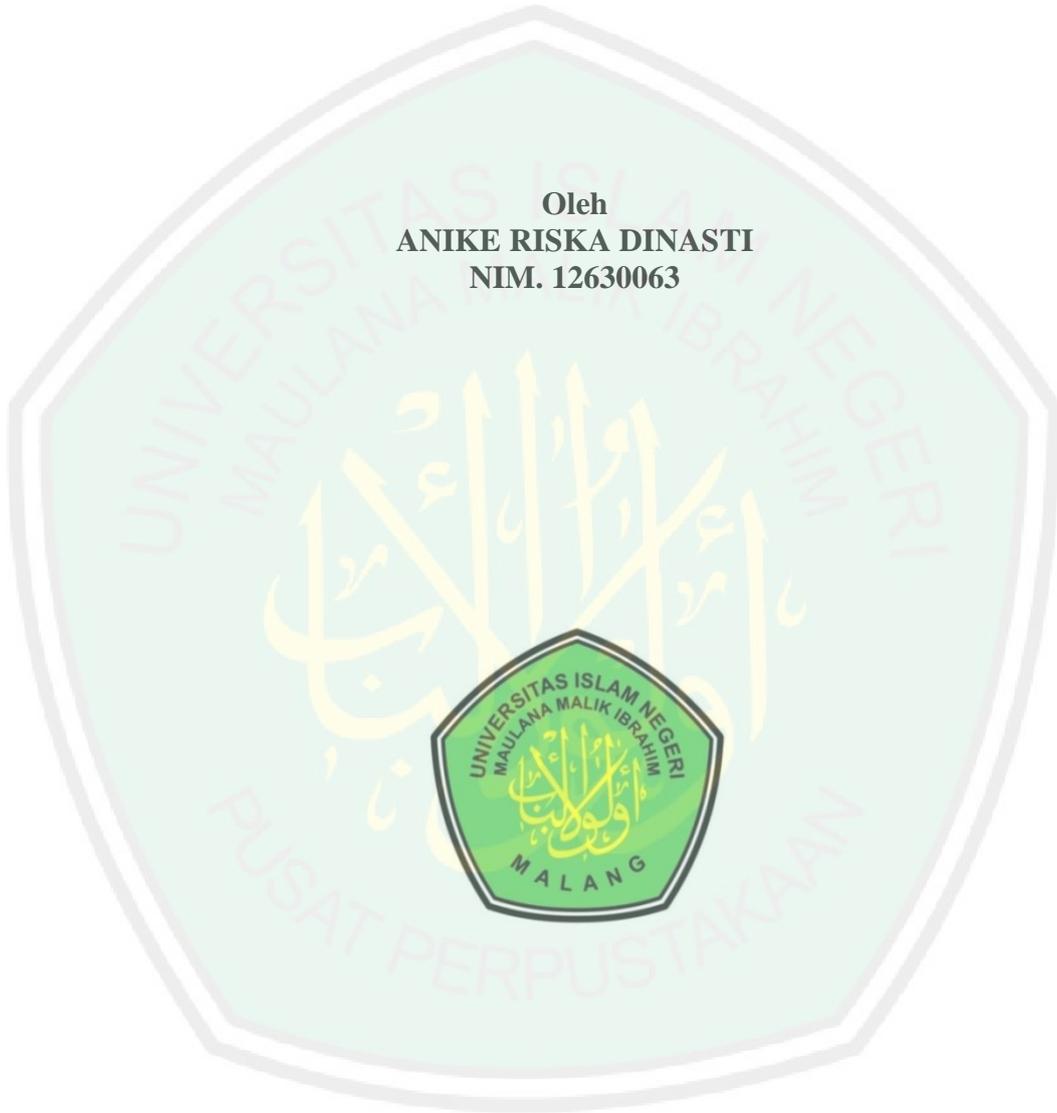


**ISOLASI DENGAN KLTP DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN
SENYAWA STEROID FRAKSI ETIL ASETAT MIKROALGA *Chlorella sp.***

SKRIPSI

Oleh
ANIKE RISKA DINASTI
NIM. 12630063



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

**ISOLASI DENGAN KLTP DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN
SENYAWA STEROID FRAKSI ETIL ASETAT MIKROALGA *Chlorella sp.***

SKRIPSI

Oleh
ANIKE RISKA DINASTI
NIM. 12630063

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

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

**ISOLASI DENGAN KLTP DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN
SENYAWA STEROID FRAKSI ETIL ASETAT MIKROALGA *Chlorella sp.***

SKRIPSI

Oleh
ANIKE RISKA DINASTI
NIM. 12630063

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 15 September 2016

Pembimbing I

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

Pembimbing II

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

Mengetahui
Ketua Jurusan Kimia



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

**ISOLASI DENGAN KLTP DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN
SENYAWA STEROID FRAKSI ETIL ASETAT MIKROALGA *Chlorella sp.***

SKRIPSI

Oleh
ANIKE RISKA DINASTI
NIM. 12630063

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratn
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S. Si)
Tanggal 15 September 2016

| | | |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------|
| Penguji Utama | : Elok Kamilah Hayati, M. Si NIP. 19790620 200604 2 002 | (.....) |
| Ketua penguji | : Ahmad Hanapi, M. Sc NIDT. 19851225 20160801 1 069 | (.....) |
| Sekretaris Penguji | : A. Ghanaim Fasya, M. Si NIP. 19820616 200604 1 002 | (.....) |
| Anggota Penguji | : Ach. Nasichuddin, M. A NIP. 19730705 200003 1 002 | (.....) |



Mengetahui
Ketua Jurusan Kimia

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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Anike Riska Dinasti
NIM : 12630063
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Isolasi dengan KLTP dan Uji Aktivitas Antioksidan
Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga
Chlorella sp.

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

Malang, 19 September 2016

Yang membuat pernyataan,



Anike Riska Dinasti

NIM. 12630063

Halaman Persembahan

Skripsi ini saya persembahkan untuk kedua orang tua, kakak, serta adikku tercinta yang selalu mendukung dan memberikan semangat dan selalu mendoakan selama proses mengerjakan karya ini.

Tak lupa pula ucapan Terimakasih Kepada pembimbing, konsultan, seluruh dosen kimia, laboran, tim mikroalga, dan seluruh teman-teman yang telah membantu dan memberikan semangat dalam proses mengerjakan skripsi ini.

Keep Fighting and never give up!!!

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur kehadirat Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, dimana dengan limpahan rahmat, taufik dan hidayah-Nya penyusun dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul, “**Isolasi Dengan KLTP dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.***”. dengan semaksimal mungkin, meskipun masih jauh dari kesempurnaan. Penyusun menyadari bahwa Skripsi ini dapat terselesaikan berkat bantuan dari pembimbing, konsultan serta berbagai pihak yang telah membantu menyelesaikan Skripsi ini. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penyusun menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Orang tua tercinta yang telah banyak memberikan dukungan baik moril maupun materil yang tak mungkin terbalaskan juga keluarga besar penyusun.
2. Bapak Prof. Dr. Mudjia Rahardjo, M.Si, selaku rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si, selaku ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si, selaku dosen pembimbing yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat kepada penyusun dalam menyelesaikan Skripsi ini.
5. Bapak Ahmad Hanapi, M.Sc, selaku konsultan yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat kepada penyusun dalam menyelesaikan Skripsi ini.
6. Bapak A. Nasichuddin, M.A, selaku dosen pembimbing agama yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan nasehat kepada penyusun dalam menyelesaikan Skripsi ini.
7. Seluruh dosen Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmu, pengetahuan, pengalaman, wacana dan wawasannya, sebagai pedoman dan bekal bagi penyusun.
8. Teman-teman organik yang banyak membantu penyusunan Skripsi ini.

9. Teman-teman Jurusan Kimia angkatan 2012 Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberi motivasi, informasi, dan masukannya kepada penyusun dalam menyelesaikan Skripsi ini.
10. Semua rekan-rekan dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala bantuan dan motivasinya kepada penyusun.

Penyusun menyadari Skripsi ini jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu penyusun mengharapkan kritik dan saran untuk perbaikan dalam penyusunan selanjutnya. Terlepas dari segala kekurangan, semoga skripsi ini dapat memberikan informasi dan kontribusi positif serta bermanfaat bagi kita semua. Amiin.

Malang, September 2016

Penyusun

DAFTAR ISI

| | |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PERSETUJUAN | ii |
| HALAMAN PENGESAHAN..... | iii |
| HALAMAN PERNYATAAN..... | iv |
| HALAMAN PERSEMBAHAN | v |
| KATA PENGANTAR..... | vi |
| DAFTAR ISI..... | viii |
| DAFTAR TABEL | x |
| DAFTAR GAMBAR..... | xi |
| DAFTAR LAMPIRAN | xii |
| ABSTRAK | xiii |
| | |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 6 |
| 1.3 Tujuan Penelitian..... | 6 |
| 1.4 Batasan Masalah | 6 |
| 1.5 Manfaat Penelitian..... | 7 |
| | |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... | 8 |
| 2.1 Pemanfaatan Tumbuhan Dalam Al-Quran | 8 |
| 2.2 Mikroalga..... | 12 |
| 2.3 Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> | 13 |
| 2.4 Kultur Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam ekstrak tauge | 15 |
| 2.5 Manfaat dan Kandungan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> | 17 |
| 2.6 Steroid..... | 19 |
| 2.7 Ekstraksi senyawa aktif | 21 |
| 2.8 Hidrolisis dan partisi..... | 23 |
| 2.9 Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) | 25 |
| 2.10 Antioksidan..... | 29 |
| 2.11 Spektrofotometer UV-Vis..... | 34 |
| | |
| BAB III METODE PENELITIAN | 36 |
| 3.1 Pelaksanaan Penelitian | 36 |
| 3.2 Alat dan Bahan | 36 |
| 3.2.1 Alat..... | 36 |
| 3.2.2 Bahan | 36 |
| 3.3 Rancangan Penelitian | 37 |
| 3.4 Tahapan Penelitian | 37 |
| 3.5 Cara Kerja..... | 38 |
| 3.5.1 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> | 38 |
| 3.5.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) | 38 |
| 3.5.1.2 Kultivasi <i>Chlorella sp.</i> dalam Medium Ekstrak Tauge..... | 38 |
| 3.5.1.3 Pemanenan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> | 39 |

| | | |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.5.2 | Preparasi Sampel | 39 |
| 3.5.3 | Penentuan Kadar Air Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> | 39 |
| 3.5.4 | Ekstraksi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan Maserasi | 40 |
| 3.5.5 | Hidrolisis dan Ekstraksi Cair-Cair (Partisi) Ekstrak Pekat Metanol | 40 |
| 3.5.6 | Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Preparatif | 41 |
| 3.5.7 | Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH..... | 42 |
| 3.5.7.1 | Penentuan Panjang gelombang maksimum DPPH | 42 |
| 3.5.7.2 | Pengukuran Potensi Antioksidan pada sampel | 42 |
| 3.5.8 | Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis | 42 |
| 3.6 | Analisis Data | 43 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN | | 44 |
| 4.1 | Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> | 44 |
| 4.1.1 | Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) | 44 |
| 4.1.2 | Kultivasi <i>Chlorella sp.</i> dalam Medium Ekstrak Tauge | 45 |
| 4.1.3 | Pemanenan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> | 46 |
| 4.2 | Preparasi Sampel | 47 |
| 4.3 | Penentuan Kadar Air Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> | 47 |
| 4.4 | Ekstraksi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan Maserasi..... | 49 |
| 4.5 | Hidrolisis dan Ekstraksi Cair-Cair (Partisi) Ekstrak Pekat Metanol..... | 51 |
| 4.6 | Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Preparatif..... | 53 |
| 4.7 | Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH | 55 |
| 4.7.1 | Penentuan Panjang gelombang maksimum DPPH..... | 55 |
| 4.7.2 | Pengukuran Potensi Antioksidan pada sampel..... | 56 |
| 4.8 | Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis | 58 |
| 4.9 | Pemanfaatan Mikroalga dan Kandungan Senyawanya dalam Perspektif Islam | 59 |
| BAB V PENUTUP | | 63 |
| 5.1 | Kesimpulan..... | 63 |
| 5.2 | Saran | 63 |
| DAFTAR PUSTAKA | | 64 |
| LAMPIRAN..... | | 72 |

DAFTAR TABEL

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabel 2.1 Konstanta Dielektrikum dan Tingkat Kelarutan Beberapa Pelarut..... | 23 |
| Tabel 4.1 Hasil Pengukuran Kadar Air Sampel Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> | 48 |
| Tabel 4.2 Hasil KLTP senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> Pada Eluen n-Heksana : Etil Asetat..... | 54 |



DAFTAR GAMBAR

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gambar 2.1 <i>Chlorella sp.</i> | 14 |
| Gambar 2.2 Kurva Pertumbuhan <i>Chlorella sp.</i> pada media MET | 15 |
| Gambar 2.3 Struktur dasar 1,2-siklopentenoperhidrofenantren | 20 |
| Gambar 2.4 Kerangka dasar karbon steroid dan sistem penomoran | 20 |
| Gambar 2.5 DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) | 31 |
| Gambar 2.6 Reaksi perendaman radikal DPPH oleh antioksidan (RH) | 31 |
| Gambar 4.1 Perubahan Warna Kultur Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> | 46 |
| Gambar 4.2 Dugaan Reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida | 51 |
| Gambar 4.3 Reaksi penetralan dengan natrium bikarbonat | 52 |
| Gambar 4.4 Hasil Isolasi Senyawa dengan KLTP | 54 |
| Gambar 4.5 Hasil Spektra UV-Vis larutan DPPH 0,2 mM | 56 |
| Gambar 4.6 Grafik Nilai EC ₅₀ Isolat | 57 |
| Gambar 4.7 Spektra UV-Vis Isolat Steroid | 58 |
| Gambar 4.8 Dugaan Senyawa Steroid dalam Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> Fraksi Etil Asetat | 59 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|---------------------------------------------------------------|----|
| Lampiran 1 Diagram Alir Penelitian..... | 72 |
| Lampiran 2 Skema Kerja | 73 |
| Lampiran 3 Perhitungan dan Pembuatan Reagen dan Larutan | 78 |
| Lampiran 4 Pengukuran Kadar Air | 82 |
| Lampiran 5 Perhitungan Randemen..... | 84 |
| Lampiran 6 Perhitungan Nilai Rf..... | 86 |
| Lampiran 7 Dokumentasi Penelitian..... | 88 |
| Lampiran 8 Data Antioksidan | 92 |



ABSTRAK

Dinasti, A. R. 2016. **Isolasi dengan KLTP dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.***

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

Kata Kunci: *Chlorella sp.*, Steroid, Hidrolisis, Kromatografi Lapis Tipis (KLT), uji Aktivitas Antioksidan.

Mikroalga *Chlorella sp.* merupakan tumbuhan ganggang hijau yang memiliki banyak manfaat. Salah satu senyawa yang terkandung didalamnya yaitu senyawa steroid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp* hasil pemisahan dengan KLTP dan identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis.

Mikroalga *chlorella sp.* diperoleh dari hasil kultivasi menggunakan Media Ekstrak Tauge (MET). Biomassa kering mikroalga yang dihasilkan kemudian di maserasi dengan pelarut metanol. Ekstrak kasar hasil maserasi di hidrolisis dengan katalis HCl dan dipartisi dengan etil asetat. Hasil partisi yang diperoleh di pisahkan dengan menggunakan KLT Preparatif dengan pelarut n-heksana dan etil asetat perbandingan 4 : 1 . isolat steroid yang diperoleh di uji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH dan diidentifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis.

Hasil penelitian diperoleh biomassa kering mikroalga sebesar 30 gram. Hasil pengukuran kadar air diperoleh sebesar 10,15 %. Randemen hasil maserasi diperoleh sebesar 21,8926 %. Hasil randemen hidrolisat yang diperoleh yaitu sebesar 80,95 %. Hasil berat steroid hasil pemisahan dengan KLTP adalah 2 mg. Dan hasil uji aktivitas antioksidan senyawa steroid diperoleh nilai EC_{50} sebesar 77,78 ppm. Hasil identifikasi senyawa steroid diperoleh panjang gelombang maksimum sebesar 204 nm.

ABSTRACT

Dinasti, A. R. 2016 **Isolation by TLC Preparatif and Antioxidant Activity Test of Steroids Compounds in Microalgae *Chlorella sp.* Ethyl Acetate Fraction**

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

Keywords: *Chlorella sp.*, Steroids, Hydrolysis, Thin Layer Chromatography (TLC), Antioxidant Activity Test.

Microalgae *Chlorella sp.* green algae is a plant which has many benefits. One of the chemical compounds in microalgae is steroid compounds. The purpose of this research is to determine the antioxidant activity of steroid compounds ethyl acetate fraction of microalgae *Chlorella sp.* results with KLTP separation and identification with UV-Vis spectrophotometer.

Microalgae *Chlorella sp.* obtained from cultivation using Sprouts Extract Media (MET). Dry biomass of microalgae produced later in the maceration using methanol. The crude extract of maceration results in hydrolysis catalyst HCl and partitioned with ethyl acetate. The results obtained in separate partitions using Preparative TLC with solvent n-hexane and ethyl acetate ratio of 4: 1. steroid derived isolates tested antioxidant activity with DPPH and identified with UV-Vis spectrophotometer.

The results of this research show that the dry biomass of microalgae is 30 grams. Results of measuring the water content is 10.15%. Randemen maceration results obtained by 21.8926%. Results randemen hydrolyzate obtained is equal to 80.95%. The results of the separation of the heavy steroids is 2 mg KLTP. And test results obtained antioxidant activity of steroid compounds EC50 values of 77.78 ppm. The results of the identification of steroid compounds obtained maximum wavelength of 204 nm.

مستخلص البحث

ديناستي ، أ. ر. ٢٠١٦. العزل مع اللوني الرقيقة الطبقة الإعدادي (KLTP) و اختبار النشاط المضاد للأوكسدة المركبات الستيريود الجزء الإيثيل الطحالب الدقيقة *Chlorella sp* . المشرف الأولى: أغنائم فشي، الماجستير، ومشرف الثاني: احمد نسخ الدين، الماجستير. مستشار: أحمد ، حنفى، الماجستير

كلمات الرئيسية: *Chlorella sp* ، الستيريود ، التحلل، اللوني رقيقة الطبقة (KLT) ، واختبار النشاط المضاد للأوكسدة.

الطحالب الدقيقة *Chlorella sp* هو الطحالب هو النبات الخضراء الذي له فوائد عديدة. واحدة من المركبات الواردة فيه هي مركبات الستيريود. وتهدف هذه الدراسة إلى تحديد نشاط مضادات الأوكسدة من مركبات الستيريود الجزء الإيثيل من الطحالب الدقيقة *Chlorella sp* الناتج فصل مع اللوني الرقيقة الطبقة الإعدادي والتماهي مع المطياف الضوئي الاشعة فوق البنفسجية المرئية

حصلت الطحالب *Chlorella sp* من زراعة باستخدام طريقة استخراج براعم الفول (MET) الكتلة الحيوية الجافة من الطحالب الدقيقة تنتج في وقت لاحق في النقع باستخدام الميثانول. استخراج النفط الخام من النتائج النقع في الهيدروكلوريك مع التحفيز تفاعل الانسان والحاسوب وتقسيم مع خلاص الإيثيل. النتائج التقسيم التي تم الحصول عليها في أقسام منفصلة باستخدام اللوني رقيقة الطبقة الاعدادى مع المذيبات ن الهكسان وإيثيل نسبة خلاص من ١:٤. الستيريود العزلات الذي حصلت في اختبار النشاط المضاد للأوكسدة مع (-1,1 DPPH (DIPHENYL-2- PICRILHYDRAZIL وحددت مع المطياف الضوئي الاشعة فوق البنفسجية المرئية

النتائج التي حصلت عليها الكتلة الحيوية الجافة من الطحالب الدقيقة يعني ٣٠ غرام. النتائج التي تم الحصول عليها عن طريق قياس محتوى الماء يعني ١٠.١٥%. النتائج النقع المحصول التي حصلت عليها ٢١.٨٩٢٦%. النتائج المحصول هيدروكسالاتي الحصول تساوي ٨٠.٩٥%. نتائج الفصل مع اللوني الرقيقة الطبقة الإعدادي يعني هي ٢ ميل غرام. ونتائج الاختبار التي تم الحصول عليها النشاط المضاد للأوكسدة مركبات الستيريود حصلت القيم EC_{50} ٧٧.٧٨ من جزء من المليون. حصلت على نتائج تحديد مركبات الستيريود تحصل طول الموج اقصى يعني ٢٠٤ نانومتر.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki keanekaragaman jenis tumbuhan yang dapat dimanfaatkan untuk kepentingan umat. Firman Allah SWT. Juga telah menjelaskan bahwa berbagai macam tumbuhan bermanfaat telah diciptakan yang tertulis pada Surat Luqman ayat 10:

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۗ وَأَلْقَىٰ فِي الْأَرْضِ رَوْسِيًّا أَن تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ
فِيهَا مِن كُلِّ دَابَّةٍ ۗ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿١٠﴾

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

Ayat tersebut menunjukkan adanya kekuasaan Allah atas penciptaan langit yang tujuh lapis dengan tanpa tiang. Allah juga menjadikan gunung-gunung yang besar diatas punggung bumi supaya bumi tidak oleng atau guncang. Dan Allah juga menjadikan berbagai macam jenis binatang dimuka bumi yang tidak dapat dihitung jumlahnya. Selain itu Allah menurunkan hujan dari awan, maka menjadilah dengan hujan itu sebagai penyebab tumbuhnya berbagai macam tanaman yang mempunyai warna yang indah dan manfaat yang banyak (Shiddieqy, 2000). Salah satu tumbuhan yang memiliki manfaat yaitu mikroalga.

Mikroalga merupakan organisme autotrof yang tumbuh melalui proses fotosintesis. Struktur uniseluler mikroalga memungkinkan mengubah energi matahari menjadi energi kimia dengan mudah. Mikroalga dapat tumbuh dimana saja, baik di ekosistem perairan maupun di ekosistem darat (Handayani dan Dessy, 2012). Menurut (Borowitzka, 1988) dalam (Khamidah, dkk., 2013) mikroalga memiliki keunggulan dibandingkan dengan makroalga dan tumbuhan tingkat tinggi lainnya. Keunggulan dari mikroalga yaitu hidupnya tidak tergantung musim, tidak memerlukan tempat yang luas, dan tidak memerlukan waktu yang lama untuk pemanenannya.

Mikroalga memiliki beberapa jenis, salah satu jenis mikroalga dari golongan Chlorophyta adalah *Chlorella sp.* *Chlorella sp.* merupakan suatu tumbuhan ganggang hijau bersel tunggal, dapat hidup menyendiri ataupun berkelompok, tidak memiliki batang, akar dan daun seperti tumbuhan pada umumnya (Sidabutar, 1999). *Chlorella sp.* dapat tumbuh di air tawar, air payau, dan air asin. Mikroalga jenis *Chlorella sp.* ini memiliki keunggulan dapat berkembangbiak dengan cepat dan mudah dibudidayakan. Kawaroe (2008) memaparkan bahwa keseluruhan organ dari *Chlorella sp.* dapat dimanfaatkan dimana organ tersebut mengandung senyawa pemacu pertumbuhan, nutrisi seperti protein, karbohidrat, asam lemak tak jenuh, vitamin, enzim, klorofil a, klorofil b, serta karotenoid.

Mikroalga memiliki peran positif terhadap lingkungan terutama penanganan masalah efek gas rumah kaca dan polusi air dari industri. Mikroalga dapat menyerap karbondioksida untuk proses fotosintetisnya dan dapat memproduksi nutrisi dengan biaya produksi rendah. Beberapa jenis mikroalga juga dapat menyerap nitrogen dan mengabsorpsi logam berat serta fosfor (Handayani dan

Dessy, 2012). Menurut Steenblock (1996) *Chlorella sp.* memiliki potensi sebagai pakan alami, pakan ternak, suplemen, penghasil komponen bioaktif bahan farmasi dan kedokteran. *Chlorella sp.* dalam bidang pangan dapat dikembangkan untuk pangan sehat, sebagai sumber protein, vitamin, dan mineral, sedangkan dalam bidang kedokteran dapat bermanfaat untuk mencegah penyakit kanker, menurunkan tekanan darah tinggi, menurunkan kadar kolesterol darah dan sebagainya. Selain itu *Chlorella sp.* memiliki kemampuan sebagai bioabsorpsi yang kuat terhadap logam berat, maka *Chlorella sp.* digunakan sebagai bioremediator dalam menetralkan limbah industri maupun perairan yang tercemar. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Bariyyah, dkk., (2013) tentang uji aktivitas antioksidan pada ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat dari mikroalga *Chlorella sp.* memiliki potensi antioksidan yang kuat dengan nilai EC_{50} berturut-turut yaitu 18,610 ppm dan 27,320 ppm.

