

**UJI TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA AKTIF
FRAKSI ETIL ASETAT, KLOOROFORM, PETROLEUM ETER
DAN n-HEKSANA HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL
MIKROALGA *Chlorella sp.***

SKRIPSI

Oleh:

NUR DESIANTI

NIM. 09630060



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)
MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG**

2014

**UJI TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA AKTIF
FRAKSI ETIL ASETAT, KLOOROFORM, PETROLEUM ETER DAN n-
HEKSANA HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL MIKROALGA**

Chlorella sp.

SKRIPSI

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)**

Oleh:

NUR DESIANTI

NIM. 09630060

JURUSAN KIMIA

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)

MAULANA MALIK IBRAHIM

MALANG

2014

**UJI TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA AKTIF
FRAKSI ETIL ASETAT, KLOOROFORM, PETROLEUM ETER DAN n-
HEKSANA HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL MIKROALGA
*Chlorella sp.***

SKRIPSI

Oleh:

NUR DESIANTI

NIM. 09630060

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: 8 Juli 2014

Pembimbing I

Pembimbing II

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

Ahmad Abtokhi, M.Pd
NIP. 19761003 200312 1 004

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

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

**UJI TOKSISITAS DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA AKTIF
FRAKSI ETIL ASETAT, KLOROFORM, PETROLEUM ETER DAN n-
HEKSANA HASIL HIDROLISIS EKSTRAK METANOL MIKROALGA
*Chlorella sp.***

SKRIPSI

**Oleh:
NUR DESIANTI
NIM. 09630060**

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Tugas Akhir dan
Dinyatakan Diterima Sebagai Salah satu Persyaratan untuk
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Malang, 8 Juli 2014

Susunan Dewan Penguji		Tanda Tangan
1. Penguji Utama	: Eny Yulianti, M.Si NIP. 19760611 200501 2 006	()
2. Ketua Penguji	: Susi Nurul Khalifah, M.Si NIPT. 20130902 2 317	()
3. Sekretaris Penguji	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	()
4. Anggota Penguji	: Ahmad Abtokhi, M.Pd NIP. 19710311 200312 1 002	()

Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

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

MOTTO

Untuk ribuan tujuan yang harus dicapai, untuk jutaan impian yang akan dikejar, untuk sebuah pengharapan, agar hidup jauh lebih bermakna,,, Teruslah belajar, berusaha, dan berdoa untuk menggapainya.

Jatuh berdiri lagi.. Kalah mencoba lagi... Gagal Bangkit lagi.... Sampai Allah SWT berkata "waktunya pulang"

Milikilah semangat bola bekel,,,
Setiap kali semakin keras dihempaskan ke lantai,
Maka setiap itu pula
ia semakin melambung tinggi ke langit-langit....

Never give up !!!

Yakin

إِنَّ مَعَ الْعُسْرِ يُسْرًا

"Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan"

"Never say "No" if you don't ever try it"

"Don't put till tomorrow what can you do today"

Sebuah ungkapan hati untuk rasa
terimakasihku.....

Alhamdulillahirabbil'amin...

Akhirnya aku sampai ke titik ini,,
sepercik keberhasilan yang Engkau hadiahkan kepadaku
tak henti-hentinya aku mengucapkan syukur kepada-Mu
aku percaya Engkau akan memberikan yang terbaik untukku
pada waktu yang telah Engkau tetapkan, karena
semua akan terasa indah pada waktunya...

kupersembahkan karya mungilku ini kepada orang tuaku,,
bapak Sahrul dan mamaku Asmawati yang tanpa kalian aku bukanlah
apa-apa,,,Ibu Hj. Wa Habiba dan H. La Kampo Basir yang
mengajarkanku mengeja arti kehidupan, menunjukkan banyak
mimpi,,,doa kalian tak pernah habis, terus mengalir menemani
langkahku,,,seperti biru langit, kemana aku melangkah aku dapat
berteduh di bawahnya.....

Nenekku Wa Djakia, Kakakku Nurhabia dan Imuslim Mayyu, pamanku
Jahimudin yang menjadi semangat terbesar dalam hidupku. Nasehat dan
doamu yang penuh cinta telah mengantarkanku pada detik ini....

Tak lupa pula untuk tante dan omku di Tomia dan Bau-Bau (Mama haji,
bapa & mama Jumu, bapa & mama Ari, bapa & mama Ulla, bapa & mama
Yanti) serta adik-adikku (Ika, Onyong, Eka, Agus) adik-adik sepupuku
(yanti, jumu, sari, Amin, Adif, Acim, iyan, ulla, maya, kribo, ulla, ari, oka,
ancili, hilmi) yang menjadi suntikan penyemangat atas keluh kesah dalam
hariku,,,semoga Allah berkenan mengumpulkan kita dalam sebuah
keluarga yang utuh di Jannah-Nya.

Dan terimakasih guru-guruku (TK, SD, SMP, SMA) dan dosen-dosen kimia
yang terkasih,,,khusus kepada bu Diana Candra Dewi dan pak A.
Ghazim Fasya yang telah memberikan bimbingan dan motivasi,,,kalian
adalah para pendidik generasi yang memberi ilmu dengan kesempurnaan
pada pondasi kehidupan dan menjadi penyangga bagi kemajuan negeri,,

Indahnya hari tak mungkin lengkap tanpa adanya sahabat2ku,,, sahabat
sejaku forever (Harisna, Jilbab, Lia, Risma, Riny dan Dian) yang selalu
mendoakanku dari kejauhan serta support yang tak pernah
henti,,,kepada teman-teman seperjuangan Chem B 10,,,kepada teman-
teman riset mikroalga (Ony,,Kis,,Diah,,Anik,,Pera),,,kepada teman-teman
Arkesa 15A (Lina,,Mila,,Pichu,,Kikong,,Cilpi,,Laluk,,Iidun,, Evi),,

Kepada mba Eny dan keluarga,,,

Rasa sayang, canda tawa, suka duka dalam kebersamaan kita adalah hal
yang sangat berarti dan kelak ku yakin merindu saat waktu menjadi
pembeda dan saat jarak menjadi pemisah....tapi beda bukan berarti putus,
berpisah bukan berarti mati,,,semoga kita selalu bisa menjaga tali
silaturahmi.....amin

“Tiada kekuatan kecuali dengan pertolongan Allah”
(desianti.ra67)

**SURAT PERNYATAAN
ORSINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nur Desianti
NIM : 09630060
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia
Judul Penelitian : Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil penelitian saya ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggungjawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 8 Juli 2014

Yang Membuat Pernyataan,

Nur Desianti

NIM. 09630060

KATA PENGANTAR



Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul: **“Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter dan n-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*”**dengan baik. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada junjungan kita, Nabi Muhammad SAW yang telah membimbing kita ke jalan yang benar, yaitu jalan yang diridhoi Allah SWT. Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan program S-1 (Strata-1) di Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

Seiring dengan terselesaikannya penyusunan skripsi ini, dengan penuh rasa hormat, kesungguhan, dan kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak A. Ghanaim Fasya, M. Si., selaku pembimbing utama yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan demi terselesaikannya skripsi ini;
2. Bapak Tri Kustono Adi, M.Sc, selaku konsultan yang banyak memberikan masukan dalam menyelesaikan naskah skripsi ini;
3. Bapak Ahmad Abtokhi, M.Pd selaku Pembimbing Agama;
4. Ibu Eny Yulianti, M.Si, selaku Penguji Utama;
5. Ibu Susi Nurul Khalifah, M.Si, selaku Ketua Penguji.

Yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, motivasi, nasehat, doa, dukungan dan bantuan materi kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulisan skripsi ini tidak luput dari bantuan semua pihak baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, Penulis mengucapkan terimakasih sedalam-dalamnya kepada:

1. Kedua orang tua dan seluruh keluarga besar yang selalu memberikan doa, semangat dan motivasi kepada saya untuk menuntut ilmu;
2. Bapak Prof. Dr. H. Mudjia Rahardjo, M.Si, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang;
3. Ibu Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maliki Malang;
4. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia, UIN Maliki Malang;
5. Ibu Diana Candra Dewi, M.Si selaku dosen wali yang telah banyak memberikan bantuan, motivasi dan dukungan dari awal saya masuk jurusan Kimia;
6. Seluruh Dosen pengajar di Jurusan Kimia yang telah membimbing dan memberikan ilmunya kepada penulis selama kuliah di UIN Maulana Malik Ibrahim Malang;
7. Seluruh staf Laboratorium (Mas Abi, Mas Taufik, Mbak Rika, Mbak Susi, dan Mbak Mei) dan staf administrasi (Mbak Ana dan Mbak Is) Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, terimakasih atas bantuannya;
8. Teman-teman kimia angkatan 2010 khususnya Kimia B, terimakasih atas dukungan, motivasi, kebersamaan, kekompakannya dan canda tawa selama kuliah;
9. Semua pihak yang tidak tertulis, terimakasih atas bantuan dan dukungannya.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu saya mengharapkan saran dan kritik demi penyempurnaan skripsi ini. Akhir kata, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Malang, 8 Juli 2014

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
SURAT PERNYATAAN ORSINALITAS PENELITIAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
ABSTRAK	xv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	9
1.3 Tujuan Penelitian.....	9
1.4 Batasan Masalah	9
1.5 Manfaat Penelitian	10
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Manfaat Tumbuhan dalam Perspektif Islam	11
2.2 Mikroalga	13
2.3 Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	15
2.3.1 Morfologi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	15
2.3.2 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	16
2.3.2.1 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	17
2.3.2.2 Fase Pertumbuhan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	18
2.3.3 Medium Ekstrak Tauge.....	20
2.3.4 Kandungan dan Manfaat Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	22
2.4 Ekstraksi Senyawa Aktif dari Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	24
2.5 Uji Toksisitas Senyawa Aktif Terhadap Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	27
2.5.1 Morfologi Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	27
2.5.2 Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	28
2.6 Identifikasi Senyawa Aktif Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan Uji Fitokimia	31
2.6.1 Alkaloid.....	31
2.6.2 Flavonoid	32
2.6.3 Triterpenoid dan Steroid	33
2.6.4 Tanin	35
2.7 Kromatografi Lapis Tipis	36
2.8 Analisis Probit	37

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	38
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	38
3.2.1 Alat-alat Penelitian	38
3.2.2 Bahan-bahan Penelitian	38
3.3 Rancangan Penelitian	39
3.4 Tahapan Penelitian	40
3.5 Pelaksanaan Penelitian	41
3.5.1 Uji Taksonomi	41
3.5.2 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	42
3.5.2.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)	42
3.5.2.2 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam Medium Ekstrak Tauge (MET)	42
3.5.2.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	42
3.5.3 Preparasi Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	43
3.5.4 Analisis Kadar Air Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	43
3.5.5 Ekstraksi Komponen Aktif Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	44
3.5.6 Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	45
3.5.7 Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	45
3.5.8 Uji Toksisitas Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> Terhadap Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	46
3.5.8.1 Penetasan Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	46
3.5.8.2 Uji Toksisitas	46
3.5.9 Uji Kandungan Golongan Senyawa Aktif dengan Uji Reagen	50
3.5.9.1 Uji Alkaloid	50
3.5.9.2 Uji Flavonoid	50
3.5.9.3 Uji Tanin	51
3.5.9.3.1 Uji Tanin dengan Larutan Gelatin	51
3.5.9.3.2 Uji Tanin dengan FeCl_3	51
3.5.9.4 Uji Terpenoid dan Steroid	51
3.5.10 Pemisahan Komponen Aktif dengan Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	51
3.5.11 Analisis Data	52

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Taksonomi	53
4.2 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	53
4.2.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)	53
4.2.2 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam Medium Ekstrak Tauge (MET)	55
4.2.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	58
4.3 Preparasi Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	59
4.4 Analisis Kadar Air Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	60

4.5 Ekstraksi Komponen Aktif Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	62
4.6 Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	66
4.7 Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	67
4.8 Uji Toksisitas Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> Terhadap Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	71
4.9 Uji Kandungan Golongan Senyawa Aktif Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	80
4.9.1 Steroid	81
4.9.2 Tanin	83
4.10 Pemisahan Golongan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis	86
4.11 Pemanfaatan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam Perspektif Islam	94
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	98
5.2 Saran	98
DAFTAR PUSTAKA	99

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan nutrisi mikroalga	14
Tabel 2.2 Perbandingan komposisi dan nilai gizi antara biji kacang hijau sebelum dan setelah dikecambahkan	21
Tabel 2.3 Pelarut organik dan sifat fisiknya	25
Tabel 2.4 Kategori toksisitas bahan	29
Tabel 2.5 Uji alkaloid	32
Tabel 4.1 Hasil maserasi ekstrak metanol mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	65
Tabel 4.2 Hasil ekstraksi partisi dan rendemen masing-masing ekstrak	70
Tabel 4.3 Nilai LC ₅₀ masing-masing ekstrak mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	79
Tabel 4.4 Hasil uji fitokimia ekstrak mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	81
Tabel 4.5 Data penampakan noda senyawa steroid hasil kromatografi lapis tipis ekstrak petroleum eter mikroalga <i>Chlorella sp.</i> pada beberapa eluen dengan lampu UV 366 nm	87
Tabel 4.6 Hasil kromatografi lapis tipis ekstrak petroleum eter mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan eluen n-heksana:aseton (3,5:1,5)	91
Tabel 4.7 Hasil kromatografi lapis tipis ekstrak petroleum eter mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan eluen n-heksana:etil asetat (3,5:1,5)	92

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Bentuk mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	15
Gambar 2.2	Kurva pertumbuhan mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	19
Gambar 2.3	Rekasi hidrolisis ikatan O-glikosida	27
Gambar 2.4	<i>Artemia salina</i> Leach	27
Gambar 2.5	Contoh struktur senyawa golongan alkaloid	32
Gambar 2.6	Struktur inti flavonoid	32
Gambar 2.7	Struktur inti (a) triterpenoid (b) steroid	34
Gambar 2.8	Struktur inti tanin	35
Gambar 4.1	Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> uji taksonomi (a) perbesaran 10 x (b) perbesaran 100 x	53
Gambar 4.2	Ekstrak tauge sebelum dan setelah pengenceran (a) ekstrak hasil perebusan sebelum pengenceran (b) ekstrak hasil pengenceran dengan konsentrasi 4 %	54
Gambar 4.3	Perubahan warna kultur mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	56
Gambar 4.4	Biomassa mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	59
Gambar 4.5	Reaksi hidrolisis ikatan o-glikosida	67
Gambar 4.6	Kurva mortalitas <i>Artemia salina</i> Leach ekstrak metanol mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan nilai $LC_{50} = 38,9697$ ppm	75
Gambar 4.7	Kurva mortalitas <i>Artemia salina</i> Leach ekstrak etil asetat mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan nilai $LC_{50} = 43,3044$ ppm	75
Gambar 4.8	Kurva mortalitas <i>Artemia salina</i> Leach ekstrak kloroform mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan nilai $LC_{50} = 32,9023$ ppm	76
Gambar 4.9	Kurva mortalitas <i>Artemia salina</i> Leach ekstrak n-heksana mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan nilai $LC_{50} = 34,2133$ ppm	76
Gambar 4.10	Kurva mortalitas <i>Artemia salina</i> Leach ekstrak petroleum eter mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan nilai $LC_{50} = 32,6710$ ppm	77
Gambar 4.11	Kurva mortalitas <i>Artemia salina</i> Leach ekstrak fasa air mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan nilai $LC_{50} = 44,3401$ ppm	77
Gambar 4.12	Dugaan reaksi steroid dengan Liebermann-Buchard	83
Gambar 4.13	Dugaan reaksi antara tanin dan gelatin	85
Gambar 4.14	Hasil KLT senyawa steroid ekstrak petroleum eter mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan eluen n-heksana:aseton (3,5:1,5)	90
Gambar 4.15	Hasil KLT senyawa steroid ekstrak petroleum eter mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dengan eluen n-heksana:etil asetat (3,5:1,5)	92

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Skema Kerja	107
Lampiran 2	Perhitungan dan Pembuatan Reagen dan Larutan	116
Lampiran 3	Perhitungan Konsentrasi Larutan Ekstrak untuk Uji Toksisitas..	120
Lampiran 4	Perhitungan Kadar Air	124
Lampiran 5	Perhitungan Rendemen.....	127
Lampiran 6	Data Kematian Larva dan Perhitungan Nilai LC ₅₀ Ekstrak Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> Menggunakan Program Minitab 16.....	130
Lampiran 7	Perhitungan Nilai Rf (<i>Retardation Factor</i>) Hasil KLTA Ekstrak Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	144
Lampiran 8	Dokumentasi Penelitian.....	146
Lampiran 9	Surat Keterangan Hasil Identifikasi Sampel.....	156
Lampiran 10	Tabel Rencana Hasil Penelitian.....	157



ABSTRAK

Desianti, Nur. 2014. **Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Fraksi Etil asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.***
Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si.; Pembimbing II: Ahmad Abtokhi, M.Pd.; Konsultan: Tri Kustono Adi, M.Sc.

Kata kunci: Toksisitas, Identifikasi, Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, n-Heksana, Hidrolisis, *Chlorella sp.*.

Mikroalga merupakan kelompok tumbuhan berukuran renik yang hidup di seluruh wilayah perairan, baik air tawar maupun air laut. Mikroalga mengandung banyak senyawa aktif yang dapat dimanfaatkan oleh manusia sebagai obat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat toksisitas fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter dan n-heksana hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach serta mengetahui golongan senyawa aktif yang memiliki toksisitas tertinggi terhadap *Artemia salina* Leach.

Ekstraksi senyawa aktif dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol p.a.. Ekstrak metanol dihidrolisis dengan larutan HCl 2 N kemudian dipartisi bertingkat dengan empat variasi pelarut yaitu n-heksana, petroleum eter, kloroform dan etil asetat. Masing-masing fraksi diuji toksisitasnya terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Data kematian larva udang dianalisis dengan analisis probit untuk mengetahui nilai LC_{50} . Semua fraksi diidentifikasi senyawa aktifnya dengan menggunakan uji reagen. Fraksi yang memiliki toksisitas tertinggi dipisahkan senyawa aktifnya dengan menggunakan kromatografi lapis tipis.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak petroleum eter memiliki toksisitas tertinggi terhadap larva udang *Artemia salina* Leach (LC_{50} rendah). Nilai LC_{50} masing-masing ekstrak yaitu: ekstrak metanol (38,9697 ppm), fraksi etil asetat (43,3044 ppm), fraksi kloroform (32,9023 ppm), fraksi petroleum eter (32,6710 ppm), fraksi n-heksana (34,2133 ppm). Identifikasi golongan senyawa aktif dengan uji reagen menunjukkan bahwa ekstrak petroleum eter mengandung senyawa stero

ABSTRACT

Desianti, Nur. 2014. **Toxicity Assay and Identification of The Active Compound Fraction Ethyl Acetate, Chloroform, Petroleum Ether and n-Hexane Hydrolysis Results of Methanol Extracts Microalgae *Chlorella sp.*** Advisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si.; Advisor II: Ahmad Abtokhi, M.Pd.; Consultant: Tri Kustono adi, M.Sc.

Keywords: Toxicity, Identification, Active Compound, Ethyl Acetate, Chloroform, Petroleum Ether, n-Hexane, Hydrolysis, *Chlorella sp.*

Microalgae are microscopic-sized groups of plants that live around waters area, both fresh water and sea water. Microalgae contain many active compounds that can be used by humans as a drug. The objectives of this study are to know the level of toxicity ethyl acetate fraction, chloroform, petroleum ether and n-hexane hydrolysis result of methanol extracts microalgae *Chlorella sp.* toward larvae shrimp of *Artemia salina* Leach and to know the active compounds that has highest toxicity to *Artemia salina* Leach.

Extraction of active compounds is done by maceration method using methanol p.a.. Methanol extract hydrolyzed with HCl 2 N and then partitioned storey with four variations solvent those are n-hexane, petroleum ether, chloroform and ethyl acetate. Each fraction was tested the toxicity toward larvae shrimp of *Artemia salina* Leach. Mortality data of Larvae Shrimp were analyzed by probit analysis to determine LC₅₀ values. All fractions active compounds identified by using reagent test. Fraction that has highest toxicity of active compounds separated by thin layer chromatography.

The results of this study showed that the petroleum ether fraction had the highest toxicity to larvae shrimp of *Artemia salina* Leach (lower LC₅₀). LC₅₀ values of each extract are: methanol extract (38.9697 ppm), ethyl acetate fraction (43.3044 ppm), chloroform fraction (32.9023 ppm), petroleum ether fraction (32.6710 ppm), n-hexane fraction (34.2133 ppm). Identification of the active compound group with reagent test showed that the petroleum ether fraction contained steroid compounds.

مستخلص البحث

ديسيانتي ، نور . الساعة ٢٠١٤ . الاختبار السمية وتحديد المركبات بالموقع الكسر المجموعة خلاص الإيثيل، كلوروفورم، الأثير البترول، ون الهكسين الميثانول مقتطفات التحلل النتائج الطحالب طحلب. المشرف الأول: أحمد الغنايمفا الماجستير؛ المشرف الثاني: أحمد أبطخي الماجستير؛ المستشار: تريكونطراعي الماجستير

الكلمات الرئيسية: سمية، تحديد الهوية، خلاص الإيثيل، كلوروفورم، الأثير البترول، ن الهكسين، التحلل، طحلب.

الطحالب هي مجموعات المجهرية الحجم من النباتات التي تعيش في جميع أنحاء منطقة المياه، سواء في المياه العذبة ومياه البحر. الطحالب تحتوي على العديد من المركبات النشطة التي يمكن استخدامها من قبل البشر كدواء. تهدف هذه الدراسة إلى تحديد مستوى سمية خلاص الإيثيل جزء، والكلوروفورم والأثير البترول ون الهكسان استخراج التحلل من الطحالب طحلب الميثانول. ضد يرقا الأرتيميا سالينا الروبيان ليتش والطبقة معرفة من المركبات النشطة التي لديها أعلى سمية ضد الأرتيميا سالينا يتش.

ويتم استخراج المركبات النشطة باستخدام طريقة النقع باستخدام الميثانول سنويا. تحلل استخراج الميثانول مع حمض الهيدروكلوريك HCl ثم تقسيم طوابق مع أربعة اختلافات المذيبات هو ن الهكسان، الأثير البترول، والكلوروفورم وخلاص الإيثيل. تم اختبار كل جزء السمية ليرقا الأرتيميا سالينا الروبيان ليتش. وقد تم تحليل بيانات الوفيات اليرقا الجميري من خلال تحليل الاحتمالية لتحديد قيمة LC_{50} . جميع الكسور تحديد المركبات النشطة باستخدام اختبار كاشف. تم فصل جزء التي لديها أعلى سمية مع المركبات النشطة باستخدام طبقة رقيقة اللوني.

أظهرت النتائج أن استخراج البترول الأثير لديها أعلى السمية ضد يرقا الأرتيميا سالينا الروبيان ليتش (أقل LC_{50}). قيم LC_{50} كل مستخلص هي: استخراج الميثانول ٣٨,٩٦٩٧ جزء في المليون، جزء خلاص الإيثيل (٤٣,٣٠٤٤ جزء في المليون)، جزء الكلوروفورم ٣٢,٩٠٢٣ جزء في المليون، وجزء من أثير البترول (٣٢,٦٧١٠ جزء في المليون)، جزء ن الهكسان (٢١٣٣, ٣٤ جزء في المليون). أظهرت تحديد مجموعة مركب نشط مع اختبار كاشف أن استخراج البترول الأثير التي تحتوي على مركبات الستيرويد.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Allah SWT berfirman dalam al Qur'an surat Thaha ayat 53:

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ
أَنْوَاجًا مِنْ نَبَاتٍ شَتَّى ﴿٥٣﴾

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

Ayat tersebut menjelaskan bahwa betapa besarnya karunia/nikmat yang Allah SWT berikan kepada kita diantaranya menciptakan bumi sebagai tempat tinggal manusia yang dilengkapi berbagai macam sarana dan prasarana seperti jalan, menurunkan air hujan dari langit sehingga bumi yang kering dan tandus menjadi subur dan dari air hujan itu pula Allah SWT menciptakan berbagai macam tumbuh-tumbuhan bagi makhlukNya. Tumbuh-tumbuhan tersebut memiliki bentuk, rasa, warna serta habitat yang berbeda yaitu dapat berasal dari daratan maupun dari lautan yang dapat dimanfaatkan oleh manusia untuk berbagai macam keperluan seperti bahan makanan, kosmetik, dan obat-obatan.

Salah satu pemanfaatan tumbuh-tumbuhan adalah sebagai obat. Dewasa ini telah banyak dilakukan penelitian bahan hayati dari tumbuhan, baik tumbuhan tingkat rendah maupun tumbuhan tingkat tinggi yang berasal dari darat maupun dari laut. Nabi Muhammad SAW bersabda:

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

“ *Tidaklah Allah menurunkan suatu penyakit, melainkan akan menurunkan pula obat untuk penyakit tersebut* ” (H.R. Bukhari).

Hadits tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT Maha Penyayang bagi makhlukNya. Dia menurunkan penyakit dan menurunkan pula obatnya. Hal ini menjadikan dorongan kepada umat manusia untuk selalu melakukan penelitian untuk mengkaji segala macam khasiat dari tumbuhan yang dapat digunakan sebagai obat.

Wijffles (2007) menyebutkan bahwa sekitar 15.000 produk bahan hayati laut telah diuji aktivitas biologisnya dan 45 diantaranya menunjukkan adanya potensi sebagai bahan obat. Berdasarkan hasil uji perklinis maupun uji klinis, hanya dua macam bahan hayati laut yang terdaftar sebagai bahan obat salah satunya berasal dari jenis siput laut. Selama ini, hampir semua penelitian bahan hayati laut hanya difokuskan pada makroalga dan hanya sedikit yang meneliti potensi dari mikroalga. Oleh sebab itu, penelitian terhadap mikroalga guna mencari potensinya sebagai bahan obat perlu dilakukan.

Mikroalga merupakan kelompok tumbuhan berukuran renik yang hidup di seluruh wilayah perairan, baik air tawar maupun air laut. Mikroalga lazim disebut fitoplankton. Mikroalga memiliki keunggulan dibandingkan dengan makroalga dan tumbuhan tingkat tinggi, antara lain hidupnya tidak bergantung musim, tidak memerlukan tempat yang luas dan tidak memerlukan waktu yang lama untuk memanennya (Borowitzka, 1988). Mikroalga mampu tumbuh cepat dan dipanen dalam waktu singkat yakni 7 – 10 hari (de Godos, *et al.*, 2010).

Salah satu jenis mikroalga yang saat ini banyak diteliti adalah mikroalga jenis *Chlorophyta* yaitu mikroalga *Chlorella sp.* Mikroalga ini merupakan mikroalga komposit yang sebagian besar hidup di lingkungan akuatik baik perairan tawar, laut maupun payau, juga ditemukan di tanah dan di tempat lembab. Menurut Sachlan, *Chlorella sp.* memiliki kelebihan untuk tumbuh dan berkembangbiak dengan cepat. Setiap sel *Chlorella sp.* mampu berkembang menjadi 10.000 sel dalam waktu 24 jam.

Chlorella sp. mengandung berbagai nutrisi seperti protein, karbohidrat, asam lemak tak jenuh, vitamin, klorofil, enzim, dan serat yang tinggi. Menurut Kawaroe (2010), mikroalga *Chlorella sp.* mempunyai potensi sebagai pakan alami, pakan ternak, suplemen, penghasil komponen bioaktif, bahan farmasi dan kedokteran. Beberapa penelitian menyebutkan adanya bioaktivitas mikroalga *Chlorella sp.* Penelitian yang dilakukan oleh Kusmiati, dkk., (2010) menyatakan bahwa ekstrak pigmen karotenoid lutein mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* mempunyai aktivitas antioksidan dan berkaitan dengan peristiwa katarak pada mata.

Setyaningsih, dkk., (2005) melaporkan bahwa ekstrak intraseluler kasar *Chlorella sp.* mempunyai aktivitas penghambatan terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Escherichia coli* serta mempunyai potensi hambatan terhadap *Streptomycin*. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa *Chlorella sp.* mempunyai aktivitas sebagai antimikroba. *Chlorella sp.* juga menghasilkan suatu antibiotik yang disebut *Chlorellin*, yaitu suatu zat yang dapat melawan penyakit-penyakit yang disebabkan oleh bakteri (Vashita, 1979 dalam Rostini, 2007).

Sementara itu, Amaliyah (2013) melakukan uji toksisitas terhadap mikroalga *Chlorella sp.* dan menyebutkan bahwa ekstrak metanol *Chlorella sp.* berpotensi sebagai antikanker sedangkan ekstrak etil asetat berpotensi sebagai antimikroba.

Pengujian awal suatu senyawa yang memiliki bioaktivitas seperti antikanker, antibakteri, antioksidan maupun antitumor dapat dilakukan melalui uji toksisitas. Uji toksisitas dimaksudkan untuk mengetahui kemampuan racun (molekul) yang dapat menimbulkan kerusakan apabila masuk ke dalam tubuh dan lokasi organ yang rentan terhadapnya (Soemirat, 2005). Pengujian toksisitas dilakukan dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji. *Artemia salina* Leach mempunyai keunggulan seperti perkembangbiakkan cepat, harga murah, metode percobaan mudah, sampel yang diperlukan sedikit, tidak memerlukan laboratorium yang khusus dan hasilnya dapat dipercaya. Hasil toksisitas dengan metode ini telah terbukti memiliki korelasi positif dengan daya toksisitas senyawa antikanker (Sukardiman, dkk., 2004).

Uji toksisitas awal menggunakan metode BSLT dilakukan untuk mengetahui nilai LC_{50} yaitu konsentrasi suatu zat yang dapat menyebabkan 50 % kematian pada hewan uji setelah hewan uji tersebut terpapar dalam waktu tertentu (Cahyono, 2004). Sifat toksisitas diketahui berdasarkan jumlah kematian larva udang (Indriyani, 2006). Menurut Meyer, *et al.*, (1982) suatu ekstrak dikatakan toksik terhadap larva udang *Artemia salina* L apabila mempunyai nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ dan dikatakan tidak toksik bila nilai $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$.

Amaliyah (2013) melakukan uji toksisitas mikroalga *Chlorella sp.* yang diekstrak dengan menggunakan pelarut metanol dan pelarut etil asetat. Masing-masing ekstrak diuji dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* menghasilkan nilai LC_{50} lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak etil asetat secara berturut-turut yaitu 20,516 ppm dan 167,417 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa kedua ekstrak memiliki bioaktivitas dimana ekstrak metanol memiliki tingkat ketoksikan yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etil asetat.

Menurut Lisdawati (2002) golongan senyawa kimia dalam tanaman yang berkaitan dengan bioaktivitas antikanker, antioksidan maupun antibakteri adalah golongan alkaloid, terpenoid, polifenol, flavonoid dan senyawa resin. Hasil penelitian Khamidah (2013) menyebutkan bahwa ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* mengandung senyawa tanin dan senyawa steroid yang memiliki bioaktivitas sebagai antibakteri terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Sementara itu, penelitian yang dilakukan oleh Bariyyah (2013) menyatakan bahwa ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* juga mengandung senyawa tanin dan senyawa steroid yang memiliki aktivitas antioksidan melalui metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrihidrazil). Oleh sebab itu, pada penelitian ini akan dilakukan pengujian awal bioaktivitas mikroalga *Chlorella sp.* melalui uji toksisitas. Mikroalga *Chlorella sp.* dikultivasi/ditumbuhkan terlebih dahulu dalam suatu media kultur yang kemudian dapat diambil biomasnya untuk diekstrak dan diuji bioaktivitasnya.

Richmond (1986) dalam Prihantini, dkk., (2005) menyebutkan bahwa ekstrak tauge merupakan salah satu sumber media alami yang dapat digunakan

untuk media pertumbuhan mikroalga. MET mengandung unsur makro dan mikro, vitamin, mineral, serta asam amino yang dibutuhkan bagi pertumbuhan mikroalga. Tauge kacang hijau merupakan jenis sayuran yang umum dikonsumsi, mudah diperoleh, ekonomis dan tidak menghasilkan senyawa yang berefek toksik.

Penggunaan ekstrak tauge sebagai media kultur mikroalga (MET) telah dilakukan terhadap *Chlorella sp.* Prihantini, dkk., (2005) melakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh derajat keasaman (pH) awal MET terhadap kerapatan sel mikroalga marga *Chlorella beijerinck* dengan menggunakan MET 4 % dan menghasilkan kesimpulan bahwa kerapatan sel tertinggi (5.677.625 sel/mL) terjadi pada media perlakuan pH awal 7. Prihantini, dkk., (2007) juga melakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh beberapa konsentrasi MET terhadap kerapatan sel mikroalga marga *Scenedesmus*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kerapatan sel tertinggi (3.981.071 sel/mL) terjadi dalam media perlakuan MET 4 %.

Berdasarkan hasil-hasil penelitian tersebut maka pada penelitian ini akan digunakan MET 4 % pada pH 7 sebagai media kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* Mikroalga *Chlorella sp.* akan dikultivasi dalam MET 4 % kemudian diekstraksi dan diuji bioaktivitasnya melalui uji toksisitas. Lenny (2006) menyebutkan bahwa pemilihan pelarut untuk proses ekstraksi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut. Secara umum pelarut metanol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam karena dapat melarutkan senyawa metabolit sekunder.

Amaliyah (2013) mengekstraksi mikroalga *Chlorella sp.* dengan menggunakan variasi pelarut yaitu metanol, etil asetat dan n-heksana. Rendemen tertinggi ditunjukkan oleh ekstraksi dengan menggunakan metanol. Ekstrak metanol juga menunjukkan nilai LC_{50} yang rendah (bersifat toksik) yaitu 20,516 ppm. Yudha (2008) mengekstraksi mikroalga *Dunaliella sp.* dengan menggunakan variasi pelarut dimana rendemen ekstrak kering yang dihasilkan dari ekstraksi dengan pelarut metanol (2,59 %) lebih besar dibandingkan rendemen ekstrak dengan pelarut etil asetat (1,94 %) dan pelarut n-heksana (1,29 %).

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Amaliyah (2013) disebutkan bahwa ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* berpotensi sebagai antikanker, dimana senyawa aktif yang memiliki bioaktivitas sebagai antikanker merupakan senyawa metabolit sekunder. Di alam, senyawa metabolit sekunder ini berbentuk glikosida yaitu senyawa metabolit sekunder terikat pada gugus gula sehingga cenderung lebih bersifat polar dan dapat larut pada pelarut metanol. Sementara itu, senyawa metabolit sekunder sendiri memiliki kepolaran yang berbeda-beda. Ada yang bersifat polar, semi polar dan non polar. Oleh sebab itu, untuk memperoleh senyawa metabolit sekunder yang lebih spesifik dilakukan proses hidrolisis untuk memutuskan ikatan antara gugus gula dan senyawa metabolit sekunder serta dilakukan proses partisi untuk mengambil senyawa metabolit sekundernya.

Afif (2012) menggunakan metode hidrolisis dengan pelarut HCl 2 N sebagai katalis dan ekstraksi cair-cair untuk mengekstrak metabolit sekunder dari

ekstrak metanol alga merah *E. contoni* dengan menggunakan variasi pelarut yaitu yaitu 1-butanol, etil asetat, kloroform, n-heksana dan petroleum eter. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak setelah dihidrolisis dan dipartisi memiliki nilai LC_{50} lebih rendah (70,32 ppm) dibandingkan ekstrak sebelum dihidrolisis (194,40 ppm). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak hasil hidrolisis dan partisi lebih bersifat toksik. Metode ekstraksi cair-cair merupakan metode untuk memisahkan senyawa metabolit sekunder yang didasarkan pada perbedaan kelarutannya pada dua pelarut yang tidak saling bercampur. Variasi pelarut yang berbeda kepolaran akan mengefektifkan pemisahan senyawa metabolit sekunder dan menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang lebih spesifik.

Pada penelitian ini akan digunakan sampel isolat *Chlorella sp.* yang dikultivasi dalam MET 4 % dan pH 7 pada fase stasioner. Biomassa yang dihasilkan pada fase stasioner kemudian diekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut metanol. Selanjutnya ekstrak pekat dihidrolisis menggunakan pelarut HCl 2 N untuk memutuskan ikatan glikosidanya. Ekstrak pekat kemudian dipartisi menggunakan variasi pelarut yaitu etil asetat, kloroform, petroleum eter dan n-heksana. Masing-masing fraksi diujikan terhadap larva udang *Artemia salina* Leach untuk mengetahui tingkat toksisitas masing-masing ekstrak. Ekstrak yang memiliki toksisitas tertinggi kemudian diidentifikasi senyawa aktifnya dengan menggunakan uji reagen dan pemisahan senyawa dengan menggunakan uji KLTA. Uji reagen meliputi uji flavonoid, alkaloid, tanin, terpenoid, dan steroid.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Bagaimana toksisitas fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter dan n-heksana hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach ?
2. Golongan senyawa apa yang terdapat dalam fraksi hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* yang memiliki toksisitas tertinggi?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mengetahui toksisitas fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter dan n-heksana hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach;
2. Mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam fraksi hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* yang memiliki toksisitas tertinggi.

