

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI ETIL ASETAT,
KLOROFORM, PETROLEUM ETER, DAN N-HEKSANA HASIL
HIDROLISIS EKSTRAK METANOL MIKROALGA *Chlorella sp.***

SKRIPSI

Diajukan Kepada:

**Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

Oleh :

ONY NOVIA ANGGRAENI

NIM. 10630083

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

2014

**SURAT PERNYATAAN
ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ony Novia Anggraeni

NIM : 10630083

Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi/Kimia

Judul Penelitian : Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleu 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 mempertanggung jawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 02 Juli 2014

Yang Membuat Pernyataan,



Ony Novia Anggraeni
NIM. 10630083

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI ETIL ASETAT,
KLOROFORM, PETROLEUM ETER, DAN N-HEKSANA HASIL
HIDROLISIS EKSTRAK METANOL MIKROALGA *Chlorella sp.***

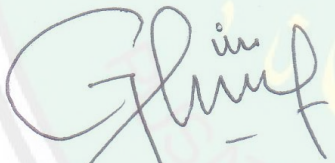
SKRIPSI

Oleh :
ONY NOVIA ANGGRAENI
NIM. 10630083

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji :
Tanggal : 02 Juli 2014

Pembimbing I

Pembimbing II

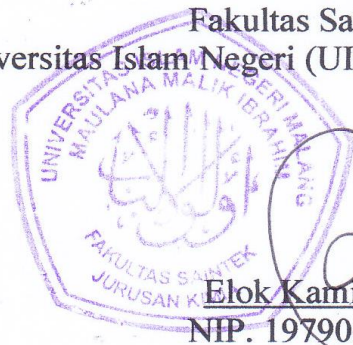


A. Ghanaim Fasya, M.Si
NIP. 19820616 200604 1 002



Dr. H. Munirul Abidin, M.Ag
NIP. 19720420 212 1 003

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 AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI ETIL ASETAT,
KLOROFORM, PETROLEUM ETER, DAN N-HEKSANA HASIL
HIDROLISIS EKSTRAK METANOL MIKROALGA *Chlorella sp.***

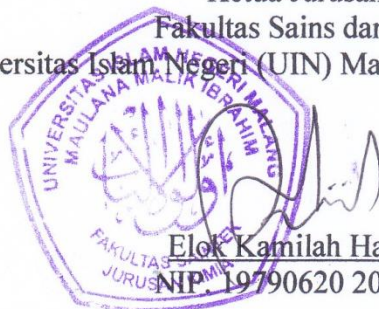
SKRIPSI

Oleh :
ONY NOVIA ANGGRAENI
NIM. 10630083

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal : 02 Juli 2014

Penguji Utama	: Rachmawati Ningsih, M.Si NIP. 19810811 200801 2 010	(..... )
Ketua Penguji	: Susi Nurul Khalifah, M.Si NIPT. 20130902 2 317	(..... )
Sekretaris Penguji	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	(..... )
Anggota Penguji	: Dr. H. Munirul Abidin, M.Ag NIP. 19720420 212 1 003	(..... )

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

LEMBAR PERSEMBAHAN

Kupersembahkan karya sederhanaku ini kepada:

Kedua orang tuaku ayah SetyoWiku Daniswara dan Ibu Aminah yang telah tak henti-hentinya melantunkan do'a, memberikan seluruh kebaikan untukku, memberikanku semangat dan motivasi hingga aku menjadi lebih baik. Terimakasih ayah dan ibu.

Semoga Allah SWT selalu melimpahkan kasih sayang-Nya kepada ayah dan ibuku. Amiin...

Seluruh dosen UIN Maliki Malang. Terimakasih atas bimbingan, nasehat maupun arahnya.

Segenap keluarga di Sukorejo, Batu dan Pujon. Terimakasih atas doa dan dukungannya.

Temen2 Kimia B 2010, kimia A 2010, temen2 Kos e pak Jun 2011-2014, temen2 riset mikroalga (mbak Desi, Kis, Anik, Diah, dan Vera).

Terimakasih atas segala bantuan, motivasi dan saran-sarannya.

EXOstand Veti, Putri, dan Hana, yang selalu memberikan semangat dan dukungan serta hiburan sehingga kita bias tertawa bersama saat senang maupun sumpek... *thanks a lot.*

*Masa muda tak akan kembali
"Do your best"*

Dream comes true

MOTTO

إِنَّا أَعْلَمُ الْغُيُوبَ
إِذَا أَعْلَمَ الْكَلِمَاتُ لَوَّحًا مُّتَتَابِعًا
مَا يَشَاءُ أَلَّا تُغْتَمَبُ الْعَاقِبَةُ لِلَّذِينَ
كَانُوا قَانِعِينَ
إِذَا جَاءَ أَمْرًا لَّوَّحًا مَّوَدَّعًا
مَا يَشَاءُ أَلَّا تُغْتَمَبُ الْعَاقِبَةُ لِلَّذِينَ
كَانُوا قَانِعِينَ
إِنَّا أَعْلَمُ الْغُيُوبَ

Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan (QS. al Insyirah:6)

Kehidupan adalah pendidikan sehingga kita terus dalam keadaan harus belajar
(Bruce Lee).

Terus belajar, berusaha dan berdoa karena hidup adalah tentang apa yang harus
dilakukan atas segala yang diberikan Allah. Dimana keberhasilan merupakan
buah dari usaha-usaha kecil yang terus menerus dan belajar bagaimana
mengatasi kegagalan.

Masa muda tak akan kembali
"Do your best"

Dream comes true

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah Swt. yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya atas terselesaikan skripsi dengan judul **“Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter dan n-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*”** tepat pada waktunya. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad Saw. Yang telah membimbing kita ke jalan yang diridhoi Allah SWT. Skripsi ini merupakan salah satu syarat menyelesaikan program S-1 (Strata-1) di Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

Penulis menyadari bahwa selama berlangsung penelitian, penyusunan sampai pada tahap penyelesaian skripsi ini tak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu iringan do'a dan ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Mudjia Rahardjo. M.Si, selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Ibu Dr. drh. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang, Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si
4. Pembimbing dan Konsultan, Bapak A. Ghanaim Fasya, M.Si dan Bapak A. Hanapi, M.Sc.
5. Penguji, Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si dan Ibu Susi Nurul Khalifah, M.Si.

6. Penguji sekaligus pembimbing agama Bapak Dr.H.Munirul Abidin, M.Ag.
7. Ibu Rachmawati Ningsih, M.Si selaku dosen wali yang telah membimbing penulis sejak awal masa studi
8. Para dosen pengajar di Jurusan Kimia yang telah memberikan bimbingan dan membagi ilmunya kepada penulis selama berada di UIN Maliki Malang.
9. Seluruh staf Laboratorium dan Administrasi Jurusan Kimia atas seluruh bantuan dan sumbangan pemikiran selama penyelesaian skripsi ini.
10. Kedua orang tuaku dan seluruh keluarga besar yang dengan penuh kasih sayang dan keikhlasan telah memberikan segala kebutuhan kepada penulis, memberi dorongan dan motivasi baik secara materiil maupun spirituil.
11. Teman-teman kimia angkatan 2010 yang telah berbagi kebersamaannya selama ini dalam senang maupun susah sehingga tetap terjaga persaudaraan kita.
12. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu atas segala bantuannya kepada penulis.

Penulis berharap semoga skripsi ini dapat diterima dan hasilnya dapat bermanfaat serta menambah khasanah ilmu pengetahuan.

Malang, 02 Juli 2014

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
MOTTO	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xv
ABSTRAK	xvii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Batasan Masalah	7
1.5 Manfaat Penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Mikroalga	9
2.2 Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	11
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi <i>Chlorella sp.</i>	11
2.2.2 Kultivasi <i>Chlorella sp.</i>	12
2.2.2.1 Faktor-faktor Pertumbuhan <i>Chlorella sp.</i>	12
2.2.2.2 Fase Pertumbuhan <i>Chlorella sp.</i>	13
2.2.2.3 Medium Ekstrak Tauge	14
2.2.2.4 Kandungan dan Manfaat <i>Chlorella sp.</i>	16
2.3 Radikal Bebas	17
2.4 Antioksidan	18
2.4.1 Antioksidan Alami	20
2.4.2 Antioksidan Sintetik	21
2.5 Mekanisme Antioksidatif	22
2.6 Ekstraksi Senyawa Golongan Antioksidan	23
2.7 Uji Aktivitas Antioksidan	26
2.7.1 Panjang Gelombang Maksimum	29
2.7.2 Waktu Reaksi DPPH dengan Senyawa Antioksidan	29
2.8 Identifikasi Senyawa Aktif Antioksidan	30
2.8.1 Terpenoid	30

2.8.2 Steroid	31
2.8.3 Flavonoid	33
2.8.4 Alkaloid	34
2.8.5 Asam Askorbat	35
2.9 Identifikasi Senyawa Aktif dengan KLT	35

BAB III METODOLOGI

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	39
3.2 Alat dan Bahan	39
3.2.1 Alat	39
3.2.2 Bahan	39
3.3 Rancangan Penelitian	40
3.4 Tahapan Penelitian	41
3.5 Pelaksanaan Penelitian	42
3.5.1 Uji Taksonomi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	42
3.5.2 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	42
3.5.2.1 Sterilisasi Alat	42
3.5.2.2 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET)	43
3.5.2.3 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam MET	43
3.5.2.4 Pemanenan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	43
3.5.3 Preparasi Sampel	43
3.5.4 Penentuan Kadar Air	44
3.5.5 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	44
3.5.6 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Peekat Metanol	45
3.5.7 Uji Aktifitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH	46
3.5.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	46
3.5.7.2 Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan	46
3.5.7.3 Pengukuran Potensi Antioksidan pada Sampel	46
3.5.8 Identifikasi Golongan Senyawa Antioksidan secara Kualitatif dengan Reagen	48
3.5.8.1 Identifikasi Triterpenoid dan Steroid	48
3.5.8.2 Identifikasi Falvonoid	48
3.5.8.3 Identifikasi Alkaloid	48
3.5.8.4 Identifikasi Asam Askorbat	49
3.5.9 Uji Senyawa Aktif dengan KLT Analitik	49
3.6 Analisis Data	50

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Taksonomi	51
4.2 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	52
4.3 Pemanenan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	55

4.4 Preparasi Sampel	57
4.5 Penentuan Kadar Air <i>Chlorella sp.</i>	58
4.6 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	59
4.7 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol <i>Chlorella sp.</i>	62
4.8 Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH	65
4.8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	65
4.8.2 Penentuan Waktu Kestabilan Antioksidan	66
4.8.3 Pengukuran Potensi Antioksidan pada Ekstrak <i>Chlorella sp.</i>	68
4.9 Uji Fitokimia Ekstrak <i>Chlorella sp.</i> dengan Reagen	75
4.9.1 Steroid	76
4.9.2 Asam Askorbat	78
4.10Pemisahan Senyawa Aktif dengan KLTA	78
4.11Pemanfaatan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> sebagai Antioksidan dalam Perspektif Islam	88
BAB V PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	92
5.2 Saran	92
DAFTAR PUSTAKA	93