Penggunaan senyawa antioksidan berkembang dengan pesat baik untuk makanan maupun pengobatan. Penggunaan sebagai obat makin berkembang seiring dengan makin bertambahnya pengetahuan tentang aktifitas radikal bebas terhadap beberapa penyakit degeneratif seperti penyakit jantung dan kanker. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Winarsi, 2007). Antioksidan yang sangat umum digunakan pada saat ini merupakan antioksidan sintetik seperti *Butylated hydroxyanisole* (BHA), *Butylated hydroxytoluene* (BHT), *Propylgallate* (PG), dan *tert-butylhydroquinone* (TBHQ) (Sherwin, 1990). Penggunaan antioksidan sintetik seperti *Butylated hydroxytoluene* (BHT) tersebut menurut Takashi dan Takayuni, (1997) dapat meracuni binatang percobaan dan

bersifat karsinogenik, oleh sebab itu pemanfaatan dan pengembangan antioksidan alami sangat penting dilakukan untuk mendapatkan antioksidan yang lebih aman digunakan.

Aktivitas antioksidan berkaitan dengan senyawa aktif yang terkandung didalamnya. Berdasarkan penelitian sebelumnya yang telah dilakukan, bahwa mikroalga *Chlorella sp.* mengandung senyawa metabolit sekunder dimana salah satu senyawa metabolit sekunder tersebut adalah steroid. Menurut Imamah, dkk., (2015), golongan senyawa aktif fraksi etil asetat biomassa *Chlorella sp.* adalah steroid. Steroid merupakan salah satu senyawa yang penting dalam bidang medis, selain itu steroid memiliki bioaktivitas yang penting misalnya dalam pembentukan struktur membran, pembentukan hormon dan vitamin D, sebagai penolak dan penarik serangga dan sebagai anti mikroba (Susilawati, dkk., 2014). Selain itu berdasarkan penelitian dari Krisna, (2014), senyawa steroid daun gayam memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Senyawa steroid merupakan senyawa yang cenderung bersifat non-polar atau semi polar, namun dapat terekstrak ke dalam pelarut metanol yang bersifat polar. Hal ini diduga karena senyawa steroid masih terikat pada senyawa gulanya yang bersifat polar sehingga ikut terekstrak dalam pelarut metanol yang bersifat polar. Beberapa senyawa steroid mengandung gugus – OH, yang sering disebut dengan sterol, sehingga sifatnya cenderung lebih polar (Sriwahyuni, 2010).

Pemisahan senyawa steroid dari ekstrak kasar metanol, diawali dengan hidrolisis menggunakan asam dan difraksinasi dengan etil asetat. Senyawa steroid dari fraksi etil asetat kemudian dipisahkan dengan menggunakan metode KLTP. Penggunaan metode ini berfungsi untuk memisahkan senyawa steroid pada

ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* dengan senyawa-senyawa lain yang terdapat di dalamnya. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Imamah, dkk., (2015), dimana diperoleh eluen terbaik yang dapat digunakan untuk pemisahan menggunakan KLTP yaitu menggunakan eluen n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan (4:1) dengan jumlah spot yang diperoleh yaitu 12 spot. Noda yang diduga senyawa steroid memiliki warna hijau kebiruan dengan panjang Rf sebesar 0,962 dan 0,987.

Hasil pemisahan KLTP senyawa steroid pada penelitian ini kemudian diuji antioksidan menggunakan metode DPPH secara spektrofotometri sinar tampak dengan berbagai variasi konsentrasi ekstrak. Metode DPPH digunakan karena metode ini mudah dilakukan, biaya relatif murah, cepat dan memerlukan sedikit sampel untuk menetapkan aktivitas antioksidan dan hasil yang diperoleh dapat dipercaya (Koleva, *et al.*, 2001). Penelitian ini diharapkan dapat memberikan hasil aktivitas antioksidan yang lebih baik dengan mengambil senyawa metabolit sekunder yang terdapat didalam mikroalga *Chlorella sp.*. Selain itu, isolat steroid hasil KLTP akan diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui panjang gelombang maksimumnya. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Susilawati, dkk., (2014), dimana pengujian senyawa steroid dari daun rimbang (*Solanum Torvum*) yang diekstrak dengan metanol dan difraksinasi menggunakan n-heksana dan etil asetat menunjukkan spektrum UV dengan serapan maksimum pada panjang gelombang 197, 271 dan 281 nm. Selain itu berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Aprelia, (2013), hasil pengukuran spektrum UV-Vis dengan munculnya puncak pada panjang gelombang maksimum 203 nm.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas antioksidan terhadap DPPH senyawa steroid hasil isolasi dengan KLTP dari fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.*?
2. Bagaimana hasil identifikasi senyawa steroid hasil isolasi dengan KLTP dari fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan spektrofotometer UV-Vis ?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui aktivitas antioksidan terhadap DPPH senyawa steroid hasil isolasi dengan KLTP dari fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.*
2. Untuk mengetahui hasil Identifikasi Senyawa steroid hasil isolasi dengan KLTP dari fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

1.4 Batasan Masalah

1. Sampel berupa isolat *Chlorella sp.* Dari laboratorium Fisiologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang dimana bagian yang digunakan berupa biomassa *Chlorella sp.*
2. Mikroalga *Chlorella sp.* Di kultivasi pada media ekstrak tauge (MET). Tauge yang digunakan adalah tauge kacang hijau. Kultivasi dikondisikan pada suhu ruang (25 – 30 °C) dan fotoperiodisitas cahaya 14 jam terang 10 jam gelap dengan lampu 36 Watt.

3. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode ekstraksi maserasi dengan pelarut metanol *p.a* dilanjutkan hidrolisis asam (HCl 2N) dan partisi dengan pelarut etil asetat.
4. Pemisahan senyawa steroid menggunakan KLTP (Kromatografi Lapis Tipis Preparatif) dengan eluen terbaik.
5. Uji aktivitas antioksidan dengan DPPH menggunakan variasi konsentrasi
6. Identifikasi senyawa steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis

1.5 Manfaat

Diharapkan penelitian ini dapat memberikan informasi bahwa mikroalga *Chlorella sp.* memiliki potensi yang sangat bagus sebagai antioksidan serta mengetahui senyawa steroid yang terkandung di dalam mikroalga *Chlorella sp.*. Dengan adanya penelitian ini dapat membantu dalam mengembangkan penelitian selanjutnya dalam memanfaatkan mikroalga *Chlorella sp.* pada berbagai aplikasi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pemanfaatan Tumbuhan Dalam Al-Quran

Allah di dalam firman-Nya telah menjelaskan beberapa ayat tentang tumbuhan, dimana salah satu ayat alquran tersebut terdapat dalam surat al An'am ayat 99 :

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرَجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنَ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ﴿٩٩﴾

“Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan Maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman.”

Menurut al-Qarni (2007), hanya Allah SWT. semata yang telah menurunkan hujan dari awan, dan dari hujan tersebut ditumbuhkan setiap tumbuhan hijau dari air hujan itu dan mengeluarkan setiap yang tertanam. Kemudian mengeluarkan biji yang bersusun dari tanaman itu, sebagiannya diatas sebagian yang lain. Setiap biji ditata sedemikian rupa dengan keindahan yang menakjubkan dan ciptaan yang mantap. Semua itu menunjukkan kebijaksanaan Allah yang telah merencangnya.

Ash-Shiddieqy, (2000) menjelaskan bahwa Dialah Allah yang telah menurunkan air dari awan, lalu dengan air hujan itulah dijadikan segala benda yang hidup. Allah mengeluarkan dengan air itu segala macam tumbuhan, padahal tanah tempat tumbuhnya serta air menyiramnya satu akan tetapi bentuk dan rasa buah-buahan atau tanaman berbeda-beda.

Dialah (Allah) yang menurunkan hujan, dan Dia pula yang mengeluarkan berbagai macam tumbuh-tumbuhan. Dia pula yang mewarnainya hijau dan lain-lainnya, lalu dia pula yang menyusun butir-butir buahnya yang tersusun rapi. Juga Dia pula yang mengeluarkan mayang pohon kurma sehingga tersusun buahnya yang mudah dipetik, Dia pula yang menumbuhkan semua tumbuh-tumbuhan dalam kebun anggur, zaitun, dan delima dan lain-lainnya baik yang serupa bentuk, warna atau cita rasanya atau yang jauh berbeda antara yang satu dengan yang lain. Didalam ayat Allah menyebutkan bahwa semua itu ditumbuhkan diatas tanah dan disiram dengan satu macam air, tetapi kalau dengan kebesaran Allah yang menumbuhkan bermacam warna, bentuk dan rasa (Agencie, 1988).

Menurut Ath-Thabari, (2008), Dialah Ilah yang telah menurunkan air dari langit, lalu dari air itu kami tumbuhkan yang hijau segar. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak dimana maksudnya adalah yang ada dalam tangkai seperti tangkai gandum, padi dan lainnya, yang memiliki butir saling menumpuk dimana terdapat dalam tangkai. Demikian pula kami keluarkan kebun-kebun anggur, dan zaitun dan delima yang serupa dan tidak serupa, bisa pula serupa dalam bentuk, namun berbeda dalam rasa.

Allah ta'ala menumbuhkan berbagai macam tanaman dan tumbuh-tumbuhan. Maka kami keluarkan darinya tanaman-tanaman yang menghijau seperti gandum,

padi-padian kemudian dari tanaman tersebut keluarlah butiran-butiran biji yang sangat banyak. Dengan izin Allah ta'ala keluarlah darinya pohon kurma yaitu tangkai-tangkai yang berjuntai dan dekat, sehingga tidak memerlukan tenaga yang banyak bagi orang yang ingin memetik dan mendapatkannya. Dan ditumbuhkan darinya kebun-kebun kurma, zaitun, dan Delima, ada yang serupa warnanya tetapi tidak sama rasanya, maka setiap buah yang masak ada yang serupa dan ada yang tidak. Karena orang-orang yang beriman itu hidup, bekerja, berfikir dan memahami, sedangkan orang-orang kafir, mereka adalah mati hatinya, tertutup oleh noda-noda syirik dan maksiat, sehingga mereka tidak berfikir dan memahami, maka bagaimanakah mereka akan mendapatkan bukti dari ayat-ayat itu yang dapat menunjukkan mereka kepada perbuatan mengesakan Allah ta'ala (Al-Jazairi, 2007).

Allah menyebut semua itu ditumbuhkan di atas tanah dan disiram dengan satu macam air, tetapi dengan kebesaran kekuasaan Allah, Allah menumbuhkan bermacam-macam warna, bentuk dan rasa, dan nyata bahwa semua ciptaan Allah itu tidak dapat ditiru oleh makhluk siapapun, baik manusia, jin, atau malaikat-Nya. Karena itu Allah menutup ayat ini dengan kalimat “sesungguhnya dalam semua kejadian itu sebagai bukti yang nyata atas kebesaran kekuasaan Allah bagi kaum yang beriman dan percaya terhadap kebesaran kekuasaan serta bertuhan kepada Allah azza wajalla (Agencie, 1988).

Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit yang maksudnya dengan kadar tertentu, sebagai berkah dan rizki bagi hamba-hamba-Nya, untuk menghidupi dan menyirami berbagai makhluk, serta sebagai rahmad Allah bagi seluruh makhluk-Nya. Ditumbuhkannya dari air itu tanaman-tanaman dan

pepohonan yang hijau, dan setelah itu kami menciptakan didalamnya biji-bijian dan buah-buahan yang menghijau itu bersusun antara yang satu dan yang lainnya, seperti bulir seperti pada padi dan yang lainnya. Dan tandan kurma yang mudah dijangkau oleh orang yang memetikinya (pohon kurma yang pendek yang tandannya menyentuh tanah. Kami juga mengeluarkan darinya kebun-kebun anggur. Dan dikeluarkan pula zaitun dan delima yang memiliki kesamaan dalam daun dan bentuk, dimana masing-masing saling berdekatan tetapi memiliki perbedaan pada buahnya baik bentuk, rasa, maupun sifatnya. Pikirkanlah kekuasaan Allah, dari tidak ada menjadi ada, setelah sebelumnya berupa kayu yang menjadi anggur dan kurma dan lain sebagainya dari berbagai ciptaan Allah berupa berbagai warna, bentuk, rasa dan aroma (Syaikh, 2006)

Beberapa ahli gizi mengemukakan bahwa terdapat sedikit buah-buahan yang dapat menandingi keutamaan jenis buah-buahan yang terkandung pada ayat diatas. Mereka menyatakan bahwa minyak zaitun dapat menghasilkan jumlah kalori yang sangat besar dan sangat banyak dalam memberikan energi. Sedangkan buah kurma mengandung banyak kalsium yang merupakan faktor utama dalam memperkuat tulang. Selain itu, buah kurma juga mengandung fosforus yang merupakan sumber dan unsur utama dalam pembentukan otak dan mencegah kelemahan syaraf dan gejala keletihan. Selain kedua buah tersebut, terdapat buah anggur yang sangat efektif sebagai obat alamiah untuk menetralsir racun yang terdapat dalam tubuh serta sebagai vitamin untuk memperkuat syaraf dan tubuh (Imani, A., 2008)

2.2 Mikroalga

Mikroalga merupakan suatu organisme jasad renik dengan tingkat organisme sel termasuk kedalam tumbuhan tingkat rendah dan dikelompokkan kedalam filum thallophyta. Kelompok filum thallophyta tidak memiliki akar, batang, dan daun sejati, tetapi memiliki zat pigmen klorofil yang dapat melakukan fotosintesis (Kabinawa, 1995). Mikroalga memiliki keunggulan dibandingkan dengan makroalga dan tumbuhan tingkat tinggi lain yaitu hidupnya tidak tergantung musim, tidak memerlukan tempat yang luas dan tidak memerlukan waktu yang lama untuk memanennya (Borowitzka, 1988).

Mikroalga dapat menghasilkan beberapa vitamin yaitu vitamin A, B1, B2, B6, B12, C, E, nikotinamida, biotin, asam folat, dan asam pantotenat. Selain itu mikroalga juga dapat menghasilkan pigmen berupa klorofil (0,5 sampai 1 % dari berat kering), karotenoid (0,1 sampai 14 % dari berat kering), dan fikobiliprotein (Becker, 1994). Mikroalga termasuk kelompok dari tumbuhan renik yang masuk dalam kelas alga, yang memiliki diameter antara 3 – 30 μm , baik sel tunggal ataupun dalam bentuk koloni yang dapat hidup di seluruh perairan tawar maupun laut, yang lazim disebut dengan fitoplankton (Romimohtarto, 2004). Menurut Damianus, (2011) Mikroalga memiliki morfologi sel yang bervariasi (uniseluler atau multiseluler).

Mikroalga termasuk produsen alami dari ekosistem perairan yang dapat menghasilkan energi. Kultur mikroalga pada skala laboratorium memerlukan kondisi lingkungan yang harus dikendalikan. Pada skala laboratorium, kultur mikroalga ditumbuhkan dengan memerlukan kondisi lingkungan yang terkendali. Dimana kebutuhan unsur hara makro dan mikro serta kondisi lingkungan sangat

berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroalga. Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga antara lain yaitu cahaya, suhu, pH air, dan salinitas (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

Tumbuhnya mikroalga pada kultur dapat ditandai dengan bertambah besarnya ukuran sel dari mikroalga tersebut yang dapat diamati dari jumlah selnya (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Sedangkan untuk kultivasi dari mikroalga dapat dilakukan dengan cepat dan singkat dengan waktu pemanenan antara 7 – 10 hari. Pemanenan mikroalga lebih banyak 30 kali dibandingkan dengan tumbuhan darat (Godos *et al.*, 2010).

2.3 Mikroalga *Chlorella sp.*

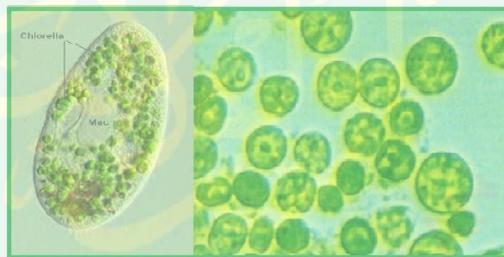
Chlorella sp. merupakan tumbuhan ganggang hijau bersel tunggal yang dapat tumbuh di air tawar, air payau, dan air asin. Berdasarkan cara pembudidayaannya, *Chlorella sp.* memiliki beberapa keunggulan yaitu dapat berkembang biak dengan cepat, mudah dalam membudidayakannya karena hidupnya tidak bergantung terhadap musim, tidak memerlukan tempat yang luas dan tidak memerlukan waktu yang lama untuk memanennya (Borowitzka, 1988).

Penamaan *Chlorella sp.* diberikan karena tumbuhan ganggang ini mengandung klorofil yang tinggi dari tumbuhan-tumbuhan yang ada di dunia ini, yang merupakan dasar permulaan kebanyakan rantai makanan akuatik karena kegiatan fotosintetiknya, oleh sebab itu dinamakan produsen primer bahan organik (Chalid, dkk., 2012).

Bold dan Wynne (1978) mengklasifikasikan *Chlorella sp.* kedalam :

| | |
|---------|------------------------|
| Divisi | : Chlorophyta |
| Kelas | : Chlorophyceae |
| Ordo | : Chlorellales |
| Famili | : Chlorellaceae |
| Genus | : Chlorella |
| Species | : <i>Chlorella sp.</i> |

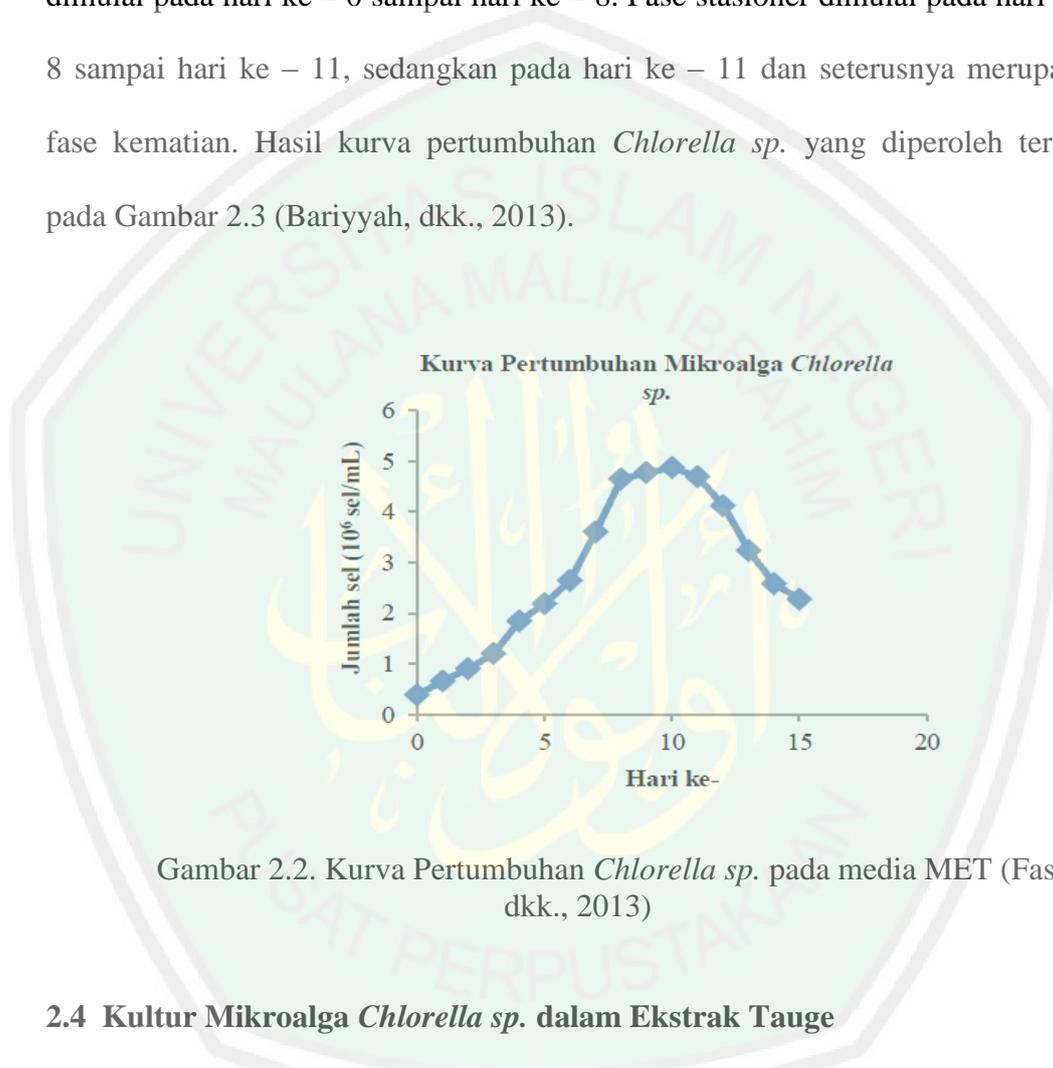
Sel-sel *Chlorella sp.* berbentuk bulat seperti bola atau bulat telur, hidup bebas (sessil) atau berkelompok, tidak motil, berukuran mikroskopis antara 2 – 3 μm , sel *Chlorella sp.* terbesar berdiameter 10 – 12 μm . *Chlorella sp.* bersifat kosmopolit, ia tersebar hidup di air tawar, payau maupun air laut. Merupakan organisme autotrof fotosintetik yang mempunyai kemampuan untuk melakukan fotosintesis dengan sumber energi sinar matahari (Wahyudi, 1999).



Gambar 2.1 *Chlorella sp.* (Andrian, 2013)

Sel *Chlorella sp.* (Gambar 2.2) secara morfologis hanya dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop dengan struktur sel yang sederhana. *Chlorella sp.* mempunyai kloroplas dan dinding sel yang tipis (Bold dan Wynne, 1985). Dinding sel *Chlorella sp.* terdiri dari selulosa dan pektin, tiap-tiap selnya terdapat satu buah inti dan satu kloroplas. Sel-selnya berbentuk bulat atau lonjong mempunyai satu kloroplas berbentuk mangkuk atau pita melengkung dengan atau tanpa pirenoid (Kumar dan Singh, 1979).

Pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* dalam MET tidak mengalami fase adaptasi sehingga pada hari ke - 1 sudah memasuki fase eksponensial. Kurva pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam MET menunjukkan bahwa fase eksponensial dimulai pada hari ke - 0 sampai hari ke - 8. Fase stasioner dimulai pada hari ke - 8 sampai hari ke - 11, sedangkan pada hari ke - 11 dan seterusnya merupakan fase kematian. Hasil kurva pertumbuhan *Chlorella sp.* yang diperoleh terlihat pada Gambar 2.3 (Bariyyah, dkk., 2013).



Gambar 2.2. Kurva Pertumbuhan *Chlorella sp.* pada media MET (Fasya, dkk., 2013)

2.4 Kultur Mikroalga *Chlorella sp.* dalam Ekstrak Tauge

Pertumbuhan Biomassa Mikroalga dapat diperbanyak dengan menggunakan teknik kultur. Kultur mikroalga memerlukan berbagai faktor pendukung hidup untuk mendapatkan biomassa yang banyak. Keberhasilan teknik kultur bergantung pada kesesuaian antara jenis mikroalga yang dibudidayakan dan beberapa faktor lingkungan (Prihantini, 2007).

Pertumbuhan alga yang baik terjadi ketika kondisi faktor lingkungan dapat memenuhi kebutuhan alga tersebut. Faktor lingkungan tersebut terdiri dari suhu dan cahaya, serta faktor kimiawi yaitu semua bahan-bahan yang diperlukan untuk pertumbuhan alga dan perkembangbiakannya (Sidabutar, 1999).

Cahaya mempunyai peranan yang sangat penting bagi pertumbuhan mikroalga, yaitu sebagai sumber energi untuk melakukan proses fotosintesis. Intensitas cahaya yang diperlukan untuk fotosintesis alga berkisar antara 2 sampai 3 kilolux. Cahaya yang diperlukan untuk pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam skala laboratorium diperoleh dari lampu TL atau tungsten (Fogg, 1975).

Kisaran temperatur optimal bagi pertumbuhan *Chlorella* adalah antara 25 – 30 °C (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Menurut Prabowo (2009) untuk kultur *Chlorella* diperlukan temperatur antara 25 – 35 °C. Temperatur mempengaruhi proses-proses fisika, kimia, dan biologi yang berlangsung dalam sel mikroalga. Peningkatan temperatur hingga batas tertentu akan merangsang aktifitas molekul meningkatnya laju difusi dan juga laju fotosintesis (Sachlan, 1982).

Teknik kultur *Chlorella sp.* dilakukan pada Medium Ekstrak Tauge (MET). Menurut Richmond (1986), Medium Ekstrak Tauge (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.

Media perlakuan MET mengandung nutrient anorganik seperti K, P, Ca, Mg, Na, Fe, Zn, Mn, dan Cu. Nutrient anorganik yang tergolong makro nutrien yaitu K, P, Ca, Mg, Na, Fe, Zn, Mn, dan Na dibutuhkan oleh sel mikroba sebagai komponen penyusun sel. Mikro nutrien seperti Fe, Zn, Mn, dan Cu dibutuhkan

oleh sel baik sebagai kofaktor enzim maupun komponen pembentukan klorofil. Mn, Zn, Cu, Mo, B, Ti, Cr, dan Co yang terdapat dalam media kultur akan mengefektifkan fotosintesis pada mikroalga. Fotosintesis yang berlangsung efektif akan mempengaruhi produk yang dihasilkan (Wulandari *et al.*, 2010).

