraction was identified using FTIR.

The results showed that the separation of steroid compounds contained in microalgae *Chlorella sp.* ethyl acetate fraction slurry packing column method of 117 vials of steroids fractions obtained by the two groups. While the method of dry packing column way of 107 vials of steroids fraction obtained by the group. FTIR analysis results steroid compounds both slurry packing column and dry packing column method provides information group -OH, -CH, C=O, C-O stretching, -CH (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> geminal dimethyl and C-OH alcohol.

## ملخص

سافيتري، داني أولياء، 2016. فصل مركبات الستيروئيد من جزء خلات الإيثيل أسيتات شلوريلا باستخدام عمود الكروماتوجرافي الرطب والجاف. مشرف الأول: أ، غنائم فشا، الماجستير و مشرف الثاني: ناسح الدين، الماجستير. مستشارة: رحماواتي ننجسيه، الماجستير  
**كلمات البحث:** شلوريلا، الستيرويد، عمود الكروماتوجرافي، التحليلي فورييه الطيفي بالأشعة تحت الحمراء.

المركبات الستيرويد هي المركبات الثانوية التي لها تأثير سمية ويمكن ان يستخدمها ومضاد الأكسدة ومضاد الجراثيم. وكان مركبات الستيرويد في من جزء الإيثيل أسيتات الطحالب شلوريلا يمكن الحصول عليها بطريق الفصل مع الكروماتوجرافي العمود. هدفت هذه الدراسة لتعرف الشخصية من إفتصال ستيرويد باستخدام الطحالب شلوريلا مع اختلاف محتويات مرحلة ثابتة و مرحلة متحركة.

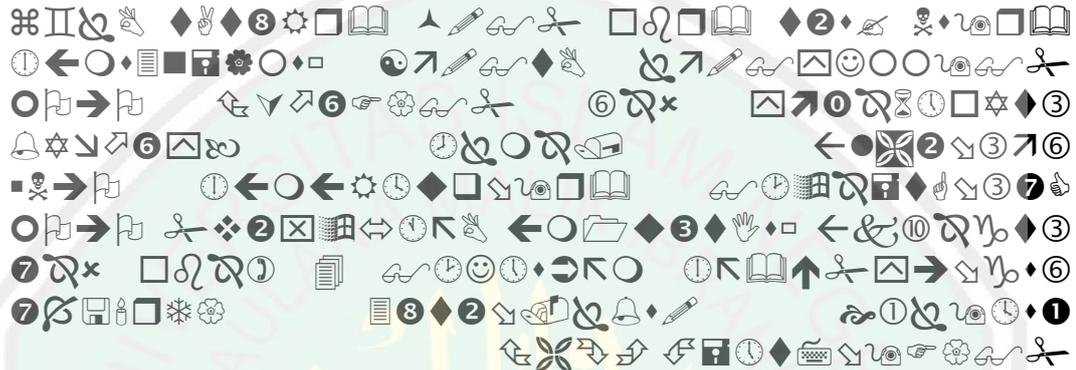
يبدأ اعزلة مركبات ستيروئيد التي توجد الطحالب شلوريلا باستخراج النقاة مع الميثانول. تفيد هدروليسيس المقتطفة المركزة بحمض هيدروكلوريد  $2\text{N}$  و تقسيم بالإيثيل أسيتات. نتائج عملية إستخراج القسم يعتزل بالكروماتوجرافي العمود مع مرحلة الثابتة السيليكاهالام  $60\text{F } 254\text{F } 0,063$  -  $0,200$  ميل (متر) للعمود اللوني والطور المتحرك ن-الهكساناالإيثيل أسيتات (4:1). تعمل عملية إفتصاليه تحتوي علي 2 مرحلة ثابتة يعني الجاف و الرطب. المركبات الستيرويد الذي يخلص من الكروماتوجرافي العمود الجاف أو الرطب يشاهد بكمياتوجرافي قرطاسرقيق التحليلي. الوصمة التي تملك ر.ف و اكتشاف المساوي تجمع الي فصل واحد. الفصل الذي توجد الستيرويدالإيجابي تحليل فوريير الطيفي بالأشعة تحت الحمراء.

تعرض هذا نتائج البحث إذا عملية إفتصال مركبات ستيرويد التي توجد في الطحالب الصغيرة شلوريلا , أفضل النتائج من الفصل الإيثيل أسيتات هي بالرطب التي تحصل علي 117 فيال تنقسم الي 2 مجموعتان الستيرويد. في حين أن طريقة شحن مرحلة ثابتة الطريقة الجافة من 107 عبوات حصلت عليها المجموعة الستيرويد . النتائج تحويل فورييه الطيفي بالأشعة تحت الحمراء مركبات الستيرويد كلا كيف الرطب أو الجاف يوفر طريقة المعلومات المتعلقة  $\text{-OH}$ ,  $\text{-C-H}$ ,  $\text{C=O}$ ,  $\text{C-O}$  تمتدكام،  $\text{-CH(CH}_3)_2$  نيل ديمثيل و  $\text{C-OH}$  الكحول.

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Allah SWT berfirman dalam surat az Zumar (39): 21.



*“Apakah kamu tidak memperhatikan, bahwa Sesungguhnya Allah SWT menurunkan air dari langit, Maka diaturnya menjadi sumber-sumber air di bumi kemudian ditumbuhkan-Nya dengan air itu tanam-tanaman yang bermacam-macam warnanya, lalu menjadi kering lalu kamu melihatnya kekuning-kuningan, kemudian dijadikan-Nya hancur berderai-derai. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat pelajaran bagi orang-orang yang mempunyai akal.” (Qs. az Zumar (39): 21).*

Firman Allah SWT dalam surat az Zumar ayat 21 menjelaskan bahwa Allah SWT menurunkan air dari langit, kemudian dengan air tersebut Allah SWT menumbuhkan tanaman yang bermacam-macam warnanya (Jalaludin, dkk., 2008). Salah satu tanaman yang diciptakan oleh Allah SWT adalah tanaman hijau (berklorofil) yang terkandung dalam tumbuh-tumbuhan. Segala sesuatu yang Allah SWT ciptakan dengan penuh hikmah tidak ada yang sia-sia serta memiliki manfaat yang besar, mulai dari tumbuhan tingkat tinggi sampai kepada tumbuhan tingkat rendah tanpa terkecuali mikroalga.

Indonesia memiliki sekitar 25.000 spesies tumbuhan endemik dan 2000 spesies diantaranya sebagai tumbuhan etnobotani. Sekitar 900 spesies tumbuhan

tersebut telah digunakan sebagai obat tradisional untuk berbagai macam penyakit (Heyne, 1987 dalam Saleh, 2007). Data tersebut menunjukkan bahwa belum maksimalnya eksplorasi yang dilakukan dalam upaya menelusuri bahan-bahan kimia (metabolit sekunder) yang terkandung dalam tumbuhan tersebut (Saleh, 2007). Menurut Harlim (1982) bahan baku steroid dapat diperoleh dari bahan alam yang berasal dari hewan, tumbuhan darat dan tumbuhan laut. Pada hewan dan jamur steroid yang ditemukan umumnya adalah kolesterol dan ergosterol, sedangkan pada tanaman adalah  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol 24-methylenecholesterol dan kolesterol (Nabil and Cosson, 1996; Robinson 1991 dalam Machado dkk., 2003).

Steroid berpotensi sebagai obat, diantaranya kardiotonik, kontraseptif dan anti inflamasi (Robbers, dkk., 1996 dalam Lin, dkk., 2010). Beberapa steroid sintetis dilaporkan berpotensi sebagai antikanker (Banday, dkk., 2010 dalam Lin, dkk., 2010). Menurut Saleh (2007) ekstrak metanol dari akar tumbuhan *S. album* yang mengandung steroid (clionasterol) mempunyai aktivitas hipoglisemik pada dosis 50 mg/Kg BB yang aktivitasnya setara dengan glibenklamid dosis 1 mg/ Kg BB. Mikroalga *Chlorella sp.* yang mengandung steroid memberikan efek toksisitas terhadap larva udang *Artemia selina* Leach (LC<sub>50</sub> fraksi etil asetat 43,3044 ppm) (Desianti, dkk., 2014), aktivitas antioksidan (EC<sub>50</sub> ekstrak metanol 18,610 ppm) (Bariyyah, dkk., 2013) dan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* (zona hambat ekstrak metanol 16,5 mm) pada konsentrasi 20 % fase stasioner (Khamidah, dkk., 2014).

Mikroalga adalah organisme perairan yang lebih dikenal dengan fitoplankton (alga laut bersel tunggal). *Chlorella sp.* merupakan tumbuhan

ganggang hijau bersel tunggal yang dapat tumbuh di air tawar, air payau, dan air asin (Sidabutar, 1999). *Chlorella sp.* dan *Dunaliella sp.* merupakan dua jenis mikroalga yang paling sering diteliti dan dimanfaatkan (Chisti, 2008). Keunggulan dari mikroalga *Chlorella sp.* adalah dapat berkembang biak dengan cepat, mudah dalam membudidayakannya (Sidabutar, 1999) karena hidupnya tidak tergantung musim, tidak memerlukan tempat yang luas, dan tidak memerlukan waktu yang lama untuk memanennya (Borowitzka dan Lesley, 1988). Menurut Wathnani, dkk., (2012) ekstrak acetone:metanol:diethyl eter (5:2:1 v/v) *Chlorella vulgaris*, positif memiliki aktivitas antimikroba terhadap *B. subtilis* dan *S. sonnei*. Sedangkan menurut Rania dan Taha (2008) dalam Thillairajeseekar dkk., (2009) ekstrak heksana dan ekstrak etil asetat mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* memiliki aktivitas antibakteri dan antijamur.

*Chlorella sp.* tumbuh pada media yang mengandung cukup unsur hara, seperti nitrogen, fosfor, kalium. Medium Ekstrak Tauge (MET) merupakan salah satu sumber media alami yang dapat digunakan untuk media pertumbuhan mikroalga (Prihantini, dkk., 2005). Menurut Wulandari, dkk., (2010) penggunaan MET menghasilkan pertumbuhan mikroalga yang sangat pesat (kelimpahan sel 21 – tak hingga sel) dibandingkan media lain (MAL dan MG). Hasil penelitian Prihantini, dkk., (2007) menunjukkan bahwa pengaruh konsentrasi MET terhadap pertumbuhan *Scenedesmus* isolat Subang diperoleh kerapatan sel tertinggi dalam kultur MET 4 % (3.981.071 sel/mL). Hasil penelitian Khamidah, dkk., (2013) juga menunjukkan bahwa *Chlorella sp.* hasil kultivasi dalam MET 4 % dapat menghasilkan kelimpahan sel tertinggi sebesar 4.880.000 sel/mL pada fase stasioner dihari ke-10.

Aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana mikroalga *Chlorella sp.* hasil ekstraksi *Soxhlet* (EC<sub>50</sub> 123,8 ppm) (Susanti, 2010), sedangkan menurut Bariyyah, dkk., (2013) aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat *Chlorella sp.* hasil ekstraksi maserasi (27,320 ppm). Ekstraksi senyawa aktif mikroalga *Chlorella sp.* yang dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol menghasilkan ekstrak dengan kandungan metabolit sekunder dengan randemen tertinggi 7 % (Amaliyah, dkk., 2013).

Di alam, sterol tumbuhan ditemukan dalam keadaan berikatan dengan glikosida (Khalaf, dkk. 2011). Ekstrak pekat metanol *Chlorella sp.* dihidrolisis dengan katalis HCl 2 N untuk mempercepat pemutusan ikatan glikosida antara senyawa glikon dan aglikon. Asam kuat lebih mudah melepas ion H<sup>+</sup> secara sempurna di dalam air (Handoko, 2006). Menurut Afif (2012) ekstrak metanol alga merah *E. contoni* hasil hidrolisis menggunakan HCl 2 N dan partisi etil asetat (LC<sub>50</sub> 143,43 ppm) lebih bersifat toksik daripada ekstrak sebelum dihidrolisis (LC<sub>50</sub> 194,40 ppm). Hasil penelitian Tasic, dkk., (2009) menunjukkan hidrolisis 1:1 (b/v) menggunakan HCl 2 N (konstanta laju reaksi 0,052 min<sup>-1</sup>) dan HCl 1 N (konstanta laju reaksi 0,036 min<sup>-1</sup>). Hasil penelitian Desianti, dkk., (2014) menunjukkan bahwa ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* hasil hidrolisis HCl 2 N dan partisi dengan etil asetat mengandung golongan senyawa steroid diduga memiliki toksisitas (LC<sub>50</sub> 43,3044 ppm). Sedangkan Utami (2014) mengekstrak metabolit sekunder dari ekstrak metanol fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* mengandung golongan senyawa steroid memberikan zona hambat terhadap bakteri *S. Aureus* tertinggi (4,6 mm pada konsentrasi 2,5 %). Golongan senyawa

aktif yang terdapat dalam fraksi etil asetat (randemen 49,323 %) hasil hidrolisis mikroalga *Chlorella sp.* adalah golongan senyawa steroid (Imamah, dkk., 2015).

Menurut Wagner (1996) dalam Marlina (2007) eluen terbaik untuk identifikasi steroid adalah n-heksana-etil asetat (4:1). Menurut Saleh (2007) salah satu cara terbaik untuk memisahkan senyawa steroid dari ekstrak metanol fraksi kloroform akar tumbuhan cendana adalah dengan cara kromatografi kolom. Pemisahan menggunakan fase diam *silica gel* 60 (70 – 230 mesh; 66,67 g) dengan panjang kolom 40 cm, diameter 2,5 cm dan dielusi secara isokratik dengan pelarut n-heksana:etil asetat (82:18) dengan penampungan 5 mL setiap fraksi menghasilkan 170 fraksi. Hasil penelitian menunjukkan fraksi ke 52 – 59 positif steroid terhadap pereaksi *Lieberman-Burchard* (LB). Sedangkan Bogoriani (2008) melakukan isolasi glikosida steroid menggunakan kromatografi kolom gravitasi dengan menggunakan fase diam silika gel 60 (70-230 mesh) dan dielusi menggunakan fase gerak campuran kloroform, metanol, dan air (3:1:0,1). Fraksi ditampung setiap 3 mL menghasilkan 50 fraksi. Hasil penelitian menunjukkan tiga kelompok fraksi (A, B, C) dimana fraksi-fraksi B menampakkan satu noda melalui uji kemurnian dan positif terhadap saponin steroid.

Fraksi-fraksi hasil pemisahan kromatografi kolom dimonitoring menggunakan kromatografi lapis tipis untuk melihat noda dengan Rf yang sama. Mulyani, dkk., (2013) menyatakan bahwa fraksi-fraksi yang memiliki noda dan nilai Rf (*retention factor*) yang sama pada kromatografi lapis tipis digabung dan diuapkan pelarutnya sehingga didapatkan fraksi yang lebih sederhana. Hasil monitoring secara KLTA dilihat profil pemisahan komponennya pada plat KLT.

Uji steroid dapat dilakukan dengan penambahan pereaksi Liebermann-Burchard (LB), terbentuk larutan berwarna biru dan hijau menunjukkan reaksi positif mengandung senyawa steroid (Nohong, 2009). Kandungan steroid dalam tumbuhan dapat diuji dengan menggunakan metode LB yang memberikan penampakan warna biru. Uji ini didasarkan pada kemampuan senyawa steroid membentuk warna oleh adanya  $H_2SO_4$  pekat dalam pelarut asetat glasial sehingga membentuk warna biru (Marlinda, 2012). Sedangkan menurut Sulastry dan Kurniawati (2010) senyawa steroid setelah disemprot dengan reagen LB menghasilkan warna hijau. Hasil penelitian Sriwahyuni (2010) dalam pemisahan senyawa steroid dari ekstrak etil asetat pada tanaman anting-anting menggunakan pereaksi LB menghasilkan noda dengan warna hijau kebiruan, hijau kehitaman, dan warna ungu yang tengahnya warna hijau kebiruan saat dideteksi di bawah sinar UV  $\lambda$  366 nm.

Imamah, dkk., (2015) telah berhasil mengidentifikasi senyawa steroid dari fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan FTIR dengan informasi serapan pada daerah bilangan gelombang khas O-H, C-H pada  $CH_3$ , C-H pada  $CH_2$ , C=O, C=C, C-H tekuk, C-O, C-OH alkohol tersier, C-OH alkohol primer, C-H pada gugus alkena. Tukiran, dkk., (2009) mengidentifikasi senyawa steroid hasil isolasi kulit batang tumbuhan kedoya (*Dysoxylum gaudichaudianum*) (A. Juss.) Miq.) (Maliaceae) menggunakan FTIR dengan informasi serapan pada daerah bilangan gelombang  $3429\text{ cm}^{-1}$  (O-H),  $2936\text{-}2861\text{ cm}^{-1}$  (C-H alifatik),  $1462\text{ cm}^{-1}$  (C=C siklik),  $1375\text{ cm}^{-1}$  ( $-CH(CH_3)_2$  geminal dimetil) dan  $1056\text{ cm}^{-1}$  (C-O). Berdasarkan data yang diperoleh, senyawa diduga mempunyai kemiripan steroid jenis  $\beta$ -sitosterol dan stigmasterol, didukung data-data hasil penentuan

struktur kimia menggunakan spektrometer NMR-<sup>1</sup>H, NMR-<sup>13</sup>C, HMQC. Sedangkan Sapor, dkk. (2004) mengidentifikasi senyawa steroid dari spons *Biemna triraphis* menggunakan FTIR, memberikan informasi serapan pada daerah bilangan gelombang khas O-H, C-H, C=C, dan C-O. Berdasarkan data yang diperoleh, senyawa diduga mempunyai kemiripan sifat dan karakteristik sama dengan *β-sitosterol* yang didukung dengan hasil interpretasi H-NMR dan GC-MS.

Berdasarkan latar belakang tersebut, mengingat pentingnya mengetahui jenis senyawa steroid apa yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* fraksi etil asetat yang memiliki banyak manfaat maka penelitian ini perlu dilakukan. Upaya memisahkan senyawa aktif steroid akan dilakukan menggunakan kromatografi kolom cara basah dan kering. Dari kedua metode tersebut dapat diketahui metode mana yang lebih baik dalam memisahkan steroid yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* fraksi etil asetat. Sehingga, eksplorasi yang dilakukan dalam upaya menelusuri bahan-bahan kimia (metabolit sekunder) yang terkandung dalam tumbuhan tersebut menjadi maksimal.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, dapat dirumuskan suatu permasalahan dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pemisahan senyawa aktif steroid pada fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan kromatografi kolom cara basah dan cara kering?
2. Bagaimana hasil identifikasi senyawa aktif steroid hasil pemisahan tersebut menggunakan FTIR?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui pemisahan senyawa aktif steroid dari mikroalga *Chlorella sp.* fraksi etil asetat menggunakan kromatografi kolom cara basah dan kering.
2. Untuk mengetahui hasil identifikasi senyawa steroid fraksi etil asetat hasil kromatografi kolom dari mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan FTIR.

### 1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mikroalga *Chlorella sp.* yang digunakan adalah mikroalga yang dikultivasi pada air tawar dengan media tumbuh ekstrak taugé dan diperoleh dari Laboratorium Ekologi Jurusan Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Pemisahan senyawa aktif mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan metode kromatografi kolom.
3. Pemisahan dilakukan dengan kromatografi kolom pengisian fase diam cara basah dan cara kering.
4. Identifikasi menggunakan FTIR.

### 1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai profil pemisahan hasil kromatografi kolom cara basah dan cara

kering yang dapat digunakan untuk memperoleh senyawa aktif steroid dari mikroalga *Chlorella sp.* fraksi etil asetat.



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tumbuhan dalam Al-Qur'an

Firman Allah SWT dalam surat Thaha (20): 53.

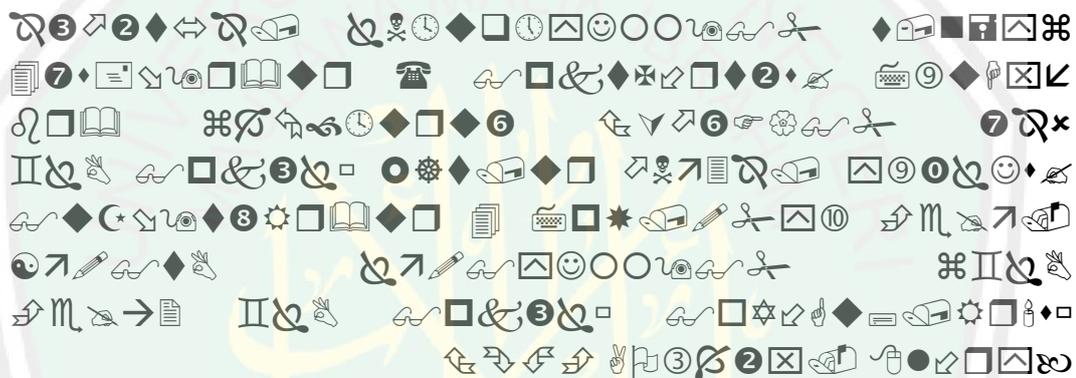


*“Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam.” (QS. Thaha : 53).*

Maksud dari ayat tersebut berdasarkan tafsir Al-Maragi adalah Allah SWT mengeluarkan berbagai jenis tumbuhan dengan berbagai manfaat, warna, aroma dan bentuk. Sebagiannya cocok untuk manusia sebagian lainnya cocok untuk hewan (Al-Maragi, 1993). Hal serupa juga disampaikan oleh Ash Shiddieqy (2000) dalam tafsir Al-Qur'anul Majid An-Nuur bahwa Allah SWT menumbuhkan beberapa pasangan tanaman dari bermacam jenis dan berlainan rasa buahnya serta berlainan manfaatnya. Ada yang bermanfaat bagi manusia, dan ada pula yang hanya bermanfaat bagi hewan. Hal ini kembali ditegaskan dalam tafsir Al-Mishbah bahwa pada setiap macam tumbuhan yang diciptakan oleh Allah SWT dengan bermacam-macam jenis bentuk dan rasa semata-mata adalah untuk kemaslahatan umat manusia, diantaranya sebagai salah satu sumber pangan bagi manusia dan dapat dipetik hasilnya untuk memenuhi kebutuhan manusia (Shihab, 2002). Lafal *nabatin syatta* dalam tafsir Ibnu Katsir adalah berbagai

macam tumbuh-tumbuhan berupa tanam-tanaman dan buah-buahan, baik yang asam, manis, maupun pahit, dan berbagai macam lainnya (Abdullah, 2007). Sedangkan menurut Asy Syanqithi (2007) dalam tafsir Adhwa'ul Bayan, lafal *nabatin syatta* adalah jenis yang bermacam-macam bentuk, ukuran, manfaat, warna, bau dan rasanya.

Ayat lain yang menjelaskan tentang keragaman tumbuh-tumbuhan adalah surat Lukman (31): 10.

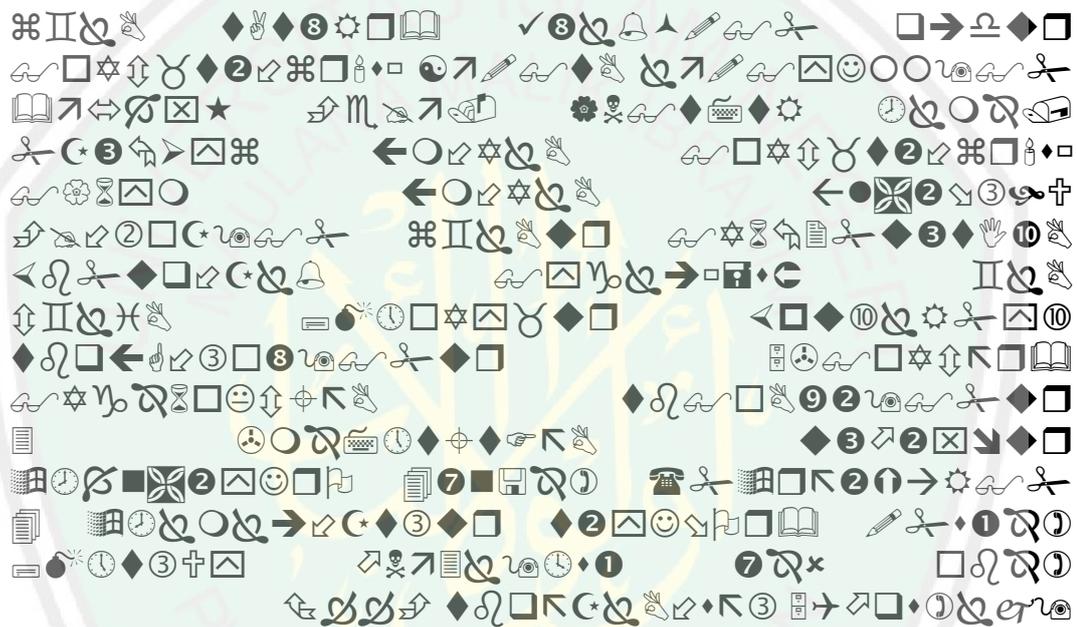


*“Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang. dan kami turunkan air hujan dari langit, lalu kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan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

Maksud dari ayat tersebut adalah Allah SWT telah menurunkan hujan dari langit, yang dengan itu ditumbuhkanlah beberapa pasangan tanaman dari bermacam jenis dan berlainan rasa buahnya serta berlainan manfaatnya (ada yang bermanfaat bagi manusia, dan ada pula yang bermanfaat bagi hewan) (Al-Qarni, 2007). *مِنْ كُلِّ رَوْحٍ كَرِيمٍ* dalam tafsir al-maraghi menjelaskan bahwa berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang memiliki banyak manfaat (Al-Maragi, 1993). Hal ini kembali ditegaskan dalam tafsir al Aisar *مِنْ كُلِّ رَوْحٍ كَرِيمٍ* menjelaskan bahawa setiap jenis dari tumbuh-tumbuhan yang indah, bermanfaat dan tidak

membahayakan (Al Jazairi, 2008). رَوْحِ كَرِيمٍ memiliki arti jenis tumbuhan yang bermanfaat dan indah (Ar Rifa'i, 2008) yang beraneka ragam dengan warna yang indah dan manfaat yang banyak (DEPAG, 2010). Menurut Shihab (2002) dalam tafsir al Mishbah menunjukkan bahwa kata كَرِيمٍ digunakan untuk menyifati segala sesuatu yang baik sesuai obyeknya.