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol <i>Chlorella sp.</i>	14
Tabel 2.2	Kandungan gizi kacang hijau dan kecambah kacang	15
Tabel 2.3	Pelarut organik dan sifat fisiknya	25
Tabel 2.4	Ketentuan kekuatan antioksidan	29
Tabel 2.5	Golongan utama terpenoid tumbuhan	31
Tabel 4.1	Hasil uji taksonomi mikroalga	51
Tabel 4.2	Hasil ekstraksi biomassa mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	61
Tabel 4.3	Hasil ekstraksi dan rendemen dari fraksi hasil partisi	65
Tabel 4.4	Waktu kestabilan masing-masing ekstrak.....	67
Tabel 4.5	Perubahan warna tiap sampel sebelum dan setelah diinkubasi	70
Tabel 4.6	Persen aktivitas antioksidan ekstrak <i>Chlorella sp.</i>	71
Tabel 4.7	Hasil pengamatan uji fitokimia	76
Tabel 4.8	Data penampakan noda senyawa steroid dari hasil KLTA	79
Tabel 4.9	Hasil KLT steroid pada eluen n-heksana:aseton (7:3)	81
Tabel 4.10	Hasil KLT steroid pada eluen n-heksana:etil asetat (7:3)	83
Tabel 4.11	Data penampakan noda asam askorbat dari hasil KLTA.....	85
Tabel 4.12	Hasil KLT asam askorbat eluen etanol:asam asetat 10 % (9:1)	86

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	<i>Chlorella sp.</i>	12
Gambar 2.2	Kurva pertumbuhan <i>Chlorella sp.</i> dalam MET	13
Gambar 2.3	Struktur kimia asam askorbat	21
Gambar 2.4	Struktur BHT (<i>Butylated hydroxytoluene</i>)	22
Gambar 2.5	Reaksi penghambatan antioksidan	23
Gambar 2.6	Reaksi penghambatan antioksidan antar radikal antioksidan	23
Gambar 2.7	Dugaan reaksi hidrolisis ikatan <i>O</i> -glikosida	26
Gambar 2.8	Reaksi DPPH dengan antioksidan.....	28
Gambar 2.9	Struktur lutein (senyawa tetraterpenoid)	31
Gambar 2.10	Struktur fukosterol	32
Gambar 2.11	Reaksi dugaan steroid dengan reagen Liebermann-Burchard.....	32
Gambar 2.12	Struktur Kuersetin	33
Gambar 2.13	Struktur kafein	34
Gambar 2.14	Dugaan reaksi asam askorbat dengan kalium permanganat	35
Gambar 4.1	Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> hasil uji taksonomi	52
Gambar 4.2	Ekstrak tauge sebelum dan sesudah pengenceran (MET 4 %)	53
Gambar 4.3	Warna kultur <i>Chlorella sp.</i> pada hari berbeda	55
Gambar 4.4	Biomassa <i>Chlorella sp.</i> hasil kultivasi	56
Gambar 4.5	Dugaan reaksi hidrolisis ikatan <i>O</i> -glikosida	63
Gambar 4.6	Reaksi penetralan dengan natrium bikarbonat	64
Gambar 4.7	Hasil Spektra UV-Vis larutan DPPH 0,2 mM	66
Gambar 4.8	Nilai EC ₅₀ pada ekstrak <i>Chlorella sp.</i> dan pembanding	72
Gambar 4.9	Reaksi asam askorbat dengan DPPH	74
Gambar 4.10	Produk akhir reaksi asam askorbat dengan DPPH.....	74
Gambar 4.11	Reaksi BHT dengan DPPH	75
Gambar 4.12	Contoh reaksi fukosterol dengan reagen Lieberman-Burchard	77
Gambar 4.13	Dugaan reaksi asam askorbat dengan kalium permanganat.....	78
Gambar 4.14	Hasil KLT steroid pada eluen n-heksana:aseton (7:3)	80
Gambar 4.15	Hasil KLT steroid pada eluen n-heksana:etil asetat (7:3)	83
Gambar 4.16	Hasil KLT asam askorbat eluen etanol:asam asetat 10 % (9:1)	86

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan penelitian	101
Lampiran 2. Pengujian aktivitas antioksidan	112
Lampiran 3. Pembuatan reagen dan larutan	117
Lampiran 4. Perhitungan rendemen	121
Lampiran 5. Perhitungan kadar air sampel kering	124
Lampiran 6. Hasil penelitian antioksidan	126
Lampiran 7. Perhitungan nilai Rf	156
Lampiran 8. Dokumentasi	159
Lampiran 9. Rangkuman referensi untuk KLTA	169
Lampiran 10. Keterangan identifikasi taksonomi	172



DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Simbol	Keterangan
°C	Derajat Celcius
%	Persen
±	Kurang lebih
λmaks	Panjang gelombang maksimum (nm)
A•	Radikal antioksidan
AH	Antioksidan
BHA	<i>Butylated hydroxyanisole</i>
BHT	<i>Butylated hydroxytoluene</i>
BM	Berat molekul
CH ₃ OH	Metanol
C ₂ H ₅ OH	Etanol
C ₆ H ₈ O ₆	Vitamin C/ asam askorbat
DPPH	<i>1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl</i>
DPPH-H	<i>1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyn</i>
EC ₅₀	<i>Efficient Concentration</i> (konsentrasi yang dibutuhkan untuk menurunkan 50% dari konsentrasi substrat (radikal DPPH) awal.
HCl	Asam klorida
HOO•	Radikal perhidroksil
H ₂ SO ₄	Asam sulfat
g	Gram
KLT	Kromatografi lapis tipis
KLTA	Kromatografi lapis tipis analitik
LB	Liebermann-Burchard
MAL	Medium air laut
MET	Medium ekstrak tauge

Simbol	Keterangan
Ppm	<i>Part per million</i>
H ₂ O	Air
R	Gugus alkil
R•	Radikal lipida
ROOH	Hidroperoksida
RO•	Radikal alkosil
ROO•	Radikal peroksil
OH•	Radikal hidroksil
OH	Hidroksil
Mg	Miligram
NaHCO ₃	Natrium bikarbonat
nm	Nanometer
O ₂	Oksigen
MG	Medium Guillard



ABSTRACT

Anggraeni, Ony Novia. 2014. **Antioxidant Activity Test of Ethyl Acetate, Chloroform, Petroleum Ether and n-Hexane Fraction Hydrolysed Microalgae *Chlorella sp.* Methanol Extracts.** Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si. Supervisor II: Dr. H. Munirul Abidin, M.Ag. Consultan: A. Hanapi, M.Sc.

Keywords: *Chlorella sp.*, Hydrolysis, antioxidants, DPPH, TLC

Qur'an surah Luqman verse 10 says that God created plants that are beneficial to humans. *Chlorella sp.* was kind of microalgae that contains bioactive antioxidant components. Purpose of this research was to determine the antioxidant activity of fraction of ethyl acetate, chloroform, petroleum ether and n-hexane as results of hydrolysis of the methanol extract of microalgae *Chlorella sp.*, and active compound of *Chlorella sp.* that identification by reagents test and thin layer chromatography (TLC).

Chlorella sp. was cultivated in Tauge Extract Medium (TEM) 4 % and harvesting at 10th day. *Chlorella sp.* macerated using methanol and hydrolyzed with HCl 2N as catalyst. Furthermore, partitioned using the solvent: n-hexane, petroleum ether, chloroform, and ethyl acetate. Antioxidant activity was estimated by DPPH assay with spectrofotometry UV-Vis. Identification of the active compound groups conducted with test reagents and TLC.

The results showed that the EC₅₀ value of methanol extract, the fraction of ethyl acetate, chloroform, petroleum ether, n-hexane, and the aqueous phase as follows 1,334; 332.7; 182; 27.26; 173.7; and 1,411 ppm. The identification result of active compound showed that the extract of *Chlorella sp.* containing steroids and ascorbic acid. Good eluents of TLC for steroids are hexane: acetone (7:3) and n-hexane: ethyl acetate (7:3). The best eluent for TLC for ascorbic acid is ethanol: 10% acetic acid (9:1).

ABSTRAK

Anggraeni, Ony Novia. 2014. **Uji Aktivitas Antioksidan 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: Dr. H. Munirul Abidin, M.Ag. Konsultan: A. Hanapi, M.Sc.

Kata kunci: *Chlorella sp.*, Hidrolisis, Antioksidan, DPPH, KLT

Al Qur'an surat Luqman ayat 10 menyebutkan bahwa Allah menciptakan tumbuh-tumbuhan yang bermanfaat bagi manusia. *Chlorella sp.* merupakan jenis mikroalga yang mengandung komponen bioaktif sebagai antioksidan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter dan n-heksana hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.*, serta mengetahui golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* hasil identifikasi dari uji reagen dan kromatografi lapis tipis.

Chlorella sp. dikultivasi dalam MET 4 % dan pemanenan dilakukan pada hari ke-10. *Chlorella sp.* dimaserasi menggunakan metanol dan dihidrolisis dengan katalis HCl 2N. Selanjutnya dipartisi menggunakan pelarut n-heksana, petroleum eter, kloroform, dan etil asetat. Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH secara spektrofotometri *UV-Vis*. Identifikasi golongan senyawa aktif dilakukan dengan uji reagen dan KLTA.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai EC_{50} ekstrak metanol *Chlorella sp.*, fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter, n-heksana, dan fasa air berturut-turut 1.334; 332,7; 182; 27,26; 173,7; dan 1.411 ppm. Hasil identifikasi golongan senyawa aktif dengan uji reagen dan KLTA menunjukkan bahwa ekstrak *Chlorella sp.* mengandung steroid dan asam askorbat. Eluen yang baik untuk KLT steroid adalah n-heksana:aseton (7:3) dan n-heksana:etil asetat (7:3). Eluen terbaik untuk KLT asam askorbat adalah etanol p.a.:asam asetat 10% (9:1).

مستخلص البحث

هانجريني ، أوبي نوفيا . ٢٠١٤ . اختبار الكسر الأثيل خلات النشاط المضادة للأكسدة، الكلوروفورم، والأثير البترول ن الهكسين الميثانول مقتطفات التحلل النتائج الطحالب طحلب . المشرف الأولى : أحمد الغنائم فشا الماجستير ، والمشرف الثاني: الدكتور منير العابدين الماجستير ، والمستشار : أحمد حنافي الماجستير

الكلمات الرئيسية : طحلب (*Chlorella sp.*)، التحليل بالماء (hidrolisis) ، ومضادات الأكسدة (antioksidan)، DPPH ، KLT.