MET juga merupakan salah satu media pertumbuhan alami yang digunakan untuk media pertumbuhan mikroalga (Prihantini, dkk., 2005). Proses pengkulturan dilakukan selama 10 hari dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap. Adanya cahaya diperlukan sebagai sumber energi selama proses fotosintesis berlangsung. Penyinaran dilakukan dengan bantuan cahaya lampu TL selama kultur sebagai pengganti cahaya matahari (Bariyyah, dkk., 2013).

2.5 Manfaat dan Kandungan Mikroalga *Chlorella sp.*

Mikroalga memiliki peran positif terhadap lingkungan terutama penanganan masalah efek gas rumah kaca dan polusi air dari industri. Mikroalga dapat menyerap karbon dioksida untuk proses fotosintetisnya dan memproduksi nutrisi dengan biaya produksi rendah. Beberapa jenis mikroalga juga dapat menyerap nitrogen dan mengabsorpsi logam berat serta fosfor (Handayani dkk., 2012). Menurut Wenno (2010) *Chlorella sp.* merupakan salah satu spesies mikroalga yang memiliki banyak manfaat, telah diproduksi secara komersial dan digunakan sebagai makanan kesehatan (*health food*) maupun *food additive* untuk meningkatkan kandungan gizi suatu bahan makanan. Hal ini disebabkan karena *Chlorella sp.* memiliki kandungan gizi yang lengkap, diantaranya protein, lemak, karbohidrat, vitamin, mineral, serat, klorofil, β -carotene dan *Chlorella Growth Factor* (CGF). Sargowo dan Ratnawati (2005) menyatakan bahwa *Chlorella sp.*

mengandung: 60,5 % protein, 11 % lemak, 20,1 % karbohidrat, 4,6 % mineral dan serat 0,2 %.

Menurut Steenblock (1996) *Chlorella sp.* memiliki potensi sebagai pakan alami, pakan ternak, suplemen, penghasil komponen bioaktif bahan farmasi dan kedokteran. *Chlorella sp.* dalam bidang pangan dapat dikembangkan untuk pangan sehat sebagai sumber protein, vitamin, dan mineral, sedangkan dalam bidang kedokteran dapat bermanfaat untuk mencegah penyakit kanker, menurunkan tekanan darah tinggi, menurunkan kadar kolesterol darah dan sebagainya. Selain itu *Chlorella sp.* memiliki kemampuan sebagai bioabsorpsi yang kuat terhadap logam berat, maka *Chlorella sp.* digunakan sebagai bioremediator dalam menetralkan limbah industri maupun perairan yang tercemar.

Chlorella sp. mempunyai pigmen warna hijau dan kaya dengan warna biru yang disebut Phycocyanin merupakan protein kompleks. Phycocyanin merupakan pembentuk darah putih didalam tubuh manusia dan merupakan antibodi atau pembentuk imunitas dari serangan racun kimia dan radiasi. Warna hijau dari klorofil pada *Chlorella sp.* disebut darah hijau (*green blood*) mempunyai kandungan zat besi pembentuk hemoglobin yang berfungsi sebagai penambah makanan bagi penyandang anemia. Pada *Chlorella sp.* terdapat warna kuning oranye merupakan kandungan karoten terdiri dari xanthopill, myxoxanthopill, zeaxathin, cryptoxanthin, echinenone, fucoxanthin, violaxanthin dan astaxanthin. Total karoten yang terdapat pada *Chlorella sp.* per 10 gr yaitu 0,37 % (Pranayogi, 2003). Karoten mempunyai khasiat pada manusia sebagai antioksidan. *Chlorella sp.* mengandung polisakarida sebanyak 15 – 25 gr merupakan karbohidrat yang mudah diserap didalam darah. Pada *Chlorella,sp* kering terdapat enzim

Superoxide dismutase (SOD) sekitar 10.000 – 37.500 units per 10 gram yang merupakan anti radikal bebas untuk mencegah penuaan dini.

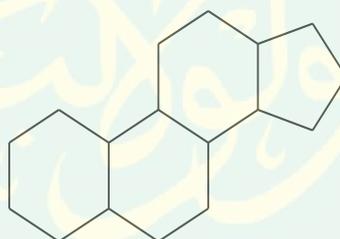
Uji aktivitas antioksidan ekstrak kasar *Chlorella sp.* serta uji fitokimia telah dilakukan sebelumnya oleh Bariyyah, dkk. (2013) yang memberikan hasil bahwa pada ekstrak kasar *Chlorella sp.* mengandung senyawa golongan steroid, tanin dan asam askorbat yang berperan sebagai antioksidan. Sedangkan Khamidah, dkk. (2013) juga telah meneliti tentang uji aktivitas antibakteri pada ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* terhadap *escherichia coli* dan *staphylococcus aureus* dan menunjukkan hasil bahwa didalam ekstrak kasar *Chlorella sp.* mengandung golongan senyawa steroid dan tanin yang bersifat sebagai antibakteri. Selain itu Amaliyah, dkk. (2013), melakukan penelitian tentang uji toksisitas, uji aktivitas antioksidan dan uji aktivitas antibakteri terhadap ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* dimana memberikan hasil bahwa mikroalga memiliki potensi sebagai antioksidan dan antibakteri serta memiliki hasil toksisitas yang baik.

2.6 Steroid

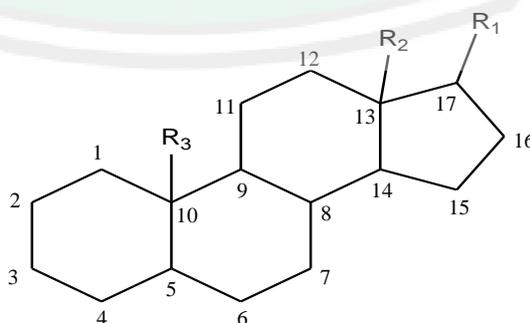
Steroid adalah suatu golongan senyawa triterpenoid yang mengandung inti siklopentana perhidrofenantren yaitu dari 3 cincin sikloheksana dan 1 cincin siklopentana (Harborne, 1987). Steroid tersusun dari isopren-isopren dari rantai panjang hidrokarbon yang menyebabkan sifatnya non-polar. Beberapa senyawaan steroid mengandung gugus –OH yang sering disebut dengan sterol, sehingga sifatnya yang cenderung lebih polar. Beberapa turunan steroid yang penting ialah steroid alkohol atau sterol. Senyawa steroid terdapat dalam setiap makhluk hidup. Steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan disebut fitosterol, sedangkan yang ditemukan dalam jaringan hewan disebut kolesterol (Robinson, 1995).

Steroid merupakan kelompok senyawa bahan alam yang memiliki struktur terdiri dari 17 atom karbon yang membentuk struktur dasar 1,2-siklopenteno perhidrofenantren (Kristanti, dkk., 2008).

Steroid terdiri atas beberapa kelompok senyawa yang pengelompokannya berdasarkan pada efek fisiologis yang dapat ditimbulkan. Dilihat dari segi strukturnya, perbedaan dapat dilihat dari jenis substituen R_1 , R_2 , dan R_3 yang terikat pada kerangka dasar sedangkan untuk membedakan antara senyawa satu dengan senyawa lainnya dari satu kelompok dapat ditentukan berdasarkan panjang rantai karbon substituen, gugus fungsi yang terdapat pada substituen, jumlah dan posisi gugus fungsi oksigen dan ikatan rangkap pada kerangka dasar dan konfigurasi pusat asimetri pada kerangka dasar (Kristanti, dkk., 2008).



Gambar 2.3 Struktur dasar 1,2-siklopentenoperhidrofenantren



Gambar 2.4 Kerangka dasar karbon steroid dan sistem penomoran

Struktur senyawa Steroid sangat beragam, akan tetapi sebagian besar senyawanya bersifat nonpolar, sehingga untuk mengisolasinya menggunakan senyawa yang bersifat non polar. Isolasi adalah proses pemisahan komponen-komponen kimia yang terdapat pada suatu bahan. Isolasi meliputi empat tahap penting yaitu maserasi, pemisahan, pemurnian dan identifikasi (Sulastry, 2010).

2.7 Ekstraksi senyawa aktif

Ekstraksi adalah proses penarikan komponen atau zat aktif suatu simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu. Proses ekstraksi bertujuan mendapatkan bagian-bagian tertentu dari bahan yang mengandung komponen-komponen aktif (Harbone, 1987). Prinsip ekstraksi adalah zat yang akan diekstrak hanya dapat larut dalam pelarut yang digunakan, sedangkan zat yang lainnya tidak akan larut, metode ekstraksi yang dipakai dalam penelitian adalah metode maserasi. Metode ini digunakan karena memiliki keunggulan yaitu proses yang mudah dan sederhana selain itu tidak memerlukan suhu yang tinggi yang dapat merusak senyawa-senyawa kimia yang terdapat pada mikroalga.

Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga senyawa metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan (Lenny, 2006). Proses ini dilakukan beberapa kali dan ekstrak kemudian disatukan lalu diuapkan dengan menggunakan penguap putar vakum (Markham, 1988). Maserasi

dilakukan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (suhu kamar). Dilakukan dengan cara merendam bahan simplisia yang telah dihaluskan dengan derajat kehalusan yang cocok ke dalam bejana tertutup dengan pelarut yang digunakan, kemudian disimpan di tempat yang terlindungi dari cahaya langsung selama 3 – 5 hari sampai sesekali diaduk (Voight, 1995).

Pelarut metanol untuk maserasi dipilih berdasarkan penelitian dari Bariyyah, dkk. (2013) dengan memberikan hasil nilai EC_{50} ekstrak metanol *Chlorella sp.* lebih kecil dibandingkan dengan pelarut etil asetat. Semakin rendah nilai EC_{50} maka semakin besar aktivitas antioksidannya sehingga pelarut metanol merupakan pelarut yang terbaik untuk mengekstrak senyawa aktif pada *Chlorella sp.*

Pelarut yang digunakan dapat mempengaruhi keberhasilan proses ekstraksi. Pelarut harus dapat melarutkan zat yang diinginkan, titik didihnya rendah, murah, tidak toksik, dan tidak mudah terbakar (Ketaren, 1986). Selain itu, keberhasilan ekstrak juga dapat dipengaruhi oleh banyaknya ekstraksi yang dilakukan. Ekstraksi dikatakan baik ketika ekstraksi dilakukan berulang – ulang dengan jumlah pelarut sedikit-sedikit. Efisiensi dapat ditingkatkan dengan menggunakan luas kontak yang besar (Khopkar, 2003).

Setiap senyawa memiliki kelarutan yang berbeda-beda dalam pelarut. Senyawa akan mudah larut dalam pelarut yang memiliki kepolaran yang sama. Kepolaran timbul dari perbedaan dua kutub (*pole*) kelarutan. Kecenderungan suatu bahan yang lebih larut dalam air disebut memiliki sifat yang polar dan sebaliknya yang cenderung lebih larut dalam pelarut organik disebut nonpolar. Tingkat kepolaran ditunjukkan oleh nilai konstanta dielektrik. Semakin besar

konstanta dielektrikum suatu pelarut maka senyawa tersebut polar (sudarmadji, dkk., 2003).

Kelarutan suatu komponen tergantung pada derajat polaritas pelarut yang ditentukan oleh konstanta dielektrikum. Semakin besar konstanta dielektrikum suatu zat maka semakin polar zat tersebut yang ditunjukkan pada Tabel 2.1 (Sax dan Lewis, 1987).

Tabel 2.1 Konstanta Dielektrikum dan Tingkat Kelarutan Beberapa Pelarut

| Jenis pelarut | Konstanta dielektrikum | Tingkat kelarutan dalam air | Titik Didih (°C) |
|----------------|------------------------|-----------------------------|-------------------|
| Heksana | 1,9 | TL | 68,7 |
| Petroleum eter | 2,28 | TL | 60 |
| Benzene | 2,38 | TL | 80,1 |
| Toluene | 4,81 | TL | 111 |
| Kloroform | 4,81 | S | 61,3 |
| Etil asetat | 6,02 | S | 77,1 |
| Metil asetat | 6,68 | S | 57 |
| Metil klorida | 9,08 | S | 39,75 |
| Butanol | 15,80 | S | 117,2 |
| Propanol | 20,1 | L | 97,22 |
| Aseton | 20,70 | L | 56,2 |
| Etanol | 24,30 | L | 78,5 |
| Metanol | 33,60 | L | 64 |
| Air | 78,4 | L | 100 |

Keterangan: TL = tidak larut; S = sedikit larut; L = larut dalam berbagai proporsi.

Sumber: Sax dan Lewis (1987), Mulyono (2006) dan Fessenden dan Fessenden (1982).

2.8 Hidrolisis dan Partisi

Senyawa organik dalam tanaman umumnya memiliki bentuk glikosida. Glikosida merupakan senyawa yang terbentuk atas gabungan dari bagian gula

(glikon) yang bersifat polar dan bagian bukan gula (aglikon) yang dapat bersifat polar, semipolar maupun non polar. Senyawa metabolit sekunder masuk kedalam golongan senyawa aglikon. Perubahan struktur ke bentuk glikosida, menyebabkan suatu senyawa mengalami perubahan sifat fisika, kimia dan aktivitas biologi yang berbeda dimana senyawa tersebut akan bersifat lebih polar sehingga diharapkan ketika masuk ke dalam tubuh secara per-oral senyawa tersebut akan lebih cepat diabsorpsi. Jika dalam suatu senyawa terdapat banyak ikatan glikosidanya maka senyawa tersebut cenderung bersifat lebih polar (Saifudin, dkk., 2006). Sterol sering ditemui dalam bentuk glikosida. Glikosida sterol biasanya disebut dengan sterolin (Kristanti, dkk., 2008).

Isolasi Senyawa metabolit sekunder didapatkan dengan melakukan Pemutusan ikatan glikosida terlebih dahulu. Pemutusan ikatan glikosida dapat dilakukan melalui reaksi hidrolisis yakni dengan cara memanaskan larutan dengan air dan sedikit asam. Hidrolisis merupakan suatu reaksi antara suatu senyawa dengan air agar senyawa tersebut pecah atau terurai. Reaksi hidrolisis yang menggunakan air berlangsung sangat lambat sehingga memerlukan bantuan katalisator (seperti asam) (Saifudin, dkk., 2006).

Hidrolisis biasanya menggunakan katalis untuk mempercepat reaksinya karena reaksi hidrolisis dengan air berjalan dengan lambat. Katalis yang digunakan biasanya menggunakan katalis asam kuat seperti HCl. Pemilihan asam kuat seperti HCl sebagai katalis disebabkan karena asam kuat 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).

Ekstrak pekat metanol *Chlorella sp.* dihidrolisis dengan katalis HCl 2 N untuk mempercepat pemutusan ikatan glikosida antara senyawa glikon dan aglikon. Kemudian dinetralkan dengan menggunakan $NaHCO_3$ untuk menghentikan reaksi hidrolisis yang *reversible* (dapat balik). Proses partisi dilakukan dengan menggunakan etil asetat (Anggraeni, dkk., 2014; Imamah, 2015).

2.9 Pemisahan dengan kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis ialah metode pemisahan fisikokimia yang terdiri atas bahan berbutir-butir (fase diam), ditempatkan pada penyangga berupa pelat gelas, logam, atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisah, berupa larutan, ditotolkan berupa bercak atau pita. Pelat atau lapisan diletakkan di dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak), pemisahan terjadi selama perambatan kapiler (pengembangan). Selanjutnya, senyawa yang tidak berwarna harus ditampakkan (dideteksi) (Stahl, 1985). Selain itu KLT digunakan untuk mencari eluen untuk kromatografi kolom, identifikasi senyawa secara kromatografi, dan isolasi senyawa murni skala kecil (Gritter, *et al.*, 1991).

Kromatografi Lapis Tipis digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang sifatnya hidrofob seperti lipida-lipida dan hidrokarbon. Sebagai fase diam digunakan senyawa yang tak bereaksi seperti silika gel atau alumina. Silika gel biasa diberi pengikat yang dimaksudkan untuk memberikan kekuatan pada lapisan dan menambah adesi pada gelas penyokong. Pengikat yang biasa digunakan

adalah kalsium sulfat (Sastrohamidjojo, 2002). Metode dalam KLT dapat dihitung nilai *Retention factor* (Rf) dengan persamaan :

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh eluen}}$$

Tetapi pada gugus-gugus yang besar dari senyawa-senyawa yang susunannya mirip, sering kali harga Rf berdekatan satu sama lainnya (Sastrohamidjojo, 2002). Nilai Rf dapat didefinisikan sebagai jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik awal dan pusat bercak yang dihasilkan senyawa dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik awal sampai titik akhir (yaitu jarak yang ditempuh cairan pengembang). Bilangan ini selalu berupa pecahan dan terletak antara 0,01 – 0,99 (Harborne, 1987).

Kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan fase diamnya berupa lapisan tipis dan fase geraknya mengalir karena kerja kapiler. Lapisan tipis dengan ketebalan 0,1 – 2 mm terdiri atas bahan padat yang dilapiskan pada permukaan penyangga datar yang biasanya terbuat dari kaca, tetapi dapat pula terbuat dari pelat polimer atau logam. Lapisan melekat pada permukaan dengan bantuan bahan pengikat, biasanya kalsium sulfat atau amilum (pati). Lapisan ini biasanya berfungsi sebagai permukaan padat yang menjerap (cair-padat), walaupun dapat pula dipakai sebagai penyangga zat cair (Gritter *et al.*, 1991). Ukuran standar untuk lempeng KLT adalah 20 x 20 cm. Ukuran lainnya dari lempeng antara lain 5 x 20 cm, 10 x 20 cm dan 20 x 40 cm (Gritter, *et. al.*, 1985). Sifat dan komposisi kimia dari fase gerak ditentukan oleh jenis zat yang dipisahkan dan jenis penyerap yang digunakan untuk pemisahan. Komposisi fase gerak dapat berupa pelarut murni maupun campuran kompleks dari beberapa pelarut (Touchstone *et al.*, 1983).

Preparasi sampel dapat dilakukan beberapa cara dengan tujuan membuat sampel yang siap untuk dianalisis secara kromatografi. Cara tersebut dapat berupa pelarutan sampel, ekstraksi, hidrolisis dan partisis ekstrak pekat dengan fraksi etil asetat. Penotolan sampel dilakukan diawali dengan sampel dilarutkan pada pelarut yang sesuai. Larutan sampel yang ditotolkan paling sedikit 0,5 μL . Jika volume sampel yang ditotolkan lebih besar dari 2 – 10 μL , maka penotolan harus dilakukan secara bertahap dengan dilakukan pengeringan antar totolan. Penotolan dilakukan pada garis awal berupa titik atau pita. Penotolan berupa titik sebaiknya mempunyai diameter 2 mm dan paling besar 5 mm (Stahl, 1969).

Setelah sampel ditotolkan kemudian adalah pengembangan sampel dalam bejana yang sebelumnya telah dijenuhkan dengan fase gerak. Tepi bagian bawah lempeng lapis tipis yang telah ditotoli sampel dicelupkan kedalam fase gerak kurang lebih 0,5 – 1 cm. Tinggi fase gerak dalam bejana harus dibawah lempeng yang telah berisi totolan sampel (Ganjar, dkk., 2007).

Bejana harus tertutup rapat dan dikondisikan volume fase gerak sesedikit mungkin, akan tetapi harus mengelusi lempeng sampai mencapai ketinggian lempeng yang telah ditentukan). Untuk melakukan penjenuhan fase gerak, bejana biasanya dilapisi dengan kertas saring. Jika fase gerak telah mencapai ujung dari kertas saring, maka dapat dikatakan fase gerak telah jenuh (Lia, 2012).

Adanya gaya kapiler yang dapat menyebabkan fase gerak dapat bergerak melewati media dalam proses yang disebut pengembangan. Saat fase gerak akan mencapai batas atas atau ujung lainnya (batas akhir penotolan) dari lempeng, maka lempeng dipindahkan dan dikeringkan sebelum dilakukan pendeteksian (Touchstone *et al.*, 1983).

Pendeteksian bercak hasil pemisahan dengan metode KLT dapat diamati dengan beberapa metode yaitu metode kimia dan metode fisika. Deteksi bercak dilakukan ketika lempengan telah dikeringkan. Metode kimia yang biasa digunakan adalah dengan cara mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui langkah penyemprotan sehingga bercak menjadi lebih jelas. Metode fisika untuk mendeteksi bercak antara lain dengan cara mengamati lempeng di bawah lampu ultra violet pada panjang gelombang emisi 254 nm atau 366 nm (Rohman, A., 2009).

Cara fisika yang dapat digunakan untuk menampakkan bercak adalah dengan pencacahan radioaktif dan fluoresensi sinar ultraviolet. Fluoresensi sinar ultraviolet terutama untuk senyawa yang dapat berfluoresensi, membuat bercak akan terlihat jelas. Jika senyawa tidak dapat berfluoresensi maka bahan penyerapnya akan diberi indikator yang berfluoresensi, dengan demikian bercak akan kelihatan hitam sedang latar belakangnya akan terlihat berfluoresensi (Gandjar dkk., 2007). Sinar UV yang digunakan biasanya pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

Sudjadi (1988) pada UV 254 nm, lempeng akan berfluoresensi sedangkan sampel akan tampak berwarna gelap. Penampakan noda pada lampu UV 254 nm adalah karena adanya daya interaksi antara sinar UV dengan indikator fluoresensi yang terdapat pada lempeng. Fluoresensi cahaya yang tampak merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron yang tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi kemudian kembali ke keadaan semula sambil melepaskan energi.

Pada UV 366 nm noda akan berfluoresensi dan lempeng akan berwarna gelap. Penampakan noda pada lampu UV 366 nm adalah karena adanya daya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh auksokrom yang ada pada noda tersebut. fluoresensi cahaya yang tampak merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron yang tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi kemudian kembali ke keadaan semula sambil melepaskan energi. Sehingga noda yang tampak pada lampu UV 366 nm terlihat terang karena silika gel yang digunakan tidak berfluoresensi pada sinar UV 366 nm (Sudjadi, 1988).

2.10 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Winarsi, 2007). Antioksidan berfungsi untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah terjadinya kerusakan tubuh yang ditimbulkan oleh radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki oleh radikal bebas tersebut (Prakash, A., 2001).

Radikal bebas sering dikaitkan dengan berbagai peristiwa fisiologis seperti peradangan, penuaan, dan penyebab kanker (Bhaigyabati dkk., 2011). Radikal bebas (*free radical*) adalah atom atau molekul yang mempunyai elektron tidak berpasangan, terbentuk sebagai hasil antara (*intermediet*) dalam suatu reaksi organik melalui proses homolisis dari ikatan kovalen. Karena reaktivitasnya, senyawa radikal bebas akan segera mungkin menyerang komponen seluler yang berada disekelilingnya, baik berupa senyawa lipid, lipoprotein, protein, karbohidrat, RNA, maupun DNA. Akibat lebih jauh dari reaktivitas radikal bebas adalah terjadinya kerusakan struktur maupun fungsi sel (Winarsi, 2007). Tanpa

disadari, dalam tubuh kita terbentuk radikal bebas secara terus-menerus, baik berupa proses metabolisme sel normal, peradangan, kekurangan gizi, dan akibat respon terhadap pengaruh dari luar tubuh, seperti polusi lingkungan, ultraviolet (UV), asap rokok dan lain-lain (Winarsi, 2007). Radikal bebas yang terbentuk dalam tubuh ini bisa dihambat oleh antioksidan yang melengkapi sistem kekebalan tubuh. Namun, dengan bertambahnya usia seseorang, sel-sel tubuh mengalami degenerasi yang berdampak pada menurunnya respon imun di dalam tubuh. Akibatnya radikal bebas yang terbentuk didalam tubuh tidak lagi diimbangi oleh produksi antioksidan. Oleh karena itu, tubuh kita memerlukan suatu antioksidan eksogen yang dapat diperoleh dari buah-buahan dan sayur-sayuran.

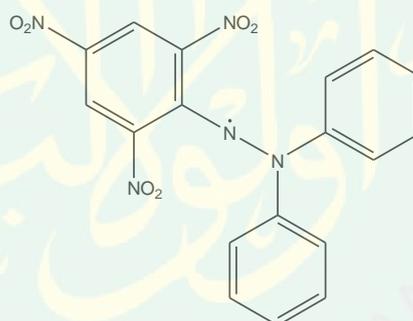
Keberadaan antioksidan dapat melindungi tubuh dari berbagai penyakit degeneratif dan kanker, serta membantu menekan proses penuaan (Tapan, 2005). Antioksidan yang sangat umum digunakan pada saat ini merupakan antioksidan sintetik seperti *Butylated hydroxyanisole* (BHA), *Butylated hydroxytoluene* (BHT), *Propylgallate* (PG), dan *tert-butylhydroquinone* (TBHQ) (Sherwin, 1990). Antioksidan memiliki peranan penting dalam mencegah oksidasi radikal bebas yang dapat menyebabkan berbagai penyakit seperti karsinogenik dan penuaan (Yan, 1998).