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Sampel yang digunakan adalah isolat mikroalga *Chlorella sp.* yang diperoleh dari Laboratorium Ekologi Jurusan Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang;
2. Kultivasi isolat *Chlorella sp.* dilakukan dalam medium ekstrak tauge (MET) kacang hijau dengan kondisi pH 7, suhu 25 – 27 °C dan intensitas cahaya 1000 – 4000 lux;

3. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode ekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut metanol p.a;
4. Hidrolisis ekstrak pekat dilakukan dengan menggunakan HCl 2 N;
5. Ekstrak hasil hidrolisis dipartisi dengan pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu etil asetat, kloroform, petroleum eter dan n-heksana;
6. Uji toksisitas dilakukan dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dengan hewan uji adalah larva udang *Artemia salina* Leach;
7. Tingkat toksisitas dari masing-masing fraksi diperoleh melalui nilai LC_{50} dengan analisis probit;
8. Identifikasi golongan senyawa aktif dilakukan dengan uji reagen yaitu flavonoid, alkaloid, tanin, terpenoid dan steroid.
9. Pemisahan senyawa aktif dilakukan dengan uji Kromatografi Lapis Tipis Analitik menggunakan fase diam silika gel F₂₅₄.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada pembaca khususnya para analis farmasi mengenai efek toksik ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach serta kandungan golongan senyawanya, sehingga dapat dimanfaatkan di bidang farmakologi. Informasi ini juga diharapkan dapat digunakan sebagai acuan untuk dilakukan uji toksisitas tahap selanjutnya, yaitu untuk mendapatkan dosis/konsentrasi yang aman penggunaannya terhadap manusia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Manfaat Tumbuhan dalam Perspektif Islam

Semua makhluk hidup dan tak hidup di jagad raya ini dipenuhi “ayat” yang menunjukkan bahwa alam semesta beserta isinya telah diciptakan. Alam ini adalah pencerminan dari kemahakuasaan, ilmu dan kreasi penciptanya. Wajib bagi manusia untuk memahami ayat-ayat ini melalui akalinya sehingga ia pun pada akhirnya menjadi hamba Allah SWT yang tunduk dan patuh di hadapan Allah SWT. Sebagaimana firman Allah SWT dalam 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﴾

Artinya: “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 keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): “Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha suci Engkau, Maka peliharalah Kami dari siksa neraka” (Q.S Ali ‘Imran: 190 – 191).

Surat Ali ‘Imran ayat 190 – 191 tersebut menjelaskan tentang sekelumit penciptaan langit, bumi dan isinya serta adanya perintah kepada manusia untuk memikirkannya guna membuktikan ketauhidan, keesaan dan kekuasaan Allah SWT. Ulul Albab adalah orang-orang yang memiliki akal untuk merenungkan fenomena alam raya hingga pada bukti yang nyata tentang keesaan Allah SWT. Orang yang berfikir adalah orang yang mau memperhatikan dan menyelidiki

ciptaan Allah SWT, mencari sesuatu yang belum kita ketahui manfaatnya baik itu benda mati maupun makhluk hidup.

Salah satu bentuk pengkajian ayat-ayat Allah SWT adalah dengan melakukan penelitian untuk mengetahui manfaat dari ciptaan Allah SWT seperti tumbuh-tumbuhan. Tumbuhan merupakan salah satu nikmat yang diberikan Allah SWT kepada manusia. Tumbuhan mengandung banyak manfaat yang dapat digunakan dalam kemaslahatan hidup manusia. Allah SWT berfirman dalam surat asy Syuara ayat 7 yang berbunyi:

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

Artinya: “Dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?” (Q.S. as Syuara: 7).

Berdasarkan ayat tersebut, kata *karim* antara lain digunakan untuk menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap objek yang disifatiNya. Tumbuhan yang baik adalah tumbuhan yang subur dan bermanfaat. Salah satu manfaat tumbuh-tumbuhan adalah potensinya sebagai bahan obat. Hal ini sejalan dengan sabda Nabi Muhammad SAW:

إِنَّ اللَّهَ لَمْ يَنْزِلْ دَاءً إِلَّا وَأَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً، عِلْمَهُ مَنْ عِلْمَهُ وَجَهْلَهُ مَنْ جَهْلَهُ

Artinya: “Sesungguhnya Allah tidak menurunkan penyakit kecuali menurunkan pula obatnya. Ada yang tahu, dan ada juga yang tidak tahu” (H.R. Ahmad).

Hadits tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT maha adil. Dia menurunkan penyakit dan menurunkan pula obatnya. Hal ini menjadikan dorongan kepada manusia untuk selalu melakukan penelitian untuk mengkaji

segala macam khasiat dari tumbuh-tumbuhan yang digunakan sebagai obat. Salah satu contohnya adalah tumbuhan tingkat rendah seperti mikroalga *Chloralla sp.*

2.2 Mikroalga

Mikroalga atau ganggang adalah organisme perairan yang lebih dikenal dengan fitoplankton (alga laut bersel tunggal). Mikroalga banyak ditemukan di perairan darat maupun laut, ukuran diameter antara 3 – 30 μm . Morfologi selnya sangat bervariasi baik bersel tunggal maupun bersel banyak. Mikroalga juga memiliki bentuk yang bervariasi seperti filamen atau lembaran, spiral atau bulat (Borowitzka dan Lesley, 1988).

Mikroalga memiliki keunggulan dibandingkan dengan makroalga dan tumbuhan tingkat tinggi. Mikroalga mempunyai peranan penting dalam kehidupan di perairan dan mudah dibudidayakan karena hidupnya tidak tergantung musim, tidak memerlukan tempat yang luas dan tidak memerlukan waktu yang lama untuk memanennya (Borowitzka, 1988). Meyer dan Ausubel (1999) dalam Rakhmawati dan Sutimin (2006) menyebutkan bahwa pemanenan rumput laut yang paling tepat adalah pada saat 60 hari (2 bulan) setelah tanam karena sebagai kurun waktu pertumbuhan terbaik. Menurut de Godos, *et al.*, (2010) kultivasi mikroalga dapat dilakukan dengan cepat dan singkat yaitu dengan waktu panen 7–10 hari. Panen mikroalga, minimal 30 kali lebih banyak dibandingkan tumbuhan darat. Kondisi iklim tropis Indonesia dengan cahaya matahari sepanjang tahun, sangat sesuai untuk kehidupan mikroalga sehingga mikroalga sangat prospektif apabila dikembangkan di Indonesia.

Dalam biomassa mikroalga terkandung bahan-bahan penting yang sangat bermanfaat misalnya protein, karbohidrat, lemak dan asam nukleat. Persentase keempat komponen tersebut bervariasi tergantung jenis alga. Secara umum kandungan nutrisi mikroalga ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Kandungan nutrisi mikroalga

Komposisi Kimia	Jumlah %
Karbohidrat	30 – 55
Protein	10 – 30
Lemak	10 – 25
Mineral	10 – 40
Asam Nukleat	4 – 10

Sumber: Pranoyogi (2003) dalam Chalid, *et al.*, (2002)

Mikroalga terbagi menjadi 11 kelompok, yaitu *Cyanophyta* (alga hijau-biru), *Prochlorophyta* (bright-green algae), *Glaucophyta* (alga air tawar mikroskopis), *Rhodophyta* (alga merah), *Heterokontophyta* (alga coklat keemasan yang hidupnya motil/bergerak aktif), *Haptophyta* (alga yang memiliki organel unik bernama haptonema), *Cryptophyta* (alga yang termasuk dalam kelompok uniseluler yang unik dan tidak memiliki kedekatan dengan kelompok alga lainnya), *Dinophyta* (suatu kelompok besar alga perairan yang berflagella), *Euglenophyta* (organisme yang motil dan memiliki 1–3 flagella di bagian anteriornya), *Chlorarachniophyta* (kelompok kecil alga yang biasanya ditemukan di laut tropis) dan *Chlorophyta* (alga hijau) (Van Den Hoek, *et al.*, 2002).

2.3 Mikroalga *Chlorella sp.*

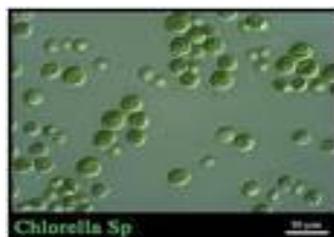
2.3.1 Morfologi Mikroalga *Chlorella sp.*

Chlorella merupakan sebuah genus dari alga hijau bersel tunggal yang berada dalam filum *Chlorophyta*. Nama *Chlorella* diambil dari Bahasa Yunani *chloros* yang berarti hijau dan imbuhan latin *ella* yang berarti kecil. *Chlorella sp.* tergolong tumbuhan tingkat rendah berukuran 3 –15 mikron yang telah hidup di bumi sejak 2,5 milyar tahun yang lalu dengan sifat genetik yang tidak mengalami mutasi hingga sekarang (Wirosaputro, 2002).

Bentuk umum sel-sel *Chlorella* adalah bulat atau elips (bulat telur). *Chlorella sp.* merupakan organisme autotrof dan eukariotik. Autotrof berarti jenis tumbuhan yang belum mempunyai akar, batang dan daun sebenarnya tetapi sudah memiliki klorofil. Sedangkan eukariotik artinya sel yang telah mengandung inti sel dan organel-organel lain. Dinding sel *Chlorella* terdiri atas selulosa dan pektin, sedangkan protoplasmanya berbentuk cawan (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995).

Klasifikasi *Chlorella sp.* menurut Bold dan Wynne (1985) dalam Vashista (1999) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Flora
Division	: Chlorophyta
Class	: Trebouxiophyceae
Order	: Chlorellales
Family	: Chlorellaceae
Genus	: <i>Chlorella</i>
Species	: <i>Chlorella sp.</i>



Gambar 2.1 Bentuk mikroalga *Chlorella sp.*

Reproduksi *Chlorella sp.* adalah aseksual dengan pembentukan autospora yang merupakan bentuk miniatur dari sel induk. Tiap satu sel induk (*parent cell*) akan membelah menjadi 4, 8, atau 16 autospora yang kelak akan menjadi sel-sel anak (*daughter cell*) dan melepaskan diri dari induknya (Bold dan Wynne, 1985). Menurut Sachlan (1982), *Chlorella sp.* memiliki kelebihan untuk tumbuh dan berkembangbiak dengan cepat. Setiap sel *Chlorella* mampu berkembang menjadi 10.000 sel dalam waktu 24 jam.

Umumnya *Chlorella* bersifat planktonis yang melayang di perairan, namun beberapa jenis *Chlorella* juga ditemukan mampu bersimbiosis dengan hewan lain misalnya *Hydra* dan beberapa *ciliata* air tawar seperti *Paramecium bursaria*. Berdasarkan habitat hidupnya *Chlorella* dapat dibedakan menjadi *Chlorella* air tawar dan *Chlorella* air laut.

2.3.2 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

Proses penumbuhan *Chlorella sp.* dalam suatu medium disebut dengan kultivasi. Media tumbuh *Chlorella sp.* merupakan media yang berisi komponen-komponen yang dibutuhkan untuk pertumbuhannya. Pertumbuhan mikroalga dalam kultur dapat ditandai dengan bertambah besarnya ukuran sel atau bertambahnya jumlah sel. Pertumbuhan ini dapat dilihat dari semakin meningkatnya tingkat kepadatan sel pada kultur. Pertumbuhan sel ditandai dengan bertambah pekatnya warna hijau kultur pada media dan bertambah tingginya nilai absorban (Richmond, 1988).

2.3.2.1 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella sp.*

Menurut Dewi dan Gultom (2009), faktor-faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan populasi *Chlorella sp.* adalah:

1. Temperatur

Chlorella sp. membutuhkan temperatur yang tinggi untuk pertumbuhannya. Temperatur optimum untuk pertumbuhan *Chlorella sp.* adalah 30 °C.

2. Intensitas cahaya

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

3. pH

Nilai pH menunjukkan kadar asam dan basa yang ditunjukkan oleh konsentrasi ion hydrogen. Nielsen (1955) menyatakan bahwa pH yang sesuai untuk pertumbuhan *Chlorella* berkisar antara 6,6 – 7,3.

4. Oksigen terlarut

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

5. Unsur hara

Unsur-unsur yang dibutuhkan untuk pertumbuhan alga terdiri dari unsur mikro dan unsur makro. Makronutrien yaitu unsur-unsur yang dibutuhkan

dalam jumlah besar, meliputi C, H, O, N, P, K, S, Si, Ca dan Cl. Mikronutrien adalah unsur-unsur yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit dan merupakan koenzim meliputi Mn, Fe, Zn, Cu dan Mg.

6. Karbondioksida

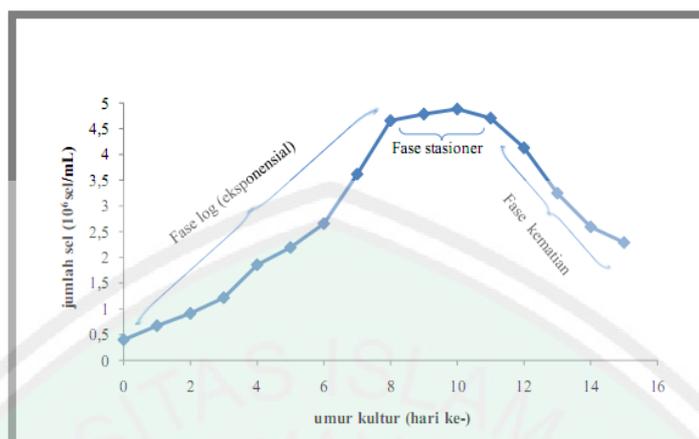
Karbon merupakan salah satu makronutrien yang dibutuhkan untuk pertumbuhan *Chlorella sp.* Salah satu sumber karbon diperairan adalah CO₂ yang secara langsung digunakan sebagai bahan untuk fotosintesis.

7. Salinitas

Salinitas adalah jumlah atau konsentrasi ion-ion terlarut dalam air yang dinyatakan dalam permil. Salinitas dapat mempengaruhi kehidupan organisme perairan. Salinitas berhubungan erat dengan tekanan osmosis air. Semakin tinggi salinitas perairan maka semakin tinggi pula tekanan osmotik. Tekanan osmotik yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan *Chlorella sp.* Menurut Isnansetyo dan Kurniastuty (1995), salinitas optimum *Chlorella sp.* adalah 25 – 28 permil.

2.3.2.2 Fase Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella sp.*

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Khamidah (2013), mikrolaga *Chlorella sp.* mengalami fase eksponensial (hari ke-0 sampai hari ke-8), fase stasioner (hari ke-8 sampai hari ke-11) dan fase kematian (hari ke-11 sampai seterusnya). Kurva pertumbuhan mikrolaga *Chlorella sp.* ditunjukkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Kurva pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.*

Fase pertumbuhan logaritmik (*log phase*) merupakan fase dimana sel membelah dengan cepat, sel-sel berada dalam keadaan stabil dan jumlah sel bertambah dengan kecepatan konstan. Bahan sel baru terbentuk dengan laju tetap, akan tetapi bahan-bahan tersebut bersifat katalitik dan massa bertambah secara eksponensial. Hal ini tergantung pada satu dari dua hal yang terjadi, yaitu kalau tidak satu atau lebih zat makanan dalam pembenihan habis, maka tentu hasil metabolisme beracun akan tertimbun dan menghambat pertumbuhan (Fogg, 1975).

Selama fase stasioner jumlah sel cenderung konstan. Hal ini disebabkan oleh habisnya nutrisi dalam medium atau karena menumpuknya hasil metabolisme yang beracun sehingga mengakibatkan pertumbuhan berhenti. Dalam kebanyakan kasus, pergantian sel terjadi dalam fase stasioner, dimana adanya kehilangan sel yang lambat karena kematian yang diimbangi oleh pembentukan sel-sel yang baru melalui pembelahan. Bila hal ini terjadi maka jumlah sel akan bertambah secara lambat meskipun jumlah sel hidup tetap (Fogg, 1975). Fase kematian menunjukkan bahwa jumlah populasi menurun. Jumlah sel yang mati per satuan

waktu perlahan-lahan bertambah dan akhirnya kecepatan mati dari sel-sel menjadi konstan (Fogg, 1975).

2.3.3 Medium Ekstrak Tauge (MET)

Chlorella sp. tumbuh pada media yang mengandung cukup unsur hara. Nutrisi yang diperlukan mikroalga dalam jumlah besar adalah karbon, nitrogen, fosfor, sulfur, natrium, magnesium, kalsium. Nutrisi ini dibutuhkan oleh sel mikroba sebagai komponen penyusun sel. Sedangkan unsur hara yang dibutuhkan dalam jumlah relatif sedikit adalah besi, tembaga (Cu), mangan (Mn), seng (Zn), dibutuhkan oleh sel baik sebagai kofaktor enzim maupun komponen pembentuk klorofil sedangkan silikon (Si), boron (B), molibdenum (Mo), vanadium (V) dan kobalt (Co) yang terdapat dalam media kultur akan mengefektifkan fotosintesis pada mikroalga. Fotosintesis yang berlangsung efektif akan mempengaruhi produk yang dihasilkan (Chumadi, dkk., 1992).

Ekstrak Tauge merupakan salah satu sumber media alami yang dapat digunakan untuk media pertumbuhan mikroalga. Media tersebut mengandung unsur makro dan mikro, vitamin, mineral serta asam amino yang dibutuhkan bagi pertumbuhan mikroalga. Tauge kacang hijau merupakan jenis sayuran yang umum dikonsumsi, mudah diperoleh, ekonomis dan tidak menghasilkan senyawa yang berefek toksik (Richmond, 1986 dalam Prihantini, dkk., 2005).

Vitamin yang ditemukan dalam tauge adalah vitamin C, thiamin, riboflavin, niasin, asam pantothenik, vitamin B₆, folat, kolin, β -karoten, vitamin A, vitamin E (α -tokoferol) dan vitamin K sebagai *growth factor* dalam pertumbuhan alga. Mineral yang ditemukan dalam tauge adalah kalsium (Ca), besi

(Fe), magnesium (Mg), fosfor (P), potasium (K), sodium (Na), zinc (Zn), tembaga (Cu), mangan (Mn), dan selenium (Se). Asam amino esensial bermakna yang terkandung dalam taube, antara lain: triptofan, treonin, fenilalanin, metionin, lisin, leusin, isoleusin, dan valin (Maulana, 2010).

Biji kacang hijau yang dikecambahkan mengalami peningkatan nilai gizi. Berdasarkan berat kering, protein kecambah kacang hijau meningkat menjadi 119 % dibandingkan dengan kandungan awal pada biji. Hal ini disebabkan terjadinya sintesa protein selama germinasi. Selama proses berkecambah, terjadi hidrolisis protein yang menyebabkan kenaikan kadar asam amino di dalam kecambah (Astawan, 2005). Perbandingan nilai gizi biji kacang hijau dan kecambah kacang hijau (taube) dalam 100 gram ditunjukkan pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Perbandingan komposisi dan nilai gizi antara biji kacang hijau sebelum dan setelah 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)

Penggunaan ekstrak tauge sebagai media kultur mikroalga yang disebut dengan media ekstrak tauge (MET) telah dilakukan terhadap *Chlorella sp.* Prihantini, dkk., (2005) melakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh derajat keasaman (pH) awal MET terhadap kerapatan sel mikroalga marga *Chlorella beijerinck* dengan menggunakan MET 4 % dan menghasilkan kesimpulan bahwa kerapatan sel tertinggi (5.677.625 sel/mL) terjadi pada media perlakuan pH awal 7. Prihantini, dkk., (2007) juga melakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh beberapa konsentrasi MET terhadap kerapatan sel mikroalga marga *Scenedesmus*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kerapatan sel tertinggi (3.981.071 sel/mL) terjadi dalam media perlakuan MET 4 %.

Wulandari, dkk., (2010) melakukan penelitian dengan membandingkan penggunaan MET 4 % dengan medium air laut (MAL) dan medium *Guillard* (MG). Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan medium ekstrak tauge 4 % menghasilkan pertumbuhan mikroalga yang sangat pesat dibandingkan dengan medium lainnya.

2.3.4 Kandungan dan Manfaat Mikroalga *Chlorella sp.*

Mikroalga *Chlorella sp.* memiliki potensi sebagai pakan alami, pakan ternak, suplemen, penghasil komponen bioaktif, bahan farmasi dan kedokteran. Menurut Sukoso (2002), *Chlorella sp.* mengandung asam lemak tak jenuh omega-3, 6, dan 9, serat, vitamin, protein, dan mineral. Kandungan beta karoten 900 lebih banyak dibandingkan dengan wortel. Kandungan omega-3 mikroalga lebih banyak dibandingkan minyak ikan, biji rami, dan kedelai, yaitu 50 – 60 %. Byung-Hwan Um dan Young-Soo Kim (2009) menyebutkan bahwa *Chlorella vulgaris* memiliki

kandungan (dalam % berat bahan kering) protein 51 – 58 %, karbohidrat 12 – 17 %, lemak 14 – 22 %, dan asam nukleat 4 – 5 %. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Morris, *et al.*, (2008) menyatakan bahwa lisin yang merupakan asam amino pembatas pada sereal ternyata ditemukan pada hidrosilat protein *Chlorella vulgaris* dengan jumlah yang lebih besar dari standar. Hal ini menunjukkan adanya kemampuan biomassa *Chlorella vulgaris* sebagai suplemen untuk melengkapi kebutuhan akan protein.

Setyaningsih, dkk., (2005) melaporkan bahwa ekstrak intraseluler kasar *Chlorella sp.* mempunyai aktivitas penghambatan terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Escherichia coli* dengan konsentrasi hambatan minimum masing-masing 500 ppm dan 250 ppm serta mempunyai potensi hambatan terhadap *Streptomycin* 40 % dan 46,2 %. *Chlorella sp.* juga menghasilkan suatu antibiotik yang disebut *Chlorellin*, yaitu suatu zat yang dapat melawan penyakit-penyakit yang disebabkan oleh bakteri (Vashista, 1979 dalam Rostini, 2007). Ekstrak pigmen karoteniod lutein dari mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* dilaporkan mempunyai aktivitas antioksidan serupa dan berkaitan dengan peristiwa katarak pada mata (Kusmiati, dkk., 2010).

Hasil penelitian Amaliyah (2013) menyatakan bahwa ekstrak kasar mikroalga *Chlorella sp.* bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan nilai LC_{50} 20,516 ppm. Ekstrak kasar ini mengandung senyawa tanin dan senyawa steroid yang berpotensi sebagai anti kanker. Selain itu, penelitian yang dilakukan Khamidah (2013) menyebutkan bahwa ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. Coli* dan *S. aureus*.

Aktivitas antibakteri terbaik dihasilkan pada konsentrasi 20 % terhadap bakteri *E. coli* yaitu dengan zona hambat sebesar 16,5 mm dan pada konsentrasi 25 % terhadap bakteri *S. aureus* dengan zona hambat sebesar 13,1 mm.

2.4 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstraksi adalah proses penarikan suatu komponen (zat terlarut) dari larutannya dalam air oleh suatu pelarut lain yang tidak bercampur dengan air (Soebagio, 2005). Ekstraksi pelarut menyangkut distribusi solut di antara dua fasa cair yang tidak berampur. Posisi zat-zat terlarut antara dua yang tidak dapat bercampur menawarkan banyak kemungkinan yang menarik untuk pemisahan analisis (Day dan Underwood, 2002).

Dalam metode ekstraksi bahan alam dikenal suatu metode maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman sampel pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi bahan alam karena dengan perendaman sampel akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa dapat sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan (Lenny, 2006). Penekanan utama pada maserasi adalah tersedianya waktu kontak yang cukup antara pelarut dan jaringan yang diekstraksi (Guenther, 1987).

Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam ke dalam pelarut tersebut (Soebagio, 2005). Kepolaran suatu pelarut menunjukkan tingkat

kelarutannya terhadap suatu bahan. Suatu bahan yang lebih larut dalam air disebut memiliki sifat yang polar dan sebaliknya apabila lebih larut dalam pelarut organik disebut nonpolar. Tingkat kepolaran ditunjukkan oleh nilai konstanta dielektrik. Semakin besar konstanta dielektrikum suatu pelarut disebut semakin polar (Sudarmadji, dkk., 2003). Konstanta dielektrik beberapa pelarut organik ditunjukkan pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Pelarut organik dan sifat fisiknya

Pelarut	Rumus Kimia	Titik Didih (°C)	Konstanta Dielektrikum	Polaritas*	Massa jenis (g/mL)
Aseton	CH ₃ -C(=O)-CH ₃	56	21	5.1	0.786
Etanol	CH ₃ -CH ₂ -OH	79	30	4.3	0,789
Metanol	CH ₃ -OH	65	33	5.1	0,791
Air	H-O-H	100	80	10.2	1.000
Heksana	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	69	2.0	0.1	0.655
Benzena	C ₆ H ₆	80	2.3	2.7	0.879
Toluen	C ₆ H ₅ -CH ₃	111	2.4	2.4	0.867
Dietil eter	CH ₃ CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₃	35	4.3	2.8	0.713
Kloroform	CHCl ₃	61	4.8	4.1	1.498
Etil asetat	CH ₃ -C(=O)-O-CH ₂ -CH ₃	77	6.0	4.4	0.894

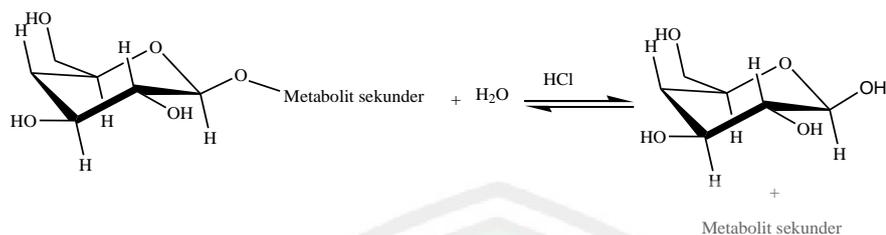
Sumber: Nur dan Adijuwana, 1989

Agustian, dkk., (2013) melakukan penelitian dengan mengekstrak mikroalga *Spirulina platensis* untuk di uji toksisitasnya. Ekstraksi mikroalga *Spirulina platensis* dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol dan pelarut gabungan metanol:aseton (7:3). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak yang memiliki aktivitas tertinggi adalah ekstrak metanol. Amaliyah (2013) melakukan penelitian untuk menguji toksisitas mikroalga *Chlorella sp.* dengan mengekstrak biomassa *Chlorella sp.* dengan menggunakan variasi pelarut yaitu metanol, etil

asetat dan n-heksana. Randemen tertinggi dihasilkan oleh ekstrak metanol yaitu sebesar 7,001 %.

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 dapat bersifat polar, semipolar maupun non polar. Senyawa metabolit sekunder tergolong dalam senyawa aglikon, dengan berubah struktur kebentuk 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 (Didik, 2004). Pemutusan ikatan glikosida dapat dilakukan dengan reaksi hidrolisis yakni dengan memanaskan larutan dengan air dan sedikit asam (Saifudin, dkk., 2006). Menurut Achmad (1986) suatu bentuk glikosida akan terurai menghasilkan gugus gula dan aglikon apabila dihidrolisis oleh asam.

Handoko (2012) menyebutkan bahwa pemilihan asam kuat seperti HCl sebagai katalis disebabkan karena asam kuat akan lebih mudah melepas proton (H^+) secara sempurna di dalam air, sedangkan asam lemah relatif lebih sukar sehingga asam lemah memiliki kecenderungan terionisasi sebagian dalam pelepasan ion H^+ . Semakin banyak proton yang terionisasi dalam air, maka semakin kuat peranan proton dalam pemutusan ikatan glikosida. Dugaan reaksi hidrolisis ikatan glikosida oleh katalis asam ditunjukkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida (Mardiyah, 2012)

2.5 Uji Toksisitas Senyawa Aktif Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

2.5.1 Morfologi Larva Udang *Artemia Salina* Leach

Artemia adalah sejenis udang-udangan primitif. *Artemia* semula diberi nama *Cancer salinus* oleh Linnaeus pada tahun 1778, tetapi kemudian pada tahun 1919 diubah menjadi *Artemia salina* Leach. Klasifikasi *Artemia salina* dalam sistematika hewan adalah sebagai berikut (Bougis, 1979 dalam Fathiyawati, 2008):

Kingdom	: Animal
Filum	: Arthropoda
Kelas	: Crustacea
Sub kelas	: Branchiopoda
Ordo	: Anostraca
Famili	: Artemiidae
Marga	: Artemia
Jenis	: <i>Artemia salina</i> Leach.



Gambar 2.4 *Artemia salina* Leach

Telur *Artemia salina* atau *cyste* berbentuk bulat berlekuk dalam keadaan kering dan bulat penuh dalam keadaan basah. Warnanya coklat yang diselubungi

oleh cangkang yang tebal dan kuat. Cangkang ini berguna untuk melindungi embrio terhadap pengaruh kekeringan, benturan keras, sinar ultraviolet dan mempermudah pengapungan (Anonymous, 2008). *Artemia* dapat mengadsorpsi air, jika tersinari oleh sinar matahari atau pada suhu sekitar 26 – 28 °C maka akan menetas setelah 24 – 48 jam tergantung pada kondisi lingkungan. *Artemia salina* yang baru menetas disebut dengan naupli (larva) yang memiliki ukuran 0,25 mm (0,01 inci) (Anonymous, 2007).

2.5.2 Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

Toksisitas (*toxicity*) 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). Cahyono (2004) menyatakan bahwa toksisitas adalah kemampuan suatu zat untuk menimbulkan kerusakan pada organisme hidup.

Uji toksisitas pada hewan uji dimaksudkan untuk ekstrapolasi hasil terhadap manusia untuk mencari dosis yang aman. Parameter yang digunakan dalam uji ini adalah efek toksikan (respon) terhadap hewan uji (Soemirat, 2005). Kadar racun suatu zat kimia salah satunya dinyatakan dengan istilah LC_{50} (*Lethal Concentration 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 dari suatu kelompok spesies setelah binatang percobaan tersebut terpapar dalam waktu tertentu (Cahyono, 2004).

Uji toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach atau BSLT dapat digunakan sebagai uji pendahuluan pada penelitian yang mengarah pada uji sitotoksik. Korelasi antara uji toksisitas akut ini dengan uji sitotoksik adalah jika mortalitas terhadap *Artemia salina* Leach yang ditimbulkan memiliki harga $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$. Tingkat toksisitas ditunjukkan pada Tabel 2.4 (Meyer, *et al.*, 1982):

Tabel 2.4 Kategori toksisitas bahan

Kategori	LC_{50} (ppm)
Sangat toksik	< 30
Toksik	30 – 1000
Tidak toksik	>1000

BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) merupakan pengujian senyawa secara umum yang dapat mendeteksi beberapa bioaktivitas dalam suatu ekstrak. Korelasi positif ditemukan antara toksisitas BSLT dan sitotoksik terhadap 9 kB sel karsinoma nasofaring manusia maupun untuk sel P-388 leukimia secara *in vivo*. Bioaktivitas yang dapat dideteksi dari skrining awal dengan metode BSLT diantaranya adalah antikanker, antitumor, antimalaria, antimikroba, *immunosuppressive*, *antifeedant* dan residu pestisida (Colegate dan Molyneux, 2007). Menurut Panjaitan (2011) *Artemia* memiliki kesamaan tanggapan dengan mamalia seperti tipe DNA-dependent RNA polymerase (DNA yang mengarahkan proses transkripsi RNA). Hal ini menyebabkan senyawa atau ekstrak yang memiliki aktivitas pada sistem tersebut dapat dideteksi melalui metode ini.

Pengujian dilakukan pada ekstrak sampel dengan berbagai konsentrasi dan kontrol. Bila dalam larutan kontrol terdapat larva yang mati, maka jumlah larva

udang sampel adalah jumlah larva udang pada tiap-tiap konsentrasi dikurangi jumlah larva pada larutan kontrol (Mc. Laughin, 1991).

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{Tes-Kontrol}}{\text{jumlah larva uji (10 ekor)}} \times 100 \% \dots\dots\dots (2.1)$$

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). Mekanisme kematian larva berhubungan dengan fungsi-fungsi senyawa-senyawa yang terkandung dalam selnya yang dapat menghambat daya makan larva. Cara kerja senyawa-senyawa tersebut adalah dengan bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut. Oleh sebab itu, apabila senyawa-senyawa tersebut masuk ke dalam tubuh larva maka alat pencernaan larva akan terganggu. Di samping itu, senyawa-senyawa tersebut dapat menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva sehingga akan mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga larva tidak mampu mengenali makanannya, akibatnya larva akan mati kelaparan.

Amaliyah (2013) melakukan uji toksisitas ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* dengan menggunakan metode BSLT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua ekstrak bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia saliana* Leach dengan nilai LC₅₀ 20,516 ppm (ekstrak metanol) dan 167,417 ppm (ekstrak etil asetat). Agustian, dkk., (2013) melaporkan bahwa hasil uji BSLT ekstrak metanol pigmen kasar *Spirulina platensis* menghasilkan nilai

LC₅₀ tertinggi yaitu 446,68 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak bersifat toksik terhadap *Artemia salina L.* dan berpotensi sebagai antikanker.

2.6 Identifikasi Senyawa Aktif Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Uji Fitokimia

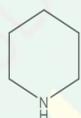
Uji fitokimia merupakan pengujian kandungan senyawa-senyawa kimia di dalam tumbuhan dengan menggunakan reagen-reagen tertentu. Tumbuhan umumnya mengandung senyawa aktif dalam bentuk metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, steroid, tanin, saponin, triterpenoid dan lain-lain. Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang umumnya mempunyai kemampuan bioaktivitas dan berfungsi sebagai pelindung tumbuhan tersebut dari gangguan hama penyakit untuk tumbuhan itu sendiri atau lingkungannya (Lenny, 2006).

2.6.1 Alkaloid

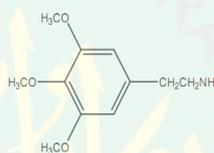
Alkaloid merupakan sekelompok metabolit sekunder alami yang mengandung nitrogen yang aktif secara farmakologis yang berasal dari tanaman, mikroba atau hewan. Dalam kebanyakan alkaloid, atom nitrogen merupakan bagian dari cincin (Gambar 2.5). Alkaloid secara biosintesis diturunkan dari asam amino. Nama alkaloid berasal dari kata “*alkalin*” yang berarti basa yang larut air. Sejumlah alkaloid dan turunannya telah dikembangkan sebagai obat untuk mengobati berbagai macam penyakit seperti morfin, reserpin, dan taxol. Beberapa pelarut yang digunakan untuk menguji adanya alkaloid ditunjukkan pada Tabel 2.5 (Sarker dan Nahar, 2009).

Tabel 2.5 Uji Alkaloid

Reagen/Uji	Komposisi Reagen	Hasil
Reagen Meyer	Larutan Kalium merkuri iodide	Endapan krim
Reagen wagner	Iodium dalam kalium iodide	Endapan cokelat kemerahan
Asam tanat	Asam tanat	Endapan
Reagen hager	Larutan asam pikrat jenuh	Endapan kuning
Reagen dragendorff	Larutan kalium bismuth iodide	Endapan orange atau cokelat kemerahan (kecuali dengan kafein dan beberapa alkaloid lain)



Piperidina

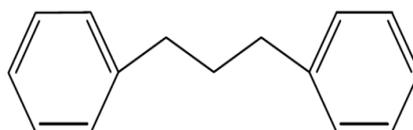


Efedrina

Gambar 2.5 Contoh struktur senyawa golongan Alkaloid (Robinson, 1995)

2.6.2 Flavonoid

Senyawa-senyawa flavonoid merupakan zat warna merah, ungu dan biru dan sebagai zat warna kuning yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan (Lenny, 2006). Flavonoida mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, dimana dua cincin benzene (C_6) terikat pada suatu rantai propana (C_3) sehingga membentuk suatu susunan $C_6-C_3-C_6$ (Gambar 2.6). Pengelompokan flavonoid dibedakan berdasarkan cincin heterosiklik-oksigen tambahan dan gugus hidroksil yang tersebar menurut pola yang berlainan pada rantai C_3 . Sesuai struktur kimianya, yang termasuk flavonoid yaitu flavonol, flavon, flavanon, katekin, antosianidin dan kalkon (Robinson, 1995).