قال الله تعالى في القرآن بسورة لقمان الآية ١٠ يقول أن الله خلق النباتات التي تعود بالفائدة على البشر. طحلب (*Chlorella sp.*) هو نوع من الطحالب التي تحتوي على المكونات النشطة بيولوجيا مثل المواد المضادة للأكسدة. وكان الغرض من هذه الدراسة لمعرفة نشاط مضادات الأكسدة فصيل من خلات الإيثيل، والكلوروفورم والأثير البترول ون الهكسان ومعرفة التحليل بالماء من الطحالب طحلب الميثانول، و معرفة فئة من المركبات التي توجد في مقتطفات من الطحالب طحلب نتيجة على اختبار الكاشف وطبقة رقيقة اللون (KLT).

الطحلب المزروع في ٤MET٪ ويتم الحصاد في يوم ١٠ (العاشرة). طحلب. متأكلة باستخدام الميثانول وتحليل مع الحفاز هيدروكلوريك ٢ N. وعلاوة على ذلك تقسيم باستخدام المذيبات ن الهكسان، الأثير البترول، والكلوروفورم، وولات الإيثيل. محاكمات النشاط المضادة للأكسدة تفعل بالمنهج DPPH بالقياس الطيفي UV-Vis . تحديد فئات من المركبات النشطة أجريت مع اختبار كاشف و KLTA.

النتائج أظهرت أن قيمة EC₅₀ لاستخراج الميثانول من طحلب، وفصيل من خلات الإيثيل، والكلوروفورم والأثير البترول، ن الهكسان، والمرحلة المائية على التوالي ١،٣٣٤ ؛ ٣٣٢.٧ ؛ ١٨٢ ؛ ٢٧.٢٦ ؛ ١٧٣.٧ ؛ ١٤١١ ppm. وأظهرت نتائج تحديد فئات من المركبات النشطة مع اختبار كاشف و KLTA بأن مستخرج من طحلب. تحتوي على المنشطات وحمض الاسكوريك . والمذيبات الجيدة ل KLT هو ن_الهكسان: الأستون (٧:٣) و ن الهكسان : خلات الإيثيل (٧:٣). أفضل المذيبات ل KLT حمض الاسكوريك هو الإيثانول: حامض الخليك ١٠٪ (٩:١).

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang kaya akan sumber daya alam baik di daratan maupun di perairan. Salah satu sumber daya alam tersebut adalah mikroalga. Mikroalga dapat ditemukan hampir di semua ekosistem di bumi, tidak hanya di perairan laut tetapi juga di air tawar. Mikroalga atau ganggang adalah organisme perairan yang hidup dengan struktur uniseluler atau multiseluler sederhana. Sehingga dapat dikatakan mikroalga tumbuhan yang paling primitif.

Firman Allah Swt. dalam surat Luqman ayat 10 :

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

“Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang. Dan kami turunkan air hujan dari langit, lalu kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik.”(QS. Luqman (31): 10).

Ayat di atas menjelaskan bahwa Allah telah menciptakan berbagai macam binatang dan tumbuh-tumbuhan yang dapat dimanfaatkan oleh manusia dalam berbagai keperluan. Tumbuhan yang *kariim* adalah yang tumbuh subur dan menghasilkan apa yang diharapkan penanamannya (Shihab, 2002). Setiap makhluk yang ada di alam semesta Allah ciptakan tidak sia-sia dan pasti memiliki manfaat yang besar, tanpa terkecuali tumbuhan primitif seperti mikroalga.

Mikroalga umumnya terdiri dari satu sel atau berbentuk seperti benang. Mikroalga tampak warna-warni indah sesuai dengan zat warna atau pigmen yang dikandungnya (Destiana, dkk., 2007). Secara umum, mikroalga terbagi menjadi 11 kelompok, yaitu Cyanophyta, Prochlorophyta, Glaucophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta, dan Chlorophyta. Salah satu contoh mikroalga jenis Chlorophyta adalah *Chlorella sp* (Hoek, dkk., 2002).

Chlorella sp. adalah mikroalga hijau bersel tunggal (uniseluler), dapat hidup menyendiri atau berkelompok, tidak mempunyai batang, akar, dan daun. Kawaroe (2010) menyatakan bahwa *Chlorella sp.* mengandung berbagai nutrisi seperti protein, karbohidrat, asam lemak tak jenuh, vitamin, klorofil, enzim, dan serat yang tinggi. *Chlorella sp.* cenderung banyak dimanfaatkan sebagai sumber energi alternatif, pangan sehat dan suplemen. *Chlorella sp.* dalam bidang pangan dapat dikembangkan untuk pangan sehat sebagai sumber protein, vitamin, dan mineral, dalam bidang kedokteran dapat bermanfaat untuk mencegah penyakit kanker, menurunkan tekanan darah tinggi, menurunkan kadar kolesterol darah dan sebagainya (Steenblock, 1996).

Pemanfaatan *Chlorella sp.* terutama di bidang farmakologi perlu lebih ditingkatkan lagi agar memberikan nilai tambah. Salah satu pemanfaatan *Chlorella sp.* di bidang farmakologi adalah sebagai antioksidan. Yan, dkk. (1998) menyebutkan bahwa antioksidan memiliki peranan penting dalam mencegah oksidasi radikal bebas yang dapat menyebabkan berbagai penyakit seperti karsinogenik dan penuaan. Menurut Winarsih (2007), yang dimaksud radikal

bebas adalah suatu senyawa atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluar. Adanya elektron yang tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan.

Saat ini antioksidan yang umum digunakan merupakan antioksidan sintetik diantaranya *Butylated hydroxyanisole* (BHA), *Butylated hydroxytoluene* (BHT), *Propylgallate* (PG) dan *Tert-Butylhydroquinone* (TBHQ) (Sherwin, 1990). Akan tetapi, senyawa tersebut dicurigai dapat menyebabkan keracunan dan efek karsinogenik (Grillo dan Dulout, 1995; Safer dan al Nughamish, 1999 dalam Shanab, 2007). Oleh karena itu, pengembangan serta pemanfaatan antioksidan yang lebih efektif dan berasal dari alam sangat penting untuk dilakukan (Oktay, dkk., 2003).

Bariyyah (2013) melakukan uji aktivitas antioksidan terhadap ekstrak kasar *Chlorella sp.* dengan hasil yang menunjukkan dalam *Chlorella sp.* terdapat senyawa golongan steroid, tanin dan asam askorbat yang berperan sebagai antioksidan. Kusmiati (2010) melakukan ekstraksi dan purifikasi senyawa lutein dari mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* Galur Lokal Ink dimana lutein ini merupakan karotenoid alami yang berfungsi sebagai antioksidan.

Penggunaan metanol sebagai pelarut untuk mengekstrak senyawa-senyawa antioksidan dalam *Chlorella sp.* didukung hasil penelitian yang dilakukan oleh Bariyyah (2013) yaitu didapatkan nilai EC_{50} ekstrak metanol *Chlorella sp.* lebih rendah dibandingkan ekstrak etil asetat. Nilai EC_{50} ekstrak metanol *Chlorella sp.* 18,610 ppm sedangkan ekstrak etil asetat adalah 27,320 ppm. Semakin kecil nilai EC_{50} suatu senyawa uji maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya.

Senyawa-senyawa antioksidan yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* umumnya merupakan senyawa metabolit sekunder. Metabolit sekunder ini kebanyakan di alam berupa glikosida (mengandung komponen gula dan bukan gula). Komponen gula disebut glikon dan komponen bukan gulanya merupakan metabolit sekunder yang disebut aglikon. Penelitian aktivitas antioksidan terhadap mikroalga *Eucheuma spinosum* dengan metode DPPH dengan parameter EC_{50} yang dilakukan Mardiyah (2012) menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak yang telah dihidrolisis adalah lebih besar dibandingkan sebelum dihidrolisis. Data yang diperoleh yaitu nilai EC_{50} ekstrak hasil hidrolisis partisi pelarut petroleum eter 12,65 mg/L dan nilai EC_{50} ekstrak metanol (sebelum dihidrolisis) 22,13 mg/L.

Partisi pelarut terhadap hasil hidrolisis ekstrak metanol *Chlorella sp.* digunakan pelarut yang bersifat semipolar dan nonpolar. Pelarut yang digunakan merupakan pelarut yang memiliki perbedaan kepolaran dengan metanol yang bersifat polar sehingga proses pemisahannya dapat berjalan dengan baik. Penelitian yang mendukung adanya partisi terhadap hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga diantaranya adalah penelitian yang dilakukan oleh Mardiyah (2012) yang menggunakan pelarut 1-butanol, etil asetat, kloroform, petroleum eter dan n-heksana untuk partisi hasil hidrolisis ekstrak metanol *Eucheuma spinosum* dengan hasil sampel yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi ada pada fraksi petroleum eter ($EC_{50} = 12,65$ mg/L) kemudian fraksi kloroform ($EC_{50} = 19,23$ mg/L), etil asetat ($EC_{50} = 41,94$ mg/L), 1-butanol ($EC_{50} = 73,02$ mg/L) dan n-heksana ($EC_{50} = 80,32$ mg/L).

Penelitian aktivitas antioksidan terhadap mikroalga *Spirulina sp.* dengan metode DPPH dengan parameter IC_{50} yang dilakukan Yudiati, dkk. (2011), mendapatkan nilai IC_{50} ekstrak kasar metanol, ekstrak pigmen kasar methanol/aseton dan eter berturut-turut sebesar 323,7 ppm; 51 ppm dan 34,85 ppm. Metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) merupakan metode untuk mengetahui adanya aktivitas antioksidan *Chlorella sp.* Metode dengan DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel. Metode DPPH juga merupakan metode yang tidak terbatas untuk mengukur komponen yang larut dalam pelarut yang digunakan dalam analisa (dapat mengukur aktivitas total antioksidan baik dalam pelarut polar maupun nonpolar) (Hafidz, 2003).

Chlorella tumbuh pada air tawar, air payau dan air asin, tetapi sebagian besar hidup di air tawar. Untuk tumbuh kembangnya yang baik, *Chlorella* memerlukan air yang jernih, sinar matahari, dan udara yang bersih (Sidabutar, 1999). Proses penumbuhan *Chlorella sp.* dalam suatu medium disebut dengan kultivasi, dimana kondisi lingkungan untuk pertumbuhan *Chlorella sp.* dapat disesuaikan pada proses kultivasi ini. Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultivasi *Chlorella sp.* adalah kualitas air yang meliputi suhu, salinitas, kekuatan cahaya, dan pH (Rostini, 2007). Selain itu, media kultur yang digunakan merupakan salah satu faktor penting untuk pemanfaatan mikroalga. Komposisi nutrien yang lengkap dan konsentrasi nutrien yang tepat menentukan produksi biomassa dan kandungan gizi mikroalga (Prihantini, dkk., 2007).

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah Medium Ekstrak Tauge (MET). MET mengandung nutrient organik seperti karbohidrat, protein, vitamin dan lemak yang dibutuhkan sebagai sumber energi bagi pertumbuhan mikroalga. Wulandari, dkk. (2010) melakukan penelitian “Identifikasi Mikroalga di Sekitar Pantai Pangandaran dan Potensi Pertumbuhannya pada Formulasi Medium Ekstrak Tauge (MET)” dengan hasil bahwa mikroalga yang ditumbuhkan pada MET memberikan pertumbuhan yang pesat dalam medium tersebut dibandingkan pada MAL (Medium Air Laut) dan MG (Medium Guillard). Selain itu, dari hasil penelitian Prihantini, dkk. (2007) menyebutkan bahwa konsentrasi MET optimum bagi mikroalga *Schedesmus* selama 10 hari pengamatan adalah MET 4 % yaitu menghasilkan kerapatan sel yang tinggi sebesar 5.677.625 sel/mL.