Terdapat beberapa metode pengujian antioksidan antara lain :

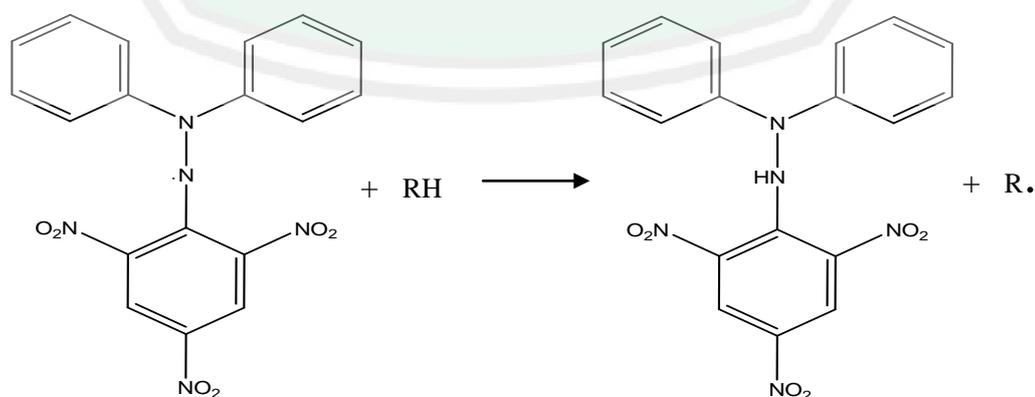
1. Metode Perendaman Radikal DPPH (1,1-difenil-2-pirilhidrazil)

Radikal bebas yang biasa digunakan adalah 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) seperti pada Gambar 2.4. DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil sehingga apabila digunakan sebagai pereaksi dalam uji penangkapan radikal bebas cukup dilarutkan dan bila disimpan dalam keadaan kering dengan kondisi

penyimpanan yang baik akan stabil selama bertahun-tahun. Mekanisme penangkapan radikal DPPH oleh antioksidan yaitu berupa donasi proton kepada radikal (Pokorni, 2001). Donasi proton menyebabkan radikal DPPH berwarna ungu menjadi senyawa non radikal yang akan kehilangan warna ungunya yang mana pemudaran warna ini dapat ditunjukkan dengan adanya penurunan serapan dari DPPH pada panjang gelombang optimumnya yang diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pada metode ini, DPPH berperan sebagai radikal bebas yang direndam oleh antioksidan dari bahan uji, sehingga DPPH akan bereaksi dengan antioksidan tersebut membentuk 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin (Juniarti, dkk., 2009).



Gambar 2.5 DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)



Gambar 2.6 Reaksi perendaman radikal DPPH oleh antioksidan (RH) (Yamaguchi *et. al.* 1998)

2. Metode *Reducing power*

Metode ini didasarkan pada prinsip peningkatan absorbansi dari reaksi campuran. Peningkatan absorbansi menunjukkan peningkatan aktivitas antioksidan. Dalam metode ini antioksidan membentuk kompleks berwarna terhadap kalium ferrisianida, asam trikloroasetat dan besi (III) klorida, lalu serapan diukur pada panjang gelombang 700 nm. Peningkatan pada serapan campuran reaksi menunjukkan kekuatan mereduksi dari antioksidan (Joseph, dkk., 2005).

3. Metode FRAP

FRAP (*Ferric Reducing Ability Of Plasma*) adalah salah satu tes yang paling cepat dan sangat berguna untuk analisis rutin (Shivaprasad, *et al.*, 2005). Uji FRAP didasarkan pada kemampuan antioksidan untuk mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} dengan adanya 2,4,6-tri(2-piridil)-s triazine (TPTZ), membentuk biru intensif dari kompleks Fe^{2+} -TPTZ yang diukur pada absorbansi maksimum 593 nm. Reaksi ini tergantung pH (pH optimum 3,6). Penurunan absorbansi sebanding dengan kandungan antioksidan (Chanda, dkk., 2009).

4. Metode Tiosianat

Aktivitas antioksidan sampel dengan metode tiosianat ditunjukkan dengan kekuatan sampel dalam menghambat peroksida asam linoleat. Jumlah peroksida yang terbentuk diukur secara tidak langsung dengan pembentukan kompleks ferritiosianat yang berwarna merah. Senyawa AAPH pada pemanasan akan menginduksi pembentukan radikal dan menyebabkan terjadinya peroksidasi asam linoleat. Peroksida yang terbentuk akan mengoksidasi ion ferro menjadi ferri.

Antioksidan kuat akan menunjukkan grafik antara serapan dan waktu inkubasi yang landai (Mun'im, dkk., 2008).

5. Aktivitas penghambatan Radikal Superoksida

Metode ini didasarkan pada pembangkitan radikal superoksida oleh autooksidasi dari riboflavin dengan adanya cahaya. Radikal superoksida mereduksi NBT (Nitro biru tetrazolium) menjadi formazon yang berwarna biru yang dapat diukur pada panjang gelombang 560 nm (Shivaprasad, dkk., 2005).

Metode yang biasa digunakan untuk uji aktivitas antioksidan adalah metode DPPH. Salah satu parameter yang digunakan untuk interpretasi untuk metode DPPH adalah konsentrasi efisien atau nilai EC_{50} (Molyneux, 2004). EC_{50} merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi dari ekstrak (mikrogram/mililiter) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%. Semakin kecil nilai EC_{50} maka semakin tinggi aktivitas antioksidan. Secara spesifik, suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai EC_{50} kurang dari 50, dikatakan kuat jika nilai EC_{50} antara 50 – 100, dikatakan sedang jika nilai EC_{50} antara 100 – 150, dan dikatakan lemah jika nilai EC_{50} antara 151 – 200 (Wulandari, 2013).

Penelitian yang telah dilakukan oleh Bariyyah, dkk. (2013), dimana uji kuantitatif potensi antioksidan pada ekstrak *Chlorella sp.* dilakukan dengan uji DPPH secara spektrofotometri sinar tampak dan didasarkan pada perubahan warna radikal DPPH. Perubahan warna tersebut disebabkan oleh reaksi antara radikal bebas DPPH dengan suatu atom hydrogen yang dilepaskan senyawa yang terkandung dalam bahan uji yang ditandai dengan perubahan warna dari ungu ke kuning.

2.11 Spektrofotometer UV – Vis

Spektrum UV-Vis merupakan hasil interaksi antara radiasi elektromagnetik (REM) dengan molekul. REM merupakan bentuk energi radiasi yang mempunyai sifat gelombang dan partikel (foton). Pengukuran serapan dapat dilakukan pada daerah ultraviolet (panjang gelombang 190 nm – 380 nm) atau pada daerah cahaya tampak (panjang gelombang 380 nm – 780 nm). Senyawa atau zat yang dapat diperiksa adalah zat yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi atau yang lebih dikenal dengan istilah kromofor. Senyawa yang mengandung gugus kromofor akan mengabsorpsi radiasi sinar ultraviolet dan cahaya tampak jika diikat oleh senyawa-senyawa bukan pengabsorpsi (auksokrom). Gugus auksokrom adalah gugus yang memiliki elektron non bonding dan tidak menyerap radiasi sinar ultraviolet jauh, contohnya $-OH$, $-NH_2$, $-NO_2$, $-X$ (Harmita, 2006).

Spektrum serapan adalah hubungan antara serapan dengan panjang gelombang yang biasanya digambarkan dalam bentuk grafik. Spektrum serapan dari zat yang diperiksa kadang kala perlu dibandingkan dengan pembanding kimia yang sesuai. Pembanding kimia yang digunakan tersebut dikerjakan dengan cara dan dalam kondisi yang sama dengan zat yang akan diperiksa. Blanko digunakan untuk koreksi serapan yang disebabkan oleh pelarut pereaksi dan pengaturan alat. Pengukuran serapan biasanya dilakukan pada panjang gelombang serapan maksimum ataupun yang sudah tercantum dalam monografi (DepKes, 1979).

Jenis spektrofotometer UV-Vis ada dua yaitu *single beam* dan *double beam*. Pada *single beam* celah keluar sinar monokromatis hanya satu, wadah kuvet yang dapat dilalui sinar hanya satu dan setiap perubahan panjang gelombang alat harus dinolkan. Sedangkan pada jenis *double beam* celah keluar sinar monokromatis ada

dua, wadah kedua kuvet dapat dilalui sinar dengan sekaligus dan hanya cukup satu kali dinolkan dengan cara mengisi kedua kuvet dengan larutan blanko (Harmita, 2006).

Pengukuran spektrum UV dilakukan dengan menggunakan alat spektrometer UV Shimadzu, yaitu kira-kira 1 mg kristal dilarutkan dengan 100 ml metanol, kemudian diatur serapannya pada daerah panjang gelombang 200–400 nm. Sebelum sampel diukur terlebih dahulu yang diukur larutan blanko yaitu metanol sebagai pembanding (Susilawati, 2014).

Susilawati (2014), memaparkan bahwa spektrum UV hasil isolasi daun rimbang (*Solanum Torvum*) (Gambar 5) mempunyai serapan maksimum pada panjang gelombang 197 nm, 271 nm dan 281 nm. Maksimum pada panjang gelombang 197 nm berarti senyawa steroid hasil isolasi ini mempunyai ikatan rangkap yang tidak terkonyugasi dan pada panjang gelombang 271 nm dan 281 nm memiliki ikatan rangkap yang terkonyugasi hal ini sesuai dengan kaidah Woodward untuk meramalkan serapan maksimum untuk sistem diena menggunakan harga dasar 214 nm untuk ikatan rangkap terkonyugasi.

Identifikasi senyawa steroid menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada ekstrak *P. boergesii* and *S. Stenophyllum* diamati pada λ_{\max} 290 – 310 nm dengan konstituen yang diamati adalah Fucosterol (Oliveira, 2015).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Aprielia, (2013), hasil pengukuran spectrum UV-Vis dengan munculnya puncak pada λ_{\max} 203 nm menunjukkan bahwa terdapat ikatan C=C tidak terkonjugasi akibat adanya transisi electron $\pi \rightarrow \pi^*$.

BAB III

METODOLOGI

3.1 Pelaksanaan Penelitian

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

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

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

3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini yaitu isolat mikroalga *Chlorella sp.* dari laboratorium Ekologi Tumbuhan Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Bahan lain yang digunakan adalah metanol p.a., asam sulfat pekat, Etil Asetat p.a., akuades, anhidrida asam,

HCl 37 %, etanol 95 %, natrium karbonat, vitamin C dan BHT, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), kloroform, H₂SO₄ pekat, dan asam asetat anhidrat, n-heksana *p.a*, dan aseton.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian secara eksperimental di laboratorium. Pengujian dilakukan dengan mengekstraksi biomassa *Chlorella sp.* Hasil kultivasi dan biomassa mikroalga *Chlorella sp.* kering diekstrak dengan menggunakan metanol *p. a.* kemudian hasil ekstrak pekat metanol mikroalga *Chlorella sp.* Dihidrolisis dengan katalis HCl 2 N dan dipartisi dengan menggunakan etil asetat *p. a.* Hasil partisi kemudian dipisahkan senyawanya dengan KLTP menggunakan plat silika gel GF₂₅₄ dengan ukuran 10 x 20 cm menggunakan eluen terbaik n-heksana : etil asetat (4 : 1). Noda warna hijau kebiruan yang diduga steroid dikerok dan diekstrak, dan dibuat variasi konsentrasi 15, 20, 25 ppm dan diuji antioksidan dengan menggunakan metode penangkap radikal bebas DPPH. Kemudian diidentifikasi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.*
 - a. Pembuatan Media Ekstrak Tauge
 - b. Kultivasi *Chlorella sp.* dalam Media Ekstrak Tauge
 - c. Pemanenan Biomassa *Chlorella sp.*

2. Preparasi Sampel.
3. Penentuan kadar air
4. Ekstraksi Senyawa aktif pada Mikroalga *Chlorella sp.*
5. Hidrolisis dan partisi ekstrak pekat metanol mikroalga *chlorella sp.* dengan fraksi etil asetat
6. Pemisahan senyawa steroid dengan KLTP menggunakan eluen terbaik.
7. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode penangkap radikal bebas DPPH terhadap senyawa steroid dari mikroalga dengan variasi konsentrasi.
8. Identifikasi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.
9. Analisis Data

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.*

3.5.1.1 Pembuatan Media Ekstrak tauge

Pembuatan medium ekstrak tauge dilakukan dengan langkah awal yaitu pembuatan larutan stok MET. Larutan stok MET dibuat dengan cara merebus 100 gram tauge dalam 500 mL aquades yang mendidih selama 1 jam hingga volume ekstrak 200 mL. Selanjutnya untuk pembuatan Medium Ekstrak Tauge 4 % sebanyak 600 mL, dilakukan dengan melarutkan sebanyak 24 mL larutan stok MET kedalam akuades 576 mL dalam erlenmeyer 1000 mL (Prihantini, dkk., 2005).

3.5.1.2 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam Media Ekstrak Tauge

Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan cara menginokulasikan 100 mL isolat *Chlorella sp.* ke dalam masing-masing 600 mL

MET 4 % dalam erlenmeyer 1000 mL dan ditempatkan pada rak kultur yang telah dilengkapi dengan pencahayaan menggunakan lampu TL 36 watt (intensitas cahaya 1000 – 4000 lux) dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap selama 10 hari (Prihantini, dkk., 2005).

3.5.1.3 Pemanenan Biomassa *Chlorella sp.*

Media kultur *Chlorella sp.* disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Biomassa *Chlorella sp.* dipisahkan dari supernatannya (Desianti, dkk., 2014).

3.5.2 Preparasi Sampel

Sampel biomassa *Chlorella sp.* diambil seluruhnya kemudian dikeringanginkan pada suhu ruang, 25 – 30 °C selama 48 jam (Anggraeni, dkk., 2014).

3.5.3 Penentuan Kadar Air

Cawan yang akan digunakan dipanaskan terlebih dahulu dalam oven dengan suhu 100 – 105 °C selama 15 menit. Kemudian cawan disimpan dalam desikator 10 menit, setelah itu ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama hingga diperoleh berat cawan yang konstan. Biomassa *Chlorella sp.* sebanyak 5 gram dimasukkan kedalam cawan yang telah konstan tersebut, kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 100 – 105 °C selama 15 menit, selanjutnya dimasukkan dalam desikator selama 10 menit yang selanjutnya dilakukan penimbangan. Perlakuan tersebut dilakukan berulang hingga diperoleh berat sampel yang konstan. Kadar air dihitung menggunakan rumus (AOAC, 1984):

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

Dimana: a = bobot cawan kosong

b = bobot sampel + cawan sebelum dipanaskan

c = bobot cawan + sampel setelah dipanaskan

3.5.4 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstraksi senyawa aktif mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan cara yaitu, biomassa *Chlorella sp.* kering dari fase pemanenan diekstraksi dengan metode maserasi, dimasukkan ke dalam beaker glass 500 mL dan ditambahkan pelarut metanol dengan perbandingan 1:5 (b/v) (50 gr : 250 mL), kemudian ditutup dengan aluminium foil. Proses maserasi diawali dengan melakukan pengocokan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama ± 5 jam pada suhu kamar. Hasil perendaman tersebut kemudian disaring dengan menggunakan corong *buchner* hingga terpisah antara residu dan filtratnya. Residu yang diperoleh kemudian dimaserasi kembali hingga 5 kali ekstraksi. Sedangkan filtrat yang diperoleh dari 5 kali proses maserasi tersebut dikumpulkan menjadi satu dan dihilangkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator vacuum*, sehingga dapat diperoleh ekstrak pekat *Chlorella sp.* Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian ditimbang untuk dihitung nilai rendemen dari ekstrak yang dihasilkan pada (Khopkar, 2003):

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

3.5.5 Hidrolisis Dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstrak pekat metanol sebanyak 5 gram dihidrolisis dengan katalis HCl 2N sebanyak 10 mL dan distirer selama 1 jam pada suhu ruang (Tensiska, *et al.*,

2007). Selanjutnya ditambahkan natrium bikarbonat ke dalam hasil hidrolisis tersebut hingga pH netral. Kemudian dipartisi dengan menggunakan etil asetat sebanyak 25 mL. Partisi dilakukan dengan dua kali pengulangan. Ekstrak hasil partisi kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* dan dialiri dengan gas N₂. Selanjutnya ekstrak pekat hasil partisi dihitung rendemennya dengan rumus:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat hidrolisat yang diperoleh}}{\text{Berat sampel yang dihidrolisis}} \times 100 \%$$

3.5.6 Pemisahan Senyawa Steroid Dengan Menggunakan KLTP

Pemisahan dengan KLT preparatif menggunakan plat silika gel GF₂₅₄ dengan ukuran 10 X 20 cm. Ekstrak pekat hasil partisi ditotolkan sepanjang plat pada jarak 1 cm dari garis bawah dan 1 cm dari garis tepi. Selanjutnya dielusi dengan menggunakan eluen yang memberikan hasil pemisahan terbaik pada KLT kualitatif percobaan sebelumnya yaitu n-heksana : Etil asetat (4 : 1) (Imamah, dkk., 2015). Hasil pemisahan di deteksi dengan cara menyemprotkan Lieberman Buchard (LB) di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm. Noda yang didapatkan diamati dan dikerok noda yang diduga steroid kemudian dilarutkan dengan etil asetat. Kemudian disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm untuk mengendapkan silikanya. Supernatan yang didapatkan kemudian dipekatkan sehingga diperoleh isolat pekat berdasarkan harga RF dari senyawa steroid.

3.5.7 Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH

3.5.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH.

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

3.5.7.2 Pengukuran Potensi Antioksidan Pada Sampel

Sampel isolat steroid dibuat variasi konsentrasi 15, 20, 25 ppm. Ekstrak masing-masing dipipet sebanyak 4,5 mL dan ditambahkan 1,5 mL DPPH 0,2 nM kemudian di inkubasi pada suhu 37 °C selama waktu kestabilan. Kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 515,0 nm. Data absorbansi yang diperoleh tiap konsentrasi masing-masing ekstrak dihitung nilai persen aktivitas antioksidan:

$$\text{Aktivitas} = \frac{A \text{ kontrol} - A \text{ Sampel}}{A \text{ kontrol}} \times 100 \%$$

Kontrol yang digunakan yaitu larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1,5 mL dalam 4,5 mL etanol 95 %. Perbandingan BHT dan Asam karboksilat (vitamin C) diperlakukan seperti sampel.

3.5.8 Identifikasi Dengan Spektrofotometer UV-Vis.

Isolat steroid hasil KLTP dilarutkan menggunakan pelarut kemudian divortex, selanjutnya dimasukkan kedalam kuvet hingga sepertiga dari kuvet dan diidentifikasi dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dengan panjang

gelombang 200 – 400 nm, sehingga dapat diperoleh panjang gelombang maksimum dan spektranya.

3.6 Analisis Data

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

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan menggunakan sampel mikroalga *Chlorella sp.* dengan beberapa tahapan yang harus dilakukan yaitu (1) Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dalam media ekstrak taugé (2) Preparasi sampel biomassa mikroalga (3) Penentuan Kadar air sampel mikroalga *Chlorella sp.* kering dan basah (4) Ekstraksi senyawa aktif pada Mikroalga *Chlorella sp.* (5) Hidrolisis dan partisi ekstrak pekat metanol mikroalga *Chlorella sp.* dengan fraksi etil asetat (6) pemisahan senyawa steroid dengan menggunakan KLTP dengan eluen terbaik (7) Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode penangkap radikal bebas DPPH terhadap senyawa steroid dari mikroalga dengan variasi konsentrasi (8) Identifikasi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (9) Analisis Data.

4.1 Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.*

4.1.1 Pembuatan Media Ekstrak Tauge

Media Ekstrak Tauge (MET) merupakan salah satu media alami untuk pertumbuhan mikroalga yang berasal dari rebusan kecambah kacang hijau. Pemilihan media ini karena media ekstrak taugé memiliki kandungan unsur makro dan mikro, vitamin, mineral asam amino yang dibutuhkan bagi pertumbuhan mikroalga. Selain itu unsur hara yang terkandung di dalam MET yaitu K, P, Fe, Na, dan K. Sedangkan vitamin yang terkandung didalam media tersebut adalah karoten, thiamin, riboflavin, niasin, dan vitamin C (Persagi, 2009).

Media ekstrak taugé yang digunakan pada penelitian ini merupakan media ekstrak taugé dengan konsentrasi 4 %. Pemilihan konsentrasi 4 % berdasarkan

pada penelitian yang telah dilakukan oleh Prihantini, dkk., (2005), dimana pada konsentrasi 4 % memberikan kerapatan sel tertinggi sebesar 3.981.071 sel/mL, dibandingkan dengan media ekstrak tauge pada konsentrasi 1, 2, 3, 5 dan 6 % dengan kerapatan sel berturut-turut 918.750 sel/mL, 1.348.962 sel/mL, 3.353.750 sel/mL, 577.500 sel/mL, 512.861 sel/mL, 851.138 sel/mL, 16.218 sel/mL. Media ekstrak tauge 4 % dapat dilihat pada Lampiran 7.

4.1.2 Kultivasi Mikroalga *chlorella sp.* dalam Media Ekstrak Tauge

Kultivasi mikroalga *chlorella sp.* bertujuan untuk memperbanyak jumlah sel dari mikroalga. Proses kultivasi dilakukan dengan menambahkan isolat mikroalga *chlorella sp.* ke dalam media ekstrak tauge (MET) konsentrasi 4 %. Penyimpanan kultur dilakukan selama 10 hari dengan pencahayaan menggunakan lampu TL (Tube lamp) 36 watt (intensitas cahaya 1000 – 4000 lux) yang berfungsi sebagai pengganti sinar matahari dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap. Temperatur yang digunakan yaitu temperatur ruang (25 – 30 °C) dimana pada temperatur tersebut merupakan rentang temperatur yang baik untuk pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.*

Selama proses kultivasi, jumlah sel dari mikroalga *Chlorella sp.* setiap harinya bertambah banyak yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna dari hijau kekuningan menjadi hijau pekat. Hal ini menandakan bahwa mikroalga dapat beradaptasi dan tumbuh dengan baik pada media ekstrak tauge tersebut. Menurut Prihantini, (2007) peningkatan kerapatan sel menandakan bahwa mikroalga tersebut dapat beradaptasi dan dapat menyerap nutrient dalam MET dan dimanfaatkan untuk proses pertumbuhannya yang dapat dilihat dari perubahan warna kultur dimana warna kultur mikroalga merupakan warna pigmen utama

yang terdapat pada sitoplasma sel, yaitu klorofil. Perubahan warna kultur mikroalga *chlorella sp.* dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Perubahan Warna Kultur Mikroalga *Chlorella sp.*

4.1.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga *chlorella sp.* dalam Media Ekstrak Tauge

Pemanenan biomassa mikroalga *chlorella sp.* dilakukan untuk mendapatkan biomassa mikroalga yang nantinya akan digunakan sebagai sampel pada penelitian ini. Biomassa mikroalga berbentuk cairan kental atau pekat yang berwarna hijau gelap. Pemanenan biomassa mikroalga *chlorella sp.* dilakukan pada fase stasioner yang terjadi pada hari ke-10. Fase stasioner merupakan tahap pertumbuhan yang konstan dimana laju reproduksi sama dengan laju kematian (Yudha, 2008). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Khamidah, (2013), fase stasioner terjadi pada hari ke-10 dengan kelimpahan sel tertinggi yaitu sebesar 4.880.000 sel/mL.

Pemanenan mikroalga *chlorella sp.* menggunakan teknik sentrifugasi. Teknik sentrifugasi yang digunakan dianggap sangat efisien untuk pemanenan mikroalga terutama *chlorella* (Vonshak, 1990). Biomassa yang dihasilkan berupa cairan kental berwarna hijau gelap dan masih mengandung air. Hasil empat kali pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella sp.* diperoleh berat basah sebesar 467,56 gram.

4.2 Preparasi Sampel

Sampel biomassa yang diperoleh berupa cairan kental berwarna hijau gelap. Preparasi sampel biomassa mikroalga *chlorella sp.* dilakukan dengan mengeringanginkan pada suhu ruang selama 48 jam hingga diperoleh biomassa kering dari mikroalga *chlorella sp.* Penghilangan kandungan air dilakukan untuk meminimalkan degradasi oleh mikroorganismenya serta mencegah terdapatnya jamur di dalam sampel sehingga dapat memperpanjang umur simpan sampel serta tidak merusak unsur kimia dari sampel tersebut. Selain itu adanya kadar air yang tinggi dapat mengganggu selama proses ekstraksi berlangsung. Sampel mikroalga *Chlorella sp.* dari berat basah sebesar 467,56 gram diperoleh berat kering sebesar 7,28 gram atau memiliki rendemen sebesar 1,557 %. Kultivasi dilakukan hingga diperoleh berat biomassa kering sebesar 30 gram.