Gambar 2.6 Struktur inti senyawa Flavonoid (Robinson, 1995)

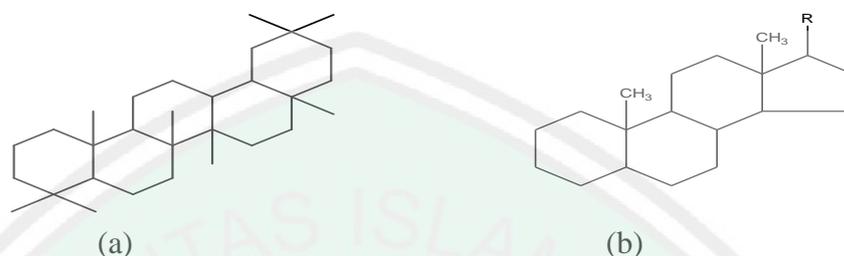
Sifat-sifat flavonoid antara lain merupakan senyawa fenol (bersifat agak asam dan dapat larut dalam basa) yang larut dalam pelarut polar (mudah larut dalam air) merupakan senyawa yang larut air, mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi sehingga akan menunjukkan pita serapan yang kuat pada sinar UV dan sinar tampak (Harborne, 1987).

2.6.3 Triterpenoid dan Steroid

Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari 6 satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C_{30} asiklik yaitu skualena. Senyawa ini berstruktur siklik yang kebanyakan berupa alkohol, aldehida, atau asam karboksilat (Harborne, 1987). Sifat-sifat triterpenoid antara lain berasa sangat pahit, tidak berwarna, berbentuk kristal, bertitik leleh tinggi, bersifat optis aktif, mempunyai bau dan dapat diisolasi dari bahan nabati dengan penyulingan sebagai minyak atsiri. Senyawa ini paling umum ditemukan pada tumbuhan berbiji, bebas dan sebagai glikosida (Robinson, 1995). Pereaksi Lieberman-Burchard secara umum digunakan untuk mendeteksi triterpenoid menghasilkan warna violet.

Steroid adalah suatu golongan senyawa triterpenoid yang mengandung inti siklopentana perhidrofenantren yaitu dari 3 cincin sikloheksana dan 1 cincin siklopentana (Harborne, 1987). Senyawa steroid terdapat dalam setiap makhluk hidup. Steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan disebut fitosterol, sedangkan yang ditemukan dalam jaringan hewan disebut kolesterol (Robinson, 1995). Reaksi warna yang digunakan untuk uji warna pada steroid adalah dengan

reaksi Lieberman-Burchard yang menghasilkan warna hijau biru. Struktur senyawa Triterpenoid dan senyawa Steroid ditunjukkan pada Gambar 2.7.



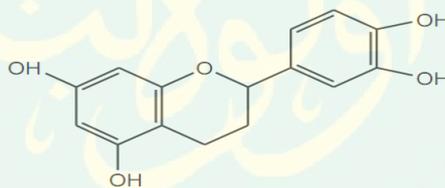
Gambar 2.7 Struktur inti (a) Triterpenoid dan (b) Steroid (Robinson, 1995)

Pemisahan senyawa steroid dapat dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dengan pereaksi Lieberman-Buchard sebagai penampak noda. Syamsudin, dkk., (2007) dengan menggunakan eluen yang sama yaitu n-heksana:aseton (7:3) untuk memisahkan senyawa steroid dari ekstrak n-heksana kulit batang asam kandis. Setelah disemprot dengan pereaksi Liebermann-Buchard menghasilkan enam bercak yang berwarna biru, ungu sampai cokelat yang diduga merupakan senyawa steroid/triterpenoid. Sulastry dan Kurniawati (2010) menyatakan bahwa senyawa steroid setelah disemprot dengan reagen Liebermann-Buchard menghasilkan warna hijau. Sriwahyuni (2010) memisahkan senyawa steroid, menggunakan eluen sikloheksana-etil asetat (1:1) dengan pereaksi LB menghasilkan 12 noda dengan Rf antara 0,06 – 0,86 (hijau kebiruan, hijau kehitaman, dan berwarna ungu yang tengahnya berwarna hijau kebiruan pada UV 366 nm) dari ekstrak etil asetat tanaman Anting-anting. Hayati, dkk., (2012) menyebutkan bahwasanya pemisahan senyawa steroid pada ekstrak etil asetat tanaman anting-anting (eluen n-heksana:etil asetat (7:3)) dengan pereaksi Liebermann-Buchard menghasilkan 9 noda dengan nilai Rf berkisar antara 0,06 –

0,82. Noda ke 1, 2 dan 8 menunjukkan warna hijau kebiruan, noda ke 4 menunjukkan warna hijau, noda ke 6 menunjukkan warna ungu yang tengahnya berwarna biru kehijauan, noda ke 9 menunjukkan warna hijau kebiruan muda. Senyawa-senyawa tersebut diduga merupakan senyawa steroid.

2.6.4 Tanin

Tanin adalah salah satu jenis polifenol yang secara alami terdapat dalam beberapa tanaman yang mempunyai sifat dapat mengikat protein dan mempunyai atribut flavor yang sepat (astringent). Tanin dalam berbagai jenis tanaman memiliki struktur kimia dan reaksi yang berbeda-beda, tetapi memiliki sifat yang sama yaitu dapat mengendapkan gelatin dan protein (Shahidi dan Naczk, 1995). Struktur senyawa tanin ditunjukkan pada Gambar 2.8.



Gambar 2.8 Struktur inti Tanin (Robinson, 1995)

Tanin umumnya dibagi menjadi dua jenis yaitu tanin terhidrolisa dan tanin terkondensasi (proantocyanidin). Tanin terhidrolisis mempunyai karbohidrat polioliol (umumnya D-glukosa) pada pusat molekulnya (Harborne, 1987). Tanin terkondensasi kebanyakan terdiri dari polimer flavonoid yang merupakan senyawa fenol. Nama lain dari tanin ini adalah proantosianidin. Proantosianidin merupakan polimer dari flavonoid (Hagerman, 2002).

2.7 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis ialah metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan pada perbedaan distribusi molekul-molekul komponen diantara dua fase (fase gerak/eluen dan fase diam/adsorben) yang kepolarannya berbeda. Komponen kimia bergerak naik mengikuti fase gerak. Karena daya serap adsorben terhadap komponen-komponen kimia tidak sama sehingga komponen kimia dapat bergerak dengan kecepatan yang berbeda berdasarkan tingkat kepolarannya, hal inilah yang menyebabkan terjadinya pemisahan (Hendayana, 2006).

Kromatografi lapis tipis merupakan bentuk kromatografi planar yang digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang sifatnya hidrofob seperti lipida-lipida dan hidrokarbon (Sastrohamidjojo, 1991). Fase diam dalam KLT yaitu lapisan tipis silika gel, alumunium oksida, atau selulosa sebagai fase diam yang dilapiskan pada gelas, kaca atau logam. Fase geraknya adalah pelarut campuran yang ditempatkan dalam bejana pengembang. Pemilihan pelarut yang digunakan berdasarkan nilai konstanta dielektrik dari pelarut yang digunakan, semakin tinggi nilai konstanta dielektriknya maka pelarut tersebut berifat polar (Fitrianti, 2011).

Terbentuknya noda/bercak pada plat dapat dilakukan dengan menambahkan indikator berfluorosensi berupa lampu UV. Jika senyawa pada bercak yang akan ditampakkan mengandung ikatan rangkap terkonjugasi atau cincin aromatik berbagai jenis, sinar UV akan mengeksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi kemudian kembali ke keadaan semula dengan melepaskan energi (Gandjar dan Rohman, 2007). Identifikasi senyawa-

senyawa yang terpisah pada kromatografi lapis tipis dapat menggunakan harga Rf (*Retardation factor*) yang menggambarkan jarak yang ditempuh suatu komponen terhadap jarak keseluruhan, yaitu:

$$Rf = \frac{\text{jarak titik pusat bercak dari titik awal}}{\text{jarak garis depan dari titik awal}} \dots\dots\dots (2.2)$$

Harga Rf dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor yang mempengaruhi gerakan noda dalam KLT diantaranya adalah struktur kimia dari senyawa yang sedang dipisahkan, sifat dari penyerap dan derajat aktivitasnya, jenis eluennya serta jumlah cuplikan yang digunakan tidak terlalu berlebihan (Sastrohamidjojo, 1991).

2.8 Analisis Probit

Salah satu metode statistika yang digunakan untuk menentukan nilai LC₅₀ adalah dengan menggunakan analisis probit menggunakan minitab. LC₅₀ didesain untuk menggambarkan respon yang mematikan komponen dalam populasi dari suatu percobaan. Analisa ini dilakukan dengan menguji respon (berupa mortalitas) suatu organisme terhadap senyawa kimia dalam konsentrasi yang bervariasi. Hubungan yang ditunjukkan berbentuk sigmoid. Analisis probit berfungsi untuk mengubah hubungan yang sigmoid menjadi linear (Kanwar, 2007). Keuntungan minitab adalah dapat digunakan dalam pengolahan data statistik untuk tujuan sosial maupun teknik. Apabila dibandingkan dengan program statistika lainnya, program minitab telah diakui sebagai program statistika yang sangat kuat dengan tingkat akurasi taksiran statistik yang tinggi (95 %) (Iriawan dan Astuti, 2006).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik, Kimia Analitik, Bioteknologi Jurusan Kimia dan Laboratorium Ekologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Desember 2013 – Maret 2014.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian adalah *heater*, timbangan analitik (Mettler AE 25), cawan penguap, *hotplate*, corong pisah, statif, desikator, lemari asam, oven, kaca arloji, cawan petri, wadah penetasan, aerator, lampu penetasan, pengaduk kaca, spatula, lampu TL 36 Watt, *shaker inkubator*, pipet tetes, pipet ukur 1 mL, pipet ukur 5 mL, pipet ukur 10 mL, pipet mikro, labu ukur 10 mL, penjepit kayu, *beakerglass* 100 mL, *beakerglass* 500 mL, bola hisap, erlenmayer 250 mL, erlenmayer 1000 mL, erlenmayer 500 mL, gelas ukur 100 mL, gelas ukur 500 mL, saringan, corong kaca, corong *buchner*, *rotary evaporator vacuum*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, aluminium foil, kertas saring, botol vial, gelas, pinset, lampu UV dan seperangkat KLT.

3.2.2 Bahan-bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat *Chlorella sp.* (bagian yang digunakan adalah biomassa *Chlorella sp.*), tauge kacang hijau

sebagai bahan Media Ekstrak Tauge (MET), dan hewan uji *Artemia salina* Leach yang berasal dari telur *Artemia salina* Leach.

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah metanol p.a, etil asetat p.a, kloroform, n-heksana p.a, petroleum eter, HCl pekat, HCl 2 N, air laut, ragi roti, asam asetat anhidrat, natrium bikarbonat, H₂SO₄ pekat, HCl 2 %, reagen Dragendroff, reagen Mayer, larutan gelatin, NaCl, FeCl₃ 1 %, metanol 50 %, dimetil sulfoksida (DMSO), serbuk Mg, reagen Liebermann-Buchard, plat KLT GF₂₅₄, dan aquades.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian eksperimental di laboratorium. Tahap pertama adalah dilakukan uji taksonomi. Selanjutnya, isolat *Chlorella sp.* dikultivasi dalam medium ekstrak tauge (MET) 4 % pada pH 7 selama 10 hari yaitu pada akhir fase stasioner dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap. Hasil kultivasi kemudian dipanen dan disentrifius selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm sehingga dihasilkan biomassa *Chlorella sp.* Selanjutnya biomassa *Chlorella sp.* dipreparasi dengan dikeringanginkan pada suhu ruang (25 – 30 °C) kemudian dihitung kadar airnya. Selanjutnya biomassa *Chlorella sp.* diekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut metanol p.a selama 24 jam dengan perbandingan 1:10 sehingga didapatkan ekstrak biomassa *Chlorella sp.*

Ekstrak *Chlorella sp.* kemudian dihidrolisis dengan menggunakan HCl 2 N. Pertama-tama ekstrak yang diperoleh dari hasil pemekatan ditimbang sebanyak 50 gram kemudian dihidrolisis dengan HCl 2 N sebanyak 100 mL kemudian distirrer selama 1 jam dengan menggunakan *hotplate stirrer*. Selanjutnya

ditambahkan natrium bikarbonat hingga pH-nya netral. Ekstrak hasil hidrolisis kemudian dipartisi dengan menggunakan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya yaitu etil asetat, kloroform, petroleum eter, dan n-heksana. Sampel dipartisi dengan pelarut mulai dari pelarut yang mempunyai tingkat kepolaran paling rendah ke pelarut yang lebih polar.

Masing-masing fraksi kemudian diuji toksisitasnya terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan variasi konsentrasi 30, 25, 20, 15, 10 dan 5 ppm. Setelah itu dihitung nilai LC_{50} masing-masing fraksi dengan menggunakan analisis probit. Fraksi yang paling toksik diuji kandungan senyawa aktifnya dengan menggunakan uji fitokimia yang meliputi uji flavonoid, uji alkaloid, uji tanin, uji triterpenoid dan uji steroid. Selanjutnya dilakukan pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA) untuk fraksi yang positif pada uji fitokimia. Selain untuk mempertegas uji fitokimia, KLTA juga digunakan untuk pemisahan senyawa teraktif dalam fraksi serta untuk mencari eluen terbaik.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Uji Taksonomi
2. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.*;
 - a. Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %;
 - b. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %;
 - c. Pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella sp.*
3. Preparasi sampel biomassa mikroalga *Chlorella sp.*;

4. Analisis kadar air biomassa mikroalga *Chlorella sp.*;
5. Ekstraksi komponen aktif biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dengan menggunakan pelarut metanol p.a ;
6. Hidrolisis ekstrak pekat mikroalga *Chlorella sp.* dengan menggunakan HCl 2 N;
7. Partisi ekstrak pekat hasil hidrolisis mikroalga *Chlorella sp.* dengan menggunakan variasi pelarut yaitu etil asetat, kloroform, petroleum eter dan n-heksana;
8. Uji toksisitas fraksi biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach;
9. Uji kandungan golongan senyawa aktif yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, triterpenoid dan steroid;
10. Pemisahan senyawa aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik menggunakan fase diam silika gel F₂₅₄;
11. Analisis data dengan menggunakan analisis probit.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Uji Taksonomi

Uji taksonomi mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan secara kualitatif di Laboratorium Biologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya. Uji taksonomi yang dilakukan meliputi pengamatan morfologi mikroalga *Chlorella sp.*

3.5.2 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

3.5.2.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)

Pembuatan medium ekstrak tauge diawali dengan pembuatan larutan stok MET yaitu 100 gram tauge direbus dalam 500 mL aquades yang mendidih sampai tauge matang. Medium ekstrak tauge dibuat dengan cara melarutkan ekstrak tauge ke dalam aquades dengan konsentrasi 4 % (v/v) (Prihantini, dkk., 2005).

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

Sebanyak 10 mL isolat *Chlorella sp.* diinokulasikan ke dalam masing-masing 60 mL media ekstrak tauge dalam erlenmayer 1000 mL kemudian di tempatkan pada ruang dengan suhu 25 – 27 °C, pH 7 dan di tempatkan pada rak yang telah dilengkapi dengan pencahayaan menggunakan lampu TL 36 Watt (intensitas cahaya 1000 – 4000 lux). Kultur *Chlorella* tersebut diinkubasi selama 10 hari dengan fotoperiodisitas 14 jam terang 10 jam gelap (Prihantini, dkk., 2005).

3.5.2.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Pemanenan biomassa *Chlorella sp.* dilakukan pada hari ke-10. Pemanenan dilakukan dengan cara media kultur *Chlorella sp.* disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Biomassa *Chlorella sp.* dipisahkan dari cairannya kemudian dilakukan penimbangan. Hasil penimbangan dicatat sebagai berat basah.

3.5.3 Preparasi Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Sampel mikroalga *Chlorella sp.* yang masih basah diletakkan di wadah terbuka yang bentuknya agak datar kemudian dikeringanginkan pada suhu ruang (25 – 30 °C) menggunakan kipas angin. Selanjutnya biomassa yang sudah dikeringanginkan tersebut ditimbang.

3.5.4 Analisis Kadar Air Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Cawan yang akan digunakan dipanaskan terlebih dahulu dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama ± 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya kemudian cawan disimpan dalam desikator sekitar 10 menit. Cawan tersebut selanjutnya ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan.

Biomassa *Chlorella sp.* ditimbang sekitar 5 gram. Selanjutnya biomassa *Chlorella sp.* dimasukkan ke dalam cawan yang telah diketahui beratnya dan dikeringkan di dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama ± 30 menit. Sampel kering didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Sampel tersebut dipanaskan kembali dalam oven ± 30 menit, didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi sampai berat konstan. Kadar air sampel biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dihitung menggunakan rumus berikut (AOAC, 1984):

$$\text{kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.1)$$

Keterangan: a = berat cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat cawan + sampel setelah dikeringkan

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}} \dots\dots\dots (3.2)$$

$$\% \text{ Kadar air terkoreksi} = \text{Kadar air} - \text{Faktor koreksi} \dots\dots\dots (3.3)$$

3.5.5 Ekstraksi Komponen Aktif Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstraksi komponen aktif dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut metanol p.a. Biomassa mikroalga *Chlorella sp.* yang telah dikeringkan kemudian ditimbang sebanyak 50 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmayer 500 mL. Biomassa ini kemudian diekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut metanol p.a sebanyak 250 mL kemudian erlenmayer ditutup dengan menggunakan aluminium foil. Ekstraksi dilakukan selama 24 jam dengan pengocokan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu kamar \pm 5 jam. Selanjutnya ekstrak disaring dengan menggunakan corong *buchner* untuk memisahkan filtrat dengan residunya. Bagian residu dimaserasi kembali hingga 3 kali proses ekstraksi. Kemudian filtrat yang diperoleh dari 3 kali proses maserasi tersebut dikumpulkan jadi satu kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator vacuum*, sehingga diperoleh ekstrak kasar mikroalga *Chlorella sp.* fraksi metanol. Selanjutnya dihitung rendemennya dengan menggunakan persamaan:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kasar yang diperoleh}}{\text{Berat sampel yang digunakan}} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.4)$$

3.5.6 Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstrak pekat metanol yang diperoleh dihidrolisis dengan menggunakan HCl 2 N. Sebanyak 50 gram ekstrak pekat metanol dihidrolisis dengan 100 mL HCl 2 N dan distirer dengan *hotplate stirrer* selama 1 jam. Selanjutnya ditambahkan natrium bikarbonat hingga pH-nya netral.

3.5.7 Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstrak pekat hasil hidrolisis kemudian dipartisi dengan pelarut etil asetat, kloroform, petroleum eter dan n-heksana. Sampel dipartisi dengan pelarut yang memiliki tingkat kepolaran rendah ke pelarut dengan tingkat kepolaran tinggi. Sampel ditambahkan 50 mL pelarut n-heksana kemudian dikocok lalu didiamkan. Selanjutnya dipisahkan antara lapisan air dan lapisan organik. Lapisan organik fraksi n-heksana dimasukkan ke dalam *beakerglass* yang nantinya akan diuji toksisitasnya, sedangkan lapisan air dimasukkan kembali ke dalam corong pisah kemudian ditambahkan 50 mL pelarut petroleum eter kemudian dikocok dan didiamkan. Lapisan organik dan lapisan air kemudian dipisahkan. Lapisan organik fraksi petroleum eter dimasukkan ke dalam *beakerglass* yang nantinya akan diuji toksisitasnya, sedangkan lapisan air dimasukkan kembali ke dalam corong pisah kemudian ditambahkan 50 mL pelarut kloroform kemudian dikocok dan didiamkan. Selanjutnya dipisahkan antara lapisan air dan lapisan organik. Lapisan organik fraksi kloroform dimasukkan ke dalam *beakerglass* yang nantinya akan diuji toksisitasnya, sedangkan lapisan air dimasukkan kembali ke dalam corong pisah kemudian ditambahkan 50 mL etil asetat kemudian dikocok dan didiamkan.

Lapisan organik dan lapisan air kemudian dipisahkan. Lapisan organik fraksi etil asetat dimasukkan ke dalam *beakerglass* yang nantinya akan diuji toksisitasnya.

Masing-masing fraksi pelarut (hasil partisi) dipekatkan dengan *rotary evaporator vacum* hingga diperoleh ekstrak pekat fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter dan n-heksana. Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian dikeringkan dengan dialiri gas N₂ sehingga diperoleh ekstrak kering. Masing-masing fraksi hasil partisi ditimbang kemudian dihitung rendemennya menggunakan Persamaan 3.4.

3.5.8 Uji Toksisitas Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.* terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach.

3.5.8.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina* Leach.

Sebanyak 250 mL air laut dimasukkan dalam wadah penetasan, dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina* Leach kemudian diaerasi dan telur akan menetas dalam waktu \pm 48 jam dan siap digunakan sebagai target uji toksisitas (Halimah, 2010).

3.5.8.2 Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan pada larutan ekstrak sebagai perlakuan dan kontrol yang digunakan adalah kontrol pelarut, kontrol media, dan kontrol air laut. Perlakuan uji toksisitas dilakukan sebanyak 3 kali ulangan pada masing-masing ekstrak sampel. Ekstrak fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter, n-heksana dan fasa air masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan menggunakan pelarutnya masing-masing sebanyak 10 mL sehingga diperoleh

larutan stok 1000 ppm. Larutan yang diperoleh selanjutnya dipipet masing-masing sebanyak 300 μL , 250 μL , 200 μL , 150 μL , 100 μL dan 50 μL kemudian dimasukkan ke dalam botol vial dan pelarutnya diuapkan hingga kering.

Pada fraksi n-heksana ditambahkan 100 μL dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti, dan 2 mL air laut kemudian dikocok sampai ekstrak dapat larut dalam air laut. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL, sehingga konsentrasi masing-masing larutan menjadi 30, 25, 20, 15, 10 dan 5 ppm.

Pada fraksi petroleum eter ditambahkan 100 μL dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti, dan 2 mL air laut kemudian dikocok sampai ekstrak dapat larut dalam air laut. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL, sehingga konsentrasi masing-masing larutan menjadi 30, 25, 20, 15, 10 dan 5 ppm.

Pada fraksi kloroform ditambahkan 100 μL dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti, dan 2 mL air laut kemudian dikocok sampai ekstrak dapat larut dalam air laut. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL, sehingga konsentrasi masing-masing larutan menjadi 30, 25, 20, 15, 10 dan 5 ppm.

Pada fraksi etil asetat ditambahkan 100 μL dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti, dan 2 mL air laut kemudian dikocok sampai ekstrak dapat larut

dalam air laut. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL, sehingga konsentrasi masing-masing larutan menjadi 30, 25, 20, 15, 10 dan 5 ppm.

Pada fraksi fasa air ditambahkan 100 μ L dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti, dan 2 mL air laut kemudian dikocok sampai ekstrak dapat larut dalam air laut. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL, sehingga konsentrasi masing-masing larutan menjadi 30, 25, 20, 15, 10 dan 5 ppm.

Kontrol pelarut dilakukan pada masing-masing pelarut. Kontrol etil asetat dibuat dengan 300 μ L pelarut etil asetat dimasukkan ke dalam botol vial dan diuapkan hingga kering. Ditambahkan 100 μ L dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut kemudian dikocok sampai semua larut dalam air laut. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL.

Kontrol kloroform dibuat dengan 300 μ L pelarut kloroform dimasukkan ke dalam botol vial dan diuapkan hingga kering. Ditambahkan 100 μ L dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut kemudian dikocok sampai semua larut dalam air laut. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL.

Kontrol petroleum eter dibuat dengan 300 μL pelarut petroleum eter dimasukkan ke dalam botol vial dan diuapkan hingga kering. Ditambahkan 100 μL dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut kemudian dikocok sampai semua larut dalam air laut. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL.

Kontrol n-heksana dibuat dengan 300 μL pelarut n-heksana dimasukkan ke dalam botol vial dan diuapkan hingga kering. Ditambahkan 100 μL dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut kemudian dikocok sampai semua larut dalam air laut. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL.

Kontrol DMSO (dimetil sulfoksida) dibuat dengan 100 μL DMSO dimasukkan ke dalam botol vial. Ditambahkan setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut kemudian dikocok sampai semua larut dalam air laut. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar, kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL.

Kontrol air laut dibuat dengan memipet air laut dimasukkan ke dalam botol vial. Ditambahkan setetes larutan ragi roti kemudian dikocok sampai semua larut dalam air laut. Larutan dipindahkan ke dalam labu takar, kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* Leach dan ditambahkan air laut sampai volumenya menjadi 10 mL.

Selanjutnya semua labu ukur diletakkan di bawah lampu pijar selama 24 jam dan diamati terhadap kematian larva udang. Selanjutnya dihitung jumlah larva udang yang mati. Analisis data dilakukan untuk mencari nilai LC_{50} dengan menggunakan analisis probit. Bila ada kematian pada kontrol dikoreksi dengan menggunakan Persamaan 3.5 (Meyer, *et al.*, 1982):

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{Tes} - \text{Kontrol}}{\text{jumlah larva uji (10 ekor)}} \times 100 \% \dots\dots\dots (3.5)$$

3.5.9 Uji Kandungan Golongan Senyawa Aktif dengan Uji Reagen

Uji kandungan golongan senyawa aktif dilakukan dengan menggunakan uji reagen pada ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* yang memiliki toksisitas tertinggi terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Ekstrak dilarutkan dengan sedikit pelarutnya kemudian dilakukan uji reagen pada golongan alkaloid, flavanoid, tanin, triterpenoid dan steroid (Indriyani, dkk, 2006).

3.5.9.1 Uji Alkaloid (Sastrohamidjojo, 1996)

Ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 0,5 mL HCl 2 % dan larutan dibagi ke dalam dua tabung reaksi. Tabung I ditambahkan 0,5 mL reagen Dragendorff, tabung II ditambahkan 2 – 3 tetes reagen Mayer. Jika tabung I terbentuk endapan jingga dan pada tabung II terbentuk endapan kekuning-kuningan, menunjukkan adanya alkaloid.

3.5.9.2 Uji Flavonoid (Harbone, 1987)

Ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan ke dalam 1 – 2 mL metanol panas 50 %. Setelah itu

ditambahkan serbuk Mg dan 0,5 mL HCl pekat. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavanoid.

3.5.9.3 Uji Tanin

3.5.9.3.1 Uji Tanin dengan Larutan Gelatin

Ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan larutan gelatin. Jika terbentuk endapan putih, menunjukkan adanya tanin.

3.5.9.3.2 Uji Tanin dengan FeCl₃

Ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* ditambahkan 2 – 3 tetes larutan FeCl₃ 1 %. Jika larutan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tua maka bahan tersebut mengandung tanin.

3.5.9.4 Uji Triterpenoid dan Steroid (Harbone, 1987)

Ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan ke dalam 0,5 mL kloroform lalu ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Campuran ini selanjutnya ditambahkan dengan 1 – 2 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecokelatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid sedangkan jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid.

3.5.10 Pemisahan Komponen Aktif dengan Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)

Identifikasi KLT analitik dilakukan dengan menggunakan plat silika gel dengan ukuran 60 mesh dan mampu berfluorosensi di bawah lampu UV pada

panjang gelombang 366 nm (silika G 60 F₂₅₄) (Merck) yang telah diaktifkan selama 30 menit dengan oven pada suhu 60 – 80 °C. Plat dipotong dengan ukuran 1 cm x 10 cm. Selanjutnya ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* ditotolkan pada jarak 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler, kemudian dikeringkan dan dielusi dengan masing-masing fase gerak golongan senyawanya. Setelah gerakan larutan pengembang sampai pada garis batas (\pm 1 cm dari tepi atas plat), maka elusi dihentikan. Noda-noda pada permukaan plat diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm kemudian diamati noda yang dihasilkan pada plat KLT.

Pengembang dan reagen penguji golongan senyawa steroid adalah eluen campuran n-heksana:aseton (3,5:1,5) (Syamsudin, dkk., 2010), n-heksana: etil asetat (4,5:0,5), n-heksana:etil asetat (4:1), n-heksana:etil asetat (3:2), n-heksana:etil asetat (3,5:1,5) (Hayati, 2012) dengan penampak noda Liebermann-Buchard akan terbentuk noda berwarna hijau terang, hijau kekuningan, hijau kecokelatan, hijau kebiruan, hijau kehitaman, pink, dan ungu yang tengahnya berwarna hijau kebiruan.

3.5.11 Analisis Data

Data yang diperoleh dibuat dalam bentuk tabel dan grafik kemudian dideskripsikan hasilnya. Tingkat toksisitas larva udang *Artemia salina* Leach dapat diketahui melalui analisa data menggunakan analisis probit dengan program MINITAB 16 yang memiliki selang kepercayaan 95 %.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Taksonomi

Mikroalga merupakan tumbuhan yang berukuran renik, sehingga bentuk dan ukuran selnya tidak dapat dilihat dengan mata telanjang. Uji taksonomi dilakukan untuk memastikan jenis mikroalga yang akan digunakan dalam penelitian ini. Hasil uji taksonomi mikroalga *Chlorella sp.* ditunjukkan pada Lampiran 9. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa mikroalga yang digunakan pada penelitian ini adalah benar-benar mikroalga *Chlorella sp.* dengan ciri-ciri selnya berbentuk bulat dan berwarna hijau. Mikroalga *Chlorella sp.* merupakan salah satu jenis mikroalga air tawar yang termasuk divisi *Chlorophyta* (alga hijau).



Gambar 4.1 Mikroalga *Chlorella sp.* uji taksonomi (Amaliyah, 2013)

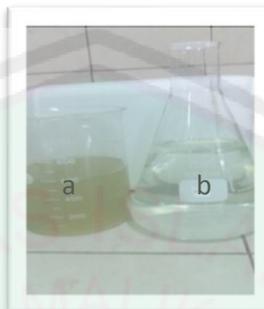
Keterangan: (a) Perbesaran 10 x
(b) Perbesaran 100 x

4.2 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

4.2.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)

Medium ekstrak tauge yang digunakan pada penelitian ini adalah medium ekstrak tauge dengan konsentrasi 4 %. Ekstrak tauge hasil rebusan yang diperoleh yaitu berupa air rebusan yang berwarna keruh dan agak kental. Sementara itu, setelah dilakukan pengenceran ekstrak dengan konsentrasi 4 %, diperoleh ekstrak

yang lebih bening. Perbandingan warna ekstrak sebelum dan setelah dilakukan pengenceran ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Ekstrak taube sebelum dan setelah pengenceran
a. Ekstrak hasil perebusan sebelum pengenceran
b. Ekstrak hasil pengenceran dengan konsentrasi 4 %

Media kultur merupakan salah satu faktor penting yang berpengaruh pada pertumbuhan mikroalga. Mikroalga *Chlorella sp.* tumbuh dan berkembang pada media yang mengandung cukup unsur hara yang dibutuhkan pada pertumbuhannya. Pada penelitian ini digunakan medium ekstrak taube (MET) sebagai media kultur mikroalga *Chlorella sp.* Medium ini berbahan dasar taube kacang hijau (kecambah) yang sangat mudah ditemukan di masyarakat serta tidak memberikan efek toksik pada penggunaannya. Medium ekstrak taube (MET) mengandung senyawa organik, anorganik dan beberapa vitamin yang dibutuhkan bagi pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.*, misalnya sebagai komponen penyusun sel, sebagai kofaktor enzim maupun komponen pembentuk klorofil serta membantu mengaktifkan fotosintesis pada mikroalga (Wulandari, dkk., 2010).

Beberapa penelitian telah menyebutkan efektivitas penggunaan medium ekstrak taube sebagai media pertumbuhan bagi mikroalga. Wulandari, dkk.,

(2010) melakukan penelitian dengan membandingkan penggunaan MET 4 % dengan medium air laut (MAL) dan medium *Guillard* (MG). Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa penggunaan medium ekstrak tauge 4 % menghasilkan pertumbuhan mikroalga yang sangat pesat dibandingkan dengan medium lainnya. Prihantini, dkk., (2007) juga melakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh beberapa konsentrasi MET terhadap kerapatan sel mikroalga marga *Scenedesmus*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kerapatan sel tertinggi (3.981.071 sel/mL) terjadi dalam media perlakuan MET 4 %. Pada konsentrasi 4 %, kelengkapan nutrisi mendukung pertumbuhan sel mikroalga.

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

Kultivasi merupakan suatu tahapan yang bertujuan untuk menumbuhkan mikroalga *Chlorella sp.* pada media yang cocok. Hasil penelitian menunjukkan bahwasanya terdapat perubahan warna pada inokulum setiap harinya. Pada hari pertama kultivasi, warna inokulum adalah kuning kehijauan, kemudian beberapa hari kultivasi, warna yang dihasilkan cenderung lebih pekat (hijau pekat) dan menghasilkan endapan. Hal ini berarti bahwa mikroalga *Chlorella sp.* dapat beradaptasi dan tumbuh pada MET sehingga kepadatan sel mikroalga *Chlorella sp.* semakin besar. Richmond (1988) menyebutkan bahwa pertumbuhan mikroalga dalam kultur dapat ditandai dengan bertambah besarnya ukuran sel atau bertambahnya jumlah sel. Pertumbuhan ini dapat dilihat dari semakin meningkatnya tingkat kepadatan sel pada kultur yang ditandai dengan bertambah pekatnya warna hijau kultur pada media. Prihantini, dkk., (2007) menyatakan

bahwa gradiasi warna hijau kultur selain menunjukkan peningkatan jumlah sel, juga mengindikasikan kadar klorofil dalam sel. Warna kultur utama mikroalga *Chlorella sp.* merupakan warna pigmen utama yang terdapat dalam sitoplasma sel yaitu klorofil. Perubahan warna kultur mikroalga selama kultivasi ditunjukkan pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Perubahan warna kultur mikroalga *Chlorella sp.*

Terdapat beberapa faktor yang perlu diperhatikan dalam pengkultivasian mikroalga *Chlorella sp.*, diantaranya adalah ketersediaan unsur-unsur hara, cahaya, suhu, dan pH. Tauge merupakan media alami yang mengandung unsur-unsur yang digunakan dalam proses pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* Medium ekstrak tauge (MET) mengandung nutrisi organik, anorganik, dan beberapa vitamin. Nutrien organik yang terkandung dalam MET adalah karbohidrat, protein dan lemak, dimana ketiga nutrisi ini dibutuhkan mikroalga *Chlorella sp.* sebagai sumber energi. Pada Siklus Krebs, ketiga nutrisi ini akan menghasilkan energi dalam bentuk ATP yang dapat digunakan untuk pertumbuhan dan pembelahan sel mikroalga *Chlorella sp.* (Prihantini, dkk., 2007).

Wulandari, dkk., (2010) menyebutkan bahwa medium ekstrak tauge mengandung nutrisi anorganik yang terdiri atas makronutrien dan mikronutrien. Nutrien anorganik yang tergolong makronutrien yaitu K, P, Ca, Mg, Na, Fe, Zn, Mn, dan Cu. Komponen nutrisi ini dibutuhkan mikroalga *Chlorella sp.* sebagai

komponen penyusun sel. Mikronutrien seperti Fe, Zn, Mn, dan Cu dibutuhkan mikroalga *Chlorella sp.* sebagai kofaktor enzim dan komponen pembentuk klorofil. Medium ekstrak tauge (MET) juga mengandung beberapa vitamin yang berfungsi sebagai *grow factor* dalam pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* yaitu tiamin, riboflavin, piridoksin, niasin, triptofan, asam pantotenat, folasin, vitamin C dan K). Tiamin berfungsi dalam reaksi α -dekarboksilasi dan transketolase; kobalamin berfungsi untuk sintesis deoksiribosa; biotin berfungsi dalam sintesis asam lemak, β -dekarboksilasi dan fiksasi karbondioksida.

Menurut Utami, dkk., (2012) cahaya diperlukan dalam proses fotosintesis sebagai sumber energi karena fotosintesis terdiri atas reaksi terang dan reaksi gelap (fotoperiod). Dalam fotoperiod diketahui bahwa yang terpenting bukanlah intensitas cahaya melainkan lama ada cahaya (lama pencahayaan). Semakin lama penyinaran yang diberikan semakin tinggi jumlah sel pada puncak-puncak populasi sampai lama penyinaran 16 jam dan ketika lama penyinaran bertambah akhirnya terjadi penurunan jumlah sel. Pencahayaan yang berlebih akan menghambat pembelahan sel.