Pembuatan kurva pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam medium MET yang dilakukan Khamidah (2013) menunjukkan bahwa fase eksponensial dimulai pada hari ke-0 sampai hari ke-8. Fase stasioner dimulai pada hari ke-8 sampai hari ke-11, sedangkan pada hari ke-11 dan seterusnya merupakan fase kematian. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol *Chlorella sp.* dari masing-masing fase yang dilakukan oleh Khamidah (2013) menunjukkan bahwa ekstrak metanol *Chlorella sp.* dari fase stasioner memiliki aktivitas antibakteri yang tertinggi dibandingkan dengan fase lainnya yaitu pada hari ke-10.

Berdasarkan permasalahan di atas, maka perlu dilakukan penelitian mengenai uji aktivitas senyawa antioksidan dari fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter, dan n-heksana hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* dengan kultivasi dalam MET terhadap DPPH. Pemanenan hasil

kultivasi *Chlorella sp.* dalam MET dilakukan pada hari ke-10. Fraksi yang mempunyai nilai EC_{50} terendah diuji golongan senyawa aktifnya dengan uji reagen yaitu asam askorbat, flavonoid, alkaloid, terpenoid dan steroid. Hasil dari penelitian yang diperoleh diharapkan dapat memberikan pengetahuan dan wawasan baru terutama di bidang pemanfaatan mikroalga dalam bidang farmakologi (sebagai obat-obatan).

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimanakah aktivitas antioksidan fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter dan n-heksana hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.*?
2. Golongan senyawa apa yang terdapat pada ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* hasil identifikasi dari uji reagen dan kromatografi lapis tipis?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui aktivitas antioksidan fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter dan n-heksana hasil hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.*
2. Mengetahui golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* hasil identifikasi dari uji reagen dan kromatografi lapis tipis.

1.4 Batasan Masalah

1. Sampel yang digunakan adalah isolat *Chlorella sp.* dari laboratorium jurusan Biologi fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

2. Kultur yang digunakan dalam kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* adalah Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 % pada kondisi pH ± 7 (tanpa perlakuan), temperatur ruang, dan intensitas cahaya 1000 – 4000 lux.
3. Pemanenan *Chlorella sp.* dalam MET dilakukan pada hari ke-10.
4. Pelarut yang digunakan untuk partisi hasil hidrolisis ekstrak metanol *Chlorella sp.* adalah *n*-heksana, petroleum eter, kloroform, dan etil asetat.
5. Metode pengujian aktivitas antioksidan yaitu metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) dengan parameter EC₅₀.
6. Golongan senyawa aktif yang diidentifikasi meliputi terpenoid, steroid, flavonoid, alkaloid, dan asam askorbat.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Dapat memberikan informasi pada lembaga akademis tentang pelarut terbaik yang digunakan dalam mengekstrak golongan senyawa antioksidan yang mempunyai aktivitas tertinggi pada ekstrak mikroalga *Chlorella sp.*
2. Dapat memberikan informasi kepada masyarakat tentang manfaat mikroalga *Chlorella sp.* bagi kesehatan yaitu sebagai antioksidan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga

Firman Allah Swt. dalam surat asy Syu'ara ayat 7 :

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

"Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik"(QS. asy Syu'ara (26):7).

Kata (الي) pada surah asy Syu'ara (26):7, merupakan kata yang mengandung makna batas akhir yang berfungsi agar manusia mengarahkan pandangannya ke seantero bumi termasuk melihat manfaat tanah dan tumbuhan. Kata (زوج) berarti pasangan, tumbuh-tumbuhan pun memiliki pasangan untuk perkembangan dan pertumbuhan. Kata (كريم) merupakan kata sifat yang bermakna baik. Kata tersebut digunakan untuk menggambarkan sesuatu yang baik bagi setiap objek yang disifatinya. Obyek yang dimaksud adalah tumbuhan, sehingga dapat diartikan sebagai tumbuhan yang baik. Pada surah asy Syu'ara (26):7 diawali dengan pertanyaan *"Apakah mereka tidak memperhatikan"*, pertanyaan tersebut mengandung unsur keheranan terhadap mereka yang tidak melihat akan pasangan tumbuhan yang baik. Tumbuhan yang baik merupakan tumbuhan yang subur dan bermanfaat (Shihab, 2002).

Firman Allah dalam surat Luqman ayat 10:

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۗ وَالْأَرْضِ رَواسِيَ أَنْ تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِنْ كُلِّ دَابَّةٍ ۗ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿١٠﴾

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

Kata *كريم* yang terdapat dalam surat Luqman ayat 10 digunakan untuk menyifati segala sesuatu yang baik, sesuai obyeknya. Rizqi yang *kariim* adalah yang banyak, halal dan bermanfaat. Pasangan tumbuhan yang *kariim* adalah yang tumbuh subur dan menghasilkan apa yang diharapkan penanamannya (Shihab, 2002). Berdasarkan ayat tersebut, Allah SWT telah menciptakan bumi beserta isinya, diantaranya adalah tumbuh-tumbuhan yang baik dan bermanfaat tak terkecuali mikroalga. Manusia dianjurkan untuk memikirkan, mempelajari dan mengkaji apa-apa yang diciptakanNya, dan salah satu bentuknya yaitu dengan melakukan penelitian untuk mencari obat dari bahan-bahan alam, seperti mikroalga.

Mikroalga merupakan mikroorganisme prokariotik atau eukariotik yang dapat berfotosintesis dan dapat tumbuh dengan cepat serta dapat hidup dalam kondisi yang sulit dengan struktur uniseluler atau multiseluler sederhana. Contoh mikroorganisme prokariotik adalah Cyanobacteria (Cyanophyceae), dan contoh mikroorganisme eukariotik adalah alga hijau (Chlorella) dan diatoms (Bacillariophyta).

Mikroalga dapat melakukan fotosintesis dan hidup dari nutrien anorganik serta menghasilkan zat-zat organik dari CO₂ oleh fotosintesis. Mikroalga mempunyai zat warna hijau daun (pigmen) klorofil yang berperan pada proses fotosintesis dengan bantuan H₂O, CO₂ dan sinar matahari untuk menghasilkan energi. Energi ini digunakan untuk biosintesis sel, pertumbuhan dan penambahan sel, bergerak atau berpindah dan reproduksi (Pranayogi, 2003).

2.2 Mikroalga *Chlorella sp.*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi *Chlorella sp.*

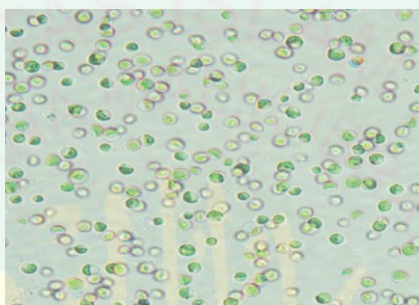
Penamaan *Chlorella sp.* diberikan karena tumbuhan ganggang ini mengandung klorofil yang tertinggi dari tumbuh-tumbuhan yang ada di dunia ini, yang merupakan dasar permulaan kebanyakan rantai makanan akuatik karena kegiatan fotosintetiknya. Oleh sebab itu, *Chlorella sp.* dinamakan produsen primer bahan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

Klasifikasi *Chlorella sp.* (Bold dan Wyne, 1985) adalah sebagai berikut :

Divisi	: Chlorophyta
Kelas	: Chlorophyceae
Ordo	: Chlorococcales
Famili	: Oocystaceae
Genus	: <i>Chlorella</i>
Spesies	: <i>Chlorella sp.</i>

Bentuk umum sel-sel *Chlorella sp.* adalah bulat atau elips (bulat telur), termasuk mikroalga bersel tunggal (unicellular) yang soliter, namun juga dapat dijumpai hidup dalam koloni aau bergerombol (Gambar 2.1). Diameter sel

umunya berkisar antara 2-12 mikron, warna hijau karena pigmen yang mendominasi adalah klorofil (Bold, 1980). Sel *Chlorella sp.* di dalamnya mengandung protein, lemak serta vitamin A, B, D, E dan K, di samping banyak terdapat pigmen hijau (klorofil) yang berfungsi sebagai katalisator dalam proses fotosintesis (Sachlan, 1982).



Gambar 2.1 *Chlorella sp.* (Bellinger dan Sigeo, 2010).

2.2.2 Kultivasi *Chlorella sp.*

2.2.2.1 Faktor-faktor Pertumbuhan *Chlorella sp.*

Kultur murni *Chlorella sp.* perlu dilakukan secara intensif untuk menyediakan makanan alami dalam jumlah cukup. Pertumbuhan mikroalga dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti salinitas, cahaya, suhu, derajat keasaman, nitrogen, karbondioksida, dan nutrisi (Rostini, 2007). Kisaran suhu 25 – 30 °C merupakan kondisi umum bagi pertumbuhan mikroalga. Derajat salinitas bergantung pada tiap spesies mikroalga. Cahaya diperlukan bagi pertumbuhan mikroalga dan berperan dalam proses metabolisme sel seperti fotosintesis. Kisaran derajat keasaman (pH) bervariasi mulai dari pH 6 – 8 (Borowitzka dan Lesley, 1988). pH yang sesuai untuk pertumbuhan *Chlorella sp.* berkisar antara 4,5 – 9,3 (Prihantini, dkk., 2005).

Nutrien yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroalga terdiri dari makronutrien dan mikronutrien. Makronutrien adalah nutrisi yang diperlukan dalam jumlah besar yang terdiri dari karbon, nitrogen, fosfor, sulfat, dan potasium. Sedangkan mikronutrien adalah nutrisi yang diperlukan dalam jumlah yang kecil meliputi Co, Mo, Mn, Vitamin B₁₂, dan Thiamin (Borowitzka dan Lesley, 1988).

2.2.2.2 Fase Pertumbuhan *Chlorella sp.*

Berdasarkan hasil penelitian Khamidah (2013), pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* dalam MET tidak mengalami fase adaptasi sehingga pada hari ke-1 sudah memasuki fase eksponensial. Kurva pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam MET menunjukkan bahwa fase eksponensial dimulai pada hari ke-0 sampai hari ke-8. Fase stasioner dimulai pada hari ke-8 sampai hari ke-11, sedangkan pada hari ke-11 dan seterusnya merupakan fase kematian. Hasil kurva pertumbuhan *Chlorella sp.* yang diperoleh terlihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Kurva pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam MET

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol *Chlorella sp.* dari masing-masing fase yang dilakukan oleh Khamidah (2013) menunjukkan bahwa ekstrak metanol *Chlorella sp.* dari fase stasioner memiliki aktivitas antibakteri yang tertinggi dibandingkan dengan fase lainnya. Hasil ini terlihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol *Chlorella sp.* (Khamidah,2013)

Ekstrak Metanol <i>Chlorella sp.</i>	Zona Hambat (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Fase ½ Eksponensial	6,5	3,3
Fase ¾ Eksponensial	6,7	8,4
Fase Awal Stasioner	7,4	10,6
Fase Stasioner	9,9	12,0
Fase Akhir Stasioner	7,3	11,0
Kontrol Pelarut	-	-
Kontrol Media	-	-
Penisilin		26,0
Streptomisin	19,3	

Keterangan : Kontrol negatif : Metanol dan MET.
Kontrol positif : Penisilin dan Streptomisin.

