

**UJI TOKSISITAS SENYAWA STEROID FRAKSI ETIL ASETAT
MIKROALGA *Chlorella sp.* DENGAN METODE BSLT DAN
IDENTIFIKASI MENGGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER FTIR**

SKRIPSI

Oleh:
MUHARROMATUS SYOFIYAH
NIM. 12630068



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

**UJI TOKSISITAS SENYAWA STEROID FRAKSI ETIL ASETAT
MIKROALGA *Chlorella sp.* DENGAN METODE BSLT DAN
IDENTIFIKASI MENGGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER FTIR**

SKRIPSI

Oleh:
MUHARROMATUS SYOFIYAH
NIM. 12630068

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

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

**UJI TOKSISITAS SENYAWA STEROID FRAKSI ETIL ASETAT
MIKROALGA *Chlorella sp.* DENGAN METODE BSLT DAN
IDENTIFIKASI MENGGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER FTIR**

SKRIPSI

Oleh:
MUHARROMATUS SYOFIYAH
NIM. 12630068

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 30 Agustus 2016

Pembimbing I



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

Pembimbing II



Nur Aini, M.Si
NIDT. 19840608 20160801 2 070

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia**



Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19870620 200604 2 002

**UJI TOKSISITAS SENYAWA STEROID FRAKSI ETIL ASETAT
MIKROALGA *Chlorella sp.* DENGAN METODE BSLT DAN
IDENTIFIKASI MENGGUNAKAN SPEKTROFOTOMETER FTIR**

SKRIPSI

Oleh:
MUHARROMATUS SYOFIYAH
NIM. 12630068

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 30 Agustus 2016

Penguji Utama	: Diana Candra Dewi, M.Si NIP. 19770720 200312 2 001	(..... )
Ketua Penguji	: Rachmawati Ningsih, M.Si NIP. 19810811 200801 2 010	(..... )
Sekretaris Penguji	: A. Ghanaïm Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	(..... )
Anggota Penguji	: Nur Aini, M.Si NIDT. 19840608 20160801 2 070	(..... )

Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia



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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Muharromatus Syofiyah
NIM : 12630068
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Uji Toksisitas Senyawa Steroid Mikroalga *Chlorella*
sp. dengan Metode BSLT dan Identifikasi
Menggunakan Spektrofotometer FTIR

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

Malang, 8 September 2016
Yang membuat pernyataan,



Muharromatus Syofiyah
NIM. 12630068

PERSEMBAHAN

Alhamdulillahilahi rabbil' alamin..

Sebuah karya ini ku dedikasikan untuk:

Ibu (Choiriyah), atas do'a terbaik yang selalu mengiringi dalam setiap langkahku.

Ayah (Alm. Solichan), terima kasih pernah memberikan aku kasih sayang yang tiada tara, pemberian terbaik yang belum sempat ku balas. Terima kasih selalu menemani perjuanganku hingga nafas terakhirmu. Maafin aku yang belum sempat mengukir senyum manis dibibirmu. Pengen banget foto wisuda bareng sama ayah, tapi apalah daya Tuhan perencana terbaik berkehendak lain. Semoga semangat dan sifat pantang menyerahmu selalu menjadi tauladan bagiku. No Pain, No gain.

Kakak-kakakku (Hida, Hanum, Mif) tercinta, pendukung dan pemberi solusi yang bisa diandalkan.

Dan yang terakhir untuk Zarkasih Hendri Kholili, all I can say is thanks.

“MITOS, LOGOS, ETOS”

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur penyusun ucapkan atas kehadiran Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Yang Maha Penyayang, dimana dengan limpahan rahmat, taufik dan hidayah Nya penyusun dapat menyelesaikan laporan skripsi ini dengan semaksimal mungkin. Sholawat serta salam selalu tercurah limpahkan kepada junjungan kita Nabi akhir zaman, yang merupakan pencetus kehidupan keadilan, revolusionis dunia, penuntun umatnya agar senantiasa berlandaskan al-Qur'an dan al-Hadist serta suritauladan terbaik yaitu Nabi Muhammad SAW.

Syukur Alhamdulillah penyusun ucapkan atas terselesaikannya laporan hasil penelitian dengan judul **“Uji Toksisitas Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Metode BSLT dan Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer FTIR”**. Laporan skripsi ini dimaksudkan sebagai salah satu syarat untuk memenuhi kewajiban jenjang S1 dalam tugas akhir berupa skripsi.

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

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

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

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

Dengan menyadari atas terbatasnya ilmu yang penyusun miliki, laporan skripsi ini tentu jauh dari kata sempurna. Untuk itu penyusun dengan senang hati mengharapkan kritik dan saran untuk perbaikan dalam penyusunan laporan selanjutnya. Terlepas dari segala kekurangan, semoga laporan skripsi ini dapat memberikan informasi dan kontribusi positif serta bermanfaat bagi kita semua. Amiin.

Malang, 10 Mei 2016

Penyusun

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
SURAT PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	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	7
1.5 Manfaat Penelitian.....	7
BAB II STUDI PUSTAKA	8
2.1 Tumbuhan dalam Perspektif Al-Qur'an	8
2.2 Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	10
2.3 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam Medium Ekstrak Tauge (MET)	12
2.4 Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	15
2.4.1 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	15
2.4.2 Hidrolisis dan Partisi.....	17
2.4.3 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLTP)	19
2.4.4 Senyawa Steroid	21
2.4.5 Uji Toksisitas Senyawa Steroid dengan <i>Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)</i> Terhadap Larva Udang <i>Artemia Salina</i> Leach.	22
2.4.6 Identifikasi Steroid menggunakan Spektrofotometer Infra Merah.....	25
BAB III METODE PENELITIAN	26
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	26
3.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	26
3.2.1 Alat-alat Penelitian.....	26
3.2.2 Bahan-bahan Penelitian.....	26
3.3 Rancangan Penelitian.....	28
3.4 Tahapan Penelitian.....	28

3.5 Pelaksanaan Penelitian.....	28
3.5.1 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	28
3.5.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %....	28
3.5.1.2 Kultivasi <i>Chlorella sp.</i> dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %	29
3.5.1.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	29
3.5.2 Preparasi Sampel Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	29
3.5.3 Analisis Kadar Air Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	29
3.5.4 Ekstraksi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan Maserasi	30
3.5.5 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	31
3.5.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)	31
3.5.7 Uji Toksisitas Senyawa Steroid terhadap Larva Udang <i>Artemia Salina</i> Leach.....	32
3.5.8.1 Penetasan Larva Udang <i>Artemia Salina</i> Leach.....	32
3.5.8.2 Uji Toksisitas	32
3.5.8 Identifikasi Senyawa Steroid Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan Spektrofotometer FTIR	33
3.5.9 Analisis Data	34
BAB IV PEMBAHASAN.....	36
4.1 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	36
4.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %	37
4.1.2 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %	37
4.1.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	38
4.2 Preparasi Sampel Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	39
4.3 Analisis Kadar Air Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	40
4.4 Ekstraksi Senyawa Aktif Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	40
4.5 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	42
4.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)	44
4.7 Uji Toksisitas Senyawa Steroid terhadap Larva Udang <i>Artemia</i> <i>salina</i> Leach.....	47
4.7.1 Penetasan Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	47
4.7.2 Uji Toksisitas	48
4.8 Identifikasi Senyawa Steroid Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan Spektrofotometer FTIR	52
4.9 Pemanfaatan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam Perspektif Islam	55
BAB V PENUTUP.....	61
5.1 Kesimpulan	61
5.2 Saran	61
DAFTAR PUSTAKA	62
LAMPIRAN.....	68

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Hasil KLT Preparatif senyawa steroid fraksi etil asetat Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> pada eluen n-heksana:etil asetat (4:1) pada sinar UV λ 366 nm.....	45
Tabel 4.2	Hasil uji toksisitas isolat steroid hasil KLTP mikroalga <i>Chlorella sp.</i> menggunakan metode BSLT	49
Tabel 4.3	Nilai LC ₅₀ masing-masing ekstrak, fraksi dan isolat steroid mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	52



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Kurva pertumbuhan mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	14
Gambar 2.2	Reaksi dugaan hidrolisis ikatan O-glikosida	18
Gambar 2.3	Dugaan mekanisme reaksi LB	21
Gambar 2.4	Kerangka dasar karbon steroid dan sistem penomorannya.....	22
Gambar 4.1	Hasil pemisahan senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan KLT Preparatif pada sinar UV λ 366 nm... ..	46
Gambar 4.2	Kurva hubungan antara konsentrasi (x) dan percent (y) isolat steroid hasil KLTP mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	50
Gambar 4.3	Spektra Infra Merah isolat hasil pemisahan dengan KLT Preparatif mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	53
Gambar 4.4	Senyawa steroid golongan ester.....	55



ABSTRAK

Syofiyah, M. 2016. **Uji Toksisitas Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Metode BSLT dan Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer FTIR**

Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Nur Aini M.Si; Konsultan: Rachmawati Ningsih, M.Si

Kata Kunci: Steroid, *Chlorella sp.*, Etil Asetat, Toksisitas, Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Fraksi etil asetat *Chlorella sp.* mengandung senyawa steroid. Steroid merupakan senyawa metabolit sekunder yang mempunyai bioaktivitas sebagai antibakteri, antioksidan yang memiliki sifat toksik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat toksisitas senyawa steroid hasil KLTP dan identifikasi senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* dengan spektrofotometer FTIR.

Mikroalga *Chlorella sp.* dikultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %. Biomassa yang dihasilkan dipreparasi hingga menjadi padatan berbentuk serbuk kemudian dimaserasi menggunakan pelarut metanol. Hasil maserasi dihidrolisis menggunakan HCl 2 N dan dipartisi dengan pelarut etil asetat. Ekstrak hasil partisi dipisahkan dengan *Rotary evaporator vacum*. Ekstrak pekat yang diperoleh dilakukan pemisahan senyawa steroid dengan KLTP. Noda hijau kebiruan yang menunjukkan senyawa steroid diuji toksisitasnya menggunakan metode BSLT dan diidentifikasi senyawa steroid dengan spektrofotometer FTIR.

Hasil penelitian diperoleh rendemen ekstrak metanol *Chlorella sp.* sebesar 13,7122 % dan rendemen ekstrak pekat hasil hidrolisis dan partisi diperoleh 80,95 %. Ekstrak hasil hidrolisis dilakukan pemisahan steroid menggunakan KLTP menggunakan eluen terbaik n-heksana:etil asetat (4:1) menghasilkan 15 noda. Noda ke 11 berwarna hijau kebiruan merupakan senyawa steroid dengan Rf 0,7222. Hasil pemisahan steroid dilakukan uji toksisitas dengan metode BSLT dan diperoleh nilai LC_{50} sebesar 14,9625 ppm. Identifikasi senyawa steroid menggunakan spektrofotometer FTIR yang menunjukkan gugus fungsi O-H, geminal dimetil, C=O, C=C, C-OH sekunder dan =C-H (alkena) yang diduga merupakan senyawa steroid.

ABSTRACT

Syofiyah, M. 2016. **Toxicity Test of Steroid Compounds in Ethyl Acetate Fraction from Microalgae *Chlorella sp.* by BSLT Method and Identification Using FTIR Spectrophotometer**

Advisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Advisor II: Nur Aini, M.Si;
Consultant: Rachmawati Ningsih, M.Si

Keywords: Steroid, *Chlorella sp.*, Ethyl Acetate, Toxicity, Thin Layer Chromatography (TLC) preparative

Ethyl acetate fraction of *Chlorella sp.* has steroid which is containing compounds. Steroid is one of the secondary metabolit has bioactivity as antibacterial, antioxidant and has a toxic characteristic. The purpose of this research is to know the toxicity levels of steroid compounds from TLC preparative result and identification steroid compounds in ethyl acetate fraction of microalgae *Chlorella sp.* using FTIR spectrophotometer.

Cultivation of microalgae *Chlorella sp.* performed with sprouts extract medium. Biomass result should be on prepared to form a solids powder, and then maceration it uses methanol solvent. The result of maceration then hydrolyzed is using HCl 2 N and partitioned is using ethyl acetate solvent. The extract was concentrated partition result with *Rotary evaporator vacum*. The thick extract produced have been separate of steroid compound with TLC preparative. Bluish green stains that indicated toxicity steroid compound tested by BSLT method and identify steroid compound using FTIR spectrophotometer.

The result of the research were obtained yield methanol extract of *Chlorella sp.* is 13,7122 % and yield hydrolysis and partition extract of 80,95 %. Hydrolysis extract then the separation to steroid by TLC preparative using the best eluent which is n-hexane: ethyl acetate (4: 1) which yielded 15 spots. Spots 11th bluish green at Rf 0,7222 a suspected steroid compounds. Purity result do toxicity test by BSLT method and yield the LC₅₀ value of 14,9625 ppm. Identifying steroid compound uses FTIR spectrophotometer which is showed that isolates suspected of steroid compound with the force function that have O-H, dimethyl gem, C=O, C=C, C-OH secondary and =C-H (alkene).

الملخص

صفية، م. 2016. تجويب مطياف محلول ملحي اختبار الروبيان الفتك (BSLT) الستيريد المستخضر مركبات خلات الايتيل جزء من الطحالب سلوريلا س.ف. وتحديد باستخدام التحليلي فورييه مطياف الاعمشة تحت الحمراء (RITF) المشرف الأول: احمد غناعم فاشا الماجستير، المشرف الثاني: نور عيني، الماجستير مستشارة: رحموتى نيغسيه، الماجستير

كلمات البحث : السترويد ، سلوريلا س.ف.، الإيتيل السينات، تحريب السمية ، إعدادي طبقة رقيقة اللوني (CLT)

خلات الإيتيل جزء من طحلب الذي يحتوي على مركب السترويد. الستيريد ويدهي المركبات الثوية التي لها الفشاط الحيوي بمضاد حيوي , خصا نص مضادة للاكسدة من السم. هذا البحث يهدف إلى تحديد مستوى سمية النتائج مركبات السترويد إعدادي طبقة رقيقة اللوني (CLT) وتحديد السترويد مركبات خلات الإيتيل جزء من طحالب سلوريلا بمعمل التحليلي فورييه مطياف الاعمشة تحت الحمراء (RITF) .

الطحالب سلوريلا س.ف براعم الفاصوليا المزروعة فى استخراج المتوسطة (TEM) إعداد الكتلة الحيوية مما أدى إلى تكون مواد صلبة فى شكل مسحوق ثم متاكلة باستخدام الميثانول. النتائج النقع تحلل باستخدام حامض الهيدوكلوريك N₂ وتفسم مع مذيب خلات الإيثيل. إستخراج النتائج التقسيم شددت المبخر فراغ دوارة. خلاصة مركزة تم الحصول عليها يتم فصل مركبات السترويد مع إعدادي طبقة رقيقة اللوني (CLT) . البقع الخضراء التي تشير إلى سمية السترويدية مركبات اختبار باستخدام على طريقة محلول ملحي اختبار الروبيان الفتك (BSLT) تحديدها باستخدام ألتى الحصول علي الستيريد مركبات مع التحليلي فورييه مطياف الاعمشة تحت الحمراء (RITF) الطيف.

وقد تم الحصول على نتائج العائد من استخراج الميثانول سلوريلا من طحلب ٣١, ٢٢١٧% والعائد من المركز استخراج والتقسيم المائي ٨٠, ٥٩% . استخراج التحلل الفصل بين استخدام السترويد مع إعدادي طبقة رقيقة اللوني (CLT) باستخدام أفضل شاطف ن الهكسان : خلات الإيثيل (٤ : ١) أسفرت عن ١٥ البقع. وصمة عار ١١

الخضراء مضاءة مركب الستيرويد مع الترددات اللاسلكية ٠, ٢٢٢٧. بلغت التقاء سمية أجريت مع طريقة محلول ملحي اختبار الروبيان الفتك (BSLT) والقيم التي تم الحصول عليها LC_{50} من ٤١, ٥٢٦٩ جزء في المليون. تحديد مركبات الستيرويد باستخدام التحليلي فورييه مطياف الاعمشة تحت الحمراء (RITF) معمل تظهر مجموعة وظيفية يا OH، غيمينلديميتيل , C=C،C=O، الثانوي و C-H = (الألكينت) تعزى لمركبات الستيرويد.



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Steroid merupakan senyawa metabolit sekunder dalam bahan alam yang mempunyai beragam bioaktivitas yang umumnya digunakan sebagai pendekatan fitofarmakologi. Efek farmakologi yang ditimbulkan oleh steroid pun berbeda. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Renai Sante Institute of Integrative Medicine dalam Sapar, dkk., (2004), menunjukkan bahwa salah satu efek farmakologis dari β -sitosterol adalah kemampuan menghambat kerja enzim yang mengkonversi testosteron menjadi dehidrotestosteron (DHT) yang merupakan penyebab terjadinya kanker prostat. Diastuti dan Warsinah (2010) dalam jurnalnya menyebutkan bahwa steroid pada kulit batang *Rhizopora mucronata* memiliki sitotoksitas terhadap sel Myeloma (tumor ganas). Berbagai manfaat yang berbeda disebabkan karena derivat steroid yang dihasilkan oleh organisme mempunyai variasi yang beragam.

Sumber steroid dapat berasal dari hewan dan tumbuhan. Sumber steroid yang berasal dari hewan disebut kolesterol, sedangkan steroid yang berasal dari tumbuhan dikenal dengan nama fitosterol. Senyawa steroid yang akan digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari tumbuhan. Oleh karena itu, keadaan ini dapat menjadi peluang untuk membantu upaya optimalisasi pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan baku terutama dalam bidang farmasi. Sebagaimana firman Allah SWT dalam surat asy Syuara' ayat 7:

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

“Dan apakah mereka tidak memerhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam (tumbuh-tumbuhan) yang baik?” (QS. asy Syuara’/19:7)

Berdasarkan tafsir Al-Misbah, ayat tersebut mengajak manusia untuk mengarahkan pandangan hingga batas kemampuannya memandang sampai batas seastero bumi, dengan keanekaragaman tumbuh-tumbuhan yang memiliki banyak manfaat dan tak terhitung jumlahnya (Shihab, 2001). Manusia sebagai kholifah di muka bumi diharapkan dapat mengetahui kebesaran Allah SWT atas berbagai macam tumbuhan yang baik dan memiliki manfaat didalamnya. “Tumbuh-tumbuhan yang baik”, kata baik disini tidak hanya diartikan sebagai “baik” secara dhohir (luar), melainkan dapat diartikan lebih luas lagi terkait dengan kandungan dan manfaat dari tumbuh-tumbuhan tersebut (Shihab, 2001). Allah menyuruh kita untuk memerhatikan secara mendalam, sehingga sampai kepada rahasia yang terkandung dalam tumbuh-tumbuhan. Pembelajaran tersebut digunakan untuk mengetahui perubahan tumbuhan dari satu keadaan ke keadaan yang lainnya dan fungsi yang terkandung didalamnya. Segala macam tumbuhan yang baik dapat menghasilkan manfaat yang baik pula apabila dilakukan pengolahan secara optimal. Salah satu tumbuhan yang bermanfaat dan diduga mengandung senyawa steroid adalah mikroalga jenis *Chlorella sp.*.

Chlorella sp. merupakan tumbuhan tingkat rendah dari sebuah genus alga hijau bersel tunggal berukuran mikroskopis yang sudah mulai banyak dikaji dan diteliti. Berdasarkan tempat hidupnya *Chlorella sp.* dapat hidup di air tawar dan air laut. Beberapa keunggulan mikroalga *Chlorella sp.* diantaranya berkembang biak dengan cepat dan mudah dalam membudidayakannya (Sidabutar, 1999).

Keberlangsungan hidup *Chlorella sp.* tidak tergantung pada musim, tidak memerlukan tempat yang luas dan tidak memerlukan waktu yang lama untuk memenuhinya (Borowitzka dan Lesley, 1988). Pada penelitian ini teknologi pembudidayaan *Chlorella sp.* dilakukan dalam skala laboratorium menggunakan teknik kultur dengan kondisi tertentu yang telah disesuaikan dengan kondisi sebenarnya. Masa adaptasi yang relatif singkat serta tahan terhadap kondisi lingkungan yang ideal bagi pertumbuhan *Chlorella sp.* menjadikan *Chlorella sp.* mudah untuk dikultur.

Kultur *Chlorella sp.* dalam skala laboratorium dilakukan dengan cara kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) kacang hijau. Wulandari, dkk., (2010) dalam jurnalnya mengenai potensi pertumbuhan mikroalga dalam formulasi MET telah membandingkan antara Medium Air Laut (MAL), Medium Guillard (MG) dan Medium Ekstrak Tauge (MET). Hasil penelitian menunjukkan bahwa MET dengan konsentrasi 4 % merupakan media kultur yang menghasilkan pertumbuhan mikroalga yang sangat pesat dibandingkan dengan MAL dan MG yaitu antara 21 – tak terhingga sel. Richmond (1986) dalam Prihantini, dkk., (2007) menyebutkan bahwa MET kacang hijau mengandung komponen makronutrien, mikronutrien, vitamin, asam amino serta gula yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.*. Selain itu, kacang hijau merupakan jenis sayuran yang umum dikonsumsi. Oleh karena itu, penelitian yang dilakukan menggunakan MET 4 % sebagai media kultur untuk pertumbuhan *Chlorella sp.* yang diduga mengandung senyawa steroid yang sangat bermanfaat.

Berbagai penelitian mengenai bioaktivitas senyawa steroid dalam mikroalga *Chlorella sp.* telah dilakukan oleh Khamidah, dkk., (2014) yang mengekstraksi

Chlorella sp. menggunakan pelarut metanol. Ekstrak metanol yang mengandung senyawa aktif steroid mempunyai aktivitas sebagai antibakteri yang dilakukan terhadap bakteri *E. Coli* dan *S. Aureus*. Zona hambat terbesar dengan varian konsentrasi yang dihasilkan terhadap kedua bakteri berturut-turut yaitu 16,5 mm dan 13,1 mm. Daya hambat antara 10 – 20 mm tergolong kuat (Yudha, 2008 dalam Khamidah, 2014). Menurut Bariyyah (2013) ekstrak metanol *Chlorella sp.* yang mengandung senyawa steroid mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak etil asetat yang ditunjukkan dengan nilai EC₅₀ berturut-turut yaitu 18,610 ppm dan 27,320 ppm. Semakin kecil nilai EC₅₀ aktivitas antioksidannya semakin besar (Molyneux, 2004 dalam Bariyyah, 2013).

Uji aktivitas lain senyawa steroid telah juga telah dilakukan oleh Amaliyah, dkk., (2013) mengenai uji toksisitas menggunakan ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* dengan nilai LC₅₀ yang rendah (bersifat toksik) yaitu 20,516 ppm. Uji reagen dengan penambahan kloroform, asam asetat anhidrat dan H₂SO₄ pekat menunjukkan hasil positif adanya senyawa steroid. Uji toksisitas lain yang dilakukan Desianti, dkk., (2014) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* memiliki efek toksisitas terhadap larva udang *Artemia selina* Leach dengan nilai LC₅₀ yaitu 43,3044 ppm. Nilai LC₅₀ 30 – 1000 ppm memiliki kategori bahan yang toksik (Meyer, *et al.*, 1982 dalam Desianti, dkk., 2014). Penelitian tersebut menyebutkan bahwa dugaan golongan senyawa aktif mikroalga *Chlorella sp.* yang memiliki toksisitas paling tinggi (LC₅₀ rendah) adalah senyawa steroid. Uji toksisitas yang akan dilakukan dalam penelitian ini merupakan penelitian uji toksisitas lanjutan menggunakan isolat hasil KLT preparatif yang diduga mengandung senyawa steroid. Penelitian ini diharapkan

dapat menambah informasi mengenai toksisitas steroid dalam mikroalga *Chlorella sp.*.