Allah SWT berfirman dalam surat al An'am ayat (6): 99.



*“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 SWT) bagi orang-orang yang beriman.” (QS. Al An'am (6): 99).*

Firman Allah SWT dalam surat al An'am ayat 99 menjelaskan bahwa Allah SWT menurunkan air hujan dari awan, kemudian dengan air tersebut Allah SWT mengeluarkan setiap jenis tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam bentuk, ciri khas serta berbeda-beda tingkahnya, kelebihan dan kekurangannya (al

Maraghi, 1992). Lafal *ghairu mutasyabih* dalam tafsir Ibnu Katsir artinya yang tidak serupa dedaunan, tetapi bentuknya serupa, sebagian darinya serupa dengan sebagian yang lain, tetapi berbeda dalam buah yang dihasilkannya, baik dari bentuk, rasa maupun kandungannya. Sementara itu, *انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ*, maksudnya adalah Allah SWT menciptakan dari tidak ada menjadi ada, pada mulanya berupa tumbuh-tumbuhan, lalu menjadi pohon, dan menghasilkan buah, ada yang menghasilkan anggur, kurma, dan lain sebagainya dari semua jenis tumbuh-tumbuhan dan pohon-pohonan yang berbeda-beda warna dan bentuknya serta berbeda-beda rasa dan bau hasil buahnya (Abdullah, 2007).

Beberapa ayat yang menjelaskan tentang pemanfaatan tumbuh-tumbuhan adalah surat al Mu'minin (23): 20 dan an Nahl (16): 67.



“Dan pohon kayu keluar dari Thursina (pohon zaitun), yang menghasilkan minyak, dan pemakan makanan bagi orang-orang yang makan.” (QS. Al Mu'minin (23): 20).



“Dan dari buah korma dan anggur, kamu buat minuman yang memabukkan dan rezki yang baik. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah SWT) bagi orang yang memikirkan.” (QS. An Nahl (16): 67).

Maksud dari kedua ayat tersebut dalam tafsir Ibnu Katsir surat al Mu'minin (23): 20 bahwa buah zaitun itu mengandung berbagai manfaat, darinya dapat dihasilkan minyak dan juga dapat dijadikan lezat makanan. Surat an-Nahl

(16): 67 bahwa rizki yang baik adalah yang dihalalkan dari kedua buah tersebut, yakni buah yang kering dari keduanya baik dari buah kurma maupun anggur (kismis), dan segala yang sudah diolah dari kedua buah tersebut baik itu berupa manisan, cuka, maupun minuman perasan, semuanya adalah halal diminum sebelum disalah gunakan (Abdullah, 2007). Menurut Fattah (2010) khasiat zaitun diantaranya adalah sebagai penawar racun, mengurangi kolesterol berbahaya, mengurangi resiko terjadinya *trombosis arteriosklerosis*, mencegah kanker, mengurangi timbulnya tukak lambung, mengurangi peradangan sendi, mengatasi cacing, memperlambat rambut beruban, menguatkan gusi, menyembuhkan borok, erysipelas, dan mencegah bau keringat. Buah anggur memiliki khasiat menggemukkan, serta memberikan nutrisi, sedangkan buah kurma berkhasiat untuk membersihkan hati dari racun, menguatkan kemampuan seksual, menyembuhkan radang tenggorokan, membunuh cacing, menutup luka, menyembuhkan *hemoptysis*, penyakit kuning, menyuburkan badan, serta merupakan nutrisi yang baik.

Allah SWT menciptakan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang tersebar luas di muka bumi ini adalah semata-mata demi kepentingan umat manusia. Allah SWT menciptakan tumbuh-tumbuhan berbagai macam bentuk, ukuran, warna, bau, rasa dengan penuh hikmah untuk dapat diambil manfaatnya. Banyak tumbuh-tumbuhan yang bisa dikaji untuk dapat diambil manfaatnya. Semakin kita mengkaji ilmu Allah SWT semakin kita dapat meningkatkan keimanan dan ketaqwaan kepada Allah SWT.

## 2.2 Mikroalga *Chlorella sp.*

Mikroalga yang digunakan sebagai sampel pada penelitian ini merupakan mikroalga hasil uji taksonomi yang telah dilakukan oleh Anggraeni, dkk., (2014) dengan klasifikasi familia dari *Chlorellaceae*, genus *Chlorella* dan spesies *Chlorella sp.* (Lampiran 5). Hasil penelitian Amaliyah (2013) melalui uji taksonomi (deskripsi sampel) (Lampiran 6) menunjukkan bahwa sampel memiliki kesamaan umum dengan alga devisi Chlorophyta atau alga hijau yang identik dengan jenis *Chlorella sp.*. Adapun ciri-ciri yang ditunjukkan berdasarkan penelitian adalah sel *Chlorella sp.* berbentuk bulat seperti cawan atau lonceng dengan posisi menghadap ke atas. *Chlorella sp.* hidup secara soliter dan berukuran 2–8  $\mu\text{m}$ . Warna hijau pada *Chlorella sp.* disebabkan karena selnya dominan mengandung klorofil a dan b, di samping karotin dan xantofil.

*Chlorella sp.* dan *Dunaliella sp.* merupakan dua jenis mikroalga yang paling sering diteliti dan dimanfaatkan (Chisti, 2008). Hasil penelitian Wathnani, dkk., (2012) menunjukkan bahwa ekstrak aceton:metanol:dietil eter (5:2:1 v/v) *Chlorella vulgaris* positif memiliki aktivitas antimikroba terhadap *B. subtilis* dan *S. sonnei*. Menurut Rania dan Taha (2008) dalam Thillairajesekar dkk., (2009) ekstrak heksana dan ekstrak etil asetat mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* memiliki aktivitas antibakteri dan antijamur. Sementara itu, hasil penelitian Bariyyah, dkk., (2013) menunjukkan bahwa ekstrak metanol *Chlorella sp.* mengandung senyawa golongan steroid, tanin dan asam askorbat yang berpotensi sebagai antioksidan. Menurut Khamidah, dkk., (2013) ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* yang mengandung golongan senyawa steroid dan tanin memiliki aktivitas antibakteri terhadap *escherichia coli* dan *staphylococcus aureus*. Sedangkan menurut

Amaliyah, dkk., (2013) ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* memiliki toksisitas serta berpotensi sebagai antioksidan dan antibakteri.

### **2.3 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.* dalam MET 4 %**

Medium ekstrak taube (MET) merupakan salah satu sumber media alami yang dapat digunakan untuk media pertumbuhan mikroalga. Media tersebut mengandung unsur makro dan mikro, vitamin, mineral serta asam amino yang dibutuhkan bagi pertumbuhan mikroalga (Richmond, 1986 dalam Prihantini, dkk., 2005). Taube kacang hijau merupakan sayuran yang umum dikonsumsi, mudah diperoleh, ekonomis dan tidak menghasilkan senyawa yang berefek toksik. MET mengandung makronutrien seperti K, P, Ca, Mg dan Na dibutuhkan oleh sel mikroba sebagai komponen penyusun sel. Mikronutrien seperti Fe, Zn, Mn dan Cu dibutuhkan oleh sel baik sebagai kofaktor enzim maupun komponen pembentuk klorofil Mn, Zn, Cu, Mo, B, Ti, Cr dan Co yang terdapat dalam media kultur akan mengaktifkan fotosintesis pada mikroalga. Fotosintesis yang berlangsung efektif akan mempengaruhi produk (Wulandari, dkk., 2010).

Penggunaan ekstrak taube sebagai media kultur mikroalga yang disebut dengan MET telah dilakukan terhadap *Chlorella sp.* Hasil penelitian Wulandari, dkk., (2010) menunjukkan bahwa penggunaan Media Ekstrak Taube (MET) menghasilkan pertumbuhan mikroalga yang sangat pesat (kelimpahan sel 21 – tak terhingga) dibandingkan dengan medium lainnya yaitu Medium Air Laut (MAL) (kelimpahan sel 0-10 sel) dan Medium Guillard (MG) (kelimpahan sel 11 – 20 sel). Prihantini, dkk., (2007) meneliti pengaruh konsentrasi MET terhadap pertumbuhan *Scenedesmus* isolat Subang. Rata-rata kerapatan sel oleh kultur

dalam MET 1% (918.750 sel/mL), MET 2% (1.348.962 sel/mL), MET 3% (2.396.250 sel/mL), MET 4% (3.981.071 sel/mL), MET 5% (898.750 sel/mL), MET 6% (660.693 sel/mL). Hasil penelitian Khamidah (2013) juga menunjukkan bahwa *Chlorella sp.* yang dikultivasi dalam MET 4 % menghasilkan kelimpahan sel tertinggi sebesar 4.880.000 sel/mL pada fase stasioner dihari ke-10.

### 2.2.1 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella sp.*

Pertumbuhan mikroalga dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti salinitas, cahaya, suhu, derajat keasaman, nitrogen, karbondioksida, dan nutrisi (Rostini, 2007). Menurut Dewi dan Gultom (2009), faktor-faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan populasi *Chlorella sp.* adalah:

#### 1. Temperatur

*Chlorella sp.* membutuhkan temperatur yang tinggi untuk pertumbuhannya. Temperatur optimum untuk pertumbuhan *Chlorella sp.* adalah 30 °C. Menurut Borowitzka dan Lesley (1998) kisaran suhu 25 – 30 °C merupakan kondisi umum bagi pertumbuhan mikroalga.

#### 2. Intensitas Cahaya

Proses fotosintesis *Chlorella sp.* membutuhkan intensitas cahaya rata-rata 4000 – 3000 lux.

#### 3. pH

Nielsen (1955) menyatakan bahwa pH yang sesuai untuk pertumbuhan *Chlorella sp.* berkisar 6,6 – 7,3. Menurut Prihantini, dkk., (2005) dalam penelitiannya mengetahui pengaruh derajat keasaman (pH) awal MET terhadap kerapatan sel

mikroalga *Chlorella beijerinck* dengan menggunakan MET 4 % menghasilkan kerapatan sel tertinggi (5.677.625 sel/mL) terjadi pada pH awal 7.

#### 4. Oksigen Terlarut

Oksigen diperlukan *Chlorella sp.* untuk respirasi. Oksigen terlarut pada perairan berasal dari hasil fotosintesis dan difusi dari udara. Biakan alga di laboratorium perlu penyediaan oksigen terlarut yang cukup, kadar oksigen terlarut 3 – 5 ppm kurang produktif, 5 – 7 ppm produktivi tinggi dan diatas 7 ppm sangat tinggi.

#### 5. Unsur Hara

Unsur-unsur yang dibutuhkan untuk pertumbuhan alga terdiri dari unsur mikro dan unsur makro. Makronutrien yaitu unsur-unsur yang dibutuhkan dalam jumlah besar, meliputi C, H, O, N, P, K, S, Si, Ca, dan Cl. Mikronutrien adalah unsur-unsur yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit dan merupakan koenzim meliputi Mn, Fe, Zn, Cu dan Mg. Menurut Borowitzka dan Lesley (1988) makronutrien yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroalga terdiri dari karbon, nitrogen, fosfor, sulfat dan potassium. Sedangkan mikronutrien yang diperlukan meliputi Co, Mo, Mn, Vitamin B<sub>12</sub> dan Thiamin.

#### 6. Karbondioksida

Karbon merupakan salah satu makronutrien yang dibutuhkan untuk pertumbuhan *Chlorella sp.* Salah satu sumber karbon diperairan adalah CO<sub>2</sub> yang secara langsung digunakan sebagai bahan untuk fotosintesis.

#### 7. Salinitas

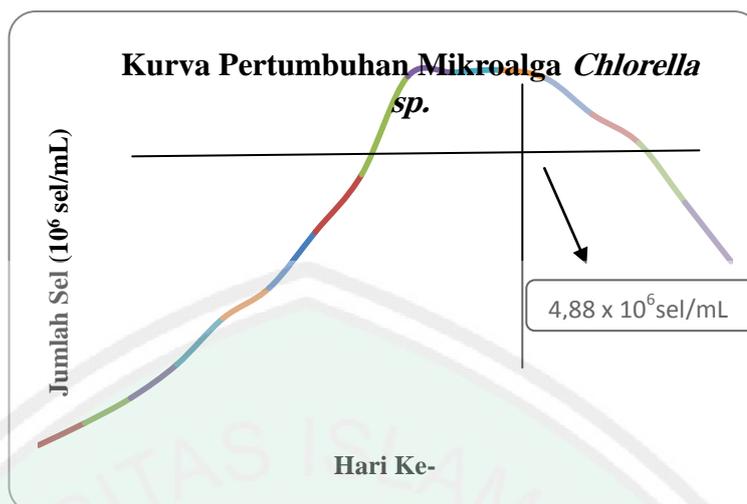
Salinitas adalah konsentrasi ion-ion terlarut dalam air yang dinyatakan dalam permil. Salinitas dapat mempengaruhi kehidupan organisme perairan. Salinitas berhubungan erat dengan tekanan osmosis air. Tekanan osmotik yang tinggi dapat

menghambat pertumbuhan *Chlorella sp.* Menurut Isnansetyo dan Kurniastuti (1995), salinitas optimum *Chlorella sp.* adalah 25 – 28 per mil.

### **2.2.2 Fase Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella sp.***

Kurva pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam MET 4 % menunjukkan fase eksponensial dimulai pada hari ke-0 sampai hari ke-8. Fase stasioner dimulai pada hari ke-8 sampai hari ke-11 yang ditandai dengan kelimpahan sel *Chlorella sp.* yang cenderung tidak bertambah, sedangkan pada hari ke-11 dan seterusnya merupakan fase kematian.

Fase eksponensial merupakan fase dimana sel membelah dengan cepat, sel-sel berada dalam keadaan stabil dan jumlah sel bertambah dengan kecepatan konstan. Fase stasioner merupakan fase dimana jumlah sel cenderung konstan yang disebabkan oleh habisnya nutrisi dalam medium sehingga mengakibatkan pertumbuhan berhenti. Fase kematian menunjukkan jumlah populasi menurun. Jumlah sel yang mati per satuan waktu perlahan-lahan bertambah dan akhirnya kecepatan mati dari sel-sel menjadi konstan (Fogg, 1975). Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.1.



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

Kelimpahan sel *Chlorella sp.* pada hari ke-0 (400.000 sel/mL), hari ke-1 (672.000 sel/mL), hari ke-2 (912.000 sel/mL), hari ke-3 (1.216.000 sel/mL), hari ke-4 (1.216.000 sel/mL), hari ke-5 (2.192.000 sel/mL), hari ke-6 (2.656.000 sel/mL), hari ke-7 (3.616.000 sel/mL) hari ke-8 (4.656.000 sel/mL), hari ke-9 (4.784.000 sel/mL), hari ke-10 (4.880.000 sel/mL), hari ke-11 (4.704.000 sel/mL). Sementara itu aktivitas antibakteri pada fase pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Aktivitas antibakteri terhadap fase pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* (Khamidah, dkk., 2013)

Ekstrak Metanol <i>Chlorella sp.</i>	Zona Hambat (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Fase $\frac{1}{2}$ eksponensial	6,5	3,3
Fase $\frac{3}{4}$ eksponensial	6,7	8,4
Fase awal stasioner	7,4	10,6
<b>Fase stasioner</b>	<b>9,9</b>	<b>12,0</b>
Fase akhir stasioner	7,3	11,0

## 2.4 Isolasi Senyawa Steroid Mikroalga *Chlorella sp.*

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

Pemisahan metabolit sekunder dalam sampel dapat dilakukan dengan cara ekstraksi senyawa aktif. Metode ekstraksi yang dilakukan pada penelitian ini 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 di dalam 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, 2006).

Aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana mikroalga *Chlorella sp.* hasil ekstraksi *Soxhlet* (EC<sub>50</sub> 123,8 ppm) (Susanti, 2010), sedangkan menurut Bariyyah, dkk., (2013) aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat *Chlorella sp.* hasil ekstraksi maserasi (27,320 ppm). Ekstraksi senyawa aktif mikroalga *Chlorella sp.* dengan maserasi menggunakan metanol, etil asetat dan n-heksana menghasilkan randemen berturut-turut 7,001 %, 3,673 % dan 0,004 % (Amaliyah, dkk., 2013). Hasil penelitian Anggraeni, dkk., (2014) juga menunjukkan bahwa ekstraksi senyawa aktif mikroalga *Chlorella sp.* yang dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut methanol *p.a* menghasilkan randemen sebesar 13,6069 % berwarna hijau tua pekat. Sedangkan Desianti, dkk., (2014) dalam penelitiannya menyatakan ekstrak metanol yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* yang memiliki toksisitas terhadap larva udang *Artemia selina Leach* (LC<sub>50</sub> 43,3044 ppm) adalah golongan senyawa steroid.

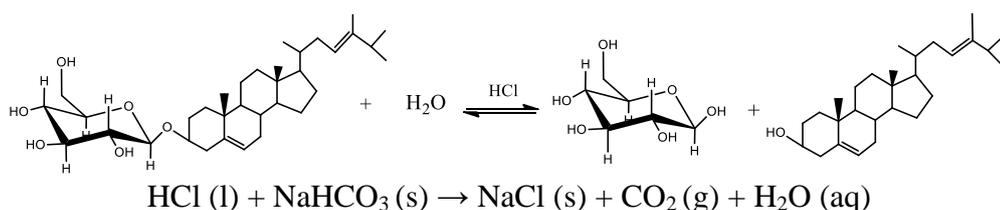
Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam ke dalam pelarut

tersebut (Soebagio, dkk., 2005). Kepolaran suatu pelarut menunjukkan tingkat kelarutan terhadap suatu bahan. Suatu bahan yang lebih larut dalam air disebut memiliki sifat yang polar dan sebaliknya apabila lebih larut dalam pelarut organik disebut nonpolar (Sudarmadji, dkk., 2003).

### 2.3.2 Hidrolisis dan Partisi

Di alam, sterol tumbuhan ditemukan dalam keadaan bebas seperti glikosida (Khalaf, dkk., 2011). Hidrolisis dilakukan untuk memutus ikatan glikosida dengan cara penambahan asam. Prinsip hidrolisis asam adalah peruraian suatu senyawa dengan memutus ikatan glikosida menggunakan air dan katalis asam (Saifudin, dkk., 2006). Pemilihan asam kuat seperti HCl sebagai katalis disebabkan karena asam kuat akan lebih mudah melepas proton ( $H^+$ ) secara sempurna di dalam air, sedangkan asam lemah relatif lebih sukar sehingga asam lemah memiliki kecenderungan terionisasi sebagian dalam pelepasan ion  $H^+$ . Semakin banyak proton yang terionisasi dalam air, maka semakin kuat peranan proton dalam pemutusan ikatan glikosida (Handoko, 2006).

Afif (2012) melakukan hidrolisis menggunakan katalis HCl 2 N dan partisi ekstrak metanol alga merah *E. contoni*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil hidrolisis menggunakan HCl 2 N dan partisi etil asetat ( $LC_{50}143,43$  ppm) lebih bersifat toksik daripada ekstrak sebelum dihidrolisis ( $LC_{50}194,40$  ppm).



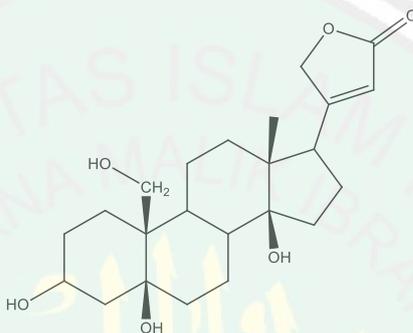
Gambar 2.2 Dugaan reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida dan penetralan dengan natrium bikarbonat (Mardiyah, 2012)

Berdasarkan penelitian Desianti, dkk., (2014) ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* fraksi etil asetat menunjukkan nilai  $LC_{50}$  43,3044 ppm dengan randemen 8,1952 %. Utami (2014) mengekstrak metabolit sekunder dari ekstrak metanol fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* mengandung golongan senyawa steroid memberikan zona hambat terhadap bakteri *S. Aureus* tertinggi (4,6 mm pada konsentrasi 2,5 %). Sedangkan menurut Imamah, dkk., (2015) randemen ekstrak metanol fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* 49,323 %. Menurut Halimah (2010) senyawa steroid akan mengalami dehidrasi dengan adanya penambahan asam kuat dan membentuk garam yang memberikan sejumlah reaksi warna. Ekstrak hasil hidrolisis memiliki tingkat kekentalan (viskositas) yang lebih kecil dari pada sebelum dihidrolisis. Hal ini dipengaruhi oleh gaya antarmolekul, semakin kuat gaya antarmolekul, maka zat akan semakin sulit mengalir dan akibatnya kekentalannya semakin tinggi (Effendy, 2010).

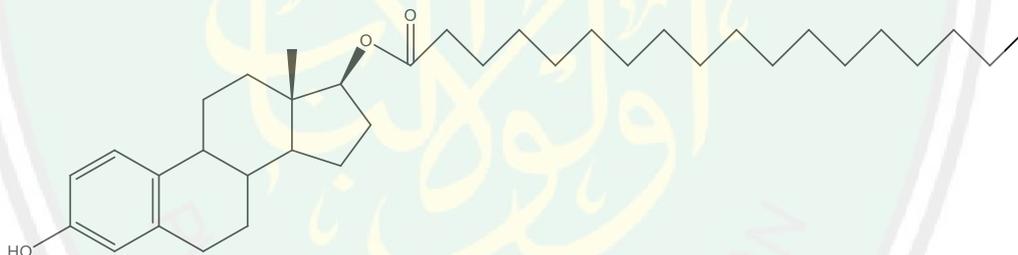
## 2.5 Steroid

Steroid adalah suatu golongan senyawa triterpenoid yang mengandung inti 1,2-siklopentanaperhidrofenantren yaitu dari 3 cincin sikloheksana dan 1 cincin siklopentana (Harbone, 1987). Steroid atau stereol biasanya larut dalam pelarut yang kurang polar (Sirait, 2007). Steroid terdapat dalam setiap makhluk hidup. Steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan disebut fitostereol, sedangkan yang ditemukan dalam jaringan hewan disebut kolesterol (Robinson, 1995).

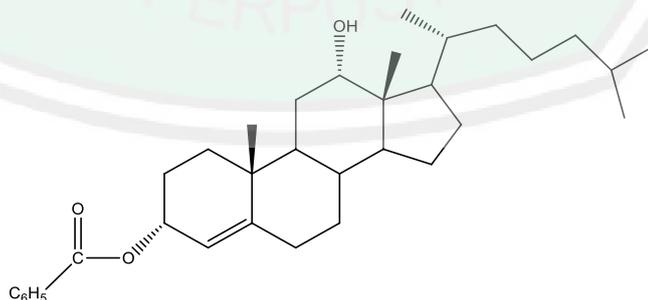
Reaksi warna yang digunakan untuk uji warna pada steroid adalah dengan reaksi LB yang menghasilkan warna hijau biru (Burke, dkk., 1974). Hal yang sama juga diutarakan oleh Sulastry dan Kurniawati (2010) bahwa senyawa steroid setelah disemprot dengan reagen LB menghasilkan warna hijau.



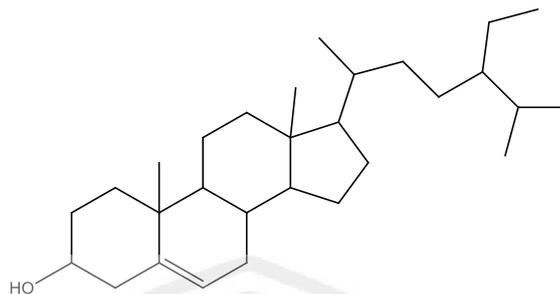
Gambar 2.3 Struktur Strophanthidin (Freidman, dkk., 2006)



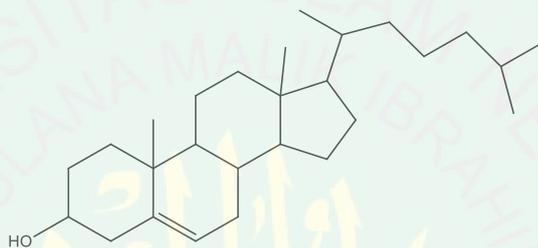
Gambar 2.4 Struktur 17β-estradiol 17-stearate (Vihma and Matti, 2011).