2.2.2.3 Medium Ekstrak Tauge (MET)

Ekstrak tauge merupakan media alami yang umum digunakan bagi pertumbuhan mikroalga. Media tersebut mengandung unsur makro dan mikro, vitamin, mineral, asam amino yang dibutuhkan bagi pertumbuhan mikroalga. Kisaran pH media kultur yang sesuai bagi *Chlorella sp.* bergantung pada jenis media (Prihantini, dkk., 2005).

Tauge kacang hijau merupakan sayuran yang umum dikonsumsi, mudah diperoleh, ekonomis, dan tidak menghasilkan senyawa yang berefek toksik. Media perlakuan MET mengandung nutrient anorganik seperti K, P, Ca, Mg, Na, Fe, Zn, Mn, dan Cu. Nutrient anorganik yang tergolong makronutrien yaitu K, P, Ca, Mg, dan Na dibutuhkan oleh sel mikroba sebagai komponen penyusun sel.

Mikronutrien seperti Fe, Zn, Mn, dan Cu dibutuhkan oleh sel baik sebagai kofaktor enzim maupun komponen pembentuk klorofil. Mn, Zn, Cu, Mo, B, Ti, Cr, dan Co yang terdapat dalam media kultur akan mengefektifkan fotosintesis pada mikroalga. Fotosintesis yang berlangsung efektif akan mempengaruhi produk yang dihasilkan (Wulandari, dkk., 2010). Kandungan gizi antara kacang hijau dan kecambah kacang hijau dapat di lihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Kandungan gizi kacang hijau dan kecambah kacang hijau per 100 gram berat kering

No	Jenis zat	Satuan	Kacang hijau	Kecambah kacang hijau
1	Energi	Kal	382	354
2	Karbohidrat	g	67,22	44,79
3	Protein	g	27,10	38,54
4	Lemak	g	1,78	12,50
5	Serat	g	8,88	11,46
6	Kalsium	mg	263,91	1729,17
7	Fosfor	mg	377,51	770,83
8	Besi	mg	8,88	8,33
9	Natrium	mg	-	-
10	Kalium	mg	-	-
11	Karoten	µg	263,91	208,33
12	Thiamin	mg	0,54	0,94
13	Riboflavin	mg	0,18	1,56
14	Niasin	mg	1,78	11,46
15	Vitamin C	mg	11,83	52,08

Sumber: PERSAGI (2009) dalam Fahriyani (2011)

Hasil penelitian Wulandari, dkk. (2010) menunjukkan bahwa penggunaan Media Ekstrak Tauge (MET) menghasilkan pertumbuhan mikroalga yang sangat pesat dibandingkan dengan medium lainnya yaitu Medium Air Laut (MAL) dan Medium Guillard (MG). Prihantini, dkk. (2007) menyebutkan bahwa konsentrasi Medium Ekstrak Tauge (MET) optimum bagi mikroalga *Schenedesmus* selama 10 hari pengamatan adalah MET 4 %. Media perlakuan tersebut menghasilkan kerapatan sel tertinggi (87.096 sel/mL). Khamidah (2013) hasil penelitian juga

menunjukkan bahwa *Chlorella sp.* yang dikultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 % dapat menghasilkan kelimpahan sel tertinggi sebesar 4.880.000 sel/mL pada fase stasioner dihari ke-10.

2.2.2.4 Kandungan dan Manfaat *Chlorella sp.*

Mikroalga *Chlorella sp.* memiliki potensi sebagai pakan alami, pakan ternak, suplemen, penghasil komponen bioaktif, bahan farmasi dan kedokteran. Hal tersebut disebabkan *Chlorella sp.* mengandung berbagai nutrisi seperti protein, karbohidrat, asam lemak tak jenuh, vitamin, klorofil, enzim, dan serat yang tinggi (Kawaroe, 2010). *Chlorella sp.* mempunyai pigmen warna hijau dan kaya dengan warna biru yang disebut *Phycocyanin* merupakan protein kompleks. *Phycocyanin* merupakan pembentuk darah putih didalam tubuh manusia dan merupakan antibodi atau pembentuk imunitas dari serangan racun kimia dan radiasi. Warna hijau dari klorofil pada *Chlorella sp.* disebut darah hijau (*greenblood*) mempunyai kandungan zat besi pembentuk hemoglobin yang berfungsi sebagai penambah makanan bagi penyandang anemia. Pada *Chlorella sp.* terdapat warna kuning oranye merupakan kandungan karoten terdiri dari *xanthophyll*, *myxoxanthophyll*, *zeaxanthin*, *cryptoxanthin*, *echinenone*, *fucoxanthin*, *violaxanthin* dan *astaxanthin*. Total karoten yang terdapat pada *Chlorella sp.* per 10 gr yaitu 0,37 % (Pranayogi, 2003). Karoten mempunyai khasiat pada manusia sebagai antioksidan.

Hasil penelitian Barriyah (2013) tentang uji aktivitas antioksidan dan identifikasi golongan senyawa aktif dalam *Chlorella sp.* menunjukkan bahwa ekstrak kasar *Chlorella sp.* mengandung senyawa golongan steroid, tanin dan

asam askorbat yang berperan sebagai antioksidan. Khamidah (2013) dalam penelitiannya tentang uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* mendapatkan hasil bahwa dalam ekstrak kasar *Chlorella sp.* mengandung senyawa golongan steroid dan tanin yang bersifat sebagai antibakteri. Amaliyah (2013) melakukan uji toksisitas terhadap ekstrak *Chlorella sp.* dengan hasil bahwa ekstrak methanol *Chlorella sp.* berpotensi sebagai antikanker dan ekstrak etil asetat *Chlorella sp.* sebagai antimikroba. Kusmiati (2010) melakukan ekstraksi dan purifikasi senyawa lutein dari mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* Galur Lokal Ink dimana lutein ini merupakan karotenoid alami yang berfungsi sebagai antioksidan.

Alga hijau uniseluler, *Haematococcus pluvialis* dalam keadaan stres akan berada dalam fase sporulasi mampu mengakumulasi pigmen astaxanthin dari alam dalam level yang tinggi. Astaxanthin ini berguna bagi alga untuk melindungi dirinya dari perubahan lingkungan yang tidak menguntungkan, seperti intensitas UV yang berlebihan, evaporasi yang berlebihan, dan lain-lain. Astaxanthin masuk dalam golongan β -karoten akan tetapi memiliki aktifitas antioksidan lebih kuat daripada β -karoten, mampu mencegah oksidasi lemak tak jenuh, melindungi efek sinar matahari yang berlebihan, dan sebagai pro-vitamin A (Suseela dan Toppo, 2006).

2.3 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau gugus atom yang memiliki satu atau lebih elektron tak berpasangan. Adanya elektron tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan. Radikal ini akan merebut

elektron dari molekul lain yang ada di sekitarnya untuk menstabilkan diri, sehingga senyawa kimia ini sering dihubungkan dengan terjadinya kerusakan sel, kerusakan jaringan, dan proses penuaan (Fessenden dan Fessenden 1986). Radikal bebas dapat terbentuk melalui dua cara, yaitu secara endogen (sebagai respon normal proses biokimia internal maupun eksternal) dan secara eksogen (berasal dari polusi, makanan, serta injeksi ataupun absorpsi melalui injeksi) (Winarsi, 2007).

Radikal bebas dalam jumlah berlebih di dalam tubuh sangat berbahaya karena menyebabkan kerusakan sel, asam nukleat, protein dan jaringan lemak. Radikal bebas terbentuk di dalam tubuh akibat produk sampingan proses metabolisme ataupun karena terdapat radikal bebas dalam tubuh melalui pernapasan (Dalimarta dan Soedibyo 1998 diacu dalam Pratiwi dkk., 2006). Akan tetapi, radikal bebas tidak selalu merugikan. Misalnya, radikal bebas berperan dalam pencegahan penyakit yang disebabkan karena mikrobia melalui sel-sel darah khusus yang disebut fagosit (Tuminah, 2000).

2.4 Antioksidan

Dalam pengertian kimia, senyawa antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (electron donor). Secara biologis, pengertian antioksidan adalah senyawa yang mampu menangkal atau meredam dampak negatif oksidan dalam tubuh. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut bisa dihambat (Winarsi, 2007).

Antioksidan berfungsi untuk menetralsasi radikal bebas, sehingga atom dan elektron yang tidak berpasangan mendapatkan pasangan elektron dan menjadi stabil. Keberadaan antioksidan dapat melindungi tubuh dari berbagai macam penyakit degeneratif dan kanker. Selain itu antioksidan juga membantu menekan proses penuaan/antiaging (Tapan, 2005).

Sumber-sumber antioksidan dapat dikelompokkan menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami) dan antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia). Senyawa-senyawa yang umumnya terkandung dalam antioksidan alami adalah fenol, polifenol, dan yang paling umum adalah flavonoid (flavonol, isoflavon, flavon, katekin, flavonon), turunan asam sinamat, tokoferol, dan asam organik polifungsi. Saat ini tokoferol sudah diproduksi secara sintetik untuk tujuan komersil (Pratt dan Hudson, 1990).

Antioksidan sintetik ditambahkan ke dalam bahan pangan untuk mencegah ketengikan. Antioksidan sintetik yang banyak digunakan sekarang adalah senyawa-senyawa fenol yang biasanya agak beracun. Oleh karena itu, penambahan antioksidan ini harus memenuhi beberapa persyaratan, misalnya tidak berbahaya bagi kesehatan, tidak menimbulkan warna yang tidak diinginkan, efektif pada konsentrasi rendah, larut dalam lemak, mudah didapat, dan ekonomis. Empat macam antioksidan sintetik yang sering digunakan adalah *Butylated hydroxyanisole* (BHA), *Butylated hydroxytoluene* (BHT), *Propylgallate* (PG), dan *Nordihidroguaiaretic* (NDGA) (Winarno, 1997).

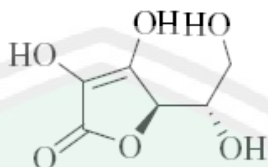
2.4.1 Antioksidan Alami

Antioksidan alami merupakan antioksidan yang diperoleh dari hasil ekstrak bahan alami. Antioksidan alami dalam makanan dapat berasal dari (a) senyawa antioksidan yang sudah ada dari satu atau dua komponen makanan, (b) senyawa antioksidan yang terbentuk dari reaksi-reaksi selama proses pengolahan, (c) senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami dan ditambahkan ke makanan sebagai bahan tambahan pangan (Pratt, 1992).

Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik. Senyawa antioksidan alami polifenolik adalah multi fungsional dan dapat bereaksi sebagai (a) pereduksi, (b) penangkap radikal bebas, (c) pengkelat logam, (d) peredam terbentuknya singlet oksigen. Senyawa fenolik mencakup sejumlah senyawa yang umumnya mempunyai sebuah cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil (OH), karboksil (COOH), metolenil (-O-CH₃) dan sering juga struktur cincin bukan aromatik. Senyawa fenol cenderung larut dalam air, karena paling sering terdapat dalam bentuk senyawa glukosida dan biasanya terdapat dalam rongga sel. Adanya ion logam, terutama besi dan tembaga, dapat mendorong terjadinya oksidasi lemak. Ion-ion logam ini seringkali diinaktivasi dengan penambahan senyawa pengkelat dapat juga disebut bersifat sinergistik dengan antioksidan karena menaikkan efektivitas antioksidan utamanya (Pratt dan Hudson, 1990).

Salah satu contoh antioksidan alami adalah vitamin C yang berfungsi untuk mengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi. Namun vitamin C bersifat tidak stabil, bila terkena cahaya dan pada suhu tinggi mudah

mengalami kerusakan. Vitamin C selain sebagai senyawa antioksidan tetapi juga bersifat prooksidan. Adapun struktur kimia asam askorbat (Cahyadi, 2006):



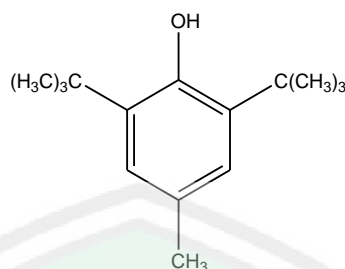
Gambar 2.3 Struktur kimia asam askorbat

Vitamin C sebagai sumber antioksidan memiliki manfaat bagi tubuh antara lain membantu menjaga pembuluh-pembuluh kapiler, meningkatkan penyerapan asupan zat besi, menghambat produksi nitrosamin, zat pemicu kanker dan memperbaiki sistem kekebalan tubuh. Senyawa yang digunakan sebagai pembanding (kontrol positif) dalam uji aktivitas penangkapan radikal hidroksil dalam penelitian ini adalah vitamin C (Cahyadi, 2006).

2.4.2 Antioksidan Sintetik

Antioksidan sintetik merupakan antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesis reaksi kimia. Beberapa contoh antioksidan sintetik yang diizinkan penggunaannya untuk makanan dan penggunaannya telah sering digunakan, yaitu BHA, BHT, PG, TBHQ dan tokoferol. Antioksidan-antioksidan tersebut merupakan antioksidan alami yang telah diproduksi secara sintetis untuk tujuan komersial (Ardiansyah, 2007 dalam Husnah, 2009).

BHT sebagai salah satu antioksidan sintetik. Adapun sifat-sifat antioksidan BHT : mempunyai rumus kimia $C_{15}H_{24}O$, berat molekul 220,36, titik lebur 69 – 70 °C, sinergis dengan BHA dan galat (Hamilton dan Allen, 1994). Adapun struktur dari BHT terlihat pada Gambar 2.4 (Cahyadi, 2006).



Gambar 2.4 Struktur BHT (*Butylated hydroxytoluene*) (Cahyadi, 2006).

2.5 Mekanisme Antioksidatif

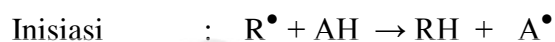
Menurut Gordon (1990), antioksidan mempunyai dua fungsi berdasarkan mekanisme kerjanya adalah sebagai berikut:

Pertama, fungsi utama antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan (AH) yang memiliki fungsi tersebut disebut juga sebagai antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipid (R^\bullet , ROO^\bullet) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara hasil reaksi radikal antioksidan (A^\bullet) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding dengan radikal lipid.

Kedua, fungsi kedua antioksidan merupakan antioksidan sekunder, yaitu berfungsi untuk memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme pemutusan rantai oksidasi di luar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi, dimana hal itu melalui perubahan radikal lipida ke bentuk yang lebih stabil.

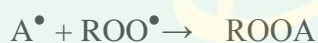
Penambahan antioksidan (AH) primer dengan konsentrasi rendah pada lipida dapat menghambat atau mencegah reaksi autooksidasi lemak dan minyak. Penambahan tersebut dapat menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi (Gambar 2.5). Radikal-radikal antioksidan (A^\bullet) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat

bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru seperti Gambar 2.5 (Gordon, 1990).



Gambar 2.5 Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipida

Autooksidasi dapat dihambat dengan menambahkan antioksidan (AH) dalam konsentrasi rendah yang dapat berasal dari penginterferensian rantai propagasi atau inisiasi. Radikal-radikal antioksidan dapat saling bereaksi membentuk produk non-radikal (Hamilton dan Allen, 1994) seperti pada Gambar 2.6.



} Produk non-radikal

Gambar 2.6 Reaksi penghambatan antioksidan antar radikal antioksidan

2.6 Ekstraksi Golongan Senyawa Antioksidan

Ekstraksi adalah suatu cara untuk memisahkan campuran beberapa zat menjadi komponen-komponen yang terpisah (Winarno, dkk. 1977). Harbone (1987) menambahkan bahwa ekstraksi adalah proses penarikan komponen atau zat aktif suatu simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu. Proses ekstraksi bertujuan mendapatkan bagian-bagian tertentu dari bahan yang mengandung komponen-komponen aktif.

Prinsip ekstraksi adalah zat yang akan diekstrak hanya dapat larut dalam pelarut yang digunakan, sedangkan zat lainnya tidak akan larut. Metode ekstraksi

yang dipakai dalam penelitian ini adalah metode maserasi. Metode maserasi dipakai karena prosesnya mudah dan sederhana sehingga bisa diterapkan di semua laboratorium. Maserasi juga tidak menggunakan suhu tinggi yang dimungkinkan dapat merusak senyawa-senyawa kimia yang terdapat pada mikroalga. Penggunaan pelarut methanol untuk maserasi didasarkan pada penelitian Bariyyah (2013) dengan hasil nilai EC50 ekstrak metanol *Chlorella sp.* lebih kecil dibandingkan dengan nilai EC50 ekstrak etil asetat *Chlorella sp.*, semakin rendah nilai EC50 maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Sehingga pelarut methanol lebih baik dalam mengekstrak senyawa aktif pada *Chlorella sp.*

Jenis dan mutu pelarut yang digunakan menentukan keberhasilan proses ekstraksi. Pelarut yang digunakan harus dapat melarutkan zat yang diinginkannya, mempunyai titik didih yang rendah, murah, tidak toksik, dan tidak mudah terbakar (Ketaren, 1986). Selain itu, keberhasilan ekstraksi juga tergantung pada banyaknya ekstraksi yang dilakukan. Hasil yang baik diperoleh jika ekstraksi dilakukan berulang-ulang dengan jumlah pelarut yang sedikit-sedikit. Efisiensi ekstraksi dapat ditingkatkan dengan menggunakan luas kontak yang besar (Khopkar, 2003). Hasil ekstrak yang diperoleh akan tergantung pada beberapa faktor antara lain kondisi alamiah senyawa tersebut, metode ekstraksi yang digunakan, ukuran partikel sampel, kondisi dan waktu penyimpanan, lama waktu ekstraksi, dan perbandingan jumlah pelarut terhadap jumlah sampel (Darusman, dkk., 1995).

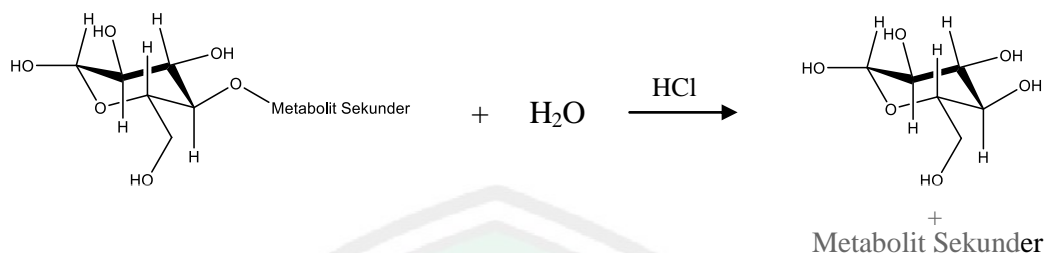
Suatu senyawa menunjukkan kelarutan yang berbeda-beda dalam pelarut yang berbeda. Bahan dan senyawa kimia akan mudah larut pada pelarut yang

relatif sama kepolarannya. Tingkat kepolaran ditunjukkan oleh nilai konstanta dielektrik. Semakin besar konstanta dielektrik suatu pelarut disebut semakin polar (Sudarmadji, dkk., 2003). Berikut adalah macam-macam pelarut organik dan tingkat polaritasnya dapat dilihat pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Pelarut Organik dan Sifat Fisiknya (Nur dan Adijuwana, 1989)

Pelarut	Rumus Kimia	Titik Didih (°C)	Konstanta Dielektrikum	Polaritas*	Massa jenis (g/mL)
Aseton	$\text{CH}_3\text{-C(=O)-CH}_3$	56	21	5.1	0.786
Etanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	79	30	4.3	0,789
Metanol	$\text{CH}_3\text{-OH}$	65	33	5.1	0,791
Air	H-O-H	100	80	10.2	1.000
Heksana	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	69	2.0	0.1	0.655
Benzena	C_6H_6	80	2.3	2.7	0.879
Toluen	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_3$	111	2.4	2.4	0.867
Dietil eter	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$	35	4.3	2.8	0.713
Kloroform	CHCl_3	61	4.8	4.1	1.498
Etil asetat	$\text{CH}_3\text{-C(=O)-O-CH}_2\text{-CH}_3$	77	6.0	4.4	0.894

Senyawa organik dalam tanaman umumnya berbentuk glikosida, yakni senyawa yang terdiri atas gabungan glikon (bagian gula) dan aglikon (bagian bukan gula atau metabolit sekunder). Pemutusan ikatan glikosida dapat dilakukan dengan reaksi hidrolisis yakni dengan memanaskan larutan dengan air dan sedikit asam (Wilbraham and Matta 1992 dalam Saifudin, dkk., 2006). Menurut Achmad (1986) suatu bentuk glikosida akan terurai menghasilkan gugus gula dan aglikon apabila dihidrolisis oleh asam. Dugaan reaksi hidrolisis ikatan glikosida pada penelitian Mardiyah (2012) terlihat pada gambar 2.7.



Gambar 2.7 Dugaan reaksi hidrolisis ikatan O-glikosida

Penelitian aktivitas antioksidan terhadap mikroalga *Eucheuma spinosum* dengan metode DPPH dengan parameter EC₅₀ yang dilakukan Mardiyah (2012) menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak yang telah dihidrolisis adalah lebih besar dibandingkan sebelum dihidrolisis. Data yang diperoleh yaitu nilai EC₅₀ ekstrak hasil hidrolisis partisi pelarut petroleum eter 12,65 mg/L dan nilai EC₅₀ ekstrak metanol (sebelum dihidrolisis) 22,13 mg/L.