Metode yang akan digunakan untuk mengekstraksi senyawa aktif mikroalga *Chlorella sp.* adalah metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Pemisahan senyawa metabolit sekunder yang lebih spesifik dalam penelitian ini dilakukan dengan cara hidrolisis menggunakan HCl 2 N dan partisi dengan pelarut etil asetat. Afif (2012) menggunakan metode hidrolisis dengan HCl 2 N sebagai katalis terhadap alga merah *E. contoni*. Hasil penelitian menyebutkan bahwa ekstrak setelah dihidrolisis dan dipartisi memiliki nilai LC₅₀ lebih rendah (70,32 ppm) dibandingkan ekstrak sebelum dihidrolisis (194,40 ppm). Berdasarkan penelitian tersebut bahwa ekstrak yang telah dihidrolisis dan dipartisi lebih bersifat toksik.

Hasil partisi dilakukan pemisahan steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) menggunakan eluen n-heksana:etil asetat. Imamah, dkk., (2015) dalam penelitiannya telah melakukan variasi eluen untuk memisahkan steroid dalam fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* Terdapat 5 eluen yang divariasi menggunakan KLTA. Eluen n-heksan:etil asetat (4:1) memberikan pemisahan terbaik terhadap senyawa steroid. Eluen terbaik hasil KLTA digunakan sebagai eluen dalam KLTP. Pemisahan senyawa steroid yang telah dilakukan dengan kromatografi lapis tipis preparatif kemudian dilanjutkan uji toksisitas dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) menggunakan larva udang jenis *Artemia salina* Leach. Isolat hasil KLTP yang diperoleh diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR.

Imamah, dkk., (2015) melakukan penelitian mengenai identifikasi senyawa steroid dalam mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan spektrofotometer FTIR. Hasil spektra menunjukkan adanya pita serapan pada bilangan gelombang $3450,61\text{ cm}^{-1}$ (O-H), bilangan gelombang $2926,28\text{ cm}^{-1}$ (C-H pada CH_3), $2857,60\text{ cm}^{-1}$ (C-H pada CH_2), $1737,22\text{ cm}^{-1}$ (C=O), $1638,98\text{ cm}^{-1}$ (C=C), $1465,93\text{ cm}^{-1}$ dan $1387,09\text{ cm}^{-1}$ (C-H tekuk), $1254,92\text{ cm}^{-1}$ (C-O), $1164,47\text{ cm}^{-1}$ (C-OH alkohol tersier), $1064,03\text{ cm}^{-1}$ (C-OH alkohol primer), $752,22\text{ cm}^{-1}$ dan $670,59\text{ cm}^{-1}$ (C-H pada gugus alkena) yang diduga merupakan gugus fungsi senyawa steroid.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Berapa nilai toksisitas senyawa steroid isolat KLTP fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach?
2. Bagaimana hasil identifikasi senyawa steroid isolat KLTP fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan spektrofotometer FTIR?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian dari rumusan masalah yang telah disebutkan adalah:

1. Mengetahui nilai toksisitas senyawa steroid isolat KLTP fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.
2. Mengidentifikasi senyawa steroid isolat KLTP fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan spektrofotometer FTIR.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada pembaca mengenai cara mengekstrak senyawa steroid yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* yang dapat dikembangkan untuk meningkatkan ilmu pengetahuan sehingga nantinya dapat diaplikasikan penggunaannya untuk masyarakat.

1.5 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Sampel yang digunakan adalah isolat mikroalga *Chlorella sp.* dari Laboratorium Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Malang.
2. Uji toksisitas senyawa steroid dilakukan terhadap isolat KLTP menggunakan metode BSLT terhadap larva udang *Artemia salina* Leach.
3. Identifikasi senyawa steroid hasil KLTP fraksi etil asetat hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan spektrofotometer FTIR.

BAB II

STUDI PUSTAKA

2.1 Tumbuhan dalam Perspektif Al-Qur'an

Allah SWT berfirman dalam surat al-An'am/7 ayat 99 :

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

“Dan Dialah yang menurunkan air dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan, maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau, Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang kurma, mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa. Perhatikanlah buahnya pada waktu berbuah, dan menjadi masak. Sungguh, pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman.” (QS. al-An'am/7:99)

Firman Allah SWT dalam surat al-An'am ayat 99 menyebutkan bahwa Allah SWT menjelaskan kejadian hal-hal yang menjadi kebutuhan manusia sehari-hari, agar mereka secara mudah dapat memahami kekuasaan, kebijaksanaan, serta pengetahuan-Nya. Allah menjelaskan bahwa Allah-lah yang menurunkan hujan dari langit, yang menyebabkan tumbuhnya berbagai jenis tumbuh-tumbuhan. Allah menjelaskan bahwa air itu sebagai sebab bagi tumbuhnya segala macam tumbuh-tumbuhan yang beraneka ragam bentuk jenis dan rasanya. Hal tersebut ditunjukkan agar manusia dapat memperhatikan siklus peredaran air sehingga dapat mengetahui betapa tingginya hukum-hukum Allah.

Allah menunjukkan kekuasaan-Nya dalam penciptaan tumbuh-tumbuhan yang beraneka ragam itu. Allah SWT menegaskan bahwa dalam proses pertumbuhan tersebut terdapat tanda-tanda kekuasaan Allah yang menjadi bukti bagi orang yang beriman (Departemen agama, 2007).

Tafsir Al-Maraghi (1992) menjelaskan bahwa Allah menurunkan air hujan dari awan. Kemudian dengan air ini Allah mengeluarkan setiap jenis tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam bentuk, ciri khas, dan berbeda tingkatan kelebihan serta kekurangannya. Semua itu menunjukkan kekuasaan Allah. Perhatikanlah bagaimana tumbuh-tumbuhan itu tumbuh, bagaimana ia dikeluarkan melalui proses pertumbuhan hingga dapat dimanfaatkan. Bandingkanlah sifat-sifatnya diantara kedua keadaan (tiap tahap pertumbuhan). Tentu kalian akan mengetahui kelembutan, pengaturan dan kebijaksanaan Allah di dalam perhitungan-Nya, dan lain-lain yang menunjukkan kepada kewajiban mentauhidkan-Nya.

Ayat-ayat yang tercantum diatas, dapat dipahami bahwa perhatian manusia pada segala macam tumbuh-tumbuhan harusnya tidak terbatas pada keadaan lahir sebagai bukti adanya kekuasaan Allah. Kita seharusnya dapat mengungkap rahasia kekuasaan Allah terhadap penciptaan tumbuh-tumbuhan melalui upaya penelitian. Potensi yang terkandung dalam tumbuh-tumbuhan dapat diketahui jika dilakukan eksplorasi terhadap tumbuhan.

Disebutkan juga dalam al Qur'an surat an-Nazi'at ayat 30-33:

وَالْأَرْضَ بَعْدَ ذَلِكَ دَحَلْنَا ﴿٣٠﴾ أَخْرَجَ مِنْهَا مَاءَهَا وَمَرْعَهَا ﴿٣١﴾ وَالْجِبَالَ أَرْسَنَّا ﴿٣٢﴾
مَتَاعًا لَكُمْ وَلِأَنْعَمِكُمْ ﴿٣٣﴾

“Dan setelah itu bumi Dia hamparkan (30). Darinya Dia pancarkan mata air, dan (ditumbuhkan) tumbuh-tumbuhannya (31). Dan gunung-gunung Dia pancangkan dengan teguh (32). (Semua itu) untuk kesenanganmu dan untuk hewan-hewan ternakmu (33)” (QS. an-Nazi’at/30: 30-33).

Berdasarkan tafsir Al-Maraghi (1992), bumi dihamparkan sehingga layak dijadikan tempat tinggal bagi manusia. Pada ayat selanjutnya. Allah memancarkan mata air yang menyebabkan tumbuhnya aneka jenis tumbuh-tumbuhan di permukaan bumi. Sebagian merupakan makanan utama bagi manusia, dan sebagian lainnya merupakan makanan hewan. Allah memancang gunung-gunung pada tempatnya bagaikan tonggak-tonggak bumi agar tidak mengalami kegoncangan. Allah menjelaskan kembali hikmah yang terkandung pada kesemuanya, yaitu sengaja diciptakan untuk dinikmati oleh manusia dan hewan.

Bumi dan segala isinya semuanya itu untuk kesenangan manusia dan hewan. Dengan demikian, manusia dan hewan-hewan dapat hidup dengan tenang dan mencari rezeki dengan melakukan berbagai kegiatan (Departemen Agama, 2007). Berbagai macam tumbuhan yang tumbuh di bumi memiliki manfaat bagi orang-orang yang mau memikirkan, merenungi dan mengambil manfaat yang dikandungnya. Salah satu tumbuhan yang dapat bermanfaat bagi manusia adalah mikroalga *Chlorella sp.*.

2.2 Mikroalga *Chlorella sp.*

Allah SWT berfirman dalam Qur’an surat an-Nahl ayat 13:

وَمَا ذَرَأَ لَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَذَّكَّرُونَ ﴿١٣﴾

“Dan (Dia juga menundukkan untukmu) apa yang Dia ciptakan untukmu di bumi ini dengan aneka macam warnanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu

benar-benar terdapat tanda-tanda bagi kaum yang mengambil pelajaran.” (QS. an-Nahl/14: 13

Kata “*maa dzara a*” dalam tafsir Ibnu Katsir (2007) mengandung arti Dia ciptakan. “*Lakum fil ardhi*”(untukmu di bumi ini), yakni hewan, tumbuh-tumbuhan dan sebagainya. Sedangkan “*mukhtalifan alwaanuhu*” (dengan aneka macam warnanya), seperti merah, kuning, hijau dan lain-lain. “*Inna fii dzaalika la a yaatun liqoumi yadzdzakkaruuna*” mempunyai maksud yakni mengambil pelajaran. Berdasarkan tafsir ayat tersebut, Allah SWT menciptakan segala sesuatu yang ada di bumi termasuk tumbuhan. Salah satu tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroalga *Chlorella sp.* yang merupakan salah satu tumbuhan tingkat rendah, bersel satu dan berwarna hijau. Pigmen warna yang terkandung dalam tumbuhan menjadikan warna tumbuhan yang berbeda. Adanya perbedaan warna tersebut menandakan bahwa manusia di haruskan untuk berfikir. Menelaah dan mempelajari penyebab perbedaan tersebut agar dapat diambil dari padanya ilmu pengetahuan sebagai sarana pembelajaran.

Chlorella sp. yang digunakan dalam penelitian ini merupakan bibit *Chlorella sp.* yang diperoleh dari penelitian sebelumnya. Menurut Anggraeni (2014) telah melakukan uji taksonomi terhadap sampel mikroalga (Lampiran 2). Adapun klasifikasi *Chlorella sp.* menurut penelitian tersebut antara lain merupakan familia dari *Chlorellaceae*, genus *Chlorella* dan spesies *Chlorella sp.*.

Hasil uji taksonomi mengenai ciri-ciri mikroalga *Chlorella sp.* pada penelitian sebelumnya dilakukan oleh Amaliyah (2013) (Lampiran 3) menunjukkan bahwa sel *Chlorella sp.* berbentuk bulat seperti cawan atau lonceng dengan posisi menghadap ke atas. *Chlorella sp.* hidup secara soliter dan

berukuran 2-8 μm . Warna hijau pada *Chlorella sp.* disebabkan karena selnya dominan mengandung klorofil a dan b, di samping karotin dan xantofil.

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

Allah SWT berfirman dalam Qur'an surat al-Waqiah ayat 62-64:

وَلَقَدْ عَلَّمْتُمُ النَّشَأَ الْأُولَىٰ فَلَوْلَا تَدْكُرُونَ ﴿٦٢﴾ أَفَرَأَيْتُمْ مَا تَحْرُثُونَ ﴿٦٣﴾ ءَأَنْتُمْ تَزْرَعُونَهُ أَمْ نَحْنُ الزَّارِعُونَ ﴿٦٤﴾

“(62) Dan sesungguhnya kamu telah mengetahui penciptaan yang pertama. Maka mengapakah kamu tidak mengambil pelajaran (untuk penciptaan yang kedua)? (63) Maka terangkanlah kepadaku tentang yang kamu tanam (64) kamukah yang menumbuhkannya atau kamukah yang menumbuhkannya?” (QS. al-Waqiah: 62 – 64)

Tafsir Al-Mishbah menjelaskan bahwa kata “*Tadzakkurun*” (kata kerja Mudhori’) mengisyaratkan bahwa jika pada masa lalu kamu belum menarik pelajaran, maka kini dan masa yang akan datang kamu seharusnya secara bersungguh-sungguh dapat menarik pelajaran darinya (Shihab, 2001). Penjelasan lain juga disebutkan dalam tafsir al-Maraghi. Kata “*Tahrutsun*” memiliki arti kamu yang menyebarkan bijinya dan mengelola tanahnya, sedangkan kata “*Tazra’unahu*” memiliki arti kamu menumbuhkan dan dan menjadikannya tumbuhan yang berkembang.

Berdasarkan penafsiran ayat diatas dapat diambil pelajaran bahwa Allah SWT Maha terdahulu yang telah menciptakan apa yang ada di bumi. Manusia sebagai khalifah di muka bumi hendaknya mempelajari semua ciptaan Allah termasuk penciptaan tumbuh-tumbuhan dan mengaplikasikannya pada penciptaan yang kedua. Kita dapat mempelajari ciptaan kedua dari penciptaan yang pertama yang telah diciptakan oleh Allah SWT. Pengaplikasian yang dilakukan dalam

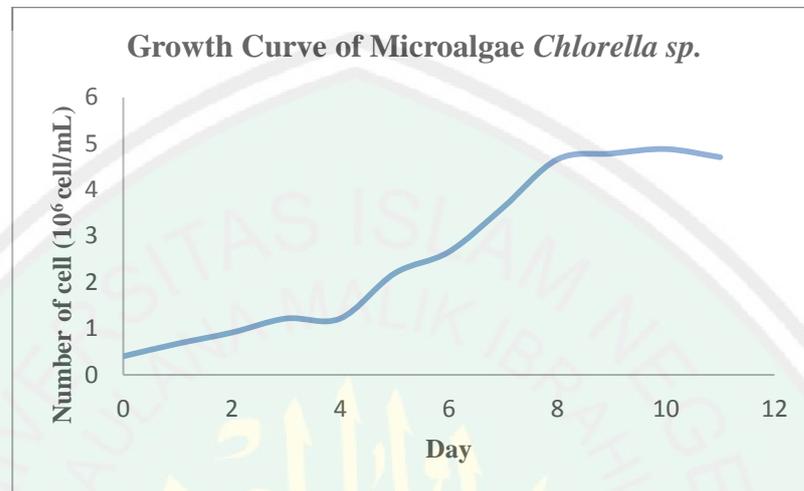
penelitian ini adalah kultivasi, karena dalam kultivasi kita dapat mengkaji penciptaan Allah yang menumbuhkan dan mengembangbiakkan tumbuhan dengan segala unsur harayang terdapat dalam media kultur tersebut.

Media yang digunakan dalam pertumbuhan dan pengembangbiakan mikroalga *Chlorella sp.* adalah Medium Ekstrak Tauge (MET) yang merupakan medium yang dibuat dari ekstrak kacang hijau. Tauge merupakan sayuran yang umum dikonsumsi, mudah diperoleh, ekonomis dan tidak menghasilkan senyawa yang berefek toksik, mengandung unsur makro dan mikro, vitamin, mineral, asam amino yang (Richmond, 1986 dalam Prihantini, dkk., 2007). Kandungan makronutrien dalam MET seperti K, P, Ca, Mg dan Na yang dibutuhkan oleh mikroba sebagai komponen penyusun sel dan mikronutrien seperti Fe, Zn, Mn dan Cu dibutuhkan oleh sel baik sebagai kofaktor enzim maupun komponen pembentuk klorofil (Wulandari, dkk., 2010). Biji kacang hijau yang telah dikecambahkan mengalami peningkatan nilai gizi. Perbandingan nilai gizi biji kacang hijau dan kecambah kacang hijau (tauge) dalam 100 gram dapat dilihat pada Lampiran 1.

Penggunaan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 % menurut Wulandari, dkk., (2010) menghasilkan pertumbuhan mikroalga yang sangat pesat dibandingkan dengan Medium Air Laut (MAL) dan Medium Guillard (MG) yang ditunjukkan pada hari ke-6. MAL dan MG menghasilkan kelimpahan sel antara 0 – 10 sel, sedangkan MET 4 % menghasilkan kelimpahan sel antara 21 – tak terhingga sel.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Khamidah, dkk., (2013) selama kultivasi mikrolaga *Chlorella sp.* mengalami empat fase pertumbuhan yaitu fase log atau eksponensial, fase penurunan laju pertumbuhan, fase stasioner

dan fase kematian. Berikut kurva pertumbuhan dari mikroalga *Chlorella sp.* dalam MET 4 % yang ditunjukkan pada Gambar 2.1:



Gambar 2.1 Kurva pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* (Fasya, *et al.*, 2013)

Kurva pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam MET 4 % berdasarkan penelitian Khamidah, dkk., (2013) menunjukkan bahwa fase log atau fase eksponensial dimulai pada hari ke-0 sampai hari ke-8 yang mengalami peningkatan yang cukup signifikan. Peningkatan jumlah sel *Chlorella sp.* tampak pada slope (kemiringan) kurva pada Gambar 2.1. Pada fase eksponensial *Chlorella sp.* mengalami pembelahan aktif karena tersedianya nutrisi dan pencahayaan yang cukup baik sehingga proses pertumbuhannya maksimal. Kelimpahan sel pada hari ke 0 – hari ke 11 dapat dilihat pada Lampiran 1.

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

bahwa laju pertumbuhan sel *Chlorella sp.* pada fase ini semakin lambat sehingga tidak mengalami peningkatan yang cukup signifikan. Menurut Yudha (2008) terjadinya fase penurunan pertumbuhan ini karena keterbatasan nutrisi, kepadatan populasi dan ketersediaan oksigen yang semakin rendah.

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

Fase kematian yang terjadi mulai hari ke-11 dan seterusnya yang ditandai dengan menurunnya kelimpahan sel *Chlorella sp.*. Slope (kemiringan) kurva menunjukkan terjadinya penurunan kelimpahan sel yang drastis. Hal ini disebabkan oleh nutrisi yang tidak lagi tersedia dalam medium pertumbuhan. Selain itu, fase kematian juga disebabkan oleh pemupukan sisa-sisa metabolisme atau bahan toksik (Clifton, 1985 dalam Sidabutar, 1999).

2.4 Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid Mikroalga *Chlorella sp.*

2.4.1 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga *Chlorella sp.*

Pemisahan senyawa metabolit sekunder yang mengandung steroid dilakukan dengan beberapa tahapan. Langkah awal yang dilakukan yaitu ekstraksi senyawa aktif mikroalga *Chlorella sp.*. Ekstraksi merupakan proses penarikan suatu komponen (zat terlarut) dari larutannya dalam air oleh suatu pelarut lain yang tidak bercampur dengan air (Soebagio, dkk., 2005). Prinsip dalam proses ekstraksi

adalah *like dissolved like*. Berbagai metode ekstraksi menawarkan banyak kemungkinan untuk hasil pemisahan. Salah satu metode ekstraksi yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi.

Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan dalam temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan untuk isolasi bahan alam yang bersifat tidak tahan terhadap temperatur tinggi, karena pada temperatur tinggi dugaan senyawa aktif yang terkandung dalam sampel akan hilang. Kelebihan lain dari maserasi adalah prosesnya yang mudah dan sederhana. Penekanan utama pada maserasi adalah tersedianya waktu kontak yang cukup antara pelarut dan jaringan yang diekstraksi (Guenther, 1987). Adapun faktor yang berpengaruh terhadap proses ekstraksi adalah lama ekstraksi, suhu dan jenis pelarut yang digunakan. Hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan jenis pelarut adalah daya melarutkan, titik didih, sifat toksik, mudah tidaknya terbakar dan sifat korosif terhadap peralatan ekstraksi (Karger, *et al.*, 1973).

Pelarut yang akan digunakan dalam proses maserasi adalah metanol. Pemilihan metanol sebagai pelarut utama dalam maserasi yang akan dilakukan tidak lepas dari hasil penelitian sebelumnya. Menurut Lenny (2006) pelarut golongan alkohol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam untuk melarutkan seluruh senyawa metabolit sekunder. Metanol termasuk golongan alkohol yang mempunyai berat molekul rendah. Kondisi ini mempermudah pembentukan ikatan hidrogen dengan molekul air dalam jaringan bahan yang diekstraksi sehingga senyawa –senyawa dalam

jaringan bahan akan mudah terekstrak (Hart, 1987). Metanol merupakan pelarut yang baik untuk semua tujuan ekstraksi awal (Harborne, 1987).

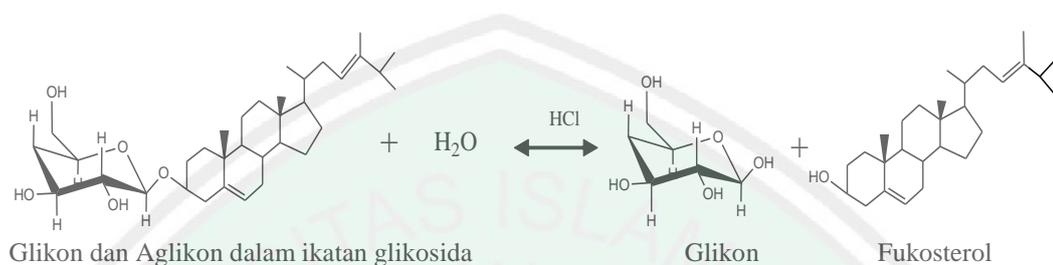
Desianti, dkk., (2014) dalam penelitiannya menyatakan bahwa ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* positif terhadap uji steroid yang merupakan dugaan senyawa dengan toksisitas tertinggi terhadap *Artemia salina* L. Oleh sebab itu, pelarut metanol digunakan dalam proses ekstraksi *Chlorella sp.* dan untuk memperoleh senyawa metabolit sekunder yang lebih spesifik dilakukan proses hidrolisis dan partisi.

2.4.2 Hidrolisis dan Partisi

Senyawa organik dalam tanaman umumnya berbentuk glikosida, yakni senyawa yang terdiri atas gabungan bagian gula (glikon) yang bersifat polar dan bagian bukan gula (aglikon) yang bersifat polar, semipolar maupun non polar. Senyawa metabolit sekunder tergolong dalam senyawa aglikon dengan merubah struktur membentuk glikosida suatu senyawa akan mengalami perubahan sifat fisika, kimia dan aktivitas biologi yang berbeda dimana senyawa tersebut akan bersifat lebih polar sehingga diharapkan bila masuk kedalam tubuh secara peroral senyawa tersebut akan lebih cepat diabsorpsi. Jika dalam suatu senyawa terdapat banyak ikatan glikosidanya maka senyawa tersebut cenderung bersifat lebih polar (Saifudin, dkk., 2006).