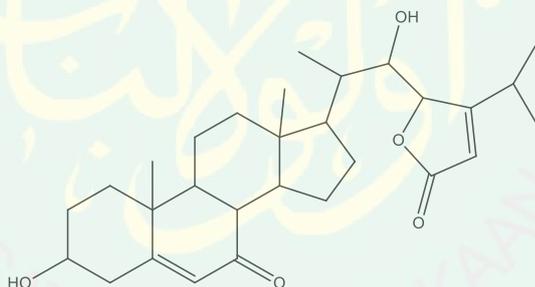
Gambar 2.5 Struktur 12α-Hydroxy-5β-cholestane-3α-yl benzoate (Freidman, dkk., 2006).



Gambar 2.6 Struktur  $\beta$ -sitosterol dari Spong *Biemna triraphis* (Sapar, dkk., 2004).



Gambar 2.7 Struktur Kolesterol (Sitaula, 2016).



Gambar 2.8 Struktur Antheridiol (Carlile, 1996).

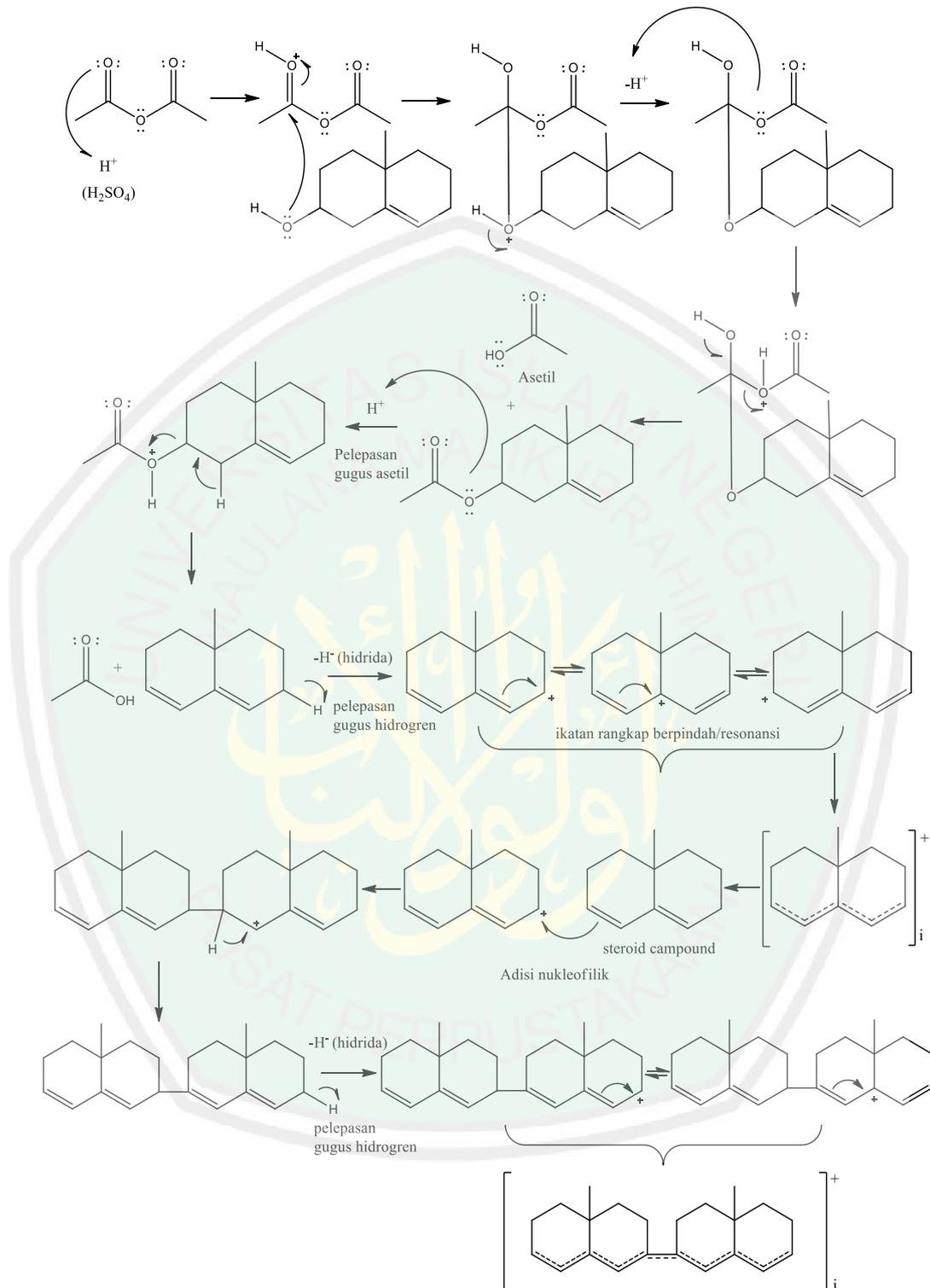
Pemilihan fase gerak yang tepat dapat mendukung keberhasilan dalam pemisahan senyawa dari komponen campuran. Campuran pelarut n-heksana dan etil asetat merupakan sistem eluen universal yang sering direkomendasikan sebagai fase gerak dalam kromatografi karena mudah diuapkan dan mudah mengatur tingkat kepolaran eluen (Sundari, 2010). Menurut Wagner (1996) dalam Marlina (2007) eluen terbaik untuk identifikasi steroid adalah n-heksan-etil asetat (4:1). Imamah, dkk., (2015) mencari eluen terbaik untuk memisahkan steroid

dengan menggunakan 5 variasi eluen diantaranya yaitu n-heksana:etil asetat (4,25:0,75), n-heksana:etil asetat (4,5:0,5), n-heksana:etil asetat (4:1), n-heksana:etil asetat (3,75:1,25), dan n-heksana:etil asetat (3,5:1,5) yang masing-masing menghasilkan 4 noda, 7 noda, 12 noda, 9 noda dan 9 noda. Spot noda yang paling banyak (12 noda) dengan pereaksi Lieberman-Buchard dihasilkan dari eluen n-heksana:etil asetat (4:1) dengan Rf berkisar antara 0,012 – 0,987 (orange, ungu, merah muda, jingga, hijau pada UV 366 nm). Sriwahyuni (2010) memisahkan senyawa steroid menggunakan eluen sikloheksana-etil asetat (1:1) dengan pereaksi Lieberman-Buchard menghasilkan 12 noda dengan Rf antara 0,06 – 0,86 (hijau kebiruan, hijau kehitaman dan ungu yang tengahnya berwarna hijau kebiruan pada UV 366 nm) dari ekstrak etil asetat tanaman anting-anting. Hayati, dkk., (2012) menyebutkan bahwasannya pemisahan senyawa steroid pada ekstrak etil asetat tanaman anting-anting (eluen n-heksana : etil asetat (7:3)) dengan pereaksi Lieberman-Buchard menghasilkan 9 noda dengan nilai Rf berkisar antara 0,06 – 0,82. Noda ke 1,2 dan 8 menunjukkan warna hijau kebiruan, noda ke 4 menunjukkan warna hijau, noda ke 6 menunjukkan warna ungu yang tengahnya berwarna biru kehijauan, noda ke 9 menunjukkan warna hijau kebiruan muda. Senyawa-senyawa tersebut diduga merupakan senyawa steroid. Hasil ekstrak diuji dengan pereaksi Liebermann-Burchard yang menghasilkan warna hijau menunjukkan adanya steroid (Lajis, dkk., 1985).

## **2.6 Identifikasi Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat dalam Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.***

Skринing fitokimia pada pengujian senyawa diperlukan untuk mengetahui bahwa terdapat senyawa steroid didalam sampel mikroalga *Chlorella sp.*. Analisis senyawa steroid didasarkan pada kemampuan senyawa tersebut membentuk warna biru kehijauan ketika bereaksi dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dalam pelarut asam asetat anhidrat (Ciulei, 1984). Senyawa steroid ketika direaksikan dengan reagen Lieberman-Burchard akan mengalami perpanjangan konjugasi. Terbentuknya warna hijau kebiruan saat uji fitokimia akibat dari perpanjangan konjugasi.

Reaksi ini diawali dengan proses asetilasi gugus hidroksil menggunakan anhidrida asetat. Gugus asetil yang terbentuk pada proses ini merupakan gugus pergi (*leaving group*) yang baik sehingga terbentuk ikatan rangkap. Selanjutnya terjadi pelepasan gugus hidrogen beserta elektronnya yang mengakibatkan ikatan rangkap berpindah. Senyawa yang terbentuk mengalami resonansi karbokation. Adanya serangan karbokation menyebabkan adisi elektrofilik dengan diikuti pelepasan hidrogen. Akibat pelepasan gugus hidrogen ini, senyawa akan mengalami perpanjangan konjugasi yang akan memunculkan warna. Reaksi dugaan yang terjadi pada uji steroid ditunjukkan pada gambar 2.9.



ikatan rangkap berpindah /resonansi menyebabkan terjadinya perpanjangan konjugasi yang menyebabkan terbentuknya warna

Gambar 2.9 Dugaan mekanisme reaksi pembentukan warna pada uji steroid (Siadi, 2012)

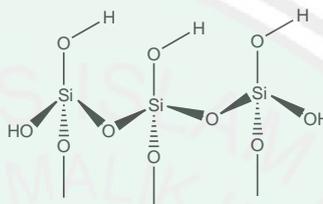
## 2.7 Kromatografi Kolom

Kromatografi adalah proses pemisahan yang tergantung pada perbedaan distribusi campuran komponen antara fase gerak dan fase diam. Fase diam dapat berupa pembentukan kolom dimana fase gerak dibiarkan untuk mengalir (kromatografi kolom) atau berupa pembentukan lapis tipis dimana fase gerak dibiarkan untuk naik berdasarkan kapilaritas (kromatografi lapis tipis). Senyawa yang berinteraksi lemah dengan fase diam akan bergerak lebih cepat melalui sistem kromatografi. Senyawa dengan interaksi yang kuat dengan fase diam akan bergerak sangat lambat (Christian, 1994; Skoog, 1998).

Solven murni atau sistem solven tunggal dapat digunakan untuk mengelusi semua komponen. Pada elusi gradien, kepolaran sistem solven ditingkatkan secara perlahan dengan meningkatkan konsentrasi solven ke yang lebih polar. Pemilihan solven eluen tergantung pada jenis adsorben yang digunakan dan kemurnian senyawa yang dipisahkan. Solven harus mempunyai kemurnian yang tinggi, karena keberadaan pengganggu seperti air, alkohol, atau asam pada solven yang kurang polar akan mengganggu aktivitas adsorben (Braithwaite and Smith, 1995). Urutan kepolaran eluen dalam mengelusi senyawa pada kromatografi menurut Noviyanti (2010) air > metanol > etanol > aseton > etil asetat > dietil eter > kloroform > benzene > karbon tetraklorida > petroleum eter.

Silika gel adalah fase diam (adsorben) yang paling sering digunakan untuk pemisahan produk alam (Cannel, 1998). Banyaknya adsorben yang digunakan bergantung pada tingkat kesulitan pemisahan dari suatu senyawa dan jumlah sampel yang akan dipisahkan. Secara umum, tiap gram sampel yang dipisahkan membutuhkan adsorben 30 – 50 gram. Jika pemisahan yang dilakukan cukup

sulit, jumlah adsorben yang dibutuhkan dapat mencapai 200 gram. Jumlah adsorben yang dibutuhkan akan lebih sedikit untuk pemisahan senyawa-senyawa yang perbedaan kepolarannya cukup besar (Kristanti, dkk., 2008). Struktur dasar silika gel dapat dilihat pada Gambar 2.10.



Gambar 2.10 Struktur dasar silika gel (Noviyanti, 2010)

Permukaan silika gel mengandung gugus silanol. Gugus hidroksil ini merupakan pusat aktif dan berpotensi dapat membentuk ikatan hidrogen kuat dengan senyawa yang dipisahkan. Silika gel membentuk ikatan hidrogen terutama dengan donor H seperti alkohol, fenol, amina, amida, dan asam karboksilat (Palleros, 2000). Semakin kuat kemampuan ikatan hidrogen suatu senyawa, semakin kuat akan tertahan oleh silika gel. Seberapa kuat senyawa tertahan dalam silika gel tergantung pada kepolaran fase gerak. Semakin kuat kemampuan ikatan hidrogen suatu solven, semakin baik eluen untuk melulusi senyawa polar yang teradsorb pada kolom silika gel (Cannel, 1998). Kepolaran adsorben dalam kromatografi menurut Noviyanti (2010) aluminium oksida (alumina) > florisil (magnesium silikat) > asam silika (silica gel) > gula > selulosa.

Pengisian adsorben dalam kolom dapat dilakukan menggunakan dua cara:

#### 1. Pengisian cara basah

Pengisian cara basah dilakukan dengan membuat campuran antara adsorben dengan eluen yang akan digunakan untuk elusi. Campuran dibuat

dengan kekentalan tertentu agar dapat dituang dalam kolom. Adsorben ditambahkan pada pelarut sedikit demi sedikit agar tidak terjadi gumpalan dalam campuran. Campuran yang terbentuk dimasukkan dalam kolom menggunakan corong. Selama proses pemasukan adsorben campuran, dinding kolom diketuk-ketuk agar lapisan yang terbentuk benar-benar mampat dan juga tidak terdapat gelembung. Kran bagian bawah dari kolom dibuka untuk mengeluarkan pelarut. Langkah tersebut diulang sampai seluruh adsorben yang akan digunakan untuk elusi berhasil dimasukkan dalam kolom. Setelah itu, ditunggu cairan yang berada di atas adsorben sampai jernih (Kristanti, dkk., 2008).

## 2. Pengisian cara kering

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

Saleh (2007) memisahkan ekstrak metanol fraksi kloroform dari akar tumbuhan *S. album* yang menunjukkan positif steroid dengan cara kromatografi kolom menggunakan fase diam *silica gel* 60 (70 – 230 mesh; 66,67 g) dengan panjang kolom 40 cm, diameter 2,5 cm dan dielusi secara isokratik dengan pelarut n-heksana:etil asetat (82:18) dengan penampungan 5 mL setiap fraksi menghasilkan 170 fraksi. Hasil penelitian menunjukkan fraksi ke 52 – 59 positif steroid terhadap pereaksi *Lieberman-Burchard* (LB). Bogoriani (2008) melakukan

isolasi glikosida steroid menggunakan kromatografi kolom gravitasi dengan menggunakan fasa diam silika gel 60 (70-230 mesh) dan dielusi menggunakan fase gerak campuran kloroform, metanol, dan air (3:1:0,1). Fraksi ditampung setiap 3 mL menghasilkan 50 fraksi. Hasil penelitian menunjukkan tiga kelompok fraksi (A, B, C) dimana fraksi-fraksi B menampakkan satu noda melalui uji kemurnian dan positif terhadap saponin steroid. Sementara itu, (Verma, dkk., 2013) melakukan isolasi dan pemurnian saponin-steroid dari ekstrak daun *Asparagus racemosus* secara kromatografi kolom, menggunakan fase diam *silica gel* (230-400 mesh) dan dielusi dengan kloroform:metanol (6:4). Hasil penelitian menunjukkan senyawa hasil isolasi positif saponin-steroid terhadap LB.

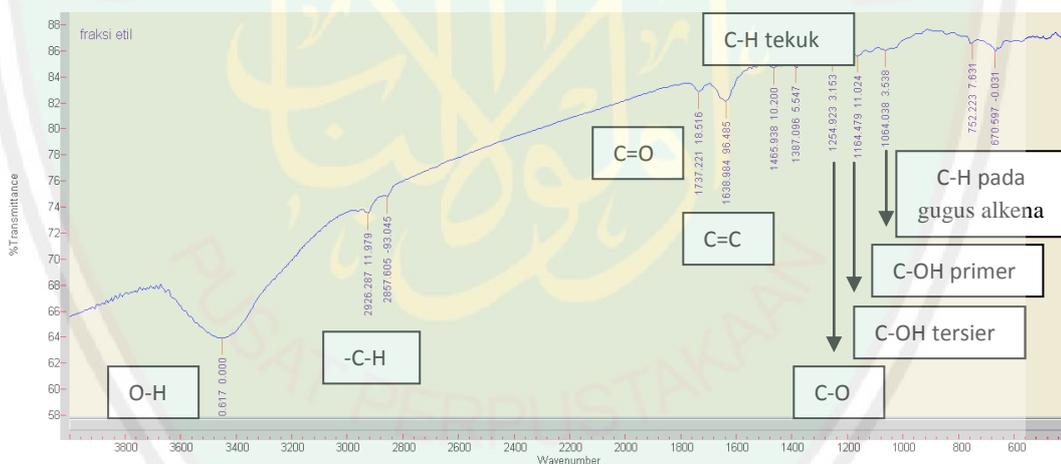
Semua fraksi hasil pemisahan kromatografi kolom selanjutnya dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis untuk melihat noda dengan Rf yang sama. Fraksi-fraksi dengan noda yang sama pada kromatografi lapis tipis digabungkan dan diuapkan pelarutnya (Saleh, 2007). Hal yang sama juga diutarakan oleh Mulyani, dkk., (2013) yang menyatakan bahwa fraksi yang memiliki noda dan nilai Rf (*retention factor*) yang sama digabung sehingga didapatkan fraksi yang lebih sederhana. Selanjutnya, semua fraksi yang telah didapatkan pada kromatografi kolom ini diperiksa senyawa metabolit sekundernya dan dilihat juga pola pemisahan komponennya pada plat KLT.

## 2.8 Identifikasi Menggunakan FTIR

Spektrofotometer infra merah merupakan alat untuk mendeteksi gugus fungsional, mengidentifikasi senyawa dan menganalisis campuran (Day, Jr., R.A. dan Underwood, A.L, 1999). Instrumen ini digunakan untuk mengukur

radiasi infra merah pada berbagai panjang gelombang (Fessenden, 1982). Daerah spektra spektroskopi IR dibagi menjadi 3, yaitu IR dekat (antara 0,8-2,5  $\mu\text{m}$  atau 12.500-4.000  $\text{cm}^{-1}$ ), IR tengah (antara 2,5-25  $\mu\text{m}$  atau 4.000-400  $\text{cm}^{-1}$ ), dan IR jauh (antara 25-1.000  $\mu\text{m}$  atau 400-10  $\text{cm}^{-1}$ ) (Rohman dan Gandjar, 2012).

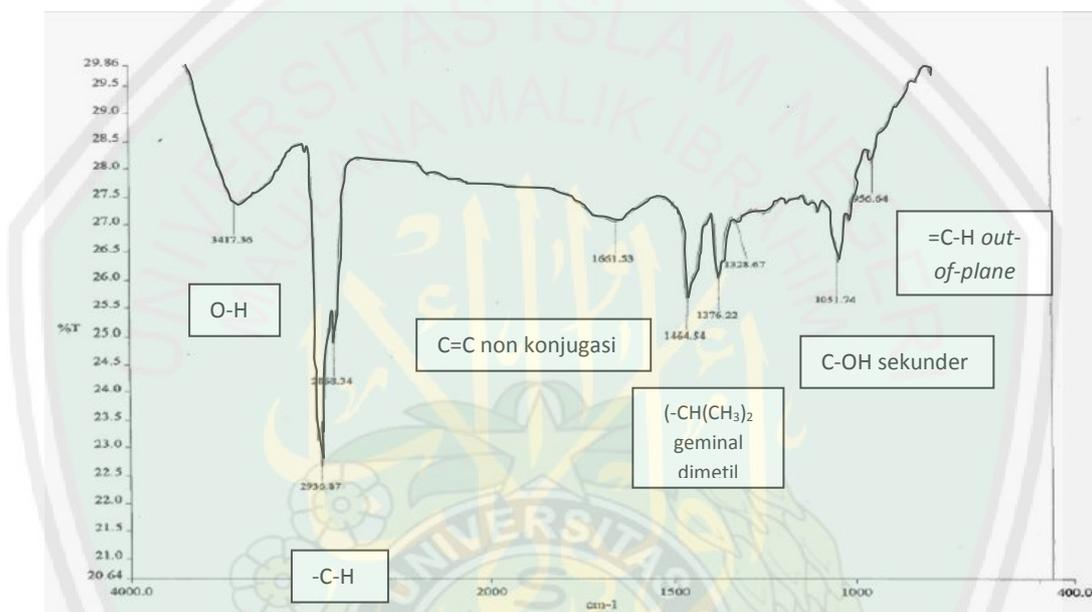
Imamah, dkk., (2015) berhasil mengidentifikasi senyawa steroid dari fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan FTIR dengan informasi serapan pada daerah bilangan gelombang 3450,61  $\text{cm}^{-1}$  (O-H), bilangan gelombang 2926,28  $\text{cm}^{-1}$  dan 2857,60  $\text{cm}^{-1}$  (-C-H), 1737,22  $\text{cm}^{-1}$  (C=O), 1638,98  $\text{cm}^{-1}$  (C=C), 1465,93  $\text{cm}^{-1}$  dan 1387,09  $\text{cm}^{-1}$  (C-H tekuk), 1254,92  $\text{cm}^{-1}$  (C-O), 1164,47  $\text{cm}^{-1}$  (C-OH alkohol tersier), 1064,03  $\text{cm}^{-1}$  (C-OH alkohol primer), 752,22  $\text{cm}^{-1}$  dan 670,59  $\text{cm}^{-1}$  (C-H pada gugus alkena).



Gambar 2.11 Spektrum IR senyawa steroid hasil isolasi dari isolat fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* (Imamah, dkk., 2015).

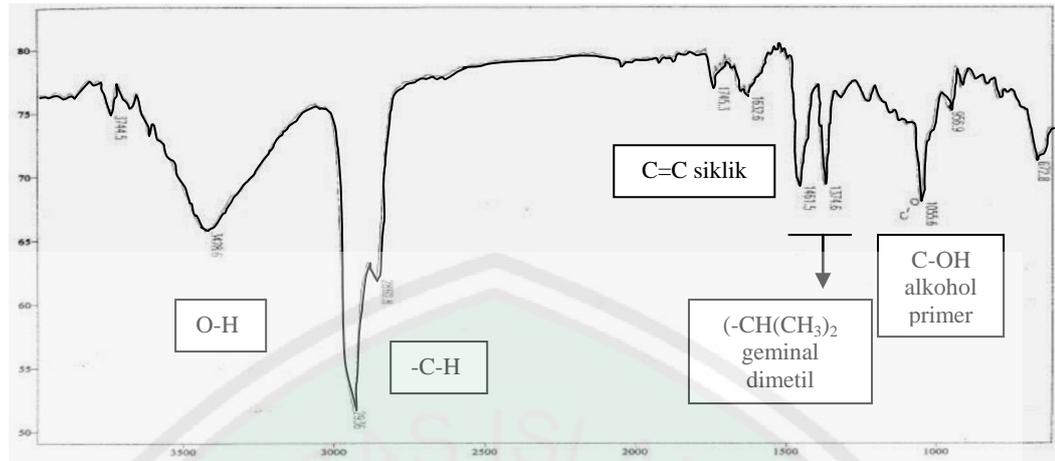
Saleh (2007) juga berhasil mengidentifikasi senyawa steroid dari ekstrak metanol fraksi kloroform akar tumbuhan cendana menggunakan FTIR dengan informasi serapan melebar pada daerah bilangan gelombang 3417,36  $\text{cm}^{-1}$  (O-H), pita serapan tajam dengan intensitas kuat dan sedang pada daerah bilangan gelombang 2936,87  $\text{cm}^{-1}$  dan 2868,34  $\text{cm}^{-1}$  (C-H), bilangan gelombang 1661,53

$\text{cm}^{-1}$  (C=C non konjugasi),  $1464,54 \text{ cm}^{-1}$  dan ( $1376,22\text{-}1328,67 \text{ cm}^{-1}$ ) ( $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  geminal dimetil),  $1051,74 \text{ cm}^{-1}$  (C-OH alkohol siklik sekunder) dan  $956,64 \text{ cm}^{-1}$  ( $=\text{C-H out-of-plane}$ ). Berdasarkan data yang diperoleh, senyawa diduga mempunyai kemiripan steroid jenis clionasterol yang didukung dengan data-data hasil penentuan struktur kimia menggunakan spektrometer NMR- $^1\text{H}$ , NMR- $^{13}\text{C}$ , DEPT, HMQC, COSY, HMBC dan MS.



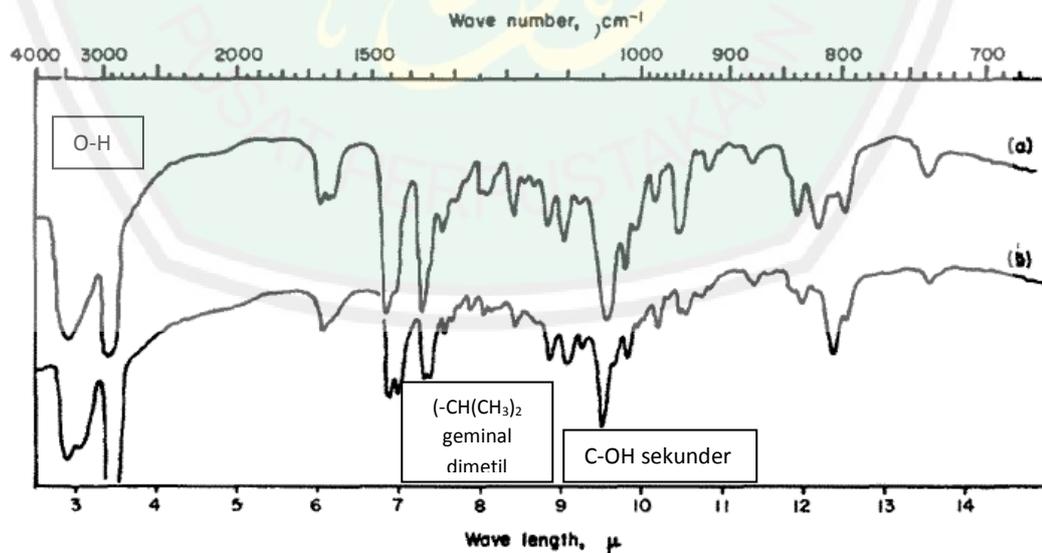
Gambar 2.12 Spektrum IR senyawa steroid hasil isolasi dari akar tumbuhan cendana (Saleh, 2007).