4.3 Pengukuran Kadar Air sampel mikroalga *Chlorella sp.*

Analisis kadar air merupakan analisis banyaknya air yang terkandung dalam bahan menggunakan prinsip menguapkan air yang ada dalam bahan dengan jalan pemanasan. Selisih massa sebelum dan sesudah dioven merupakan berat dari air yang dinyatakan dalam persen. Analisis kadar air pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui banyaknya kandungan air di dalam sampel mikroalga *Chlorella sp.* Penetapan kadar air dilakukan dengan memanaskan sampel mikroalga *Chlorella sp.* kering ke dalam oven dengan suhu 100 – 105 °C selama 30 menit yang selanjutnya ditimbang hingga memperoleh berat yang konstan. Hilangnya berat setelah dipanaskan merupakan banyaknya air yang terkandung di dalam sampel mikroalga *Chlorella sp.*

Penelitian ini dilakukan dua kali pengukuran kadar air terhadap sampel mikroalga *Chlorella sp.* kering dan sampel mikroalga *Chlorella sp.* basah. Setiap sampel dilakukan tiga kali pengulangan. Hasil pengukuran kadar air yang diperoleh yaitu sebesar 10,15 % untuk kadar air sampel mikroalga *Chlorella sp.* kering dan 97,70 % untuk kadar air sampel mikroalga *Chlorella sp.* basah.

Tabel 4.1 Hasil Pengukuran Kadar Air sampel mikroalga *Chlorella sp.* kering dan basah

| Ulangan | Kadar air (%) | |
|---------------|---------------|--------------|
| | Sampel kering | Sampel basah |
| 1 | 10,05 | 97,68 |
| 2 | 10,76 | 97,80 |
| 3 | 9,63 | 97,61 |
| Rata-rata (%) | 10,15 | 97,70 |

Kadar air sampel mikroalga *Chlorella sp.* kering yang diperoleh termasuk rendah dan masih dibawah batas maksimum yang dapat digunakan untuk ekstraksi. Menurut Sulistijowati (2001), kadar air yang baik untuk keberhasilan proses ekstraksi adalah sebesar 11 %. Semakin rendah nilai kadar air sampel maka akan semakin memudahkan pelarut untuk mengekstrak komponen senyawa aktif yang diinginkan (Nurmilla, 2009). Menurut Harbone (1987) pelarut metanol akan berikatan hidrogen dengan air yang terdapat pada sampel, sehingga kandungan air dalam sampel juga ikut terekstrak. Selain berpengaruh terhadap proses ekstraksi, kandungan air dalam sampel juga berpengaruh terhadap proses penyimpanan sampel. Sampel dengan kadar air yang rendah tidak mudah ditumbuhi mikroorganisme sehingga masa simpan dari sampel tersebut dapat bertahan lama. Hasil kadar air ini tidak berbeda jauh dengan penelitian yang dilakukan oleh Khamidah (2013), dimana diperoleh nilai kadar air sampel

mikroalga *Chlorella sp.* kering sebesar 10,899 % dan kadar air sampel mikroalga *Chlorella sp.* basah yaitu 78,663 %. Menurut Rachmaniah, dkk., (2010), mikroalga memiliki kadar air yang cukup tinggi yaitu 70 – 90 %.

Hasil kadar air sampel basah dan kering memiliki perbedaan yang sangat signifikan, hal ini menunjukkan bahwa proses pengeringan dengan dikeringanginkan efektif untuk menurunkan kandungan air dalam sampel. Selisih kadar air sampel mikroalga *Chlorella sp.* kering dan basah sebesar 87,55 %. Perhitungan kadar air dapat dilihat pada Lampiran 4.

4.4 Ekstraksi Senyawa Aktif Pada Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstraksi mikroalga *Chlorella sp.* pada penelitian ini menggunakan metode ekstraksi maserasi. Maserasi sampel mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan pelarut metanol p. a. Metanol dipilih karena memiliki sifat polar sehingga diharapkan dapat mengekstrak senyawa polar yang terdapat pada sampel mikroalga *Chlorella sp.* Senyawa steroid yang diinginkan pada sampel mikroalga bersifat nonpolar, namun karena kebanyakan di alam senyawa steroid masih terikat dengan senyawa gula yang bersifat polar sehingga dipilih pelarut yang bersifat polar untuk mengekstraknya. Menurut Kristanti, dkk. (2008) Sterol sering ditemui dalam bentuk glikosida. Glikosida sterol biasanya disebut dengan sterolin.

Maserasi dipilih karena memiliki proses yang mudah, sederhana, dan tidak memerlukan suhu tinggi yang dapat merusak senyawa metabolit sekunder pada mikroalga *Chlorella sp.* Proses maserasi sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa pada mikroalga *Chlorella sp.* karena dengan perendaman akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga senyawa metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma

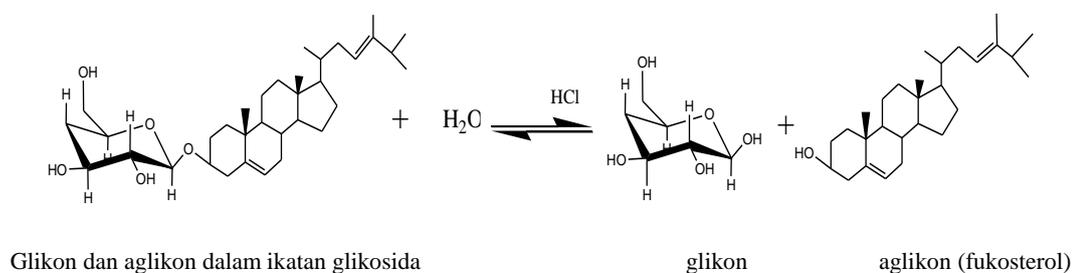
akan terlarut dalam pelarut metanol dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan (Lenny, 2006).

Proses maserasi menggunakan perbandingan sampel dengan pelarut yaitu 5 : 1 dimana pelarut yang digunakan selalu baru. Pengulangan maserasi dilakukan pada sampel yang semula berwarna hijau kehitaman hingga menjadi lebih terang dan pucat. Hal ini diharapkan senyawa aktif dalam sampel dapat terekstrak secara maksimal. Selama proses maserasi dilakukan pengocokan dengan *shaker* untuk membantu meningkatkan kontak antara sampel dengan pelarut sehingga dapat mengekstrak komponen aktif dengan maksimal. Filtrat yang dihasilkan dipisahkan dengan menggunakan *rotary evaporator vacum*. Selama proses ini, pelarut akan menguap sehingga dapat diperoleh ekstrak pekat metanol dari mikroalga *chlorella sp.* Pemberhentian dilakukan ketika sudah tidak terdapat pelarut yang menetes pada tempat pelarut. Ekstrak pekat yang diperoleh di aliri gas N₂ untuk menghilangkan sisa pelarut yang terdapat dalam sampel. Ekstrak pekat ditimbang hingga diperoleh berat yang konstan.

Hasil randemen ekstrak pekat metanol yang diperoleh pada penelitian ini sebesar 21,8926 %. Bariyyah, dkk, (2013) menyatakan bahwa ekstrak pekat metanol memiliki randemen sebesar 7,001 %. Hal ini memberikan hasil yang berbeda, perbedaan ini dapat disebabkan oleh berbedanya nilai kadar air yang terkandung dalam sampel. Penelitian Bariyyah, dkk (2013) memiliki nilai kadar air sebesar 12,036 % sedangkan pada penelitian ini sebesar 10,15 %. Semakin rendah nilai kadar air bahan maka akan semakin memudahkan pelarut untuk mengekstrak komponen senyawa aktif yang diinginkan.

4.5 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Peekat Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Dengan Fraksi Etil Asetat

Proses hidrolisis dari ekstrak peekat metanol mikroalga *chlorella sp.* dilakukan dengan menggunakan bantuan katalis. Katalis bertugas untuk mempercepat jalannya reaksi hidrolisis yang berjalan lambat. Katalis yang dipilih merupakan katalis asam kuat, asam kuat yang digunakan yaitu HCl 2 N. HCl 2 N dipilih karena HCl merupakan asam kuat yang mudah terionisasi di dalam air. Menurut Handoko (2006), asam kuat memberikan dampak yang lebih besar terhadap reaksi hidrolisis dibandingkan dengan asam lemah, karena asam kuat dalam air mudah melepaskan proton (H^+), sedangkan asam lemah cenderung terionisasi sebagian dalam pelepasan ion H^+ , sehingga banyaknya jumlah proton yang terlepas dapat mempengaruhi pemutusan ikatan glikosida. Selain itu, pemilihan HCl sebagai katalis juga diperhatikan pada sifat garam yang terbentuk saat penetralan (NaCl) yang tidak menyebabkan gangguan. Proses hidrolisis berjalan *reversible* (dapat balik) sehingga reaksi hidrolisis tersebut perlu dihentikan agar tidak terbentuk lagi ikatan antara glikon dan aglikon. Penetralan dilakukan dengan menambahkan natrium bikarbonat. Dugaan reaksi pemutusan ikatan glikosida dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Dugaan Reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida (Imamah, dkk, 2015)

Karena reaksi hidrolisis berjalan *reversible*, maka hidrolisat yang diperoleh ditambah dengan natrium bikarbonat untuk memberhentikan reaksi hidrolisis. Larutan dikatakan netral ketika sudah tidak terdapat lagi gelembung-gelembung udara (CO₂) yang dihasilkan. Reaksi penetralan dengan natrium bikarbonat dapat dilihat pada Gambar. 4.3



Gambar 4.3 Reaksi penetralan dengan natrium bikarbonat

Proses partisi dilakukan dengan menggunakan pelarut etil asetat. Pelarut etil asetat bersifat semipolar, dimana diharapkan senyawa yang memiliki sifat yang sama dapat terekstrak ke dalam pelarut tersebut. Partisi dilakukan untuk memisahkan antara senyawa glikon dengan aglikon yang telah terputus ikatannya akibat dari reaksi hidrolisis. Pada proses partisi akan terbentuk dua lapisan cairan, dimana lapisan tersebut merupakan lapisan organik yang berwarna hijau kehitaman berada di bagian atas dan lapisan air yang berwarna hijau pucat berada di bagian bawah, hal ini terjadi karena massa jenis dari air (1 g/mL) lebih besar dari pada massa jenis etil asetat (0,900 g/mL). Lapisan air akan mengekstrak glikon sedangkan lapisan organik akan mengekstrak aglikon yang memiliki sifat kepolaran yang sama dengan etil asetat.

Ekstrak hasil partisi kemudian di hilangkan pelarutnya dengan dialiri gas N₂ hingga pelarut etil asetat menguap keseluruhan dan dihitung randemennya. Hasil rendemen ekstrak partisi diperoleh sebesar 80,95 %. Berdasarkan hasil randemen tersebut menunjukkan bahwa metabolit sekunder yang terkandung dalam

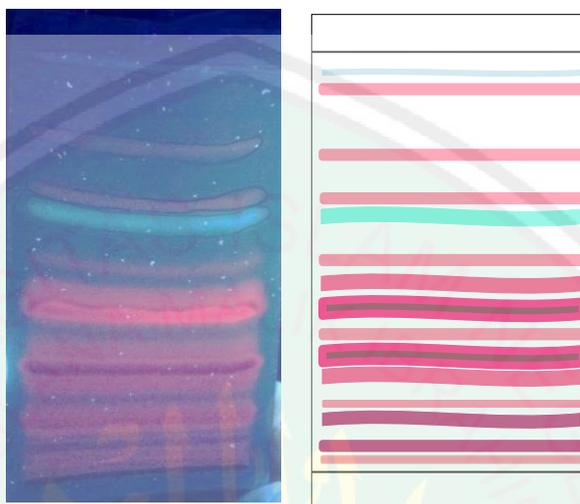
mikroalga *chlorella sp.* banyak yang memiliki sifat kurang polar sesuai dengan sifat kepolaran dari etil asetat.

4.6 Pemisahan Senyawa Steroid Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Kromatografi lapis tipis preparatif dilakukan untuk memperoleh isolat senyawa steroid. Kromatografi Lapis Tipis merupakan suatu metode pemisahan yang didasarkan pada perbedaan distribusi dari dua fase yaitu fase diam dan fase gerak (Sastrohamidjojo, 2002). Senyawa yang dipisahkan diasumsikan berada di fase diam dan fase gerak secara bergantian dalam kesetimbangan. Fase gerak disebut pembawa sedangkan fase diam bertindak sebagai penahan. Distribusi zat terlarut dalam dua fase disebut sebagai koefisien distribusi (Wonoraharjo, 2013).

Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) menggunakan silika sebagai fase diam dan eluen sebagai fase gerak. Eluen yang digunakan merupakan eluen terbaik dari hasil KLTA dimana eluen terbaik pada penelitian ini dipilih berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Imamah, dkk, (2015) bahwa berdasarkan hasil kromatografi lapis tipis analitik (KLTA) diperoleh hasil eluen terbaik yaitu n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 4 : 1 dengan sport yang diperoleh sebanyak 12. Eluen yang digunakan cenderung memiliki kepolaran yang lebih rendah dibandingkan silika. Noda yang memiliki nilai R_f kecil lebih bersifat polar karena lebih tertahan kedalam plat silika sedangkan noda yang memiliki R_f besar memiliki sifat yang lebih non-polar karena ikut terbawa oleh eluen yang memiliki sifat lebih non polar. Noda dengan koefisien distribusi besar terdistribusi ke fase diam sedangkan noda dengan

koefisien distribusi kecil lebih terdistribusi ke fase gerak. Hasil yang diperoleh dari KLTP tertera pada Gambar 4.4



Gambar 4.4 Hasil Isolasi Senyawa dengan KLTP

Tabel 4.2 Hasil KLT preparatif senyawa steroid pada fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* pada eluen n-heksana:etil asetat (4:1) dideteksi di bawah lampu UV λ 366 nm

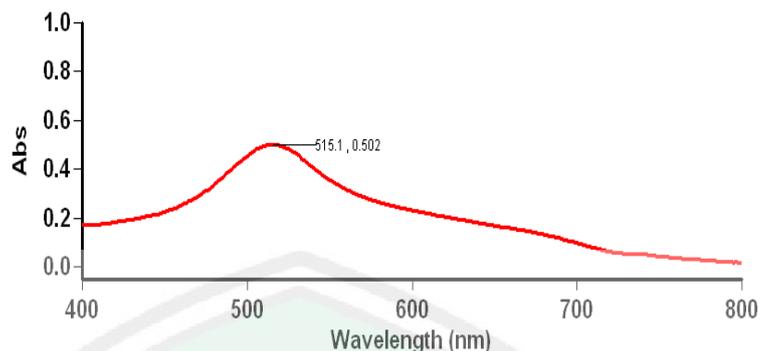
| No. | Nilai Rf | Warna noda di bawah sinar UV pada λ 366 nm | | Dugaan Senyawa |
|-----|----------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------|
| | | Sebelum disemprot reagen Liebermann-Buchard | Setelah disemprot reagen Liebermann-Buchard | |
| 1. | 0,03 | Merah muda | Merah muda | - |
| 2. | 0,08 | Ungu kecoklatan | Ungu kecoklatan | - |
| 3. | 0,15 | Ungu kecoklatan | Ungu kecoklatan | - |
| 4. | 0,19 | Merah muda | Merah muda | - |
| 5. | 0,22 | Merah muda menyala | Merah muda menyala | - |
| 6. | 0,26 | Merah kehitaman | Merah kehitaman | - |
| 7. | 0,34 | Merah muda | Merah muda | - |
| 8. | 0,39 | Merah kehitaman | Merah kehitaman | - |
| 9. | 0,43 | Merah muda menyala | Merah muda menyala | - |
| 10. | 0,50 | Merah muda | Merah muda | - |
| 11. | 0,56 | Hijau kebiruan | Hijau kebiruan | Steroid |
| 12. | 0,65 | Merah muda | Merah muda | - |
| 13. | 0,78 | Merah muda | Merah muda | - |
| 14. | 0,82 | Merah muda | Merah muda | - |
| 15. | 0,95 | Biru | Biru | - |

Berdasarkan data Tabel 4.2 Noda yang diduga senyawa steroid adalah noda berwarna hijau kebiruan dengan Rf 0,56. Senyawa dengan nilai Rf besar terdistribusi ke fase geraknya sedangkan senyawa yang memiliki nilai Rf kecil terdistribusi ke fase diamnya. Berdasarkan penelitian dari Aprelia, (2013), bahwa noda hasil KLTP yang berwarna hijau kebiruan merupakan noda yang positif senyawa steroid. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Al-Quais (2015) steroid memiliki warna hijau sebelum dan sesudah disemprot dengan reagen Liebermann-Buchard. Noda dengan warna hijau kebiruan tersebut dikerok dan dilarutkan dengan etil asetat dan disentrifuge untuk memperoleh senyawa steroid yang diinginkan. Supernatan hasil sentrifugasi diuapkan hingga semua pelarutnya menguap dan diperoleh hasil isolat KLTP sebesar 2 mg.

4.7 Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH

4.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang yang memiliki nilai absorbansi tertinggi dimana hal ini menunjukkan bahwa radikal DPPH memiliki nilai absorbansi yang tinggi pada panjang gelombang tersebut. Pengukuran panjang gelombang dengan spektrofotometer UV-Vis diperoleh panjang gelombang maksimum dari radikal DPPH sebesar 515,0 nm. Panjang gelombang radikal DPPH yang memiliki elektron tidak berpasangan memiliki warna komplementer ungu dengan rentang panjang gelombang antara 515 – 520 nm. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Mardiyah, (2013) bahwa radikal DPPH memiliki panjang gelombang maksimum 515 nm. Puncak panjang gelombang dapat dilihat pada Gambar. 4.5.



Gambar 4.5 Hasil Spektra UV-Vis larutan DPPH 0,2 mM

4.7.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Senyawa Steroid Hasil KLTP

Pengukuran aktivitas antioksidan dari isolat hasil pemisahan dengan KLTP dilakukan dengan menggunakan metode DPPH dengan tiga variasi konsentrasi yaitu konsentrasi 15, 20, 25 ppm menggunakan kontrol DPPH konsentrasi 0,2 mM pada panjang gelombang 515 nm. Larutan kontrol pada tiap harinya akan mengalami penurunan nilai absorbansi, sehingga penggunaan larutan kontrol DPPH selalu dalam keadaan yang masih baru.

Metode DPPH didasarkan pada pengukuran absorbansi dari sisa DPPH yang tidak bereaksi dengan isolat hasil pemisahan dengan KLTP. Penurunan jumlah radikal DPPH ditandai dengan perubahan warna dari ungu menjadi kuning. Perubahan warna terjadi akibat adanya reaksi antara radikal bebas DPPH dengan atom hidrogen dari isolat hasil KLTP menjadi senyawa *1,1diphenyl-2-picrylhydrazin*. Perubahan warna yang terjadi pada penelitian ini tidak sepenuhnya berubah dari ungu menjadi kuning, melainkan hanya memudar menjadi ungu muda.

Parameter yang digunakan untuk mengetahui potensi antioksidan pada senyawa steroid yang terkandung dalam mikroalga *chlorella sp.* yaitu persen (%)

aktivitas antioksidan dan nilai EC_{50} . EC_{50} merupakan konsentrasi larutan sampel yang akan menyebabkan reduksi terhadap aktivitas DPPH sebesar 50 %. Semakin kecil nilai EC_{50} maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya (Molyneux, 2004). Data persen aktivitas antioksidan dari isolat hasil KLTP yang diperoleh kemudian dianalisa menggunakan *software graphPad prism6* dengan persamaan non regresi linier *Regression for analyzing dose-response data*.

Isolat memiliki nilai EC_{50} sebesar 77,78 ppm dimana nilai EC_{50} ini lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak metanol dan ekstrak hasil partisi etil asetat yang memiliki nilai EC_{50} secara berturut-turut yaitu 1334 ppm dan 332,7 ppm pada penelitian Anggraeni, (2014). Grafik nilai EC_{50} dari isolat dapat dilihat pada Gambar 4.6.



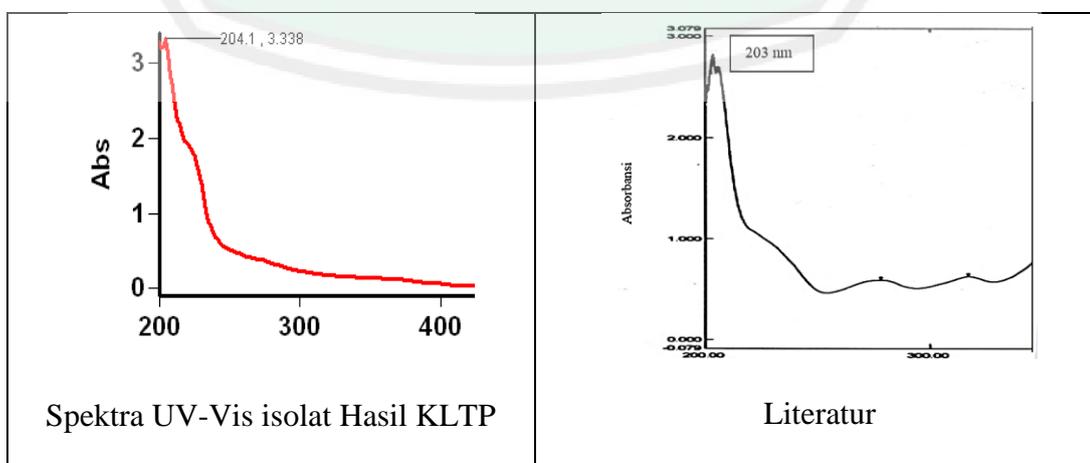
Gambar 4.6 Grafik Nilai EC_{50} Isolat

Isolat steroid memiliki nilai EC_{50} yang lebih kecil dibandingkan dengan ekstrak metanol dan ekstrak hasil partisi. Hal ini diduga karena adanya efek antagonis salah satu senyawa yang terkandung didalam ekstrak partisi etil asetat dan ekstrak metanol. Efek antagonis suatu senyawa dapat menyebabkan penurunan aktivitas senyawa lainnya sehingga menyebabkan aktivitas antioksidan

ekstrak metanol dan ekstrak partisi memiliki nilai EC_{50} lebih besar dibandingkan dengan isolat steroid. Selain itu dapat juga diduga akibat perbedaan jumlah kadar senyawa steroid yang terkandung dalam 1 gram isolat dengan senyawa steroid dalam 1 gram ekstrak. Aktivitas antioksidan Isolat steroid memberikan nilai EC_{50} sebesar 77,78 ppm dimana menurut Wulandari, (2013), dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai EC_{50} kurang dari 50, dikatakan kuat jika nilai EC_{50} antara 50 – 100, dikatakan sedang jika nilai EC_{50} antara 100 – 150, dan dikatakan lemah jika nilai EC_{50} antara 151 – 200, hal ini menunjukkan bahwa isolat hasil KLTP tergolong dalam antioksidan yang kuat.

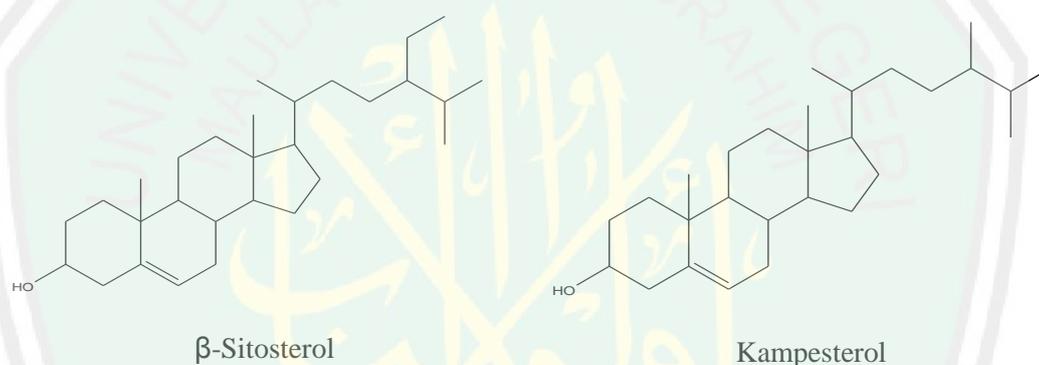
4.8 Identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis

Berdasarkan identifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis diperoleh panjang gelombang maksimum dari isolat steroid adalah 204 nm. Pengukuran panjang gelombang dari pelarut yang digunakan yaitu etanol memiliki panjang gelombang maksimum 209 nm yang menunjukkan bahwa panjang gelombang 204 nm merupakan spektra dari isolat steroid. Gambar spektra UV-Vis dari isolat steroid dapat dilihat pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Spektra UV-Vis Isolat Steroid

Selain itu, hasil spektra dan panjang gelombang isolat steroid dari mikroalga *Chlorella sp.* diperkirakan mendekati dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Aprelia, (2013) dimana diperoleh panjang gelombang senyawa steroid dari tumbuhan paku pada panjang gelombang maksimum 203 nm yang menunjukkan adanya ikatan C=C tidak terkonjugasi serta senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada isolat steroid diduga merupakan senyawa steroid kampesterol dan β -sitosterol.



Gambar 4.8. Dugaan Senyawa Steroid dalam mikroalga *Chlorella sp.* Fraksi Etil Asetat

4.9 Pemanfaatan Mikroalga dan Kandungan Senyawanya dalam Perspektif Islam

Tumbuhan merupakan karunia yang diberikan Allah SWT kepada manusia. Mikroalga merupakan salah satu tumbuhan tingkat rendah yang dapat hidup di air tawar maupun air laut yang telah diciptakan, dimana telah dijelaskan dalam Al-Quran bahwa Allah SWT. telah menciptakan tumbuh-tumbuhan yang memiliki manfaatnya masing-masing. Dalam surat Al-an'am telah dijelaskan bahwa Allah telah menciptakan tumbuh-tumbuhan dari perantara air hujan yang diturunkan dari langit. Tumbuh-tumbuhan tersebut memiliki beranekaragam bentuk dengan

manfaat yang berbeda dari masing-masing tumbuhan, meskipun berasal dari tanah dan air yang sama (Ash-Shiddieqy, 2000). Mikroalga merupakan salah satu tumbuhan yang baik yang memiliki berbagai macam jenis, dimana jenis mikroalga yang digunakan pada penelitian ini adalah *Chlorella sp.* Tumbuhan ini banyak dimanfaatkan pada bidang industri, makanan, dan kesehatan. Pemanfaat yang paling banyak terdapat pada bidang kesehatan.