Gunawan (2012) menyatakan bahwa derajat keasaman (pH) berpengaruh terhadap kelarutan dan ketersediaan ion mineral sehingga mempengaruhi penyerapan nutrisi oleh sel. Perubahan nilai pH yang signifikan dapat mempengaruhi kerja enzim dan menghambat proses fotosintesis dan pertumbuhan mikroalga. Hasil penelitian Gunawan (2012) menunjukkan bahwa pH yang sesuai untuk pertumbuhan mikroalga kelas *Chlorophyta* adalah pada pH 7. Pada lingkungan netral, CO₂ berada dalam bentuk bebas sehingga dapat berdifusi

dengan mudah ke dalam sel mikroalga. Hal tersebut menyebabkan CO₂ sebagai sumber karbon utama bagi proses fotosintesis mikroalga cukup tersedia sehingga proses metabolisme dapat berlangsung dengan cepat dan kerapatan sel meningkat.

4.2.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Pemanenan mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan pada hari ke-10. Pemanenan dilakukan dengan cara mikroalga *Chlorella sp.* yang telah diendapkan disentrifius dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Sentrifius merupakan alat yang digunakan untuk memisahkan biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dengan filtratnya dengan menggunakan kecepatan yang tinggi sehingga biomassa mikroalga *Chlorella sp.* yang memiliki berat lebih besar akan berkumpul di dasar tabung sentrifius.

Pemanenan mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan pada hari ke-10 didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Khamidah (2013) yang menyebutkan bahwa kurva pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* dalam MET menunjukkan fase stasioner yang dimulai pada hari ke-8 sampai hari ke-11 yang ditandai dengan kelimpahan sel mikroalga *Chlorella sp.* yang cenderung tidak bertambah dan mulai mengalami penurunan. Pada hari ke-10 mikroalga *Chlorella sp.* menunjukkan kelimpahan sel yang tertinggi. Hal ini menunjukkan bahwa pada fase stasioner, sel mikroalga *Chlorella sp.* sudah tidak mengalami pembelahan sel karena berkurangnya nutrisi dalam labu kultur.

Fase stasioner merupakan fase dimana sel mikroalga *Chlorella sp.* mulai membentuk senyawa metabolit sekunder. Menurut Nofiani (2008), metabolit

sekunder merupakan senyawa sampingan yang dihasilkan oleh tumbuhan. Metabolit sekunder tidak digunakan untuk pertumbuhan dan dibentuk dari metabolit primer pada kondisi stress. Senyawa metabolit sekunder digunakan untuk pertahanan hidup bagi penghasilnya. Kehabisan nutrisi dalam medium serta penurunan kecepatan pertumbuhan merupakan faktor pemicu terbentuknya metabolit sekunder.

Hasil pemanenan diperoleh biomassa mikroalga *Chlorella sp.* yang berwarna hijau pekat yang masih mengandung air. Berat basah mikroalga *Chlorella sp.* yang diperoleh yaitu sebesar 244,8828 gram. Hasil pemisahan biomassa mikroalga *Chlorella sp.* ditunjukkan pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 Biomassa mikroalga *Chlorella sp.*

4.3 Preparasi Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Preparasi biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan cara dikeringanginkan menggunakan kipas angin sampai biomassa mikroalga *Chlorella sp.* kering yaitu selama ± 2 hari. Preparasi ini bertujuan untuk mengurangi kadar air yang terkandung dalam biomassa mikroalga *Chlorella sp.* Hal ini dilakukan untuk memudahkan pengekstrakan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam biomassa mikroalga *Chlorella sp.* Setelah kering, biomassa mikroalga *Chlorella sp.* kemudian dikerok.

Pengeringan merupakan salah satu proses yang dapat mempengaruhi kualitas dari senyawa aktif yang terkandung dalam suatu simplisia terutama kandungan senyawa metabolit sekunder. Pengeringan pada suhu yang tinggi akan merusak komposisi bahan aktif seperti terjadinya oksidasi senyawa aktif, akan tetapi pada suhu rendah akan meningkatkan jumlah mikroba yang berakibat kerusakan sampel yang akan digunakan. Winarno (2002) menyebutkan bahwasanya sampel dengan kadar air 36,10 % rentan terhadap pertumbuhan mikroba.

Keragaman struktur kimia senyawa metabolit sekunder sangat luas meliputi senyawa alifatik, heterosiklik dengan atom oksigen, nitrogen, senyawa jenuh dan tak jenuh dengan berbagai macam gugus fungsional seperti hidroksil, dimana senyawa-senyawa tersebut cenderung rentan terhadap suhu tinggi (Hernani dan Nurdjanah, 2009). Senyawa metabolit sekunder cenderung rusak pada suhu 60 °C. Rendemen biomassa mikroalga *Chlorella sp.* setelah dilakukan pengeringan adalah sebesar 2,33 %.

4.4 Analisis Kadar Air Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Analisis kadar air bertujuan untuk mengetahui kadar air yang terkandung dalam suatu bahan. Prinsip analisis kadar air yaitu penghilangan kadar air yang terkandung dalam suatu sampel dengan cara sampel dipanaskan menggunakan oven pada suhu 100 – 105 °C. Pemanasan dilakukan hingga berat sampel konstan. Selisih berat sampel sebelum dan sesudah pemanasan menunjukkan banyaknya air yang teruapkan.

Penentuan kadar air sangat penting karena jumlah kadar air yang terkandung dalam suatu sampel akan berpengaruh pada stabilitas dan kualitas sampel. Kandungan air dalam sampel akan mempengaruhi proses ekstraksi senyawa aktif. Semakin rendah kadar air dalam suatu sampel, maka pelarut akan semakin mudah untuk mengekstrak senyawa aktif dalam sampel sehingga rendemen yang dihasilkan akan semakin banyak. Menurut Sulistijowati (2001), kadar air yang baik untuk keberhasilan proses ekstraksi adalah sebesar 11 %. Kadar air yang tinggi pada sampel juga akan berpengaruh terhadap daya simpan sampel. Puspita (2009) menyebutkan bahwa apabila kandungan air dalam suatu sampel kurang dari 10 %, maka kestabilan optimum akan tercapai dan pertumbuhan mikroba akan dapat dikurangi. Sampel dengan kadar air yang tinggi akan mudah ditumbuhi mikroba, karena mikroba rentan tumbuh pada sampel yang memiliki kelembaban yang tinggi.

Berdasarkan hasil pengukuran kadar air terhadap sampel mikroalga *Chlorella sp.* kering, diperoleh kadar air sebesar 7,68 %. Hasil ini menunjukkan bahwa kadar air sampel telah mencukupi untuk dilakukan proses ekstraksi. Proses pengeringan dengan menggunakan kipas angin telah efisien untuk menurunkan kadar air dalam sampel mikroalga *Chlorella sp.* Hasil penelitian Amaliyah (2013) menyebutkan bahwa kadar air mikroalga *Chlorella sp.* adalah sebesar 10,899 %. Perbedaan hasil kadar air yang diperoleh dapat disebabkan karena perbedaan lama pengeringan sampel mikroalga *Chlorella sp.* Semakin lama proses pengeringan sampel, maka kandungan air dalam sampel akan semakin rendah. Pada penelitian ini, pengeringan sampel mikroalga *Chlorella sp.* selama 2 hari telah efisien dalam

menurunkan kadar air sampel mikroalga *Chlorella sp.* sedangkan pada penelitian Amaliyah (2013) pengeringan hanya dilakukan selama 12 jam.

4.5 Ekstraksi Komponen Aktif Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstraksi merupakan pemisahan suatu senyawa berdasarkan tingkat kelarutannya pada dua pelarut yang tidak saling melarutkan. Ekstraksi komponen aktif mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi. Prinsip utama dari metode ekstraksi maserasi adalah pengekstrakan senyawa aktif yang dapat larut pada pelarut yang sesuai dengan tingkat kepolarannya. Metode ini didasarkan pada perendaman ekstrak dengan pelarut yang cocok pada suhu ruang. Maserasi dipilih sebagai metode ekstraksi mikroalga *Chlorella sp.* karena ekstraksi maserasi tidak menggunakan suhu tinggi/pemanasan sehingga tidak merusak komponen-komponen aktif dalam sel mikroalga *Chlorella sp.* Selain itu, metode ekstraksi maserasi juga menggunakan alat-alat yang sangat sederhana sehingga memudahkan dalam proses ekstraksi.

Komponen bioaktif mikroalga *Chlorella sp.* diekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut metanol dengan perbandingan 1:10. Pemilihan pelarut dalam proses ekstraksi maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi terhadap kelarutan senyawa yang akan diekstrak. Menurut Khopkar (2003) suatu senyawa akan larut pada pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang sama dengan senyawa tersebut. Pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan pelarut non polar akan melarutkan senyawa non polar (*like dissolves like*). Di alam, senyawa metabolit sekunder berada dalam bentuk ikatan glikosida yaitu senyawa metabolit

sekunder terikat pada gugus gula sehingga cenderung bersifat polar. Metanol merupakan pelarut organik yang bersifat polar sehingga dapat mengekstrak senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam sel mikroalga *Chlorella sp.* Pelarut metanol akan menembus dinding sel mikroalga *Chlorella sp.* kemudian masuk ke dalam sitoplasma sel yang mengandung senyawa-senyawa metabolit sekunder. Adanya perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel mengakibatkan senyawa metabolit sekunder akan terekstrak oleh pelarut metanol.

Pemilihan pelarut metanol sebagai pelarut untuk mengekstrak komponen aktif mikroalga *Chlorella sp.* didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Yudha (2008) yaitu pelarut metanol menghasilkan rendemen tertinggi (2,59 %) dalam mengekstrak senyawa metabolit sekunder dalam sel mikroalga *Dunaliella sp.* dibandingkan dengan menggunakan pelarut etil asetat (4,54 %) dan n-heksana (1,81 %). Hal ini diperkuat pula oleh penelitian yang dilakukan oleh Amaliyah (2013) yang mengekstrak senyawa metabolit sekunder pada mikroalga *Chlorella sp.* dengan menggunakan variasi pelarut yaitu metanol, etil asetat dan n-heksana. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstraksi dengan pelarut metanol menunjukkan nilai rendemen yang paling tinggi (7,001 %) dibandingkan dengan pelarut etil asetat (3,673 %) dan n-heksana (0,004 %).

Proses ekstraksi maserasi dilakukan dengan penggantian pelarut setiap harinya. Proses ekstraksi dihentikan apabila warna filtrat yang dihasilkan sudah mengalami perubahan yaitu warna filtrat menjadi lebih bening. Hal ini diasumsikan bahwa senyawa aktif dalam sel mikroalga *Chlorella sp.* telah terekstrak oleh pelarut metanol secara maksimal. Pada proses ekstraksi maserasi,

ekstrak dishaker selama 5 jam dengan kecepatan 120 rpm. Hal ini bertujuan untuk memaksimalkan kontak antara ekstrak dengan pelarut sehingga mempermudah masuknya pelarut ke dalam dinding sel dan meratakan pelarut agar menyentuh seluruh bagian mikroalga *Chlorella sp.* Perendaman ekstrak dilakukan selama 24 jam. Semakin lama waktu perendaman, maka kontak antara pelarut dengan ekstrak akan semakin besar sehingga senyawa yang terekstrak akan lebih banyak.

Filtrat yang dihasilkan pada proses maserasi dipisahkan dengan menggunakan corong *buchner*. Prinsip penyaringan dengan corong *buchner* adalah suatu metode penyaringan secara mekanis berdasarkan ukuran molekul, sehingga molekul-molekul yang berukuran lebih besar akan tertahan pada media filter (kertas saring) dengan adanya bantuan penyedotan udara pada pompa *buchner*. Filtrat hasil penyaringan berwarna hijau pekat. Filtrat hasil penyaringan diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *rotary evaporator vacum* untuk mendapatkan ekstrak pekat mikroalga *Chlorella sp.* Prinsip utama *rotary evaporator vacum* adalah penurunan tekanan dengan dipercepatnya putaran pada labu alas bulat dan adanya proses pemanasan sehingga pelarut dapat menguap 5 – 10 °C di bawah titik didihnya. Penguapan pelarut dihentikan ketika tidak ada lagi pelarut yang menetes pada *receiving part* dengan asumsi bahwa ekstrak pada labu alas bulat sudah tidak mengandung pelarut. Ekstrak pekat yang dihasilkan berwarna hijau pekat. Ekstrak pekat dialiri gas N₂ untuk menghilangkan sisa-sisa pelarut yang mungkin masih menempel ketika proses *rotary evaporator vacum*. Pengaliran gas N₂ dihentikan ketika berat ekstrak telah konstan dengan asumsi

bahwa pelarut telah teruapkan secara maksimal. Hasil ekstraksi ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Nilai rendemen ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* pada penelitian ini cukup besar yaitu 13,37 %. Menurut Lenny (2006) metanol merupakan pelarut organik yang biasanya digunakan untuk mengekstraksi senyawa bahan alam. Adanya ikatan glikosida yang mengandung banyak gugus –OH pada senyawa organik menyebabkan senyawa tersebut cenderung lebih bersifat polar sehingga pada proses ekstraksi, senyawa-senyawa organik seperti senyawa metabolit sekunder lebih terekstrak ke pelarut yang bersifat polar seperti metanol. Hasil penelitian Amaliyah (2013) menyebutkan bahwa nilai rendemen ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* adalah sebesar 7,001 %. Perbedaan yang cukup besar ini dapat disebabkan karena perbedaan kadar air yang terkandung dalam sampel. Pada penelitian Amaliyah (2013) air yang dihasilkan sebesar 10,899 % sedangkan pada penelitian ini kadar air yang dihasilkan sebesar 7,68 %. Banyaknya kandungan air pada sampel akan berpengaruh pada proses ekstraksi. Kadar air yang terlalu tinggi akan menghalangi masuknya pelarut ke dalam dinding sel. Menurut Harborne (1987) pelarut metanol akan berikatan hidrogen dengan air yang terdapat pada sampel, sehingga kandungan air dalam sampel juga ikut terekstrak.

Tabel 4.1 Hasil maserasi ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.*

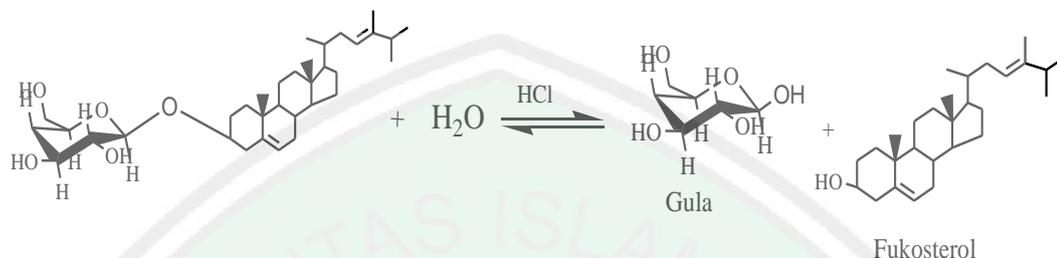
Pelarut	Perubahan Warna Filtrat	Warna Ekstrak pekat	Rendemen Ekstrak (%)
Metanol	Hijau pekat sampai hijau bening	Hijau pekat	13,37

4.6 Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

Senyawa organik dalam tanaman umumnya terdapat dalam bentuk ikatan glikosida yaitu senyawa yang terdiri atas gabungan dua bagian senyawa yaitu gugus gula dan gugus bukan gula. Kedua senyawa ini dihubungkan oleh suatu bentuk ikatan berupa jembatan oksigen. Gugus gula disebut dengan glikon sedangkan gugus bukan gula disebut dengan aglikon. Senyawa metabolit sekunder terikat pada gugus aglikon. Saifuddin, dkk., (2006) menyebutkan bahwa ikatan glikosida dapat diputus dengan reaksi hidrolisis menggunakan katalis asam. Hidrolisis merupakan pemecahan suatu senyawa menggunakan air.

Hidrolisis senyawa aktif ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan mencampurkan ekstrak dengan larutan HCl 2 N (1:2) kemudian dinetralkan dengan menggunakan larutan natrium bikarbonat. Tujuan penambahan HCl 2 N adalah sebagai katalis untuk mempercepat reaksi pemutusan ikatan glikosida. Pemilihan asam klorida (HCl) sebagai katalis didasarkan bahwa garam yang dihasilkan setelah penetralan tidak mengganggu proses reaksi yaitu berupa NaCl. Handoko (2012) menyebutkan bahwa pemilihan asam kuat seperti HCl sebagai katalis disebabkan karena asam kuat akan lebih mudah melepas proton (H^+) secara sempurna di dalam air, sedangkan asam lemah relatif lebih sukar sehingga asam lemah memiliki kecenderungan terionisasi sebagian dalam pelepasan ion H^+ . Semakin banyak proton yang terionisasi dalam air, maka semakin kuat peranan proton dalam pemutusan ikatan glikosida. Sementara itu, penambahan natrium bikarbonat adalah untuk menetralkan suasana larutan yang menjadi asam setelah adanya penambahan HCl. Adapun reaksi pemutusan ikatan

glikosida ketika penambahan HCl dan penetralan dengan natrium bikarbonat ditunjukkan pada Gambar 4.5 dan Persamaan 4.1.



Gambar 4.5 Reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida



Persamaan 4.1 Reaksi antara HCl dengan NaHCO₃

4.7 Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

Partisi atau ekstraksi cair-cair merupakan tahap untuk memisahkan metabolit sekunder yang telah terlepas ikatannya dari gugus gula. Prinsip dari ekstraksi cair-cair adalah untuk memisahkan suatu senyawa berdasarkan distribusi komponen target pada dua pelarut yang tidak saling bercampur. Sebagian komponen akan larut pada fase pertama dan sebagian akan larut pada fase kedua.

Partisi komponen aktif ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan menggunakan variasi pelarut yaitu n-heksana, petroleum eter, kloroform dan etil asetat. Senyawa metabolit sekunder dapat bersifat polar, semipolar maupun non polar sehingga pengestrakan senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan variasi pelarut. Petroleum eter dan n-heksana merupakan pelarut organik yang bersifat non polar, kloroform bersifat semipolar dan etil asetat bersifat

semipolar. Masing-masing pelarut akan melarutkan senyawa metabolit sekunder yang memiliki kepolaran yang sama dengan kepolarannya.

Partisi senyawa metabolit sekunder dilakukan dengan cara partisi bertingkat dimulai dari pelarut dengan tingkat kepolaran rendah ke pelarut dengan tingkat kepolaran yang tinggi, secara berturut-turut pelarut n-heksana, petroleum eter, kloroform dan etil asetat. Berdasarkan hasil penelitian, pada pengekstrakan dengan masing-masing pelarut dihasilkan dua lapisan yang tidak saling bercampur. Partisi dengan pelarut n-heksana dihasilkan dua lapisan yang tidak saling bercampur, dimana lapisan atas berwarna hijau pekat sedangkan lapisan bawah berwarna hijau dan terdapat gumpalan-gumpalan. Lapisan atas merupakan fase organik sedangkan lapisan bawah merupakan fase air. Pelarut n-heksana dan komponen yang terlarut pada pelarut n-heksana terdistribusi ke fase organik sedangkan fase air berisi sisa-sisa pelarut metanol yang kemungkinan masih tersisa pada ekstrak dan garam serta air yang dihasilkan pada proses hidrolisis senyawa metabolit sekunder. Fraksi n-heksana (fase organik) berada pada lapisan atas karena berat jenis n-heksana (0,655 g/mL) lebih kecil dibandingkan berat jenis air (1 g/mL).

Sementara itu, pengekstrakan dengan menggunakan pelarut petroleum eter juga dihasilkan dua lapisan yang tidak saling bercampur. Lapisan atas berwarna hijau pekat dan terdapat gumpalan-gumpalan sedangkan lapisan bawah berwarna hijau. Lapisan atas merupakan fase organik, dimana pelarut petroleum eter dan komponen-komponen yang terlarut pada pelarut petroleum eter terdistribusi pada fase ini. Sementara itu lapisan bawah merupakan fase air yang berisi sisa-sisa

pelarut metanol yang kemungkinan masih tersisa pada ekstrak dan garam serta air yang dihasilkan pada proses hidrolisis senyawa metabolit sekunder. Fraksi petroleum eter (fase organik) berada pada lapisan atas karena berat jenis petroleum eter (0,77 g/mL) lebih kecil dibandingkan berat jenis air (1 g/mL).

Pengekstrakan dengan menggunakan pelarut kloroform juga menghasilkan dua lapisan yang tidak saling bercampur yaitu lapisan atas dan lapisan bawah. Lapisan atas berwarna hijau sedangkan lapisan bawah berwarna hijau pucat. Lapisan atas merupakan fase air sedangkan lapisan bawah merupakan fase organik. Pelarut kloroform dan komponen-komponen yang terlarut pada pelarut kloroform terdistribusi pada fase organik yang terletak pada lapisan bawah sedangkan lapisan atas merupakan fase air yang berisi sisa-sisa pelarut metanol yang kemungkinan masih tersisa pada ekstrak dan garam serta air yang dihasilkan pada proses hidrolisis senyawa metabolit sekunder. Fraksi kloroform (fase organik) berada pada lapisan bawah karena berat jenis kloroform (1,498 g/mL) lebih besar dibandingkan berat jenis air (1 g/mL).

Pengekstrakan dengan menggunakan pelarut etil asetat juga menghasilkan dua lapisan yang tidak saling bercampur yaitu lapisan atas dan lapisan bawah. Lapisan atas merupakan lapisan organik yang berisi pelarut etil asetat dan komponen-komponen yang terlarut pada pelarut etil asetat, sedangkan lapisan bawah merupakan fase air yang berisi sisa-sisa pelarut metanol yang kemungkinan masih tersisa pada ekstrak dan garam serta air yang dihasilkan pada proses hidrolisis senyawa metabolit sekunder. Lapisan atas berwarna hijau pucat sedangkan lapisan bawah berwarna bening. Fraksi etil asetat (fase organik) berada

pada lapisan atas karena berat jenis etil asetat (0,894 g/mL) lebih kecil dibandingkan berat jenis air (1 g/mL).

Pembentukan dua lapisan yang tidak saling larut pada masing-masing pelarut disebabkan karena adanya perbedaan kepolaran. Air yang dihasilkan pada proses hidrolisis memiliki kepolaran yang lebih besar dibandingkan dengan pelarut n-heksana, petroleum eter, kloroform dan etil asetat. Sudarmadji, dkk., (2003) menyatakan bahwa kepolaran suatu pelarut menunjukkan tingkat kelarutannya terhadap suatu bahan. Tingkat kepolaran ditunjukkan oleh nilai konstanta dielektrik. Semakin besar nilai konstanta dielektrik maka pelarut tersebut semakin bersifat polar. Konstanta dielektrik air yaitu sebesar 80; n-heksana sebesar 1,9; petroleum eter sebesar 2,28; kloroform sebesar 4,8; dan etil asetat sebesar 6. Perbedaan konstanta dielektrik yang cukup jauh antara air dengan masing-masing pelarut mengakibatkan pelarut-pelarut tersebut tidak dapat saling bercampur dengan air sehingga terbentuk dua lapisan.

Masing-masing fraksi pelarut (n-heksana, petroleum eter, kloroform dan etil asetat) diuapkan pelarutnya dengan cara diangin-anginkan dalam lemari asam untuk mendapatkan ekstrak pekat. Ekstrak pekat yang diperoleh dialiri gas N₂ sampai berat ekstrak konstan. Hasil rendemen masing-masing ekstrak ditunjukkan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil ekstraksi partisi dan rendemen masing-masing fraksi

Pelarut	Warna filtrat	Warna ekstrak pekat	Rendemen (%)
n-heksana	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman	32,7809
Petroleum eter	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman	12,0582
Kloroform	Hijau	Hijau kehitaman	9,3531
Etil asetat	Hijau	Hijau kehitaman	8,1952
Fasa air	Hijau Pucat	Hijau pucat	9,8522

Berdasarkan hasil penelitian, nilai rendemen ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* fraksi n-heksana dan petroleum eter cenderung lebih besar dibandingkan dengan fraksi lainnya. Diduga senyawa metabolit sekunder dalam mikroalga *Chlorella sp.* lebih bersifat non polar. Haryadi (2012) menyebutkan bahwa berdasarkan hasil uji fitokimia, terlihat senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar seperti steroid akan terekstrak ke dalam pelarut yang bersifat non polar seperti n-heksana dan petroleum eter. Senyawa triterpenoid juga cenderung tertarik ke pelarut yang bersifat nonpolar walaupun masih bisa terekstrak oleh pelarut polar. Banyaknya senyawa aktif yang terekstrak diharapkan berkorelasi positif terhadap aktivitas farmakologi yang ditimbulkan oleh ekstrak mikroalga *Chlorella sp.*

4.8 Uji Toksisitas Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.* Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

Pengujian toksisitas ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* dimulai dengan penetasan telur hewan uji *Artemia salina* Leach. Telur *Artemia salina* Leach dinetaskan dalam air laut selama 48 jam. Selama penetasan, wadah diberi aerator yang bertujuan untuk memberikan oksigen yang cukup bagi kelangsungan hidup *Artemia salina* Leach sehingga jika terdapat *Artemia salina* Leach yang mati, hal tersebut bukan disebabkan karena kekurangan oksigen. Selain itu, wadah yang digunakan sebagian ditutupi aluminium foil sehingga wadah terdiri atas dua bagian yaitu bagian gelap dan bagian terang yang dipisahkan oleh sekat yang berlubang (kawat kasa). Larva yang aktif akan bergerak dari tempat yang gelap ke tempat yang terang.

Bagian larva yang digunakan dalam penelitian ini adalah larva *Artemia salina* Leach yang berumur 48 jam karena pada fase tersebut organ-organ *Artemia salina* Leach sudah terbentuk lengkap. Dengan terbentuknya mulut, *Artemia salina* Leach dapat meminum air laut yang berisi ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* dengan berbagai konsentrasi sehingga dapat menyebabkan kematian pada *Artemia salina* Leach. Ropiqa (2009) menyebutkan bahwa pada umur 48 jam, larva *Artemia salina* Leach berada pada fase yang paling aktif membelah secara mitosis yang identik dengan sel kanker yang juga membelah secara mitosis sehingga dapat digunakan sebagai hewan uji pada umur tersebut.

Toksisitas merupakan kemampuan suatu senyawa yang dapat menimbulkan kerusakan pada organisme lain. Uji toksisitas merupakan uji pendahuluan yang bertujuan untuk mengetahui bioaktivitas dari suatu senyawa. Pada penelitian ini, uji toksisitas ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan menggunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Uji toksisitas dengan metode BSLT merupakan uji toksisitas akut dimana efek toksik dari suatu senyawa ditentukan dalam waktu singkat, yaitu selama 24 jam setelah pemberian dosis uji. Prosedurnya adalah dengan menentukan nilai LC_{50} dari aktivitas komponen aktif terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Nilai LC_{50} merupakan nilai konsentrasi suatu senyawa yang dapat mengakibatkan 50 % kematian pada hewan uji.

Mekanisme kematian larva berhubungan dengan fungsi senyawa-senyawa yang terkandung dalam selnya yang dapat menghambat daya makan larva. Cara kerja senyawa-senyawa tersebut adalah dengan bertindak sebagai *stomach*

poisoning atau racun perut. Oleh sebab itu, apabila senyawa-senyawa tersebut masuk ke dalam tubuh larva maka alat pencernaan larva akan terganggu. Di samping itu, senyawa-senyawa tersebut dapat menghambat reseptor perasa pada daerah mulut larva sehingga akan mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa sehingga larva tidak mampu mengenali makanannya, akibatnya larva akan mati kelaparan.

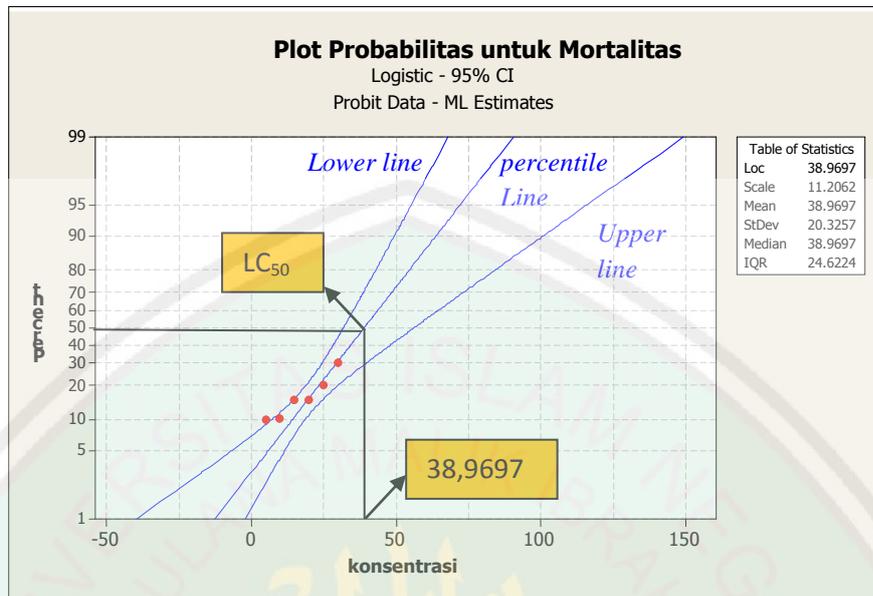
Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak metanol, fraksi etil asetat, fraksi kloroform, fraksi petroleum eter, fraksi n-heksana dan fraksi fasa air dari mikroalga *Chlorella sp.* Masing-masing ekstrak dibuat dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm. Ekstrak dipipet dengan menggunakan mikropipet kemudian dimasukkan ke dalam botol vial kemudian diuapkan pelarutnya sampai ekstrak kering. Penguapan pelarut bertujuan agar kematian larva benar-benar disebabkan oleh ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* Ekstrak yang telah kering kemudian ditambahkan DMSO. DMSO (dimetil sulfoksida) merupakan surfaktan yang berfungsi untuk melarutkan ekstrak dengan air laut sebagai media tumbuh larva udang *Artemia salina* Leach. DMSO memiliki struktur yang terdiri atas ikatan S=O yang bersifat polar dan dua alkil CH₃ yang bersifat nonpolar. Gugus polar akan melarutkan air laut sedangkan gugus nonpolar akan melarutkan ekstrak yang bersifat semipolar (fraksi etil asetat dan kloroform) dan ekstrak yang bersifat nonpolar (fraksi n-heksana dan fraksi petroleum eter).

Ekstrak yang telah dilarutkan dalam DMSO kemudian ditambahkan larutan ragi roti yang berfungsi sebagai sumber makanan. Pemberian makan berfungsi untuk memastikan kematian larva *Artemia salina* Leach bukan

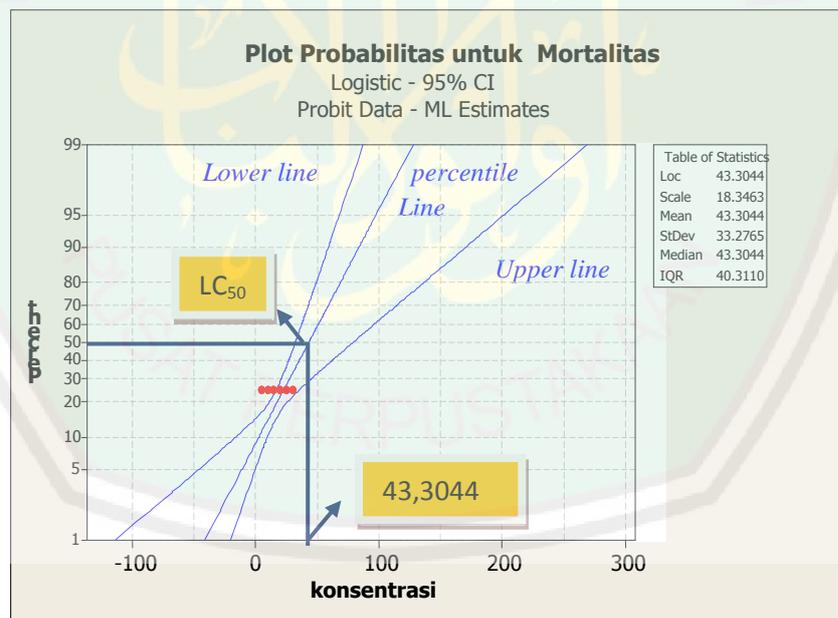
disebabkan karena kekurangan makanan. Larva udang *Artemia salina* Leach kemudian dimasukkan ke dalam botol sebanyak 10 ekor larva tiap konsentrasi ekstrak.

Pada penelitian ini dibuat larutan kontrol dari masing-masing ekstrak yang terdiri atas kontrol pelarut, kontrol air laut dan kontrol DMSO. Kontrol bertujuan untuk mengoreksi kematian larva udang *Artemia salina* Leach yang bukan disebabkan oleh pengaruh ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* Perlakuan uji sama dengan yang dilakukan pada ekstrak namun pada larutan kontrol tidak ada penambahan ekstrak sama sekali. Larutan uji kemudian didiamkan selama 24 jam.

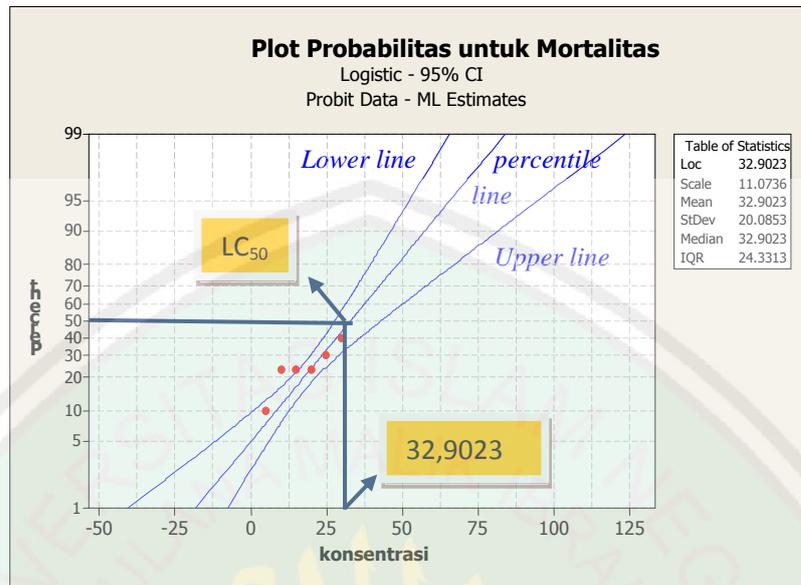
Berdasarkan hasil penelitian, pada saat awal perlakuan, *Artemia salina* Leach masih bergerak aktif pada masing-masing vial, namun setelah didiamkan selama 24 jam, mulai terlihat *Artemia salina* Leach yang mati. Kematian ini ditandai dengan tidak adanya pergerakan dan *Artemia salina* Leach tersebut berada di dasar vial. Sementara itu, *Artemia salina* Leach yang hidup terlihat masih bergerak walaupun gerakannya tidak seaktif saat awal perlakuan. Hasil pengujian ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* ditunjukkan pada Lampiran 6 dan kurva mortalitas masing-masing ekstrak ditunjukkan pada Gambar 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, dan 4.11.