Tukiran, dkk., (2009) sukses mengidentifikasi senyawa steroid hasil isolasi kulit batang tumbuhan kedoya (*Dysoxylum gaudichaudianum*)(A. Juss.) Miq.) (Maliaceae) menggunakan FTIR dengan informasi serapan pada daerah bilangan gelombang  $3429 \text{ cm}^{-1}$  (O-H),  $2936\text{-}2861 \text{ cm}^{-1}$  (-C-H),  $1462 \text{ cm}^{-1}$  dan  $1375 \text{ cm}^{-1}$  ( $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  geminal dimetil) dan  $1056 \text{ cm}^{-1}$  (C-OH alkohol primer). Berdasarkan data yang diperoleh, senyawa diduga mempunyai kemiripan steroid jenis  $\beta$ -sitosterol dan stigmasterol yang didukung dengan data-data hasil penentuan struktur kimia menggunakan spektrometer NMR- $^1\text{H}$ , NMR- $^{13}\text{C}$ , HMQC.

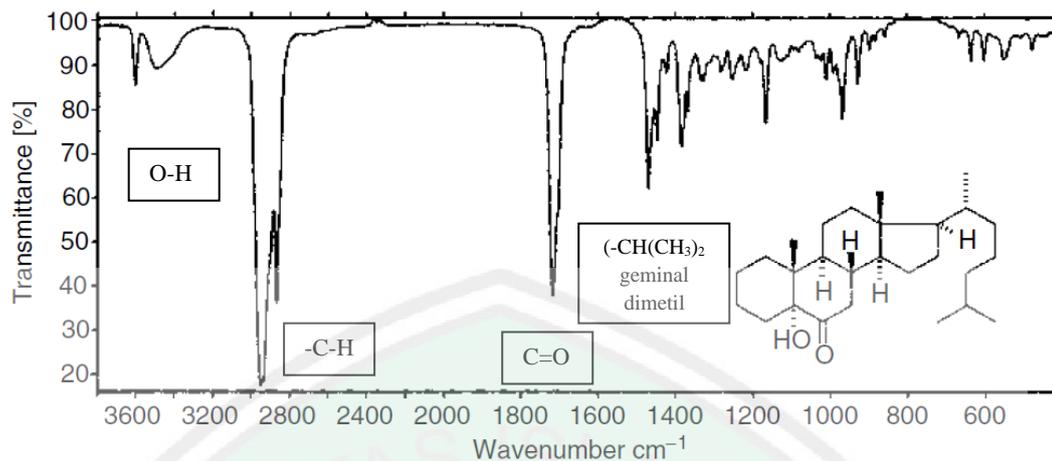


Gambar 2.13 Spektrum IR senyawa steroid hasil isolasi dari kulit batang tumbuhan kedoya (*Dysoxylum gaudichaudianum*)(A. Juss.) Miq.) (Maliaceae) (Tukiran, dkk., 2009).

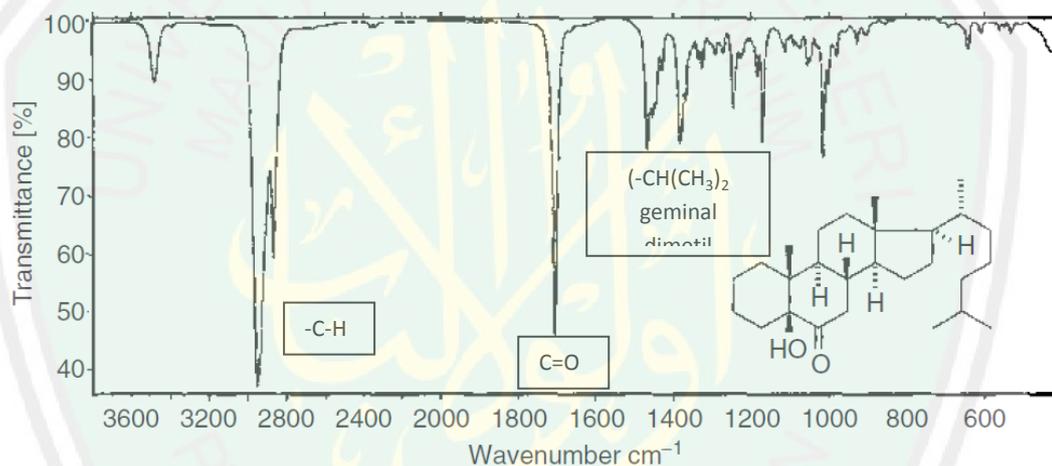
Gibbons dkk., (1968) melakukan identifikasi senyawa 28-isofukosterol (isomer fukosterol) dari alga hijau *Enteromorpha intensitinalis* dan *Ulva latuca* menggunakan FTIR dengan informasi bilangan gelombang yang hampir menyerupai bilangan gelombang dari fukosterol.



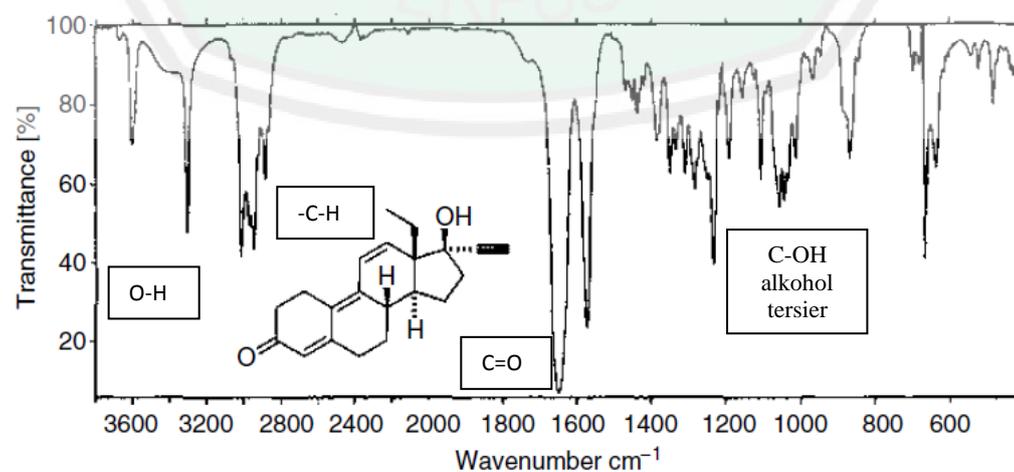
Gambar 2.14 Spekra IR (a) fukosterol hasil isolasi *Fucus spiralis* (b) sterol (28-isofukosterol) hasil isolasi *Enteromorpha intensitinalis* (Gibbons, dkk., 1968).



Gambar 2.15 Spektrum IR senyawa steroid jenis 5-hydroxy-5 $\alpha$ -cholestan-6one (Kasal, dkk., 2010).



Gambar 2.16 Spektrum IR senyawa steroid jenis 5-hydroxy-5 $\beta$ -cholestan-6-one (Kasal, dkk., 2010).



Gambar 2.17 Spektrum IR senyawa steroid jenis 17 $\alpha$ -ethynyl-17 $\beta$ -hydroxy-18-homoandrost-4,9,11-trien-3-one (Kasal, dkk., 2010).

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

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

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

##### **3.2.1 Alat-alat Penelitian**

Alat-alat yang digunakan adalah oven, timbangan analitik, *hotplate*, *heater*, cawan penguap, gelas arloji, pengaduk kaca, spatula, desikator, *shaker*, *inkubator*, lampu TL 36 watt, bola hisap, pipet tetes, pipet ukur, penjepit, beaker glass 100 mL, erlenmeyer 1000 mL, 500 mL, dan 100 mL, gelas ukur 500 mL, labu ukur 10 mL, lemari asam, aluminium foil, corong kaca, corong *buchner*, corong pisah 250 mL, kertas saring, *rotary evaporator vacum*, *sentrifuge*, plat KLT, jarum, gunting, *cutter*, *hairdryer*, penggaris, bejana pengembang, pipa kapiler, pinset, *chamber*, pH universal, plastik wrap, gelas vial, botol vial, kolom kromatografi, FTIR, lampu UV, senter, statif dan klem.

##### **3.2.2 Bahan-bahan Penelitian**

Bahan-bahan yang digunakan adalah isolat *Chlorella sp.*, tauge kacang hijau, metanol *p.a*, etil asetat *p.a*, n-heksana *p.a*, aquades, HCl 2 N, natrium

bikarbonat, kloroform, etanol *absolute*, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, asam asetat anhidrat, gas N<sub>2</sub>, *silica gel* 60 F<sub>254</sub> (0,063 – 0,200 mm) untuk kolom dan plat KLT F<sub>254</sub>.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian eksperimental di laboratorium. Sampel yang digunakan adalah isolat *Chlorella sp.* yang diperoleh dari Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Jurusan Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Isolat *Chlorella sp.* dikultivasi pada Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 % dengan pH netral (tanpa perlakuan) selama 10 hari dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap. Hasil kultivasi dipanen dengan cara disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Biomassa hasil panen dikeringkan (kering-angin) 48 jam dan diekstraksi komponen aktifnya dengan maserasi.

Ekstraksi komponen aktif pada *Chlorella sp.* dimaserasi menggunakan pelarut metanol *p.a.* dengan perbandingan 1:5 (b/v) selama 24 jam (*dishaker* ± 5 jam). Ekstrak metanol *Chlorella sp.* disaring dan residu yang diperoleh diekstraksi kembali dengan pelarut metanol hingga 3 kali pengulangan (warna ekstrak pucat) dan filtrat yang diperoleh digabungkan menjadi satu. Filtrat hasil ekstraksi dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat yang kemudian dihidrolisis menggunakan HCl 2 N dan dipartisi menggunakan pelarut etil asetat.

Fraksi etil asetat diuji fitokimia senyawa steroid menggunakan reagen LB. Fraksi etil asetat yang diduga positif steroid terhadap LB dilakukan pemisahan senyawa aktif steroid menggunakan kromatografi kolom dengan perbedaan kolom basah dan kolom kering menggunakan eluen n-heksana:etil asetat (4:1) dengan

penampungan 2 mL. Vial-vial hasil isolasi kolom dimonitoring menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) menggunakan fase diam *silica gel* F<sub>254</sub>, eluat yang mempunyai harga R<sub>f</sub> yang sama dan bercak yang sama dikumpulkan menjadi satu sebagai fraksi yang sama. Isolat yang diperoleh diidentifikasi struktur zat aktif hasil kromatografi kolom menggunakan FTIR.

### 3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.*;
  - a. Sterilisasi alat;
  - b. Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %;
  - c. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dalam MET 4 %;
  - d. Pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella sp.*;
2. Preparasi sampel biomassa mikroalga *Chlorella sp.*;
3. Analisis kadar air biomassa mikroalga *Chlorella sp.*;
4. Ekstraksi mikroalga *Chlorella sp.* dengan maserasi;
5. Hidrolisis dan partisi ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.*;
6. Identifikasi senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.*;
7. Pemisahan senyawa aktif yaitu steroid dengan kromatografi kolom basah dan kromatografi kolom kering
8. Monitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) menggunakan fase diam *silica gel* F<sub>254</sub>;
9. Identifikasi struktur senyawa isolat menggunakan FTIR;
10. Analisis data;

### **3.5 Prosedur Penelitian**

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

##### **3.5.1.1 Sterilisasi Alat**

Sterilisasi alat dilakukan dengan mencuci semua alat-alat yang digunakan dengan air panas. Alat-alat tersebut ditutup dengan plastik atau aluminium foil.

##### **3.5.1.2 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %**

Ekstrak tauge dibuat dengan cara tauge kacang hijau 100 g yang telah dicuci bersih direbus dalam 500 mL aquades yang mendidih selama 1 jam. Ekstrak tauge 36 mL diambil dan dimasukkan kedalam erlenmeyer 1000 mL yang berisi 864 mL aquades hingga diperoleh MET dengan konsentrasi 4 % (Prihantini, dkk., 2005).

##### **3.5.1.3 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.* dalam MET 4 %**

Isolat mikroalga *Chlorella sp.* sebanyak 150 mL diinokulasikan ke dalam masing-masing 900 mL MET 4 % (suhu 25 – 27 °C, pH 7) dan ditempatkan pada rak yang dilengkapi dengan pencahayaan menggunakan lampu TL 36 watt (intensitas cahaya 1000 – 4000 lux) dan diinkubasi selama 10 hari dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap (Prihantini, dkk., 2005).

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

Pemanenan biomassa *Chlorella sp.* dilakukan pada hari ke-10 dengan cara *Chlorella sp.* disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Biomassa *Chlorella sp.* dipisahkan dari supernatannya (Desianti, dkk., 2014).

### 3.5.2 Preparasi Sampel Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Biomassa *Chlorella sp.* diletakkan dalam suatu wadah untuk selanjutnya dikeringanginkan selama  $\pm 48$  jam pada suhu ruang (berkisar antara 25 – 30 °C). Biomassa *Chlorella sp.* kering dikerok dan ditimbang. Hasil yang diperoleh dicatat sebagai berat kering mikroalga *Chlorella sp.* (Imamah, dkk., 2015).

### 3.5.3 Analisis Kadar Air Mikroalga *Chlorella sp.* (AOAC, 1984)

Analisis kadar air dilakukan pada sampel kering mikroalga *Chlorella sp.* cawan yang akan digunakan sebelumnya dipanaskan terlebih dahulu dalam oven pada suhu 100 – 105 °C sekitar 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya, kemudian cawan disimpan dalam desikator selama 10 menit. Cawan tersebut kemudian ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Biomassa *Chlorella sp.* ditimbang sebanyak 0,5 g dimasukkan dalam cawan yang telah diketahui berat konstan, kemudian dikeringkan didalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama 30 menit. Selanjutnya sampel kering didinginkan dalam desikator, ditimbang kemudian dioven kembali selama 30 menit. Perlakuan ini diulangi sampai diperoleh berat konstan. Kadar air sampel biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dihitung menggunakan rumus berikut (AOAC, 1984):

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

Keterangan : a = berat cawan kosong  
b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan  
c = berat cawan + sampel setelah dikeringkan

### 3.5.4 Maserasi Mikroalga *Chlorella sp.* (Imamah, dkk., 2015)

Biomassa *Chlorella sp.* kering dimasukkan ke dalam *beaker glass* 500 mL dan ditambahkan pelarut metanol *p.a* dengan perbandingan 1:5 (b/v), kemudian ditutup dengan aluminium foil. Maserasi dilakukan dengan pengocokan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama  $\pm$  5 jam pada suhu kamar. Selanjutnya disaring dengan menggunakan corong *buchner*. Residu yang diperoleh dimaserasi kembali hingga  $\pm$  3 kali proses ekstraksi (warna ekstrak pucat). Filtrat yang diperoleh digabung menjadi satu kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator vacum* hingga diperoleh ekstrak pekat metanol mikroalga *Chlorella sp.* Ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang kemudian dihitung nilai rendemen ekstrak yang dihasilkan (Khopkar, 2003):

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kasar}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \%$$

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

Ekstrak metanol sebanyak 5 g dimasukkan ke dalam *beaker glass*, kemudian dihidrolisis dengan 10 mL HCl 2 N dan distirrer menggunakan *magnetic stirrer hot plate* selama 1 jam pada suhu ruang (Tensiska, dkk., 2007). Hidrolisat yang diperoleh ditambahkan dengan natrium bikarbonat hingga pH netral. Pelarut metanol dan etil asetat masing-masing ditambahkan sebanyak 25 mL kemudian dikocok dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan organik dan lapisan air. Masing-masing lapisan yang terbentuk kemudian dipisahkan. Proses partisi dilakukan hingga diperoleh fasa air bening. Lapisan organik dimasukkan ke dalam *beaker glass* kemudian dipekatkan dengan *rotary*

*evaporator vacuum* lalu dialiri dengan gas N<sub>2</sub>. Ekstrak pekat yang diperoleh selanjutnya ditimbang dan dihitung rendemennya (Imamah, dkk., 2005).

### **3.5.6 Identifikasi Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat dalam Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.***

Ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform dan ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya ditambahkan 1 – 2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat melalui dinding tabung tersebut. Terbentuknya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid (Indrayani, *et al.*, 2006).

### **3.5.7 Pemisahan Senyawa Steroid menggunakan Kromatografi Kolom**

Ekstrak hasil partisi fraksi etil asetat 0,1 g dalam 1 mL pelarut n-heksana dan etil asetat (4:1) dipisahkan secara kromatografi kolom (d : 1,5 cm, p : 50 cm) menggunakan fasa diam silika gel 60 F<sub>254</sub> (0,063 – 0,200 mm) dan dielusi secara isokratik dengan pelarut sebanyak 250 mL dengan penampungan 2 mL setiap fraksi (kecepatan alir 2 mL/1-2 menit). Pemisahan dilakukan dengan perbedaan metode yaitu pemisahan menggunakan kromatografi kolom pengisian fase diam cara basah dan cara kering untuk mengetahui profil pemisahan yang dihasilkan.

#### **a. Pengisian Fase Diam Cara Basah (Kusmiyati, dkk., 2011)**

Silika gel 60 F<sub>254</sub> untuk kolom sebanyak 10 g diaktivasi dengan pemanasan dalam oven selama 2 jam pada suhu 110 °C, selanjutnya didinginkan dengan meletakkannya dalam desikator. Pembuatan bubuk dilakukan dengan cara silika gel yang telah diaktivasi dicampur dalam 20 mL pelarut hingga homogen selama ± 1 jam. Bubur silika gel dimasukkan dalam kolom yang mula-mula telah terisi

*glasswool* pada bagian bawah. Selama penambahan silika, dinding kolom diketuk-ketuk sampai adsorben yang dihasilkan benar-benar mampat dan dipastikan tidak ada gelembung udara, kemudian didiamkan selama  $\pm 24$  jam. Sejumlah cuplikan (0,1 g/ 1 mL) diimpregnasi pada silika gel lain dan dimasukkan ke dalam kolom berisi adsorben kemudian ditambahkan sisa silika gel diatasnya. Eluen ditambahkan untuk proses elusi, dimana posisi eluen harus selalu ada diatas silika hingga diperoleh fraksi-fraksi. Proses elusi dilakukan secara isokratik membentuk jalur-jalur serapan dari senyawa dengan posisi kran sedikit dibuka dan ditampung.

b. Pengisian Fase Diam Cara Kering (Ismarti, 2011)

Silika gel 60 F<sub>254</sub> untuk kolom yang sudah diaktivasi sebanyak 10 g dengan perbandingan berat sampel dan silika 1:10 dimasukkan dalam kolom. Pengisian fase diam dilakukan dalam keadaan vakum, agar diperoleh kerapatan kemasan maksimum. Sejumlah cuplikan (0,1 g/ 1 mL) diimpregnasi pada silika gel lain dan dimasukkan dalam kolom berisi adsorben kemudian ditambahkan sisa silika gel diatasnya. Elusi dilakukan secara isokratik hingga membentuk jalur-jalur serapan dari senyawa. Eluen ditambahkan saat proses elusi, posisi eluen harus selalu ada diatas silika hingga diperoleh fraksi-fraksi.

### 3.5.8 Monitoring Senyawa Steroid Secara KLTA

Hasil kromatografi kolom dimonitoring senyawa steroid menggunakan KLTA. Plat silika G<sub>60</sub> F<sub>254</sub> yang sudah diaktivasi dengan pemanasan dalam oven pada suhu 110 °C selama 30 menit berukuran 10 x 10 cm. Penotolan dilakukan pada jarak  $\pm 1$  cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler sebanyak 5 kali totalan yang diselingi dengan pengeringan yang kemudian dielusi dengan fase gerak n-

heksana : etil asetat (4 :1) (Marliana, 2007). Setelah gerakan fase gerak sampai pada garis batas, elusi dihentikan. Noda-noda pada permukaan plat hasil pemisahan dideteksi dengan menyemprotkan LB dan diamati dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Desianti, dkk.,2014), kemudian dianalisis terbentuknya warna hijau kebiruan manunjukkan adanya steroid (Indrayani, dkk., 2006). Eluat yang mempunyai harga Rf yang sama dan bercak yang sama dikumpulkan menjadi satu sebagai fraksi yang sama. Fraksi yang menunjukkan hasil positif steroid digabungkan (Utama, dkk., 2013).

#### **3.5.9 Identifikasi dengan FTIR (Sukandana, 2011)**

Penentuan struktur molekul isolat senyawa steroid dilakukan menggunakan FTIR (*Fourier Transform Infrared*). Ekstrak pekat dicampur dengan serbuk KBr dan digerus bersamaan menggunakan mortar agate. Hasil gerusan dibuat pelet dengan tekanan 80 Torr (8 – 20 torr per satuan waktu) selama 10 menit. Pelet yang terbentuk dianalisis menggunakan FTIR.

#### **3.6 Analisis Data**

Metode yang digunakan adalah analisa deskriptif. Data yang diperoleh merupakan fraksi-fraksi hasil partisi dimonitoring dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) menggunakan fase diam silika gel F<sub>254</sub>. Eluat yang mempunyai harga Rf sama dikumpulkan menjadi satu. Isolat yang diperoleh diidentifikasi struktur senyawa isolat menggunakan FTIR. Hasil identifikasi senyawa aktif steroid dalam mikroalga genus *Chlorella sp.* dipaparkan dalam bentuk spektra sehingga dapat diinterpretasikan hasilnya.

## BAB IV PEMBAHASAN

### 4.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

#### 4.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%

Budidaya mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan teknik kultur bergantung terhadap beberapa parameter penting. Menurut Brown (1991) upaya meningkatkan produksi biomassa dapat dilakukan dengan memanipulasi faktor lingkungan seperti cahaya, kadar CO<sub>2</sub>, suhu, pH, salinitas, bentuk wadah kultur, dan medium. Salah satu parameter penting yang mendukung pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* adalah medium kultur. Komposisi nutrisi yang lengkap dan konsentrasi nutrisi yang tepat dapat menghasilkan pertumbuhan biomassa yang optimum.

Medium yang digunakan dalam penelitian ini untuk menumbuhkan mikroalga *Chlorella sp.* adalah MET 4 %. MET mengandung vitamin, mineral serta asam amino yang dibutuhkan bagi pertumbuhan mikroalga (Richmond, 1986). MET juga mengandung makronutrien (K, P, Ca, Mg dan Na) yang dibutuhkan oleh mikroba sebagai komponen penyusun sel serta mikronutrien (Fe, Zn, Mn dan Cu) dibutuhkan oleh sel baik sebagai kofaktor enzim maupun komponen pembentuk klorofil (Wulandari, dkk., 2010). Hasil penelitian menunjukkan bahwa MET 4 % dari hasil air rebusan tauge yang diperoleh berwarna kekuningan dan sedikit kental. Hal ini diasumsikan kandungan nutrisi dari tauge telah terekstrak dalam air. Ekstrak tauge diencerkan dengan aquades hingga konsentrasi 4 % sehingga warnanya akan memudar menjadi lebih bening. Seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 4 (L.4.1).

#### 4.1.2 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.* dalam MET 4%

Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* merupakan suatu tahapan untuk menumbuhkan mikroalga *Chlorella sp.* dalam MET 4 % sehingga didapatkan biomassa *Chlorella sp.* dengan pertumbuhan yang lebih pesat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* pada medium ekstrak taugé (MET) 4 % terjadi perubahan warna kultur setiap harinya (hari ke-0 sampai hari ke-10) yaitu mulai dari warna hijau kekuningan sampai dengan hijau pekat. Perubahan warna kultur mikroalga *Chlorella sp.* selama dikultivasi pada MET 4 % ditunjukkan pada Lampiran 4 (L.4.2). Prihantini, dkk., (2007) menyatakan bahwa gradasi warna hijau kultur menunjukkan peningkatan jumlah sel serta mengindikasikan kadar klorofil yang terkandung dalam sel. Hal ini menunjukkan bahwa mikroalga *Chlorella sp.* dapat tumbuh dengan baik pada MET 4 %.

Pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* dapat berlangsung optimum ketika memperoleh intensitas cahaya yang cukup untuk dapat mengadakan fotosintesis. Selain intensitas cahaya yang cukup, fotoperiode juga memegang peranan penting sebagai pendukung pertumbuhan alga (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Sumber cahaya yang digunakan sebagai pengganti sinar matahari untuk dapat mengadakan fotosintesis adalah lampu TL (*Tube Lamp*) 36 watt (intensitas cahaya 1000-4000 lux) dengan pengaturan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap yang dianalogikan sebagai pengganti siang dan malam.