Sebagaimana Firman Allah SWT dalam surat asy Syu'ara ayat 7:

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

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

Allah SWT telah menciptakan beraneka ragam tumbuh-tumbuhan yang baik di bumi yang menunjukkan keagungan Allah dan kekuasaan-Nya (Ash-Shiddieqy, 2000). Allah menciptakan segala sesuatu tidak ada yang sia-sia. Manusia yang mau berfikir tentang manfaat dari tanaman-tanaman akan mengerti betapa agung kekuasaan Allah SWT sang maha pencipta. Allah tidak menciptakan sesuatu tanpa ada manfaatnya termasuk Mikroalga yang merupakan salah satu tumbuhan baik yang dapat dimanfaatkan. Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan mikroalga berpotensi sebagai antioksidan, antikanker dan antibakteri. Sebagaimana firman Allah dalam surat al Dukhaan ayat 38:

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا لَٰعِبِينَ ﴿٣٨﴾

“Dan Kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya dengan bermain-main.” (Qs. Al Dukhaan/44:38)

Allah menciptakan segala sesuatu yang ada di bumi tidak ada yang main-main. Melainkan semuanya itu diciptakan dengan hikmah yang agung dan tujuan yang mulia (al Qarni, 2008). Allah menciptakan mikroalga *chlorella sp.* memiliki banyak manfaat salah satunya dalam bidang kesehatan, yaitu sebagai obat. Obat merupakan cara untuk menyembuhkan penyakit, berdasarkan hadist nabi Muhammad SAW yang diriwayatkan oleh Imam Bukhari dalam shahihnya, dari shahabat Abu Hurairah bahwasannya nabi bersabda,

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

“Tidaklah Allah turunkan penyakit kecuali Allah turunkan pula obatnya”

Hadist tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT maha adil memberikan suatu penyakit beserta obatnya dan penyakit tersebut akan sembuh sesuai kehendak Allah SWT. (Fattah, 2010). Manusia harus mempelajari banyak ilmu pengetahuan yang akan menuntunnya mendapatkan obat-obat yang diperlukan. Manusia tidak akan mendapatkan tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai obat tanpa adanya usaha dalam mengembangkan ilmu pengetahuan.

Penelitian dalam mendapatkan manfaat dari mikroalga *Chlorella sp.* merupakan bentuk dari usaha untuk mendapatkan bukti atas apa yang telah diberikan oleh Allah SWT. Dalam mikroalga *Chlorella sp.* mengandung senyawa aktif yang berperan dalam bidang kesehatan. Senyawa aktif yang dipisahkan pada penelitian ini adalah senyawa steroid. Senyawa steroid dari mikroalga *chlorella sp.* dipisahkan dengan menggunakan KLTP dengan eluen terbaik yaitu n-heksana : etil asetat dengan perbandingan 4 : 1. Isolat steroid hasil KLTP diuji bioaktivitasnya sebagai antioksidan terhadap DPPH dan memiliki nilai aktivitas

yang cukup baik dengan nilai EC_{50} sebesar 77,78 ppm. Potensi mikroalga *chlorella sp.* sebagai bahan obat membuktikan bahwa mikroalga yang tumbuh pada perairan juga memiliki manfaat bagi manusia.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Nilai EC_{50} isolat hasil KLTP sebesar 77,78 ppm dimana termasuk dalam golongan antioksidan yang kuat.
2. Identifikasi senyawa steroid dengan spektrofotometer UV-Vis diperoleh panjang gelombang maksimum sebesar 204 nm, yang menunjukkan adanya ikatan C=C tidak terkonjugasi.

5.2 Saran

Diperlukan identifikasi senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* dengan instrumen yang dapat memberikan informasi struktur senyawa steroid lebih spesifik seperti LC-MS dan H-NMR.

DAFTAR PUSTAKA

- Agencie, V. 1988. *Terjemah Singkat Tafsir Ibnu Katsier Jilid 3*. Surabaya: Bina Ilmu.
- Al Qarni, 'A. 2008. *Tafsir Muyassar Jilid 4 Juz 24-30*. Jakarta: Qisthi Press.
- Al Quais, K. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak n-Heksana Dan Identifikasi Senyawa Steroid Akar Rumput Bambu (*Lophatherum gracile Brongn*). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Al-Jazairi, S.A. B. J. 2007. *Tafsir Al-Quran Al-Aisar Jilid 2*. Jakarta: Darus Sunnah.
- Amaliyah, S., Achmad G. F., Siti K. B., Umi K., Ahmad H. dan Romaidi. 2013. Uji toksisitas, Antioksidan dan antibakteri dari ekstrak metanol Mikroalga *Chlorella sp.* hasil kultivasi pada media ekstrak tauge. *Jurnal Green technology*.
- Andrian, R. 2013. *Chlorella sp.* [Http://Www.Google.Com/Image](http://www.google.com/image) (Diakses Pada Tanggal 24 Mei 2015).
- Anggraeni, O. N., Achmad G. F., Munirul A., dan Ahmad H. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, Dan N-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- AOAC, 1984. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist, Inc.* Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Aprelia, F. dan Suyatno. 2013. Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Etil Asetat Tumbuhan Paku *Christella Arida* Dan Uji Pendahuluan Sebagai Antikanker. *Jurnal of chemistry* Vol. 2 No. 3 September 2013.
- Ariyanti, D., dan Handayani, N. A. Mikroalga Sebagai Sumber Biomasa Terbarukan: Teknik Kultivasi Dan Pemanenan. *Jurnal Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro*.
- Ash Shiddieqy, T.M.H. 2000. *Tafsir Al-Qur'anul Majid An-Nuur*. Semarang: Pustaka Rizki Putra.
- Ath-Thabari, A. J. M. B. J. 2008. *Tafsir Ath-Thabari*. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Bariyyah, S. K., Achmad G. F., Munirul A., dan Ahmad H. 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.

- Becker. 1994. *Microalgae Biotechnology And Microbiology*. London: Cambridge University Press.
- Bhaigyabati, T., T, Kirithika., J, Ramya., K, Usha. 2011. *Phytochemical Constituents And Antioxidant Activity Of Various Extracts Of Corn Silk (Zea Mays. L). Research Journal Of Pharmaceutical, Biological And Chemical Sciences*. 2(4):986-993
- Bold, E. G. Dan Wynne, M. J. 1985. *Introduction To Algae, Second Edition*. New York: Prentice – Hall Mc. Engelwood Cliffs.
- Borowitzka, M. A. Dan Lesley, J. B. 1988. *Microalgae Biotechnology*. London : Cambridge University Press.
- Chalid, S. Y., Sri A., Dan Suci D. L. 2012. Kultivasi *Chlorella sp.* Pada Media Tumbuh Yang Diperkaya Dengan Pupuk Anorganik Dan *Soil Ekstract. Valensi*, I (6): 298 – 304.
- Chanda, S., Dave, R. 2009. *In Vitro Model For Antioxidant Activity Evaluation And Some Medicinal Plants Possessing Antioxidant Properties: An Overvie. African Journal Of Microbiology Research Vol 3(13) Pp. 981-996 December, 2009.*
- Damianus, M. 2011. Aktivitas Ekstrak Mikroalga Sebagai Inhibitor Helikase Virus Japanese *Encephalitis*. *Skripsi Diterbitkan*. Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- De Godos, I., Hector, O., Guzman, S., Pedro, A., Garcia, E., Eloy, B., Raul, M., dan Virginia, A. 2010. Coagulation/flocculation-based Removal of Algal-bacterial Biomass from Piggery Wastewater Treatment. *Journal Bioresource Technology*, (X): 153 – 158.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1979. *Farmakope Indonesia Edisi Iii. Departemen Kesehatan Republik Indonesia*. Jakarta: X, 333-337.
- Desianti, N., Achmad G. F., dan Tri K. A. 2014. Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan N-Heksan Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Fasya, A. G., Umi K., Suci A., Siti K. B., dan Romaidi. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi Dalam Medium Ekstrak Tauge (Met) Pada Tiap Fase Pertumbuhan. *Jurnal Alchemy Vol. 2 No. 3 Oktober 2013*, hal. 162 – 169.
- Fattah, A. B. A. B. 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*. London: The University of Wisconsin Press.
- Ganjar, I. G., Dan Rohman, A, 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gritter, R, J., J. M. Bobbits, And A. E. Schwarting, 1985. *Introduction To Chromatography (Pengantar Kromatografi), Edisi Ke-2 (Padmawinata, K., Penerjemah)*. Bandung: Penerbit Itb
- Gritter, R, J., J. M. Bobbits, And Arthur, E. S., 1991. *Pengantar Kromatografi*. Penerbit Itb. Bandung.
- Hanani, E., Abdul, M., Dan Ryany, S. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan Dalam Spons *Callyspongia Sp.* Dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol. II No 3: 127 – 133.
- Handayani, N. A., dan Dessy, A. 2012. Potensi Mikroalga Sebagai Sumber Biomasa Dan Pengembangan Produk Turunannya. *Jurnal Teknik-Vol. 33 No. 2 Tahun 2012, Issn 0852-1697*.
- 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 Edisi Kedua: Padmawinata K, Soediro I, Penerjemah*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Harmita, 2006. *Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
- Imamah, N., Achmad G. 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.
- Imani, A. K. F. 2008. *Tafsir Nurul Quran*. Jakarta: Al-Huda.
- Isanansetyo, A., dan Kurniastuti. 1995. *Teknik Kultur Phitoplankton dan Zooplankton Pakan Alami untuk Pembenihan Organisme Laut*. Yogyakarta: Kanisius.
- Joseph, G. S., Jayaprakasha, Selvi A. T., Jena B. S., Sakariah K. K. 2005. *Antiaflatoxic And Antioxidant Activities Of Antidesma Extract. International Journal Of Food Microbiology*, 8: 153-160
- Juniarti, Delvi, O., dan Yuhernita. 2009. Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (*Brine Shrimp Lethality Test*) Dan Antioksidan (1,1-Diphenyl-

- 2- Pikrilhidrazyl) Dari Ekstrak Daun Saga (*Abrus Precatorius L*). *Jurnal Makara, Sains*, Vol. 13, No. 1: 50-54
- Kabinawa, I. N. K. 2001. *Mikroalga Sebagai Sumber Daya Hayati Perairan Dalam Perspektif Bioteknologi*. Bogor: Puslitbang-Biotek. LIPI.
- Kawaroe, M. 2008. *Mikroalga Sebagai Bahan Baku Biofuel. Surfactant And Bioenergy Research Center*, Lembaga Pengabdian Pada Masyarakat. Institut Pertanian Bandung.
- Ketaren, S. 1986. *Pengantar Teknologi Minyak Dan Lemak Pangan*. Jakarta: UI Press.
- Khamidah, U., Achmad G. F., dan Romaidi. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi Dalam Medium Ekstrak Tauge Terhadap *Escherichia Coli* Dan *Staphylococcus Aereus*. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Khopkar, S. M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analistik*. Jakarta: UI Press.
- Koleva, I. I., Teris A. Van Beek, Jozef P. H. L., Aede de Groot, dan Lyuba N. E. 2001. *Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. Journal Phytochemical Analysis*. 2001, 13, 8–17.
- Krisna, I. G. A. P. S. A., Sri R. S., dan Ni L. R. 2014. Senyawa Steroid Pada Daun Gayam (*Inocarpus fagiferus Fosb*) Dan Aktivitasnya Sebagai Antioksidan Terhadap Difenilpikril Hidrazil (DPPH). *Jurnal Kimia* 8 (2), Juli 2014: 251-256.
- Kristanti, A. N., Nanik S. A., Mulyadi T., dan Bambang K. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Kumar Dan Singh, 1979. *A Text Book Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University
- Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida Dan Alkaloida. *Karya Ilmiah Tidak Diterbitkan*. Medan: Mipa Universitas Sumatera Utara.
- Lia, P. I. 2012. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun *Antidesma Neurocarpum Miq.* Dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (Dpph) Dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Dari Fraksi Teraktif. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Depok: Departemen Farmasi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Program Studi Ekstensi Universitas Indonesia.
- Mardiyah, U., Ahmad, G. F., Ahmad, H., Begum, F., dan Suci, A. 2014. Ekstraksi, Uji Aktivitas Antioksidan Dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma Spinosum* Dari Perairan Banyuwangi. *Jurnal Alchemy* Vol. 3 No. 1 Maret 2014, hal 39 – 46.

- Markham, K. R., 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Terjemahan Kosasih Padmawinata. ITB Bandung.
- Miyake, Takashi dan Takayumi S. 1997. Antioxidant activities of natural compound found in plant. *Journal Agric. Food. Chemi.* 45, 1819-1822.
- Molyneux, P. 2004. *The Use Of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (Dpph) For Estimating Antioxidant Activity*. *Songklanarin J. Sci. Technol*, 26 (2), 211-219.
- Mulyono. 2006. *Kamus Kimia*. Jakarta: PT Bumi Aksara.
- Mun'im, A., Azizahwati, Trastiana., 2008. Aktivitas Antioksidan Cendawan Suku *Pleurotaceae* Dan *Polyporaceae* Dari Hutan UI. *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 5(1), 36-41
- Nurmillah, Ovi, Y. 2009. Kajian Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Ekstrak Biji, Kulit Buah, Batang dan Daun Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.). *Skripsi* diterbitkan. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian IPB.
- Oliveira, Naiara M., Carla L. C. M., Rosane, M. A., Djalma M. D. O., Carlos, W. N. M., Sidney, A. V. F. 2015. *Biological Activities Of Extracts From Padina Boergesenii And Sargassum Stenophyllum, Seaweeds Naturally Found In Baia De Todos Os Santos, Brazil*. *Journal International of Pharmamaceutical Science*. Vol 7 Issue 1 2015.
- Persagi (Persatuan Ahli Gizi Indonesia). 2009. *Tabel Komposisi Pangan Indonesia*. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo.
- Pokorni, 2001. *Antioxidant In Food; Practical Applications*. New York: Crs Press.
- Prabowo, D. A. 2009. Optimasi Pengembangan Media untuk Pertumbuhan *Chlorella sp.* pada Skala Laboratorium. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Bogor: Program Studi Ilmu dan Teknologi Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.
- Prakash, A. 2001. *Antioxidant Activity*. *Medallion Laboratories Analytical Progress*, Vol.19(2).
- Pranayogi, D. 2003. *Studi Potensi Pigmen Klorofil Dan Karotenoid Dari Mikroalga Jenis Chlophyceae*. Lampung: Universitas Lampung.
- Prihantini, N. H, Putri B., dan Yuliati R. 2005. Pertumbuhan *Chlorella sp.* Dalam Medium Ekstrak Tauge (Met) Dengan Variasi pH Awal. *Makara, Sains, Ix* (I): 1 – 6.
- Richmond, A.E. 1986. *Microalga Culture*. Tokyo: CRC Press.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Rohman, Abdul. 2007. *Analisis Kimia Farmasi*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.

- Romimohtarto, K. 2004. *Meroplankton Laut*. Jakarta: Penerbit Djambatan.
- Sachlan, M. 1982. *Planktonologi*. Semarang: Fakultas Peternakan dan Perikanan Universitas Diponegoro.
- Saifudin, A., Suparti, F., Anang dan Da'i, M. 2006. Biotransformasi Kurkumin Melalui Kultur Suspensi Sel Daun *Catharanthus roseus [L]* G. Don Berbunga Merah. *Skripsi*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah.
- Sastrohamidjojo, H. 2002. *Kromatografi Cetakan Keempat*. Yogyakarta: Liberty.
- Sax, N. I. and Lewis, R. J. 1987. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*. New York: Van Nostrand Reinhold Company.
- Sherwin, F. R. 1990. *Antioxidant*. In: *Food Additive (Ed. Branen R)*. New York: Marcel Dekker.
- Shivappasad, H. N., S. Mohan, M.D. Kharya, M.R. Shiradkar, & K. Lakhsman. 2005. *In Vitro Models For Antioxidant Activity Evaluation: A Review*. 5 Desember 2009.
- Sidabutar, E. A. 1999. Pengaruh Medium Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella sp.* Terhadap Aktivitas Senyawa Pemacu Pertumbuhan Yang Dihasilkan. *Skripsi*. Institut Pertanian Bandung.
- Sriwahyuni, I. 2010. Uji Fitokimia Ekstrak Tanaman Anting – Anting (*Acalypha Indicia Linn*) Dengan Variasi Pelarut Dan Uji Toksisitas Menggunakan Brine Shrimp (*Artemia Salina Leach*). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Stahl, E. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*. (Diterjemahkan Oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro). Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Stahl, E., 1969. *Apparatus And General Techiques In Tlc. Dalam: Stahl, E.(Ed). Thin Layer Chromatography A Laboratory Handbook*. Terj Dari Dunnschichth Cromatography, Oleh Ashworth, M.R.F. Berlin-Verlag, 61-77
- Steenblock. 1996. *Chlorella Makanan Sehat Alami*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama
- Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi. 2003. *Analisa Bahan Makanan Dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Sudjadi. 1988. *Metode Pemisahan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sulastry, T. dan Nilam K. 2010. Isolasi Steroid Dari Ekstrak Metanol Daun Beluntas (*Plucea indica L*). *Jurnal Chemica* Vol. 11 Nomor 1 Juni 2010). Hlm. 52 – 56.

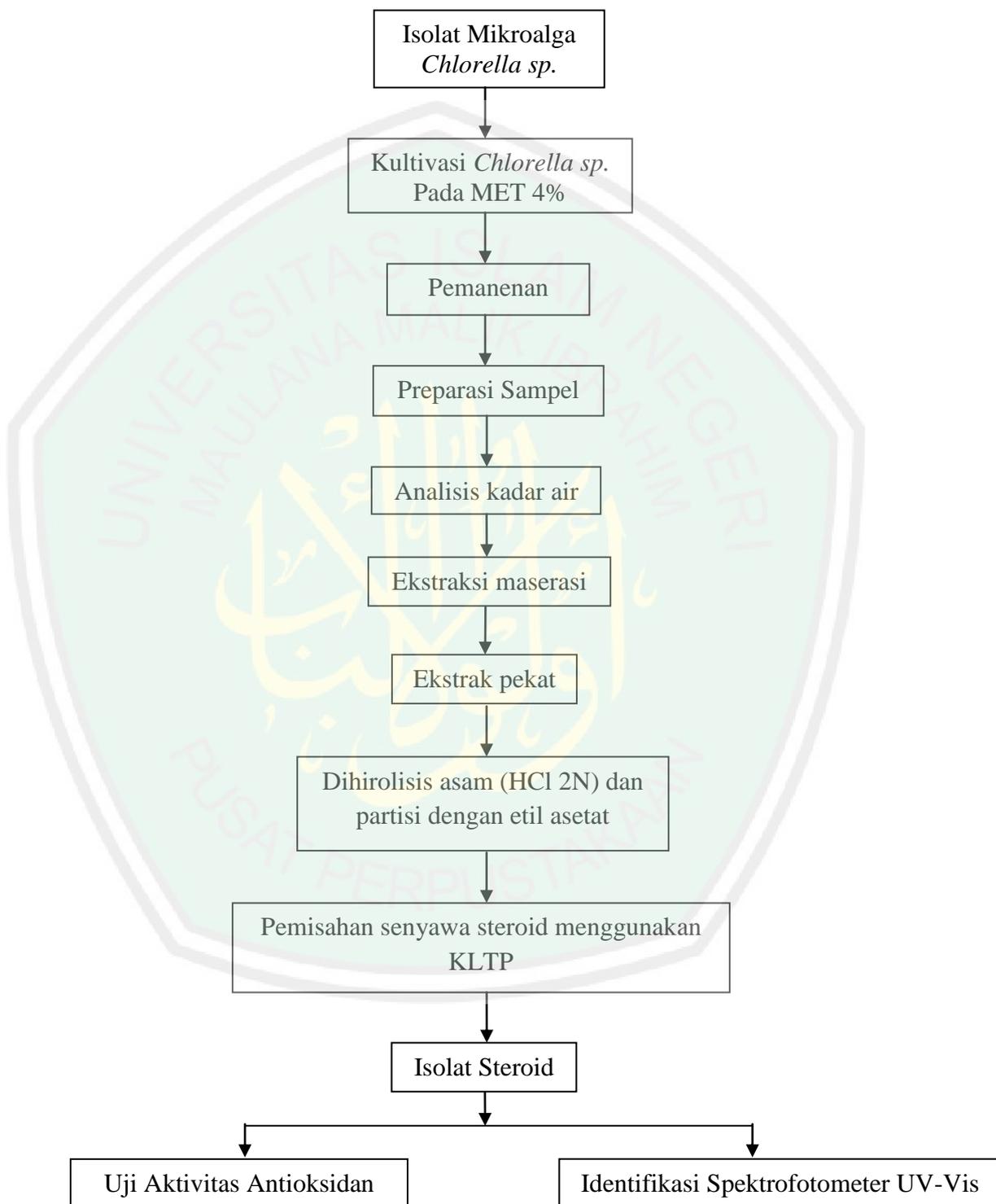
- Sulistijowati, A. dan Didik G. 2001. Efek Ekstrak Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* A. Gray.) Terhadap *Candida albicans* Serta Profil Kromatografinya. Artikel Media Litbangkes Edisi Khusus “Obat Asli Indonesia” Volume VIII No. 3 dan 4. Hlm. 32
- Susilawati, Hafni I. N. S. T., dan Widya, L. 2015. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Steroid Dari Daun Rimbang (*Solanum Torvum*). *Jurnal Repository university of Riau*.
- Syaikh, A. B. M. B. A. B. I. 2006. Tafsir Ibnu Katsir Jilid 3. Jakarta: Penebar Sunnah.
- Tapan, E., 2005. *Kanker, Antioksidan Dan Terapi Komplementer*. Jakarta: PT Gramedia.
- Tensiska, M., 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.. 2007
- Touchtone, J.C., M.F. Dobbins., 1983. *Practice Of Thin Layer Chromatography*. Canada : John Wiley & Sons, 2-12 Van Den Hoek, Dkk., 2002.
- Voight, R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi Edisi Ke-5*. Yogyakarta: Ugm.
- Vonshak, A. 1990. *Recent Advances In Microalgal Biotechnology*. *Jurnal Biotech. Adv. Vol. 8*. Hlm. 713.
- Wahyudi, Priyo. 1999. *Chlorella: Mikroalga Sumber Protein Sel Tunggal*. *Jurnal Sains Dan Teknologi Indonesia* Vol. 1 No. 5 (Agustus 1999). Hlm. 35 – 41.
- Wenno, M. R., Ninik P., Johanna L., dan Thenu. 2010. Ekstraksi Senyawa Antibakteri dari *Chlorella sp.* *Jurnal penelitian Pertanian Terapan* Vol. 10 (2): 131 – 137.
- Winarsi, H. 2007. Radikal Bebas Dan Antioksidan Dalam Antioksidan Alami Dan Radikal Bebas: Potensi Dan Aplikasinya Dalam Kesehatan. *Jurnal*. Yogyakarta. 5-11.
- Wonorahardjo, S. 2013. *Metode-metode Pemisahan Kimia*. Jakarta: Akademia Permata.
- 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*. Jatnagor: Jurusan Biologi FMIPA Universitas Padjajaran.

- Wulandari, M., Nora I., dan Gusrizal. 2013. Aktivitas Antioksidan Ekstrak n-Heksana, Etil Asetat, dan Metanol Kulit Buah Jeruk Sambal (*Citrus microcarpe Bunge*). *Jurnal JKK* tahun 2013, volume 2 (2), 90 – 94.
- Yan, X. Nagata, T., And Xiao, F. 1998. *Antioxidative Activities In Some Common Seaweeds*. *Journal Of Plant Food For Human Nutrition Institute Of Oceanology*, Lii.
- Yudha, A.P.. 2008. Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Dunaliella sp.* pada Umur Panen yang Berbeda. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Bogor : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.