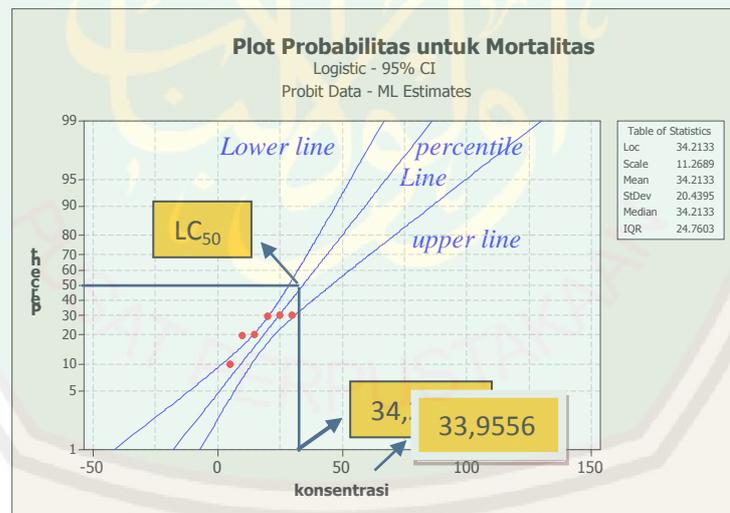
Gambar 4.6 Kurva mortalitas *Artemia salina* Leach ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* dengan nilai LC_{50} = 38,9697 ppm



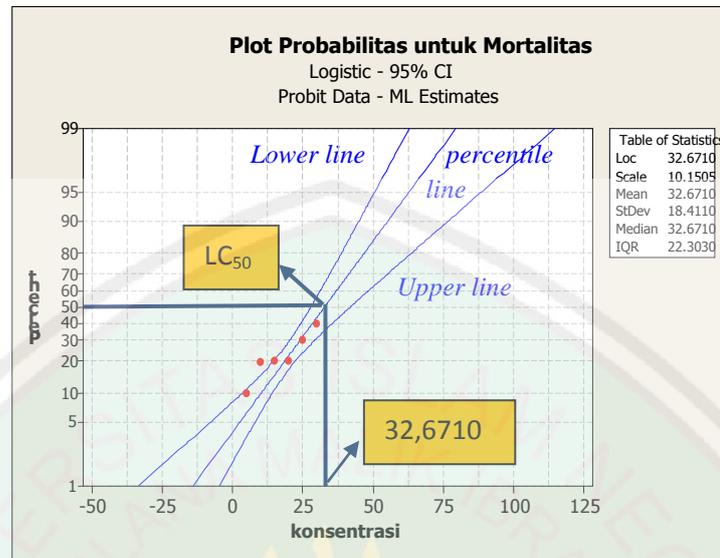
Gambar 4.7 Kurva mortalitas *Artemia salina* Leach fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* dengan nilai LC_{50} = 43,3044 ppm



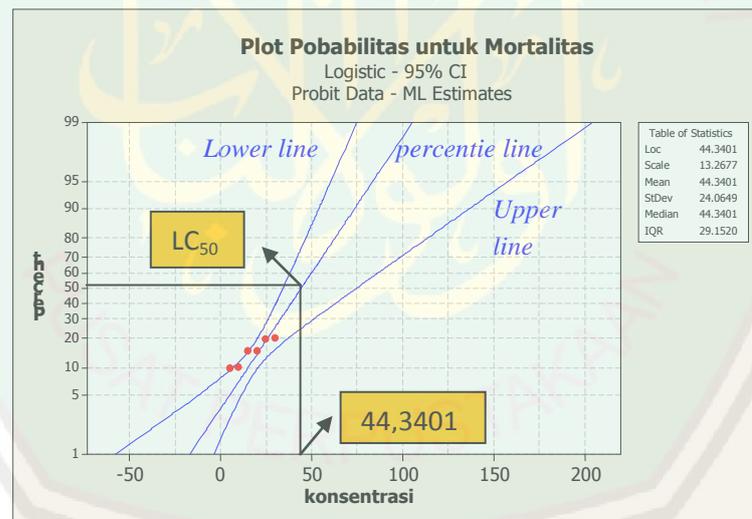
Gambar 4.8 Kurva mortalitas *Artemia salina* Leach fraksi kloroform mikroalga *Chlorella sp.* dengan nilai LC_{50} = 32,9023 ppm



Gambar 4.9 Kurva mortalitas *Artemia salina* Leach fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella sp.* dengan nilai LC_{50} = 34,2133 ppm



Gambar 4.10 Kurva mortalitas *Artemia salina* Leach fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* dengan nilai $LC_{50} = 32,6710$ ppm



Gambar 4.11 Kurva mortalitas *Artemia salina* Leach fraksi fasa air mikroalga *Chlorella sp.* dengan nilai $LC_{50} = 44,3401$ ppm

Kurva mortalitas menunjukkan hubungan antara konsentrasi ekstrak pada sumbu X dan persen mortalitas pada sumbu Y. Pada masing-masing kurva terdapat tiga garis yaitu *lower line*, *percentile line* dan *upper line*. Garis atas (*lower line*) adalah batas bawah yang menunjukkan konsentrasi terendah pada

setiap persen mortalitas. Garis tengah (*percentile line*) menunjukkan konsentrasi pada setiap persen mortalitas. *Percentile line* disebut juga garis normal karena menunjukkan ada tidaknya hubungan linear antara konsentrasi dengan persen mortalitas. Garis bawah (*upper line*) adalah batas atas konsentrasi pada setiap persen mortalitas (Nasliyana, 2013).

Kurva tersebut menunjukkan bahwa berbagai konsentrasi ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* pada percobaan ini memperlihatkan pengaruh yang berbeda terhadap kematian larva *Artemia salina* Leach. Secara umum, hasil analisis uji BSLT menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi yang diujikan, maka cenderung semakin banyak larva *Artemia salina* Leach yang mati. Hal ini sesuai dengan pernyataan Harborne (1997) bahwa semakin tinggi konsentrasi suatu ekstrak maka sifat toksiknya akan semakin tinggi. Kematian hewan uji disebabkan oleh sifat toksik dari ekstrak yang terlarut dalam media hidup hewan uji tersebut. Toksisitas hewan uji juga dipengaruhi oleh jenis ekstraknya dan komponen yang terdapat dalam ekstrak.

Berdasarkan hasil penelitian, dapat dilihat bahwasanya penggunaan 3 kontrol yaitu kontrol pelarut dari masing-masing ekstrak, kontrol DMSO dan kontrol air laut tidak menyebabkan kematian pada larva udang *Artemia salina* Leach. Hal ini menunjukkan bahwa adanya penambahan ketiga kontrol tersebut pada ekstrak tidak mempengaruhi kematian larva *Artemia salina* Leach.

LC₅₀ merupakan indikasi ketoksikan suatu bahan atau senyawa yang dapat menyebabkan 50 % kematian pada hewan uji. Semakin besar nilai LC₅₀ berarti menunjukkan toksisitasnya semakin kecil dan sebaliknya semakin kecil nilai LC₅₀

semakin besar toksisitasnya. Meyer, *et al.*, (1982) menyatakan bahwa suatu senyawa dikatakan toksik apabila memiliki nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa keenam ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Nilai LC_{50} masing-masing ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* ditunjukkan pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Nilai LC_{50} masing-masing ekstrak mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstrak	Nilai LC_{50} (ppm)
Metanol	38,9697
Etil Asetat	43,3044
Kloroform	32,9023
n-Heksana	34,2133
Petroleum Eter	32,6710
Fasa Air	44,3401

Berdasarkan Tabel 4.3, nilai LC_{50} ekstrak hasil partisi dengan menggunakan pelarut kloroform (32,9023 ppm), petroleum eter (32,6710 ppm) dan n-heksana (34,2133 ppm) cenderung lebih rendah dibandingkan dengan nilai LC_{50} ekstrak metanol (38,9697 ppm). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak hasil partisi dengan ketiga pelarut tersebut cenderung bersifat lebih toksik dibandingkan dengan ekstrak kasar (ekstrak metanol) mikroalga *Chlorella sp.* Hal ini juga menunjukkan bahwa melalui metode partisi ekstrak kasar maka akan diperoleh senyawa yang bersifat non polar dan semipolar secara lebih optimal dari ekstrak polarnya. Senyawa semipolar dan non polar ini bekerja secara sinergis sehingga dapat meningkatkan nilai toksisitas ekstrak mikroalga *Chlorella sp.*

Berdasarkan tabel nilai LC_{50} tersebut juga dapat dilihat bahwasanya nilai LC_{50} ekstrak metanol lebih rendah dibandingkan fraksi etil asetat dan fraksi fasa air yang berarti bahwa ekstrak metanol lebih bersifat toksik dibandingkan kedua

ekstrak tersebut. Hal ini sesuai dengan penelitian Amaliyah (2013) yang mengekstrak mikroalga *Chlorella sp.* dengan pelarut metanol dan pelarut etil asetat kemudian diuji toksisitasnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol lebih bersifat toksik (20,516 ppm) dibandingkan ekstrak etil asetat (167,417 ppm). Perbedaan kandungan senyawa yang larut pada masing-masing ekstrak mengakibatkan perbedaan nilai LC_{50} kedua ekstrak tersebut. Ekstrak metanol mengandung senyawa steroid dan tanin sedangkan ekstrak etil asetat mengandung senyawa tanin. Hal ini diperkuat dengan hasil uji kandungan golongan senyawa aktif mikroalga *Chlorella sp.*

4.9 Uji Kandungan Golongan Senyawa Aktif Mikroalga *Chlorella sp.*

Uji kandungan golongan senyawa aktif mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan menggunakan uji reagen (uji fitokimia). Uji fitokimia ini merupakan uji kualitatif yang bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa aktif dalam suatu ekstrak. Prinsipnya adalah reaksi pengujian warna pada ekstrak yang diuji dimana pengamatan yang dilakukan adalah adanya perubahan warna atau terbentuknya endapan pada larutan yang diuji dengan adanya penambahan reagen-reagen tertentu.

Pengujian golongan senyawa aktif mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan pada semua ekstrak yang bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Golongan senyawa aktif yang diuji adalah senyawa alkaloid, flavonoid, triterpenoid, steroid dan tanin. Hasil uji reagen pada masing-masing ekstrak ditunjukkan pada Tabel 4.4. Berdasarkan hasil uji reagen, dapat diketahui bahwa

semua ekstrak mengandung golongan senyawa steroid dimana ekstrak petroleum eter dan n-heksana mengandung senyawa yang lebih banyak yang ditunjukkan dengan intensitas warna yang lebih pekat. Selain itu, ekstrak metanol dan etil asetat mengandung senyawa golongan tanin. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Amaliyah (2013) yaitu ekstrak kasar (ekstrak metanol) mikroalga *Chlorella sp.* mengandung golongan senyawa steroid dan tanin sedangkan ekstrak etil asetat mengandung senyawa tanin. Semakin pekat warna yang dihasilkan pada hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa semakin banyak senyawa yang diekstrak dengan pelarut yang digunakan.

Tabel 4.4 Hasil uji fitokimia ekstrak mikroalga *Chlorella sp.*

Golongan Senyawa aktif	Ekstrak					
	Metanol	Etil asetat	Kloroform	n-Heksana	Petroleum eter	Fasa Air
Alkaloid						
- Mayer	-	-	-	-	-	-
- Dragendorf	-	-	-	-	-	-
Flavonoid	-	-	-	-	-	-
Tanin						
- Gelatin	++	+	-	-	-	-
- FeCl ₃		-	-	-	-	-
Steroid	+	+	+	++	++	+
Triterpenoid	-	-	-	-	-	-

Keterangan: ++ = kandungan senyawa lebih banyak (warna lebih pekat)

+ = mengandung senyawa (warna cukup pekat)

- = tidak mengandung senyawa

4.9.1 Steroid

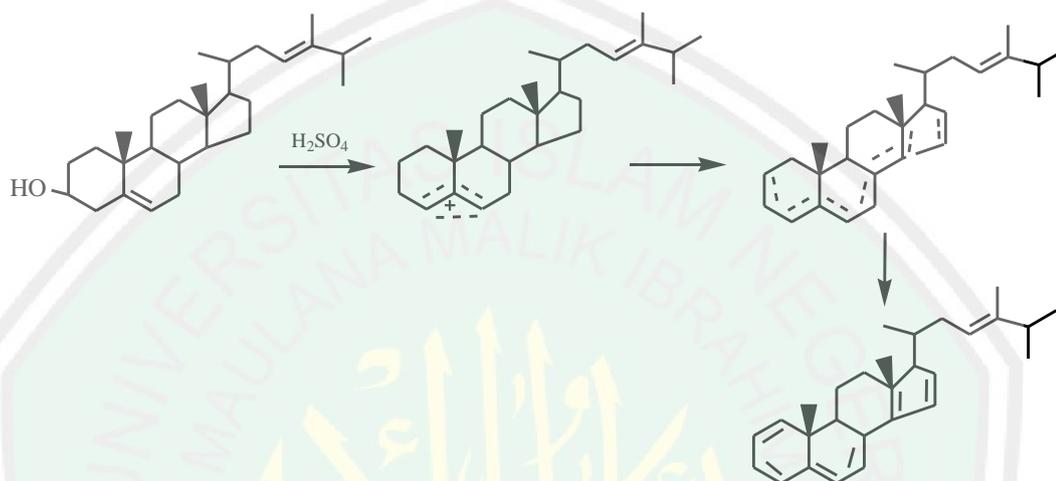
Kandungan triterpenoid dan steroid dalam ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* diuji dengan menggunakan metode Liebermann-Buchard yaitu menggunakan asam asetat anhidrat dan asam sulfat. Hasil positif ditunjukkan oleh steroid

apabila pada larutan uji terjadi perubahan warna larutan menjadi hijau biru sedangkan reaksi positif pada triterpenoid adalah terbentuknya cincin kecokelatan pada perbatasan dua pelarut (Harborne, 1987). Pada penambahan pereaksi Liebermann-Buchard, molekul-molekul asam asetat anhidrida akan berikatan dengan molekul senyawa triterpenoid/steroid sehingga menghasilkan reaksi yang tampak pada perubahan warna. Senyawa triterpenoid dan steroid akan mengalami dehidrasi dengan adanya penambahan asam kuat dan membentuk garam yang memberikan sejumlah reaksi warna. Perubahan warna disebabkan karena terjadinya reaksi oksidasi melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi.

Berdasarkan hasil penelitian, semua ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* yang diujikan memberikan reaksi positif terhadap golongan senyawa steroid yang ditunjukkan dengan adanya perubahan warna pada larutan ekstrak menjadi hijau kebiruan dan memberikan reaksi negatif terhadap senyawa triterpenoid. Dugaan reaksi steroid dengan pereaksi Liebermann-Buchard ditunjukkan pada Gambar 4.12. Steroid merupakan suatu lipid sehingga senyawa steroid bersifat non polar. Oleh sebab itu, steroid dapat larut pada pelarut-pelarut organik yang bersifat non polar seperti petroleum eter dan n-heksana dan larut juga pada pelarut semipolar seperti kloroform dan etil asetat sesuai dengan kaidah *like dissolves like*.

Senyawa steroid dapat larut dalam pelarut metanol karena diduga senyawa steroid dalam mikroalga *Chlorella sp.* terikat dalam bentuk ikatan glikosida yaitu senyawa steroid terikat pada gugus gula sehingga cenderung bersifat lebih polar. Sarker dan Nahar (2009) menyebutkan bahwa dengan meningkatnya jumlah gugus hidroksil fungsional polar lainnya pada kerangka steroid membuat

kelarutan steroid dalam pelarut polar menjadi meningkat. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Amaliyah (2013) yang menyebutkan bahwa dalam ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* terkandung senyawa golongan steroid.



Gambar 4.12 Dugaan reaksi steroid dengan Liebermann-Buchard (Burke, dkk., 1974)

Senyawa steroid memiliki struktur lipofilik (larut dalam lemak) dan bersifat non polar akan mudah menembus dinding sel dengan membentuk misel pada sisi hidrofobik. Terbentuknya ikatan antara senyawa non polar dari steroid dengan bagian non polar dari membran sel menyebabkan permeabilitas sel proses biokimiawi *Artemia salina* Leach akan terganggu. Membran sel yang tidak selektif lagi mengakibatkan segala sesuatunya dianggap makanan oleh *Artemia salina* Leach sehingga akan merusak sel *Artemia salina* Leach (Nasliyana, 2013).

4.9.2 Tanin

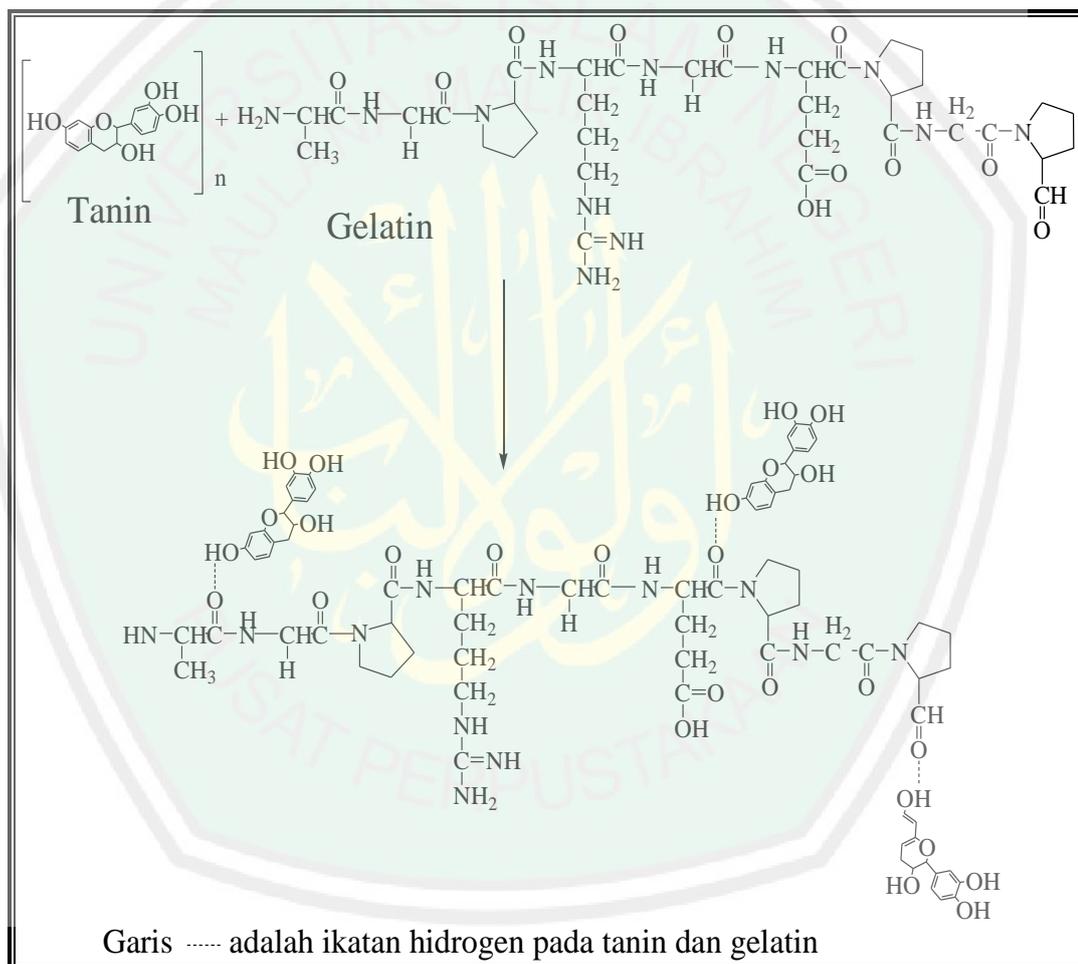
Uji tanin pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan dua cara yaitu dengan penambahan larutan FeCl₃ dan penambahan larutan gelatin. uji

positif tanin ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi hijau kehitaman atau menjadi biru tua setelah ditambahkan larutan FeCl_3 . Hal ini menunjukkan adanya gugus fenol. Sementara itu, uji positif tanin pada penambahan larutan gelatin ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih pada larutan uji.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa uji tanin dengan menggunakan larutan FeCl_3 memberikan hasil negatif pada semua ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* sedangkan uji tanin menggunakan larutan gelatin menghasilkan reaksi positif terhadap ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* Jenis tanin yang dapat bereaksi dengan larutan FeCl_3 adalah tanin pirokatekol dan tanin pirogalol. Tanin pirokatekol merupakan tanin terkondensasi yang membentuk larutan berwarna hijau dengan FeCl_3 dengan 2 gugus fenol, contohnya yaitu katekol dan flobatanin. Sementara itu, tanin pirogalol merupakan tanin terhidrolisis yang membentuk warna biru dengan larutan FeCl_3 dengan 3 gugus fenol, contohnya gallotanin dan ellagitanin. Tanin terhidrolisis biasanya berikatan dengan karbohidrat yang dapat membentuk jembatan oksigen, sehingga dapat dihidrolisis dengan menggunakan asam sulfat atau asam klorida. Tanin terkondensasi biasanya tidak dapat dihidrolisis, melainkan terkondensasi yang kebanyakan terdiri dari polimer flavonoid dan menghasilkan produk yang tidak larut dalam air.

Harborne (1987) menyatakan bahwa semua tanin akan membentuk sedikit atau banyak endapan setelah ditambahkan larutan gelatin. Gelatin merupakan protein alami yang memberikan sifat penstabil dan pengental bagi media yang

berbasis air, mengandung asam amino dengan kandungan glisin (27 %), prolin (16 %) dan hidroxiprolin (14 %), sehingga terbentuknya senyawa tanin protein dikarenakan adanya ikatan hidrogen antara tanin dan protein pada gelatin sehingga terbentuk endapan putih. Dugaan reaksi antara gelatin dan senyawa tanin ditunjukkan pada Gambar 4.13.



Gambar 4.13 Dugaan reaksi antara tanin dan gelatin (Leemensand, 1991 dalam Sa'adah, 2010)

Tanin merupakan senyawa polifenol yang memiliki gugus hidroksi sehingga bersifat polar. Pengekstrakan senyawa dengan menggunakan pelarut polar seperti metanol akan mengefektifkan pengekstrakan senyawa tanin.

Amaliyah (2013) menyatakan bahwa ekstrak metanol dan etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* mengandung senyawa tanin. Hal ini diperkuat oleh penelitian yang dilakukan Uma, *et al.*, (2011) yang menyatakan bahwa dalam ekstrak metanol mikroalga *Chlorella vulgaris* terkandung senyawa tanin.

Banyaknya gugus -OH yang terkandung dalam senyawa tanin, dapat bersifat racun terhadap *Artemia salina* Leach. Gugus -OH ini dapat menembus dan merusak permeabilitas membran sel *Artemia salina* Leach dengan membentuk ikatan hidrogen pada sisi aktif membran sel.

4.10 Pemisahan Golongan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis adalah suatu metode pemisahan senyawa yang didasarkan pada perbedaan distribusi senyawa pada dua fase yaitu fase gerak dan fase diam yang kepolarannya berbeda (Hendayana, 2006). Pada kromatografi lapis tipis, fase diam yang digunakan adalah berupa plat silika gel F₂₅₄ sedangkan fase geraknya adalah eluen terbaik dalam memisahkan senyawa yang diinginkan. Indikator eluen yang baik adalah eluen yang dapat memisahkan senyawa dalam jumlah yang banyak yang ditandai dengan munculnya noda pada plat KLT.

Pada penelitian ini, pemisahan senyawa dilakukan pada ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* yang memiliki nilai LC₅₀ terendah (yang bersifat paling toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach) yaitu ekstrak petroleum eter. Golongan senyawa yang akan dipisahkan adalah golongan senyawa yang positif pada ekstrak petroleum eter yang dihasilkan pada uji reagen yaitu golongan senyawa steroid. Penggunaan eluen campuran diharapkan mampu memisahkan

senyawa steroid dengan sempurna. Pemisahan golongan senyawa steroid dilakukan dengan menggunakan 5 variasi eluen yaitu n-heksana:aseton (3,5:1,5); n-heksana:etil asetat (4,5:0,5), n-heksana:etil asetat (4:1); n-heksana:etil asetat (3:2); dan n-heksana:etil asetat (3,5:1,5). Hasil pemisahan kromatografi lapis tipis ditunjukkan pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Data penampakan noda senyawa steroid hasil kromatografi lapis tipis ekstrak petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* pada beberapa eluen dengan lampu UV 366 nm

No.	Fase Gerak	Jumlah Noda dengan Pendeteksi Liebermann Buchard	Nilai Rf
1.	n-heksana:aseton (3,5:1,5)	13	0,025; 0,0625; 0,125; 0,2125; 0,3125; 0,3625; 0,5; 0,6875; 0,7875; 0,8375; 0,925; 0,9625; 0,9875
2.	n-heksana:etil asetat (4,5:0,5)	6	0,0375; 0,0775; 0,1; 0,1375; 0,4375; 0,65
3.	n-heksana:etil asetat (4:1)	7	0,025; 0,05; 0,0875; 0,15; 0,5125; 0,55; 0,5875; 0,775
4.	n-heksana:etil asetat (3:2)	3	0,025; 0,1375; 1
5.	n-heksana:etil asetat (3,5:1,5)	12	0,025; 0,125; 0,25; 0,4625; 0,525; 0,575; 0,725; 0,7375; 0,7875; 0,85; 0,925; 0,9625

Berdasarkan Tabel 4.5, semua eluen menghasilkan noda pada plat KLT yang berarti bahwa eluen-eluen tersebut dapat memisahkan senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* Banyaknya noda yang dihasilkan menunjukkan banyaknya senyawa yang terpisahkan. Semakin banyak noda yang muncul pada plat KLT berarti semakin banyak senyawa yang terpisahkan. Pemisahan senyawa tersebut bergantung pada

sifat kepolarannya. Plat KLT bersifat polar dan eluen yang digunakan merupakan campuran eluen yang bersifat semipolar dan nonpolar. Senyawa yang bersifat polar akan cenderung tertahan pada fase diamnya. Senyawa steroid merupakan senyawa yang bersifat non polar sehingga senyawa steroid akan mengikuti pergerakan fase gerak karena memiliki kepolaran yang sama dengan fase geraknya.

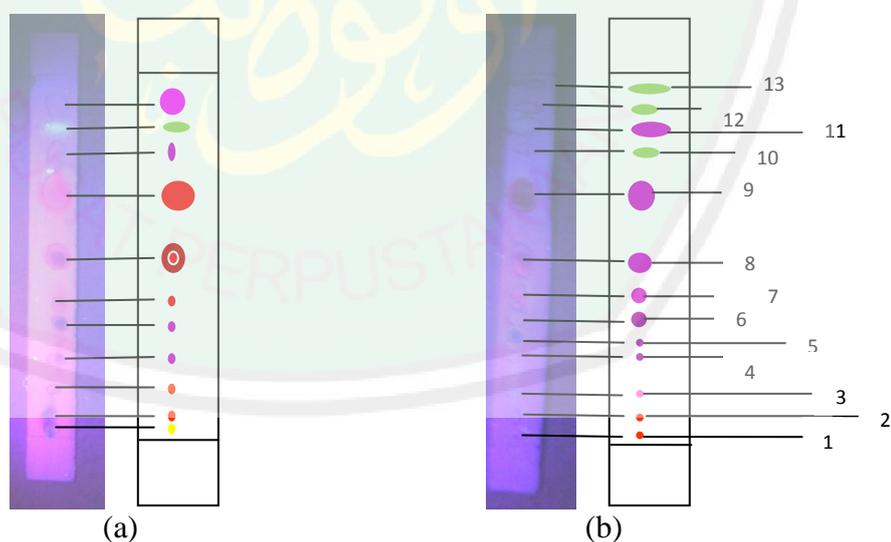
Berdasarkan hasil penelitian, dari 5 variasi eluen yang digunakan terdapat dua eluen terbaik yang memisahkan senyawa steroid pada ekstrak petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* yaitu eluen n-heksana:aseton (3,5:1,5) dan eluen n-heksana:etil asetat (3,5:1,5). Pemisahan dengan menggunakan eluen n-heksana:aseton (3,5:1,5) menghasilkan 13 noda sedangkan pemisahan dengan menggunakan eluen n-heksana:etil asetat (3,5:1,5) menghasilkan 12 noda dengan nilai Rf (*retardation factor*) yang berbeda-beda. Nilai Rf hasil pemisahan ekstrak petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* dengan eluen n-heksana:aseton (3,5:1,5) berkisar antara 0,025 – 0,9875 sedangkan nilai Rf dengan eluen n-heksana:etil asetat (3,5:1,5) berkisar antara 0,025 – 0,9625. Rf atau waktu retensi menyatakan lama yang dibutuhkan senyawa target untuk lepas dari fase diamnya. Nilai maksimum Rf adalah 1 yang berarti bahwa solut bermigrasi dengan kecepatan yang sama dengan fase gerak, sedangkan nilai minimumnya adalah 0 yang berarti bahwa solut tertahan pada fase diam dan tidak dapat terpisahkan oleh fase geraknya.

Senyawa yang memiliki nilai Rf paling rendah yaitu (0,025; 0,0625; dan 0,125) pada eluen n-heksana:aseton (3,5:1,5) dan nilai Rf (0,025 dan 0,125) pada

eluen n-heksana:etil asetat (3,5:1,5) memiliki kepolaran yang lebih besar dibandingkan senyawa yang memiliki nilai Rf di atasnya. Hal ini disebabkan karena senyawa-senyawa ini cenderung tertahan pada fase diamnya yang bersifat polar, sehingga diindikasikan senyawa tersebut bersifat polar. Selanjutnya, senyawa dengan nilai Rf 0,2125; 0,3125; 0,3625 dan 0,5 pada eluen n-heksana:aseton (3,5:1,5) serta nilai Rf 0,25; 0,4625; 0,525 dan 0,575 pada eluen n-heksana:etil asetat (3,5:1,5) cenderung bersifat semipolar. Hal ini disebabkan karena spot yang dihasilkan berada di tengah-tengah plat KLT yang berarti bahwa pergerakan senyawa-senyawa ini tidak cenderung bersifat polar dan tidak pula bersifat nonpolar. Pergerakan senyawa cenderung berada pada posisi seimbang antara eluen dan fasa diam plat KLT sehingga diindikasikan senyawa-senyawa tersebut memiliki sifat semipolar. Sementara itu, senyawa dengan Rf paling tinggi (0,6875; 0,7875; 0,8375; 0,925; 0,9625 dan 0,9875) pada eluen n-heksana:aseton (3,5:1,5) dan nilai Rf (0,725; 0,7375; 0,785; 0,835; 0,925 dan 0,9625) pada eluen n-heksana:etil asetat (3,5:1,5) memiliki kepolaran yang lebih rendah dibandingkan senyawa-senyawa dengan Rf yang lebih rendah. Senyawa ini cenderung bersifat non polar karena lebih terikat kuat pada fase gerak yang bersifat non polar (mengikuti pergerakan fase gerak). Hasil pemisahan kromatografi lapis tipis ekstrak petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* dengan menggunakan eluen n-heksana:aseton (3,5:1,5) ditunjukkan pada Gambar 4.14 dan Tabel 4.6.

Diantara 13 noda yang dihasilkan setelah disemprot reagen Liebermann-Buchard, diduga noda ke-3, ke-4, ke-5, ke-6, ke-7, ke-8, ke-9, ke-10, ke-11, ke-12 dan noda ke-13 merupakan senyawa steroid. Noda ke-3 dengan nilai Rf 0,125

bersifat semipolar menghasilkan warna pink setelah disemprot dengan pereaksi Liebermann-Buchard sedangkan noda ke-4, ke-5, ke-6, ke-7, ke-8, ke-9 dan ke-11 memiliki nilai Rf (0,125; 0,2125; 0,3125; 0,3625; 0,5; 0,6875; 0,7875; dan 0,925) bersifat non polar memiliki warna ungu. Noda ke-10, ke-12 dan ke-13 dengan nilai Rf (0,8375; 0,9625; 0,9875) bersifat non polar memiliki warna hijau. Hal ini diperkuat oleh penelitian yang dilakukan oleh Syamsudin, dkk., (2007) dengan menggunakan eluen yang sama yaitu n-heksana:aseton (7:3) untuk memisahkan senyawa steroid dari ekstrak n-heksana kulit batang asam kandis. Setelah disemprot dengan pereaksi Liebermann-Buchard menghasilkan enam bercak yang berwarna biru, ungu sampai cokelat yang diduga merupakan senyawa steroid. Selain itu, Sulastry dan Kurniawati (2010) menyatakan bahwa senyawa steroid setelah disemprot dengan reagen Liebermann-Buchard menghasilkan warna hijau.

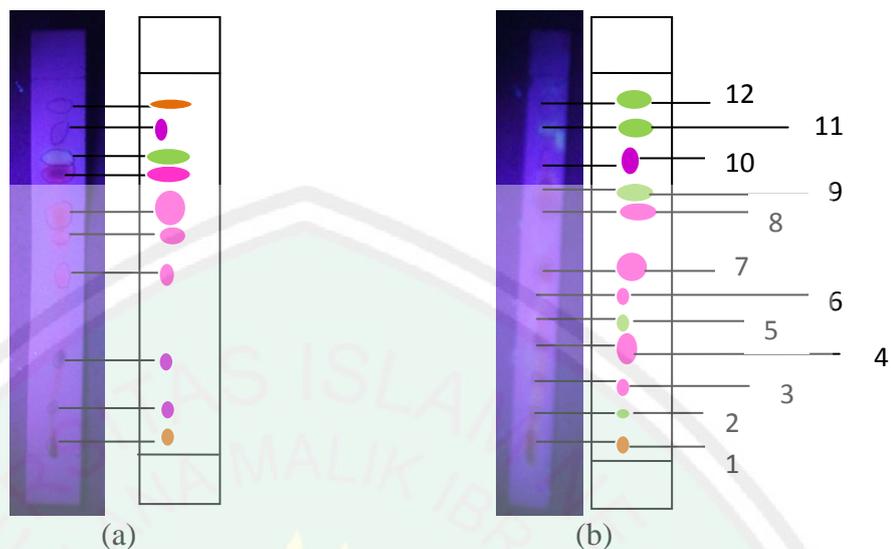


Gambar 4.14 Hasil KLTA senyawa steroid ekstrak petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* dengan eluen n-heksana:aseton (3,5:1,5)
 (a) Hasil pengamatan di bawah sinar UV pada λ_{366} nm sebelum disemprot reagen Lieberman-Buchard
 (b) Hasil pengamatan di bawah sinar UV pada λ_{366} nm setelah disemprot reagen Lieberman-Buchard
 (c)

Tabel 4.6 Hasil kromatografi lapis tipis ekstrak petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* dengan eluen n-heksana:aseton (3,5:1,5)

No.	Warna noda di bawah sinar UV pada λ 366 nm		Nilai Rf
	Sebelum disemprot dengan reagen Liebermann-Buchard	Setelah disemprot dengan reagen Liebermann-Buchard	
1.	Kuning	Orange	0,025
2.	Orange	Orange	0,0625
3.	Orange	Pink	0,125
4.	Pink ungu	Ungu	0,2125
5.	Ungu	Ungu	0,3125
6.	Merah	Ungu	0,3625
7.	Merah	Ungu	0,5
8.	Merah	Ungu	0,6875
9.	Ungu	Ungu	0,7875
10.	Hijau	Hijau	0,8375
11.	Pink	Ungu	0,925
12.	-	Hijau	0,9625
13.	-	Hijau	0,9875

Sementara itu, pada eluen n-heksana:etil asetat (3,5:1,5) dihasilkan 12 noda setelah di semprot dengan reagen Liebermann-Buchard dan diduga noda ke-2, ke-3, ke-4, ke-5, ke-6, ke-7, ke-8, ke-9, ke-10, ke-11, dan noda ke-12 merupakan senyawa steroid. Noda ke-2 dengan nilai Rf 0,125 bersifat semipolar menghasilkan warna hijau setelah disemprot dengan pereaksi Liebermann-Buchard sedangkan noda ke-3, ke-4 memiliki nilai Rf (0,25; 0,4625) bersifat semipolar memiliki warna pink. Noda ke-6, ke-7, dan ke-8 dengan nilai Rf 0,575; 0,725; 0,7375 bersifat nonpolar juga berwarna pink. Noda ke-5, ke-9, ke-11 dan ke-12 dengan nilai Rf (0,525; 0,7875; 0,925 dan 0,9625) bersifat non polar memiliki warna hijau. Hasil pemisahan kromatografi lapis tipis ekstrak petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* dengan menggunakan eluen n-heksana:etil asetat (3,5:1,5) ditunjukkan pada Gambar 4.15 dan Tabel 4.7.



Gambar 4.15 Hasil KLTA senyawa steroid ekstrak petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* dengan eluen n-heksana:etil asetat (3,5:1,5)

(a) Hasil pengamatan di bawah sinar UV pada λ_{366} nm sebelum disemprot reagen Liebermann-Buchard

(b) Hasil pengamatan di bawah sinar UV pada λ_{366} nm setelah disemprot reagen Liebermann-Buchard

Tabel 4.7 Hasil kromatografi lapis tipis ekstrak petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* dengan eluen n-heksana:etil asetat (3,5:1,5)

No.	Warna noda di bawah sinar UV pada λ 366 nm		Nilai Rf
	Sebelum disemprot dengan reagen Liebermann-Buchard	Setelah disemprot dengan reagen Liebermann-Buchard	
1.	Orange	Orange	0,025
2.	Ungu	Hijau	0,125
3.	Ungu	Pink	0,25
4.	Pink	Pink	0,4625
5.	Pink	Hijau	0,525
6.	Pink	Pink	0,575
7.	Hijau	Pink	0,725
8.	Ungu	Pink	0,7375
9.	Ungu	Hijau	0,7875
10.	Orange	Ungu	0,835
11.	-	Hijau	0,925
12.	-	Hijau	0,9625

Berdasarkan hasil penelitian, dapat dilihat bahwasanya kedua eluen menghasilkan spot dengan rentang warna yang sama yaitu berwarna pink, ungu,

dan hijau yang diduga sebagai senyawa steroid. Nilai Rf yang dihasilkan oleh noda-noda tersebut berkisar antara 0,125 – 0,9625. Hal ini diperkuat oleh penelitian yang dilakukan oleh Sriwahyuni (2010) yang memisahkan senyawa steroid dari ekstrak etil asetat tanaman anting-anting menggunakan eluen sikloheksana-etil asetat (1:1) dengan pereaksi LB menghasilkan noda (hijau kebiruan, hijau kehitaman, dan berwarna ungu yang tengahnya berwarna hijau kebiruan pada UV 366 nm).