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

Pemanenan biomassa *Chlorella sp.* bertujuan untuk memperoleh biomassa *Chlorella sp.* hasil kultivasi. Pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella sp.*

dilakukan pada hari ke-10 yang merupakan fase stasioner dari pertumbuhan mikroalga tersebut. Berdasarkan penelitian Khamidah, dkk., (2013) pada hari ke-10 mikroalga *Chlorella sp.* menghasilkan kelimpahan sel tertinggi sebesar  $4,88 \times 10^6$  sel/mL serta memiliki aktivitas antibakteri tertinggi dengan zona hambat 9,9 mm terhadap bakteri *E.coli* dan 12,0 mm terhadap bakteri *S.aureus*.

Pemanenan mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan cara memisahkan biomassa dari filtratnya. Hasil kultur mikroalga *Chlorella sp.* yang telah diendapkan dalam suatu wadah, disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit sehingga terpisah antara biomassa dengan filtratnya. Biomassa yang diperoleh dari lima kali kultivasi dilakukan berkelompok menghasilkan biomassa berwarna hijau pekat, sedikit kental serta mengandung cukup air (694,74 g) (Fasya, dkk., 2016). Hasil pemanenan biomassa *Chlorella sp.* ditunjukkan pada Lampiran 4 (L.4.3).

#### **4.2 Preparasi Sampel Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.***

Preparasi sampel mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan cara pengeringangan biomassa mikroalga *Chlorella sp.* pada suhu ruang selama  $\pm$  2-3 hari. Pengeringangan dimaksudkan untuk menguapkan kandungan air yang terdapat pada sampel biomassa mikroalga tersebut. Kandungan air yang teruapkan dari sampel dapat meminimalisir kerusakan akibat degradasi mikroorganisme, mencegah tumbuhnya jamur serta tidak merusak komposisi kimia didalamnya sehingga dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama. Pengeringangan biomassa *Chlorella sp.* seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 4 (L.4.4).

Hasil yang diperoleh dari proses sekali pengeringan biomassa *Chlorella sp.* dilakukan berkelompok adalah 10,17 g dengan rendemen sebesar 1,4638 % (Faysa, dkk., 2016). Sampel kering dari tiga kali pengeringan dikumpulkan menjadi satu untuk digunakan pada proses maserasi.

#### 4.3 Analisis Kadar Air Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Analisis kadar air dilakukan untuk mengetahui banyaknya kandungan air yang terdapat dalam sampel biomassa mikroalga *Chlorella sp.* sehingga dapat diketahui ketahanan sampel terhadap daya simpannya. Kadar air yang terkandung kurang dari 11 % maka kestabilan optimum bahan akan dapat tercapai dan pertumbuhan mikroba dapat dikurangi (Puspita, 2011). Pada proses ini sampel diusahakan memiliki kadar air seminimal mungkin agar sampel dapat disimpan dalam jangka waktu yang lebih lama. Berdasarkan hasil pengukuran kadar air sampel biomassa mikroalga *Chlorella sp.* kering sebesar 10,33 % dengan waktu pengeringan  $\pm$  48 jam.

#### 4.4 Ekstraksi Senyawa Aktif Biomassa *Chlorella sp.*

Proses ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi. Menurut Imamah, dkk., (2015) pelarut yang sesuai yang dapat digunakan untuk maserasi mikroalga *Chlorella sp.* adalah pelarut metanol *p.a* dengan perbandingan sampel dan pelarut adalah 1:5. Pemilihan pelarut metanol dimaksudkan agar senyawa dalam mikroalga *Chlorella sp.* yang memiliki tingkat kepolaran sama dengan pelarut metanol mudah terekstrak. Senyawa steroid cenderung bersifat non polar atau semi polar, namun senyawa steroid dapat larut dalam pelarut metanol

yang bersifat polar. Hal ini diduga senyawa steroid pada ekstrak metanol terikat pada ikatan glikosida sehingga dapat terekstrak dalam pelarut metanol. Beberapa persenyawaan steroid yang mengandung banyak gugus -OH sifatnya cenderung lebih polar (Sriwahyuni, 2010). Berdasarkan prinsip *like dissolve like* senyawa aktif akan terekstraksi ke dalam pelarut pada tingkat kepolaran yang sama.

Selain pelarut yang sesuai, waktu perendaman juga memiliki peranan penting terhadap hasil ekstraksi. Semakin lama waktu perendaman, maka kontak antara pelarut dengan sampel semakin besar sehingga senyawa yang terekstrak lebih banyak. Hasil maserasi menunjukkan maserat dari mikroalga *Chlorella sp.* yang semula berwarna hijau kehitaman berubah menjadi lebih terang dan sampel berwarna hijau pucat. Hal ini diasumsikan bahwa senyawa aktif yang terdapat pada sampel mikroalga *Chlorella sp.* sudah terekstrak.

Ekstrak hasil maserasi dilakukan berkelompok menghasilkan rendemen ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* 21,8926 % dengan berat ekstrak 6,5679 g berwarna hijau tua pekat (Fasya, dkk., 2016).

#### 4.5 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol

Hidrolisis ekstrak pekat metanol mikroalga *Chlorella sp.* dengan HCl 2 N dimanfaatkan sebagai katalis asam untuk mempercepat reaksi pemutusan ikatan glikosida antara senyawa glikon (gula) dan aglikon (bukan gula). Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampel sebelum dihidrolisis memiliki tingkat kekentalan lebih tinggi dari pada setelah dihidrolisis. Hal ini dimungkinkan karena gaya antarmolekul antara senyawa metabolit sekunder yang masih berikatan dengan gugus gula. Sedangkan setelah dihidrolisis gaya antarmolekul yang terbentuk

lebih sedikit karena gugus gula yang terikat oleh metabolit sekunder telah terputus menjadi glikon (gula) dan aglikon (metabolit sekunder). Reaksi hidrolisis merupakan reaksi *reversible* (dapat balik), sehingga apabila tidak dihentikan maka akan terbentuk kembali ikatan glikosida antara glikon dan aglikon. Penetralkan dengan natrium bikarbonat dilakukan untuk menghentikan reaksi hidrolisis dengan ditandai terbentuknya gelembung-gelembung yang diduga merupakan gas CO<sub>2</sub> hasil reaksi dari HCl dan NaHCO<sub>3</sub>.

Ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* hasil hidrolisis dipartisi menggunakan pelarut etil asetat untuk mengekstrak senyawa steroid yang memiliki tingkat kepolaran yang sama dengan pelarut etil asetat yaitu semi polar. Hasil pengamatan menunjukkan terbentuk dua lapisan, lapisan atas sebagai fase organik dan lapisan bawah sebagai fase air. Hal ini terjadi karena perbedaan nilai densitas antara keduanya, berat jenis etil asetat (0,900 g/mL) lebih kecil dibandingkan dengan berat jenis air (1 g/mL).

Ekstrak hasil partisi dilakukan berkelompok menghasilkan rendemen 80,95 % dengan berat ekstrak 2,0278 g (0,2 g untuk kolom) berwarna hijau kehitaman (Fasya, dkk., 2016). Nilai rendemen yang cukup besar menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* kebanyakan memiliki tingkat kepolaran yang sama dengan pelarut etil asetat.

#### **4.6 Identifikasi Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat dalam Ekstrak Metanol**

##### **Mikroalga *Chlorella sp.***

Skринing fitokimia dilakukan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak (Kristanti dkk., 2008). Uji fitokimia

senyawa steroid dapat dilakukan dengan penambahan pereaksi Liebermann-Burchard, terbentuk larutan berwarna biru dan hijau menunjukkan reaksi positif mengandung senyawa steroid (Nohong, 2009). Menurut Halimah (2010) senyawa steroid akan mengalami dehidrasi dengan adanya penambahan asam kuat yang memberikan sejumlah reaksi warna.

Hasil identifikasi uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak metanol fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* positif mengandung senyawa steroid yang ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan. Hasil penelitian Imamah, dkk., (2015) menunjukkan bahwa ekstrak metanol fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* mengandung golongan senyawa steroid.

#### **4.7 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Kolom dan Monitoring Secara KLTA**

Isolasi senyawa steroid dari ekstrak metanol fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* pada penelitian ini dilakukan menggunakan metode kromatografi kolom. Teknik pemisahan didasarkan pada perbedaan kecepatan perambatan komponen-komponen dalam suatu media. Pemisahan menggunakan kromatografi kolom merupakan metode pemisahan yang didasarkan pada distribusi komponen campuran ke dalam dua fase antara fase gerak dan fase diam. Fase diam akan menahan komponen campuran sedangkan fase gerak akan melarutkan zat komponen campuran. Komponen yang lebih cenderung terdistribusi ke dalam fase diam akan tertahan dan terelusi lebih lama, sedangkan komponen yang lebih terdistribusi ke fase gerak akan bergerak lebih cepat dan terelusi terlebih dahulu.

Pemisahan senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan variasi metode kromatografi kolom pengisian fase diam cara basah dan cara kering. Fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub> (0,063-0,200 mm) untuk kolom kromatografi sebanyak 10 g diaktivasi dalam oven pada suhu 100 °C selama ± 2 jam bertujuan untuk menguapkan kandungan air yang terdapat pada silika gel sehingga gugus –OH yang terikat pada silika gel menjadi aktif. Adanya ikatan hidrogen antara gugus –OH dengan molekul air yang terikat pada silika gel mengakibatkan interaksi antarmolekul gugus –OH (pada silika gel) dengan senyawa yang akan dipisahkan dari komponen campuran menjadi kurang maksimal. Ekstrak hasil partisi etil asetat dengan konsentrasi 100.000 ppm (0,1 g/1 mL) diimpregnasi dengan silika gel lain (Kusmiyati, dkk., 2011) dan dipisahkan secara kromatografi kolom (p: 50 cm, d: 1,5 cm) membentuk jalur-jalur serapan dari senyawa.

Fase gerak yang digunakan pada penelitian ini adalah eluen terbaik hasil KLT analitik yaitu n-heksana : etil asetat (4:1). Imamah, dkk., (2015) dalam penelitiannya mengatakan bahwa hasil pemisahan terbaik secara KLT analitik senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* adalah menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (4 : 1) menghasilkan 12 noda. Pemilihan fase gerak yang tepat dapat mendukung keberhasilan dalam pemisahan senyawa dari komponen campuran. Fase gerak terbaik dipilih berdasarkan kemampuannya dalam memisahkan senyawa target dari komponen campuran yang ditentukan melalui profil pemisahannya (bentuk spot yang jelas dan tidak berekor). Fase gerak akan membawa senyawa-senyawa terpisah dari komponen campuran dan ditampung setiap 2 mL dalam botol vial untuk meminimalisir terjadinya

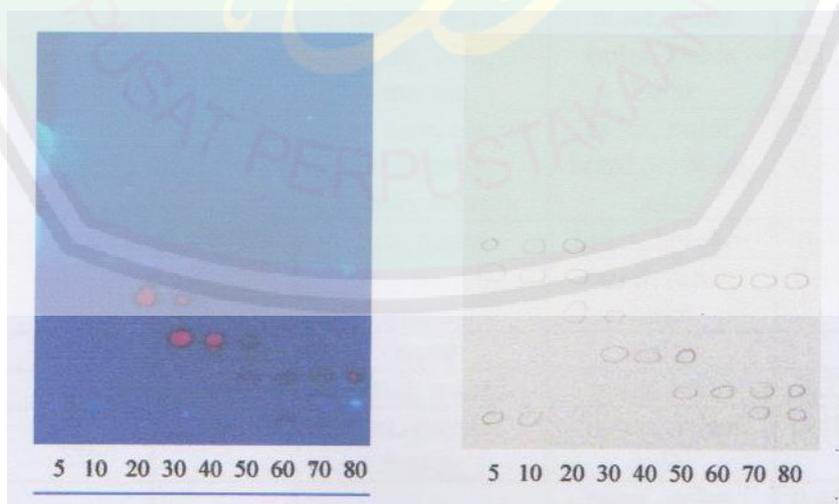
percampuran senyawa satu dengan senyawa lain (Ningsih, dkk., 2006). Istilah botol vial dimaksudkan sebagai wadah penampungan hasil kolom. Vial-vial yang ditampung hasil pemisahan kromatografi kolom seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 4 (L.4.9).

#### 4.6.1 Kromatografi Kolom Cara Basah

Pemisahan dengan kromatografi kolom pengisian fase diam cara basah, fase diamnya berbentuk bubuk silika. Bubuk silika dalam kolom (t:20,5 cm) diketuk-ketuk hingga tidak terbentuk gelembung (Kristanti, dkk., 2008) dan didiamkan selama  $\pm 24$  jam (t:18 cm) untuk memaksimalkan kerapatan dari fase diam. Kerapatan fase diam besar pengaruhnya terhadap kemampuan menjerap suatu komponen. Semakin rapat fase diam yang terbentuk semakin kuat daya jerap suatu komponen, sehingga pemisahan yang terbentuk menjadi optimal. Pembuatan bubuk silika mengakibatkan kerapatan dari fasa diam yang terbentuk menjadi maksimal. Hal ini dimungkinkan karena adanya gaya antarmolekul antara eluen dengan silika. Pergerakan suatu komponen bergantung pada kecenderungannya terhadap dua fase (fase diam dan fase gerak). Steroid yang bersifat semipolar-non polar akan terjerap lemah pada fase diam (silika) dan cenderung bergerak cepat daripada komponen lainnya. Hal ini terjadi karena silika yang digunakan sebagai fase diam bersifat polar, senyawa yang memiliki tingkat kepolaran yang sama dengan silika akan terjerap kuat dan cenderung tertahan lebih lama dalam kolom sedangkan senyawa yang berbeda kepolaran dengan silika akan terjerap lemah dan cenderung bergerak lebih cepat keluar dari kolom. Kerapatan fase diam dapat mempengaruhi laju alir, dimana laju alir juga besar

pengaruhnya terhadap hasil pemisahan. Jika laju alir terlampau cepat ataupun lambat mengakibatkan interaksi antara senyawa dengan fase diam menjadi kurang maksimal, akibatnya pemisahan yang terbentuk menjadi kurang optimal (berekor).

Eluen sebanyak 250 mL digunakan mengelusi senyawa steroid dalam ekstrak metanol fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* menghasilkan 117 pada vial-vial penampungan (laju alir 2 mL/2 menit 20 detik). Tiap-tiap vial hasil kromatografi kolom dianalisis secara KLTA sehingga dapat diamati profil pemisahannya. Spot noda hasil KLTA diamati dalam lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366. Gandjar dan Rohman (2007) menyatakan bahwa lempeng KLT akan mengemisikan suatu fluoresensi hijau ketika disinari lampu UV  $\lambda$  254 nm. Sedangkan pada  $\lambda$  366 nm lempeng KLT berwarna gelap saat disinari lampu UV dan noda hasil pemisahan berfluoresensi sehingga noda dapat teramati. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.1



Gambar 4.1 Hasil monitoring pemisahan senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* metode kromatografi kolom cara basah

Spot noda yang mempunyai harga Rf sama dan bercak yang sama dikumpulkan menjadi satu sebagai fraksi yang sama (Utama, dkk., 2013). Hal ini menunjukkan bahwa senyawa tersebut merupakan senyawa yang sama. Sementara itu, hasil isolasi senyawa yang menunjukkan positif steroid (warna hijau atau biru) digabungkan menjadi satu fraksi (Ismarti, 2011). Istilah fraksi dimaksudkan sebagai kelompok hasil isolasi senyawa dalam vial-vial penampungan yang memiliki harga Rf, bentuk spot, dan warna spot yang sama. Tabel monitoring pemisahan steroid cara basah ditunjukkan pada Tabel 4.1.

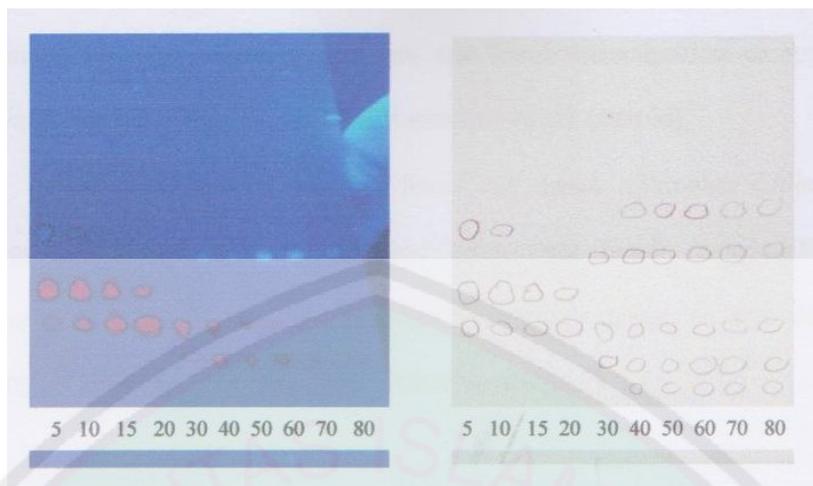
Tabel 4.1 Hasil monitoring pemisahan steroid kromatografi kolom cara basah

Fraksi	Vial ke-	$\Sigma$ -Spot	Warna Spot	Bentuk Spot	Rf
<b>B.1</b>	<b>1-8</b>	<b>3</b>	<b>biru, biru, biru</b>	<b>bulat, bulat, bulat</b>	<b>0,587; 0,487; 0,075</b>
B.2	9-11	3	biru-merah, biru, biru	bulat, bulat, bulat	0,587; 0,487; 0,075
B.3	12-16	3	biru-merah-hijau, biru, biru	berekor, bulat, bulat	0,550; 0,487; 0,075
B.4	17	4	hijau, biru, merah, biru	bulat, bulat, bulat, bulat	0,537; 0,487; 0,387; 0,075
B.5	18-20	3	hijau, biru, merah	bulat, bulat, bulat	0,537; 0,487; 0,387
B.6	21-24	5	biru, biru, merah kehitaman, merah, merah	bulat, bulat, berekor, bulat, bulat	0,587; 0,487; 0,400; 0,300; 0,237
B.7	25	2	biru, merah	bulat, berekor	0,487; 0,400
B.8	30	3	biru, merah, merah	bulat, bulat, bulat	0,487; 0,387; 0,225
B.9	40	1	merah	Bulat	0,225
B.10	50	2	merah, merah	bulat, bulat	0,225; 0,125
B.11	60	3	biru, merah, merah	bulat, bulat, bulat	0,487; 0,125; 0,043
B.12	70-85	3	biru, merah, biru	bulat, bulat, bulat	0,487; 0,125; 0,075
<b>B.13</b>	<b>86-117</b>	<b>2</b>	<b>biru, biru</b>	<b>bulat, bulat</b>	<b>0,587; 0,487</b>

Berdasarkan Tabel 4.1 diperoleh bahwa vial 1-8 dalam fraksi (B.1) menampakkan tiga noda berwarna biru yang dimungkinkan merupakan golongan steroid (6,5 mg) dengan rendemen sebesar 6,5 %. Penampakan tiga noda dalam satu fraksi menunjukkan bahwa dalam fraksi tersebut mengandung campuran dari tiga senyawa berbeda yang diduga sebagai senyawa target (steroid). Sementara itu pada vial 86-117 dalam fraksi (B.13) menampakkan dua noda berwarna biru yang juga dimungkinkan senyawa steroid (6,7 mg) dengan rendemen sebesar 6,7 %. Penampakan dua noda dalam satu fraksi menunjukkan bahwa dalam fraksi tersebut mengandung campuran dari dua senyawa berbeda yang diduga sebagai senyawa target (steroid), sehingga dibedakan dalam fraksi lain.

#### 4.6.2 Kromatografi Kolom Cara Basah Kering

Pemisahan dengan kromatografi kolom pengisian fase diam cara kering, fase diamnya berbentuk butiran silika kering. Berbeda dengan kromatografi kolom pengisian fase diam cara basah, kolom pengisian fase diam cara kering dikemas tanpa mencampurkan fase diam dengan fasa geraknya (Kristanti, dkk., 2008). Silika dalam kolom divakum untuk membentuk lapisan fase diam yang rapat (t: 19,5 cm). Eluen sebanyak 250 mL digunakan untuk mengelusi senyawa steroid dalam ekstrak metanol fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* menghasilkan 107 pada vial-vial penampungan (laju alir 2 mL/ 1 menit 50 detik). Sama halnya dengan metode kromatografi kolom cara basah, tiap vial hasil kromatografi kolom dianalisis secara KLTA sehingga didapatkan profil pemisahan cara kering. Hasil monitoring pemisahan steroid kromatografi kolom pengisian fase diam cara kering ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Hasil monitoring pemisahan senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* metode kromatografi kolom cara kering

Tabel hasil monitoring pemisahan steroid metode kromatografi kolom cara kering ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil monitoring pemisahan steroid kromatografi kolom cara kering

Fraksi	Vial ke-	$\Sigma$ -Spot	Warna Spot	Bentuk Spot	Rf
	1	-	-	-	-
K.1	2	2	merah, merah	bulat, bulat	0,668; 0,556
K.2	3-4	3	merah, merah-hijau merah	bulat, berekor, berekor	0,668; 0,556; 0,387
K.3	5-10	3	hijau, merah, merah	bulat, berekor, bulat	0,537; 0,387; 0,225
K.4	15-20	2	merah, merah,	berekor, bulat	0,387; 0,225
K.5	30	3	biru, merah, merah	bulat, berekor, bulat	0,487; 0,225; 0,125
K.6	40-80	5	biru, biru, merah, merah, biru	bulat, bulat, bulat, bulat, bulat	0,587; 0,487; 0,225; 0,125; 0,075
<b>K.7</b>	<b>90-107</b>	<b>3</b>	<b>biru, biru, biru</b>	<b>bulat, bulat, bulat</b>	<b>0,587; 0,487; 0,075</b>

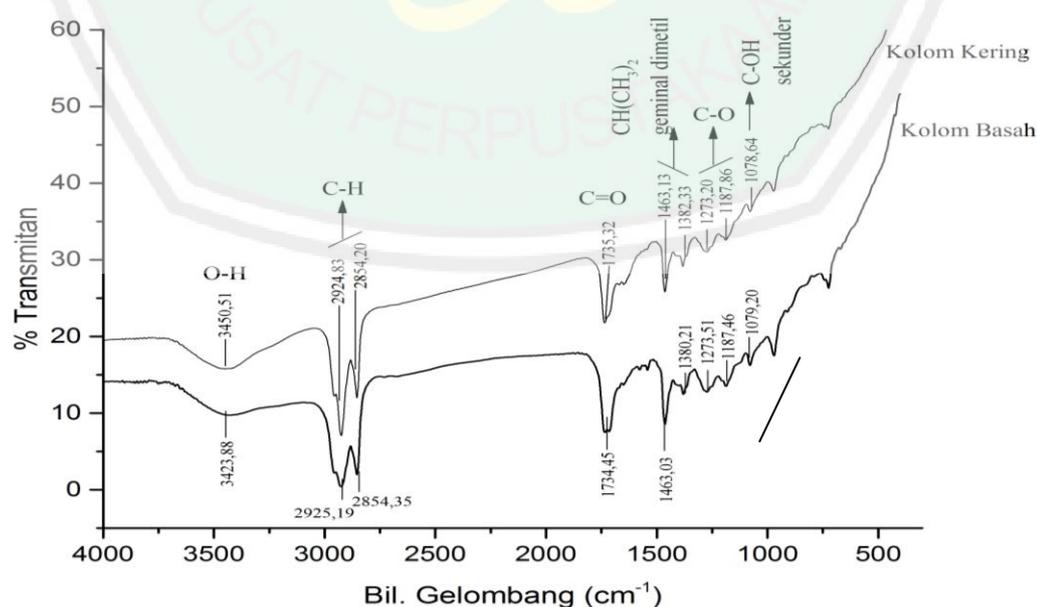
Berdasarkan Tabel 4.2 diperoleh bahwa vial 90-107 dalam fraksi (K.7) menampakkan tiga noda berwarna biru yang dimungkinkan merupakan golongan steroid (2,5 mg) dengan rendemen 2,5 %. Sama halnya dengan metode

kromatografi kolom cara basah, dalam satu fraksi menampakkan campuran tiga senyawa berbeda yang diduga sebagai senyawa target (steroid).

Pemisahan senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan metode pengisian fase diam cara basah menghasilkan dua kelompok fraksi (B.1 dan B.13) sedangkan metode pengisian fase diam cara kering menghasilkan satu kelompok fraksi steroid (K.7).

#### 4.8 Identifikasi Menggunakan FTIR

Kelompok fraksi (B.13 dan K.7) dari masing-masing metode kolom kromatografi yang diduga merupakan senyawa steroid diidentifikasi menggunakan FTIR. Analisis FTIR dilakukan untuk mengetahui gugus-gugus fungsi, sehingga dapat ditentukan struktur molekul senyawa. Spektra FTIR dari fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* pemisahan menggunakan kromatografi kolom cara basah dan kering dapat dilihat pada Gambar 4.3.