Hidrolisis dilakukan dengan penambahan katalis asam untuk mempercepat reaksi pemutusan. Penelitian ini menggunakan HCl 2 N sebagai agen penghidrolisis. Pemilihan HCl yang tergolong sebagai asam kuat ini lebih mudah melepaskan proton H^+ secara sempurna dalam air. Semakin banyak proton H^+ yang dilepas, Semakin mudah dalam memutus ikatan glikosida. Jika asam lemah

yang digunakan sebagai agen penghidrolisis, Maka lebih sukar untuk melepaskan ion H^+ (terionisasi sebagian) (Handoko, 2006). Gambar 2.2 menunjukkan reaksi dugaan pemutusan ikatan glikosida pada proses hidrolisis.



Gambar 2.2 Reaksi dugaan hidrolisis ikatan O-glikosida

Hasil hidrolisis akan dilakukan partisi menggunakan pelarut etil asetat yang bersifat semi polar. Prinsip partisi adalah pemisahan kimia berdasarkan perbedaan distribusi diantara dua fase pelarut yang tidak saling bercampur dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Berdasarkan penelitian Desianti, dkk., (2014) fraksi etil asetat ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* memberikan hasil positif terhadap golongan senyawa steroid. Khoiriyah, dkk., (2014) menyimpulkan bahwa golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak metanol fraksi etil asetat alga coklat *S. vulgare* yang mempunyai aktivitas antibakteri tertinggi ditunjukkan oleh senyawa steroid. Pemisahan suatu senyawa dapat dilakukan menggunakan berbagai macam cara. Salah satunya yaitu Kromatografi Lapis Tipis (KLT) preparatif.

2.4.3 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan pada perbedaan distribusi molekul-molekul komponen diantara

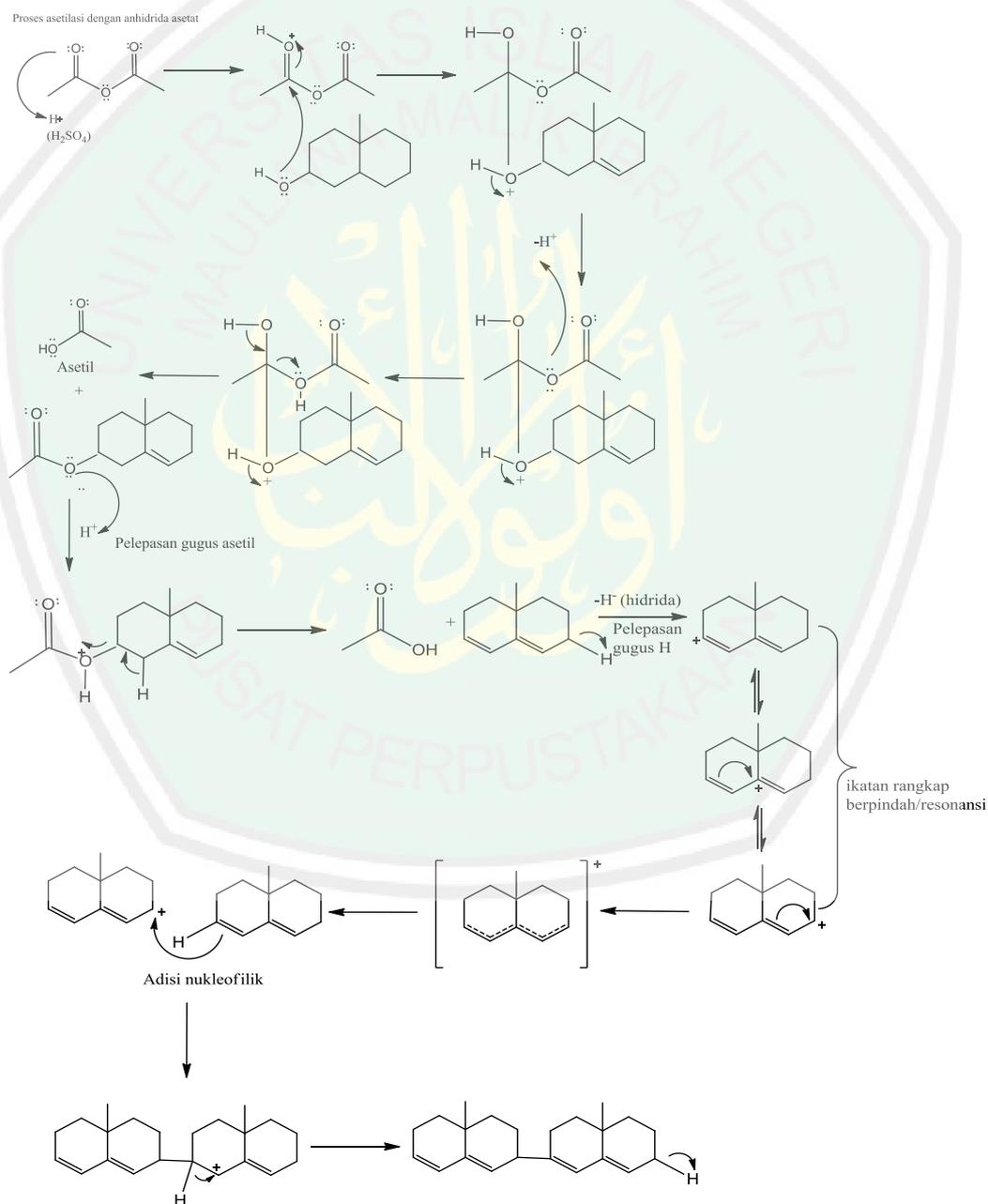
dua fase (fase gerak/eluen dan fase diam/adsorben) yang memiliki kepolaran yang berbeda (Hendayana, 2006). Kristanti, dkk., (2008) menyebutkan bahwa KLT banyak digunakan karena proses analisis yang mudah dan cepat. KLT digunakan untuk memisahkan suatu senyawa dari campurannya sehingga dihasilkan senyawa yang lebih murni.

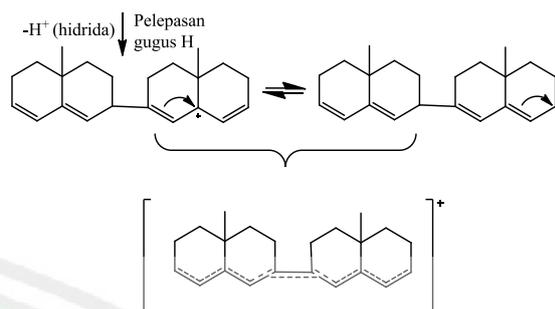
Pada dasarnya semua cara kromatografi menggunakan dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Prinsip KLT yaitu pemisahan senyawa yang didasarkan pada perbedaan distribusi diantara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak yang memiliki kepolaran yang berbeda (Hendayana, 2006). Fase diam dalam KLT yaitu lapisan tipis silika gel, aluminium oksida, atau selulosa sebagai fase diam yang dilapiskan pada gelas, kaca atau logam. Fase geraknya adalah pelarut campuran yang ditempatkan dalam bejana pengembang.

Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini adalah eluen n-heksana:etil asetat (4:1). Imamah, dkk., (2015) dalam penelitiannya telah melakukan variasi eluen untuk memisahkan steroid dalam fraksi etil asetat hasil hidroisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.*. Terdapat 5 eluen yang divariasi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA), yaitu n-heksana:etil asetat (4,25:0,75), n-heksana:etil asetat (4,5:0,5), n-heksana:etil asetat (4:1), n-heksana:etil asetat (3,75:1,25) dan n-heksana:etil asetat (3,5:1,5). Eluen n-heksana:etil asetat (4:1) memberikan pemisahan terbaik steroid dengan menghasilkan 12 noda.

Bercak pemisahan pada plat KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna. Cara yang biasa digunakan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas.

Identifikasi senyawa steroid pada KLT dilakukan dengan melihat noda dibawah sinar UV atau dengan menyemprotkan pereaksi warna sesuai dengan jenis atau kelas senyawa yang dianalisis (Kristanti, dkk., 2008). Pereaksi yang digunakan adalah peraksi *Lieberman Burchard* (LB). Dugaan mekanisme reaksi LB dapat dilihat pada Gambar 2.3 (Siadi, 2012) :





Gambar 2.3 Dugaan mekanisme reaksi LB

Lempeng nantinya akan diamati dibawah lampu ultraviolet yang dipasang pada panjang gelombang emisi 254 nm atau 366 nm untuk menampakkan solut sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluoresensi terang pada dasar yang berfluoresensi seragam (Gandjar dan Rohman, 2007).

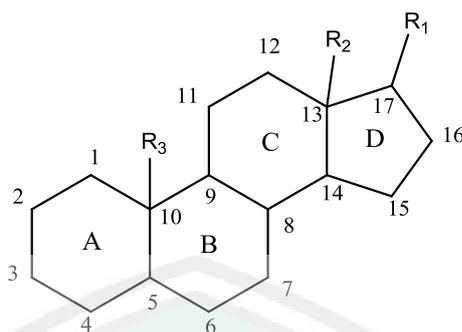
Metode dalam KLT dapat dihitung nilai Retention faktor (R_f) dengan persamaan :

$$R_f = \frac{\text{jarak titik pusat bercak dari titik awal}}{\text{jarak garis depan dari titik awal}} \dots\dots\dots(2.1)$$

Tetapi pada gugus-gugus yang besar dari senyawa-senyawa yang susunannya mirip, sering kali harga R_f berdekatan satu sama lainnya (Sastrohamidjojo, 2002).

2.4.4 Senyawa Steroid

Steroid adalah salah satu kelompok senyawa bahan alam dengan struktur dasar yang terdiri dari 17 atom karbon dengan membentuk struktur dasar 1,2-siklopentenoperhidrofenantren. Steroid mempunyai kerangka dasar triterpena asiklik. Ciri umum steroid ialah sistem empat cincin yang tergabung (Kristanti, dkk., 2008). Cincin A, B dan C beranggotakan enam atom karbon, dan cincin D beranggotakan lima. Perhatikan Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Kerangka dasar karbon steroid dan sistem penomorannya (Kristanti, dkk., 2008)

Robinson (1995) menyebutkan bahwa senyawa steroid terdapat dalam setiap makhluk hidup. Steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan disebut fitosterol, sedangkan yang ditemukan dalam jaringan hewan disebut kolesterol.

2.4.5 Uji Toksisitas Senyawa Steroid dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach

Toksisitas merupakan ukuran relatif derajat racun antara satu bahan kimia terhadap bahan kimia lain pada organisme yang sama kemampuan racun (molekul) untuk menimbulkan kerusakan apabila masuk ke dalam tubuh dan lokasi organ yang rentan terhadapnya (Soemirat, 2005). Uji toksisitas yang akan dilakukan menggunakan metode BSLT terhadap larva udang *Artemia Salina* Leach. Metode pengujian BSLT menggunakan *Artemia Salina* dianggap memiliki korelasi dengan daya sitotoksik senyawa-senyawa antikanker, sehingga sering dilakukan untuk screening awal pencarian senyawa antikanker. Beberapa kelebihan dari uji bioaktivitas dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva udang adalah cepat waktu ujinya, sederhana (tanpa teknik aseptik), murah (tidak perlu serum hewan), jumlah organisme banyak, memenuhi kebutuhan validasi statistik dengan sedikit sampel (Meyer, *et al.*, 1982).

Artemia Salina Leach diperjual belikan dalam bentuk telur istirahat yang disebut dengan kista. Satu gram kista *Artemia* kering rata-rata terdiri atas 200.000 – 300.000 butir kista. Telur *Artemia salina* berbentuk bulat dalam keadaan kering dan penuh dalam keadaan basah. Warnanya coklat yang diselubungi oleh cangkang yang kuat dan tebal untuk melindungi embrio terhadap pengaruh udara kering, benturan keras dan sinar ultraviolet (Sriwahyuni, 2010). *Artemia* dapat digunakan di laboratorium *biossay* untuk menentukan toksisitas dengan konsentrasi yang menimbulkan 50 % anggota populasi hewan uji mati (LC₅₀) yang telah dilaporkan sebagai racun dan ekstrak tanaman.

Tahapan proses penetasan *Artemia* dibagi menjadi tahap hidrasi, tahap pecah cangkang dan tahap payung atau pengeluaran. Tahap hidrasi terjadi penyerapan air sehingga air kista yang diawetkan dalam bentuk kering tersebut akan menjadi bulat dan aktif bermetabolisme. Tahap selanjutnya adalah tahap pecah cangkang dan disusul dengan tahap payung yang terjadi beberapa saat sebelum naupli (larva) keluar dari cangkang (Setiawan, 2010).

Larva udang tersebut sangat peka terhadap apapun yang berada di lingkungannya dan berkembang dengan sangat cepat menyerupai pertumbuhan sel kanker. Keadaan membran kulitnya yang sangat tipis memungkinkan terjadinya difusi zat dari lingkungan yang mempengaruhi metabolisme dalam tubuhnya. Oleh karena itu, penambahan zat ekstraktif yang diduga mengandung senyawa bioaktif yang juga berpotensi sebagai senyawa obat diharapkan mampu mengganggu metabolisme dan menyebabkan kematian larva udang (Meilani, 2006).

Kematian hewan uji *Artemia Salina* disebabkan adanya senyawa uji yang masuk ke dalam tubuh hewan uji melalui difusi dan transport aktif. Kemudian senyawa tersebut akan menyebabkan terjadinya kerusakan pada permeabilitas membran sehingga dapat mengacaukan transport ion dan menyebabkan penurunan produksi ATP (Connel dan Miller, 1995). Senyawa-senyawa tersebut menghambat daya makan dengan bertindak sebagai racun perut atau *stomach poisoning*, yaitu sebuah interaksi penyerangan yang dapat membunuh suatu hewan uji dengan menyerang sistem pencernaan yang dapat mempengaruhi metabolisme larva yang mengganggu reseptor perasa pada mulut *Artemia salina*. Hal ini dapat mengakibatkan *Artemia salina* kehilangan stimulus rasa sehingga larva tidak mampu mengenali makanannya dan menyebabkan larva mati kelaparan (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995 dalam Widyastuti, 2005).

Daya toksisitas suatu senyawa dapat diketahui dengan menghitung jumlah kematian larva *Artemia Salina* L. dengan parameter *Lethal Concentration 50* (LC_{50}). LC_{50} adalah kadar atau konsentrasi suatu zat yang dinyatakan dalam miligram bahan kimia per meter kubik media uji (*part per million* atau ppm) yang dapat menyebabkan 50 % kematian pada binatang percobaan terpapar dalam waktu tertentu (Cahyono, 2004). Menurut Meyer, *et al.*, (1982) suatu ekstrak dikatakan bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia Salina* L. apabila mempunyai nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ dan dikatakan tidak toksik bila nilai $LC_{50} > 1.000 \mu\text{g/mL}$. Penentuan potensi bioaktif dilakukan dengan membandingkan nilai LC_{50} suatu ekstrak sampel dengan ketentuan (Meyer, *et al.*, 1982):

- $LC_{50} \leq 30 \text{ ppm}$ = Sangat Toksik
- $LC_{50} 31 \text{ ppm} \leq 1.000 \text{ ppm}$ = Toksik

- $LC_{50} > 1.000$ ppm = Tidak Toksik

2.4.6 Identifikasi Steroid menggunakan Spektrofotometer Infra Merah

Identifikasi senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan spektrofotometer infra merah yang digunakan untuk mendeteksi gugus fungsional, mengidentifikasi senyawa dan menganalisis campuran (Day, Jr., R.A. dan Underwood, A.L., 1999). Senyawa organik yang berbeda akan mempunyai spektra yang berbeda dan sangat jarang sekali dua senyawa mempunyai spektra yang sama (Hayati, 2007). Bilangan gelombang yang sering digunakan dalam analisis senyawa bahan alam yaitu pada daerah infra merah tengah ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$). Keuntungan menggunakan FTIR antara lain diperoleh informasi struktur molekul secara tepat dan akurat dengan resolusi tinggi dan identifikasi sampel dapat dilakukan dalam berbagai fase, baik pada fase padat, cair maupun gas.

Penelitian Imamah, dkk., (2015) yang melakukan identifikasi terhadap senyawa steroid dalam mikroalga *Chlorella sp.* fraksi etil asetat menggunakan FTIR. Hasil analisis memberikan pita serapan pada bilangan gelombang $3450,61 \text{ cm}^{-1}$ (O-H), bilangan gelombang $2926,28 \text{ cm}^{-1}$ (C-H pada CH_3), $2857,60 \text{ cm}^{-1}$ (C-H pada CH_2), $1737,22 \text{ cm}^{-1}$ (C=O), $1638,98 \text{ cm}^{-1}$ (C=C), $1465,93 \text{ cm}^{-1}$ dan $1387,09 \text{ cm}^{-1}$ (C-H tekuk), $1254,92 \text{ cm}^{-1}$ (C-O), $1164,47 \text{ cm}^{-1}$ (C-OH alkohol tersier), $1064,03 \text{ cm}^{-1}$ (C-OH alkohol primer), $752,22 \text{ cm}^{-1}$ dan $670,59 \text{ cm}^{-1}$ (C-H pada gugus alkena) yang diduga merupakan senyawa steroid.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

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

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat-alat Penelitian

Alat yang digunakan adalah oven, timbangan analitik, *heater*, cawan porselen, wadah penetasan, aerator, lampu penetasan, pengaduk kaca, spatula, desikator, *shaker*, lampu TL 36 watt, bola hisap, pipet tetes, pipet ukur, pipet mikro, penjepit, beaker glass, erlenmeyer, gelas ukur, labu ukur 10 mL, aluminium foil, botol vial, corong kaca, corong *buchner*, kertas saring, *rotary evaporator vacum*, *sentrifuge*, *vortex*, plat KLT, *chamber*, pH universal dan seperangkat alat spektrofotometer FTIR.

3.2.2 Bahan-bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah isolat *Chlorella sp.*, taugé kacang hijau sebagai bahan Medium Ekstrak Taugé (MET) dan hewan uji adalah larva udang *Artemia salina* L.

Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah metanol *p.a.*, etil asetat *p.a.*, n-heksana *p.a.*, HCl 37 %, natrium bikarbonat, reagen *Lieberman-Burchard* (asam

asetat anhidrat, H₂SO₄ pekat, etanol absolut), ragi roti, DMSO dan plat KLT GF₂₅₄.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini diawali dengan kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dalam Media Ekstrak Tauge (MET) 4 % dan pada hari ke-10 dilakukan pemanenan mikroalga *Chlorella sp.* Preparasi sampel biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dikeringkan kemudian dikerok dan ditimbang. Biomassa mikroalga *Chlorella sp.* yang diperoleh selanjutnya diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol *p.a* dengan masa perendaman selama 24 jam. Selanjutnya ekstrak yang diperoleh dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak pekat yang dihidrolisis menggunakan HCl 2N dan dipartisi dengan etil asetat. Kemudian dipisahkan senyawa steroid dengan KLTP menggunakan eluen terbaik n-heksana:etil asetat (4:1). Diamati noda dengan lampu UV untuk selanjutnya dikerok noda yang terbentuk dan dilarutkan dengan pelarut yang sesuai sebagai isolat. Isolat yang diperoleh diuji toksisitasnya menggunakan metode BSLT dengan hewan uji larva udang *Artemia salina* L. dengan varian konsentrasi pelarut yang terdiri dari 5 level, yaitu : 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm. Percobaan dilakukan dengan 3 kali pengulangan. Isolat senyawa steroid yang mempunyai toksisitas tertinggi akan dilakukan identifikasi menggunakan Spektrofotometri Infra Merah. Data yang dianalisis disajikan dalam bentuk nilai LC₅₀ hasil uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* L yang dianalisis menggunakan probit dengan program MINITAB 17.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.*;
 - a. Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %
 - b. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dalam MET 4 %
 - c. Pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella sp.*
2. Preparasi sampel biomassa mikroalga *Chlorella sp.*
3. Analisis kadar air biomassa mikroalga *Chlorella sp.*
4. Ekstraksi senyawa aktif biomassa mikroalga *Chlorella sp.*
5. Hidrolisis dan partisi ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.*
6. Pemisahan senyawa steroid dengan KLTP
7. Uji toksisitas senyawa steroid dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva udang *Artemia salina* L
8. Identifikasi senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan spektrofotometer FTIR
9. Analisis data

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

3.5.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%

Pembuatan MET 4 % diawali dengan melarutkan ekstrak tauge ke dalam aquades yang telah dibuat dengan konsentrasi 4 % (Prihantini, dkk., 2005). Ekstrak tauge dibuat dengan cara tauge kacang hijau 100 gram yang telah dicuci bersih direbus dalam 500 mL aquades yang mendidih selama 1 jam. Ekstrak tauge

diambil dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 1000 mL dan diencerkan hingga diperoleh MET dengan konsentrasi 4 %.

3.5.1.2 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %

Isolat *Chlorella sp.* sebanyak 10 mL diinokulasikan ke dalam masing-masing 60 mL MET 4 % dalam erlenmeyer dan ditempatkan pada rak yang dilengkapi dengan pencahayaan menggunakan lampu TL 36 watt (intensitas cahaya 1000 – 4000 lux) dan diinkubasi selama 10 hari dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap (Prihantini, dkk., 2005).

3.5.1.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Pemanenan biomassa *Chlorella sp.* dilakukan pada hari ke-10 dengan cara *Chlorella sp.* disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Endapan biomassa *Chlorella sp.* dipisahkan dari filtratnya kemudian dilakukan penimbangan yang dicatat sebagai berat basah.

3.5.2 Preparasi Sampel Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Biomassa *Chlorella sp.* diletakkan dalam suatu wadah untuk selanjutnya dikeringanginkan selama 2 hari pada suhu ruang (berkisar antara 25 - 30 °C). Setelah diperoleh *Chlorella sp.* kering, dikerok dan selanjutnya ditimbang biomassa *Chlorella sp.* sebagai berat kering.

3.5.3 Analisis Kadar Air Mikroalga *Chlorella sp.*

Cawan yang akan digunakan dipanaskan dahulu dalam oven dengan suhu 100 – 105 °C selama 15 menit, kemudian cawan disimpan dalam desikator selama 10 menit, lalu ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama hingga diperoleh

berat cawan yang konstan. Biomassa *Chlorella sp.* ditimbang 0,5 gram dalam cawan dan dikeringkan di dalam oven suhu 100 – 105 °C selama 30 menit, kemudian dimasukkan ke dalam desikator, ditimbang dan dioven sampai diperoleh berat konstan. Kadar air sampel biomassa *Chlorella sp.* dihitung menggunakan rumus (AOAC, 1984) :

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

Keterangan : a = berat cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat cawan + sampel setelah dikeringkan

3.5.4 Ekstraksi Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Maserasi

Biomassa *Chlorella sp.* kering sebanyak 30 gram dimasukkan ke dalam *beaker glass* 500 mL dan ditambahkan pelarut metanol dengan perbandingan 1:5 (b/v) (30 gr : 150 mL), kemudian ditutup dengan aluminium foil. Maserasi dilakukan dengan pengocokan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 5 jam pada suhu kamar. Selanjutnya disaring dengan menggunakan corong *buchner*. Residu yang diperoleh dimaserasi kembali hingga 5 kali proses ekstraksi. Filtrat yang diperoleh dari 5 kali maserasi tersebut digabung menjadi satu dan diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator vacum* hingga terbentuk ekstrak pekat *Chlorella sp.*. Ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang kemudian dihitung nilai randemen ekstrak yang dihasilkan:

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

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

Ekstrak metanol sebanyak 2,5 gram dimasukkan ke dalam *beaker glass*, kemudian dihidrolisis dengan 5 mL HCl 2 N dan distirrer menggunakan *magnetic stirrer hot plate* selama 1 jam pada suhu ruang (Tensiska, dkk., 2007). Hidrolisat yang diperoleh ditambahkan dengan natrium bikarbonat hingga pH netral. Selanjutnya ditambahkan 12,5 mL pelarut etil asetat kemudian dikocok dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan organik dan lapisan air. Kemudian masing-masing lapisan dipisahkan. Proses partisi dilakukan sebanyak 5 kali. Lapisan organik dimasukkan ke dalam *beaker glass* kemudian dipekatkan dengan dialiri dengan gas N₂. Ekstrak pekat yang diperoleh selanjutnya ditimbang dan dihitung rendemennya.