LAMPIRAN

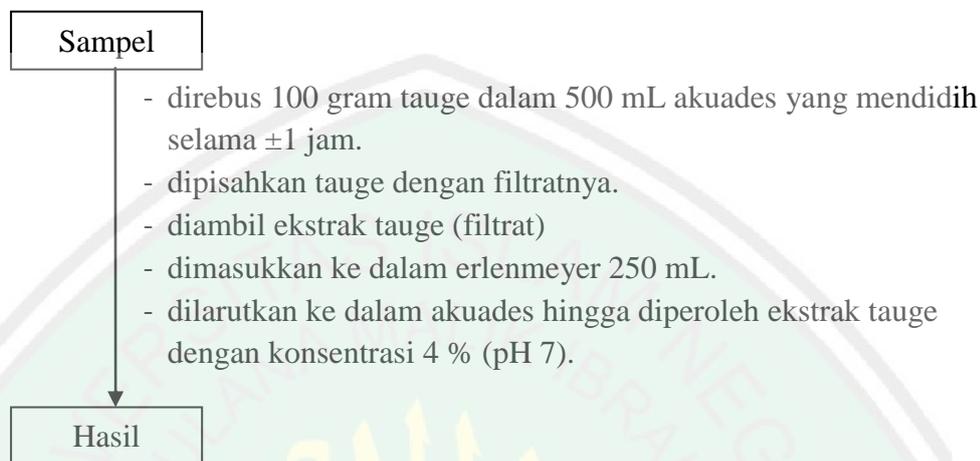
Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian



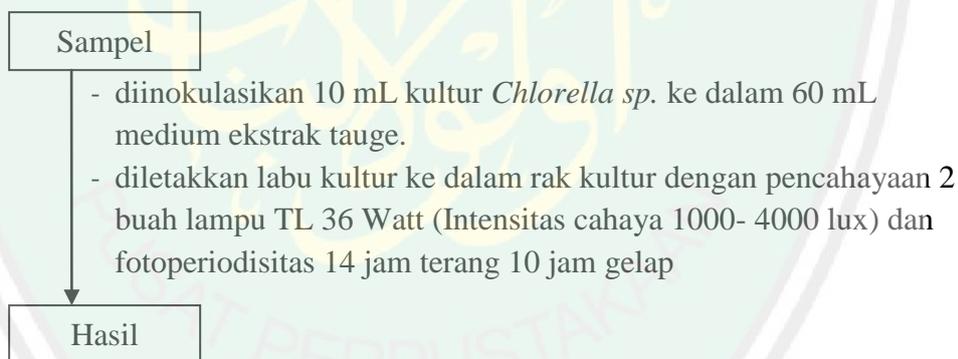
Lampiran 2. Skema Kerja

L.2.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

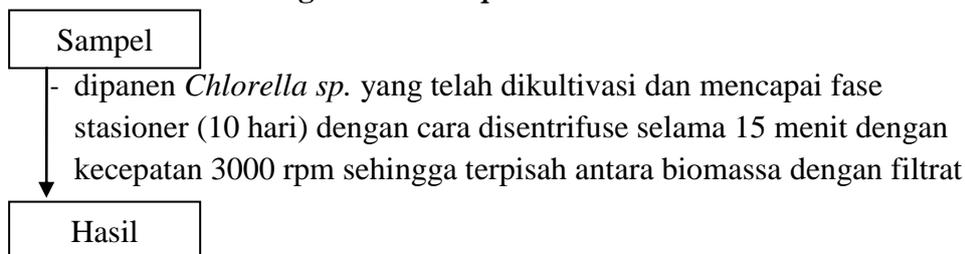
L.2.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)



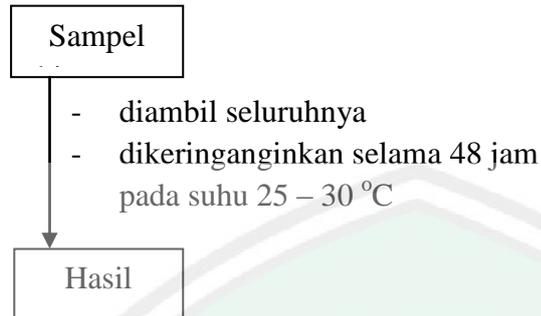
L.2.1.2 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge



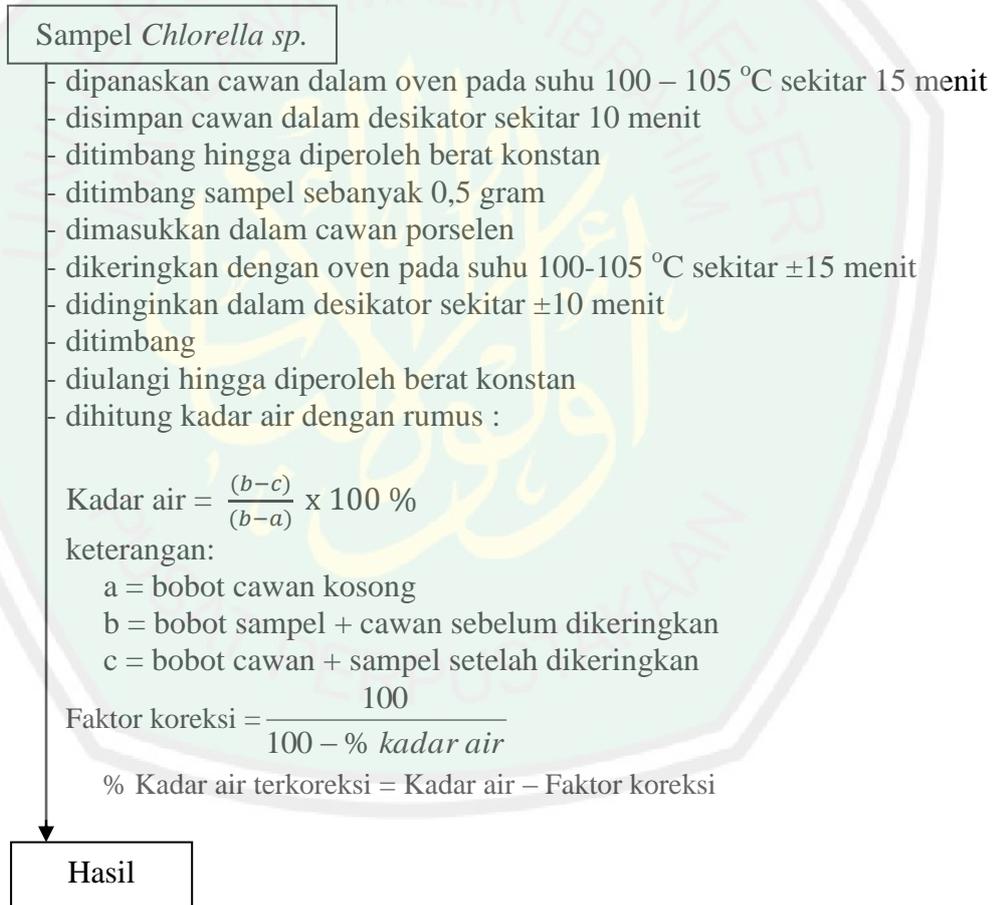
L. 2.1.3 Pemanenan Mikroalga *Chlorella sp.*



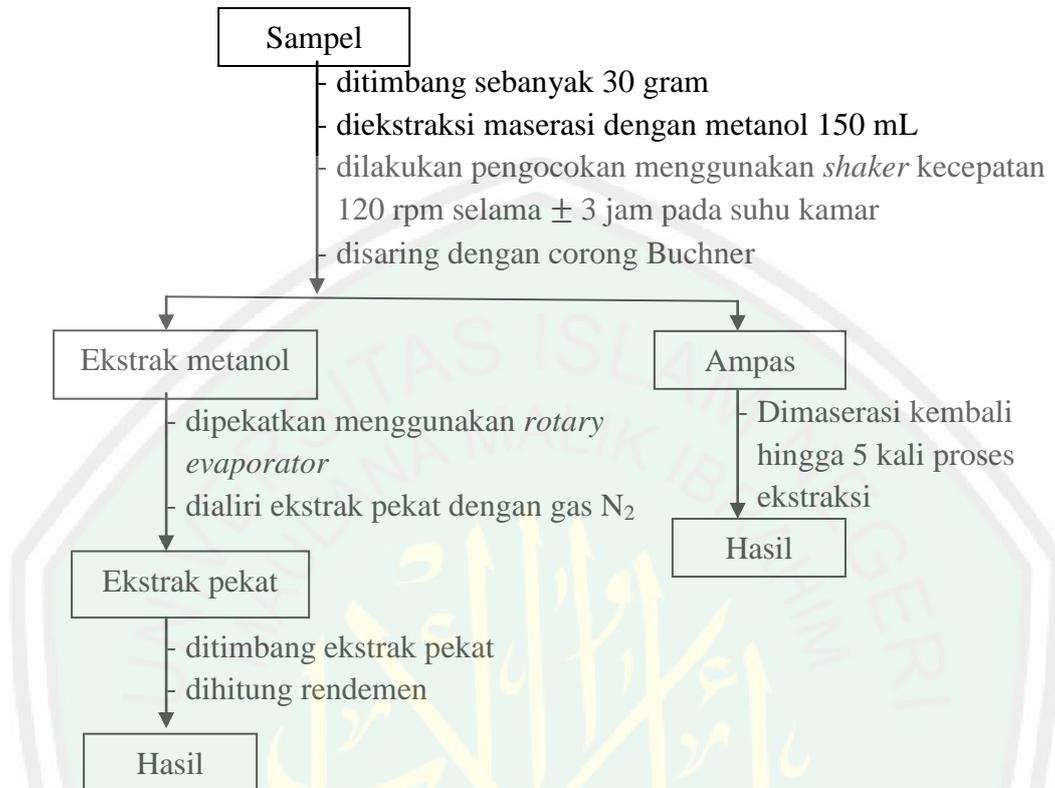
L. 2.2 Preparasi sampel



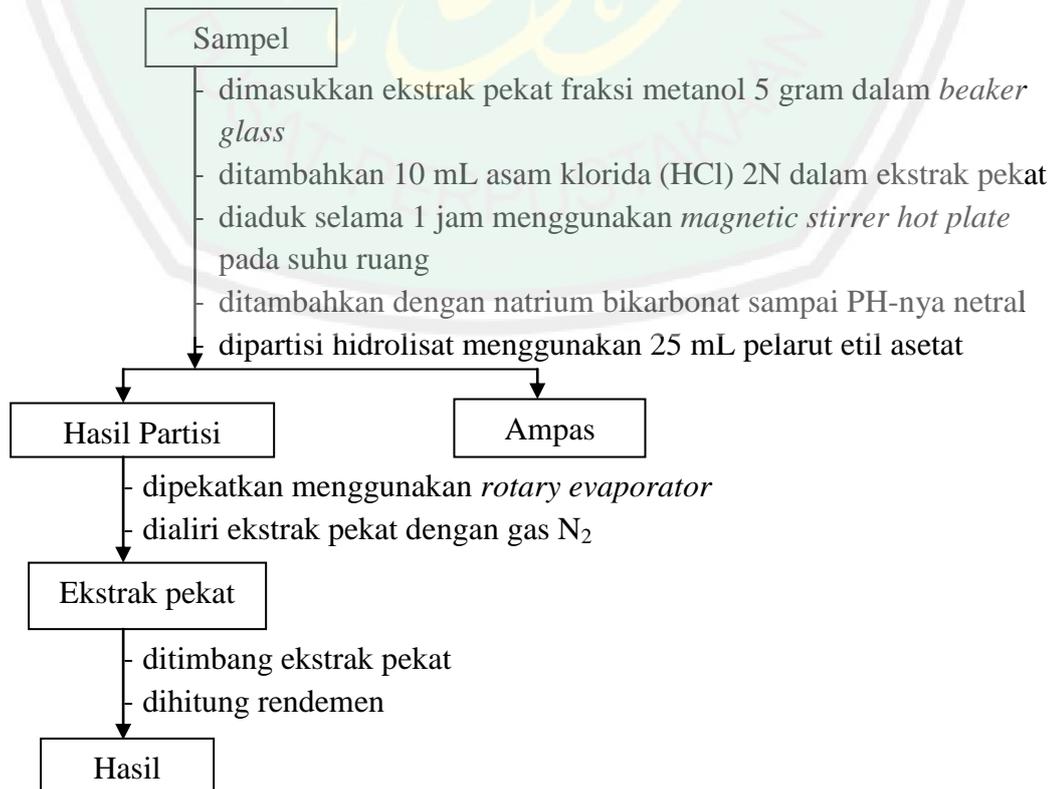
L.2.3 Penentuan Kadar Air Secara Thermogravimetri (AOAC, 1984)



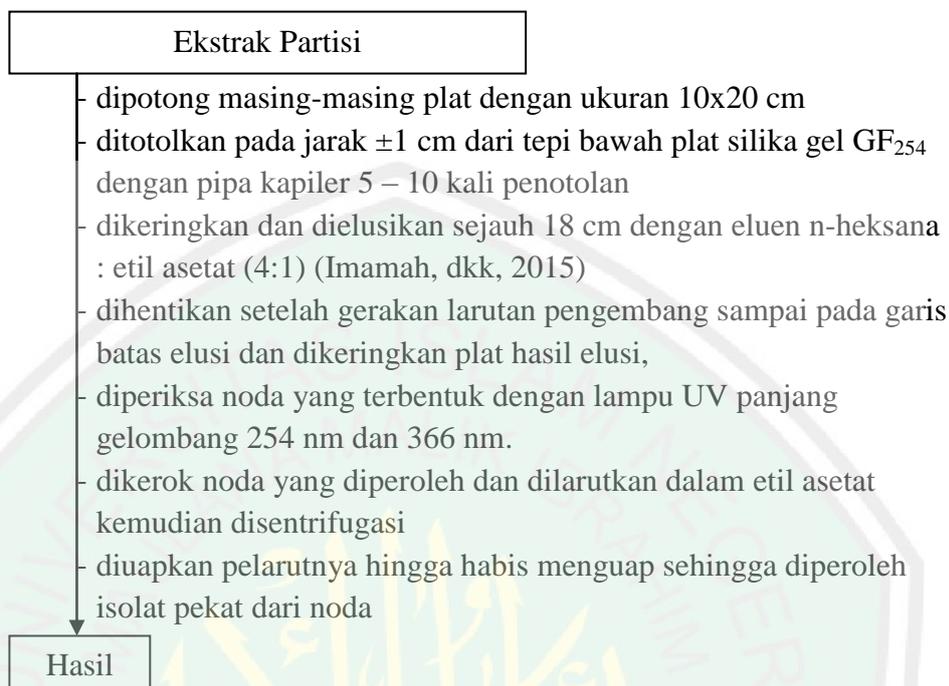
L.2.4 Ekstraksi Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Maserasi



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

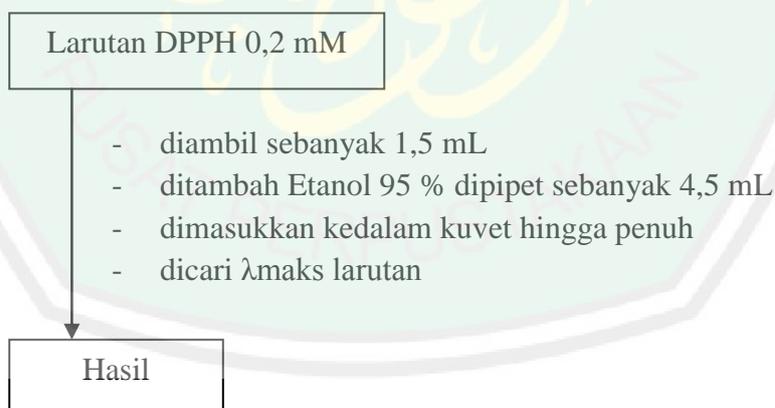


L. 2.6. Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLT Preparatif



L. 2.7 Uji aktivitas Antioksidan dengan DPPH

L. 2.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum



L. 2.7.2 Pengukuran Potensi Antioksidan Pada Sampel

Uji Aktivitas Antioksidan

- dibuat variasi konsentrasi 15, 20, 25 ppm
- dipipet sebanyak 4,5 mL
- ditambahkan 1,5 mL DPPH 0,2 mM kemudian di inkubasi dengan suhu 37 °C
- diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 515,0 nm
- dihitung nilai persen aktivitas antioksidan (Arindah, D. 2010):

$$\text{Aktivitas} = \frac{A \text{ kontrol} - A \text{ Sampel}}{A \text{ kontrol}} \times 100 \%$$

- Kontrol yang digunakan yaitu larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1,5 mL dalam 4,5 mL etanol 95 %. Perbandingan BHT dan Asam karboksilat (vitamin C) diperlakukan seperti sampel.

Hasil

L.2.8 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer UV-Vis

Isolat hasil KLTP

- dilarutkan dengan 9 mL pelarut etanol
- dimasukkan kedalam kuvet hingga sepertiga dari kuvet
- diidentifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200 - 800

Spektra Senyawa Steroid

Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Larutan dan Reagen

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

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

L.3.1.1. Kultivasi dalam Erlenmeyer 1000 mL dengan Memaksimalkan Daya

Tampung Erlenmeyer

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

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

$$x = \frac{9000 \text{ ml}}{60} = 150 \text{ mL Isolat } Chlorella \text{ sp.}$$

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

L.3.1.2. Pembuatan MET 4% sebanyak 900 mL

MET = (aquades + ekstrak tauge)

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

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

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

L.3.1.3. Kultivasi dalam Erlenmeyer 1500 mL dengan Memaksimalkan Daya

Tampung Erlenmeyer

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

$$60x = 12000 \text{ mL}$$

$$x = \frac{12000 \text{ ml}}{60} = 200 \text{ mL Isolat } Chlorella \text{ sp}$$

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

L.3.1.4. Pembuatan MET 4% sebanyak 1200 mL

MET = (aquades + ekstrak taugé)

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

$$= 48 \text{ mL ekstrak taugé}$$

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

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

$$= 1152 \text{ mL}$$

L.3.2. Pembuatan larutan HCl 2 N

BJ HCl pekat = 1,19 g/mL = 1190 g/L

Konsentrasi = 37 %

BM HCl = 36,42 g/mol

n = 1 (jumlah mol ion H⁺)

Normalitas HCl = n x Molaritas HCl

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

$$= \frac{0,37 \times 1190 \text{ g/L}}{36,42 \text{ g/mol}} = 12,09 \text{ N}$$

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

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

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

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

L.3.3. Pembuatan reagen Lieberman-Burchard

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

Cara pembuatannya adalah asam sulfat pekat 5 mL dan anhidrida asetat 5 mL dicampur ke dalam etanol absolut 50 mL, kemudian didinginkan dalam lemari

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

L.3.4. Pembuatan Larutan DPPH 0,2 mM 20 mL

$$Mr \text{ DPPH} = 394,33$$

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

$$Massa = M \times Mr \times Vol$$

$$Massa = 0,2 \frac{mmol}{L} \times 394,33 \frac{g}{mol} \times 0,05 \text{ L}$$

$$Massa = 3,9433 \text{ mg}$$

L.3.5. Pembuatan Variasi Konsentrasi Larutan Sampel

1,1 mg dilarutkan dalam 5 mL etanol 96 %, kemudian di vorteks untuk melarutkan senyawanya.

$$\begin{aligned} ppm &= \frac{mg}{L} \\ &= \frac{1,1 \text{ mg}}{0,005 \text{ L}} = 220 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Konsentrasi 15 ppm

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

$$220 \text{ ppm} \times \kappa = 15 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$\kappa = \frac{75}{220} \text{ mL}$$

$$\kappa = 0,34 \text{ mL} = 340 \mu\text{L}$$

Konsentrasi 20 ppm

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

$$50 \text{ ppm} \times \kappa = 20 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$\kappa = \frac{100}{50} \text{ mL}$$

$$\kappa = 0,46 \text{ mL} = 460 \mu\text{L}$$

Konsentrasi 25 ppm

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

$$50 \text{ ppm} \times x = 25 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$x = \frac{125}{220} \text{ mL}$$

$$x = 0,57 \text{ mL} = 570 \mu\text{L}$$



Lampiran 4. Perhitungan kadar air

L.4.1 Kadar air kering

Tabel pengukuran cawan konstan

| Ulangan | Berat cawan sebelum di panaskan (gram) | Oven 1 | Oven 2 | Oven 3 | Rata-rata |
|---------|----------------------------------------|---------|---------|---------|-----------|
| 1 | 65,4845 | 65,4823 | 65,4812 | 65,4811 | 65,4811 |
| 2 | 57,4563 | 57,4514 | 57,4521 | 57,4503 | 57,4512 |
| 3 | 53,6865 | 53,7919 | 53,7927 | 53,7912 | 53,7919 |

Tabel pengukuran Cawan + Sampel

| Ulangan | Berat cawan + sampel sebelum dioven | Oven 1 | Oven 2 | Oven 3 | Rata-rata |
|---------|-------------------------------------|---------|---------|---------|-----------|
| 1 | 65,9811 | 65,9295 | 65,9267 | 65,9257 | 65,9273 |
| 2 | 57,9503 | 57,9028 | 57,9024 | 57,9013 | 57,9022 |
| 3 | 54,2912 | 54,2409 | 54,2421 | 54,2400 | 54,2410 |

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

Dimana: a = bobot cawan kosong

b = bobot sampel + cawan sebelum dipanaskan

c = bobot cawan + sampel setelah dipanaskan

Perhitungan Kadar Air Kering

$$1. \text{ Kadar air} = \frac{65,9811 - 65,9273}{65,9811 - 65,4811} \times 100\% = 10,76 \%$$

$$2. \text{ Kadar air} = \frac{57,9503 - 57,9022}{57,9503 - 57,4512} \times 100 \% = 9,63 \%$$

$$3. \text{ Kadar air} = \frac{54,2912 - 54,2410}{54,2912 - 53,7919} \times 100 \% = 10,05 \%$$

L.4.2 Kadar air basah

Tabel cawan konstan

| Ulangan | Berat cawan sebelum di panaskan (gram) | Oven 1 | Oven 2 | Oven 3 | Rata-rata |
|---------|----------------------------------------|---------|---------|---------|-----------|
| 1 | 19,1440 | 19,1434 | 19,1433 | 19,1435 | 19,1434 |
| 2 | 34,5545 | 34,5535 | 34,5533 | 34,5539 | 34,5535 |
| 3 | 29,2011 | 29,1999 | 29,1989 | 29,1995 | 29,1994 |

Tabel cawan + sampel sebelum dan sesudah dipanaskan

| Ulangan | Berat cawan + sampel sebelum dioven | Oven 1 | Oven 2 | Oven 3 | Rata-rata |
|---------|-------------------------------------|---------|---------|---------|-----------|
| 1 | 19,6448 | 19,1545 | 19,1552 | 19,1559 | 19,1552 |
| 2 | 35,0539 | 34,5646 | 34,5659 | 34,5650 | 34,5651 |
| 3 | 29,7016 | 29,2110 | 29,2117 | 29,2115 | 29,2114 |

Perhitungan Kadar Air Kering

$$1. \text{ Kadar air} = \frac{19,6448 - 19,1552}{19,6448 - 19,1434} \times 100\% = 97,62 \%$$

$$2. \text{ Kadar air} = \frac{35,0539 - 34,5651}{35,0539 - 34,5535} \times 100\% = 97,74 \%$$

$$3. \text{ Kadar air} = \frac{29,7016 - 29,2114}{29,7016 - 29,1994} \times 100\% = 97,61 \%$$

Tabel Hasil Pengukuran Kadar Air sampel mikroalga *Chlorella sp.* kering dan basah

| Ulangan | Kadar air (%) | |
|---------------|---------------|--------------|
| | Sampel kering | Sampel basah |
| 1 | 10,05 | 97,68 |
| 2 | 10,76 | 97,80 |
| 3 | 9,63 | 97,61 |
| Rata-rata (%) | 10,15 | 97,70 |

Lampiran 5. Perhitungan Randemen

L.5.1 Perhitungan Randemen Hasil Pengeringan

➤ Pemanenan

| No. | Berat botol kosong (gr) | Berat Botol + <i>Chlorella sp.</i> basah (gr) | Berat <i>Chlorella sp.</i> basah (gr) | Berat <i>Chlorella sp.</i> kering (gr) |
|-------|-------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|
| 1. | 150,23 | 269,29 | 119,06 | 7,28 |
| 2. | 149,34 | 292,74 | 143,40 | |
| 3. | 200,69 | 309,21 | 108,52 | |
| 4. | 149,44 | 246,02 | 96,58 | |
| Total | | | 467,56 | |

$$\begin{aligned}
 \text{Randemen} &= \frac{\text{Berat kering}}{\text{Berat basah}} \times 100 \% \\
 &= \frac{7,28 \text{ gr}}{467,56 \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= 0,01557 \times 100 \% \\
 &= 1,557 \%
 \end{aligned}$$

L.5.2 Perhitungan Randemen Hasil Maserasi

➤ Maserasi

| Berat sampel (gr) | Berat wadah (gr) | Berat wadah + ekstrak pekat (gr) | Berat ekstrak pekat (gr) |
|-------------------|------------------|----------------------------------|--------------------------|
| 30,0005 | 65,1469 | 67,7278 | 2,5809 |
| | 68,1975 | 72,1845 | 3,9870 |
| Total | | | 6,5679 |

$$\begin{aligned}
 \% \text{ randemen} &= \frac{\text{ekstrak kasar}}{\text{berat sampel awal}} \times 100 \% \\
 &= \frac{6,5679}{30,0005} \times 100 \% \\
 &= 21,8926 \%
 \end{aligned}$$

L.5.3 Perhitungan Randemen Hasil Partisi

➤ Partisi fraksi etil asetat

| 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 |

$$\begin{aligned}\% \text{ randemen} &= \frac{\text{massa hidrolisat}}{\text{massa sampel awal}} \times 100 \% \\ &= \frac{2,0278}{2,5050} \times 100 \% \\ &= 80,9500 \%\end{aligned}$$