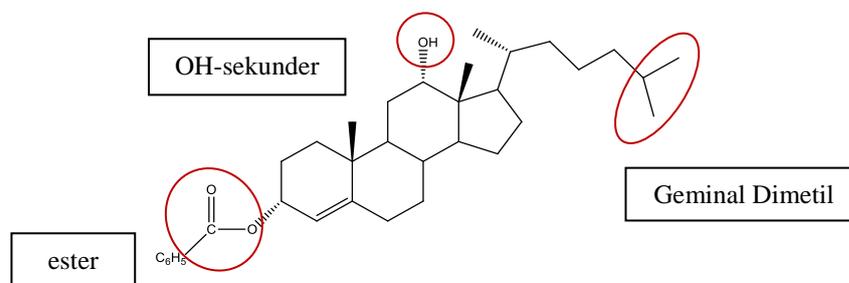
Gambar 4.3 Spektra hasil Identifikasi FTIR kolom basah dan kering

Tabel 4.3 Interpretasi Spektra FTIR

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Referensi (ν, cm <sup>-1</sup> )
	Kolom Basah	Kolom Kering	
-OH (alkohol)	3424	3450	3550-3230 (Socrates, 1994)
-C-H	2925 dan 2854	2925 dan 2854	2960 dan 2870 (Supratman, 2010)
C=O (ester)	1734	1735	1750-1730 (Supratman, 2010)
-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1463 dan 1380	1463 dan 1382	1454 and 1384 (Suryani, 2011)
C-O	1273 dan 1187	1273 dan 1187	1300-1100 (Socrates, 1994)
O-H (sekunder)	1079	1079	1124-1087 (Supratman, 2010)

Hasil analisis FTIR dari fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* baik metode cara basah maupun kering berdasarkan Tabel 4.3, menunjukkan adanya pita serapan gugus -OH, -C-H, C=O, C-O stretching, C-OH alkohol sekunder, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> geminal dimetil. Gugus geminal dimetil lazim ditemukan pada senyawa steroid (Astuti, 2014).

Berdasarkan serapan gugus-gugus fungsi yang muncul diduga kuat senyawa steroid yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* fraksi etil asetat hasil kromatografi kolom baik menggunakan cara basah maupun kering merupakan senyawa yang sama yaitu senyawa steroid turunan kolesterol.



Gambar 4.4 Dugaan struktur senyawa steroid dalam mikroalga *Chlorella sp.* fraksi etil asetat.

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

Al-Qur'an tidak menuntut umat manusia untuk menerima begitu saja apa yang telah disampaikan. Melainkan memaparkan masalah dan membuktikannya dengan argumentasi-argumentasi. Firman Allah SWT dalam surat Thaha (20): 53, menjelaskan bahwasannya Allah SWT menciptakan bermacam-macam (ukuran, bentuk, warna, rasa, bau) tumbuhan yang ada di muka bumi ini bukan tanpa alasan, sebab setiap tanaman itu baik dan indah serta memiliki manfaatnya masing-masing. Mikroalga *Chlorella sp.* merupakan satu dari banyak contoh tumbuhan yang Allah SWT ciptakan. Mikroalga *Chlorella sp.* tergolong tumbuhan hijau tingkat rendah berukuran 2–8  $\mu\text{m}$ , berbentuk bulat seperti cawan atau lonceng dengan posisi menghadap ke atas (Amaliyah, dkk., 2013).

Segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah SWT tidak ada yang sia-sia dan penuh hikmah. Sebagaimana firman Allah SWT dalam surat Shaad (38): 27,



*“Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya tanpa hikmah, yang demikian itu adalah anggapan orang-orang kafir, Maka celakalah orang-orang kafir itu karena mereka akan masuk neraka.”*

Maksud dari ayat tersebut dalam tafsir Jalalain adalah (Dan kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada diantara keduanya dengan batil) dengan main-main. (Yang demikian itu) yakni penciptaan hal tersebut tanpa hikmah (Jalaludin, dkk., 2008). Menurut tafsir Ibnu Katsir surat al Mu'minin (23): 20 bahwa buah zaitun itu dapat dijadikan minyak dan juga dapat dijadikan

pelezat makanan. Sedangkan dalam surat an-Nahl (16): 67 dalam tafsir Ibnu Katsir menjelaskan buah kurma maupun anggur (kismis), dan segala yang sudah diolah dari kedua buah tersebut baik itu berupa manisan, cuka, maupun minuman perasan. Hal ini kembali ditegaskan Fattah (2010) bahwa zaitun, kurma, anggur dan beberapa tumbuhan lainnya berkhasiat sebagai obat.

Petunjuk bahwasannya Allah SWT menciptakan segala sesuatu penuh hikmah untuk dapat diambil manfaatnya tidak hanya ditujukan pada buah zaitun, kurma dan anggur saja namun juga tumbuhan lainnya seperti yang ditegaskan dalam surat Luqman (31): 10 bahwa Allah menumbuhkan segala macam tumbuhan yang baik tanpa terkecuali mikroalga *Chlorella sp.*. Berdasarkan beberapa penelitian senyawa aktif yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* memiliki banyak manfaat, diantaranya yaitu steroid memberikan efek toksisitas terhadap larva udang *Artemia selina* Leach (LC<sub>50</sub> fraksi etil asetat 43,3044 ppm) (Desianti, dkk., 2014), aktivitas antioksidan (EC<sub>50</sub> ekstrak metanol 18,610 ppm) (Bariyyah, dkk., 2013) dan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* (zona hambat ekstrak metanol 16,5 mm) pada konsentrasi 20 % fase stasioner (Khamidah, dkk., 2014). Salah satu optimalisasi untuk memperoleh senyawa tersebut dilakukan metode pemisahan kromatografi kolom cara basah dan cara kering. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi B.13 (cara basah) dan fraksi K.7 (cara kering) diduga merupakan senyawa steroid, dengan informasi serapan – OH, -C-H, C=O, C-O stretching, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> geminal dimetil dan C-OH alkohol setelah diidentifikasi menggunakan FTIR.



## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1 Kesimpulan

1. Pemisahan senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan kromatografi kolom pengisian fase diam cara basah diperoleh dua kelompok fraksi steroid (B.1 dan B.13), sedangkan pada pengisian fase diam cara kering diperoleh satu kelompok fraksi steroid (K.7).
2. Identifikasi senyawa steroid hasil kromatografi kolom cara basah dan kering menggunakan FTIR menghasilkan pita serapan gugus  $-OH$ ,  $-CH(CH_3)_2$  (geminal dimetil),  $-C-H$ ,  $C=O$ ,  $C-O$  stretching,  $C-OH$  (alkohol) yang diduga merupakan kelompok steroid turunan kolesterol.

#### 5.2 Saran

Penelitian selanjutnya diharapkan melakukan re-kolom hasil kromatografi kolom pengisian fase diam cara basah pada isolasi senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* sehingga diperoleh isolat steroid yang lebih murni.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah. 2007. *Tafsir Ibnu Katsir*. Jakarta: Pustaka Imam Asy Syafi'i.
- Afif, S., 2012. Ekstraksi, Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Alga Merah *Euchema Cottoni* dari Perairan Sumenep Madura. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Al Jazairi, S.A.B.J., 2008. *Tafsir Al-Aisar*. Jakarta: Darus Sunah Press.
- Al Maraghi, A.M. 1992. *Terjemahan Tafsir Al-Maraghi 7*. Semarang: CV. Toha Putra Semarang.
- Al Qarni, 'A. 2008. *Tafsir Muyassar Jilid 4 Juz 24-30*. Jakarta: Qisthi Press.
- Amaliyah, S., A. Ghanaim F. dan A. Hanapi. 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 Malang
- Anggraeni, O.N., A. Ghanaim F., M. Abidin, A. Hanapi, 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* *ALCHEMY*, vol.3 No.2 Oktober 2014, hal 173-188.
- AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist, Inc.* Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Ar Rifa'i, U.A.K. 2008. *Tafsirul Wajiz*. Jakarta: Gema Insani.
- Ash Shiddieqy, T.M.H. 2000. *Tafsir Al-Qur'anul Majid An-Nuur*. Semarang: Pustaka Rizki Putra.
- Astuti, M. D., Abdi M., Evi M. K. 2014. Isolasi Steroid Dari raksi n-heksana Batang Bajakah Tampala (*Spatholobus littoralis Hassk.*). *Jurnal Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya*, ISBN : 978-602-0951-00-3
- Asy Syanqithi, S. 2007. *Tafsir Adhwa'ul Bayan*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Banday, A. H.; Shameem, S. A.; Gupta, B. D.; Kumar, H. M. S. Steroids 2010, 75, 801.
- 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 (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Bogoriani, N.W. 2008. Isolasi dan Identifikasi Glikosida Steroid dari Daun Andong. *Jurnal Kimia Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana*. 2 (1)
- Borowitzka, M.A. dan Lesley, J.B. 1988. *Microalgae Biotechnology*. London: Cambridge University Press.
- Braithwaite, A and Smith, F. J. 1995. *Chromatographic Methods*. Kluwer Academic Publishers, London.
- Brown, M.R., 1991. The amino acid and sugar composition of sixteen species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Bh~L EcoL*, Vol. 145, pp. 79-99.
- Burke, R.W. Diamondstone, B.A. Velapoidi. R.A. Menis O. 1974. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reaction for Cholesterol. *Clinical Chemistry Journal*. Washington D.C : Analytical Chemistry Division, Institute for Materials Research, National Bureau of Standards. Vol.20. No.7.
- Cannel, R.J.P. 1998. *Natural Produk Isolation*. Humana Press, Totowa.
- Carlile, M. J. 1996. The Discovery of Fungal Sex Hormones: II. Antheridiol. Volume 10, Part 3 August 1996.
- Chisti Y. 2008. Biodiesel From Microalgae Beats Bioethanol. *Trends in Biotechnology*, Volume 26, Issue 3, March 2008, Pages: 126-131.
- Christian, Gary D. 1994. *Analytical Chemistry*. Fifth Edition. University of Washington. John Wiley & Sons, USA.
- Ciulei, J. 1984. Metodology for Analysis of vegetable and Drugs. Bucharest Rumania: Faculty of Pharmacy. p. 11-26.
- Day, J.R. R.A. dan Underwood, A. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif, edisi keenam*. Jakarta: Erlangga.
- DEPAG. 2010. *Al-Qur'an dan Tafsirnya (Edisi yang Disempurnakan)*. Jakarta: Lentera Abadi.
- Desianti, N., A. Ghanaim F., dan Tri K. 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.
- Dewi, Y.S. dan Gultom, Y.H. 2009. Pemanfaatan Algae *Chlorella sp.* dan Enceng Gondok untuk Menurunkan Tembaga (Cu) pada Industri Pelapisan Logam. *Seminar Tugas Akhir*. Semarang: Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Diponegoro.

- Effendy. 2010. *Teori VSEPR Kepolaran, dan Gaya Antarmolekul edisi 3*. Malang: Bayumedia Publishing.
- Fattah, A. 2010. *Shahih Thibbun Nabawi Panduan dan Metode Pengobatan Nabi SAW*. Buku. Jakarta: Pustaka Imam Ahmad.
- Fessenden, R.J. dan Fessenden, J.S. 1982. *Kimia Organik Edisi Ketiga Jilid 1*. Terjemahan Aloysius Handyana Pudjatmaka. Jakarta: Erlangga.
- Fogg, G. E. 1975. *Algal Culture and Phytoplankton Ecology. Second Edition*. The University of Wisconsin Press, Ltd., London.
- Freidman, D., Alex, B., Dov T., Meir, E. 2007. Steroid Kit Foamable Composition and Uses Thereof. WO 2007012977 A2.
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gibbons, G. F., Goad L. J., Goodwin T. W. 1968. The Identification Of 28-Isofucosterol In The Marine Green Algae Enteromorpha Intestinalis And *Ulva Lactuca*. *Journal of Phytochemistry* Vol. 7, pp. 983 to 988.
- Halimah, N. 2010. Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn.) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi* Diterbitkan. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- 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.
- Harborne. J.B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Diterjemahkan oleh Kokasih Padmawinta dan Iwang Soediro. Bandung. Penerbit ITB.
- Harlim, T. 1982. *Kandungan Steroid Alga Laut di Sekitar Pantai Indonesia*. Disertasi, ITB, Bandung.
- Hayati, E.K., Jannah, A., dan Ningsih,R. 2012. *Identifikasi Senyawa Dan Aktivitas Antimalaria In Vivo Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting-Anting (AcalyphaIndica L.)*. *Molekul*, Volume 7. No.1.hal: 20-32.
- Heyne, K., 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia, Jilid II, Yayasan Sarana Wana Jaya*. Jakarta, 714-718.
- Imamah, N., A. Ghanaim F. dan Tri K. A. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Indrayani, L., Soetjipto, H. dan Sihasale, L. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Salatiga: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Matematika Universitas Kristen Satya Wacana.
- Isanansetyo, A. dan Kurniastuty. 1995. *Teknik Kultur Phytoplankton dan Zooplankton Pakan Alam untuk Pembenihan Organisme Laut*. Yogyakarta: Kanisius.
- Ismarti. 2011. Isolasi Triterpenoid dan Uji Antioksidan dari Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Meranti Merah (*Sshorea singkawang* (Miq). Miq). *Artikel Pascasarjana Universitas Andalas*
- Jalaluddin, A. I., Muhammad, Al-Imam J. A. 2010. *Tafsir Jalalain*. Surabaya: PT. eLBA FITRAH MANDIRI SEJAHTERA.
- Kasal, A., Milos B., William J. G. 2010. *Spectroscopic Methods of Steroid Analysis*. Swansea SA2 8PP, UK: Springer.
- Khalaf, I. Andreia C., Laurian V., Bianca I., Doina L. 2011. LC/MS Analysis of Sterolic Compounds From *Glycyrrhiza Glabra*. *Jurnal STUDIA UBB CHEMIA*, LVI,3 2011 (p. 97-102).
- Khamidah, U. 2013. A. Ghanaim F. dan Romaidi. 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 Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Khopkar, S.M. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Kristanti, A. N., Nanik, S. A., Mulyadi, T., Bambang, K. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Kusmiyati, Nurfini A., Sri H. 2011. Isolasi dan Identifikasi Zat Aktif Ekstrak Metanol Rimpang Kunyit Putih (*Curcuma mangga* Val) Fraksi Etil Asetat. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian, Vol. 1, No. 2, 2011 : 1 - 10*.
- Lajis, D. H., Laily, Samsudin, M.W., Mohamed, A. L., Kiew, R., Toia, R.F., 1985. The Phytochemical Survey, Proceeding of A Workshop, Dept. Of Chemistry Universiti Pertanian Malaysia, Selangor, 1-4.
- Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida dan Alkaloida. *Karya Ilmiah Tidak Diterbitkan*. Medan: MIPA Universitas Sumatera Utara.
- Lin, A.S., Sebastian E., Benjamin A. S., Craig R. F., William A., Mark E. H., Julia K. 2010. Structure and biological evaluation of novel cytotoxic sterol glycosides from the marine red alga *Peyssonnelia sp.*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18 (2010) 8264–8269.

- Machado, D.I.S., J. Lopez H., P. Paseiro L., J. Lopez C. 2013. An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds. *Biomed Chromatog.* 18: 183-190 (2004).
- Mardiyah, U. 2012. Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Identifikasi Golongan Senyawa Alga Merah (*Euचेuma Spinosum*) dari Perairan Banyuwangi. *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi. UIN Malang.
- Marliana, E., 2007. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Batang *Spatholobus Ferrugineus* (Zoll 7 Morizi) Benth yang Berfungsi Sebagai Antioksidan. *Jurnal*. Samarinda: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Mulawarman.
- Marlinda. 2012. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (*Persea Americana* Mill). *Jurnal Mipa UNSRAT* 24-28.
- Mulyani, M., Bustanul A., Hazil N. 2013. Uji Antioksidan dan Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Daun Srikaya (*Annona squamosa L.*). *Jurnal Kimia Unand*, Volume 2 Nomor 1, Maret 2013.
- Nabil and Cosson J. 1996. Seasonal Variations in Sterol Composition of *Dellesteria sanguinea* (Cerameiales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*. 326/327: 511-514.
- Nielsen, S.S. 1995. *Introduction to The Chemical Analysis of Food*. New York: Chapman and Hall.
- Ningsih, D. R., Warsinah dan Suwandri. 2006. Fraksinasi Ekstrak Metanol Kulit Batang *Rhizophora mucronata* dan Uji Daya Hambat nya Terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia. Molekul*, Vol. 1. No. 1 Nopember, 2006: 30-35.
- Nohong. 2009. Skrining Fitokimia Tumbuhan *Ophiopogon jaburan Lodd* dari Kabupaten Kolaka Provinsi Sulawesi Tenggara. FMIPA, Universitas Haluoleo Kendari. *Jurnal Pembelajaran Sains*, 5 (2) : 172-178.
- Noviyanti, L. 2010. Modifikasi Teknik Kromatografi Kolom untuk Pemisahan Trigliserida dari Ekstrak Buah erah (*Pandanus conoideus Lamk.*). *Skripsi*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret.
- Palleros, D. R. 2000. *Experimental Organic Chemistry*. John Willey and Sons. New York.
- Puspita, M.D.A. 2011. Pengoptimuman Fase Gerak KLT Menggunakan Desain Campuran untuk Pemisahan Komponen Ekstrak Meniran (*Phylantus niruni*). *Skripsi Diterbitkan*. Bogor: Departemen Kimia Fakultas MIPA. IPB.

- Prihantini, N. H., Putri B., dan Yulianti R. 2005. Pertumbuhan *Chlorella sp.* Dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan variasi pH Awal. *Makara, Sains*, IX (I): 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.
- Rania, M.A.A. and Taha H. M. 2008. Antibacterial and Antifungal Activity of Cyanobacteria and Green Microalgae. Evaluation of Medium Components by Placket-Burman Design for Antimicrobial Activity of *Spirulina platensis*. *Global J. Biotechnol. Biochem.*, 3(1): 22-31.
- Richmond, A.E. 1986. *Microalga Culture*. Tokyo: CRC Press.
- Richmond, A.E. 1988. *Microalga Culture. Journal CRC Critical Rev in Biotech Volume 4, Nomor 4, Page 369-438.*
- Robbers, J. E.; Speedie, M. K.; Tyler, V. E. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*; Williams & Wilkins: Maryland, 1996. p 108.
- Robinson, D.S. 1991. *Bioquimica y valornutritivo, de los alimentos*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Rostini, I. 2007. Kultur Fitoplankton (*Chlorella sp.* dan *Tetraselmis chuii*) pada Skala Laboratorium. *Karya Ilmiah*. UNPAD.
- Saifudin, A., Suparti, Fuad, Anang dan Da'i, M. 2006. Biotransformasi Kurkumin Melalui Kultur Suspensi Sel Daun *Catharanthus roseus [L]* G.Don Berbunga Merah. *Skripsi*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah
- Saleh, C. 2007. Isolasi dan Penentuan Struktur Senyawa Steroid dari Akar Tumbuhan Cendana (*Santalun album Linn*). *Skripsi*. Medan: Universitas Sumatra Utara.
- Sapar, A., Kumanireng, A., Voogd, N.de., Noor, A.. 2004. Isolasi dan Penentuan Struktur Metabolit Sekunder Aaktif dari Spons *Biemna triraphis* Asal Pulau Kapodasang (Kepulauan Spermonde). *Marina Chimica Acta*. 5 (1) ISSN 1411-2132.
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an* Vol.7 dan 10. Jakarta: Penerbit Lentera Hati.
- Siadi, K. 2012. Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) sebagai Biopestisida yang Efektif dengan Penambahan Larutan NaCl. *Jurnal MIPA* 35 (1) (2012).

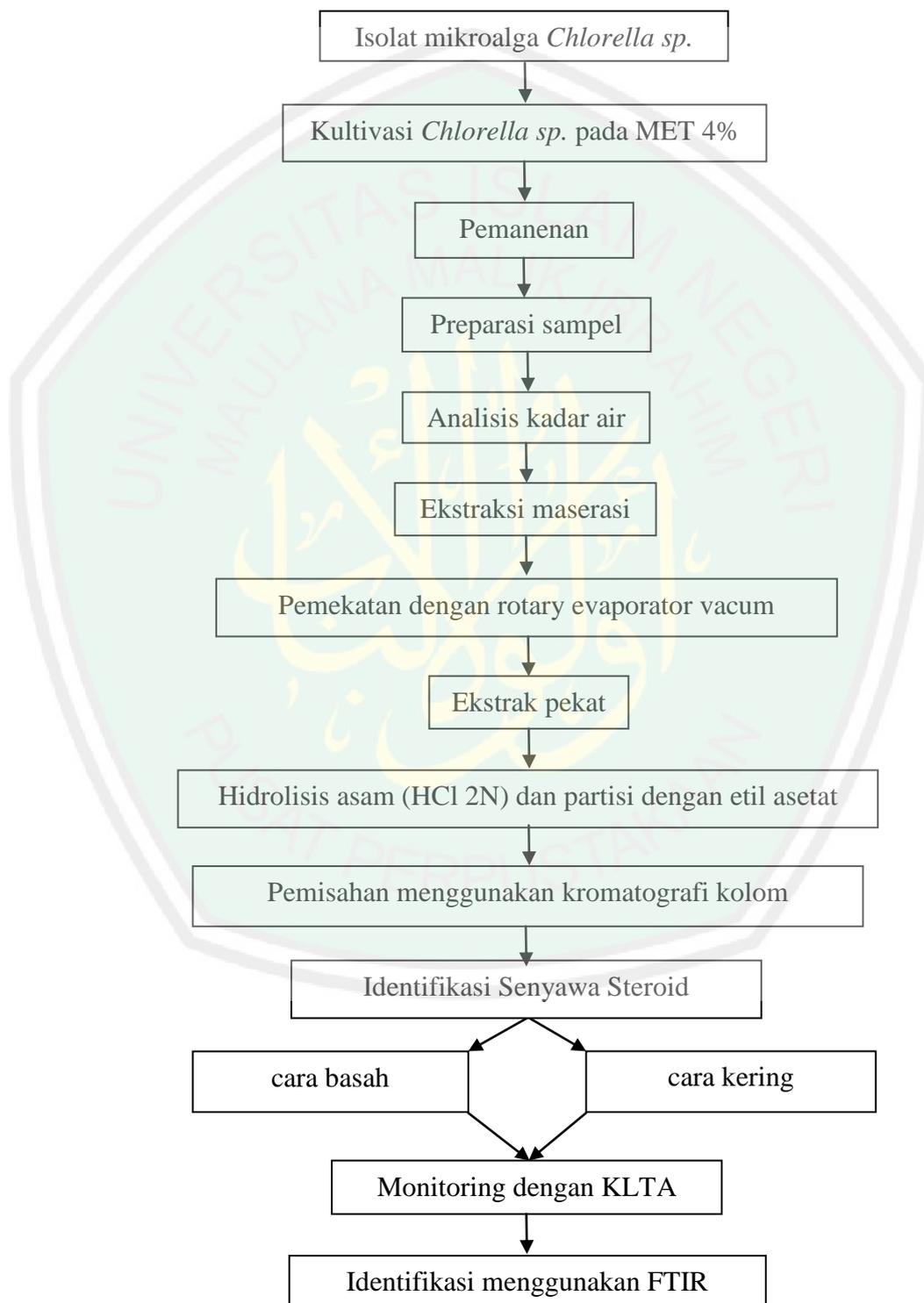
- Sidabutar, E.A. 1999. Pengaruh Medium Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella sp.* terhadap Aktivitas Senyawa Pemacu Pertumbuhan yang Dihasilkan. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Institut Pertanian Bogor.
- Sirait, M. 2007. *Penuntun Fitokimia dalam Farmasi*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Sitaula, S., Burris, TP. 2016. Cholesterol and Other Steroids. *Encyclopedia of Cell Biology, Volume 1*.
- Skoog, D. A. 1998. *Principles of Instrumental Analysis*. Fifth Edition. Brooks/Cole-Thomson Learning, USA.
- Socrates. 1994. *Infrared Characteristic Group Frequencies Tables and Charts Second Edition*. New York: John Wiley and Sons Inc.
- Soebagio, Budiasih, E., Ibnu, M.S., Widarti, H.R. dan Munzil. 2005. *Kimia Analitik II*. Malang: UM Press.
- Sriwahyuni, I. 2010. Uji Fitokimia Ekstrak Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica Linn*) dengan Variasi Pelarut dan Uji Toksisitas Menggunakan Brine Shrimp (*Artemia salina Leach*). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Sudarmadji, S., Haryono, B. Dan Suhardi. 2003. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Sukandana, I. M. 2011. Kandungan Senyawa Steroid-Alkaloid pada Ekstrak n-Heksana Daun Beringin (*Ficus benjamina L*). *Jurnal Kimia* 5 (2), Juli 2011 : 169-174.
- Sulastry, T dan Nilam, K. 2010. Isolasi Steroid dari Ekstrak Metanol daun Bluntas (*Plucea indica L*). *Jurnal Chemica* Vol. II. FMIPA UNM.
- Sundari, I. 2010. Identifikasi Senyawa dalam Ekstrak Etanol Biji Buah Merah (*Pandanus conoideus Lamk.*). *Skripsi*. Surakarta: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret.
- Supratman, U. 2010. *Elusidasi Struktur Senyawa Organik*. Bandung: Widya Padjadjaran.
- Suryani, E. 2011. Isolasi dan Elusidasi Struktur Senyawa Triterpenoid dari Ekstrak Etil Asetat Kulit Batang Tumbuhan Kecapi. *Artikel*. Padang: Program Studi Kimia Pascasarjana Universitas Andalas Padang.
- Susanti, V. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Minyak dan Asam Lemak Mikroalga *Chlorella sp.* Terhadap Radikal DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Tasic, *et. al.*, 2009. The Acid Hydrolysis of Potato Tuber Mash in Bioetanol Production. *Biochemical Engineering Journal* 43 (208-211).
- Tensiska, Marsetio, Silvia, O.N.Y. 2007. Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Isoflavon dari Ampas Tahu. *Hasil Penelitian Dosen Jurusan Teknologi Industri Pangan*. Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Thillairajeseekar, K., Veeramuthu D., Pachiappan P., Savarimuthu I. 2009. Antimicrobial activity of *Trichodesmium erythraeum* (Ehr) (microalga) from South East coast of Tamil Nadu. *International Journal of Integrative Biology*. ISSN 0973-8363.
- Tukiran, Hamdani. B. E., Mahyudi, R., Syarief, S. H., dan Hidayati, N.. Beberapa Senyawa Hasil Isolasi dari Kulit Batang Tumbuhan Kedoya (*Dysoxylum gaudichaudianum* (A. Juss.) Miq.) (Meliaceae). *Jurnal Ilmu Dasar*. 10 (2): 236 – 244.
- Utama, W. A, Mai. E, Adlis, S. 2013. Isolasi Senyawa Triterpenoid dari Fraksi Aktif Kulit Batang Kecapi (*Sandoricum Koetjape Merr*) dan Uji Bioaktivitas “Brineshrimps Lethality Bioassay”. *Jurnal Kimia Unand*. 2 (1). ISSN No. 2303-3401.
- Utami, K.S. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri 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.
- Verma, A., Sudhanshudhar D., Namrata S. 2013. Spectral Analysis of Steroidal Saponin Isolated and Purified from Leaves Extract of *Asparagus racemosus* (Family-Asparagaceae). *American Journal of Advanced Drug Delivery*. AJADD (1) (5) (2013)770-776.
- Vihma, V., Matti J. T. 2011. Fatty Acid Esters of Steroids: Synthesis and Metabolism in Lipoproteins and Adipose Tissue. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 124 (2011) 65-76.
- Wagner, H. and S. Bland. 1996. *Plant Drug Analysis; A Thin Layer Chromathography Atlas*. 2<sup>nd</sup> Edition. Berlin Heildeberg: Springer.
- Wathnani H. A., Ismet A., Tahmaz R. R., Dayel T. H. A., Bakir M. A. 2012. Bioactivity of Natural Compounds Isolate from Cyanobacteria and Green Algae Against Human Pathogenic Bacteria and Yeast. *Journal of Medicinal Plants Research Vol. 6(18)*, pp. 3425-3433.
- Wulandari, A. P., Naderia, F., Pattalia, A. E., dan Permata, D. R. 2010. Identifikasi Mikroalga di Sekitar Pantai Pangandaran dan Potensi Pertumbuhannya pada Formulasi Medium Ekstrak Tauge (MET). *Prosiding Seminar Nasional Limnologi V Tahun 2010*. Jatinagor: Jurusan Biologi FMIPA Universitas Padjadjaran.