Hal ini menunjukkan bahwasanya kedua eluen (n-heksana: aseton dan n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 3,5:1,5) merupakan eluen yang cocok untuk memisahkan senyawa steroid ekstrak petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* Eluen yang baik adalah eluen yang dapat menghasilkan pemisahan yang sempurna. Menurut Gandjar dan Rohman (2007), pemisahan senyawa dikatakan baik apabila spot/noda yang dihasilkan banyak, berbentuk bulat dan tidak berekor, serta noda yang dihasilkan jelas.

Penampakan noda pada plat KLT dilakukan di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm baik sebelum maupun setelah disemprotkan reagen Liebermann-Buchard. Penampakan noda dilakukan pada panjang gelombang 366 nm karena lempeng/plat KLT akan berwarna gelap ketika disinari UV pada panjang gelombang tersebut sedangkan noda-noda hasil pemisahan akan berfluoresensi sehingga noda dapat teramati. Sementara itu, apabila penampakan noda dilakukan pada panjang gelombang 254 nm, maka noda akan tampak berwarna gelap dan lempeng KLT akan berfluoresensi sehingga noda akan sulit teramati. Gandjar dan Rohman (2007) menyebutkan bahwa lempeng KLT akan

mengemisikan suatu fluoresensi hijau ketika diradiasi/disinari dengan lampu UV pada panjang gelombang 254 nm. Selain itu, golongan senyawa yang dapat menyerap sinar UV pada panjang gelombang 254 nm adalah golongan aromatik, α dan β karbonil tak jenuh dan sistem terkonjugasi (Zahro, 2011). Senyawa steroid tidak memiliki sistem terkonjugasi sehingga apabila dilakukan penampakan noda pada panjang gelombang 254 nm, maka senyawa akan sulit teramati.

Timbulnya warna pada noda karena adanya interaksi antara sinar UV dengan senyawa yang terkandung pada noda hasil pemisahan. Senyawa tersebut mengandung gugus kromofor yang mana pada gugus kromofor ini juga terikat gugus auksokrom. Kromofor merupakan gugus dalam senyawa organik yang menyerap sinar UV sedangkan auksokrom merupakan gugus yang mempunyai elektron bebas yang apabila terikat pada kromofor maka akan mengakibatkan pergeseran ke panjang gelombang yang lebih besar. Sinar yang tampak pada noda merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh senyawa tersebut melalui eksitasi elektron dari tingkat energi rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi dengan melepaskan energi (Gandjar dan Rohman, 2007).

4.11 Pemanfaatan Mikroalga *Chlorella sp.* dalam Perspektif Islam

Segala sesuatu yang diciptakan Allah SWT di muka bumi ini pasti memiliki makna dan manfaat. Demikian pula Allah SWT menciptakan manusia dengan banyak kelebihan dibandingkan dengan makhluk hidup yang lain. Manusia diberi akal dan pikiran dengan tujuan untuk memikirkan dan mengungkap segala sesuatu yang ada di dunia. Salah satunya adalah dengan

mengungkap keistimewaan ciptaan Allah SWT yang berupa tumbuh-tumbuhan. Dalam ayat al Quran telah banyak disebutkan tentang tumbuh-tumbuhan, diantaranya firman Allah SWT dalam surat al An'am ayat 99:

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



Artinya: “dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan Maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman” (Q.S. al An'am: 99).

Firman Allah SWT dalam surat al An'am ayat 99 menjelaskan bahwa Allah SWT menurunkan air hujan dari awan, kemudian dengan air tersebut Allah SWT mengeluarkan setiap jenis tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam bentuk, ciri khas serta berbeda-beda tingkatan, kelebihan dan kekurangannya (al Maraghi, 1992), meskipun semuanya tumbuh di tanah yang sama dan dialiri dengan air yang sama. Tumbuh-tumbuhan diciptakan di muka bumi ini tidak ada yang sia-sia. Banyak penelitian menyebutkan bahwa tumbuh-tumbuhan mengandung senyawa aktif yang dapat dimanfaatkan dalam kehidupan sehari-hari diantaranya adalah sebagai bahan makanan dan bahan obat-obatan.

Allah SWT berfirman dalam al Quran surat Luqman ayat 10:

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا وَأَلْقَى فِي الْأَرْضِ رَوَاسِيَ أَنْ تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ
وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿١٠﴾

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

Ayat ini mengajak/mengundang manusia untuk mengarahkan pandangan hingga batas kemampuannya dalam memandang sampai mencakup seantero bumi dengan aneka tanah dan tumbuhan serta beragam keajaiban yang terhampar pada tumbuh-tumbuhan. Kata *karim* menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap objek yang disifatinya. Tumbuhan yang paling baik adalah tumbuhan yang subur dan bermanfaat. Pemanfaatan tumbuhan tidak hanya terbatas sebagai sumber makanan saja. Allah SWT memerintahkan kepada kita untuk memperhatikan segala ciptaanNya dengan cara melakukan studi eksperimen alam. Tujuannya adalah untuk menunjukkan pentingnya penalaran dan perenungan serta mengajak kita untuk tidak puas hanya dengan mengamati saja alam semesta ini (Pasya, 2004).

Surat al An'am ayat 99 menggambarkan bentuk luar dari tumbuh-tumbuhan yang merupakan objek kajian morfologi tumbuh-tumbuhan. Mikroalga merupakan tumbuhan yang berukuran mikroskopis. Bentuk tubuhnya tidak dapat dilihat dengan mata telanjang. Tumbuhan ini memiliki sejuta khasiat baik sebagai bahan makanan, bahan obat-obatan maupun sebagai sumber energi. Hal ini merupakan tanda-tanda kekuasaan Allah SWT yang wajib kita syukuri. Bukti rasa

syukur dapat kita tuangkan dalam bentuk penelitian guna mengkaji makna dan manfaat penciptaannya.

Sebagaimana hasil penelitian ini yang menunjukkan bahwa senyawa metabolit sekunder yang diekstraksi dari mikroalga *Chlorella sp.* memiliki bioaktivitas. Ekstrak petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* menunjukkan nilai LC_{50} terendah yaitu sebesar 32,6710 ppm yang menunjukkan bahwa senyawa ini bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Ekstrak petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* mengandung senyawa aktif berupa senyawa steroid yang dapat dimanfaatkan dan menjadi acuan di bidang kedokteran dan farmasi.

Hasil penelitian tersebut merupakan salah satu bukti kekuasaan Allah SWT. Mikroalga yang selama ini hanya dianggap sebagai tumbuhan pengganggu dalam perairan, ternyata memiliki khasiat yang sangat luar biasa. Hal ini menunjukkan kebenaran ayat-ayat al Quran yang menjelaskan bahwa segala sesuatu yang ada di duna ini tidak ada yang sia-sia. Semua diciptakan dengan manfaat masing-masing. Dengan adanya penelitian maka kita dapat menemukan rahasia alam tumbuh-tumbuhan. Pada surat al An'am ayat 99 Allah SWT menutup ayat dengan "*Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman*", karena orang-orang yang beriman itu hidup, bekerja, berfikir tentang kebesaran Allah SWT.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Fraksi hasil partisi ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach yang ditunjukkan dengan nilai $LC_{50} < 1000$ ppm. Fraksi petroleum eter memiliki toksisitas paling tinggi dibandingkan dengan fraksi lainnya. Nilai LC_{50} fraksi etil asetat adalah sebesar 43,3044 ppm, fraksi kloroform sebesar 32,9023 ppm, fraksi petroleum eter sebesar 32,6710 dan fraksi n-heksana sebesar 34,2133 ppm.
2. Kandungan golongan senyawa aktif yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* yang memiliki toksisitas paling tinggi (LC_{50} rendah) adalah golongan senyawa steroid.

5.2 Saran

1. Hasil uji pendahuluan dengan menggunakan metode BSLT menunjukkan fraksi petroleum eter memiliki nilai LC_{50} paling rendah (bersifat toksik) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach sehingga perlu dilakukan pengujian bioaktivitas lebih lanjut terhadap mikroalga *Chlorella sp.*
2. Diperlukan identifikasi senyawa aktif yang lebih spesifik dengan menggunakan instrumen seperti GC-MS agar struktur senyawa pada mikroalga *Chlorella sp.* dapat diketahui.

DAFTAR PUSTAKA

- Afif, S. 2008. Ekstraksi, Uji Toksisitas dengan Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Alga Merah *Euclidean Conttoni* dari Perairan Sumenep Madura. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia UIN Malang.
- Agustian, R., Yudiati, E., dan Sedjati, S. 2013. Uji Toksisitas Ekstrak Pigmen Kasar Mikroalga *Spirulina platensis* dengan Metode Uji BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). *Journal Of Marine Research Volume 2, Nomor 1, Halaman 25 – 31*.
- Amaliyah, S. 2013. Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Anonimous. 2008. *Artemia*, Pakan Alami Berkualitas Untuk Ikan dan Udang. <http://mantauresearcher.blogspot.com/2008/01/artemia-pakan-alami-berkualitas-untuk.html>. Diakses tanggal 14 Maret 2009.
- AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington DC: Association of Official Analytical.
- Astawan, M. 2005. Kacang Hijau, Antioksidan yang Membantu Kesuburan Pria. http://web.ipb.ac.id/~tpg/de/pubde_ntrtnhlth_kacanghijau.php. (19 Januari 2013).
- 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. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Bold, C.H. dan Wynne, J.M. 1985. *Introduction to The Algae Structure And Reproduction Pentice-Hall*. New York: Inc. Englewood Cliff.
- Borowitzka, M.A. dan Lesley, J.B. 1988. *Microalgae Biotechnology*. London: Cambridge University Press.
- Burke, R.W., dkk. 1974. Mechanism of The Liebermann-Buchard and ZAK Color Reaction For Cholesterol. *Journal of Clin. Chem Volume 20, Number 7, Page 794 – 801*.
- Byung, H. dan Young-Soo, K. Review: A Chance for Korea to Advance Algal-biodiesel Technology. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry, doi:10.1016/j.jiec.2008.08.002, 2009*.

- Cahyono, A.B. 2004. *Keselamatan Kerja Bahan Kimia di Industri*. Yogyakarta: UGM Press.
- Chalid, S.Y., Amini, S., dan Lestari, S.D. 2012. Kultivasi *Chlorella sp.* Pada Media Tumbuh Yang Diperkaya dengan Pupuk Anorganik Dan Soil Extract. *Jurnal Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan (BBRPPBKP)*. Jakarta: Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Syarif Hidayatullah.
- Chumadi, dkk. 1992. *Pedoman Teknis Budidaya Pakan Alami Ikan dan Udang*. Jakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan Perikanan.
- Colegate, S.M. dan Molyneux, R.J. 2007. *Bioactive Natural Products: Determination, Isolation and Structural Determination Second Edition*. Prancis: CRC Press.
- Day, R.A. dan Underwood, A.L. 1999. *Analisis Kimia Kuantitatif (terjemahan Pudjastmaka, A.H.)*. Jakarta: Penerbit Airlangga.
- De Godos, I., Hector, O., Guzman, S., Pedro, A., García, E., Eloy, B., Raul, M. dan Virginia, A. 2010. Coagulation/flocculation-based Removal of Algal-bacterial Biomass from Piggery Wastewater Treatment. *Journal Bioresource Technology, Volume 10, Halaman 153 – 158*.
- Dewi, Y.S. dan Gultom, Y.H. 2009. Pemanfaatan Algae *Chlorella sp.* dan Enceng Gondok untuk Menurunkan Tembaga (Cu) pada Industri Pelapisan Logam. *Seminar Tugas Akhir*. Semarang: Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Diponegoro.
- Didik, G. 2004. *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi), Jilid 1*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Fathiyawati. 2008. Uji Toksisitas Ekstrak Daun *Ficus racemosa* L. terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Tesis* (tidak dipublikasikan). Fakultas Farmasi UMS. Surakarta.
- Fattah, A.b.A.b.A. 2010. *Shahih Thibbun Nabawi Panduan dan Metode Pengobatan Nabi SAW*. Jakarta: Pustaka Imam Ahmad.
- Fitrianti S.A. 2011. Diferensiasi Temulawak, Kunyit, dan Bangle Berdasarkan Interpretasi Kromatografi Lapis Tipis Menggunakan ImageJ. *Skripsi*. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Fogg, G.E. 1975. *Alga Culture ang Phytoplankton Ecology*. The university of Wisconsin Press. London.

- Gandjar dan Rohman. 2012. *Analisis Obat Secara Spektroskopi dan Kromatografi*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Guenther, E. 1987. *Minyak Atsiri*. Jilid I. Terjemahan Ketaren S. Jakarta: Universitas Jakarta.
- Gunawan. 2012. Pengaruh Perbedaan pH pada Pertumbuhan Mikroalga Klas *Chlorophyta*. *Jurnal Bioscientiae, Volume 9, Nomor 2, Halaman 62 – 65*.
- Hagerman, A.E. 2002. *Tannin Handbook*. Department of Chemistry and Biochemistry, Miami University.
- 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: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Handoko, D.S.P. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis. *Jurnal SIGMA, Volume 9, Nomor 1, ISSN 1410-5888*. Jember: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung: Penerbit ITB.
- Haryadi, D. 2012. Senyawa Fitokimia dan Sitotoksisitas Ekstrak Daun Surian (*Toona sinensia*) terhadap Sel Vero dan MCF-7. *Skripsi*. Bogor: Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut pertanian Bogor.
- Hayati, E.K., Jannah, A. dan Ningsih, R. 2012. Identifikasi Senyawa dan Aktivitas Antimalaria *In Vivo* Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* L.). *Jurnal Molekul Volume 7, Nomor 1, Halaman 20 – 32*.
- Hendayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung: PT Remaja Rosdakarya.
- Hernani dan Hurdjanah, R. 2009. Aspek Pengeringan dalam Mempertahankan Kandungan Metabolit Sekunder pada Tanaman. *Jurnal Perkembangan Teknologi TRO, Volume 21, Nomor 2, Halaman 33 – 39, ISSN 1829-6289*.
- Indrayani, L., Soetjipto, H., dan Sihasale, L. 2006. Skrinning Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Jurnal Berk. Penel. Hayati, Volume 12, Halaman 57 – 61*. Salatiga: Universitas Kristen Satya Wacana.

- Isnansetyo, A. dan Kurniastuty. 1995. *Teknik Kultur Phytoplankton Zooplankton Pakan Alam untuk Pembenihan Organisme Laut*. Yogyakarta: Kanisius.
- Iriawan, N. dan Astuti, S.P. 2006. *Mengolah Data Statistika dengan Mudah Menggunakan Minitab 14*. Yogyakarta: CV Andi Offset.
- Kanwar, A.S. 2007. Brine shrimp (*Artemia salina*) a Marine Animal for Simple and Rapid Biological Assays. *Journal of Chinese Clinical Medicine, Volume 2, Halaman 236 – 240*.
- Kawaroe. 2010. *Mikroalga Potensi dan Pemanfaatannya untuk Produksi Bio Bahan Bakar*. Bogor: IPB Press.
- Khamidah, U. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Khopkar, S.M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Kusmiati, Agustini, N.W.S., Tamat, S.R. dan Irawati, M. 2010. Ekstraksi dan Purifikasi Senyawa Lutein dari Mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* Galur Lokal Ink. *Jurnal Kimia Indonesia Volume 5, Nomor 1, Halaman 30 – 34*.
- Lenny, S. 2006. Senyawa Flavanoida, Fenil Propanoida dan Alkaloida. *Karya Tulis Ilmiah*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara.
- Lisdawati, V. 2002. Berdasar Uji Penapisan Farmakologi pada Buah Mahkota Dewa. *Skripsi* tidak diterbitkan. Yogyakarta: Fakultas Kedokteran UGM.
- Al Maraghi, A.M. 1992. *Terjemah Tafsir Al-Maraghi 7*. Semarang: CV. Toha Putra Semarang.
- Mardiyah, U. 2012. Ekstraksi, Uji Aktivitas Antioksidan terhadap 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Euclima spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Maulana, A.I. 2010. Pengaruh Ekstrak Tauge (*Phaseolus radiatus*) terhadap Kerusakan Sel Ginjal Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Parasetamol. *Skripsi*. Surakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.

- Mc Laughlin J.L. 1991. *Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractination*. Methods in Plants Biochemistry, Academic Press.
- 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 Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica, Volume 45, Halaman 31 – 34*.
- Nasliyana, S. 2013. Uji Toksisitas Ekstrak Biji Sirsak (*Annonamuricata Linn*) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktifnya. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang.
- Nofiani, R. 2008. Artikel Ulas Balik Urgensi dan Mekanisme Biosintesis Metabolit Sekunder Mikroba Laut. *Jurnal Natur Indonesia, Volume 10, Nomor 2, Halaman 120 – 12, ISSN 1410-9379*.
- Nur, M.A. dan Adijuwana, H.A. 1989. *Teknik Pemisahan dalam Analisis Biologi*. Bogor: Pusat Antar Universitas Ilmu Hayati, Institut Pertanian Bogor.
- Panjaitan, R.B. 2011. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Batang Pulasari (*Alixiae cortex*) dengan Metode *Brine Shrimp Lathality Test* (BST). *Skripsi*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Sanata Dharma.
- Pasya, A.F. 2004. *Dimensi sains al-Qur'an Menggali Ilmu Pengetahuan dari al-Qur'an. Buku*. Solo: Tiga serangkai.
- Prihantini, N.B., Putri, B. dan Yuniati, R. 2005. Pertumbuhan *Chlorella* sp. Dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) Dengan Variasi pH Awal. *Jurnal Makara Sains, Volume 9, Nomor 1, Halaman 1 – 6*.
- Prihantini, N.B., Damayanti, D. dan Yuniati, R. 2007. Pengaruh Konsentrasi Medium Ekstrak Tauge (MET) terhadap Pertumbuhan *Scenedesmus* Isolat Subang. *Jurnal Makara Sains Volume 11, Nomor 1, Halaman 1 – 9*.
- Puspita, M.D.A. 2009. Pengoptimuman Fase Gerak KLT Menggunakan Desain Campuran untuk Pemisahan Komponen Ekstrak Meniran (*Phylantus ninuri*). *Skripsi Diterbitkan*. Bogor: Departemen Kimia Fakultas MIPA. IPB.
- Rakhmawati, F. dan Sutimin. 2006. Model Pemanenan Logistik dengan Daya Dukung Bergantung Waktu pada Budidaya Rumput Laut. *Jurnal. Prosiding SPMIPA*, pp, *Halaman 43 – 49*.
- Richmond, A.E. 1988. Microalga Culture. *Journal CRC Critical Rev in Biotech Volume 4, Nomer 4, Page 369 – 438*.

- Rita, W.S., Suirta, I.W. dan Sabirin A. 2008. Isolasi dan Identifikasi Senyawa yang Berpotensi Sebagai Antitumor pada Daging Buah Pare (*Momordica carantia* L). *Jurnal Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana, Volume 2, Nomor 1, Halaman 1 – 6, ISSN 1907-9850.*
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. Terjemahan Prof. Dr. Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Ropiqa, M. 2009. Uji Ketoksikan (LC₅₀) Ekstrak Etanol Daun Ekor Kucing (*Acalypha hispida* Burm.f) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Jurnal*. Pontianak: Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Tanjungpura.
- Rostini, I. 2007. Kultur Fitoplankton (*Chlorella sp.* dan *Tetraselmis sp.*) pada Skala Laboratorium di Instalasi Penelitian dan Pengkajian Teknologi Pertanian Bojonegara. *Karya Ilmiah*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Sa'adah, L. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Tanin dari Daun Belimbing Wuluh (*Avverhoa bilimbi* L.). *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Sachlan, M. 1982. *Planktonologi*. Semarang: Fakultas Peternakan dan Perikanan Universitas Diponegoro.
- 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.
- Sarker, S.D. dan Nahar, L. 2009. *Kimia untuk Mahasiswa Farmasi Bahan Kimia Organik, Alam dan Umum*. Yogyakarta: Pustaka pelajar.
- Sastrohamidjojo, H. 1991. *Kromatografi*. Liberty : Yogyakarta.
- Setyaningsih, I., Desniar dan Sriwardani, T. 2005. Konsentrasi Hambatan Minimum Ekstrak *Chlorella sp.* terhadap Bakteri dan Kapang. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan, Volume 8, Nomor 1.*
- Shahidi, F. dan Nacz, M. 1995. *Food Phenolic*. Lancaster: Technomic Publishing Co.Inc.
- Soebagio, Budiasih, E., Ibnu, M.S., Widarti, H.R. dan Munzil. 2005. *Kimia Analitik II*. Malang: UM Press.
- Soemirat, J. 2005. *Toksikologi Lingkungan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

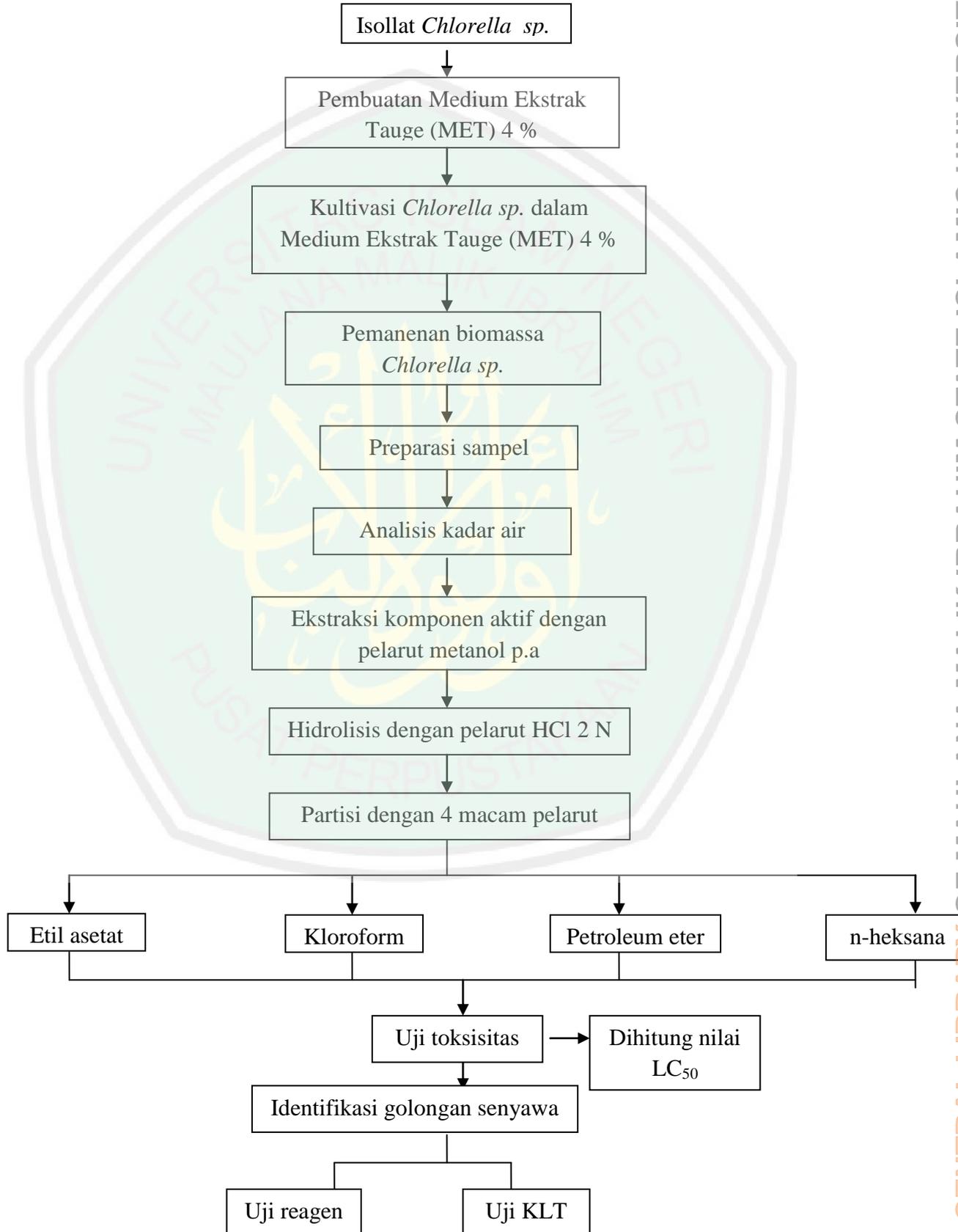
- Sudarmadji, S., Haryono, B. dan Suhardi. 2003. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Sukadirman, Rahman, A., Pratiwi F.N. 2004. Uji Praskrining Aktivitas Antikanker Ekstrak Eter dan Ekstrak Metanol *Marchantia cf. Planiloba Steph.* dengan Metode Uji Kematian Larva Udang dan Profil Densitometri Ekstrak Aktif. *Skripsi*. Surabaya (ID): Universitas Airlangga
- Sukoso. 2002. *Peranan Bioteknologi Molekuler dalam Pembangunan Bidang Perikanan dan Kelautan Indonesia*. Malang: Universitas Brawijaya.
- Sulastry, T. dan Kurniawati, N. 2010. Isolasi Steroid dari Ekstrak Metanol Daun Beluntas (*Plucea Indica L.*). *Jurnal Chemica, Volume 11, Nomor 1, Halaman 52 – 56.*
- Sulistijowati, S. dan Gunawan, D. 2001. Efek Ekstrak Daun Kembang Bulan (*Tithonia difersifolia A. Gray*) Terhadap *Candica albicans* Serta Profil Kromatografinya. *Jurnal*. Jakarta: Pusat Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.
- Syamsudin, Tjokrosonto, S., Whyuono S. dan Mustofa. 2007. Aktivitas Antiplasmodium dari Dua Fraksi Ekstrak n-Heksana Kulit Batang Asam Kandis. *Jurnal Makalah Farmasi Indonesia, Volume 18, Nomor 4, Halaman 210 – 215.*
- Uma, R., Sivasubramanian, V. dan Devaraj, S.N. 2011. Preliminary Phycochemical Analysis and In Vitro Antibacterial Screening of Green Microalgae, *Desmococcus olivaceous, Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*. *Journal of Algal Biomass Utilization Volume 2, Nomer 3, Pages 74 – 81.*
- Utami, N.P., M.S, Yuniarti., Haetami, K. 2012. Pertumbuhan *Chlorella sp.* yang Dikultur pada Periodisitas Cahaya yang Berbeda. *Jurnal Perikanan dan Kelautan, Volume 3, Nomor 3, Halaman 237 – 244, ISSN: 2088-3137.*
- Van, D.H.C. 2002. *Algae: An Introduction to Phycology*. New York: Cambridge University Press.
- Wijffels, R.H. 2007. Potential of Sponges and Microalgae for Marine Biotechnology. *Journal Trends Biotechnol, Volume 26, Nomer 1, Pages 26 – 31.*
- Winarno, F.G. 2002. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Wirosaputro, S. 2002. *Chlorella Untuk Kesehatan Global*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

- 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). *Jurnal Prosiding Seminar Nasional Limnologi V Tahun 2010*. Bandung: Jurusan Biologi FMIPA Universitas Padjadjaran.
- Yudha, A.P. 2008. Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Dunaliella sp.* pada Umur Panen yang Berbeda. *Skripsi*. Program Studi teknologi Hasil Pertanian Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB Bogor.
- Zahro, I.M. 2011. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Triterpenoid Ekstrak n-Heksana Tanaman Anting-Anting (*Acalipha indica* Linn.) Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

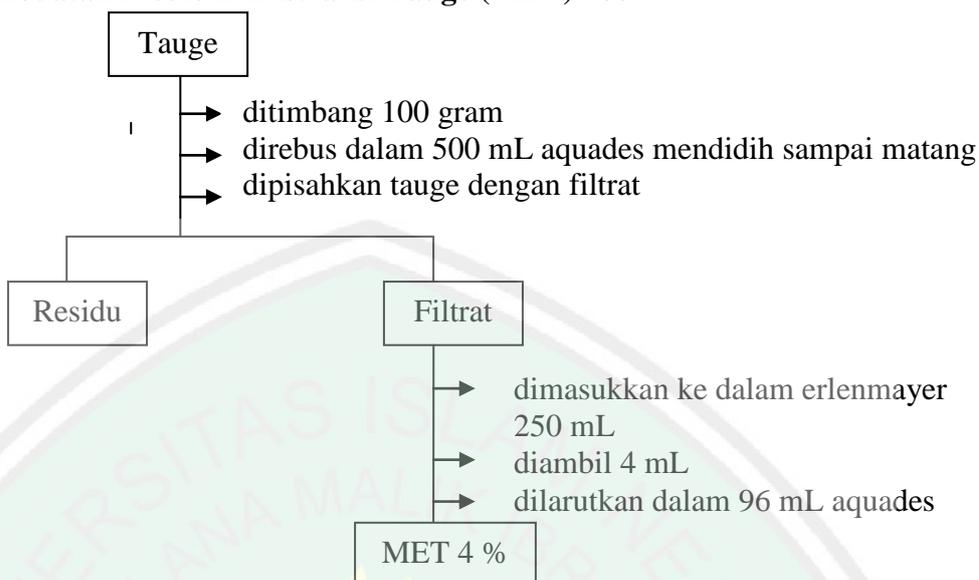


LAMPIRAN

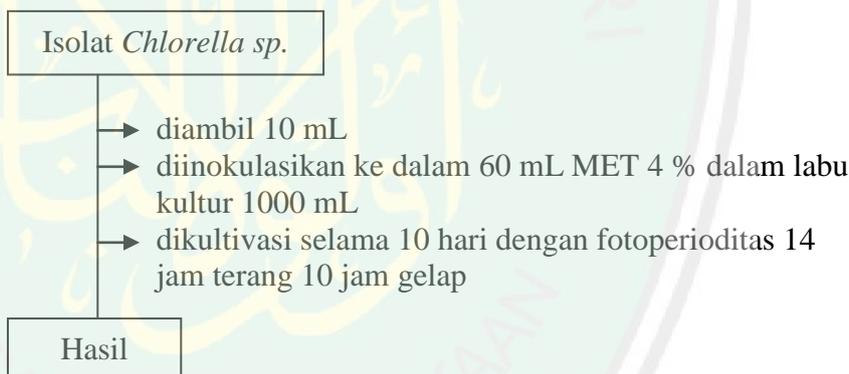
Lampiran 1 Skema Kerja L.1.1 Rancangan Penelitian



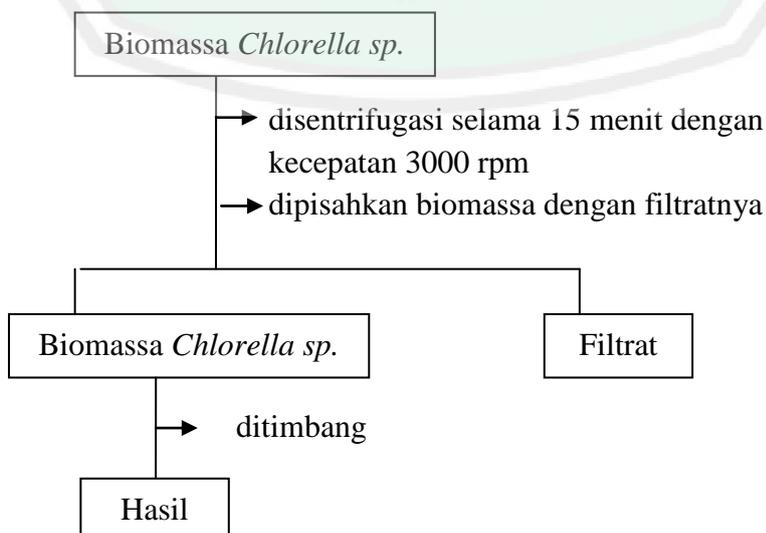
L.2.2 Pembuatan Medium Ekstraksi Tauge (MET) 4%



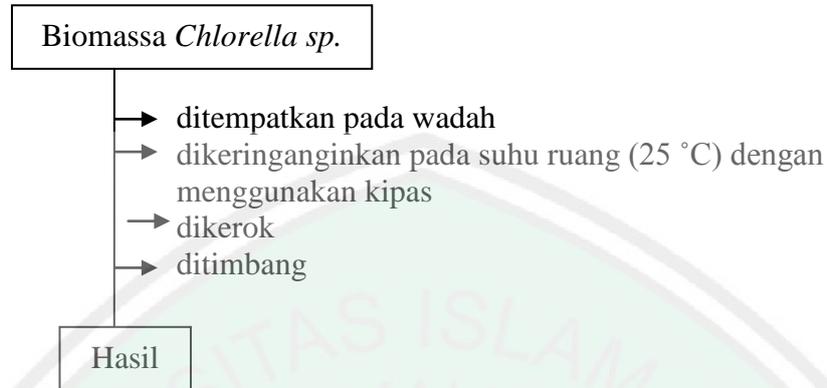
L.2.3 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.* dalam MET 4 %



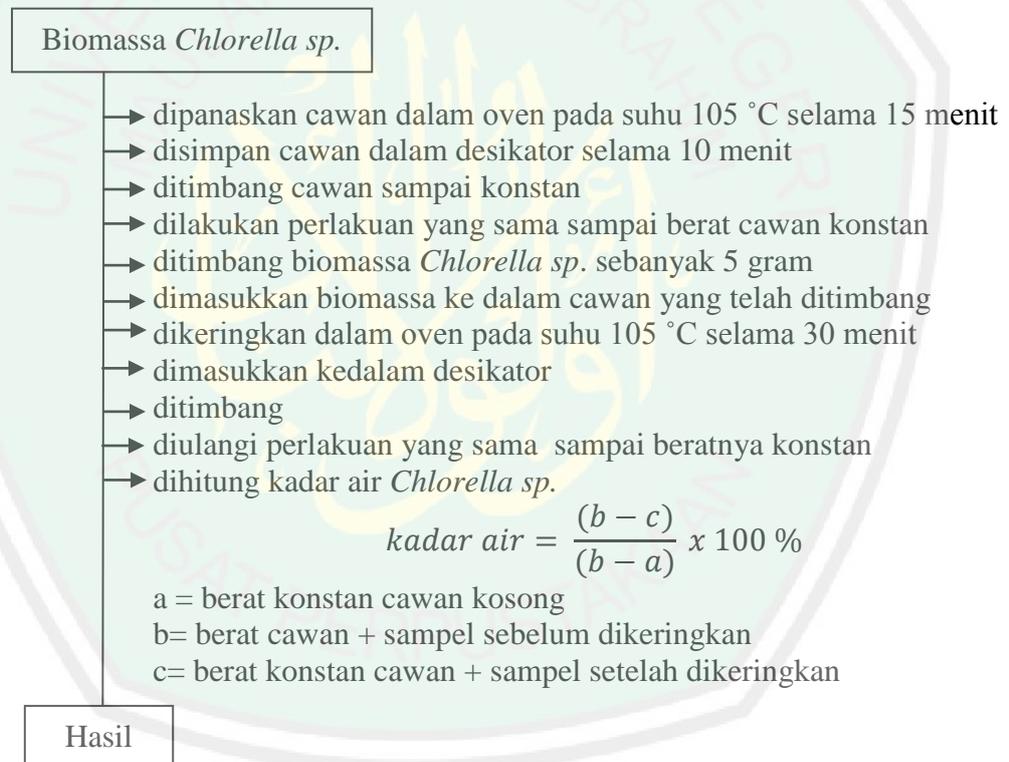
L.2.4 Pemanenan Biomassa *Chlorella sp.*