3.5.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP)

Sampel hasil partisi diambil sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dengan 10 mL etil asetat sehingga diperoleh larutan 1000 ppm. Pemisahan steroid dengan KLTP digunakan plat silika gel F₂₅₄ yang sudah diaktifkan dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100 - 105 °C selama 30 menit. Masing-masing plat dengan ukuran 10 x 20 cm. Ekstrak *Chlorella sp.* yang telah dilarutkan dengan pelarutnya ditotolkan pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler kemudian keringkan dan dielusi menggunakan eluen n-heksana:etil asetat (4:1). Setelah gerakan larutan pengembang sampai pada garis batas, elusi dihentikan kemudian dikeringkan. Noda hasil pemisahan kemudian diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 366 nm. Selanjutnya plat KLTP dipotong sebagian

dan disemprot dengan pereaksi *Lieberman-Burchard* dan amati kembali di bawah lampu UV 254 dan 366 nm.

3.5.7 Uji Toksisitas Senyawa Steroid terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

3.5.7.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina* Leach

Sebanyak 250 mL air laut dimasukkan dalam wadah penetasan, dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina* L kemudian diaerasi. Telur akan menetas dalam waktu \pm 48 jam dan siap digunakan sebagai target uji toksisitas.

3.5.7.2 Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan terhadap isolat steroid. Noda KLTP berwarna hijau yang diduga senyawa steroid dikerok, kemudian ditempatkan pada tabung sentrifuge. Senyawa steroid hasil kerok dilarutkan dengan pelarutnya dan divortex, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Filtrat yang terpisah diambil dari endapannya, kemudian diuapkan pelarutnya. Isolat yang dihasilkan ditimbang dan dilarutkan menggunakan pelarut yang sesuai.

Larutan stok dibuat dengan cara sampel isolat hasil KLTP sebanyak 2,9 mg dilarutkan dalam 5 mL pelarutnya (n-heksana:etil asetat) sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 580 ppm. Pelarut yang digunakan disesuaikan dengan sifat kelarutan sampel. Isolat steroid dari larutan stok 580 ppm dibuat dengan tiga seri konsentrasi 5, 10, 20, 25 ppm. Isolat dari larutan stok 580 ppm dipipet menggunakan mikropipet.

Isolat dari larutan stok 580 ppm dibuat variasi konsentrasi 5, 10, 20, 25 ppm dengan cara dipipet 43,1 , 86,2 , 129,3, 172,4, 215,5 μ L, kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing botol vial yang telah disiapkan. Pelarutnya

diuapkan hingga kering. Larutan ragi dibuat dengan melarutkan 3 mg dalam 5 mL air laut. Setetes larutan ragi roti dan 50 μ L DMSO ditambahkan dalam botol vial yang berisi isolat kemudian dikocok hingga larut sempurna. 10 ekor larva udang udang *Artemia salina* L dimasukkan dalam botol vial dan ditanda bataskan dengan laut hingga volume 5 mL (Rahayu, dkk., 2013) . Larutan ragi roti dibuat dengan cara melarutkan 3 mg ragi roti ke dalam 5 mL air laut. Uji toksisitas dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Semua botol vial diletakkan dibawah lampu pijar selama 24 jam dan diamati terhadap kematian larva udang. Selanjutnya dihitung jumlah larva udang yang mati.

Kontrol pelarut dibuat dengan mengambil 130 μ L dimasukkan dalam botol vial dan pelarut kemudian diuapkan, setelah itu ditambah dengan setetes larutan ragi roti dan ditambahkan 2 mL air laut dalam botol vial lalu dikocok. Setelah itu, dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L ke dalam botol vial dan ditanda bataskan dengan air laut. Larva dalam botol vial diletakkan dibawah lampu pijar selama 24 jam dan diamati terhadap kematian larva udang.

Kontrol DMSO dibuat dengan mengambil 50 μ L DMSO dan dimasukkan dalam botol vial. Setetes larutan ragi roti dan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L dimasukkan dalam botol vial. Ditanda bataskan dengan air laut. Selanjutnya larva dalam botol vial di letakkan di bawah lampu pijar selama 24 jam. Amati dan hitung larva yang mati.

3.5.8 Identifikasi Senyawa Steroid Mikroalga *Chlorella* sp. dengan Spektrofotometer FTIR

Pelet KBr 0,2 g ditambahkan dengan isolat yang di duga senyawa steroid di aduk merata, kemudian pres membentuk pelet dan diidentifikasi menggunakan

spektrofotometer FTIR merk IR Buck M500 *Scientific* dengan bilangan gelombang 4000 – 400 cm⁻¹.

3.6 Analisis Data

Efek toksisitas diamati dengan persen kematian larva udang yang dinyatakan dengan LC₅₀. Data yang diperoleh berupa data dan grafik nilai LC₅₀. Nilai LC₅₀ dihasilkan dari analisa probit pada program MINITAB 17 dengan tingkat kepercayaan 95 %.

Uji toksisitas dilakukan dengan variasi konsentrasi terhadap isolat steroid terbaik yang mempunyai toksisitas tertinggi. Variasi konsentrasi yang digunakan yaitu 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm dengan 3 kali pengulangan. Pada masing-masing konsentrasi, dimasukkan sebanyak 10 ekor hewan uji *Artemia Salina* L yang telah ditetaskan. Data yang dimasukkan dalam analisa probit pada program MINITAB 17 yaitu konsentrasi dan mortalitas (Desianti, dkk., 2014).

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{Modus}}{\text{Jumlah larva yang dimasukkan}} \times 100 \%$$

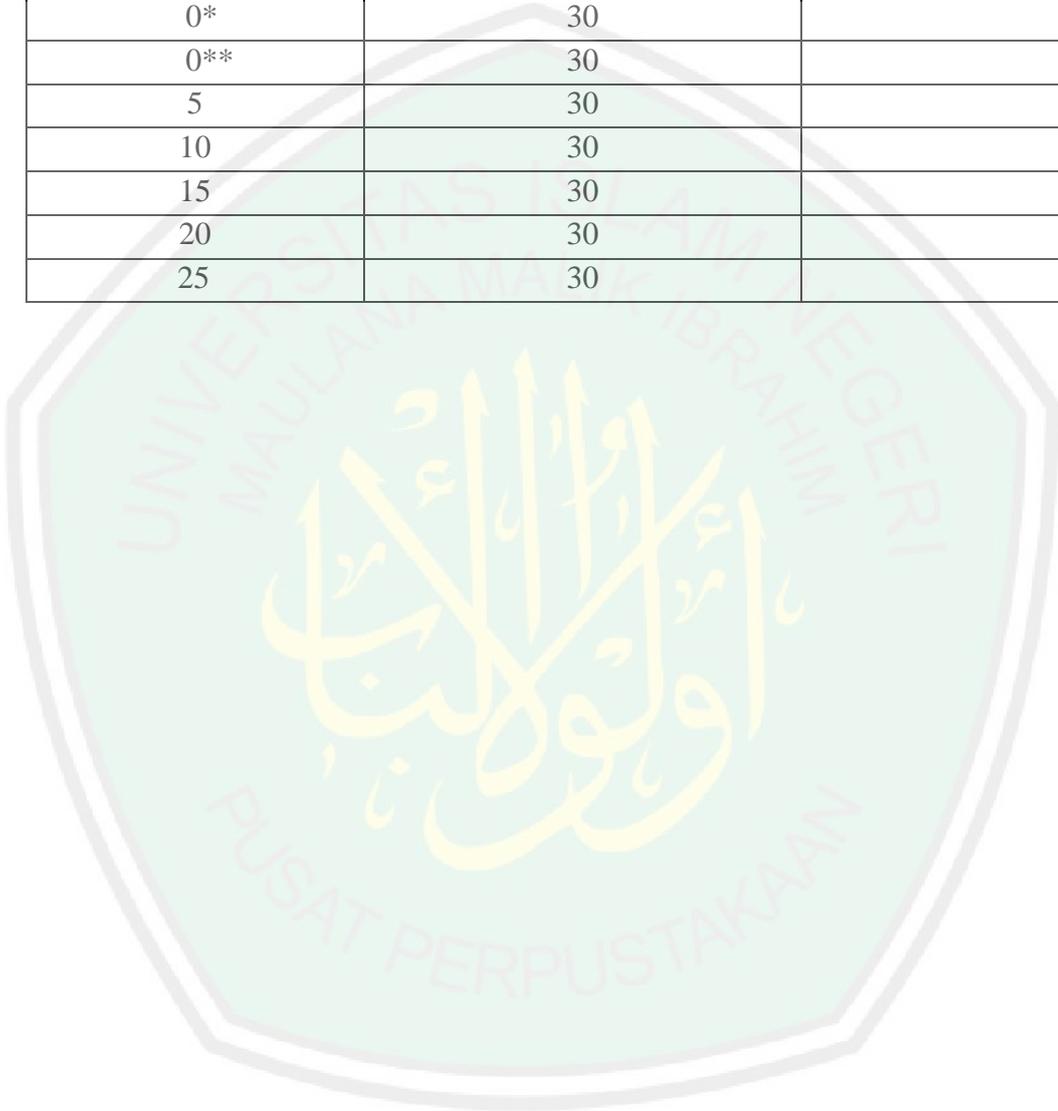
Tabel 3.1 Data Kematian Larva Udang *Artemia Salina* L dan Perhitungan Nilai LC₅₀ Senyawa Steroid Mikroalga *Chlorella* sp. menggunakan Minitab 17

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati (ekor)				% Mortalitas
	I	II	III	Modus	
0*					
0**					
5					
10					
15					
20					
25					

Keterangan: * : Kontrol pelarut
** : Kontrol DMSO

Mortalitas = % Mortalitas x jumlah hewan uji

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva uji	Mortalitas
0*	30	
0**	30	
5	30	
10	30	
15	30	
20	30	
25	30	



BAB IV

PEMBAHASAN

Senyawa steroid dalam mikroalga *Chlorella sp.* dipisahkan menggunakan KLT Preparatif yang dimulai dengan tahap kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* untuk memperoleh biomassa *Chlorella sp.* sehingga cukup untuk memenuhi sediaan sampel penelitian. Pemurnian senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* perlu dilakukan beberapa tahap pemisahan, antara lain ekstraksi maserasi untuk mengekstrak senyawa aktif yang terkandung dalam *Chlorella sp.*. Ekstrak kasar yang diperoleh dihidrolisis dengan katalis asam dan dipartisi menggunakan pelarut etil asetat. Pemisahan senyawa steroid dilakukan dengan menggunakan KLT Preparatif. Screening awal pengujian bioaktivitas steroid dapat diketahui dengan melakukan uji toksisitas dengan metode BSLT. Data yang diperoleh berupa nilai LC₅₀. Jenis senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* berdasarkan gugus fungsi diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR.

4.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

4.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %

Media kultur yang digunakan dalam penelitian ini adalah Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %. Pada penelitian Prihantini, dkk., (2007) yang melakukan variasi konsentrasi 1 - 6 % pada MET. Hasil rerata kerapatan sel mikroalga tertinggi dicapai pada konsentrasi 4 % yaitu 3.981.071 sel/mL.

Nutrisi yang terkandung dalam MET digunakan untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroalga *Chlorella sp.*. MET diperoleh dari air rebusan tauge. Hasil ekstrak tauge berwarna bening kekuningan dan agak kental. Hal ini

mengindikasikan bahwa kandungan senyawa dalam tauge telah terekstrak. Ekstrak tauge diencerkan dengan aquades hingga diperoleh MET konsentrasi 4 % yang digunakan sebagai medium ekstrak tauge. Hasil MET yang diperoleh berwarna bening agak kekuningan dan encer.

4.1.2 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %

Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* bertujuan untuk menumbuhkan mikroalga *Chlorella sp.* pada media ekstrak tauge. Hal ini ditandai dengan bertambah pekatnya warna hijau kultur pada media. Kultivasi dapat dilakukan pada hari ke-6 dan ke-7. Pada hari tersebut merupakan fase eksponensial dimana *Chlorella sp.* mengalami pembelahan aktif karena tersedianya nutrisi dan pencahayaan yang cukup baik sehingga proses pertumbuhannya maksimal (Khamidah, dkk., 2014). Mikroalga yang dikultivasi dalam MET 4 % diinkubasi selama 10 hari dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap. Pengaturan fotoperiodisitas terang dan gelap bertujuan untuk mengatur pencahayaan yang dianalogikan sebagai pengganti sinar matahari (siang-malam) yang berperan penting dalam proses fotosintesis.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa selama proses kultivasi, mikroalga mengalami perubahan warna pada inokulum setiap harinya dari warna hijau kekuningan hingga hijau pekat. Perubahan warna tersebut mengindikasikan bahwa terjadi peningkatan kadar klorofil pada mikroalga yang merupakan pigmen utama mikroalga *Chlorella sp.* Prihantini, dkk., (2005) menyatakan bahwa perubahan warna kultur tersebut juga menunjukkan peningkatan kerapatan sel yang menandakan terjadinya pemanfaatan nutrisi yang terkandung dalam MET oleh sel-sel *Chlorella sp.*

4.1.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Pemanenan mikroalga *Chlorella sp.* bertujuan untuk memisahkan biomassa *Chlorella sp.* dari MET 4 % menggunakan sentrifuge sehingga terpisah antara filtrat dan supernatan. Filtrat yang diperoleh berwarna bening kekuningan dan supernatan berwarna hijau pekat. Supernatan yang merupakan biomassa dari mikroalga *Chlorella sp.* dikumpulkan menjadi satu dan diambil untuk digunakan sebagai sampel penelitian melalui tahapan preparasi sampel.

Tahap pemanenan ini dilakukan pada hari ke-10. Hal ini disebabkan pada hari tersebut merupakan fase stasioner pra kematian. Menurut Khamidah, dkk., (2014) fase stasioner terjadi dari hari ke-8 sampai hari ke-11, dimana jumlah kelimpahan sel tertinggi dicapai pada fase stasioner hari ke-10 yaitu 4.880.000 sel/mL, sedangkan pada hari ke-11 mikroalga mengalami fase kematian yang ditunjukkan dengan jumlah kelimpahan sel yang semakin menurun yaitu 4.704.000 sel/mL. Fase penurunan pertumbuhan ini diakibatkan oleh ketersediaan nutrient yang semakin terbatas, populasi mikroalga yang semakin meningkat dan ketersediaan oksigen yang semakin rendah (Yudha, 2008).

Biomassa mikroalga *Chlorella sp.* basah yang telah terkumpul diperoleh berat sebesar 737,56 g dari 5 kali proses pemanenan. Biomassa yang terkumpul dimungkinkan masih mengandung air, sehingga perlu dilakukan preparasi sampel mikroalga *Chlorella sp.* sebelum dilanjutkan ke perlakuan berikutnya.

4.2 Preparasi Sampel Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Preparasi sampel bertujuan untuk meminimalisir kadar air yang terkandung dalam sampel dan memudahkan dalam proses ekstraksi. Preparasi sampel

dilakukan dengan cara dikeringanginkan pada suhu ruang dalam suatu wadah. Pengeringan tidak dilakukan menggunakan oven maupun sinar matahari secara langsung karena pengeringan dengan pemanasan dapat merusak senyawa metabolit sekunder termasuk senyawa steroid dalam mikroalga *Chlorella sp.* yang tidak tahan terhadap panas. Menurut Robinson (1995), beberapa metabolit sekunder mudah rusak pada suhu tinggi. Hasil pengeringan pada suhu ruang ini diperoleh biomassa *Chlorella sp.* kering, berwarna hijau kehitaman dan menempel pada permukaan wadah pengeringan. Sampel yang telah kering selanjutnya dikerok dan hasil yang didapatkan dari preparasi sampel berupa padatan berbentuk serbuk.

Penghalusan mikroalga *Chlorella sp.* bertujuan untuk mempermudah proses ekstraksi dengan cara memperbesar luas permukaan. *Chlorella sp.* akan mengalami kontak langsung dengan pelarut, sehingga semakin besar luas permukaan, maka lebih banyak komponen bioaktif yang terekstrak ke dalam pelarut. Hasil biomassa dari proses pengeringan diperoleh berat sebesar 19,37 gram. Rendemen yang diperoleh dari mikroalga *Chlorella sp.* kering adalah 2,63 %. Penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Imamah., (2015) mikroalga *Chlorella sp.* kering yang berbentuk serbuk halus sebanyak 12,9895 g mempunyai rendemen sebesar 2,94 %.

4.3 Analisis Kadar Air Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Analisis kadar air bertujuan untuk mengetahui jumlah kadar air yang terkandung dalam sampel mikroalga *Chlorella sp.*. Banyaknya kandungan air dalam sampel dapat mempengaruhi ketahanan sampel saat proses penyimpanan.

Sampel dengan kadar air yang rendah dapat mencegah tumbuhnya mikroorganisme saat penyimpanan seperti jamur sehingga dapat disimpan lebih lama (pengawetan). Selain itu, mikroorganisme yang dapat mendegradasi senyawa dalam sampel dapat diminimalisir sehingga senyawa tidak mudah rusak dan komposisi kimianya tidak mengalami perubahan (Hayati, dkk., 2012). Kadar air juga sangat berpengaruh terhadap proses ekstraksi. Pelarut metanol akan berikatan hidrogen dengan air yang terdapat pada sampel, sehingga kandungan air dalam sampel juga ikut terekstrak (Harborne, 1987). Hal tersebut berpengaruh terhadap rendemen hasil ekstraksi.

Menurut Setyowati (2009) dalam Setyaningsih (2013) proses ekstraksi maksimum kadar air yang disyaratkan agar proses ekstraksi dapat berjalan dengan lancar yaitu sebesar 11 %. Kadar air dalam biomassa mikroalga *Chlorella sp.* kering diperoleh sebesar 10,96 %. Sampel *Chlorella sp.* setelah pengeringan memiliki kadar air dibawah kadar air maksimum yang disyaratkan untuk ekstraksi.

4.4 Ekstraksi Senyawa Aktif Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstraksi senyawa aktif mikroalga *Chlorella sp.* dalam penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol *p.a.* Pemilihan pelarut didasarkan pada prinsip ekstraksi yaitu *like dissolved like*. Senyawa steroid yang merupakan senyawa aktif dalam mikroalga *Chlorella sp.* umumnya berikatan dengan glikosida yang cenderung bersifat polar, sehingga senyawa aktif akan terekstrak ke dalam pelarut yang mempunyai kesamaan sifat kepolaran dengan metanol.

Pemilihan metanol sebagai pelarut dalam maserasi tidak terlepas dari penelitian sebelumnya. Menurut Amaliyah (2013) yang melakukan maserasi pada mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan variasi pelarut yaitu metanol, etil asetat dan n-heksana. Rendemen tertinggi ditunjukkan oleh ekstrak metanol yaitu sebesar 7,0001 %.

Sampel mikroalga *Chlorella sp.* direndam pada suhu ruang. Selama proses perendaman terjadi proses difusi. Terjadi perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel. Larutan dengan konsentrasi yang rendah akan terdesak keluar dan digantikan dengan pelarut dengan konsentrasi tinggi. Metanol yang memiliki konsentrasi yang lebih tinggi masuk ke dalam sel *Chlorella sp.* melewati dinding sel. Hal ini mengakibatkan sitoplasma di dalam sel akan keluar dan terlarut dalam pelarut metanol. Oleh karena itu konsentrasi larutan di dalam sel lebih tinggi dibandingkan dengan larutan di luar sel dan terjadilah proses difusi.

Proses maserasi dilakukan berulang-ulang hingga filtrat yang diperoleh berubah warna dari hijau kehitaman menjadi hijau lebih terang. Perubahan warna ini memerlukan perlakuan maserasi sebanyak 5 kali pengulangan. Sampel yang telah mengalami proses pengulangan maserasi, diasumsikan bahwa senyawa aktif yang terkandung didalamnya telah terekstrak maksimal dalam pelarut metanol. Filtrat hasil maserasi yang terkumpul berwarna hijau tua.

Filtrat kemudian diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator vacuum*. Suhu yang digunakan untuk menguapkan metanol yaitu 50 °C yang merupakan suhu dibawah titik didih metanol (titik didih metanol 65 °C). Hal ini sesuai dengan prinsip *rotary evaporator vacuum* yang tidak hanya terletak pada pemanasannya tapi dengan menurunkan tekanan pada labu alas bulat dan memutar

labu alas bulat dengan kecepatan tertentu. Berdasarkan teknik tersebut, suatu pelarut akan menguap dan senyawa yang larut dalam pelarut tidak ikut menguap melainkan akan mengendap dalam labu alas bulat. Adanya pemanasan dibawah titik didih pelarut inilah yang menyebabkan senyawa yang terkandung dalam pelarut tidak rusak oleh suhu tinggi. Hasil yang didapatkan dari *rotary evaporator vacuum* yaitu ekstrak pekat mikroalga *Chlorella sp.* yang berwarna hijau pekat.

Penelitian ini merupakan penelitian kelompok, sehingga pada tahap maserasi mikroalga *Chlorella sp.* kering hasil panen masing-masing individu dikumpulkan menjadi satu kelompok. Hasil dari berat pengumpulan yang diperoleh, digunakan 30 g *Chlorella sp.* kering untuk maserasi. Berat ekstrak pekat yang dihasilkan dari proses maserasi adalah 6,5679 g dan rendemen ekstrak sebesar 21,8926 % (Fasya, dkk., 2016). Hal ini menandakan bahwa dalam berat ekstrak pekat 6,5679 g terkandung senyawa aktif termasuk steroid sebesar 21,8926 %. Sampel kering *Chlorella sp.* dengan berat 30 g dapat diperoleh dari 8 kali pemanenan dengan takaran yang sama dalam kultivasi pada penelitian ini.

4.5 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Hidrolisis dilakukan untuk memutuskan ikatan glikosida yang dilakukan dengan penambahan asam untuk diambil senyawa aglikonnya yang dimungkinkan mengandung senyawa steroid. Prinsip dari hidrolisis adalah memutus ikatan glikosida menggunakan air dan katalis asam. Proses hidrolisis dilakukan dengan penambahan HCl 2 N sebagai katalis asam yang digunakan untuk mempercepat reaksi hidrolisis.