## LAMPIRAN

## Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian

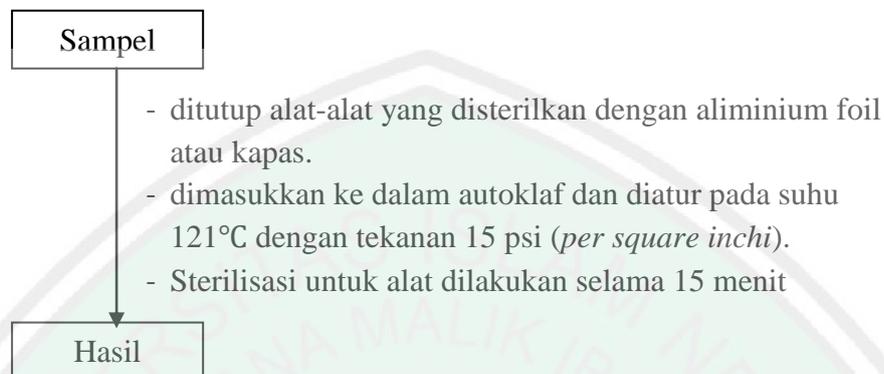
## L.1.1 Rancangan Penelitian



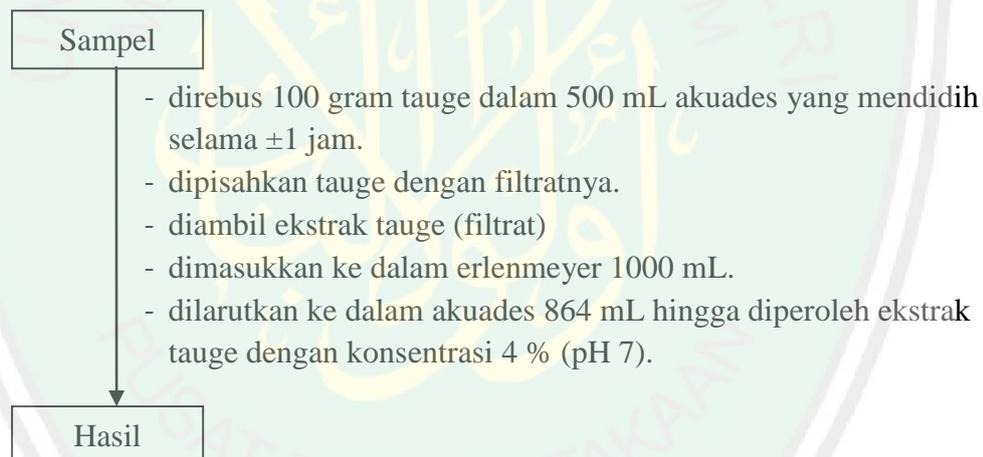
## Lampiran 2. Skema Kerja

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

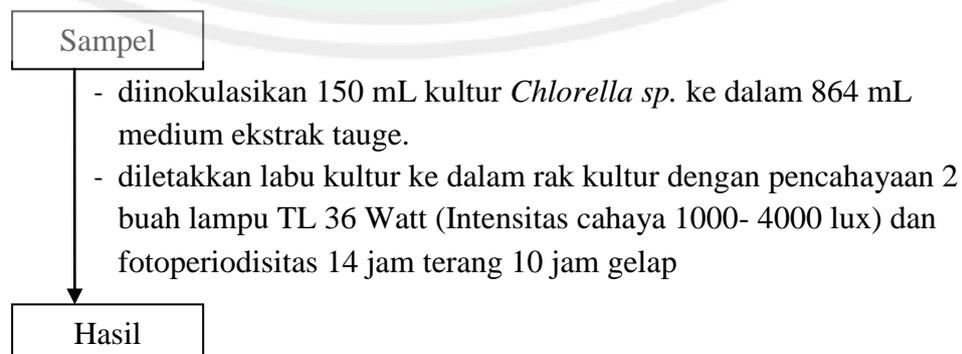
#### L. 2.1.1 Sterilisasi Alat



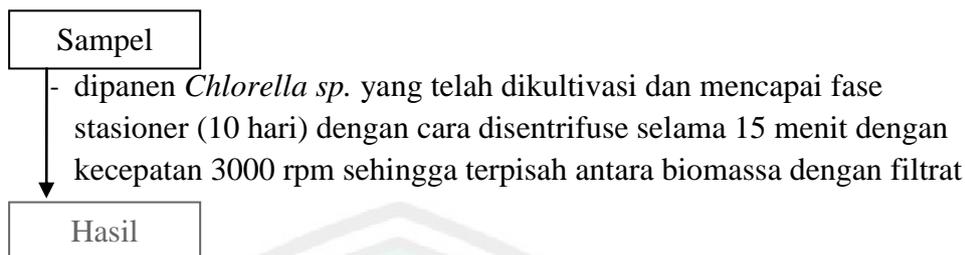
#### L. 2.1.2 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %



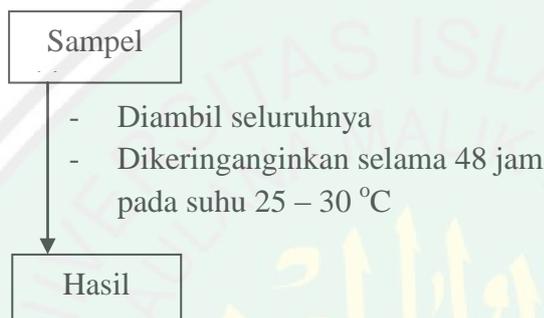
#### L. 2.1.3 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam MET 4 %



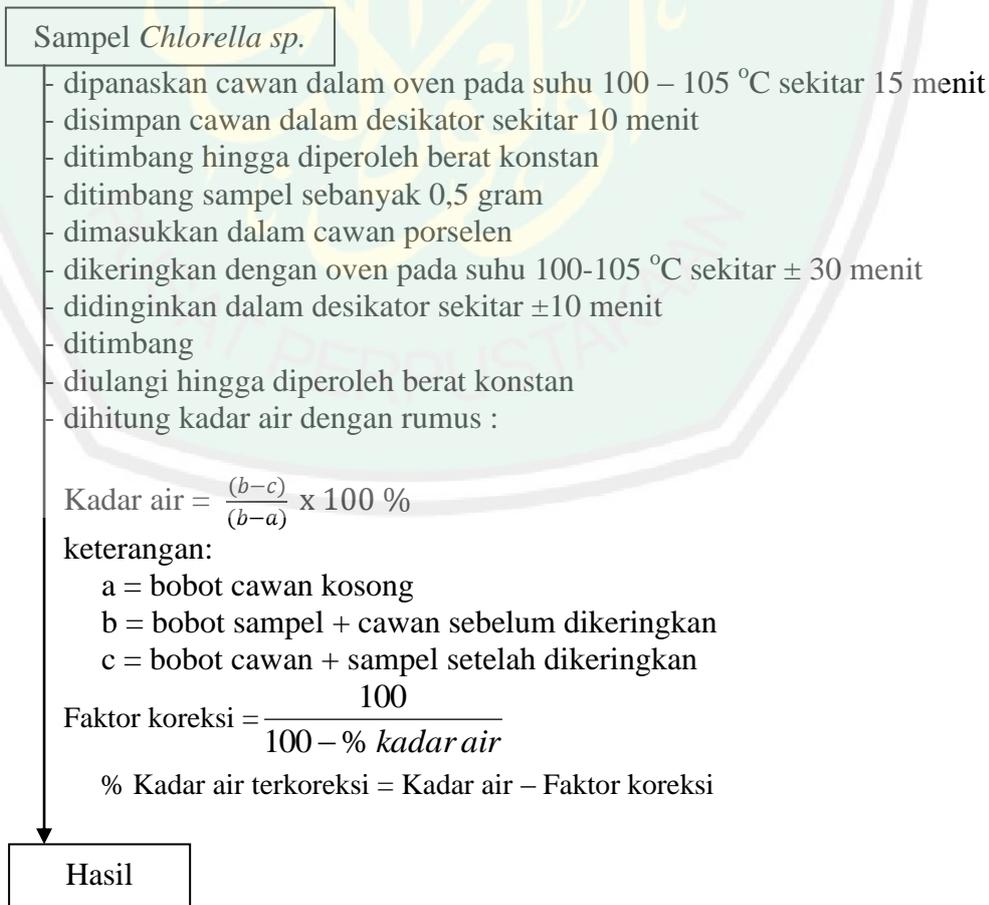
#### L. 2.1.4 Pemanenan Mikroalga *Chlorella sp.*



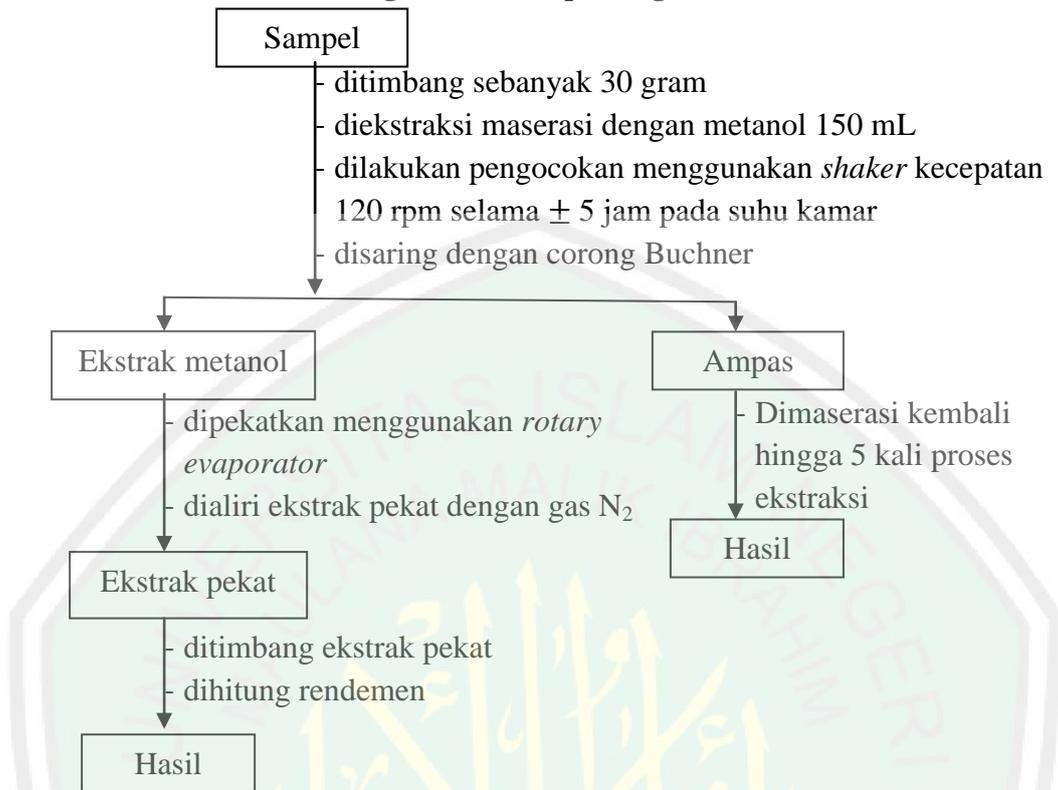
#### L. 2.2 Preparasi sampel



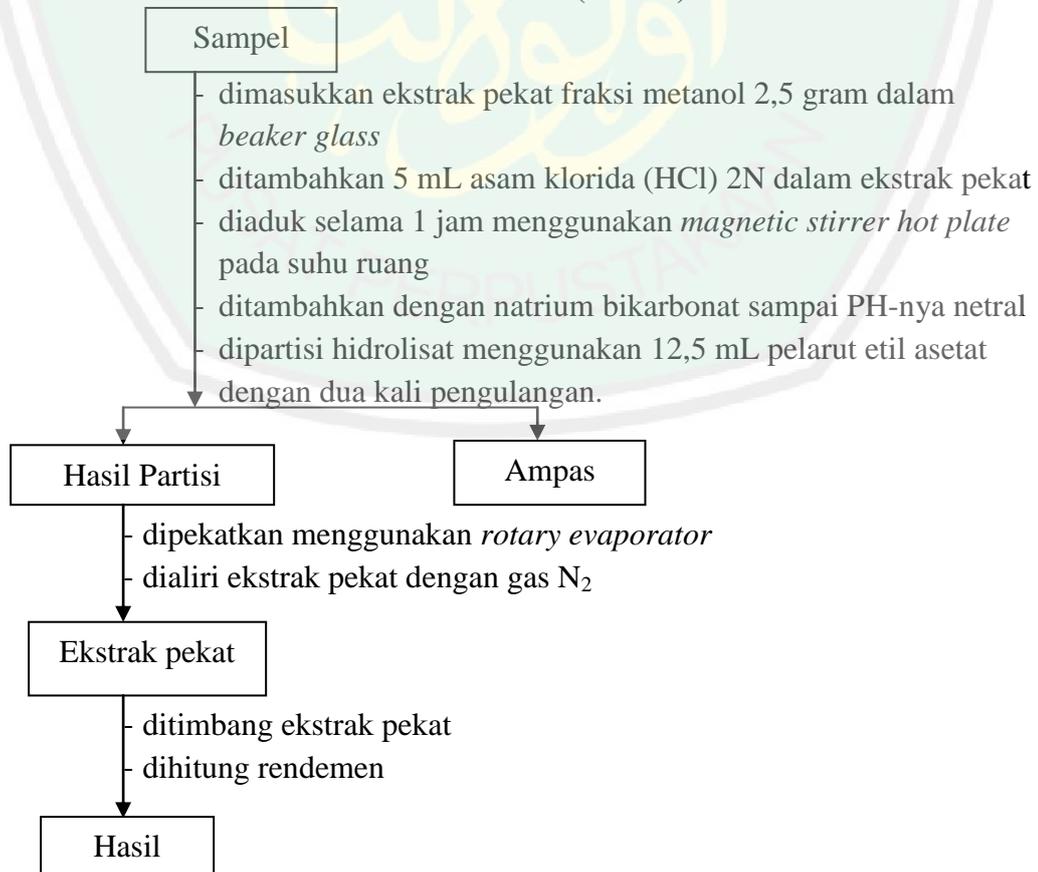
#### L. 2.3 Penentuan Kadar Air Secara Thermogravimetri (AOAC, 1984)



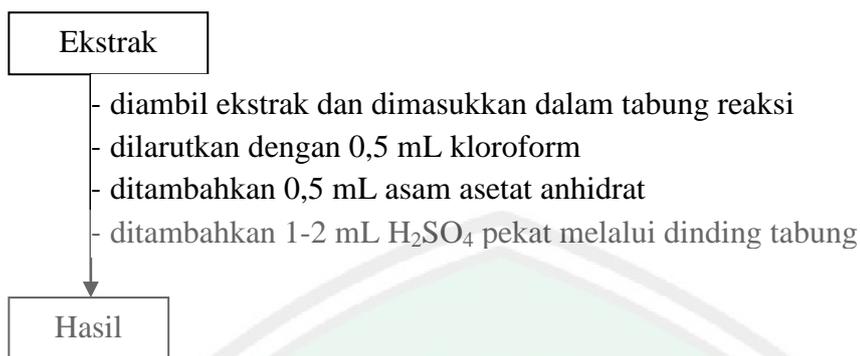
#### L. 2.4 Ekstraksi Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Maserasi



#### L. 2.5 Hidrolisis dan Ekstraksi Cair-Cair (Partisi) Ekstrak Pekat Metanol

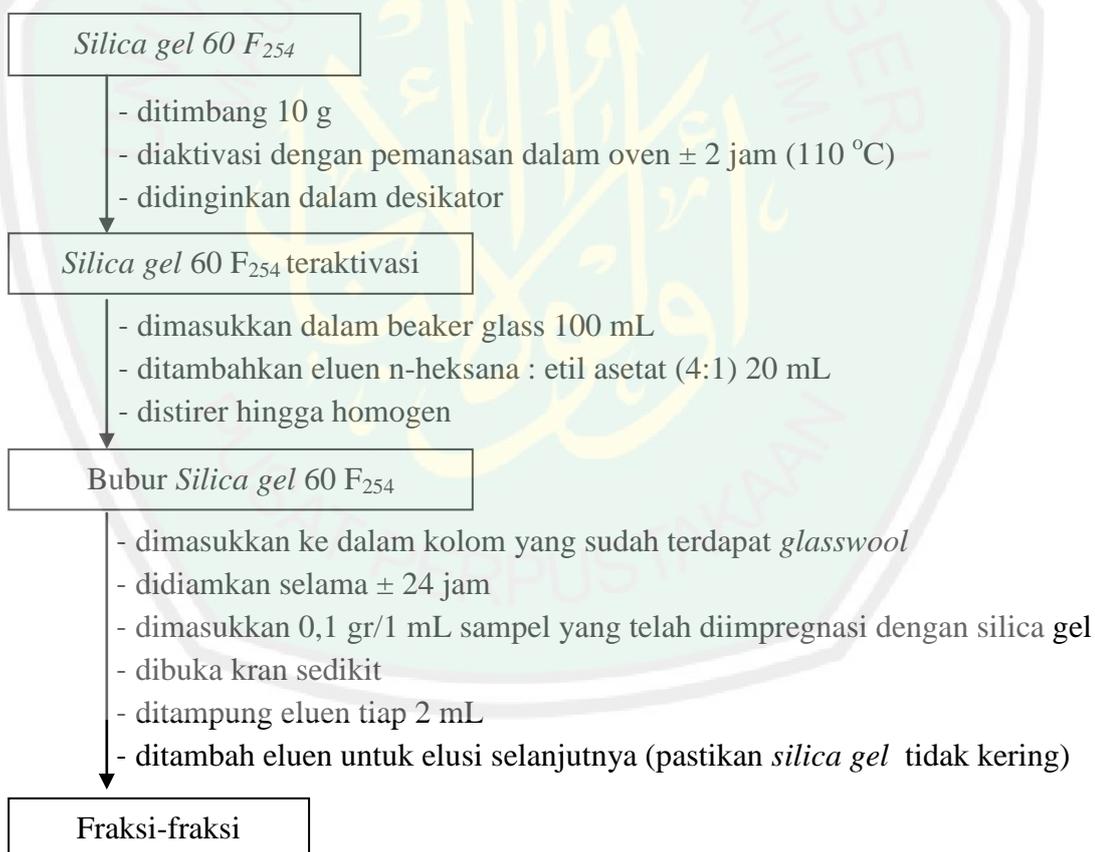


### L.2.6. Identifikasi senyawa steroid

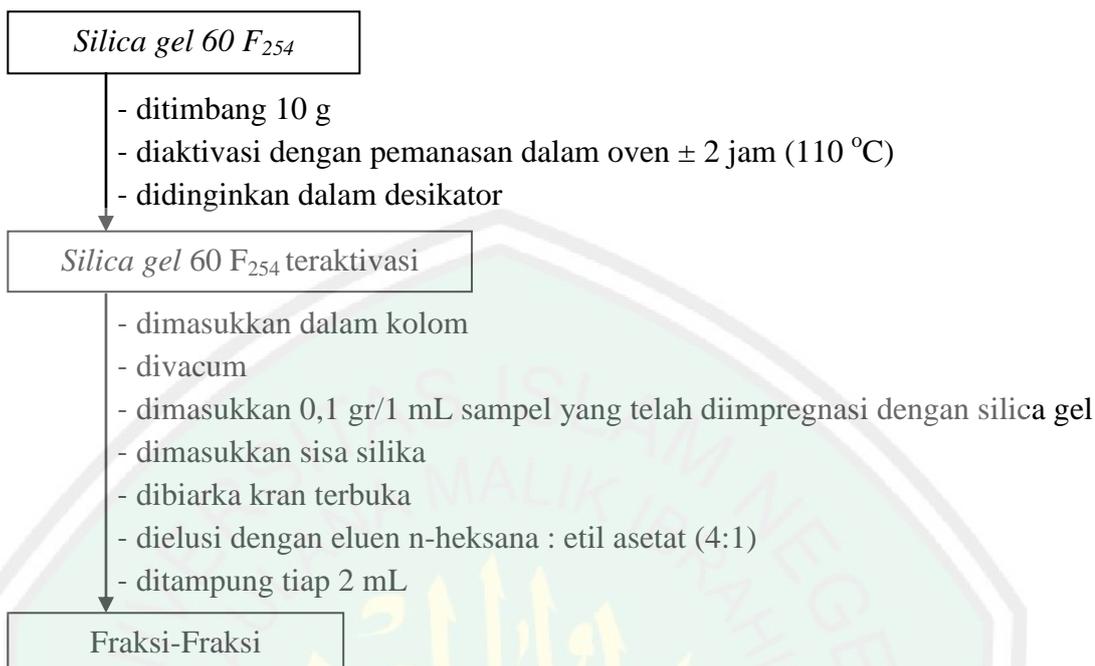


### L. 2.7. Pemisahan Senyawa Steroid Menggunakan Kolom Basah dan Kolom Kering

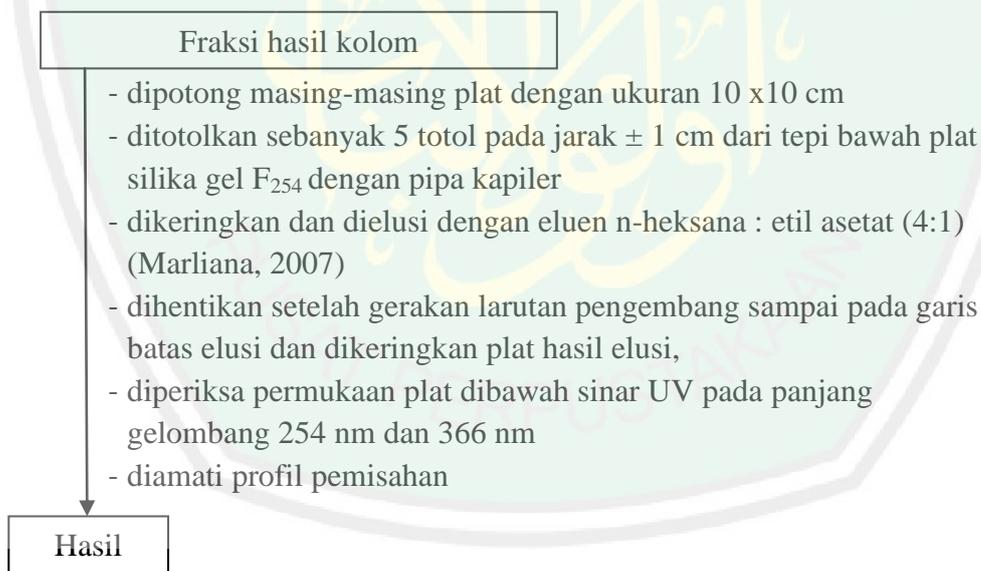
#### a. Kolom Basah



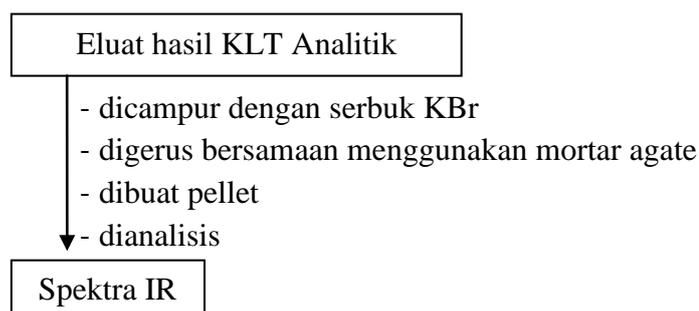
### b. Kolom Kering



### L. 2.8. Monitoring Senyawa Steroid dengan KLT Analitik



### L. 2.9. Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer FTIR



### Lampiran 3. Perhitungan

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

$$\text{Ketentuan} = \frac{10 \text{ mL isolat } chlorellasp}{60 \text{ mL MET 4\%}} = \text{Volume total 70 mL}$$

- a. Kultivasi dalam Erlenmeyer 1000 mL dengan Memaksimalkan Daya Tampung

Erlenmeyer

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

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

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

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

- b. Pembuatan MET 4% sebanyak 900 mL

MET = (aquades + ekstrak tauge)

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

$$= 36 \text{ mL ekstrak tauge}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume Aquades} &= \text{MET 4\%} - (\text{Volume ekstrak tauge}) \\ &= 900 \text{ mL} - 36 \text{ mL} \\ &= 864 \text{ mL} \end{aligned}$$

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

Erlenmeyer

$$\frac{10}{60} = \frac{x}{1200 \text{ mL MET 4 \%}}$$

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

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

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

d. Pembuatan MET 4% sebanyak 1200 mL

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

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

$$= 48 \text{ mL ekstrak taugé}$$

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

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

$$= 1152 \text{ mL}$$

### L.3.2 Pembuatan larutan HCl 2 N

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### L.3.3 Pembuatan reagen Lieberman-Burchard

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

Cara pembuanya adalah diambil 50 mL etanol terlebih dahulu, kemudian ditambahkan secara hati-hatianhidrida asetat 5 mL dan 5 mL asam sulfat pekat dalam beaker glass 50 mL (diakukan dalam lemari asam). kemudian didinginkan

dalam lemari pendingin. Penggunaan reagen ini digunakan langsung setelah pembuatan (Wagner, 2001).