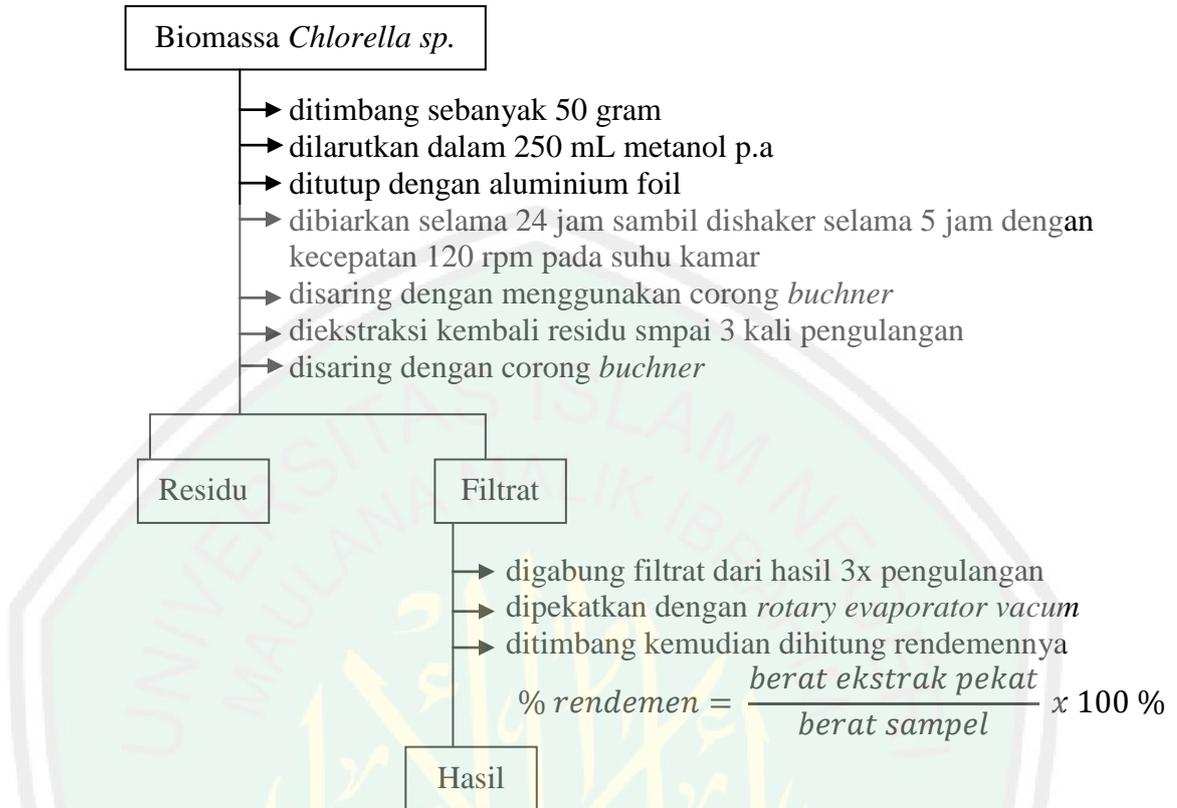
L.2.5 Preparasi Sampel



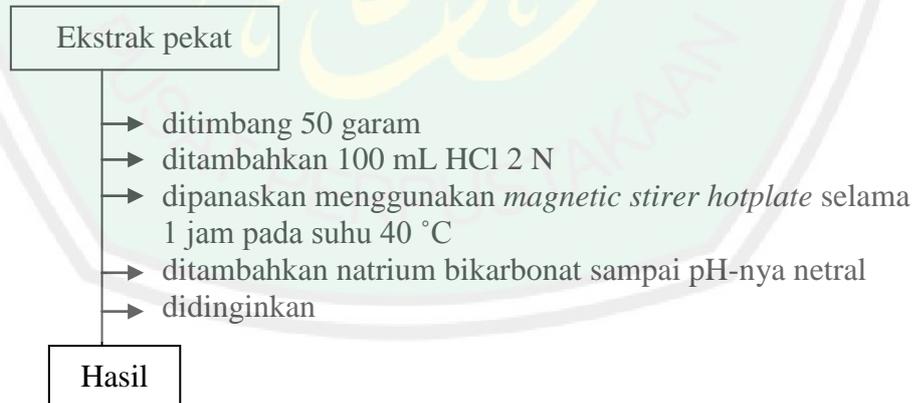
L.2.6 Analisis Kadar Air



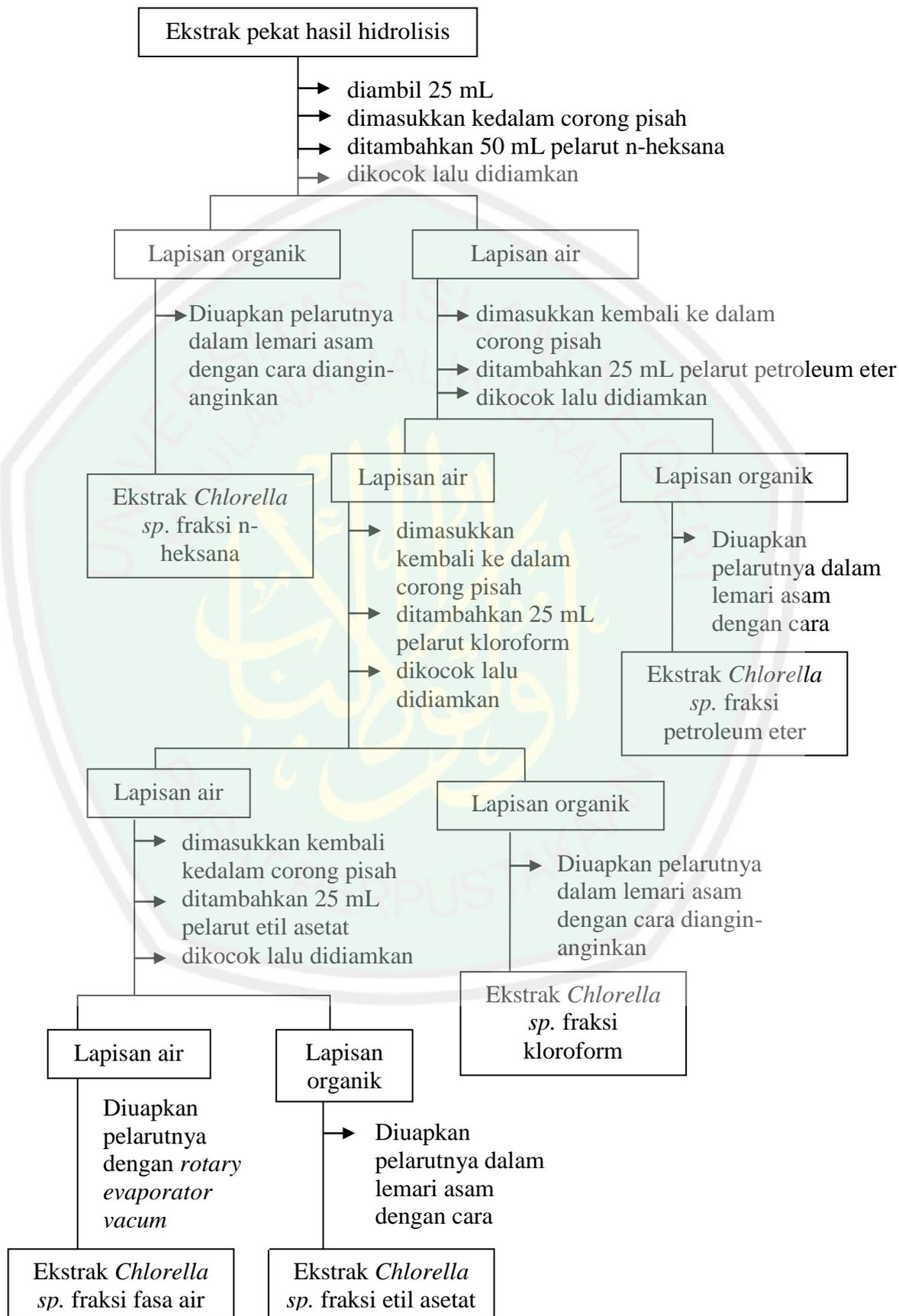
L.2.7 Ekstraksi Komponen Aktif



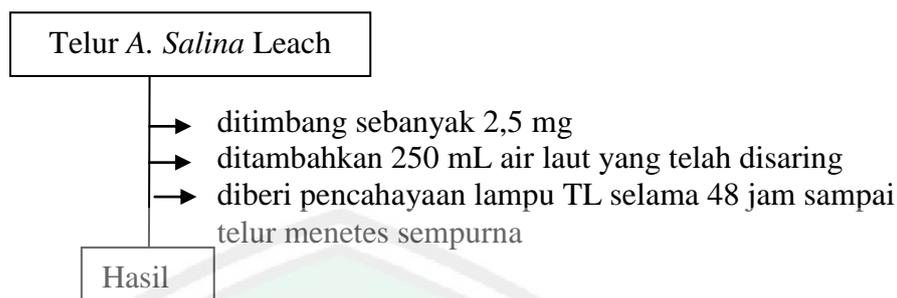
L.2.8 Hidrolisis



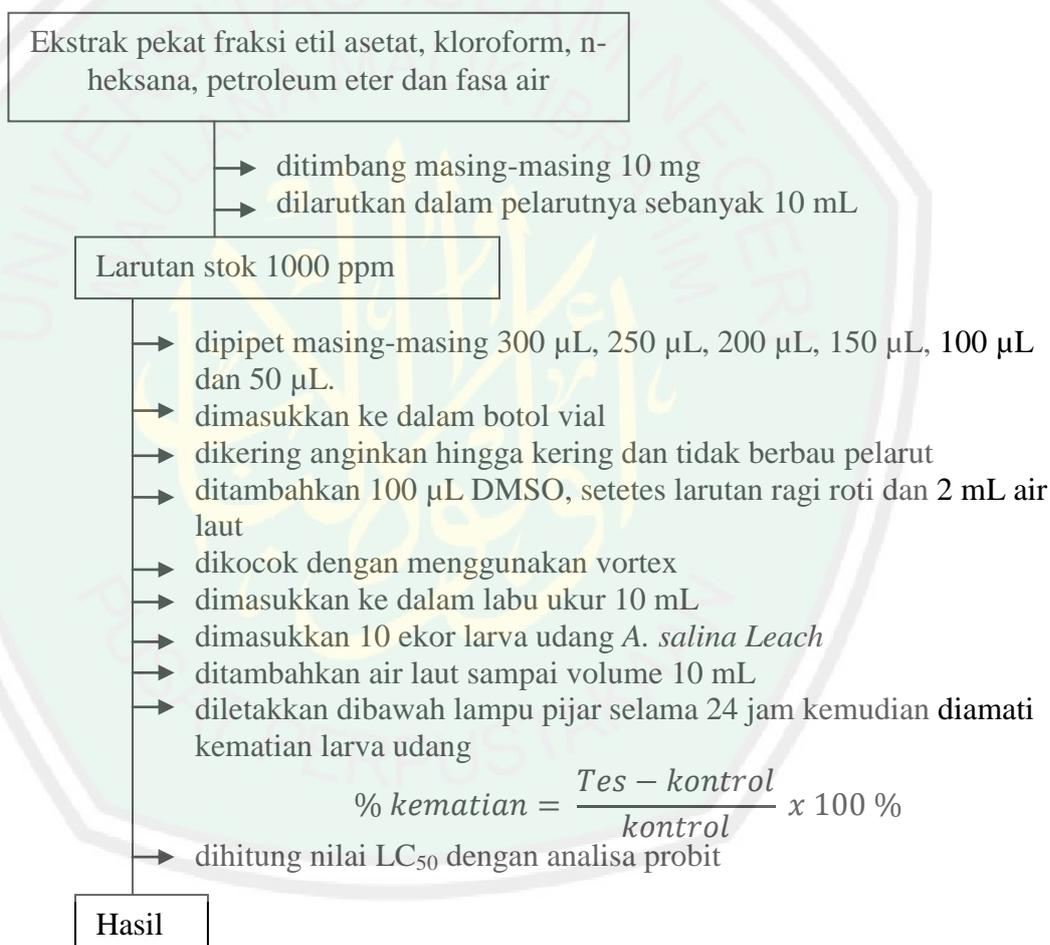
L.2.9 Partisi



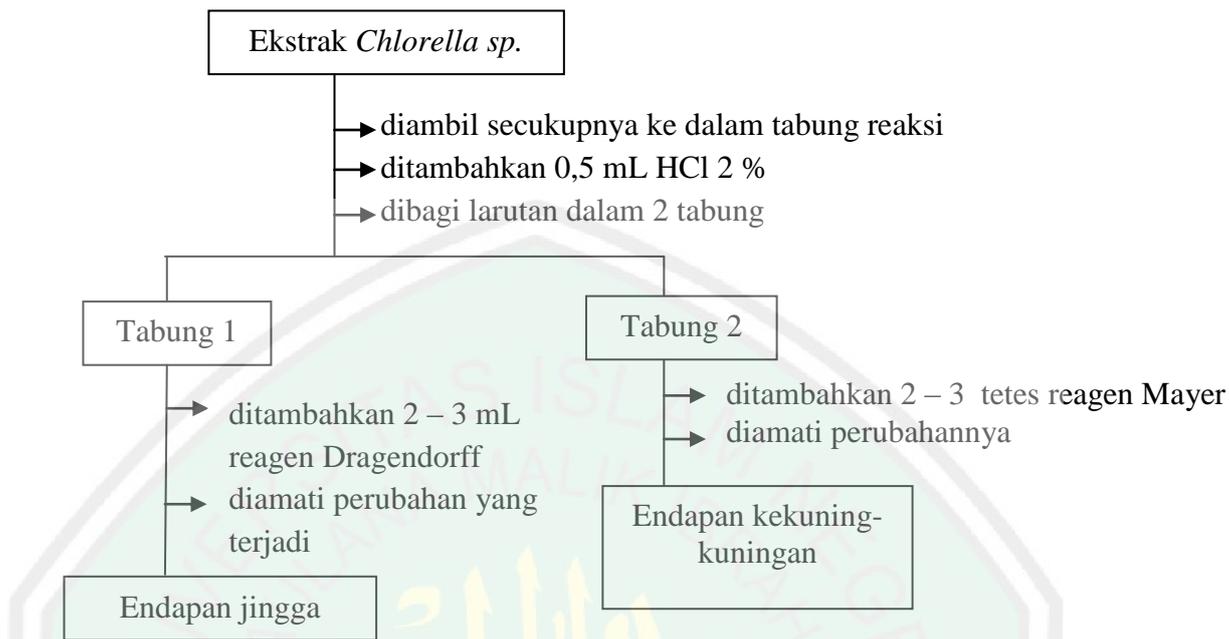
L.2.10 Penentesan Larva Udang *Artemia salina* Leach



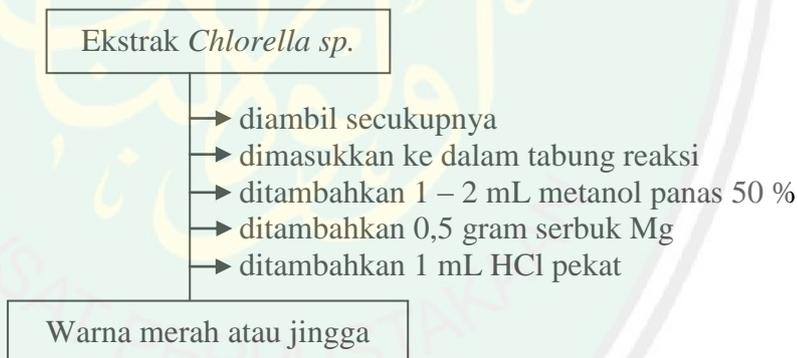
L.2.11 Uji Toksisitas



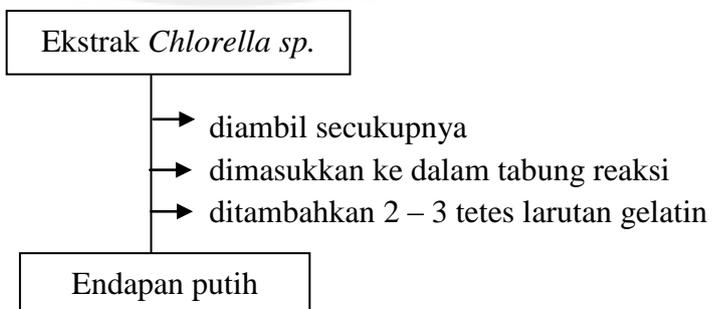
L.2.12 Identifikasi Alkaloid



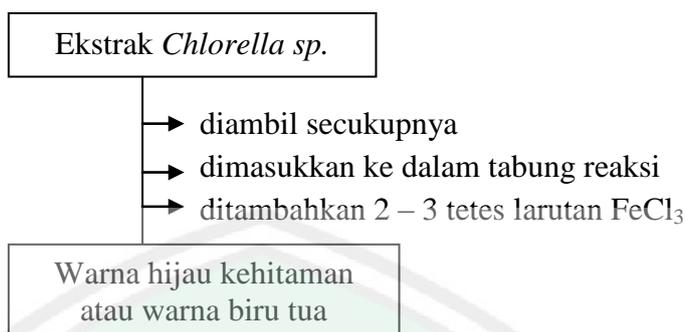
L.2.13 Identifikasi Flavanoid



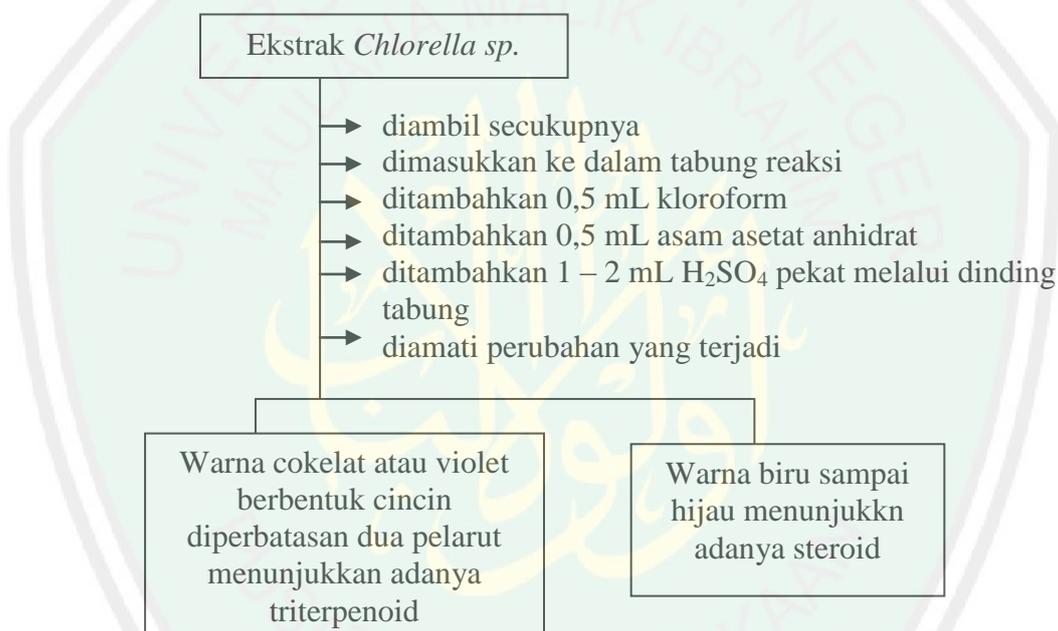
L.2.14 Identifikasi Tanin dengan Larutan Gelatin



L.2.15 Identifikasi Tanin dengan FeCl_3



L.2.16 Identifikasi Terpenoid dan Steroid



L.2.17 Pemisahan Komponen Aktif dengan Uji Kromatografi Lapis Tipis

Uji senyawa aktif dengan KLTA dilakukan terhadap golongan senyawa yang positif dari hasil uji senyawa aktif dengan uji reagen. Ekstrak yang diuji merupakan ekstrak yang memiliki nilai LC_{50} terendah.

Ekstrak *Chlorella sp.*

- ditotolkan pada plat silika gel F₂₅₄ yang telah diaktivasi (ukuran plat 1 x 10 cm) dengan menggunakan pipa kapiler
- dikeringkan totolan dengan menggunakan *hair dryer*
- dielusi dengan masing-masing fase gerak golongan senyawa yang telah dijenuhkan
- dideteksi noda pada permukaan plat di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm
- diamati noda yang terbentuk dengan cara dilingkari dengan pensil (dicatat warna pada masing-masing spot)
- disemprot dengan masing-masing penyemprot golongan senyawa
- dideteksi noda pada permukaan plat di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm
- diamati noda yang terbentuk dengan cara dilingkari dengan pensil (dicatat warna pada masing-masing spot)
- dihitung nilai R_f

Hasil

Senyawa	Eluen	Pereaksi	Pengamatan Warna
Steroid	1. n-heksana:aseton (3,5:1,5) 2. n-heksana:etil asetat (4,5:0,5) 3. n-heksana:etil asetat (4:1) 4. n-heksana:etil asetat (3:2) 5. n-heksana:etil asetat (3,5:1,5)	Lieberman-Burchard	Hijau, hijau-biru, pink, ungu

Lampiran 2 Perhitungan dan Pembuatan Reagen dan Larutan

L.2.1 Perhitungan dan Pembuatan Larutan Stok Media Ekstrak Tauge 4 %

Sebanyak 4 mL ekstrak tauge (air rebusan tauge) dilarutkan dalam 100 mL aquades.

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi Media Ekstrak Tauge} &= \frac{\text{Volume Ekstrak Tauge}}{\text{Volume larutan}} \\ &= \frac{4 \text{ mL ekstrak tauge}}{96 \text{ mL aquades}} = 4 \% \end{aligned}$$

L.2.2 Pembuatan Larutan HCl 2N

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Cara pembuatan larutan HCl 2 N adalah dipipet 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 sampai homogen.

L.2.3 Pembuatan Larutan NaHCO₃ 5 % (b/v)

Sebanyak 5 gram natrium bikarbonat dilarutkan dengan aquades dalam beaker glass. Kemudian dimasukkan dalam labu takar 100 mL, ditambahkan aquades sampai tanda batas lalu dihomogenkan.

L.2.4 Pembuatan HCl 2 %

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 37 \% \times V_1 &= 2 \% \times 10 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Cara pembuatannya adalah dipipet larutan HCl pekat 37 % sebanyak 0,5 mL kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang berisi ± 5 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.2.5 Pembuatan Metanol 50%

$$\begin{aligned} M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\ 99,8 \% \times V_1 &= 50 \% \times 10 \text{ mL} \\ V_1 &= 5 \text{ mL} \end{aligned}$$

Cara pembuatannya adalah diambil larutan metanol 99,8 % sebanyak 5 mL kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang berisi ± 5 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

L.2.6 Pembuatan Reagen Lieberman-Burchard

- Asam sulfat pekat 5 mL
- Anhidrida asetat 5 mL

- Etanol absolute 50 mL

Cara pembuatannya adalah asam sulfat pekat 5 mL dan anhidrida asetat 5 mL dicampur ke dalam etanol absolut 50 mL, kemudian didinginkan dalam lemari pendingin 5–10 menit. Penggunaan reagen ini digunakan langsung setelah pembuatan (Wagner and Bladt, 2001).

L.2.7 Pembuatan Reagen Dragendorff

Larutan I. 6 g $\text{Bi}(\text{NH}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dalam 2 mL HCl pekat dan 10 mL H_2O .

Larutan II. 6 g KI dalam 10 mL H_2O .

Cara pembuatannya adalah larutan I dibuat dengan 0,6 g $\text{Bi}(\text{NH}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yang dilarutkan ke dalam 2 mL HCl pekat dan 10 mL aquades dan larutan II dibuat dengan 6 g KI yang dilarutkan ke dalam 10 mL aquades. Kedua larutan tersebut dicampur dengan 7 mL HCl pekat dan 15 mL H_2O . Pereaksi Dragendorff ini harus disimpan dalam botol yang berwarna gelap.

L.2.8 Pembuatan Reagen Mayer

Larutan I. HgCl_2 1,358 g dalam aquades 60 mL

Larutan II. KI 5 g dalam aquades 10 mL

Cara pembuatannya adalah larutan I dibuat dengan HgCl_2 1,358 g yang dilarutkan dengan aquades 60 mL dan larutan II dibuat dengan KI 5 g yang dilarutkan dengan aquades 10 mL. Larutan I dituangkan ke dalam larutan II, diencerkan dengan aquades sampai tanda batas pada labu ukur 100 mL (Manan, 2006: 71).

L.2.9 Pembuatan FeCl₃ 1%

$$\text{BM FeCl}_3 = 162,2 \text{ g/mol}$$

$$\text{Massa FeCl}_3 = \frac{1\% \times \text{BM FeCl}_3 \times V}{22,4}$$

$$\text{Massa FeCl}_3 = \frac{1\% \times 162,2 \times 0,01 \text{ L}}{22,4}$$

$$\text{Massa FeCl}_3 = 0,072 \text{ g} = 72 \text{ mg}$$

Jadi untuk membuat larutan FeCl₃ 1 % diambil sebanyak 72 mg serbuk FeCl₃ dan dilarutkan hingga volume 10 mL.

L.2.10 Pembuatan Larutan Gelatin

Cara pembuatan larutan gelatin adalah 2,5 g serbuk gelatin dicampur dengan 50 mL larutan garam NaCl jenuh, kemudian dipanaskan sampai gelatin larut seluruhnya. Setelah dingin, ditambahkan larutan NaCl jenuh kemudian ditandabatkan dalam labu ukur 100 mL dan dikocok hingga homogen.

Lampiran 3 Perhitungan Konsentrasi Larutan Ekstrak untuk Uji Toksisitas

L.3.1 Pembuatan larutan stok dari ekstrak *Chlorella sp.* :

Larutan stok yang akan dibuat adalah 10 mL larutan ekstrak 1000 ppm.

Maka:

$$1000 \text{ ppm} = \text{mg/L}$$

$$1000 \text{ ppm} = \text{mg}/10 \text{ mL}$$

$$1000 \text{ ppm} = \text{mg}/10 \cdot 10^{-3} \text{ L}$$

$$10^3 \text{ ppm} = \text{mg}/10^{-2} \text{ L}$$

$$\text{mg} = 10^3 \times 10^{-2} = 10 \text{ mg}$$

Jadi, larutan stok 1000 ppm pada masing-masing ekstrak dibuat dengan dilarutkan 10 mg ekstrak sampel ke dalam 10 mL masing-masing pelarutnya.

L.3.2 Pembuatan larutan ekstrak 30 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 30 \text{ ppm}$$

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 30 \times 10^{-2} \text{ L} \cdot \text{ppm}$$

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 3 \times 10^{-1} \text{ L}$$

$$V_1 = 3 \times 10^{-1} \text{ L} / 10^3$$

$$V_1 = 3 \times 10^{-4} \text{ L}$$

$$V_1 = 3 \times 10^{-4} / 10^{-6} \mu\text{L} = 3 \times 10^2 \mu\text{L} = 300 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 30 ppm dibuat dengan memipet 300 μL larutan stok kemudian dilarutkan dalam 10 mL pelarutnya.

L.3.2 Pembuatan larutan ekstrak 25 ppm

$$V_1.M_1 = V_2.M_2$$

$$V_1. 1000 \text{ ppm} = 10. 10^{-3} \text{ L. } 25 \text{ ppm}$$

$$V_1. 1000 \text{ ppm} = 25 \times 10^{-2} \text{ L. ppm}$$

$$V_1 = 25 \times 10^{-2} \text{ L} / 10^3$$

$$V_1 = 25 \times 10^{-5} \text{ L}$$

$$V_1 = 25 \times 10^{-5} / 10^{-6} \mu\text{L} = 25 \times 10 \mu\text{L} = 250 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 25 ppm dibuat dengan memipet 250 μL larutan stok kemudian dilarutkan dalam 10 mL pelarutnya.

L.3.3 Pembuatan larutan ekstrak 20 ppm

$$V_1.M_1 = V_2.M_2$$

$$V_1. 1000 \text{ ppm} = 10. 10^{-3} \text{ L. } 20 \text{ ppm}$$

$$V_1. 1000 \text{ ppm} = 20 \times 10^{-2} \text{ L. ppm}$$

$$V_1. 1000 \text{ ppm} = 2 \times 10 \times 10^{-2} \text{ L}$$

$$V_1. 1000 \text{ ppm} = 2 \times 10^{-1} \text{ L}$$

$$V_1 = 2 \times 10^{-1} \text{ L} / 10^3$$

$$V_1 = 2 \times 10^{-4} \text{ L}$$

$$V_1 = 2 \times 10^{-4} / 10^{-6} \mu\text{L} = 2 \times 10^2 \mu\text{L} = 200 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 20 ppm dibuat dengan memipet 200 μL larutan stok kemudian dilarutkan dalam 10 mL pelarutnya.

L.3.4 Pembuatan larutan ekstrak 15 ppm

$$V_1.M_1 = V_2.M_2$$

$$V_1. 1000 \text{ ppm} = 10. 10^{-3} \text{ L. } 15 \text{ ppm}$$

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 15 \times 10^{-2} \text{ L} \cdot \text{ppm}$$

$$V_1 = 15 \times 10^{-2} \text{ L} / 10^3$$

$$V_1 = 15 \times 10^{-5} \text{ L}$$

$$V_1 = 15 \times 10^{-5} / 10^{-6} \mu\text{L} = 15 \times 10 \mu\text{L} = 150 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 15 ppm dibuat dengan memipet 150 μL larutan stok kemudian dilarutkan dalam 10 mL pelarutnya.

L.3.5 Pembuatan larutan ekstrak 10 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 10 \text{ ppm}$$

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \times 10^{-2} \text{ L} \cdot \text{ppm}$$

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 1 \times 10 \times 10^{-2} \text{ L}$$

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 1 \times 10^{-1} \text{ L}$$

$$V_1 = 1 \times 10^{-1} \text{ L} / 10^3$$

$$V_1 = 1 \times 10^{-4} \text{ L}$$

$$V_1 = 1 \times 10^{-4} / 10^{-6} \mu\text{L} = 1 \times 10^2 \mu\text{L} = 100 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 10 ppm dibuat dengan memipet 100 μL larutan stok kemudian dilarutkan dalam 10 mL pelarutnya.

L.3.6 Pembuatan larutan ekstrak 5 ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot 5 \text{ ppm}$$

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 5 \times 10^{-2} \text{ L} \cdot \text{ppm}$$

$$V_1 = 5 \times 10^{-2} \text{ L} / 10^3$$

$$V_1 = 5 \times 10^{-5} \text{ L}$$

$$V_1 = 5 \times 10^{-5} / 10^{-6} \mu\text{L} = 5 \times 10 \mu\text{L} = 50 \mu\text{L}$$

Jadi, larutan ekstrak 5 ppm dibuat dengan memipet 50 μL larutan stok kemudian dilarutkan dalam 10 mL pelarutnya.



Lampiran 4 Perhitungan Kadar Air

Data Pengukuran Kadar Air Kering

Ulangan Cawan	Berat Cawan Kosong (g)				Rata-rata Berat Konstan (g)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
A1	53,8110	53,8108	53,8107	53,8107	53,8107
A2	61,0550	61,0547	61,0550	61,0541	61,0546
A3	57,0269	57,0259	57,0253	57,0250	57,0254

Ulangan Sampel	Berat Cawan + Sampel (g)						Rata-rata Berat Konstan (g)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	P4	P5	
B1	54,8118	54,7618	54,7568	54,7327	54,7324	54,7322	54,7324
B2	62,0550	61,9945	61,9864	61,9831	61,9811	61,9796	61,9812
B3	58,0250	57,9604	57,9525	57,9493	57,9476	57,9461	57,9476

Keterangan: P= perlakuan

Tanda merah menunjukkan berat yang telah konstan

$$\text{Kadar air} = \frac{(\text{Berat cawan+sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan konstan+sampel setelah dikeringkan})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100 \%$$

$$\text{Faktor Koreksi} = \frac{100}{100 \% - \% \text{ kadar air}}$$

1. Kadar air ulangan ke-1

$$\text{Kadar air} = \frac{(\text{Berat cawan+sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan konstan+sampel setelah dikeringkan})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100 \%$$

$$= \frac{(54,8118 - 54,7324)}{(54,8118 - 53,8107)} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,0794}{1,0011} \times 100 \%$$

$$= 0,0793 \times 100 \%$$

$$= 7,93 \%$$

$$\text{Faktor Koreksi} = \frac{100}{100 \% - \% \text{ kadar air}}$$

$$= \frac{100}{100 \% - 7,93 \%$$

$$= \frac{100}{92,07 \%} = 1,0861 \%$$

2. Kadar air ulangan ke-2

$$\text{Kadar air} = \frac{(\text{Berat cawan+sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan konstan+sampel setelah dikeringkan})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100 \%$$

$$= \frac{(62,0550 - 61,9812)}{(62,0550 - 61,0546)} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,0738}{1,0004} \times 100 \%$$

$$= 0,0737 \times 100 \%$$

$$= 7,37 \%$$

$$\text{Faktor Koreksi} = \frac{100}{100 \% - \% \text{ kadar air}}$$

$$= \frac{100}{100 \% - 7,37 \%$$

$$= \frac{100}{92,63 \%$$

$$= 1,0756 \%$$

3. Kadar air ulangan ke-3

$$\text{Kadar air} = \frac{(\text{Berat cawan+sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan konstan+sampel setelah dikeringkan})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dikeringkan}) - (\text{berat cawan kosong})} \times 100 \%$$

$$= \frac{(58,0250 - 57,9476)}{(58,0250 - 57,0254)} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,0774}{0,9996} \times 100 \%$$

$$= 0,0774 \times 100 \%$$

$$= 7,74 \%$$

$$\text{Faktor Koreksi} = \frac{100}{100 \% - \% \text{ kadar air}}$$

$$= \frac{100}{100 \% - 7,74 \%$$

$$= \frac{100}{92,96 \%$$

$$= 1,07573 \%$$

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

P1(%)	P2 (%)	P3 (%)	Rata-rata (%)
7,93	7,37	7,74	7,68



Lampiran 5 Perhitungan Rendemen

L.5.1 Perhitungan Rendemen Hasil Pengeringan

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.	85,7710	204,5300	118,7590	5,7074
2.	88,4910	168,5224	80,0314	
3.	156,5700	202,6624	46,0924	
Total			244,8828	

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat kering}}{\text{Berat basah}} \times 100 \% \\
 &= \frac{5,7074 \text{ g}}{244,8828 \text{ g}} \times 100 \% \\
 &= 0,0233 \times 100 \\
 &= 2,33 \%
 \end{aligned}$$

L.5.2 Perhitungan Rendemen Hasil Maserasi

Berat sampel (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + ekstrak pekat (g)	Berat ekstrak pekat (g)
6,7789	89,6360	90,5427	0,9067

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,9067}{6,7789} \times 100 \% \\
 &= 0,1337 \times 100 \% \\
 &= 13,37 \%
 \end{aligned}$$

L.5.3 Perhitungan Rendemen Hasil Partisi

➤ Partisi fraksi n-Heksana

Berat ekstrak metanol yang dihidrolisis (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + ekstrak n-heksana (g)	Berat ekstrak n-heksana (g)
1,0018	86,8616	87,1900	0,3284

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,3284}{1,0018} \times 100 \% \\
 &= 0,327809 \times 100 \% \\
 &= 32,7809 \%
 \end{aligned}$$

➤ Partisi fraksi petroleum eter

Berat ekstrak metanol yang dihidrolisis (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + ekstrak PE (g)	Berat ekstrak PE (g)
1,0018	70,1087	70,2295	0,1208

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,1208}{1,0018} \times 100 \% \\
 &= 0,120582 \times 100 \% \\
 &= 12,0582 \%
 \end{aligned}$$

➤ Partisi fraksi kloroform

Berat ekstrak metanol yang dihidrolisis (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + ekstrak kloroform (g)	Berat ekstrak kloroform (g)
1,0018	73,9609	74,0546	0,0937

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,0937}{1,0018} \times 100 \% \\
 &= 0,093531 \times 100 \% \\
 &= 9,3531 \%
 \end{aligned}$$

➤ Partisi fraksi etil setat

Berat ekstrak metanol yang dihidrolisis (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + ekstrak etil asetat (g)	Berat ekstrak etil asetat (g)
1,0018	90,6717	90,7538	0,0821

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,0821}{1,0018} \times 100 \% \\
 &= 0,081952 \times 100 \% \\
 &= 8,1952 \%
 \end{aligned}$$

➤ Partisi fraksi fasa air

Berat ekstrak metanol yang dihidrolisis (g)	Berat wadah (g)	Berat wadah + ekstrak fasa air (g)	Berat ekstrak fasa air (g)
1,0018	83,7659	83,8646	0,0987

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,0987}{1,0018} \times 100 \% \\
 &= 0,098522 \times 100 \% \\
 &= 9,8522 \%
 \end{aligned}$$

Lampiran 6 Data Kematian Larva dan Perhitungan Nilai LC₅₀ Ekstrak Mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan Minitab 16

L.6.1 Ekstrak Metanol

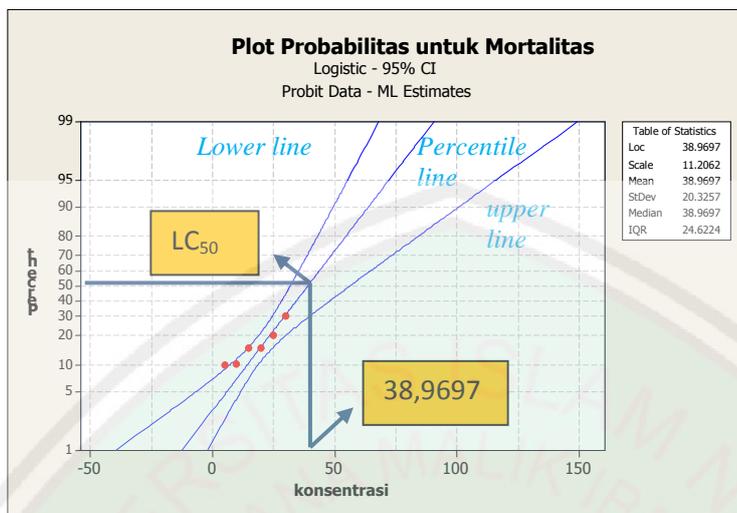
$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{Modus}}{\text{jumlah larva yang dimasukkan}} \times 100 \%$$