Ekstrak metanol yang ditambahkan dengan HCl terbentuk suasana asam yang kemudian dinetralkan dengan natrium bikarbonat (NaHCO_3). Penetralkan ini

berfungsi untuk menghentikan reaksi hidrolisis yang bersifat *reversible*, sehingga apabila reaksi ini tidak dihentikan dengan cepat maka ikatan glikosida antara glikon dan aglikon yang telah terurai dalam proses hidrolisis dapat terbentuk kembali. Penggunaan HCl yang bereaksi dengan NaHCO₃ menghasilkan produk samping yang tidak berbahaya yaitu berupa garam NaCl. Reaksi penetralan yang terjadi antara HCl dan natrium bikarbonat ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Persamaan 4.1 Reaksi penetralan dengan natrium bikarbonat

Hidrolisat yang diperoleh dilakukan partisi (ekstraksi cair-cair). Partisi pada penelitian ini menggunakan pelarut etil asetat. Penggunaan etil asetat yang bersifat semi polar digunakan untuk mengekstrak senyawa steroid yang memiliki kepolaran yang sama dengan kepolaran pelarutnya. Imamah., (2015) melakukan partisi menggunakan etil asetat, hasil fitokimia dan IR menunjukkan bahwa adanya dugaan senyawa steroid dalam mikroalga *Chlorella sp.*. Desianti, dkk., (2014) fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* mempunyai toksisitas terhadap larva udang *Artemia Salina* Leach yaitu 43,3044 ppm.

Hasil dari proses partisi membentuk dua lapisan fasa zat cair yaitu fasa organik (lapisan atas) yang berwarna hijau pekat dan fasa air (lapisan bawah) yang berwarna kuning bening. Tiap lapisan mengekstrak komponen yang berbeda. Fasa organik mengekstrak senyawa metabolit sekunder (aglikon) yang dimungkinkan mengandung steroid dan fasa air yang mengekstrak komponen gula (glikon). Fasa organik diambil dan dilakukan partisi berulang sebanyak 3 kali untuk memaksimalkan pemisahan senyawa steroid.

Fasa organik hasil partisi yang telah terkumpul, selanjutnya dialiri gas N_2 dalam lemari asap untuk menguapkan pelarut etil asetat. Ekstrak pekat hasil partisi yang diperoleh berwarna hijau kehitaman dengan berat 2,0278 g dari ekstrak kasar 2,5050 g. Rendemen yang diperoleh dari partisi menggunakan etil asetat sebesar 80,95 % (Fasya, dkk., 2016). Berdasarkan rendemen hasil partisi tersebut, ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* lebih banyak yang terekstrak ke dalam pelarut etil asetat. Hal ini dimungkinkan bahwa banyak senyawa metabolit sekunder pada mikroalga *Chlorella sp.* yang bersifat semi polar sesuai dengan kepolaran dari etil asetat. Imamah (2015) menyebutkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* menghasilkan nilai rendemen sebesar 49,323 % dalam berat ekstrak pekat 0,5064 g. Semakin besar nilai rendemen, dimungkinkan semakin banyak senyawa steroid yang terekstrak kedalam pelarut etil asetat.

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

Pemurnian senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan menggunakan metode KLTP. Fase diam yang digunakan dalam pemisahan senyawa steroid adalah plat silika gel $G_{60}F_{254}$. Plat terbuat dari gypsum dengan ukuran pori-pori 60 \AA dengan kemampuan berfluorosensi pada panjang gelombang minimal 254 nm. Plat KLT silika $G_{60}F_{254}$ yang berukuran 10x20 cm.

Fase gerak dalam KLT preparatif adalah campuran dua pelarut organik terbaik yang telah diatur sedemikian rupa sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal. Eluen n-heksana:etil asetat (4:1) sebagai fase gerak yang merupakan eluen terbaik pemisahan steroid pada mikroalga *Chlorella sp.*. Imamah (2015) yang telah melakukan 5 variasi eluen untuk pemisahan senyawa steroid fraksi etil

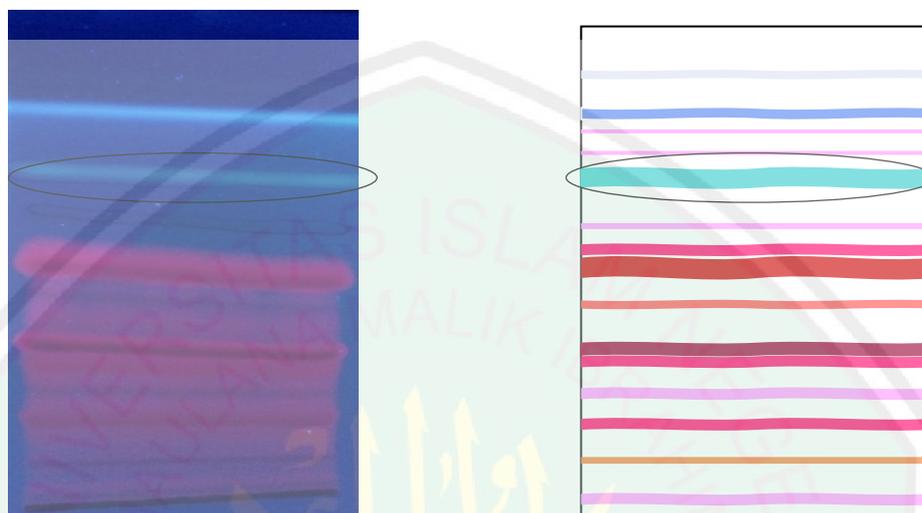
asetat mikroalga *Chlorella sp.* membuktikan bahwa eluen n-heksana:etil asetat (4:1) merupakan eluen yang memberikan pemisahan terbaik dengan menghasilkan 12 noda pada plat KLTA, sedangkan hasil KLT preparatif diperoleh 10 noda. Hasil uji kemurnian senyawa steroid pada menggunakan KLT dua dimensi menunjukkan bahwa pada elusi menggunakan eluen yang pertama (n-heksana:etil asetat (4:1)) dan kedua (benzena:etil asetat (3:2)) menghasilkan 1 noda berwarna hijau. Marliana (2007) melakukan identifikasi senyawa aktif menggunakan fase gerak n-heksana:etil asetat (4:1) memberikan hasil positif terhadap senyawa steroid.

Identifikasi senyawa-senyawa yang terpisah pada plat KLT menggunakan bercak yang tampak dan nilai Rf. Hasil elusi ditunjukkan ada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil KLT Preparatif senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* pada eluen n-heksana:etil asetat (4:1) pada sinar UV λ 366 nm

No.	Nilai Rf	Warna noda	Dugaan senyawa
1.	0,0389	Merah muda	-
2.	0,0889	Ungu kecoklatan	-
3.	0,1805	Merah muda menyala	-
4.	0,2361	Merah muda	-
5.	0,2944	Merah muda menyala	-
6.	0,3389	Merah kehitaman	-
7.	0,4389	Merah muda	-
8.	0,5	Ungu kemerahan	-
9.	0,2056	Merah muda menyala	-
10.	0,6162	Merah muda	-
11.	0,7222	Hijau kebiruan	Steroid
12.	0,7556	Merah muda	-
13.	0,8056	Merah muda	-
14.	0,8472	Biru terang	-
15.	0,9056	Biru	-

Hasil KLT preparatif noda pemisahan senyawa steroid fraksi etil asetat dengan eluen n-heksana:etil asetat (4:1) disajikan pada Lampiran Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Hasil pemisahan senyawa steroid fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* dengan KLT Preparatif pada sinar UV λ 366 nm

Hasil pemisahan steroid menggunakan KLT preparatif pada penelitian ini diperoleh 15 noda. Noda yang dihasilkan pada plat KLT dideteksi dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 366 nm. Noda ke 11 berwarna hijau kebiruan yang diduga merupakan senyawa steroid. Pereaksi uji yang umum digunakan untuk steroid adalah reaksi *Lieberman – Burchard* dengan memberikan warna hijau – biru (Harborne, 1987). Hal tersebut didukung dengan penelitian Aprelia dan Suyatno (2013) menyatakan bahwa warna hijau kebiruan pada tumbuhan paku *Christella arida* menunjukkan adanya senyawa steroid golongan kampesterol dan β - sitosterol yang dilakukan penentuan struktur isolat menggunakan UV-Vis, IR dan MS. Penelitian lain dari Astuti, dkk., (2014) yang mengisolasi steroid batang bajakah tampala menghasilkan warna hijau kebiruan pada plat KLT. Identifikasi struktur menggunakan spektrofotometri UV, IR, ^1H

dan ^{13}C -NMR adanya senyawa steroid jenis 6α -hidrokikiktigmas-4-en-3-on. Dugaan adanya steroid diperkuat dengan hasil Rf 0,7222. Analisis alga merah *Acanthopora spcifera* (Vahl) menyebutkan bahwa pada teknik KLT dihasilkan Rf steroid 0,72 (Shankhadarwar, 2015). Pada makroalga *padina australis* menggunakan eluen n heksana:etil asetat (7:3) diperoleh steroid golongan β -sitosterol dengan Rf 0,7 (Pridawati, dkk., 2014). Berdasarkan data pendukung dengan kesamaan eluen, Rf yang dihasilkan dari mikroalga *Chlorella sp.* merupakan senyawa steroid.

4.7 Uji Toksisitas Senyawa Steroid terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

Uji toksisitas dilakukan menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Salah satu organisme yang sangat sesuai untuk hewan uji dalam penelitian ini adalah *brine shrimp* (Lenny, 2006). Mortalitas *in vitro* dari senyawa terhadap organisme hewan dapat digunakan untuk menguji ekstrak tumbuhan yang mempunyai bioaktivitas. Parameter yang digunakan untuk menunjukkan adanya aktivitas biologis suatu senyawa pada *Artemia Salina* L. adalah kematiannya (Meyer, *et al.*, 1982).

4.7.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina* Leach

Penetasan telur dilakukan dalam air laut sambil di aerasi dibawah pencahayaan lampu pijar. Fungsi aerasi untuk memberikan oksigen yang cukup bagi kelangsungan hidup *Artemia*. Larva udang *Artemia* merupakan organisme fototropik yang membutuhkan cahaya sebagai rangsangan sehingga telur lebih cepat menetas. Telur *Artemia* akan menetas dalam waktu ± 24 jam. *Artemia* yang baru menetas berwarna orange kemerah-merahan berbentuk bulat lonjong yang disebut dengan nauplius. Larva udang yang digunakan dalam penelitian ini adalah

larva yang berumur 48 jam karena organ-organ pada *Artemia* sudah terbentuk lengkap sehingga dapat meminum air laut yang telah diberi larutan isolat dugaan steroid hasil KLTP.

4.7.2 Uji Toksisitas

Sampel yang diuji toksisitasnya adalah isolat dugaan steroid hasil KLTP. Pemisahan senyawa steroid dari plat silika KLT dilakukan menggunakan alat sentrifugasi. Tujuan sentrifugasi dalam penelitian ini adalah untuk memisahkan antara filtrat dan residu. Residu berupa plat silika KLT dan filtrat yang diambil berisi senyawa steroid. Proses ini dilakukan berulang hingga dirasa semua senyawa steroid dalam plat silika KLT larut dalam pelarutnya. Berat hasil isolat senyawa steroid yang didapatkan dari hasil KLTP dalam penelitian ini sebanyak 2,9 g. Hasil KLTP dibuat larutan stok isolat sebagai sampel dalam pengujian toksisitas.

Larutan stok 580 ppm dibuat seri konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm serta sebagai pengontrolnya yaitu 0 ppm tanpa penambahan sampel. Kontrol yang digunakan dalam uji toksisitas ini meliputi kontrol pelarut dan kontrol DMSO untuk mengetahui atau mengontrol kematian hewan uji yang murni disebabkan oleh sampel dalam pengujian toksisitas. Pelarutan isolat dalam air laut yang berbeda kepolaran sering menimbulkan masalah. Oleh karena itu, digunakan DMSO untuk melarutkannya (Colegate dan Molyneux, 2007). DMSO yang berperan sebagai surfaktan dengan ujung hidrofilik (suka air) dan hidrofobik (tidak suka air). Hasil penambahan DMSO diperoleh isolat yang larut sempurna dalam air laut.

Selama proses pengujian, larva udang diberikan larutan ragi sebagai makanan untuk kelangsungan hidupnya. Setelah 24 jam, diamati dan dihitung larva yang mati. Hasil uji toksisitas isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* ditunjukkan pada Tabel 4.2.

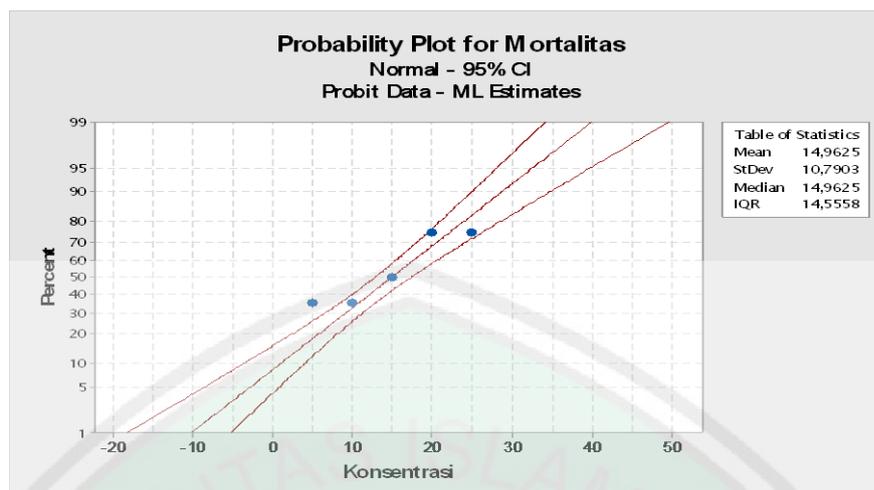
Tabel 4.2 Hasil uji toksisitas isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan metode BSLT

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati (ekor)				% Mortalitas	Mortalitas
	I	II	III	Modus		
0*	0	0	0	0	0	0
0**	0	0	0	0	0	0
5	4	4	4	4	40	12
10	3	4	3	3	30	9
15	7	5	5	5	50	15
20	8	8	5	8	80	24
25	7	7	7	7	70	21

Keterangan: * : Kontrol pelarut

** : Kontrol DMSO

Kematian larva ditunjukkan dengan parameter *Lethal Concentration 50* (LC_{50}) yang mengindikasikan tingkat toksisitas senyawa. Semakin kecil nilai LC_{50} maka semakin berpotensi untuk memiliki aktifitas biologi atau efek farmakologi (Lisdawati, 2006) . Nilai LC_{50} diperoleh melalui penentuan data mortalitas yang dilakukan perhitungan menggunakan analisa probit dalam program MINITAB 17 dengan memasukkan data Mortalitas, jumlah larva dan konsentrasi. Kurva nilai LC_{50} isolat steroid menggunakan program MINITAB 17 ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Kurva hubungan antara konsentrasi (x) dan percent (y) isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.*

Kurva diatas menunjukkan hubungan antara percent dan konsentrasi. Sumbu (y) yang menunjukkan percent diperoleh dengan memasukkan 50. Angka 50 ini merupakan penentuan nilai LC_{50} . Konsentrasi pada sumbu (x) menunjukkan seri variasi konsentrasi yang digunakan pada uji toksisitas. Analisa probit untuk menentukan nilai LC_{50} pada isolat steroid hasil KLTP yang dilakukan dengan tingkat kepercayaan 95 %.

Berdasarkan Gambar 4.2 menunjukkan bahwa isolat steroid mikroalga *Chlorella sp.* memiliki nilai LC_{50} sebesar 14,9625 ppm. Meyer, *et al.*, (1982) menyatakan bahwa suatu ekstrak memiliki aktivitas sangat toksik jika ekstrak tersebut dapat menyebabkan kematian 50 % hewan uji pada konsentrasi kurang dari 30 ppm. Menurut Wawan (2003) dalam Halimah (2010) nilai $LC_{50} < 30$ ppm memiliki potensi aktivitas sebagai antitumor atau antikanker yang bersifat sitotoksik. Meskipun uji toksisitas dengan BSLT tidak dapat secara langsung menggambarkan kemampuan toksiknya terhadap sel kanker tertentu, namun

metode ini telah banyak dilaporkan bermanfaat untuk uji skrining senyawa aktif antikanker (Astuti, *et al.*, 2005).

Uji BSLT yang telah dilakukan oleh Marraskuranto, dkk., (2008) mengenai hubungan nilai LC_{50} dengan bioaktivitasnya. Ekstrak makroalga hijau *Ulva fasciata* dengan nilai LC_{50} 19,12 ppm. Nilai $LC_{50} < 30$ ppm berpotensi sebagai antikanker atau antitumor. Pada penelitian ini $LC_{50} < 30$ menunjukkan aktivitas sitotoksik cukup tinggi terhadap sel tumor HeLa ($IC_{50} = 25,6$ ppm) dan terhadap sel tumor T47D ($IC_{50} = 28,7$ ppm).

Ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* mempunyai nilai toksisitas yang berbeda-beda. Hasil uji toksisitas dengan metode BSLT pada mikroalga *Chlorella sp.* yang dilakukan oleh Amaliyah (2013) terhadap ekstrak metanol menghasilkan nilai LC_{50} 20,516 ppm. Desianti, dkk., (2014) yang melakukan uji toksisitas terhadap fraksi etil asetat diperoleh nilai toksisitas sebesar 43,3044 ppm. Toksisitas senyawa steroid yang telah dilakukan oleh Diastuti dan Warsinah (2010), ekstrak kloroform kulit batang *Rhizopora mucronata* yang mengandung senyawa steroid menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 5,122 ppm dan terbukti memiliki sitotoksik terhadap sel kanker myeloma. Senyawa steroid dalam spons *Biemna triraphis* mempunyai nilai LC_{50} sebesar 76 ppm (Sapar, dkk., 2004) dan nilai LC_{50} steroid dalam daun kerehau yaitu 96,4096 ppm (Novadiana, 2014). Nilai LC_{50} ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan isolat senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* pada penelitian ini disajikan pada Tabel 4.3 sebagai berikut.

Tabel 4.3 Nilai LC_{50} masing-masing ekstrak, fraksi dan isolat steroid mikroalga *Chlorella sp.*

Sampel Uji	Nilai LC_{50} (ppm)
------------	--------------------------

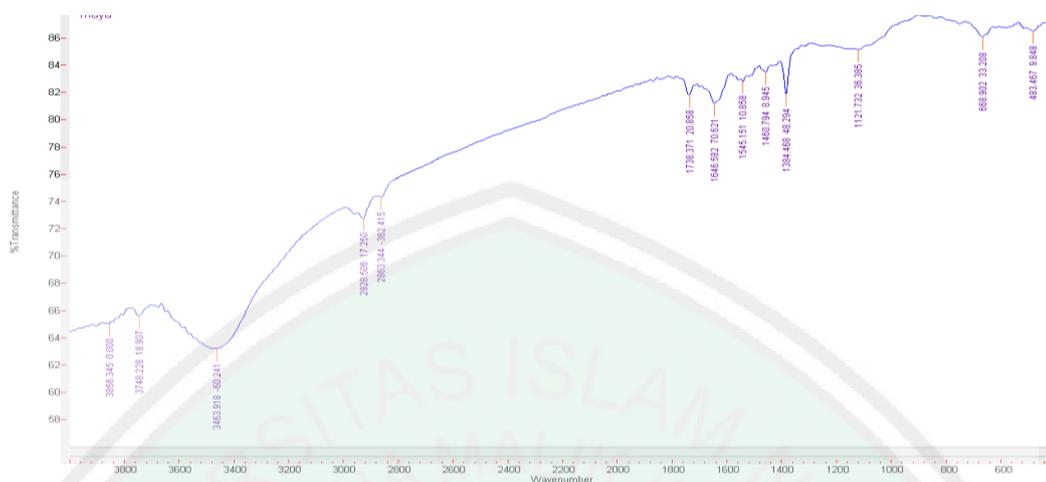
Ekstrak Metanol	36,4224
Fraksi Etil Asetat	24,5046
Isolat Senyawa Steroid	14,9625

Berdasarkan Tabel 4.3 nilai LC_{50} menunjukkan bahwa isolat memiliki nilai LC_{50} terendah. Data tersebut menjelaskan bahwa senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* lebih bersifat toksik dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan ekstrak metanol. Hal ini dimungkinkan bahwa dalam jumlah sampel yang sama, kadar senyawa steroid isolat KLTP paling banyak dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan ekstrak metanol, karena dalam fraksi etil asetat dan ekstrak metanol terkandung berbagai senyawa campuran, sehingga kadar steroid lebih sedikit. Namun, nilai LC_{50} fraksi etil asetat lebih baik dibandingkan dengan ekstrak metanol.

4.8 Identifikasi Senyawa Steroid Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Spektrofotometer FTIR

Spektrofotometer infra merah mengidentifikasi gugus fungsional suatu senyawa berdasarkan perbedaan momen dipol yang dapat bervibrasi sehingga dapat terbaca oleh sinar infra merah yang ditunjukkan serapan yang spesifik. Tiap senyawa memiliki serapan gugus fungsional yang khas. Isolat hasil KLTP yang digunakan untuk identifikasi menggunakan spektrofotometer infra merah adalah isolat yang dimungkinkan merupakan senyawa steroid. Hal ini berdasarkan dari penelitian sebelumnya Imamah (2015) yang menunjukkan adanya dugaan senyawa steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* yang didukung dengan identifikasi menggunakan spektrofotometer infra merah.

Hasil spektra spektrofotometer infra merah dari isolasi senyawa hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* dapat dilihat pada Gambar 4.3 di bawah:



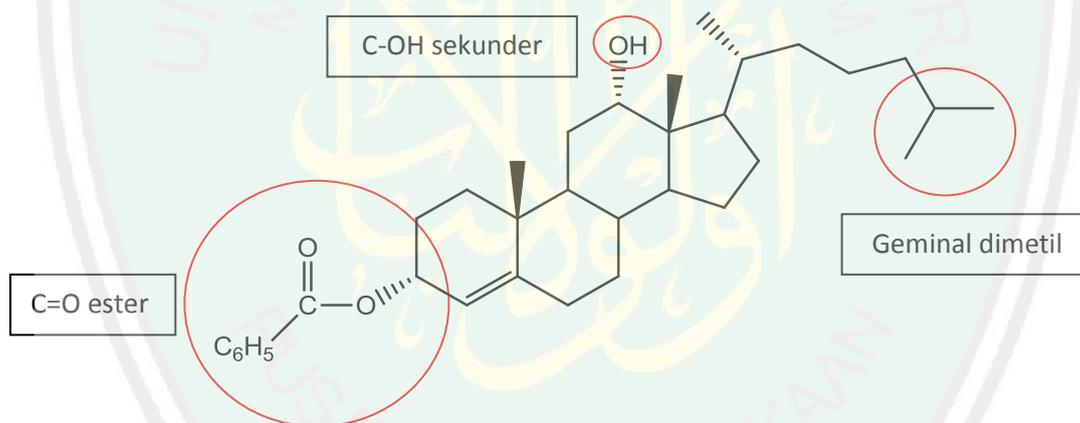
Gambar 4.3 Spektra Infra Merah isolat hasil pemisahan dengan KLT Preparatif mikroalga *Chlorella sp.*

Gambar 4.3 dapat dilihat bahwa puncak serapan lebar terbentuk pada bilangan gelombang $3463,91 \text{ cm}^{-1}$, pada panjang gelombang tersebut terdapat serapan uluran simetri gugus O-H. Pita serapan $2928,50 \text{ cm}^{-1}$ dan $2863,34 \text{ cm}^{-1}$ diduga mengandung rentangan -CH alifatik. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan adanya gugus metil (CH_3) dan metilen (CH_2) (Socrates, 1994). Pada bilangan gelombang $1738,37 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya ikatan rangkap C=O dan C=C dengan daerah serapan $1646,58 \text{ cm}^{-1}$. Dugaan ini diperkuat dengan vibrasi C-H tekuk yang mengindikasikan adanya gugus geminal dimetil yang umumnya ditemukan pada kerangka senyawa steroid (Aprelia dan Suyatno, 2013) (Astuti, dkk., 2004). Vibrasi C-H tekuk terdapat pada pita serapan $1460,79 \text{ cm}^{-1}$ dan $1384,46 \text{ cm}^{-1}$. Bilangan gelombang $1121,73 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya vibrasi C-OH sekunder. Serapan pada bilangan gelombang $668,90 \text{ cm}^{-1}$ merupakan serapan dari C-H gugus alkena dengan intensitas lemah (Skoog, 1998).