### L.3.4 Data Pengukuran Kadar Air

Ulangan Cawan	Berat Cawan Kosong (gr)				Rata-Rata Berat Konstan (gr)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
A1	58,1379	58,1339	58,1328	58,1326	58,1331
A2	57,4563	57,4514	57,4521	57,4503	57,4512
A3	58,6865	58,6845	58,6825	58,6823	58,6831

Ulangan Sampel	Berat Cawan + Sampel (gr)				Rata-Rata Berat Konstan (gr)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
A1	58,6327	58,5759	58,5770	58,5759	58,5774
A2	57,9503	57,9028	57,9024	57,9013	57,9022
A3	59,1823	59,1290	59,1309	59,1328	59,1309

Keterangan: P = perlakuan

#### 1. Kadar air ulangan ke-1

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{beratcawan+sampelsebelumdikeringkan})-(\text{beratcawan+sampelsetelahdikeringkan})}{(\text{beratcawan+sampelsebelumdikeringkan})-(\text{beracawankosong})} \times 100 \% \\
 &= \frac{(58,6327-58,5774) \text{ gr}}{(58,6327-58,1331) \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,0553 \text{ gr}}{0,4996 \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= 11,06 \%
 \end{aligned}$$

#### 2. Kadar air ulangan ke-2

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{beratcawan+sampelsebelumdikeringkan})-(\text{berat cawan+sampelsetelahdikeringkan})}{(\text{beratcawan+sampelsebelumdikeringkan})-(\text{beracawankosong})} \times 100 \% \\
 &= \frac{(57,9503-57,9022) \text{ gr}}{(57,9503-57,4512) \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,0481 \text{ gr}}{0,4991 \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= 9,63 \%
 \end{aligned}$$

## 3. Kadar air ulangan ke-3

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{beratcawan+sampelsebelumdikeringkan})-(\text{beratcawan+sampelsetelahdikeringkan})}{(\text{beratcawan+sampelsebelumdikeringkan})-(\text{beratcawankosong})} \times 100 \% \\
 &= \frac{(59,1823-59,1309) \text{ gr}}{(59,1823-58,6831) \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,0514 \text{ gr}}{0,4991 \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= 10,29 \%
 \end{aligned}$$

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

P1 (%)	P2 (%)	P3 (%)	Total (%)	Rata-rata (%)
11,06	9,63	10,29	30,98	10,33

## L.3.5 Randemen Preparasi Sampel (Pengeringan Sampel)

No	Berat botol kosong (g)	Berat botol + <i>Chlorella sp.</i> basah (g)	Berat <i>Chlorella sp.</i> basah (g)	Berat <i>Chlorella sp.</i> kering (g)
1.	150,23	269,29	119,06	2,75
2.	145,06	280,68	135,62	2,01
3.	150,19	385,15	234,96	2,30
4.	149,44	246,02	96,58	1,29
5.	200,69	309,21	108,52	1,82
Total			694,74	10,17

$$\% \text{ Randemen} = \frac{\text{Berat kering}}{\text{Berat basah}} \times 100 \%$$

$$\frac{10,17 \text{ gr}}{694,74 \text{ gr}} \times 100\% = 1,4638 \%$$

### L.3.6 Randemen Hasil Maserasi

Ekstrak	Berat wadah (gr)	Berat wadah + ekstrak (gr)	Berat ekstrak pekat (gr)
Cair	65,1469	67,7278	2,5809
Padat	68,1975	72,1845	3,9870
Total			6,5679

$$\begin{aligned} \text{Randemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{6,5679 \text{ gr}}{30,0005 \text{ gr}} \times 100 \% \\ &= 21,8926 \% \end{aligned}$$

### L.3.7 Randemen Hasil Hidrolisis dan Partisi

Berat ekstrak metanol yang dihidrolisis (gr)	Berat wadah (gr)	Berat wadah + ekstrak etil asetat (gr)	Berat ekstrak pekat etil asetat (gr)
2,5050	129,5239	131,5513	2,0278

$$\begin{aligned} \text{Randemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{2,0278 \text{ gr}}{2,5050 \text{ gr}} \times 100 \% \\ &= 80,95 \end{aligned}$$

### L.3.8 Perhitungan Nilai Rf Hasil Monitoring

Kromatografi Kolom Cara Basah		Kromatografi Kolom Cara Kering	
B.1 (1-8)	$\frac{4,7 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,587$	K.1 (2)	$\frac{5,35 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,668$
	$\frac{3,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,487$		$\frac{4,45 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,556$
	$\frac{0,6 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,075$	K.2 (3-4)	$\frac{5,35 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,668$
$\frac{4,7 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,587$	$\frac{4,45 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,556$		
$\frac{3,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,487$	K.3 (5-10)		$\frac{3,1 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,387$
$\frac{0,6 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,075$		$\frac{4,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,537$	

B.3 (12-16)	$\frac{4,4 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,550$	K.4 (15-20)	$\frac{3,1 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,387$
	$\frac{3,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,487$		$\frac{1,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,225$
	$\frac{0,6 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,075$		$\frac{3,1 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,387$
B.4 (17)	$\frac{4,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,537$	K.5 (30)	$\frac{1,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,225$
	$\frac{3,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,487$		$\frac{3,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,487$
	$\frac{3,1 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,387$		$\frac{1,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,225$
	$\frac{0,6 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,075$		$\frac{1 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,125$
B.5 (18-20)	$\frac{4,3 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,537$	K.6 (40-80)	$\frac{4,7 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,587$
	$\frac{3,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,487$		$\frac{3,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,487$
	$\frac{3,1 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,387$		$\frac{1,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,225$
B.6 (21-24)	$\frac{4,7 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,587$	K.7 (90-107)	$\frac{1 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,125$
	$\frac{3,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,487$		$\frac{0,6 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,075$
	$\frac{3,2 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,400$		$\frac{4,7 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,587$
	$\frac{2,4 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,300$		$\frac{3,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,487$
	$\frac{1,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,237$		$\frac{0,6 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,075$
B.7 (25)	$\frac{3,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,487$		
	$\frac{3,2 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,400$		
B.8 (30)	$\frac{3,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,487$		
	$\frac{3,1 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,387$		
	$\frac{1,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,225$		
B.9 (40)	$\frac{1,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,225$		

B.10 (50)	$\frac{1,8 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,225$		
	$\frac{1 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,125$		
B.11 (60)	$\frac{3,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,487$		
	$\frac{1 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,125$		
B.12 (70-85)	$\frac{3,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,487$		
	$\frac{1 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,125$		
	$\frac{0,6 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,075$		
B.13 (86-117)	$\frac{4,7 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,587$		
	$\frac{3,9 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} = 0,487$		

## Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian

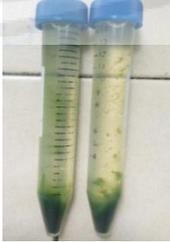
### L.4.1 Pembuatan medium ekstrak taugé (MET 4 %)

			
Tauge	Perebusan taugé	Ekstrak taugé pekat	MET 4%

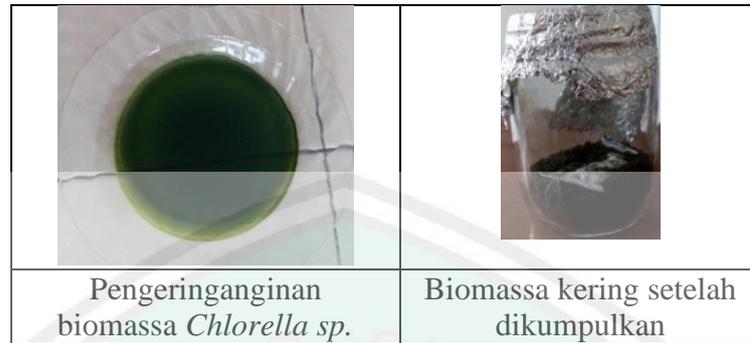
### L.4.2 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

					
Hari ke-0	Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3	Hari ke-4	Hari ke-5
					
Hari ke-6	Hari ke-7	Hari ke-8	Hari ke-9	Hari ke-10	

### L.4.3 Pemanenan Biomassa *Chlorella sp.*

			
Biomassa <i>Chlorella sp.</i>	Biomassa sebelum disentrifuge	Biomassa setelah disentrifuge	Biomassa hasil sentrifuge

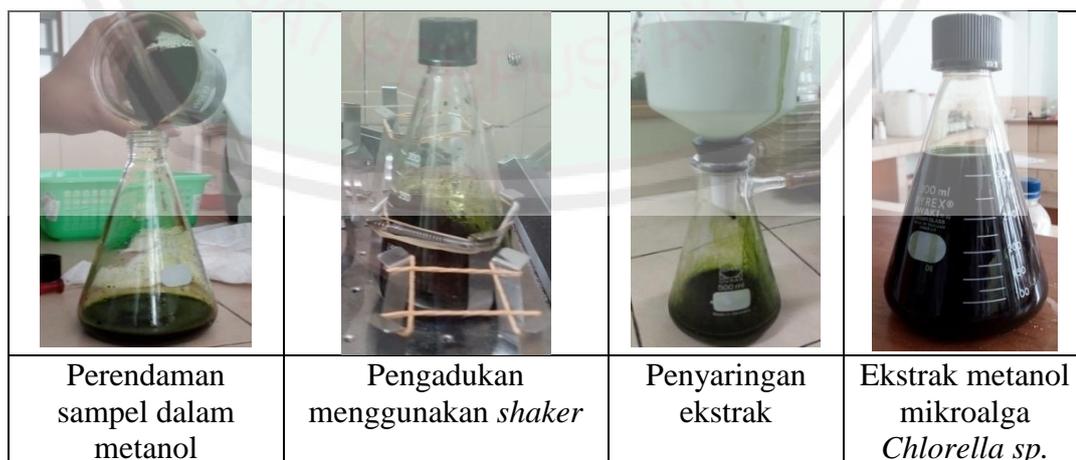
#### L.4.4 Preparasi Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*



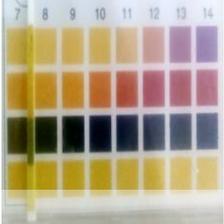
#### L.4.5 Analisis kadar air



#### L.4.6 Ekstraksi Maserasi



### L.4.7 Hidrolisis

		
Proses Hidrolisis ekstrak dengan HCl 2 N	Penetralan dengan NaHCO <sub>3</sub>	pH 7 setelah penetralan

### L.4.8 Partisi

		
Proses partisi ekstrak hasil hidrolisis	Pemisahan fase air dengan fase organic	Ekstrak pekat hasil partisi

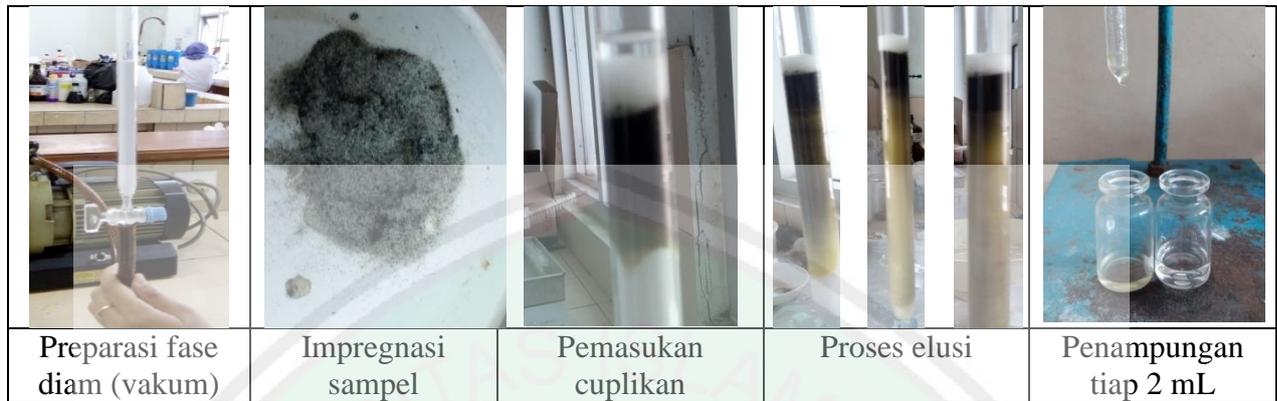
### L.4.9 Identifikasi Senyawa Steroid

	
Ekstrak sebelum ditetesi reagen LB	Ekstrak setelah ditetesi reagen LB

### L.4.10 Pemisahan Menggunakan Kolom Kromatografi Cara Basah

				
Pembuatan bubuk silika	Preparasi fase diam	Impregnasi sampel	Proses elusi	Penampungan tiap 2 mL

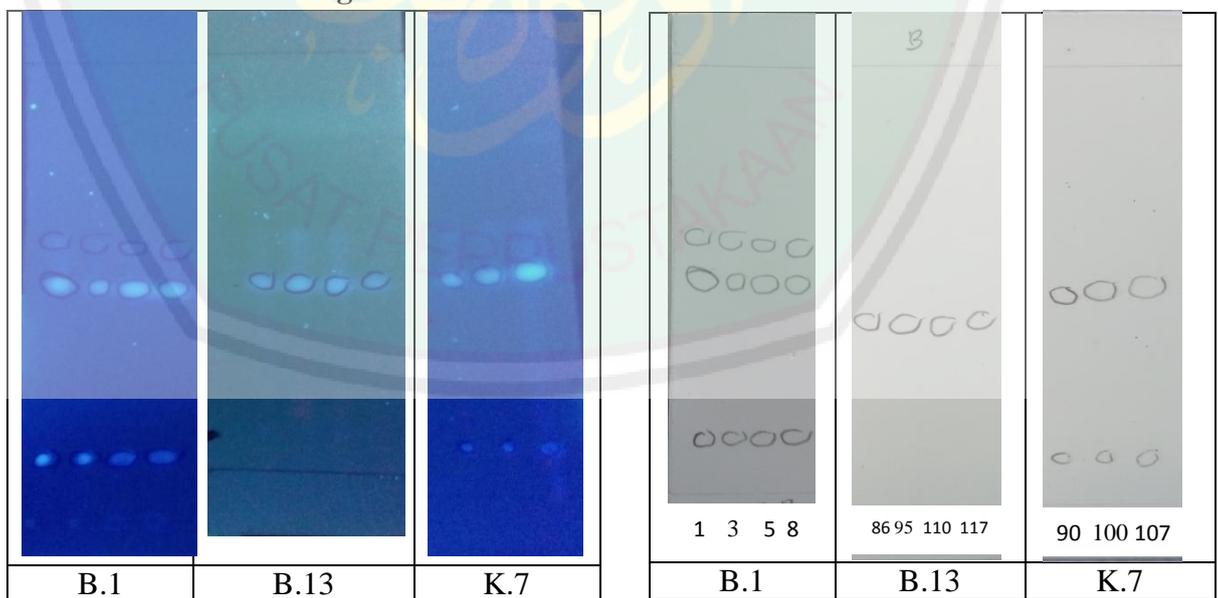
#### L.4.11 Pemisahan Menggunakan Kolom Kromatografi Cara Kering



#### L.4.12 Monitoring



#### L.4.13 Hasil Monitoring



### L.4.14 Bagian-Bagian Kolom

Gambar 1. Bagian-Bagian Kromatografi Kolom Cara Basah

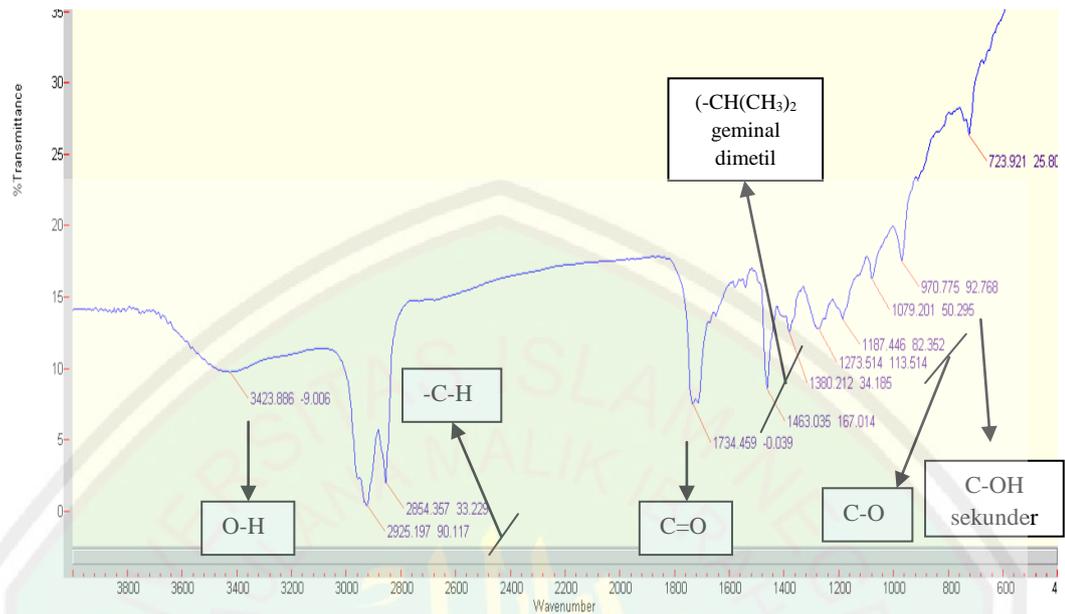


Gambar 2. Bagian-Bagian Kromatografi Kolom Cara Kering

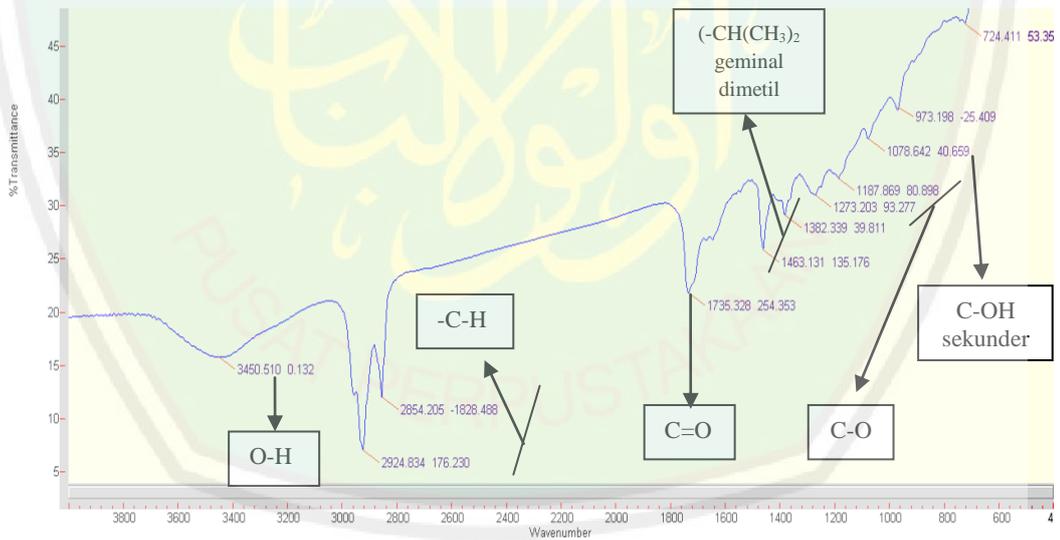


- A : Vacuum
- B : Pemegang dasar kolom
- C : Kolom
- D : Lengan pengait
- E : Penyangga

#### L.4.15 Spektra FTIR Cara Basah (Fraksi B-13)



#### L.4.16 Spektra FTIR Cara Kering (Fraksi K-7)





LABORATORIUM TAKSONOMI, STRUKTUR DAN  
PERKEMBANGAN TUMBUHAN  
JURUSAN BIOLOGI, FAKULTAS MIPA  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
JALAN VETERAN, MALANG 65145  
Telepon/faks: 0341-575841

### KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0114/Takso. Identifikasi/03/2013

Kepala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:

Nama : A. Ghanaim Fasya, M.Si

Instansi : UIN Malang

Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Algae (Linda E. Graham & Lee W. Wilcox, 2000), halaman 145, diidentifikasi sebagai:

**Familia** : *Chlorellaceae*

**Genus** : *Chlorella*

**Species** : *Chlorella sp.*

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 2 Oktober 2013

Kepala Laboratorium  
Taksonomi, Struktur dan  
Perkembangan Tumbuhan,

LABORATORIUM TAKSONOMI, STRUKTUR DAN PERKEMBANGAN TUMBUHAN  
Dr. Serafinah Indriyanti, M.Si.  
98802 2 001



KEMENTERIAN AGAMA  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
JURUSAN BIOLOGI

## LABORATORIUM BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Telp. (0341) 558933, Fax. (0341) 558933 Malang

Malang, 15 Juni 2013

### SURAT KETERANGAN HASIL IDENTIFIKASI SAMPEL

Nama Pengirim : Umi Khamidah  
Instansi : Jurusan Kimia F. SAINTEK UIN Maliki Malang  
Kode Sampel : S.12  
Tanggal Pengiriman : 1 Desember 2012  
Lokasi Pengambilan Sampel : Pantai Camplong Kabupaten Sampang Jawa Timur  
Deskripsi Sampel :

Sel berbentuk bulat, hidup soliter, berukuran 2-8  $\mu\text{m}$ . Protoplas tipis dan berbentuk seperti cawan atau lonceng dengan posisi menghadap ke atas. Pineroid-pineroid stigma dan vacuola kontraktil tidak ada. Warna hijau pada alga ini diduga disebabkan karena selnya mengandung klorofil a dan b dalam jumlah yang besar, di samping karotin dan xantofil. Alga ini mempunyai kesamaan umum dengan alga Divisi Chlorophyta atau alga hijau. Berdasarkan ciri-ciri tersebut dapat disimpulkan bahwa sampel ini identik dengan marga *Chlorella* atau jenis:

*Chlorella sp.*

#### Referensi :

- ✓ Wehr, J. D. (2002). *Freshwater algae of North America: ecology and classification*. Academic Press.
- ✓ John, D. M., Whitton, B. A., & Brook, A. J. (2002). *The freshwater algal flora of the British Isles: An identification guide to freshwater and terrestrial algae*. Cambridge University Press.

Mengetahui,  
Identifikator

**Romaidi, M.Si**  
NIP. 19810201 200901 1 019

Koordinator Laboratorium

Fakultas Sains dan Teknologi  
UN MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG

**Kholifah Hohl, M.Si**  
NIP. 19751106 200912 2 001