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

Keterangan: * : kontrol pelarut
 ** : kontrol DMSO
 *** : kontrol air laut

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

Konsentrasi	Jumlah hewan uji	Mortalitas
0*	30	0
0**	30	0
0***	30	0
5	30	3
10	30	3
15	30	6
20	30	3
25	30	6
30	30	9



Gambar L.6.1 Kurva mortalitas *Artemia salina* Leach ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* dengan nilai $LC_{50} = 38,9697$ ppm

Probit Analysis: mortalitas, jumlah larva versus konsentrasi

Distribution: Logistic
 Response Information
 Variable Value Count
 mortalitas Success 30
 Failure 240
 jumlah larva Total 270
 Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-3.47753	0.446401	-7.79	0.000
konsentrasi	0.0892367	0.0205389	4.34	0.000

Natural Response = 0
 Log-Likelihood = -82.894

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	8.8406	5	0.116
Deviance	10.5722	5	0.061

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Location	38.9697	5.05460	29.0629	48.8766
Scale	11.2062	2.57923	7.13744	17.5943

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-12.5239	7.68239	-39.4043	-1.93459
2	-4.64262	5.97394	-25.2563	3.70720
3	0.0160194	4.99916	-16.9653	7.11397

4	3.35596	4.32876	-11.0807	9.61591
5	5.97388	3.82921	-6.52364	11.6324
6	8.13559	3.44167	-2.81544	13.3522
7	9.98288	3.13519	0.297688	14.8776
8	11.6004	2.89161	2.96604	16.2709
9	13.0428	2.69929	5.28574	17.5729
10	14.3473	2.55019	7.32217	18.8121
20	23.4347	2.46049	18.9733	29.9793
30	29.4748	3.25509	24.4581	39.6611
40	34.4260	4.14746	28.3873	48.1643
50	38.9697	5.05460	31.8014	56.1594
60	43.5134	6.00698	35.1207	64.2493
70	48.4647	7.07489	38.6760	73.1265
80	54.5048	8.40318	42.9614	84.0076
90	63.5922	10.4320	49.3478	100.440
91	64.8967	10.7253	50.2607	102.802
92	66.3390	11.0499	51.2691	105.416
93	67.9566	11.4145	52.3990	108.347
94	69.8039	11.8315	53.6882	111.697
95	71.9656	12.3201	55.1955	115.617
96	74.5835	12.9128	57.0190	120.367
97	77.9234	13.6701	59.3430	126.430
98	82.5821	14.7285	62.5807	134.890
99	90.4634	16.5231	68.0500	149.210

L.6.2 Ekstrak Etil Asetat

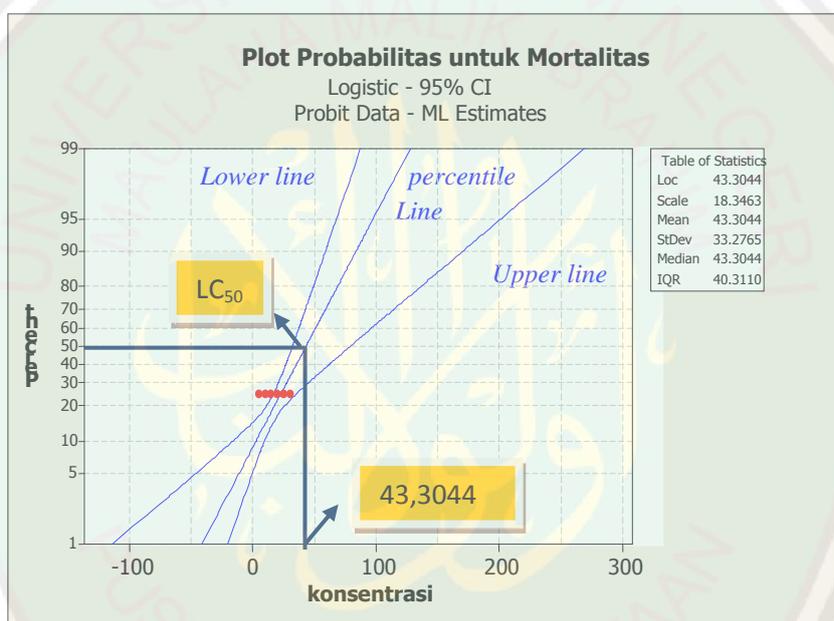
$$\% \text{ Mortalitas} = \frac{\text{Modus}}{\text{jumlah larva yang dimasukkan}} \times 100 \%$$

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

Keterangan: * : kontrol pelarut
 ** : kontrol DMSO
 *** : kontrol air laut

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

Konsentrasi	Jumlah hewan uji	Mortalitas
0*	30	0
0**	30	0
0***	30	0
5	30	3
10	30	3
15	30	6
20	30	6
25	30	6
30	30	6



Gambar L.6.2 Kurva mortalitas *Artemia salina* Leach fraksi etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* dengan nilai LC₅₀= 43,3044 ppm

Probit Analysis: mortalitas, jumlah larva versus konsentrasi

Distribution: Logistic
 Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Success	45
	Failure	225
jumlah larva	Total	270

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-2.36039	0.297260	-7.94	0.000
konsentrasi	0.0545069	0.0155077	3.51	0.000

Natural
Response 0

Log-Likelihood = -115.166

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	25.9514	5	0.000
Deviance	30.3046	5	0.000

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Location	43.3044	8.39790	26.8448	59.7640
Scale	18.3463	5.21969	10.5045	32.0423

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-40.9991	16.4593	-113.209	-20.0837
2	-28.0961	12.8711	-84.2059	-11.6359
3	-20.4692	10.7764	-67.1148	-6.58950
4	-15.0012	9.29588	-54.9049	-2.92824
5	-10.7152	8.15502	-45.3749	-0.0179975
6	-7.17612	7.23233	-37.5463	2.42569
7	-4.15180	6.46379	-30.8990	4.55662
8	-1.50366	5.81203	-25.1249	6.46887
9	0.857735	5.25383	-20.0278	8.22575
10	2.99344	4.77426	-15.4765	9.87346
20	17.8710	3.12745	11.3485	26.2312
30	27.7596	4.57774	21.0667	45.2151
40	35.8656	6.47480	27.1445	62.6652
50	43.3044	8.39790	32.3160	79.0852
60	50.7432	10.3964	37.3290	95.6635
70	58.8492	12.6180	42.7018	113.819
80	68.7378	15.3619	49.1880	136.035
90	83.6153	19.5275	58.8722	169.533
91	85.7510	20.1278	60.2578	174.347
92	88.1124	20.7920	61.7888	179.670
93	90.7606	21.5374	63.5047	185.640
94	93.7849	22.3894	65.4629	192.460
95	97.3240	23.3872	67.7530	200.442
96	101.610	24.5965	70.5244	210.111
97	107.078	26.1408	74.0574	222.449
98	114.705	28.2968	78.9813	239.663
99	127.608	31.9486	87.3028	268.793

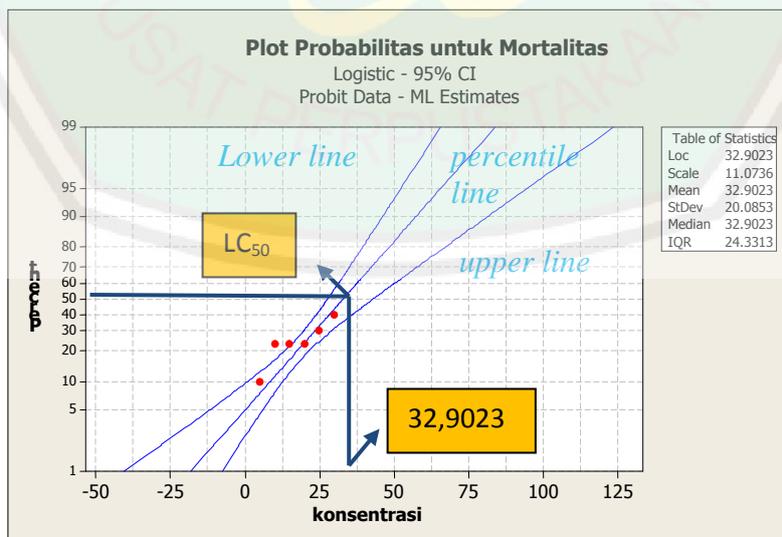
L.6.3 Ekstrak Kloroform

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

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

Mortalitas= % Mortalitas x jumlah hewan uji

Konsentrasi	Jumlah hewan uji	Mortalitas
0*	30	0
0**	30	0
0***	30	0
5	30	3
10	30	9
15	30	6
20	30	6
25	30	9
30	30	12



Gambar L.6.3 Kurva mortalitas *Artemia salina* Leach fraksi kloroform mikroalga *Chlorella sp.* dengan nilai $LC_{50} = 32,9023$ ppm

Probit Analysis: mortalitas, jumlah larva versus konsentrasi

Distribution: Logistic

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Success	45
	Failure	225
jumlah larva	Total	270

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-2.97123	0.360584	-8.24	0.000
konsentrasi	0.0903046	0.0173126	5.22	0.000

Natural Response = 0
Log-Likelihood = -105.480

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	16.2639	5	0.006
Deviance	17.7224	5	0.003

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Location	32.9023	3.41421	26.2105	39.5940
Scale	11.0736	2.12296	7.60508	16.1241

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-17.9824	7.20540	-40.2949	-7.57445
2	-10.1943	5.78097	-27.9549	-1.77761
3	-5.59078	4.95802	-20.6989	1.68711
4	-2.29034	4.38232	-15.5257	4.20004
5	0.296623	3.94331	-11.4959	6.19475
6	2.43277	3.59200	-8.19146	7.86495
7	4.25821	3.30243	-5.38985	9.31443
8	5.85660	3.05926	-2.95864	10.6056
9	7.28192	2.85273	-0.812713	11.7789
10	8.57100	2.67625	1.10574	12.8625
20	17.5509	1.93764	13.3409	21.5398
30	23.5196	2.18372	19.6904	29.0900
40	28.4123	2.74830	24.0383	36.1363
50	32.9023	3.41421	27.7020	42.9289
60	37.3922	4.15240	31.2132	49.8739
70	42.2849	5.00163	34.9470	57.5342
80	48.2536	6.07308	39.4301	66.9509
90	57.2335	7.72456	46.0960	81.1975
91	58.5226	7.96407	47.0481	83.2474
92	59.9479	8.22941	48.0997	85.5151
93	61.5463	8.52757	49.2778	88.0593
94	63.3717	8.86878	50.6220	90.9662
95	65.5079	9.26888	52.1932	94.3696
96	68.0949	9.75448	54.0940	98.4934
97	71.3953	10.3754	56.5162	103.757
98	75.9988	11.2437	59.8905	111.104
99	83.7869	12.7172	65.5901	123.541

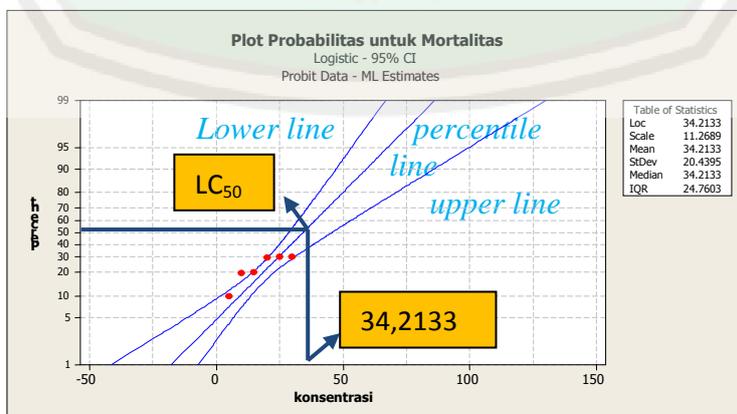
L.6.4 Ekstrak n-Heksana

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

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

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

Konsentrasi	Jumlah hewan uji	Mortalitas
0*	30	0
0**	30	0
0***	30	0
5	30	3
10	30	6
15	30	3
20	30	6
25	30	3
30	30	9



Gambar L.6.4 Kurva mortalitas *Artemia salina* Leach fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella sp.* dengan nilai $LC_{50} = 34,2133$ ppm

Probit Analysis: mortalitas, jumlah larva versus konsentrasi

Distribution: Logistic

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Success	42
	Failure	228
jumlah larva	Total	270

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-3.03608	0.371036	-8.18	0.000
konsentrasi	0.0887399	0.0177055	5.01	0.000

Natural Response = 0
Log-Likelihood = -101.841

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	10.7078	5	0.057
Deviance	14.1739	5	0.015

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Location	34.2133	3.74709	26.8691	41.5574
Scale	11.2689	2.24839	7.62163	16.6615

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-17.5686	7.44748	-41.1922	-6.92118
2	-9.64324	5.94037	-28.3242	-1.07679
3	-4.95852	5.07081	-20.7608	2.42068
4	-1.59988	4.46363	-15.3713	4.96113
5	1.03270	4.00177	-11.1758	6.98132
6	3.20651	3.63341	-7.73847	8.67650
7	5.06414	3.33111	-4.82743	10.1514
8	6.69072	3.07871	-2.30473	11.4692
9	8.14116	2.86592	-0.0818292	12.6709
10	9.45298	2.68582	1.90135	13.7850
20	18.5913	2.01252	14.3453	22.9171
30	24.6652	2.37189	20.6243	30.9790
40	29.6441	3.01798	24.9379	38.4210
50	34.2133	3.74709	28.5968	45.5502
60	38.7824	4.54261	32.1157	52.8193
70	43.7614	5.45105	35.8648	60.8259
80	49.8353	6.59254	40.3710	70.6605
90	58.9735	8.34740	47.0756	85.5320
91	60.2854	8.60165	48.0334	87.6715
92	61.7358	8.88327	49.0914	90.0380
93	63.3624	9.19967	50.2767	92.6931
94	65.2200	9.56168	51.6291	95.7267
95	67.3938	9.98610	53.2102	99.2782
96	70.0264	10.5011	55.1228	103.581
97	73.3850	11.1596	57.5603	109.074
98	78.0698	12.0801	60.9558	116.739
99	85.9952	13.6419	66.6916	129.716

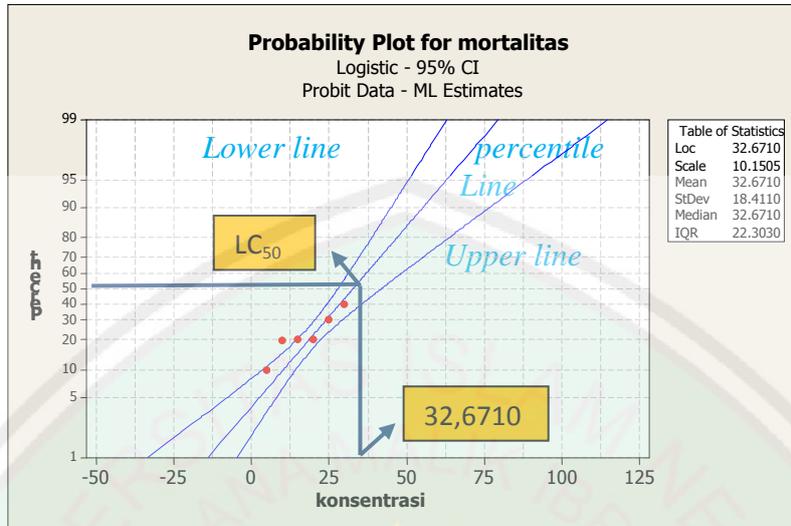
L.6.5 Ekstrak Petroleum Eter

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

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

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

Konsentrasi	Jumlah hewan uji	Mortalitas
0*	30	0
0**	30	0
0***	30	0
5	30	3
10	30	6
15	30	6
20	30	6
25	30	9
30	30	12



Gambar L.6.5 Kurva mortalitas *Artemia salina* Leach fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* dengan nilai $LC_{50} = 32,6710$ ppm

Probit Analysis: mortalitas, jumlah larva versus konsentrasi

Distribution: Logistic

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Success	42
	Failure	228
jumlah larva	Total	270

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-3.21866	0.393514	-8.18	0.000
konsentrasi	0.0985172	0.0184232	5.35	0.000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -99.034

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	8.9303	5	0.112
Deviance	11.4590	5	0.043

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Location	32.6710	3.15160	26.4940	38.8481
Scale	10.1505	1.89819	7.03573	14.6442

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-13.9718	6.42808	-33.5581	-4.61000
2	-6.83293	5.16276	-22.4268	0.752108

3	-2.61314	4.43408	-15.8858	3.96037
4	0.412166	3.92607	-11.2255	6.28972
5	2.78348	3.54014	-7.59787	8.14065
6	4.74155	3.23262	-4.62546	9.69212
7	6.41482	2.98034	-2.10743	11.0400
8	7.87997	2.76962	0.0758246	12.2417
9	9.18646	2.59172	2.00119	13.3349
10	10.3681	2.44074	3.72096	14.3451
20	18.5994	1.83679	14.6720	22.4115
30	24.0705	2.06842	20.4334	29.2904
40	28.5554	2.56541	24.4376	35.6478
50	32.6710	3.15160	27.8259	41.7682
60	36.7867	3.80376	31.0751	48.0279
70	41.2715	4.55634	34.5292	54.9353
80	46.7426	5.50822	38.6745	63.4303
90	54.9740	6.97842	44.8347	76.2875
91	56.1556	7.19184	45.7143	78.1380
92	57.4621	7.42833	46.6858	80.1849
93	58.9273	7.69412	47.7742	82.4816
94	60.6005	7.99835	49.0158	85.1059
95	62.5586	8.35517	50.4671	88.1785
96	64.9299	8.78832	52.2226	91.9015
97	67.9552	9.34234	54.4596	96.6542
98	72.1750	10.1173	57.5755	103.288
99	79.3139	11.4327	62.8381	114.518

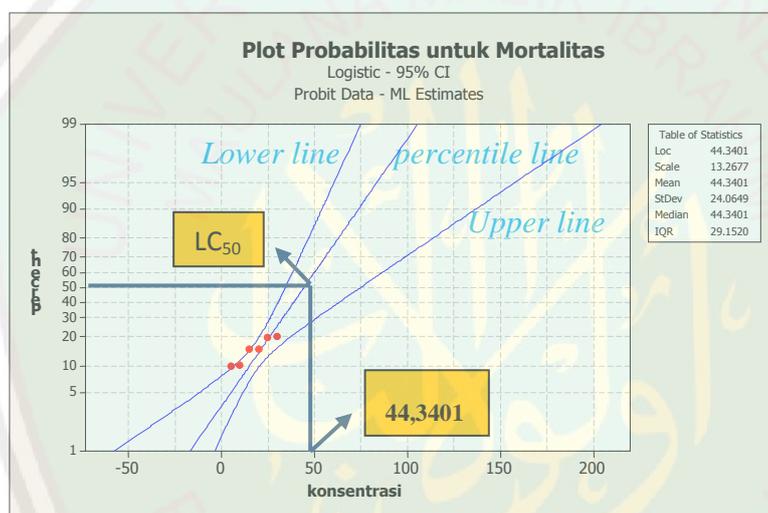
L.6.6 Ekstrak Fasa Air

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

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

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

Konsentrasi	Jumlah hewan uji	Mortalitas
0*	30	0
0**	30	0
0***	30	0
5	30	3
10	30	3
15	30	6
20	30	3
25	30	6
30	30	6



Gambar L.6.5 Kurva mortalitas *Artemia salina* Leach fraksi air mikroalga *Chlorella sp.* dengan nilai $LC_{50} = 44,3401$ ppm

Probit Analysis: mortalitas, jumlah larva versus konsentrasi

Distribution: Logistic

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Success	27
	Failure	243
jumlah larva	Total	270

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-3.34197	0.432525	-7.73	0.000
konsentrasi	0.0753712	0.0204235	3.69	0.000

Natural

Response = 0

Log-Likelihood = -80.079

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	9.5654	5	0.089

Deviance 11.5706 5 0.041
 Tolerance Distribution
 Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95.0% Normal CI	
			Lower	Upper
Location	44.3401	7.52455	29.5923	59.0880
Scale	13.2677	3.59516	7.80087	22.5656

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95.0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-16.6264	9.92358	-57.2297	-3.64908
2	-7.29523	7.52948	-37.5993	2.71486
3	-1.77957	6.16499	-26.1011	6.58190
4	2.17479	5.23069	-17.9519	9.44850
5	5.27431	4.54094	-11.6589	11.7900
6	7.83370	4.01474	-6.56315	13.8241
7	10.0208	3.61015	-2.31860	15.6723
8	11.9359	3.30285	1.27678	17.4119
9	13.6436	3.07713	4.35054	19.0954
10	15.1881	2.92148	6.98989	20.7586
20	25.9473	3.42798	20.4128	37.3081
30	33.0985	4.82628	26.2760	51.3665
40	38.9606	6.19319	30.5656	63.4072
50	44.3401	7.52455	34.3361	74.6228
60	49.7197	8.89561	38.0238	85.9213
70	55.5818	10.4165	41.9874	98.2880
80	62.7330	12.2950	46.7758	113.421
90	73.4922	15.1494	53.9236	136.246
91	75.0367	15.5610	54.9460	139.526
92	76.7444	16.0165	56.0756	143.154
93	78.6595	16.5278	57.3414	147.223
94	80.8466	17.1123	58.7859	151.871
95	83.4060	17.7970	60.4750	157.312
96	86.5055	18.6270	62.5187	163.903
97	90.4599	19.6872	65.1237	172.313
98	95.9755	21.1679	68.7535	184.049
99	105.307	23.6769	74.8863	203.910

Lampiran 7 Perhitungan Nilai Rf (*Retardation Factor*) Hasil KLT Ekstrak Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella sp.*

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{Jarak senyawa yang digerakkan dari titik asal}}{\text{Jarak pelarut yang digerakkan dari titik asal}}$$

a. Eluen n-heksana:aseton (3,5:1,5)

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

$$\text{Harga Rf}_1 = \frac{0,2}{8} = 0,025$$

$$\text{Rf}_8 = \frac{5,5}{8} = 0,6875$$

$$\text{Harga Rf}_2 = \frac{0,5}{8} = 0,0625$$

$$\text{Rf}_9 = \frac{6,3}{8} = 0,7875$$

$$\text{Harga Rf}_3 = \frac{1}{8} = 0,125$$

$$\text{Rf}_{10} = \frac{6,7}{8} = 0,8375$$

$$\text{Harga Rf}_4 = \frac{1,7}{8} = 0,2125$$

$$\text{Rf}_{11} = \frac{7,4}{8} = 0,925$$

$$\text{Harga Rf}_5 = \frac{2,5}{8} = 0,3125$$

$$\text{Rf}_{12} = \frac{7,7}{8} = 0,9625$$

$$\text{Harga Rf}_6 = \frac{2,9}{8} = 0,3625$$

$$\text{Rf}_{13} = \frac{7,9}{8} = 0,9875$$

$$\text{Harga Rf}_7 = \frac{4}{8} = 0,5$$

b. Eluen n-heksana:etil asetat (4,5:0,5)

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

$$\text{Harga Rf}_1 = \frac{0,3}{8} = 0,0375$$

$$\text{Rf}_4 = \frac{1,1}{8} = 0,1375$$

$$\text{Harga Rf}_2 = \frac{0,62}{8} = 0,0775$$

$$\text{Rf}_5 = \frac{3,5}{8} = 0,4375$$

$$\text{Harga Rf}_3 = \frac{0,8}{8} = 0,1$$

$$\text{Rf}_6 = \frac{5,2}{8} = 0,65$$

c. Eluen n-heksana:etil asetat (4:1)

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

$$\text{Harga Rf}_1 = \frac{0,2}{8} = 0,025$$

$$\text{Harga Rf}_2 = \frac{0,4}{8} = 0,05$$

$$\text{Harga Rf}_3 = \frac{0,7}{8} = 0,0875$$

$$\text{Harga Rf}_4 = \frac{1,2}{8} = 0,15$$

$$\text{Rf}_5 = \frac{4,1}{8} = 0,5125$$

$$\text{Rf}_6 = \frac{4,4}{8} = 0,55$$

$$\text{Rf}_7 = \frac{4,7}{8} = 0,5875$$

d. Eluen n-heksana:etil asetat (3:2)

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

$$\text{Harga Rf}_1 = \frac{0,2}{8} = 0,025$$

$$\text{Rf}_3 = \frac{8}{8} = 1$$

$$\text{Harga Rf}_2 = \frac{1,1}{8} = 0,1375$$

e. Eluen n-heksana:etil asetat (3,5:1,5)

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

$$\text{Harga Rf}_1 = \frac{0,2}{8} = 0,025$$

$$\text{Rf}_7 = \frac{5}{8} = 0,725$$

$$\text{Harga Rf}_2 = \frac{1}{8} = 0,125$$

$$\text{Rf}_8 = \frac{5,9}{8} = 0,7375$$

$$\text{Harga Rf}_3 = \frac{2}{8} = 0,25$$

$$\text{Rf}_9 = \frac{6,3}{8} = 0,7875$$

$$\text{Harga Rf}_4 = \frac{3,7}{8} = 0,4625$$

$$\text{Rf}_{10} = \frac{6,8}{8} = 0,85$$

$$\text{Harga Rf}_5 = \frac{4,2}{8} = 0,525$$

$$\text{Rf}_{12} = \frac{7,4}{8} = 0,925$$

$$\text{Harga Rf}_6 = \frac{4,6}{8} = 0,575$$

$$\text{Rf}_{13} = \frac{7,7}{8} = 0,9625$$

Lampiran 8 Dokumentasi Penelitian

L.8.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge 4 %



Perebusan Tauge



Medium Ekstrak Tauge (MET)

L.8.2 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.* dalam MET 4 %



Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*



Hari ke-0



Hari ke-1



Hari ke-2



Hari ke-3



Hari ke-4



Hari ke-5



Hari ke-6



Hari ke-7



Hari ke-8



Hari ke-9



Hari ke-10

L.8.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*



Pemisahan dengan Sentrifius

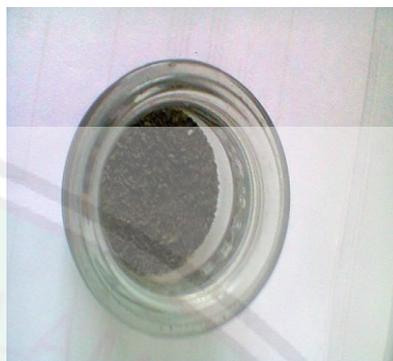


Pengambilan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

L.8.4 Preparasi Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*



Pengeringan dengan Kipas Angin



Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Pengeringan dan Pengerokan

L.8.5 Analisis Kadar Air Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*



Pengovenan



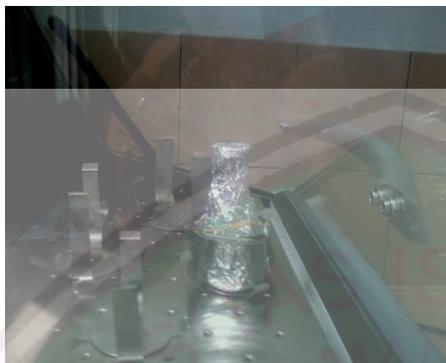
Sampel dalam desikator



Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Analisis Kadar Air

L.8.2 Ekstraksi

L.8.2.1 Ekstraksi Maserasi



Pengadukan dengan Menggunakan *Shaker*



Penyaringan dengan Corong *Buchner*



Pemekatan dengan *Rotary Evaporator Vacum*



Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*



L.8.2.2 Ekstraksi Cair-cair

L.8.2.2.1 Partisi Ekstrak Kasar Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Pelarut n-heksana



Proses Partisi:
Lapisan atas : Fraksi n-heksana
Lapisan bawah: Fasa air



Fraksi n-heksana mikroalga *Chlorella sp.*



L.8.2.2.2 Partisi Ekstrak Kasar Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Pelarut Petroleum Eter



Proses Partisi:
Lapisan atas : Fraksi petroleum eter
Lapisan bawah: Fasa air



Fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.*

L.8.2.2.3 Partisi Ekstrak Kasar Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Pelarut Kloroform



Proses Partisi:
Lapisan atas : Fraksi Air
Lapisan bawah : Fraksi kloroform



Fraksi kloroform mikroalga *Chlorella sp.*

L.8.2.2.4 Partisi Ekstrak Kasar Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Pelarut Etil Asetat



Proses Partisi: Fraksi etil asetat mikroalga
 Lapisan atas: Fraksi etil asetat *Chlorella sp.*
 Lapisan bawah: Fasa air

L.8.2.2.4 Fraksi Air



Fraksi air mikroalga *Chlorella sp.*

L.8.3 Uji Toksisitas



Penetasan larva udang *Artemia Salina* Leach



Pembuatan konsentrasi larutan uji



Pemasukan larva udang *Artemia salina*
Leach dalam larutan uji

L.8.5 Uji Reagen

L.8.5.1 Ekstrak Metanol



Alkaloid
Mayer (-)



Alkaloid
Dragendorff (-)



Flavonoid
(-)



Steroid
(+)



Tanin
FeCl₃ (-)



Tanin
Gelatin (+)

L.8.5.2 Ekstrak Etil Asetat



Alkaloid
Mayer (-)



Alkaloid
Dragendorff (-)



Flavonoid
(-)

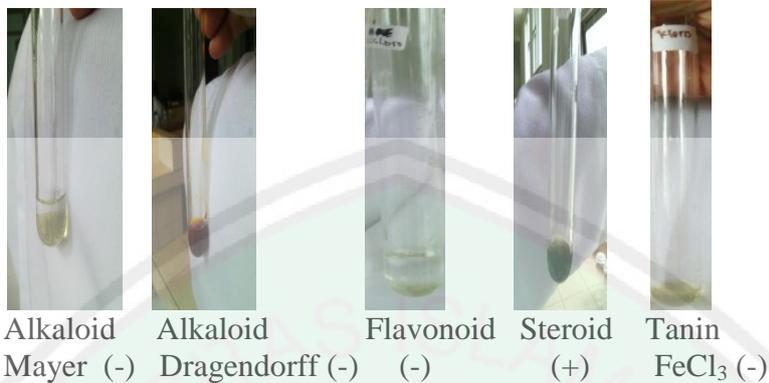


Steroid
(+)

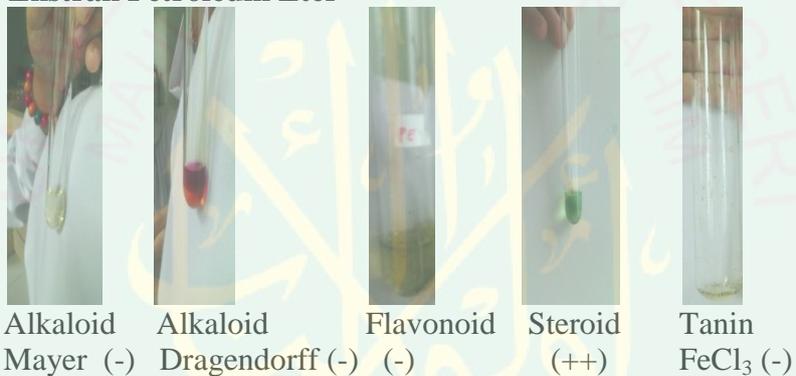


Tanin
FeCl₃ (-)

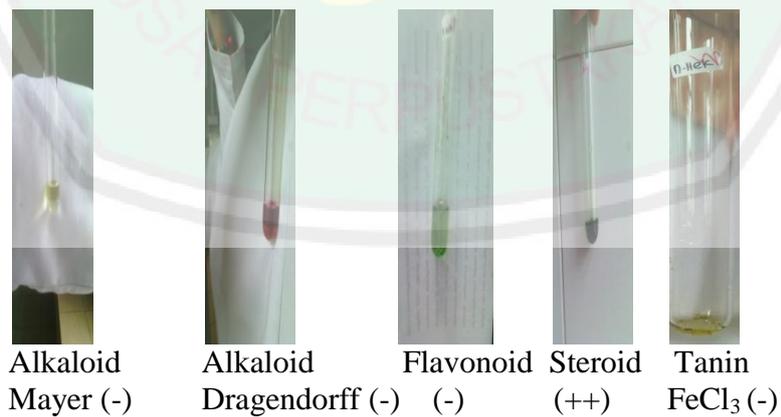
L.8.5.3 Ekstrak Kloroform



L.8.5.4 Ekstrak Petroleum Eter

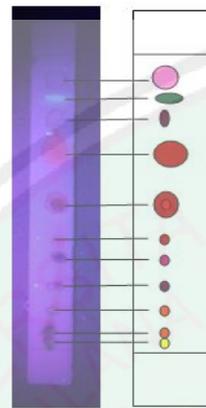


L.8.5.5 Ekstrak n-heksana



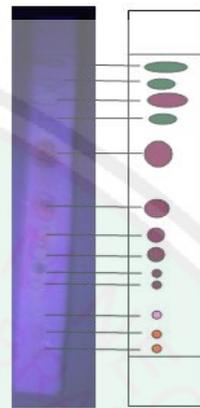
L.8.6 Kromatografi Lapis Tipis

L.3.6.1 Eluen n-Heksana:aseton (3,5:1,5)



(a)

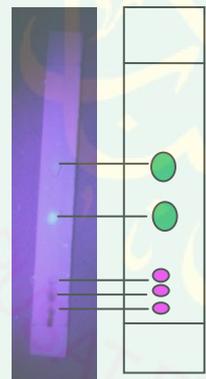
Sebelum disemprot LB



(b)

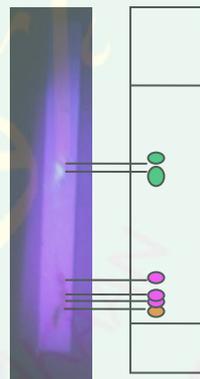
Setelah disemprot LB

L.3.6.2 Eluen n-Heksana:asam asetat (4,5:0,5)



(a)

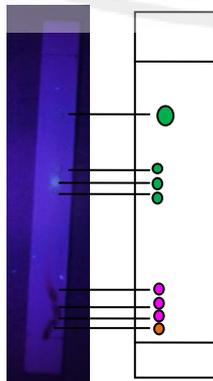
Sebelum disemprot LB



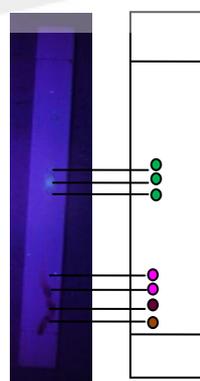
(b)

Setelah disemprot LB

L.3.6.3 Eluen n-Heksana:etil asetat (4:1)

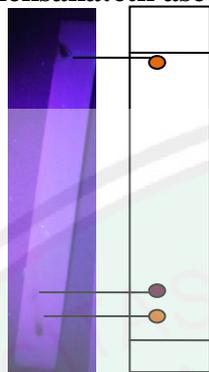


(a)



(b)

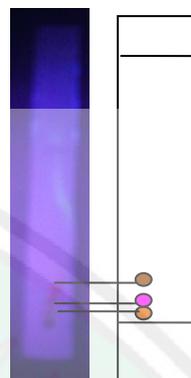
Sebelum disemprot LB
L.3.6.4 Eluen n-Heksana:etil asetat (3:2)



(a)

Sebelum disemprot LB

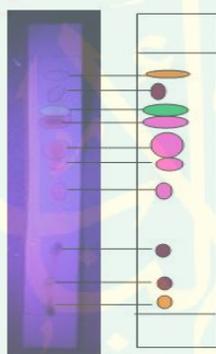
Setelah disemprot LB



(b)

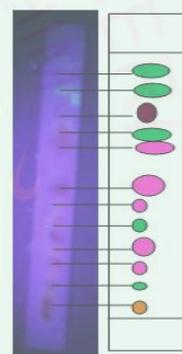
Setelah disemprot LB

L.8.6.5 Eluen n-Heksana:etil asetat (3,5:1,5)



(a)

Sebelum disemprot LB



(b)

Setelah disemprot LB

Lampiran 10 Tabel Rencana Penelitian

No.	Rencana Penelitian	Bulan																																			
		September				Oktober				November				Desember				Januari				Februari				Maret				April				Mei			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	Proposal																																				
2	Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>																																				
3	Preparasi sampel dan analisis kadar air																																				
4	Ekstraksi sampel																																				
5	Hidrolisis dan partisi sampel																																				
6	Uji Toksisitas																																				
7	Uji Fitokimia dan KLT																																				
8	Analisis Data																																				
9	Pembuatan Laporan																																				