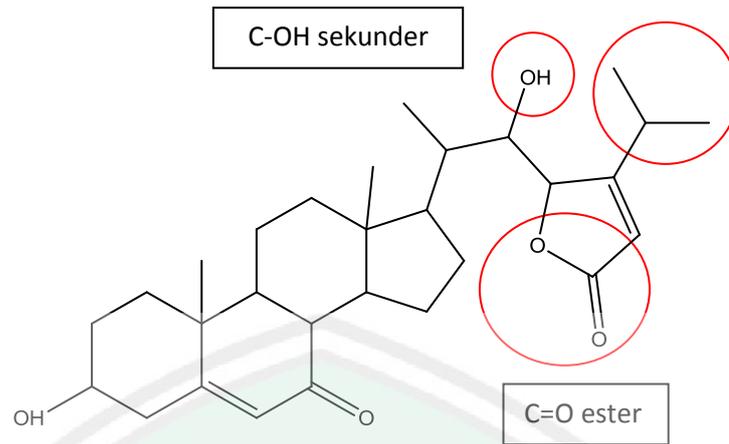
Hasil identifikasi dengan spektrofotometer infra merah ini didukung dengan penelitian Sapar, dkk., (2004) yang menyebutkan bahwa Spons *Biemna triraphis*

mengandung senyawa steroid golongan β -sitosterol yang diidentifikasi menggunakan IR, GC-MS dan H-NMR. Gugus fungsi pada spektrofotometer IR menunjukkan munculnya gugus fungsi O-H stretching ($3432,67\text{ cm}^{-1}$), C-H stretching asimetrik ($2932,26\text{ cm}^{-1}$), C-H stretching simetrik ($2869,55\text{ cm}^{-1}$), C=C stretching ($1635,33\text{ cm}^{-1}$), C-H bonding ($1457,92\text{ cm}^{-1}$), C-O stretching ($1056,79\text{ cm}^{-1}$) dan C-H bonding ($802,24$).

Berdasarkan serapan-serapan gugus fungsi senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* fraksi etil asetat yang muncul pada FTIR, diduga senyawa steroid golongan ester.



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



Antheridiol (Carlile, 1996)

Gambar 4.4 Senyawa steroid golongan ester

4.9 Pemanfaatan Mikroalga *Chlorella sp.* dalam Perspektif Islam

Alam semesta beserta isinya diciptakan oleh Allah SWT sebagai bentuk rasa kasih dan sayang Nya kepada kita sebagai makhluk Nya yang termulia diantara semua makhluk ciptaan Allah. Manusia ditakdirkan oleh Allah sebagai kholifah di muka bumi yang ditugasi untuk menjaga dan melestarikan alam. Alam semesta ini tidak diciptakan dengan tujuan yang sia-sia, tetapi diciptakan untuk tujuan yang agung. Manusia diberi akal agar senantiasa memikirkan segala ciptaan Allah, memilah dan memilih antara kebaikan dan keburukan serta bersyukur atas nikmat yang diberikan Nya kepada kita. Allah SWT berfirman dalam al-Qur'an surat Ali 'Imran ayat 190-191:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

“Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal. (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam

keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): “ Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa api neraka.” (QS. Ali ‘Imran 190-191).

Makna dari ayat ini berdasarkan tafsir Ibnu Katsir (2007) adalah *“Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi”*, artinya pada ketinggian dan keluasan langit dan juga pada kerendahan bumi serta kepadatannya. Dan juga tanda-tanda kekuasaan-Nya yang terdapat pada ciptaan-Nya yang dapat dijangkau oleh indera manusia pada keduanya (langit dan bumi), baik yang berupa bintang-bintang, komet, daratan dan lautan, pegunungan, dan pepohonan, tumbuh-tumbuhan, tanaman, binatang, barang tambang, serta berbagai macam warna dan aneka ragam makanan dan bebatuan. *“Dan silih bergantinya malam dan siang”*. yakni, silih bergantinya, susul menyusulnya, panjang dan pendeknya. Semua itu merupakan ketetapan Allah yang Maha Perkasa. *“Terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal (Ulul Albab).”* Yaitu mereka yang mempunyai akal yang sempurna lagi bersih, yang mengetahui hakikat banyak hal yang jelas dan nyata. Mereka bukan orang-orang yang tuli dan bisu yang tidak berakal. *“Dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi”*. Maksudnya mereka memahami apa yang terdapat pada keduanya (langit dan bumi) dari kandungan hikmah yang menunjukkan keagungan, kekuasaan-Nya, keluasan ilmu-Nya, hikmah-Nya, pilihan-Nya, juga rahmat-Nya.

Dijelaskan pula dalam tafsir Adhawa’ul Bayan yang menjelaskan bahwa pada ayat ini, Allah menyebutkan bahwa di antara perkataan yang diucapkan oleh orang-orang yang berakal itu adalah perkataan mereka yang mensucikan Tuhan mereka, yaitu dengan mengatakan bahwa tidak mungkin Allah menciptakan langit

dan bumi ini dengan sia-sia atau tanpa hikmah satu pun. Maha suci Allah dari hal seperti itu (Asy-Syaqinhi, 2006). Ayat tersebut menjelaskan bahwa sesungguhnya Allah SWT menciptakan segala sesuatu tidaklah sia-sia bagi orang yang mau berfikir, termasuk tumbuh-tumbuhan.

Pengetahuan yang merupakan buah dari akal pikir manusia untuk mempelajari makna yang terkandung dalam al-Qur'an dengan pembuktian sains dilakukan melalui upaya penelitian. Penelitian ini mempelajari tentang tumbuhan laut alga berukuran mikroskopis atau disebut dengan mikrolga jenis *Chlorella sp.* yang merupakan salah satu kekayaan laut yang diberikan Allah SWT kepada umat manusia. Sebagaimana yang tercantum dalam surat an Nahl ayat 14:

وَهُوَ الَّذِي سَخَّرَ الْبَحْرَ لِتَأْكُلُوا مِنْهُ لَحْمًا طَرِيًّا وَتَسْتَخْرِجُوا مِنْهُ حِلْيَةً تَلْبَسُونَهَا وَتَرَى
 الْفُلَّكَ مَوَاجِرَ فِيهِ وَلِتَبْتَغُوا مِنْ فَضْلِهِ ۗ وَلِعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ ﴿١٤﴾

“Dan Dia-lah Allah yang menundukkan lautan (untukmu), agar kamu dapat memakan daripadanya daging yang segar (ikan), dan kamu mengeluarkan dari lautan itu perhiasan yang kamu pakai; dan kamu melihat bahtera berlayar padanya, dan supaya kamu mencari (keuntungan) dari karunia-Nya, dan supaya kamu bersyukur.” (QS. an Nahl : 14).

Allah SWT menyebutkan nikmat-nikmat yang terdapat di lautan yang diberikan kepada hamba-Nya. Dijelaskan bahwa Dia mengendalikan lautan untuk manusia. Maksudnya ialah mengendalikan segala macam nikmat-Nya yang terdapat di lautan berupa daging segar dari segala jenis ikan, mutiara, marjan (sebangsa tumbuh-tumbuhan di dasar laut dan mirip dengan karang) dan kapal yang dijadikan sarana lalu lintas pelayaran. Nikmat-nikmat Allah itu disebutkan agar manusia mensyukuri semua nikmat yang diberikan-Nya kepada manusia. Selain itu, juga dimaksudkan agar manusia dapat memahami betapa besar nikmat

Allah yang telah diberikan dan memanfaatkan nikmat yang tiada tara itu untuk beribadah kepada-Nya (Maraghi dalam Tafsir Al-Maraghi, 1992). Potensi kekayaan laut termasuk mikroalga *Chlorella sp.*, serta kemungkinan pengelolaan dan pemanfaatan bagi keperluan manusia yang dapat dirasakan atau digunakan merupakan salah satu sarana untuk mengambil pelajaran dan memikirkan tentang kekuasaan dan kebesaran Allah SWT.

Berdasarkan penelitian mengenai uji toksisitas dan identifikasi senyawa aktif dalam mikroalga *Chlorella sp.* mempunyai keefektifan menimbulkan kematian terhadap larva udang *Artemia Salina* L. Hasil yang didapatkan sebesar 14,9625 ppm. Hal ini membuktikan bahwa mikroalga *Chlorella sp.* memiliki aktifitas biologi atau efek farmakologi yang dapat berpotensi sebagai obat alternatif sebagai antitumor, antikanker maupun antimikroba dengan parameter nilai LC_{50} .

Allah SWT berfirman dalam Qur'an surat al-Furqon ayat 2:

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُنْ لَهُ شَرِيكٌ فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا ﴿٢﴾

“Yang memiliki kerajaan langit dan bumi, tidak mempunyai anak, tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan-Nya, dan Dia menciptakan segala sesuatu, lalu menetapkan ukuran-ukurannya dengan tepat.” (QS. al-Furqon/18:2)

Menurut tafsir Al-Maraghi (1992), Allah menciptakan segala sesuatu sesuai dengan tuntutan kehendak-Nya yang didasarkan atas hikmah yang sempurna, serta mempersiapkan segala sesuatu yang diciptakan untuk menerima apa yang dikehendaki-Nya, berupa keistimewaan dan perbuatan yang sesuai dengannya (ciptaan-Nya). Maka Dia mempersiapkan manusia untuk dapat

memahami, memikirkan urusan dunia dan akhirat, menemukan berbagai industri, dan memanfaatkan apa yang terdapat di permukaan serta di dalam perut bumi. Dia juga mempersiapkan berbagai jenis hewan untuk melakukan berbagai pekerjaan yang sesuai dengannya dan dengan kemampuannya. Berdasarkan tafsir Ibnu Katsier (2007), Allah menyifatkan diri-Nya, bahwa kepunyaan-Nyalah kerajaan langit dan bumi, tidak mempunyai anak dan tidak pula mempunyai sekutu dalam kerajaan dan kekuasaan-Nya itu dan Dia Yang Maha Kuasa telah menciptakan segala sesuatu yang diberinya perlengkapan-perengkapan dan persiapan-persiapan sesuai dengan naluri, sifat-sifat dan fungsinya masing-masing makhluk itu.

Allah SWT mengatur kadar sesuai dengan ukuran yang dibutuhkan oleh makhluk ciptaanNya. Kadar yang terlalu tinggi maupun yang terlalu rendah dapat menimbulkan manfaat bahkan dampak bagi pemakainya. Oleh karena itu, kadar merupakan sesuatu yang sangat penting untuk dikaji, diteliti dan dipelajari seperti halnya dalam penelitian ini yang menghasilkan nilai LC_{50} sebagai parameter ukuran suatu senyawa dalam mikroalga *Chlorella sp.* yang memiliki daya toksik yang dapat digunakan sebagai obat antikanker, antitumor, maupun obat lainnya.

Rasullullah SAW telah memberikan petunjuk tentang cara mengobati diri beliau sendiri, keluarga dan para sahabat yaitu dengan menggunakan jenis obat yang berasal dari alam (alamiah). Pengobatan tersebut berdasarkan wahyu yang Allah SWT turunkan dalam al Qur'an tentang apa yang dapat dimanfaatkan dari alam, misalnya pengobatan dengan menggunakan berbagai jenis tumbuh-tumbuhan. Pemanfaatan mikroalga *Chlorella sp.* meskipun tidak tersurat didalam al Qur'an maupun al Hadits sebagai tumbuhan yang berpotensi sebagai obat

alternatif, tetapi pemanfaatannya diqiyaskan dengan tumbuhan yang dimanfaatkan sebagai pengobatan. Pemanfaatan mikroalga *Chlorella sp.* bukanlah sesuatu yang melanggar syariat Islam. Hal tersebut merupakan suatu upaya mengikuti sunnah Nabi untuk mencari obat dengan memanfaatkan apa saja asalkan tidak melanggar syariat agama. Sebagaimana sabda Nabi Muhammad SAW yang diriwayatkan dari Ibnu Mas'ud:

إِنَّ اللَّهَ لَمْ يَنْزِلْ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً، عِلْمُهُ مَنْ عِلْمَهُ وَجَهْلُهُ مَنْ جَهْلُهُ

“Sesungguhnya Allah tidaklah menurunkan sebuah penyakit melainkan menurunkan pula obatnya. Obat itu diketahui oleh orang yang bisa mengetahuinya dan tidak diketahui oleh orang yang tidak bisa mengetahuinya.”
(HR. Ahmad, Baihaqi dan Al-Hakim)

Hadits tersebut menunjukkan bahwa Allah SWT itu Maha Adil. Allah SWT tidak akan memberikan suatu penyakit tanpa memberikan obatnya. Obat dari suatu penyakit tersebut dapat ketahui dari belajar ilmu pengetahuan. Namun dari semua ikhtiar yang kita lakukan, kita harus bertawakkal kepada Allah yang Maha Penyembuh karena sesungguhnya tidak ada yang memberikan kesembuhan kecuali Allah SWT. Allah berfirman dalam surat asy Syu'ara ayat 80:

وَإِذَا مَرَضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ ﴿٨٠﴾

“Dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan aku” (QS. asy Syu'ara : 80).

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, didapat kesimpulan sebagai berikut:

1. Dugaan senyawa steroid hasil KLTP fraksi etil asetat ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* dengan uji Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) didapatkan nilai LC_{50} sebesar 14,9625 ppm.
2. Identifikasi isolat dugaan steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan spektrofotometer FTIR memiliki gugus fungsi O-H, geminal dimetil, C=O, C=C, C-OH sekunder dan =C-H (alkena).

5.2 Saran

1. Dugaan spesifik golongan senyawa steroid dalam mikroalga *Chlorella sp.* yang bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia Salina L* dapat diidentifikasi menggunakan LC-MS dengan informasi pola fragmen yang terbentuk.
2. Identifikasi noda pada plat KLT preparatif selain senyawa steroid.

DAFTAR PUSTAKA

- Afif, S. 2012. Ekstraksi, Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Alga Merah *Euchema Cottoni* dari Perairan Sumenep Madura. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia UIN Malang.
- Al Maraghi, A.M. 1992. Terjemahan Tafsir Al-Maraghi 7. Semarang: CV. Toha Putra Semarang.
- AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington DC: Association of Official Analytical.
- Amaliyah, Suci. 2013. Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia salina* dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET). *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Anggraeni, O.N., A. Ghanaim, F., Munirul. A. dan A. Hanapi. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif 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 Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Aprelia, Fitri., dan Suyatno. 2013. Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etil Asetat Tumbuhan Paku *Christella arida* dan Uji Pendahuluan Sebagai Antikanker. Surabaya: UNESA Journal of Chemistry Vol. 2 No.3.
- Astuti, P., S. Utami, T. Pratiwi, T. Hertiani, G. Alam, A. Tahir dan S. Wahyono. 2005. *Antimicrobial Activity Screening of Marine Sponge Extracts Colected from Barang Lomposea*. *Journal of Traditional Medicine* (10): 32.
- Astuti, M.D., Abdi, M., dan Evi, M.K. 2004. Isolasi Steroid dari Fraksi N-Heksana Batang Bajakah Tampala (*Spatholobus littoralis Hassk.*). 2014. *Prosiding Seminar Nasional Kimia*. Surabaya: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya. ISBN : 978-602-0951-00-3
- Asy Syanqithi, S. 2006. Tafsir Adhwa'ul Bayan. Jakarta: Pustaka Azzam.
- Bariyyah, S.K. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *ALCHEMY*. Vol. 2, No.3: 150-204.
- Borowitzka, M.A. dan Lesley, J.B. 1988. *Microalgae Biotechnology*. London : Cambridge University Press.

- Cahyono, A. B. 2004. Keselamatan Kerja Bahan Kimia di Industri. Yogyakarta: UGM Press.
- Colegate, S. M. and Molyneux, R. J. 2007. *Bioactive Natural Products: Determination, Isolation and Structural Determination Second Edition*. Prancis: CRC Press.
- Connel, D. W. dan Gregory J. Miller. 1995. Kimia dan Ekotoksilologi Pencemaran. UI-Press. Jakarta.
- Clifton. 1985. *Introduction to the Bacteria*. Tokyo: Kogakusha Company, LTD.
- Day, Jr., R.A. dan Underwood, A.L, 1999. *Analisis Kimia Kuantitatif (terjemahan Pudjaatmaka, A.H.)*. Jakarta: Penerbit Airlangga.
- Departemen Agama. 2007. Al-Qur'an dan Tafsirnya. Jakarta: Departemen Agama Republik Indonesia.
- Desianti, N.,A. Ghanaim, F., Tri, K. A. 2014. Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* *Jurnal ALCHEMY*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Diastuti, H., dan Warsinah. 2010. Identifikasi Senyawa Antikanker dari Ekstrak Kloroform Kulit Batang *Rhizopora mucronata*. *Majalah Farmasi Indonesia*, 21(4), 266 – 271.
- Fahriyani, I. 2011. Pemanfaatan Kecambah Kacang Hijau dalam Formulasi Bubur Susu Instan sebagai Alternatif Makanan Pendamping Air Susu Ibu (MP-ASI). *Skripsi*. Tidak diterbitkan. Bogor: Departemen Gizi Masyarakat Fakultas Ekologi Manusia Institut Pertanian Bogor.
- Fasya, A. G., Suci, A., Siti, K. B., Khamidah, U., Hanapi, A., dan Romaidi. 2013. *Toxicity, Antioxidant and Antibacterial Activity Test of Methanol Extract of Chlorella sp. Microalgae Result Cultivation in Tauge Extract Medium. Proceeding International Conference*. Malang: Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim. Hal: 287-295.
- Gandjar, I.G. dan Rohman, A. 2007. Kimia Farmasi Analisis. Yogyakarta: Pustaka belajar.
- Guenther, E. 1987. Minyak Atsiri. Jilid I. Terjemahan Ketaren S. Jakarta: Universitas Jakarta.
- Halimah, N. 2010. Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn.) Terhadap Larva Udang *Artemia Salina* Leach. *Skripsi*. Tidak Diterbitkan. Malang: Kurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Harborne. J.B. 1987. Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Diterjemahkan oleh Kokasih Padmawinta dan Iwang Soediro. Bandung. Penerbit ITB.
- Hart, H. 1987. Kimia Organik Suatu Kuliah Singkat. Penerjemah. Achmadi, S. Jakarta: Erlangga.

- 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.
- Hayati, E. K. 2007. *Dasar-Dasar Analisis Spektroskopi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, hal 35-41.
- Hayati, E. K., Akyunul, J., dan Rachmawati, N. 2012. Identifikasi Senyawa Dan Aktivitas Antimalaria In Vivo Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting-Anting (*AcalyphaIndicaL.*). *Molekul*, Vol. 7. N0. 1. hal: 20-32.
- Hendayana, S. 2006. Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern. Bandung: PT. Remaja Rosdakarya.
- Ibnu Katsir. 2007. Tafsir Ibnu Katsir. Bogor : Pustaka Imam Asy-Syafi'i.
- Imamah, N., A. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasinya Menggunakan Spektrofotometer FTIR. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Isanansetyo, A., dan Kurniastuti. 1995. Teknik Kultur Phitoplankton dan Zooplankton Pakan Alami untuk Pembenihan Organisme Laut. Yogyakarta: Kanisius.
- Karger, BL., Synder, L., dan Hosvarth C. 1973. *An Introduction to Separation*. Brisbane: John dan Sons.
- Khamidah, U. Fasya, A. G., dan Romaidi. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* pada Fase Stasioner Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET). *Jurnal*. Malang : *ALCHEMY*. Vol. 3 No.1.
- Khoiriyah, S. Hanapi, A., dan Fasya, A. G. 2014. Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat, Kloroform dan Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga Coklat *Sargassum vulgare* dari Pantai Kapong Pamekasan Madura. *Jurnal*. Malang: *ALCHEMY*. Vol. 3 No.2. hal 133 – 144.
- Kristanti, A. N., Aminah, N. S., Tanjung, M., Kurniadi, B. 2008. Fitokimia. Surabaya: Airlangga University Press.
- Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida dan Alkaloida. Karya Ilmiah Tidak Diterbitkan. Medan: MIPA Universitas Sumatera Utara.
- Lisdawati, V., Sumali, W., L. Broto., dan S. Kardono. 2006. *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dari Berbagai Fraksi Ekstrak Daging Buah dan Kulit Biji Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*). *Jurnal*. Bul. Penel. Kesehatan, Vol. 34 No. 3. Hal 111-118.
- Marraskuranto, E., Nurrahmi, D. F., Hedi, I, J., dan Thamrin, W. 2008. Aktivitas Antitumor (HeLa dan T47D) dan Antioksidan Ekstrak Makroalga Hijau

- Ulva fasciata. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Vol. 3 No. 2.
- Marliana, Eva. 2007. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Batang *Spatholobus Ferrugineus* (Zoll 7 Morizi) Benth yang Berfungsi Sebagai Antioksidan. *Jurnal*. Samarinda: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Mulawarman.
- Meilani, S. W. 2006. Uji Bioaktivitas Zat Ekstraktif Kayu Suren (*Toona sureni Merr.*) dan Ki Bonteng (*Platea latifolia BL.*) Menggunakan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Bogor: Departemen Hasil Hutan Fakultas Kehutanan ITB.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L.B., Nichols, D. E and McLaughlin, J. L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Biossay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45: 31-34.
- Novadiana, A., Erwin., Subur, P. P. 2014. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Steroid Fraksi Kloroform dari Fraksinasi Ekstrak Metanol Daun Kereheu (*Callicarpa longifolia Lam*). *Jurnal Kimia Mulawarman*. Universitas Mulawarman: Kimia FMIPA Unmul. Vol. 12: 8 – 13.
- Prihantini, N. B., Damayanti, D. dan Yuniati, R. 2007. Pengaruh Konsentrasi Medium Ekstrak Tauge (MET) terhadap Pertumbuhan *Scenedesmus* Isolat Subang. *Makara, Sains, Vol. 11: 1 - 9*.
- Prihantini, N. B., Damayanti, D. dan Yuniati, R. 2005. Pertumbuhan *Chlorella spp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan Variasi pH Awal. *Makara, Sains, Vol. 9: 1 - 6*.
- Pridawati, E., Ahyar., A., dan Usman, H. 2014. *Isolation and Identification of Secondary Metabolites of Chloroform Fraction of Macroalgae Padina australis as Anti Tuberculosis*. *Journal. Indonesia Chimica Acta*. Vol. 7 No.1.
- Rahayu, M. R., James, S., dan I Made, D. S. 2013. Uji Toksisitas dan Identifikasi Ekstrak Etanol *Spons Callyspongia aerizusa* Terhadap Larva *Artemia Salina L.* *Jurnal Cakra Kimia*. Vol 1. No. 1. 1 – 7.
- 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.
- Saifudin, A., Suparti, Fuad, Anang dan Da'i, M. 2006. Biotransformasi Kurkumin Melalui Kultur Suspensi Sel Daun *Catharanthus roseus [L]* G.Don Berbunga Merah. *Skripsi*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah.
- Sapar, Ajuk., A. S. Kumanireng., N. de Voogd., dan Alfian Noor. 2004. Isolasi dan Penentuan Struktur Metabolit Sekunder Aktif dari Spons *Biemna*