Proses partisi pelarut yang dilakukan dalam penelitian ini adalah partisi bertingkat yaitu hasil hidrolisis ekstrak metanol *Chlorella sp.* dipartisi dengan pelarut dengan urutan n-heksana, kemudian petroleum eter, kloroform dan yang terakhir dengan etil asetat. Urutan partisi dimulai dari pelarut yang memiliki kepolaran paling rendah hingga yang terbesar. Wijono (2003) telah melakukan isolasi flavonoid dari daun kati dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol. Kemudian ekstrak etanol ini dilarutkan dalam air panas, disaring kemudian diekstraksi bertingkat dengan pelarut n-heksana, kloroform, etil asetat, dan n-butanol,

2.7 Uji Aktivitas Antioksidan

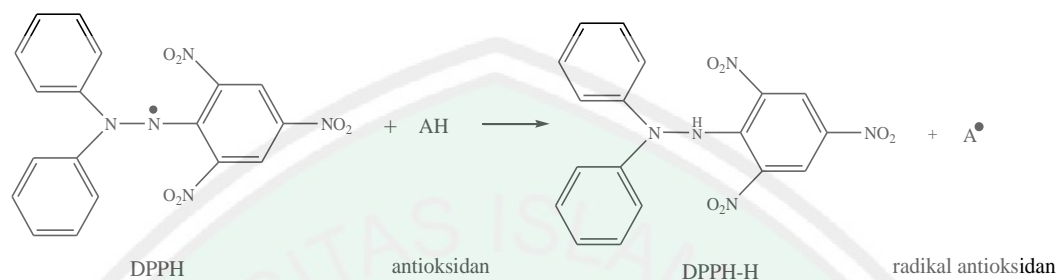
Aktivitas antioksidan dari suatu makanan dapat berbeda bila diuji dengan metode yang berbeda. Metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) digunakan

secara luas untuk menguji kemampuan senyawa yang berperan sebagai pendonor elektron atau hidrogen. Metode DPPH merupakan metode yang dapat mengukur aktivitas total antioksidan baik dalam pelarut polar maupun nonpolar. Beberapa metode lain terbatas mengukur komponen yang larut dalam pelarut yang digunakan dalam analisa. Metode DPPH mengukur semua komponen antioksidan, baik yang larut dalam lemak atau pun dalam air (Prakash, dkk., 2001). Metode DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel (Hanani, 2005).

Senyawa antioksidan mempunyai sifat yang relatif stabil dalam bentuk radikalnya. Senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan dapat diprediksi dari golongan fenolat, flavonoida dan alkaloida, yang merupakan senyawa-senyawa polar (Brand-Williams, 1995 dalam Manik, 2011). Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning yang diukur pada panjang gelombang 517 nm. Pengurangan intensitas warna yang terjadi berhubungan dengan jumlah elektron DPPH yang menangkap atom hidrogen. Pengurangan intensitas warna mengindikasikan peningkatan kemampuan antioksidan untuk menangkap radikal bebas. Dengan kata lain, aktivitas antioksidan diperoleh dengan menghitung jumlah pengurangan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan pengurangan konsentrasi larutan DPPH melalui pengukuran absorbansi larutan uji (Prakash, dkk., 2001).

DPPH yang bereaksi dengan antioksidan akan menghasilkan bentuk tereduksi *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyn* dan radikal antioksidan (Prakash dkk.,

2001). Reaksi antara antioksidan dengan molekul DPPH dapat dilihat pada Gambar 2.8.



Gambar 2.8 Reaksi DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) dengan antioksidan

Aktivitas penangkapan radikal bebas dapat dinyatakan dengan satuan persen (%) aktivitas antioksidan. Nilai ini diperoleh dengan Persamaan 2.1 (Molyneux, 2003):

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel})}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100 \% \dots\dots\dots(2.1)$$

Nilai 0 % berarti sampel tidak mempunyai aktivitas antioksidan, sedangkan nilai 100 % berarti pengujian aktivitas antioksidan perlu dilanjutkan dengan pengenceran sampel untuk mengetahui batas konsentrasi aktivitasnya. Suatu bahan dapat dikatakan aktif sebagai antioksidan bila presentase aktivitas antioksidan lebih atau sama dengan 50 % (Parwata, dkk., 2009). Absorbansi kontrol yang digunakan dalam prosedur DPPH ini adalah absorbansi DPPH sebelum ditambahkan sampel. Kontrol digunakan untuk mengkonfirmasi kestabilan sistem pengukuran. Nilai absorbansi kontrol dapat berkurang dari hari ke hari dikarenakan kehilangan aktivitasnya saat dalam stok larutan DPPH, tetapi nilai absorbansi kontrol tetap dapat memberikan batasan untuk pengukuran saat itu. Kontrol juga berfungsi menjaga kekonstanan total konsentrasi DPPH dalam serangkaian pengukuran (Molyneux, 2003).

Dalam metode DPPH terdapat parameter EC_{50} . Parameter EC_{50} merupakan parameter yang menunjukkan konsentrasi ekstrak uji yang mampu menangkap radikal bebas sebanyak 50 % yang diperoleh melalui persamaan regresi. Semakin kecil EC_{50} suatu senyawa uji maka senyawa tersebut semakin efektif sebagai penangkal radikal bebas (Rohman dkk., 2005).

Tabel 2.4 Ketentuan kekuatan antioksidan

Intensitas	Nilai IC_{50}/EC_{50}
Sangat kuat	< 50 mg/L
Kuat	50 – 100 mg/L
Sedang	100 – 150 mg/L
Lemah	150 – 200 mg/L
Sangat lemah	> 200 mg/L

Sumber : Hidajat (2005).

2.7.1 Panjang Gelombang Maksimum (λ_{maks})

Panjang gelombang maksimum (λ_{maks}) yang digunakan dalam pengukuran uji aktivitas antioksidan sampel uji sangat bervariasi. Panjang gelombang maksimum yang digunakan dalam pengukuran absorbansi yaitu 515 nm (Kuntorini dan Astuti, 2010; Hanani, dkk., 2005), 516 nm (Julyasih, dkk., 2009), 517 nm (Yudiati, dkk., 2011), 518 nm (Barriyah, 2013). Pada prakteknya, hasil pengukuran panjang gelombang yang memberikan serapan maksimum yaitu sekitar panjang gelombang yang disebutkan diatas. Nilai absorbansi yang mutlak tidaklah penting, karena panjang gelombang dapat diatur untuk memberikan absorbansi maksimum sesuai dengan alat yang digunakan (Molyneux, 2003).

2.7.2 Waktu Reaksi DPPH dengan Senyawa Antioksidan

Waktu reaksi yang direkomendasikan adalah 30 menit dan telah dilakukan dalam beberapa penelitian (Hanani, dkk., 2005; Kuntorini dan Astuti, 2010;

Rejeki dan Ningsih, 2010; Nihlati, dkk., 2011; Yudiati, dkk., 2011). Barriyah (2013) melakukan pengujian antioksidan ekstrak metanol *Chlorella sp.* dengan hasil sangat baik jika diinkubasi pada suhu 37 °C pada rentang waktu 30 – 55 menit, sedangkan untuk ekstrak etil asetat pada rentang waktu 45 – 80 menit. Waktu yang paling cepat yang pernah digunakan, 5 menit atau 10 menit. Kenyataannya waktu reaksi yang benar adalah ketika reaksi sudah mencapai kesetimbangan. Kecepatan reaksi dipengaruhi oleh sifat dari aktivitas antioksidan yang terdapat di dalam sampel (Molyneux, 2003 dalam Manik, 2011).

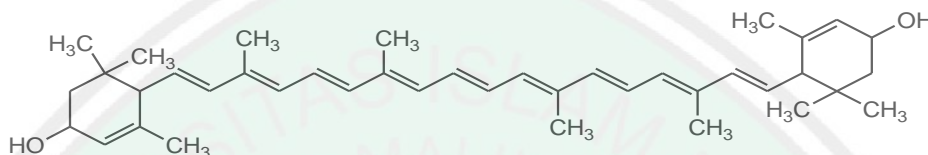
2.8 Identifikasi Senyawa Aktif Antioksidan

Mikroalga memiliki senyawa aktif yang dapat dimanfaatkan dalam bidang industri pangan, kosmetik, farmasi dan *neutraceutical*. Komponen aktif mikroalga antara lain fenol, terpenoid, sterol, flavonoid dan polisakarida (El-Baky, dkk., 2008 dalam Hasanah, 2011). Hasil skrining dari ekstrak aseton, metanol, etanol dan DMSO pada *Chlorella vulgaris* menunjukkan adanya senyawa flavonoid, saponin, tanin, karbohidrat, fenolat, terpenoid, dan glikosida (Uma, dkk., 2011).

2.8.1 Terpenoid

Terpenoid adalah kelompok senyawa metabolit sekunder yang terbesar, dilihat dari jumlah senyawa maupun variasi kerangka dasar strukturnya (Kristanti, dkk., 2008). Kebanyakan senyawa terpenoid terdapat bebas dalam jaringan tanaman, tiak terikat dengan senyawa lain, tetapi banyak diantara mereka yang terdapat sebagai glikosida, ester dari asam organik dan dalam beberapa hal terikat dengan protein.

Senyawa-senyawa yang termasuk dalam kelompok terpenoid diklasifikasikan berdasarkan jumlah atom karbon penyusunnya. Setiap golongan terpenoid itu penting (Tabel 2.5), baik pada pertumbuhan dan metabolisme maupun ekologi tumbuhan (Harborne, 1987).