Lampiran 6. Perhitungan Nilai Rf

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

L.6.1 Hasil Nilai Rf KLTP 1

$$\text{Noda 1} = \frac{0,7}{17,8} = 0,0393$$

$$\text{Noda 9} = \frac{7,9}{17,8} = 0,4438$$

$$\text{Noda 2} = \frac{1,2}{17,8} = 0,0674$$

$$\text{Noda 10} = \frac{9,9}{17,8} = 0,5562$$

$$\text{Noda 3} = \frac{2,5}{17,8} = 0,1404$$

$$\text{Noda 11} = \frac{12,1}{17,8} = 0,6798$$

$$\text{Noda 4} = \frac{3,4}{17,8} = 0,1910$$

$$\text{Noda 12} = \frac{12,5}{17,8} = 0,6798$$

$$\text{Noda 5} = \frac{4,1}{17,8} = 0,2303$$

$$\text{Noda 13} = \frac{14,5}{17,8} = 0,8146$$

$$\text{Noda 6} = \frac{4,8}{17,8} = 0,2697$$

$$\text{Noda 14} = \frac{15,5}{17,8} = 0,8708$$

$$\text{Noda 7} = \frac{5,7}{17,8} = 0,3202$$

$$\text{Noda 15} = \frac{16,9}{17,8} = 0,9494$$

$$\text{Noda 8} = \frac{7,4}{17,8} = 0,4157$$

L.6.2 Hasil Nilai Rf KLTP 2

$$\text{Noda 1} = \frac{0,7}{17,8} = 0,0393$$

$$\text{Noda 4} = \frac{3,6}{17,8} = 0,2078$$

$$\text{Noda 2} = \frac{1,3}{17,8} = 0,0730$$

$$\text{Noda 5} = \frac{4,6}{17,8} = 0,2584$$

$$\text{Noda 3} = \frac{2,8}{17,8} = 0,1573$$

$$\text{Noda 6} = \frac{5,1}{17,8} = 0,2865$$

$$\text{Noda 7} = \frac{5,8}{17,8} = 0,3258$$

$$\text{Noda 12} = \frac{13}{17,8} = 0,7303$$

$$\text{Noda 8} = \frac{7,7}{17,8} = 0,4326$$

$$\text{Noda 13} = \frac{14,8}{17,8} = 0,8315$$

$$\text{Noda 9} = \frac{8,2}{17,8} = 0,4607$$

$$\text{Noda 14} = \frac{15,8}{17,8} = 0,8876$$

$$\text{Noda 10} = \frac{9,7}{17,8} = 0,5449$$

$$\text{Noda 15} = \frac{17,0}{17,8} = 0,9551$$

$$\text{Noda 11} = \frac{12,3}{17,8} = 0,6910$$

L.6.3 Hasil nilai Rf KLTP 3

$$\text{Noda 1} = \frac{0,6}{17,8} = 0,0337$$

$$\text{Noda 10} = \frac{8,9}{17,8} = 0,5$$

$$\text{Noda 2} = \frac{1,4}{17,8} = 0,0787$$

$$\text{Noda 11} = \frac{10}{17,8} = 0,5618$$

$$\text{Noda 3} = \frac{2,7}{17,8} = 0,1517$$

$$\text{Noda 12} = \frac{11,5}{17,8} = 0,6460$$

$$\text{Noda 4} = \frac{3,4}{17,8} = 0,1910$$

$$\text{Noda 13} = \frac{13,8}{17,8} = 0,7753$$

$$\text{Noda 5} = \frac{4}{17,8} = 0,2247$$

$$\text{Noda 14} = \frac{14,6}{17,8} = 0,8202$$

$$\text{Noda 6} = \frac{4,6}{17,8} = 0,2584$$

$$\text{Noda 15} = \frac{16,9}{17,8} = 0,9494$$

$$\text{Noda 7} = \frac{6}{17,8} = 0,3371$$

$$\text{Noda 8} = \frac{7}{17,8} = 0,3933$$

$$\text{Noda 9} = \frac{7,7}{17,8} = 0,4326$$

Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian



Gambar Pembuatan Media Ekstrak Tauge



Gambar kultivasi hari ke-0 sampai hari ke-10



Gambar Hasil Pemanenan



Gambar mikroalga *chlorella sp.* setelah pengeringan



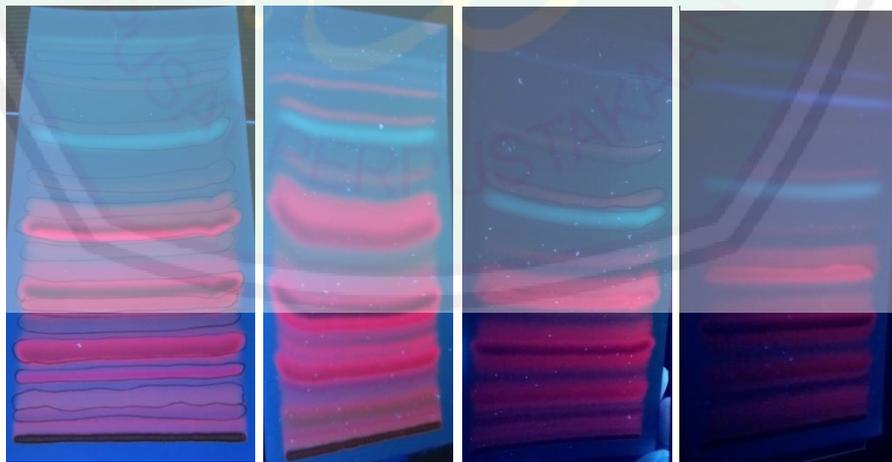
Gambar penentuan kadar air



Gambar Maserasi



Gambar Partisi



Gambar KLTP



Gambar Uji Aktivitas Antioksidan



Gambar Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin C dan BHT

Lampiran 8. Data Uji Aktivitas Antioksidan

| Ekstrak | Nilai EC ₅₀ (ppm) |
|-----------|------------------------------|
| Isolat | 77,78 |
| BHT | 12,27 |
| Vitamin C | 0,21 |

L.8.1 Data Hasil Analisis Kapasitas Antioksidan Isolat Hasil KLTP

| Konsentrasi (ppm) | Ulangan (absorbansi sampel) | | | Rerata | Log [] | Absorbansi Kontrol | Aktivitas Antioksidan (%) |
|-------------------|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------------------|---------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | | | | |
| 15 | 0,1983 | 0,1983 | 0,1982 | 0,1983 | 1,1761 | 0,2004 | 0,8500 |
| 20 | 0,1943 | 0,1941 | 0,1943 | 0,1942 | 1,3010 | 0,2005 | 3,1421 |
| 25 | 0,1917 | 0,1915 | 0,1916 | 0,1916 | 1,3979 | 0,2008 | 4,5817 |

Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Nilai EC₅₀ dihitung menggunakan program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing doseresponse data*” dengan konsentrasi ekstrak 15 – 25 ppm.

| [Ekstrak] (ppm) | Log [Ekstrak] (ppm) | Aktivitas antioksidan (%) |
|-----------------|---------------------|---------------------------|
| 15 | 1,1761 | 0,8500 |
| 20 | 1,3010 | 3,1421 |
| 25 | 1,3979 | 4,5817 |

Sehingga diperoleh persamaan:

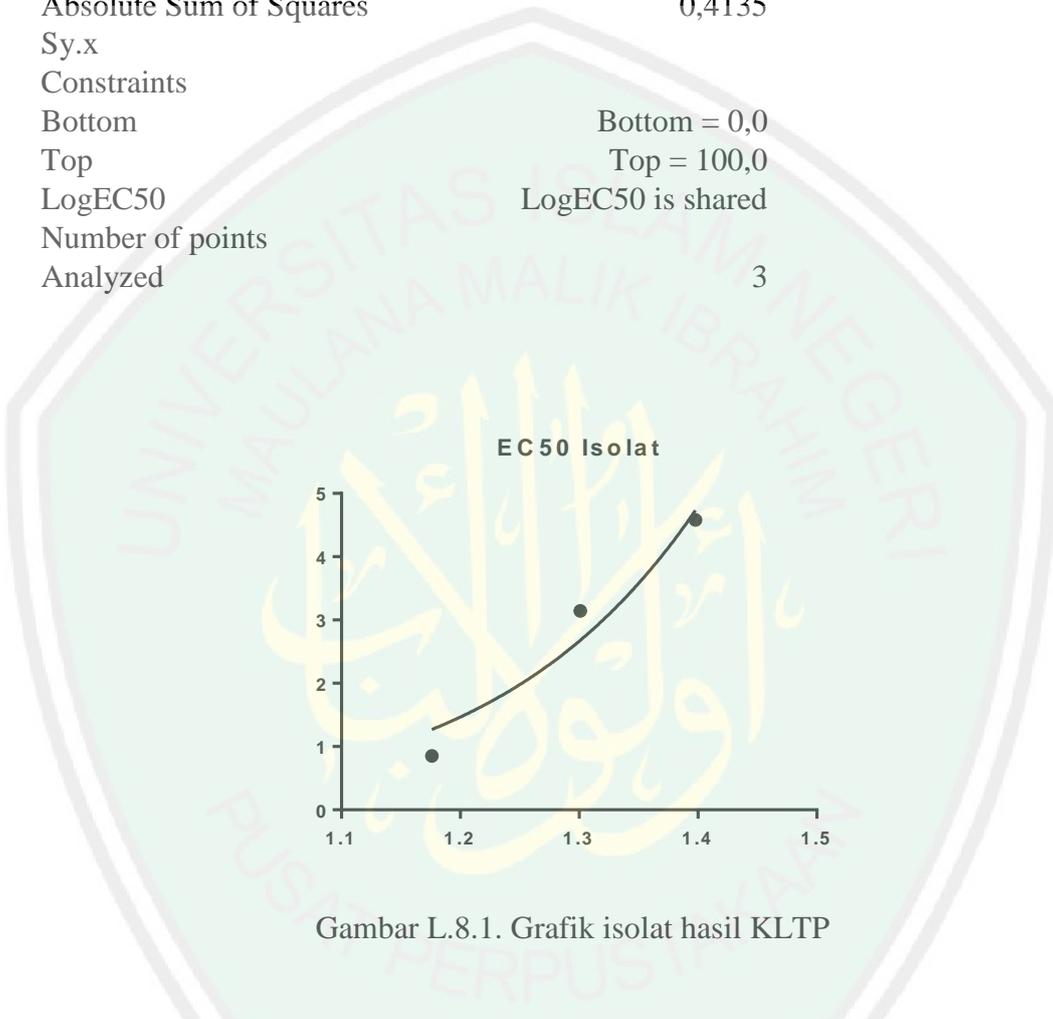
$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top}-\text{Bottom}) / (1+10^{((\text{LogEC}_{50}-X) \cdot \text{HillSlope}))}$$

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

% Aktivitas
Antioksidan

| | | |
|-------------------------------------|------------------|-------------------------------------|
| Comparison of Fits | | Can't calculate |
| Null hypothesis | | LogEC50 different for each data set |
| Alternative hypothesis | | LogEC50 same for all data sets |
| P value | | |
| Conclusion (alpha = 0.05) | | Models have the same DF |
| Preferred model | | LogEC50 different for each data set |
| F (DFn, DFd) | | |
| LogEC50 different for each data set | | |
| Best-fit values | | |
| Bottom | = 0,0 | |
| Top | = 100,0 | |
| LogEC50 | 1,891 | |
| HillSlope | 2,645 | |
| EC50 | 77,78 | |
| Span | = 100,0 | |
| Std. Error | | |
| LogEC50 | 0,1725 | |
| HillSlope | 0,8584 | |
| 95% Confidence Intervals | | |
| LogEC50 | -0,3009 to 4,083 | |
| HillSlope | -8,262 to 13,55 | |
| EC50 | 0,5001 to 12095 | |
| Goodness of Fit | | |
| Degrees of Freedom | 1 | |
| R square | 0,9416 | |
| Absolute Sum of Squares | 0,4135 | |
| Sy.x | 0,6430 | |
| Constraints | | |
| Bottom | Bottom = 0,0 | |
| Top | Top = 100,0 | |
| LogEC50 same for all data sets | | |
| Best-fit values | | |
| Bottom | = 0,0 | |
| Top | = 100,0 | |
| LogEC50 | 1,891 | 1,891 |
| HillSlope | 2,645 | |
| EC50 | 77,78 | 77,78 |
| Span | = 100,0 | |
| Std. Error | | |
| LogEC50 | 0,1725 | 0,1725 |
| HillSlope | 0,8584 | |
| 95% Confidence Intervals | | |
| LogEC50 | -0,3009 to 4,083 | -0,3009 to 4,083 |

| | | |
|---------------------------|-------------------|-----------------|
| HillSlope | -8,262 to 13,55 | |
| EC50 | 0,5001 to 12095 | 0,5001 to 12095 |
| Goodness of Fit | | |
| Degrees of Freedom | | 1 |
| R square | 0,9416 | 0,9416 |
| Absolute Sum of Squares | 0,4135 | 0,4135 |
| Sy.x | | 0,6430 |
| Constraints | | |
| Bottom | Bottom = 0,0 | |
| Top | Top = 100,0 | |
| LogEC50 | LogEC50 is shared | |
| Number of points Analyzed | | 3 |



Gambar L.8.1. Grafik isolat hasil KLTP

L.8.2 Data Hasil Analisis Kapasitas Antioksidan Vitamin C

| Konsentrasi (ppm) | Ulangan (absorbansi sampel) | | | Rerata | Log [] | Absorbansi Kontrol | Aktivitas Antioksidan (%) |
|-------------------|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------------------|---------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | | | | |
| 5 | 0,0497 | 0,0497 | 0,0495 | 0,0496 | 0,6989 | 0,4699 | 89,4446 |
| 10 | 0,0304 | 0,0305 | 0,0303 | 0,0304 | 1,0000 | 0,4696 | 93,5264 |
| 15 | 0,0221 | 0,0223 | 0,0223 | 0,0222 | 1,1760 | 0,4701 | 95,2776 |
| 20 | 0,0214 | 0,0215 | 0,0214 | 0,0214 | 1,3010 | 0,4690 | 95,4371 |
| 25 | 0,0194 | 0,0194 | 0,0194 | 0,0194 | 1,3979 | 0,4688 | 95,8618 |

Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Nilai EC_{50} dihitung menggunakan program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing doseresponse data*” dengan konsentrasi ekstrak 5 – 25 ppm.

| [Ekstrak] (ppm) | Log [Ekstrak] (ppm) | Aktivitas antioksidan (%) |
|-----------------|---------------------|---------------------------|
| 5 | 0,6989 | 89,4446 |
| 10 | 1,0000 | 93,5264 |
| 15 | 1,1760 | 95,2776 |
| 20 | 1,3010 | 95,4371 |
| 25 | 1,3979 | 95,8618 |

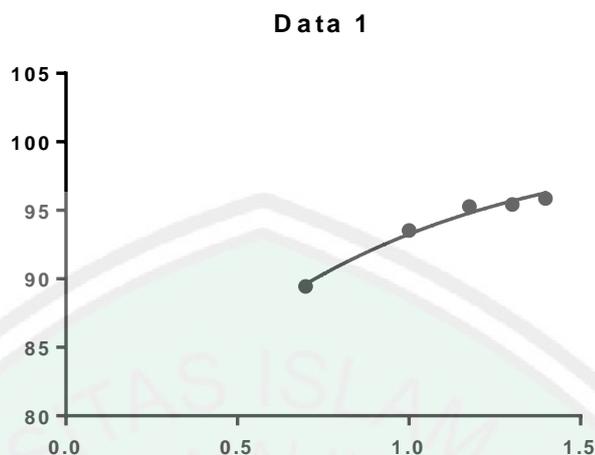
Sehingga diperoleh persamaan:

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

$$Y = 0,0 + (100-0,0) / (1+10^{(0,05531-X)}) \cdot 0,1326$$

| | % Aktivitas Antioksidan | Global (shared) |
|-------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| Comparison of Fits | | Can't calculate |
| Null hypothesis | | LogEC50 different for each data set |
| Alternative hypothesis | | LogEC50 same for all data sets |
| P value | | |
| Conclusion (alpha = 0.05) | | Models have the same DF |
| Preferred model | | LogEC50 different for each data set |
| F (DFn, DFd) | | |
| LogEC50 different for each data set | | |
| Best-fit values | | |
| Bottom | = 0,0 | |
| Top | = 100,0 | |
| LogEC50 | -0,6760 | |
| HillSlope | 0,6807 | |
| EC50 | 0,2108 | |
| Span | = 100,0 | |
| Std. Error | | |
| LogEC50 | 0,1326 | |
| HillSlope | 0,05531 | |
| 95% Confidence Intervals | | |

| | | |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| LogEC50 | -1,098 to -0,2541 | |
| HillSlope | 0,5047 to 0,8567 | |
| EC50 | 0,07980 to 0,5571 | |
| Goodness of Fit | | |
| Degrees of Freedom | 3 | |
| R square | 0,9802 | |
| Absolute Sum of Squares | 0,5575 | |
| Sy.x | 0,4311 | |
| Constraints | | |
| Bottom | Bottom = 0,0 | |
| Top | Top = 100,0 | |
| LogEC50 same for all data sets | | |
| Best-fit values | | |
| Bottom | = 0,0 | |
| Top | = 100,0 | |
| LogEC50 | -0,6760 | -0,6760 |
| HillSlope | 0,6807 | |
| EC50 | 0,2108 | 0,2108 |
| Span | = 100,0 | |
| Std. Error | | |
| LogEC50 | 0,1326 | 0,1326 |
| HillSlope | 0,05531 | |
| 95% Confidence Intervals | | |
| LogEC50 | -1,098 to -0,2541 | -1,098 to -0,2541 |
| HillSlope | 0,5047 to 0,8567 | |
| EC50 | 0,07980 to 0,5571 | 0,07980 to 0,5571 |
| Goodness of Fit | | |
| Degrees of Freedom | | 3 |
| R square | 0,9802 | 0,9802 |
| Absolute Sum of Squares | 0,5575 | 0,5575 |
| Sy.x | | 0,4311 |
| Constraints | | |
| Bottom | Bottom = 0,0 | |
| Top | Top = 100,0 | |
| LogEC50 | LogEC50 is shared | |
| Number of points | | |
| Analyzed | 5 | |



Gambar L.8.2. Grafik vitamin C

L.8.3 Data Hasil Analisis Kapasitas Antioksidan BHT

| Konsentrasi (ppm) | Ulangan (absorbansi sampel) | | | Rerata | Log [] | Absorbansi Kontrol | Aktivitas Antioksidan (%) |
|-------------------|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------------------|---------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | | | | |
| 5 | 0,3513 | 0,3501 | 0,3497 | 0,3503 | 0,6989 | 0,5119 | 31,56570 |
| 10 | 0,2701 | 0,2701 | 0,2703 | 0,2702 | 1,0000 | 0,5117 | 47,19560 |
| 15 | 0,2539 | 0,2561 | 0,2532 | 0,2544 | 1,1760 | 0,5111 | 50,22500 |
| 20 | 0,2027 | 0,2023 | 0,2024 | 0,2025 | 1,3010 | 0,5105 | 60,33300 |
| 25 | 0,1630 | 0,1630 | 0,1628 | 0,1630 | 1,3979 | 0,5099 | 67,85640 |

Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

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

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

| [Ekstrak] (ppm) | Log [Ekstrak] (ppm) | Aktivitas antioksidan (%) |
|--------------------|---------------------|---------------------------|
| 5 | 0,6989 | 31,56570 |
| 10 | 1,0000 | 47,19560 |
| 15 | 1,1760 | 50,22500 |
| 20 | 1,3010 | 60,33300 |
| 25 | 1,3979 | 67,85640 |

Sehingga diperoleh persamaan:

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

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

Comparison of Fits

Null hypothesis

Alternative hypothesis

P value

Conclusion (alpha = 0.05)

Preferred model

F (DFn, DFd)

LogEC50 different for each data set

Best-fit values

LogEC50 1,089

HillSlope 0,8854

EC50 12,27

Std. Error

LogEC50 0,02864

HillSlope 0,1076

95% Confidence Intervals

LogEC50 0,9978 to 1,180

HillSlope 0,5431 to 1,228

EC50 9,950 to 15,14

Goodness of Fit

Degrees of Freedom 3

R square 0,9637

Absolute Sum of Squares 27,71

Sy.x 3,039

LogEC50 same for all data sets

Best-fit values

LogEC50 1,089

HillSlope 0,8854

Can't calculate

LogEC50 different for each data set

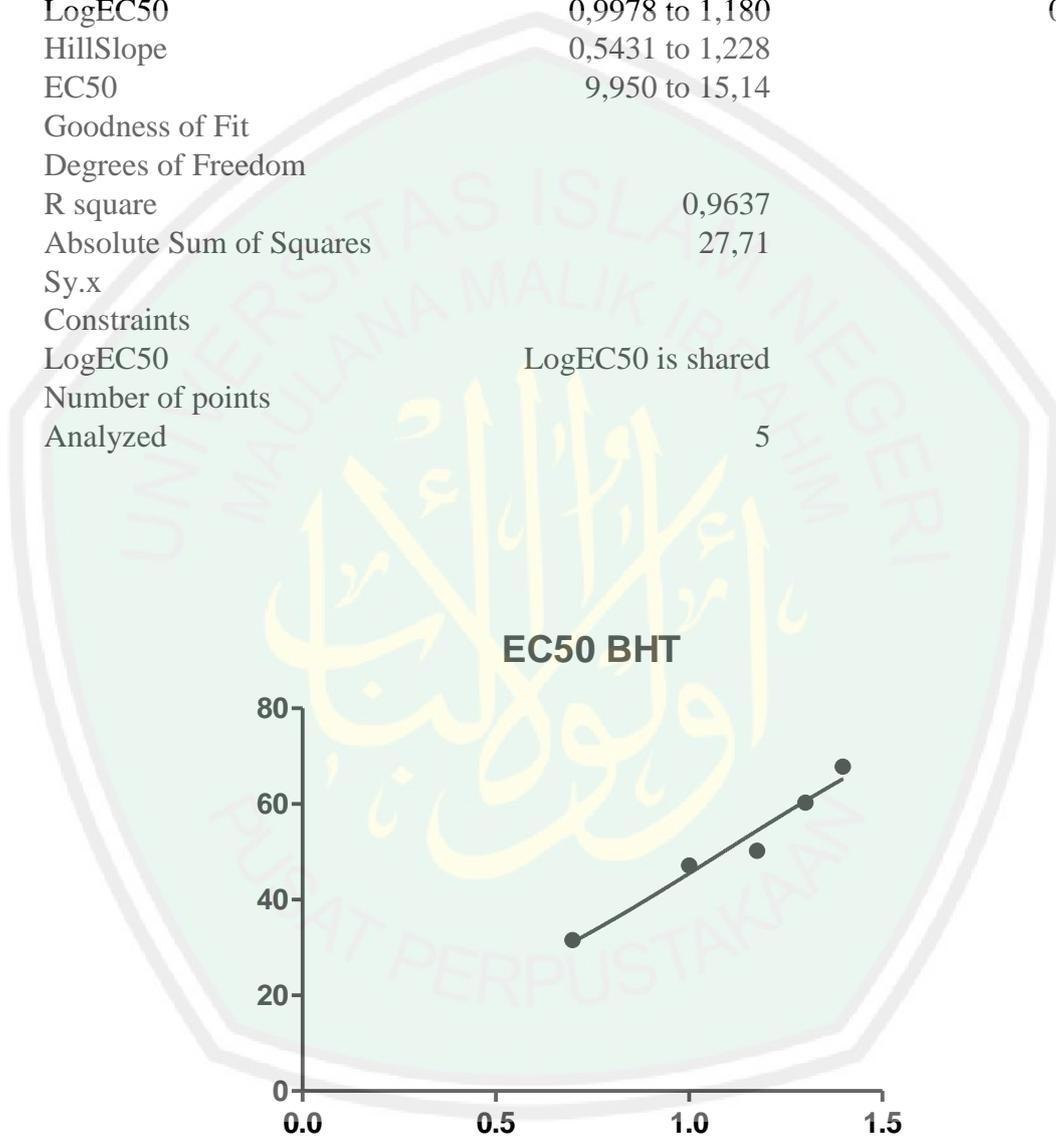
LogEC50 same for all data sets

Models have the same DF

LogEC50 different for each data set

1,089

| | | |
|---------------------------|-------------------|-----------------|
| EC50 | 12,27 | 12,27 |
| Std. Error | | |
| LogEC50 | 0,02864 | 0,02864 |
| HillSlope | 0,1076 | |
| 95% Confidence Intervals | | |
| LogEC50 | 0,9978 to 1,180 | 0,9978 to 1,180 |
| HillSlope | 0,5431 to 1,228 | |
| EC50 | 9,950 to 15,14 | 9,950 to 15,14 |
| Goodness of Fit | | |
| Degrees of Freedom | | 3 |
| R square | 0,9637 | 0,9637 |
| Absolute Sum of Squares | 27,71 | 27,71 |
| Sy.x | | 3,039 |
| Constraints | | |
| LogEC50 | LogEC50 is shared | |
| Number of points Analyzed | 5 | |



Gambar L.8.3. Grafik BHT