- triraphis* Asal Pulau Kepodasang (Kepulauan Spermonde). Jurnal Marina Chimica Acta, Vol. 5 No. 1: Universitas Hasanuddin.
- Sastrohamidjojo, H. 2002. Kromatografi. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada Press.
- Shankhadarwar, S. D. 2015. *Phytochemical Analysis of Red Acanthopora spicifera (Vahl) Collected from Mumbai, India. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(12):441-444. ISSN: 0975-7384.
- Setiawan, B. 2010. Uji Toksisitas (*Artemia salina* Leach) dan Antibakteri (*Staphylococcus aureus*) Ekstrak Etanol Daun Benalu Cengkeh (*Dendropohtoe pentandra* (L.) Miq.). *Skripsi*. Tidak Diterbitkan. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Setyaningsih, D., Nurmillah, O. Y., Windarwati, S. 2013. Kajian aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Ekstrak Biji, Kulit Buah, Batang dan Daun Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L). Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Shihab, Q. 2001. Tafsir Al-Mishbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an. Jakarta: Penerbit Lentera Hati.
- Siadi, K. 2012. Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) Sebagai Biopestisida yang Efektif dengan Penambahan Larutan NaCl. Jurnal MIPA 35 (1).
- Sidabutar, E. 1999. Pengaruh Jenis Medium Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella sp.* terhadap Aktivitas Senyawa Pemacu Pertumbuhan yang Dihasilkan. *Skripsi*. Tidak Diterbitkan. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Socrates. 1994. *Infrared Characteristic group Frequencies -2nd Edition*. England: John Wiley and Sons Ltd.
- Soebagio, Budiasih, E., Ibnu, M.S., Widarti, H.R. dan Munzil. 2005. *Kimia Analitik II*. Malang: UM Press.
- Soemirat, J. 2005. Toksilogi Lingkungan. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Skoog, DA., Holler, FJ., Nieman, TA., dan Crouch, SR. 1998. *Principles of Instrumental Analysis*. Ed ke-5. Orlando: Hourcourt Brace.
- Sriwahyuni, I. 2010. Uji Fitokimia Ekstrak Tanaman Ating-Ating (*Acalypha Indica* Linn) dengan Variasi Pelarut dan Uji Toksisitas Menggunakan *Brine Shrimp* (*Artemia salina* Leach). *Skripsi* Diterbitkan. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Tensiska, Marsetio, Silvia, O.N.Y. 2007. Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Isoflavon dari Ampas Tahu. *Hasil Penelitian Dosen Jurusan Teknologi Industri Pangan*. Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Widyastuti, S. 2008. Uji Toksisitas Ekstrak Daun Iprih (*Ficus Glabella Blurme*) Terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Wulandari, A. P., Naderia, F., Pattalia, A. E., dan Permata, D. R. 2010. Identifikasi Mikroalga di Sekitar Pantai Pangandaran dan Potensi Pertumbuhannya pada Formulasi Medium Ekstrak Tauge (MET). *Prosiding Seminar Nasional Limnologi V Tahun 2010*. Jatinagor: Jurusan Biologi FMIPA Universitas Padjadjaran.
- 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

L.1. Komposisi dan Nilai Gizi Kacang Hijau

Perbandingan komposisi dan nilai gizi antara biji kacang hijau sebelum dan sesudah dikecambahkan dalam 100 gram.

Komposisi Gizi	Nilai Gizi	
	Dalam biji	Dalam kecambah
Kalori (kal)	382	354
Karbohidrat(g)	67,22	44,79
Protein (g)	27,10	38,54
Lemak (g)	1,78	12,50
Kalsium (mg)	263,91	1729,17
Fosfor (mg)	377,51	770,83
Besi (mg)	8,88	8,33
Natrium (mg)	-	-
Kalium (mg)	-	-
Karoten (mg)	263,91	208,33
Tiamin (mg)	0,54	0,94
Riboflavin (mg)	0,18	1,56
Niasin (mg)	1,78	11,46
Vitamin C (mg)	11,83	52,08

Sumber: Persagi (2009) dalam Fahriyani (2011)

▪ **Jumlah Kelimpahan Sel pada Tiap Fase Pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.***

1. Fase log atau eksponensial

Kelimpahan sel mikroalga *Chlorella sp.* fase eksponensial

Hari ke-	Jumlah Sel (sel/mL)
0	400.000
1	672.000
2	912.000
3	1.216.000
4	1.216.000
5	2.192.000
6	2.656.000
7	3.616.000
8	4.656.000

2. Fase penurunan laju pertumbuhan

Kelimpahan sel mikroalga *Chlorella sp.* fase penurunan laju pertumbuhan

Hari ke-	Selisih Jumlah Sel (sel/mL)
7 - 8	1.040.000
8 - 9	128.000

3. Fase Stasioner

Kelimpahan sel mikroalga *Chlorella sp.* fase stasioner

Hari ke-	Jumlah Sel (sel/mL)
8	4.656.000
9	4.784.000
10	4.880.000
11	4.704.000

4. Fase Kematian

Kelimpahan sel mikroalga *Chlorella sp.* fase stasioner

Hari ke-	Jumlah Sel (sel/mL)
9 - 10	4.784.000 - 4.880.000
10 - 11	4.880.000 - 4.704.000

L.2. Uji Taksonomi Mikroalga *Chlorella sp.* (Anggraeni, dkk., 2014)



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

KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0114/Takso. Identifikasi/03/2013

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

Nama : A. Ghanaim Fasya, M.Si.

Instansi : UIN Malang

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

Familia : Chlorellaceae
Genus : *Chlorella*
Species : *Chlorella sp.*

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 2 Oktober 2013

Kepala Laboratorium
Taksonomi, Struktur dan
Perkembangan Tumbuhan.

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

L.3. Identifikasi Mikroalga *Chlorella* sp. (Amaliyah, 2013)

160



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

LABORATORIUM BIOLOGI

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

Malang, 15 Juni 2013

SURAT KETERANGAN HASIL IDENTIFIKASI SAMPEL

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

Deskripsi Sampel :

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

Chlorella sp.

Referensi :

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

Mengetahui,
Identifikator

Romaidi, M.Si

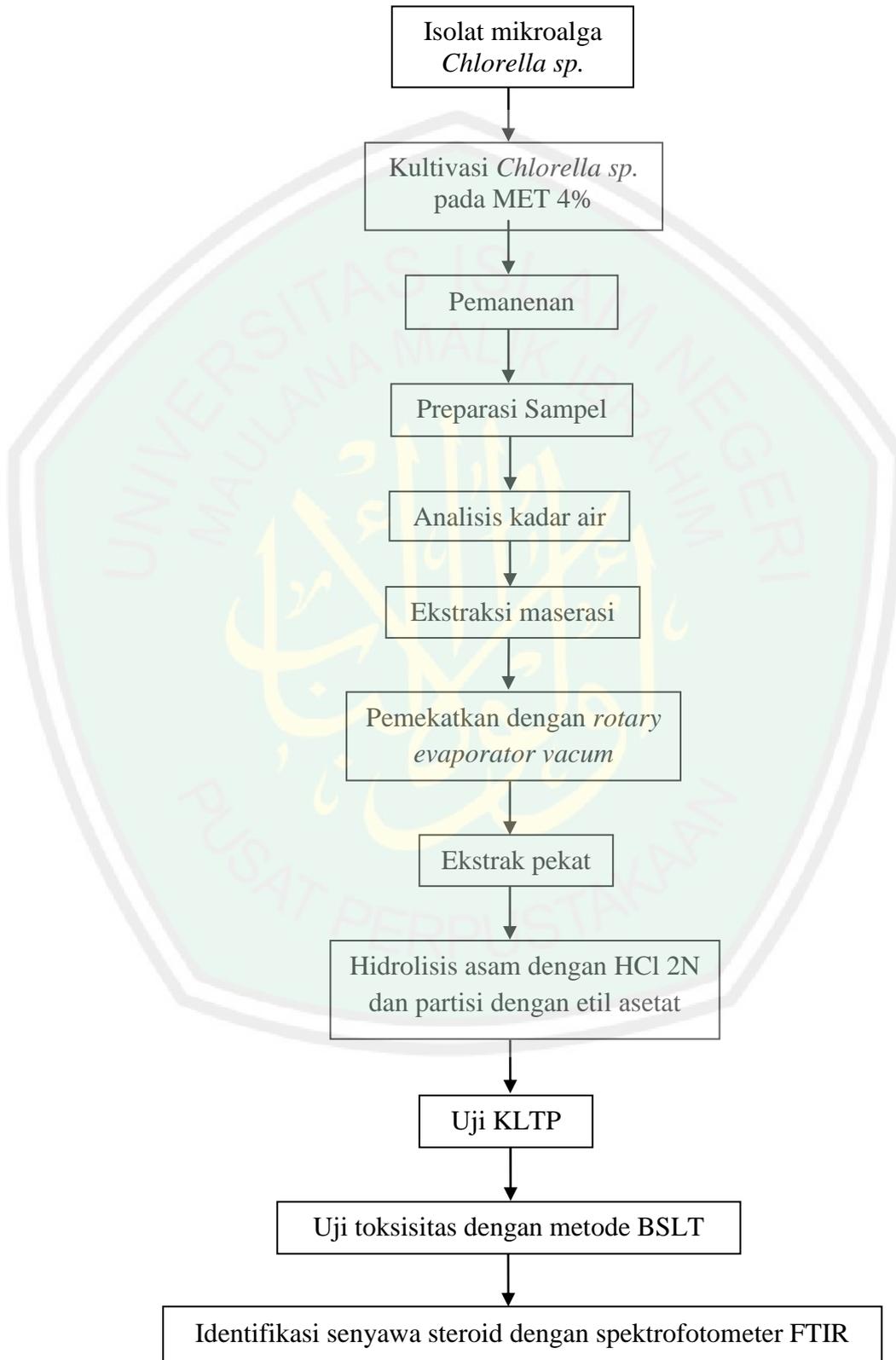
NIP. 19810201 200901 1 019

Koordinator Laboratorium

Kholifah Holil, M.Si

NIP. 19751106 200912 2 001

L.4. Diagram Alir Penelitian



L.5. Perhitungan Kultivasi dan Pembuatan Reagen dan Larutan

L.5.1 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam MET 4 %

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

- a. Kultivasi dalam erlenmeyer 1000 ml dengan memaksimalkan daya tampung erlenmeyer

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

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

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

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

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

$$= 1050 \text{ mL}$$

- b. Pembuatan MET 4 % sebanyak 900 ml

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

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

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

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

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

$$= 864 \text{ mL}$$

- c. Kultivasi dalam botol air mineral 1200 ml dengan memaksimalkan daya tampung botol air mineral

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

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

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

Volume total = Isolat *Chlorella* sp + MET 4 %

$$= 200 \text{ mL} + 1200 \text{ mL}$$

$$= 1400 \text{ mL}$$

d. Pembuatan MET 4 % sebanyak 1200 ml

MET = (aquades + ekstrak tauge)

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

$$= 48 \text{ mL ekstrak tauge}$$

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

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

$$= 1152 \text{ mL}$$

L.5.2 Pembuatan Larutan HCl 2 N

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

L.5.3 Pembuatan Reagen Lieberman-Burchard

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

Cara pembuatannya adalah disiapkan etanol absolut dan dimasukkan dalam beaker glass, kemudian anhidrida asetat dituangkan secara perlahan pada dinding beaker glass. Selanjutnya asam sulfat pekat dicampur kedalam beaker glass dan dikocok secara perlahan.

L.5.4 Pembuatan larutan stok 1000 ppm ekstrak metanol fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* untuk KLTP

ppm = mg/L

mg = ppm. L (jika dibuat larutan stok 1 mL = 10^{-3} L)

= 1000 ppm. 0,005 L

= 5 mg

Cara Pembuatannya larutan stok 1000 ppm adalah dibuat dengan diambil 5 mg ekstrak pekat metanol fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.*, kemudian dilarutkan dengan pelarutnya (etil asetat), dan ditanda bataskan dalam labu takar 5 mL.

L.5.5 Perhitungan Konsentrasi Larutan Isolat Steroid Hasil KLTP untuk Uji Toksisitas

a. Pembuatan larutan stok 580 ppm isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* untuk uji toksisitas

ppm = mg/L (jika dibuat larutan stok 1 mL = 10^{-3} L)

$$= 2.9 \text{ mg} / 0,005 \text{ L}$$

$$= 580 \text{ ppm}$$

Cara pembuatannya larutan stok 580 ppm adalah dibuat dengan diambil 2,9 mg isolat steroid mikroalga *Chlorella sp.*, kemudian dilarutkan dengan eluennya (n-heksana:etil asetat (4:1)), dan ditanda bataskan dalam labu takar 5 mL.

b. Pembuatan variasi konsentrasi dari larutan stok 580 ppm isolat steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.* untuk uji toksisitas

- 5 ppm

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$580 \text{ ppm} \cdot X = 5 \text{ ppm} \cdot 5 \text{ mL}$$

$$X = 25 \text{ ppm} \cdot \text{mL} / 580 \text{ ppm}$$

$$X = 0,0431 \text{ mL} \rightarrow 43,1 \mu\text{L}$$

- 10 ppm

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$580 \text{ ppm} \cdot X = 10 \text{ ppm} \cdot 5 \text{ mL}$$

$$X = 50 \text{ ppm} \cdot \text{mL} / 580 \text{ ppm}$$

$$X = 0,0862 \text{ mL} \rightarrow 86,2 \mu\text{L}$$

- 15 ppm

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$580 \text{ ppm} \cdot X = 15 \text{ ppm} \cdot 5 \text{ mL}$$

$$X = 75 \text{ ppm} \cdot \text{mL} / 580 \text{ ppm}$$

$$X = 0,1293 \text{ mL} \rightarrow 129,3 \mu\text{L}$$

- 20 ppm

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$580 \text{ ppm} \cdot X = 20 \text{ ppm} \cdot 5 \text{ mL}$$

$$X = 100 \text{ ppm} \cdot \text{mL} / 580 \text{ ppm}$$

$$X = 0,1724 \text{ mL} \rightarrow 172,4 \mu\text{L}$$

- 25 ppm

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$580 \text{ ppm} \cdot X = 25 \text{ ppm} \cdot 5 \text{ mL}$$

$$X = 125 \text{ ppm} \cdot \text{mL} / 580 \text{ ppm}$$

$$X = 0,2155 \text{ mL} \rightarrow 215,5 \mu\text{L}$$

Cara pembuatannya dipipet μL masing-masing konsentrasi dari larutan stok 580 ppm. Dimasukkan dalam botol vial yang berbeda, kemudian diuapkan, lalu ditanda bataskan dengan air laut hingga volume 5 mL.



L.6. Perhitungan Kadar Air Kering

Data Pengukuran Kadar Air

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

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

Keterangan: P = Perlakuan

1. Kadar air ulangan ke-1

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

2. Kadar air ulangan ke-2

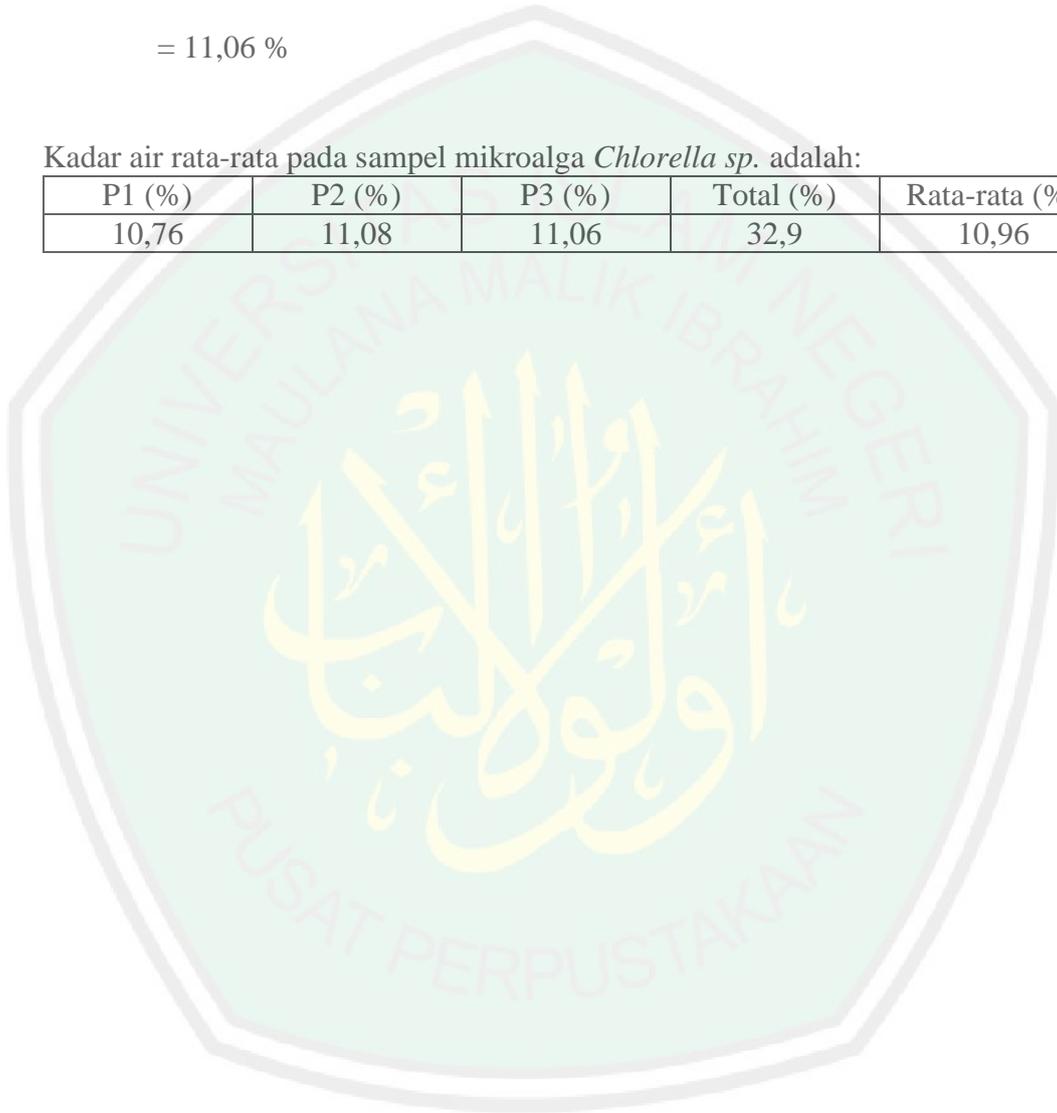
$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dikeringkan})-(\text{berat cawan+sampel setelah dikeringkan})}{(\text{berat cawan + sampel sebelum dikeringkan})-(\text{berat cawan kosong})} \times 100 \% \\
 &= \frac{(58,1871-58,1318) \text{ gr}}{(58,1871-57,6882) \text{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

3. Kadar air ulangan ke-3

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

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

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



L.7. Perhitungan Kadar Air Basah Data Pengukuran Kadar Air

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

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

Keterangan: P = perlakuan

4. Kadar air ulangan ke-1

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan + sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan + sampel setelah dikeringkan})}{(\text{berat cawan + sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\
 &= \frac{(19,6448 - 19,1552) \text{ gr}}{(19,6448 - 19,1436) \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,4896 \text{ gr}}{0,5015 \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= 97,62 \%
 \end{aligned}$$

5. Kadar air ulangan ke-2

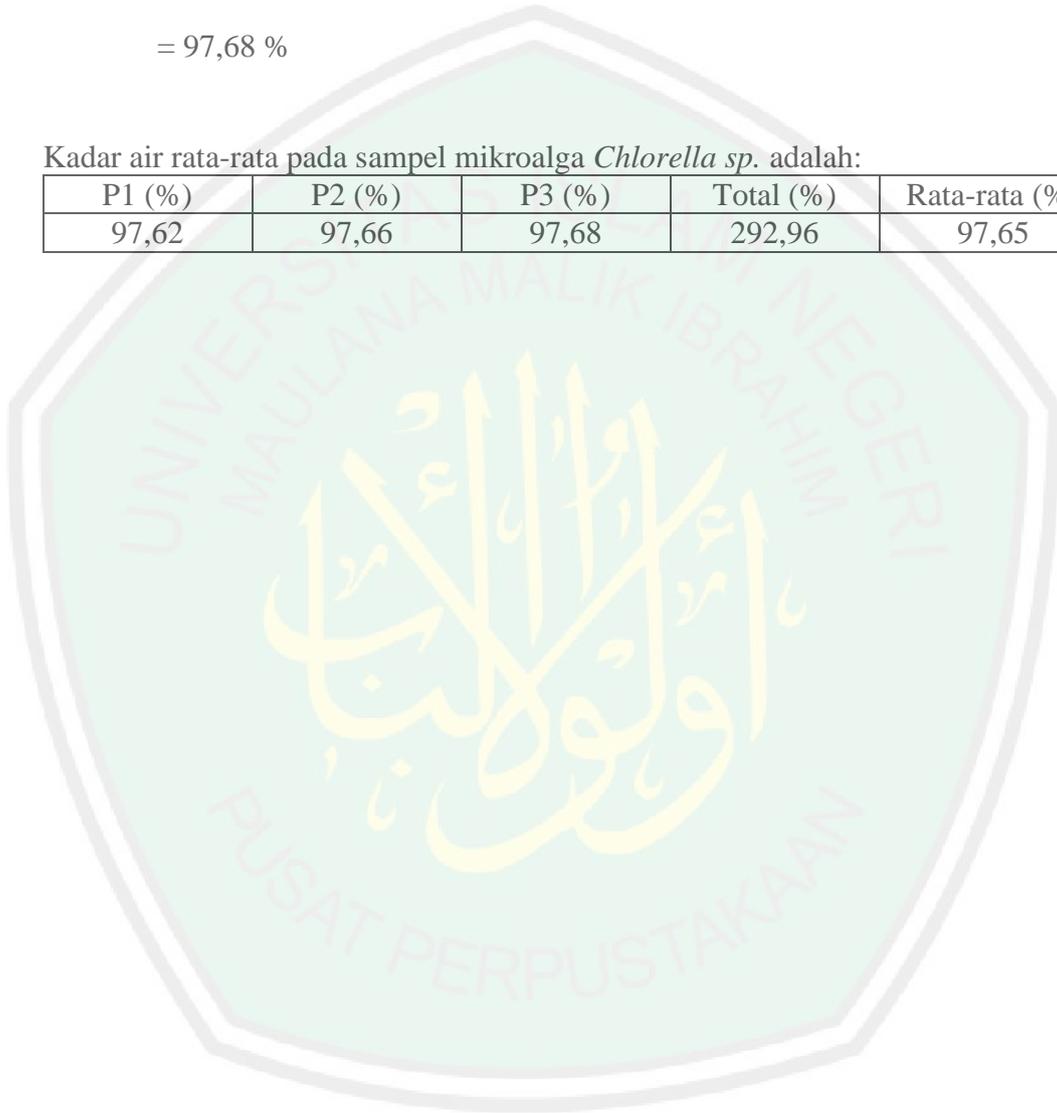
$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan + sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan + sampel setelah dikeringkan})}{(\text{berat cawan + sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100\% \\
 &= \frac{(25,4173 - 24,9271) \text{ gr}}{(25,4173 - 24,9154) \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,4902 \text{ gr}}{0,5019 \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= 97,66 \%
 \end{aligned}$$

6. Kadar air ulangan ke-3

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan} + \text{sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan} + \text{sampel setelah dikeringkan})}{(\text{berat cawan} + \text{sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100 \% \\
 &= \frac{(17,9942 - 17,5042) \text{ gr}}{(19,9942 - 17,4926) \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,49 \text{ gr}}{0,5016 \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= 97,68 \%
 \end{aligned}$$

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

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



L.8. Perhitungan Rendemen

1. Rendemen Hasil Pengeringan

▪ Pemanenan

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

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

2. Rendemen Hasil Maserasi (Fasya, dkk., 2016)

Berat sampel (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + ekstrak pekat (g)	Berat ekstrak pekat (g)
30,0005	65,1469	67,7278	2,5809
	68,1975	72,1845	3,987
Total			6,5679

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\
 &= \frac{6,5679 \text{ g}}{30,0005 \text{ g}} \times 100 \% \\
 &= 0,21892635 \times 100 \% \\
 &= 21,8926 \%
 \end{aligned}$$

3. Perhitungan Rendemen Hasil Partisi

▪ Partisi Etil Asetat

Berat ekstrak metanol yang akan dihidrolisis (g)	Berat gelas kosong (g)	Berat gelas + ekstrak etil asetat (g)	Berat ekstrak pekat etil asetat (g)
2,5050	129,5239	131,5513	2,0278

$$\begin{aligned}\text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{2,0278 \text{ g}}{2,5050 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 0,8095009 \times 100 \% \\ &= 80,95 \%\end{aligned}$$

L.9. Perhitungan Nilai Rf KLT Preparatif

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

Hasil nilai Rf KLT preparatif

➤ Eluen n-Heksana : Etil asetat (4:1)

Rf noda 1 = $\frac{0,7 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,0389$	Rf noda 9 = $\frac{9,7 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,2056$
Rf noda 2 = $\frac{1,6 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,0889$	Rf noda 10 = $\frac{11,1 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,6167$
Rf noda 3 = $\frac{3,25 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,1805$	Rf noda 11 = $\frac{13 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,7222$
Rf noda 4 = $\frac{4,25 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,2361$	Rf noda 12 = $\frac{13,6 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,7556$
Rf noda 5 = $\frac{5,3 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,2944$	Rf noda 13 = $\frac{14,5 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,8056$
Rf noda 6 = $\frac{6,1 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,0,3389$	Rf noda 14 = $\frac{15,25 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,8472$
Rf noda 7 = $\frac{7,9 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,4384$	Rf noda 15 = $\frac{16,3 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,9056$
Rf noda 8 = $\frac{9 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,5$	

L.10. Perhitungan Toksisitas

$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{Modus}}{\text{Jumlah larva yang dimasukkan}} \times 100 \%$$

$$\text{Mortalitas} = \% \text{ Mortalitas} \times \text{jumlah hewan uji}$$

L.10.1 Hasil uji toksisitas ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.*

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati (ekor)				% Mortalitas
	I	II	III	Modus	
0*	0	0	0	0	0
0**	0	0	0	0	0
5	1	1	1	1	10
10	0	0	0	0	0
15	3	2	2	2	20
20	2	2	2	2	20
25	4	4	3	2	20

Keterangan: * : Kontrol pelarut
** : Kontrol DMSO

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva uji	Mortalitas
0*	30	0
0**	30	0
5	30	3
10	30	0
15	30	6
20	30	6
25	30	6

24/05/2016 0:18:03

Welcome to Minitab, press F1 for help.

Probit Analysis: Mortalitas; Jumlah larva versus Konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas	Event	21
	Non-event	189
Jumlah larva	Total	210

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-2,04980	0,270274	-7,58	0,000
Konsentrasi Natural Response	0,0562784	0,0154107	3,65	0,000

Log-Likelihood = -60,491

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	9,3730	4	0,052
Deviance	11,4051	4	0,022

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

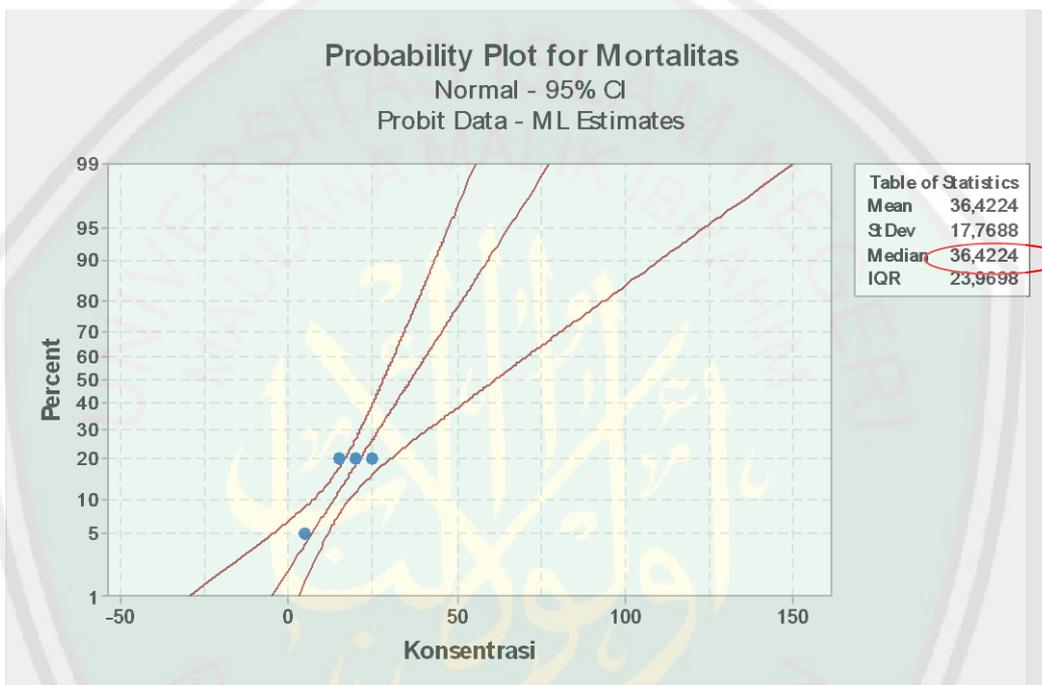
Parameter	Estimate	Standard Error	95,0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	36,4224	6,15265	24,3635	48,4814
StDev	17,7688	4,86562	10,3890	30,3908

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95,0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-4,91398	6,02485	-29,4251	3,07648
2	-0,0702262	4,81946	-19,2170	6,47527
3	3,00298	4,09365	-12,8245	8,71584
4	5,31484	3,58120	-8,09095	10,4767
5	7,19535	3,19639	-4,31589	11,9843
6	8,79597	2,90084	-1,18169	13,3465
7	10,1994	2,67412	1,48185	14,6254
8	11,4560	2,50397	3,77619	15,8610
9	12,5988	2,38205	5,76726	17,0803
10	13,6508	2,30194	7,50204	18,3007
20	21,4678	2,77657	16,9948	30,7672
30	27,1045	3,89019	21,6155	41,9807
40	31,9208	5,02516	25,1327	51,9931
50	36,4224	6,15265	28,2762	61,4956
60	40,9241	7,31417	31,3487	71,0690
70	45,7404	8,57889	34,5909	81,3565
80	51,3770	10,0767	38,3496	93,4319
90	59,1941	12,1727	43,5245	110,216

91	60,2460	12,4560	44,2186	112,477
92	61,3889	12,7639	44,9721	114,934
93	62,6455	13,1028	45,8002	117,636
94	64,0489	13,4815	46,7244	120,654
95	65,6495	13,9139	47,7776	124,097
96	67,5300	14,4223	49,0142	128,144
97	69,8419	15,0480	50,5332	133,119
98	72,9151	15,8806	52,5507	139,735
99	77,7588	17,1947	55,7269	150,165

Probability Plot for Mortalitas



L.10.2 Hasil uji toksisitas fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella* sp.

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati (ekor)				% Mortalitas
	I	II	III	Modus	
0*	0	0	0	0	0
0**	0	0	0	0	0
5	2	2	2	2	20
10	3	3	2	3	30
15	4	4	1	4	40
20	5	7	5	5	50
25	3	4	3	3	30

Keterangan: * : Kontrol pelarut
 ** : Kontrol DMSO

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva uji	Mortalitas
0*	30	0
0**	30	0
5	30	6
10	30	9
15	30	12
20	30	15
25	30	9

12/06/2016 18:55:41

Welcome to Minitab, press F1 for help.

Probit Analysis: Mortalitas; Jumlah Larva versus Konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas	Event	51
	Non-event	159
Jumlah Larva	Total	210

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1,41934	0,188190	-7,54	0,000
Konsentrasi	0,0579212	0,0117641	4,92	0,000
Natural Response		0		

Log-Likelihood = -103,151

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	16,6809	4	0,002
Deviance	21,0037	4	0,000

Tolerance Distribution

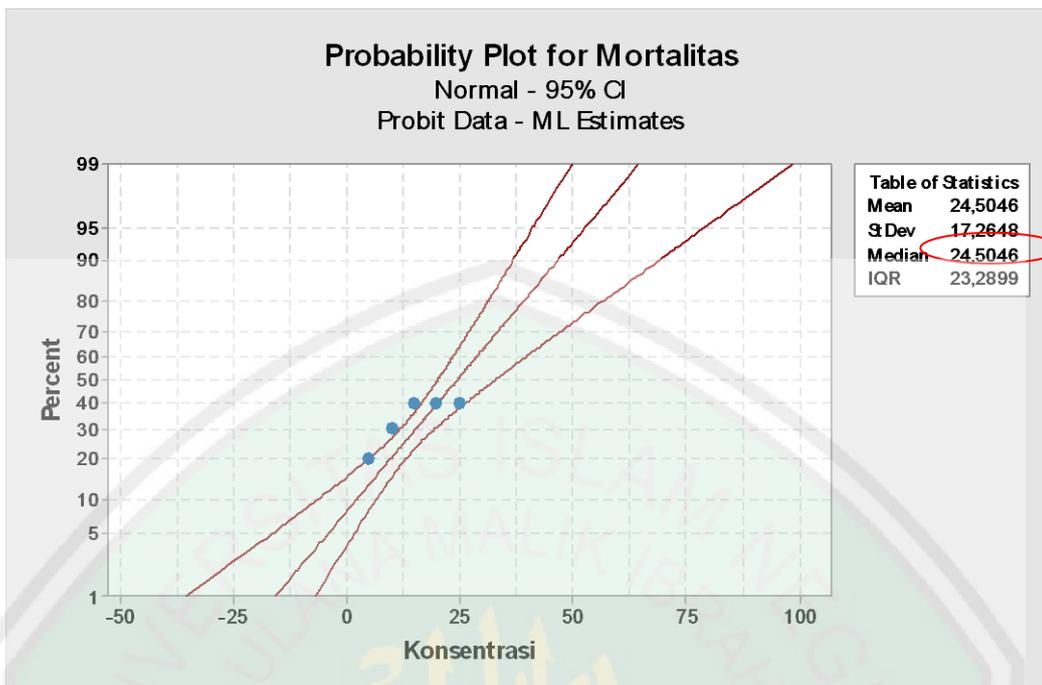
Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95,0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	24,5046	2,81940	18,9787	30,0305
StDev	17,2648	3,50658	11,5952	25,7067

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95,0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-15,6594	6,17801	-35,4575	-6,85905
2	-10,9530	5,26715	-27,7278	-3,40349
3	-7,96699	4,69852	-22,8422	-1,19238
4	-5,72070	4,27762	-19,1809	0,484832
5	-3,89352	3,94106	-16,2145	1,86095
6	-2,33831	3,65986	-13,7005	3,04306
7	-0,974686	3,41828	-11,5064	4,08985
8	0,246273	3,20684	-9,55211	5,03727
9	1,35669	3,01937	-7,78488	5,90907
10	2,37882	2,85169	-6,16851	6,72192
20	9,97415	1,87525	5,23978	13,3648
30	15,4509	1,77250	12,0063	19,6144
40	20,1306	2,18681	16,5371	26,2054
50	24,5046	2,81940	20,2012	32,9366
60	28,8786	3,56290	23,6248	39,9083
70	33,5583	4,41803	27,1634	47,4915
80	39,0350	5,45900	31,2229	56,4483
90	46,6304	6,93942	36,7787	68,9436
91	47,6525	7,14065	37,5224	70,6291
92	48,7629	7,35967	38,3295	72,4611
93	49,9839	7,60093	39,2160	74,4763
94	51,3475	7,87088	40,2052	76,7279
95	52,9027	8,17933	41,3323	79,2970
96	54,7299	8,54240	42,6550	82,3168
97	56,9762	8,98966	44,2794	86,0309
98	59,9622	9,58552	46,4361	90,9709
99	64,6686	10,5271	49,8305	98,7618

Probability Plot for Mortalitas



L.10.3 Hasil uji toksisitas senyawa steroid hasil KLTP mikroalga *Chlorella sp.*

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati (ekor)				% Mortalitas
	I	II	III	Modus	
0*	0	0	0	0	0
0**	0	0	0	0	0
5	4	4	4	4	40
10	3	4	3	3	30
15	7	5	5	5	50
20	8	8	5	8	80
25	7	7	7	7	70

Keterangan: * : Kontrol pelarut
** : Kontrol DMSO

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva uji	Mortalitas
0*	30	0
0**	30	0
5	30	12
10	30	9
15	30	15
20	30	24
25	30	21

Welcome to Minitab, press F1 for help.

Probit Analysis: Mortalitas; Jumlah larva mati versus Konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
Mortalitas	Event	81
	Non-event	129
Jumlah larva mati	Total	210

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1,38667	0,180584	-7,68	0,000
Konsentrasi	0,0926762	0,0120123	7,72	0,000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -104,379

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	20,7675	4	0,000
Deviance	23,4600	4	0,000

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

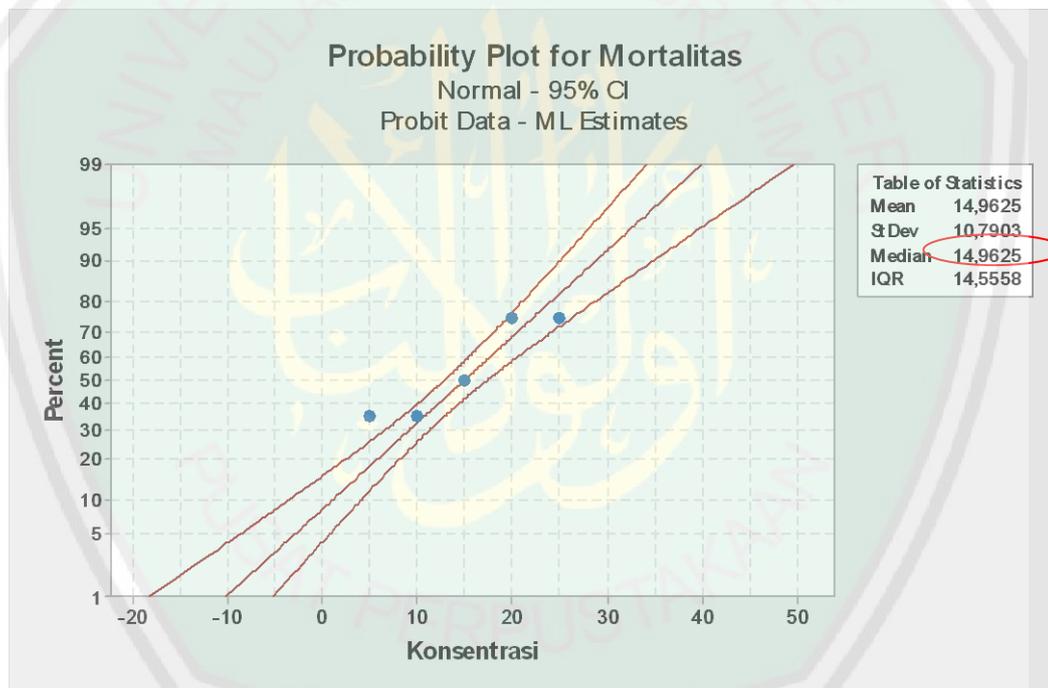
Parameter	Estimate	Standard Error	95,0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	14,9625	1,11873	12,7699	17,1552
StDev	10,7903	1,39858	8,36957	13,9111

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95,0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-10,1393	3,13011	-18,2374	-5,17108
2	-7,19793	2,77508	-14,3460	-2,77379
3	-5,33170	2,55375	-11,8849	-1,24499
4	-3,92781	2,38988	-10,0387	-0,0896901
5	-2,78585	2,25863	-8,54104	0,854143
6	-1,81386	2,14863	-7,26974	1,66093
7	-0,961620	2,05370	-6,15810	2,37137
8	-0,198539	1,97007	-5,16553	3,01025
9	0,495453	1,89529	-4,26540	3,59386
10	1,13427	1,82767	-3,43928	4,13352

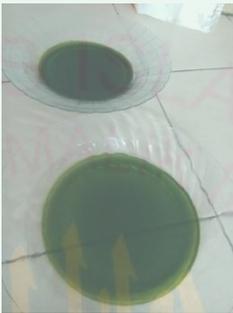
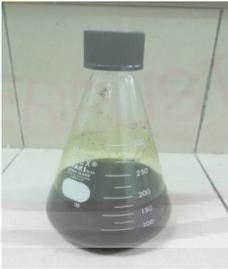
20	5,88123	1,37808	2,59139	8,25175
30	9,30413	1,15310	6,73324	11,4280
40	12,2289	1,07469	10,0292	14,3850
50	14,9625	1,11873	12,8562	17,4026
60	17,6962	1,26461	15,4645	20,6389
70	20,6210	1,49976	18,0883	24,2680
80	24,0438	1,83713	21,0308	28,6436
90	28,7908	2,36385	24,9921	34,8313
91	29,4296	2,43791	25,5188	35,6703
92	30,1236	2,51897	26,0898	36,5831
93	30,8867	2,60878	26,7163	37,5880
94	31,7389	2,70983	27,4144	38,7119
95	32,7109	2,82594	28,2090	39,9954
96	33,8529	2,96339	29,1405	41,5054
97	35,2568	3,13368	30,2830	43,3644
98	37,1230	3,36195	31,7981	45,8394
99	40,0644	3,72521	34,1790	49,7471

Probability Plot for Mortalitas



L.11. Dokumentasi Penelitian

Tahapan	Dokumentasi
<p>1. Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;">  <div style="text-align: right;"> <p>Ekstrak tauge hasil perebusan sebelum diencerkan</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;">  <div style="text-align: right;"> <p>MET 4 %</p> </div> </div>
<p>2. Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam MET 4 %</p>	<div style="text-align: center;">  <p>Perubahan warna kultur mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dari hari ke-0 sampai hari ke-10</p> </div>
<p>3. Pemanenan Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i></p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;">  <div style="text-align: right;"> <p>Hasil pengumpulan panen biomassa mikroalga <i>Chlorella sp.</i></p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;">  <div style="text-align: right;"> <p>Biomassa mikroalga <i>Chlorella sp.</i> sebelum disentrifuge</p> </div> </div>

		<p>Hasil biomassa setelah disentrifugasi yang siap untuk dikering-anginkan</p>
<p>4. Preparasi Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i></p>	 	<p>Proses pengering-anginan mikroalga <i>Chlorella sp.</i></p> <p>Hasil kerokan biomassa mikroalga <i>Chlorella sp.</i> yang berupa serbuk</p>
<p>5. Ekstraksi Maserasi</p>	 	<p>Proses perendaman sampel mikroalga <i>Chlorella sp.</i></p> <p>Penyaringan hasil maserasi mikroalga <i>Chlorella sp.</i> menggunakan corong buchner</p>

6. Hidrolisis



Proses hidrolisis dengan penambahan HCl 2 N dan diaduk dengan bantuan *magnetic stirrer*



Proses penetralan dengan penambahan natrium bikarbonat



Pengukuran pH setelah hidrolisis yang telah dinetralkan dengan natrium bikarbonat

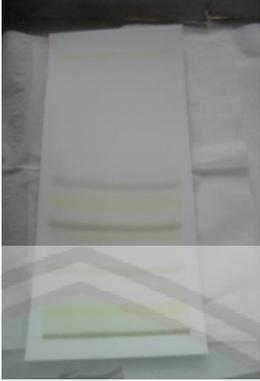
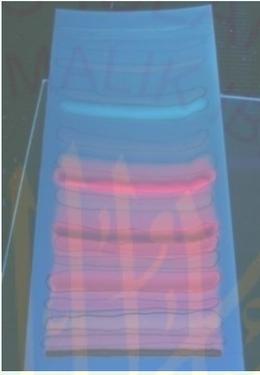
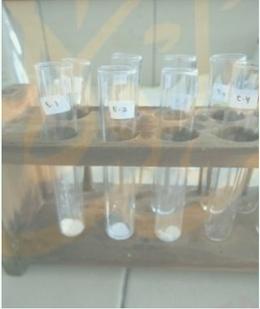
7. Partisi ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* dengan pelarut etil asetat



Proses partisi terbentuk 2 lapisan (organik dan air)



Penguapan pelarut menggunakan gas N₂

<p>8. Identifikasi senyawa steroid fraksi etil asetat dengan KLTP</p>	<div data-bbox="715 230 975 611">  </div> <p data-bbox="1034 371 1316 488">Hasil elusi sebelum dilakukan penyinaran dengan lampu UV</p> <div data-bbox="715 680 975 1055">  </div> <p data-bbox="1034 808 1316 925">Hasil elusi saat dilakukan penyinaran dengan lampu UV</p> <div data-bbox="715 1088 975 1397">  </div> <p data-bbox="997 1149 1334 1223">Proses pemisahan senyawa dalam plat silika</p>
<p>9. Uji toksisitas dengan metode BSLT</p>	<div data-bbox="715 1469 1015 1720">  </div> <p data-bbox="1054 1543 1350 1659">Proses penetasan larva udang <i>Artemia Salina</i> L.</p>



Proses pengujian toksisitas isolat steroid *Chlorella sp.* terhadap larva udang *Artemia Salina L.*

Larutan ragi roti