Gambar 2.9 Senyawa lutein (senyawa tetraterpenoid)

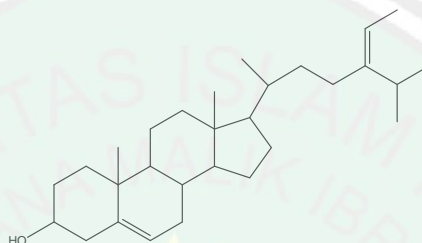
Tabel 2.5 Golongan utama terpenoid tumbuhan

Jumlah Satuan Isoprena	Jumlah Karbon	Golongan	Jenis Utama
1	C ₅	Isoprene	dideteksi dalam daun <i>Hamamelis japonica</i>
2	C ₁₀	Monoterpenoid	Mentol, nepetalakton, tropolon
3	C ₁₅	Seskuiterpenoid	Seskuiterpena lakton, absisin
4	C ₂₀	Diterpenoid	Asam diterpena, giberelin
6	C ₃₀	Triterpenoid	Sterol, triterpena, saponin
8	C ₄₀	Tetraterpenoid	Karotenoid (misalnya lutein)
N	C _n	Politerpen	Karet

2.8.2 Steroid

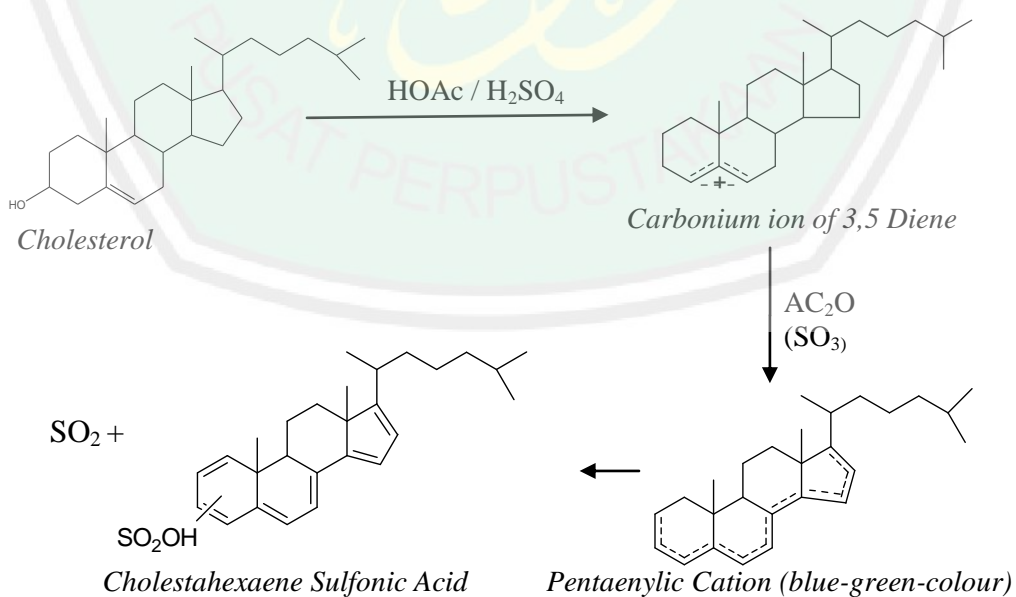
Steroid atau sterol adalah triterpen yang strukturnya berdasarkan sistem cincin siklopentana perhidro fernantren yang biasanya larut dalam pelarut yang kurang polar (Sirait, 2007). Semua sterol diduga hanya ada pada binatang, namun sekarang telah diketahui bahwa sterol juga terdapat dalam tumbuhan (fitosterol). Fitosterol ini berbeda secara struktural dengan sterol binatang. Perbedaannya terutama pada substitusi gugus metil dan etil (Febriany, 2004). Beberapa sterol ditemukan pada tumbuhan tingkat rendah; salah satu contoh ialah ergosterol,

ditemukan pada ragi dan jamur. Yang lainnya terutama terdapat pada tumbuhan tingkat rendah, tapi juga kadang-kadang pada tumbuhan tingkat tinggi, misalnya fukosterol, yaitu steroid utama pada ganggang coklat, namun juga dideteksi pada kelapa (Sirait, 2007).



Gambar 2.10 Struktur fukosterol

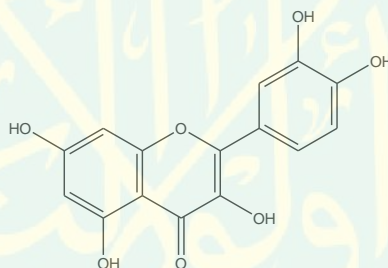
Reaksi warna yang digunakan untuk uji warna pada steroid adalah dengan reaksi Lieberman-Burchard yang menghasilkan warna hijau biru. Reaksi dugaan senyawa steroid (contoh senyawa Kolesterol) dengan reagen Lieberman-Burchard (dikutib dari Burke, dkk., 1974) terlihat pada Gambar 2.11.



Gambar 2.11 Reaksi dugaan senyawa steroid (contoh senyawa Kolesterol) dengan reagen Lieberman-Burchard (dikutib dari Burke, dkk., 1974).

2.8.3 Flavonoid

Flavonoid adalah bagian dari senyawa fenolik yang terdapat pada pigmen tumbuh-tumbuhan. Flavonoid merupakan kelompok besar fitokimia yang bersifat melindungi banyak terdapat pada buah dan sayuran. Flavonoid sering dikenal sebagai bioflavonoid yang berperan sebagai antioksidan. Antioksidan dapat menetralkan atau menginaktifkan reaksi yang tidak stabil pada molekul yang disebut sebagai radikal bebas yang dapat menyerang sel tubuh. Senyawa-senyawa flavonoid termasuk di dalamnya adalah *resveratrol*, *anthocyanin*, *quercetin*, *hesperidin*, *tangeritin*, *kaempferol*, *myricetin* dan *apigenin*.



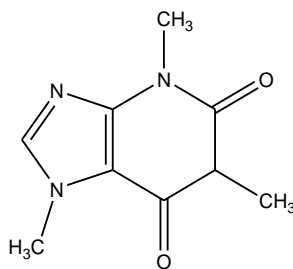
Gambar 2.12 Struktur Kuersetin

Manfaat utama flavonoid adalah untuk melindungi struktur sel, membantu memaksimalkan manfaat vitamin C, mencegah keropos tulang, sebagai antibiotik dan anti-inflamasi (Winarsi, 2007). Golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavonol, isoflavon, kateksin, flavonol dan kalkon (Pratt dan Hudson, 1990). Uji fitokimia pada penelitian Yudiati, dkk. (2011), menunjukkan dari ekstrak metanol, ekstrak kasar pigmen metanol/aseton dan ekstrak pigmen kasar eter dari *Spirulina sp.* positif mengandung senyawa flavonoid.

2.8.4 Alkaloid

Semua alkaloid mengandung paling sedikit sebuah nitrogen yang biasanya bersifat basa dan dalam sebagian besar atom nitrogen ini merupakan bagian dari cincin heterosiklik (Achmad dalam Widodo, 2007). Alkaloid adalah senyawa kimia tanaman hasil metabolit sekunder yang terbentuk berdasarkan prinsip pembentukan campuran. Alkaloid biasanya tanpa warna, seringkali bersifat optis aktif, kebanyakan berbentuk kristal dan hanya sedikit yang berbentuk cairan pada suhu kamar, contohnya pada nikotina. Senyawa-senyawa golongan alkaloid misalnya *caffeine*, *theobromine* dan *theophylline* (Sirait, 2007).

Kelompok senyawa alkaloid terdiri dari alkaloid sesungguhnya, protoalkaloid dan pseudoalkaloid. Alkaloid sesungguhnya adalah racun, senyawa tersebut menunjukkan aktivitas fisiologi yang luas, hampir tanpa terkecuali bersifat basa, mengandung nitrogen dalam cincin heterosiklis, diturunkan dari asam amino, dan biasanya terdapat dalam tanaman sebagai garam asam organik. Protoalkaloid merupakan amin yang relatif sederhana, nitrogen asam amino tidak terdapat cincin heterosiklis, dan diperoleh berdasarkan biosintesis dari asam amino yang bersifat basa. Pseudoalkaloid tidak diturunkan dari prekursor asam amino dan biasanya senyawa ini bersifat basa (Sastrohamidjojo, 1996).

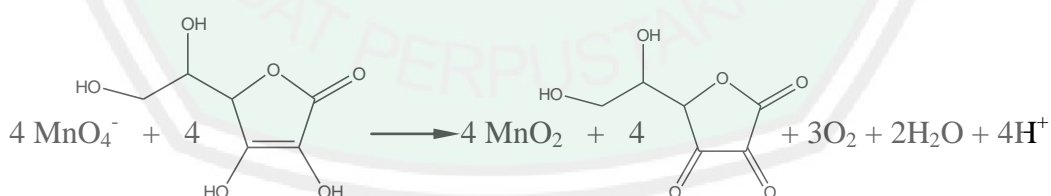


Gambar 2.13 Struktur Kafein

Beberapa pereaksi pengendapan digunakan untuk memisah-misahkan jenis alkaloid. Pereaksi sering didasarkan pada kesanggupan alkaloid untuk bergabung dengan logam yang memiliki berat atom tinggi seperti merkuri, bismut, tungsten, atau jood. Pereaksi Mayer mengandung kalium jodida dan merkuri klorida dan pereaksi Dragendorff mengandung bismut nitrat dan merkuri klorida dalam asam nitrit berair (Sastrohamidjojo, 1996).

2.8.5 Asam Askorbat (Vitamin C)

Vitamin C (L-asam askorbat) merupakan suatu antioksidan penting yang larut dalam air. Vitamin C secara efektif menangkap radikal-radikal $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , ROO^{\cdot} dan juga berperan dalam regenerasi vitamin E (Silalahi, 2006). Pemeriksaan kualitatif asam askorbat dapat dilakukan dengan menggunakan larutan kalium permanganat dalam suhu kamar dengan adanya perubahan warna dari pereduksi kalium permanganat yang semula berwarna ungu berubah menjadi coklat (Auterhoff dan Kovar, 1987 dalam Barriyah 2013).



Gambar 2.14 Dugaan reaksi asam askorbat dengan kalium permanganat (Bariyyah, 2013)

2.10 Identifikasi Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis ialah metode pemisahan fisikokimia yang didasarkan pada perbedaan distribusi molekul-molekul komponen diantara dua fasa (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. Penelitian yang dilakukan menggunakan campuran pelarut yang memiliki sifat polar, semipolar, dan nonpolar. Pelarut yang digunakan adalah pelarut yang dapat memisahkan komponen yang diharapkan sama dengan standar yang akan digunakan (Fitrianti, 2011).

Suksesnya pemisahan secara kromatografi lapis tipis tergantung pada proses lokalisasi bercak. Bercak pemisahan pada KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna. Agar dapat ditentukan, deteksi bercak dapat dilakukan secara kimia, fisika maupun biologi. Cara kimia yang biasa dilakukan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi penyemprot sehingga bercak menjadi jelas. Untuk penyemprotan lempeng KLT dengan reagen kromogenik yang akan

bereaksi secara kimia dengan seluruh solut yang mengandung gugus fungsional tertentu sehingga bercak menjadi berwarna (Gandjar dan Rohman, 2007).

Metode identifikasi bercak yang sederhana adalah dengan menggunakan nilai R_f (*Retardation factor*). Harga R_f di definisikan sebagai berikut (Sastrohamidjojo, 2007).

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

Harga R_f untuk senyawa-senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga standart. Harga R_f yang diperoleh hanya berlaku untuk campuran tertentu dari pelarut dan penyerap yang digunakan (Sastrohamidjojo, 2007). Harga R_f 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).

Kondawar (2011) melakukan pemisahan asam askorbat dalam Triphala (gabungan *Terminalia chebula*, *Terminalia belerica* and *Embellica officinalis*) menggunakan pelarut campuran etanol : asam asetat glacial : toluena (5,5:1:1,5) dengan hasil R_f antara 0,1 – 0,74. Himesh, dkk., (2012) melakukan pemisahan senyawa asam askorbat dari daun sirsak (*Annona squamosa*) menggunakan eluen campuran etanol : etil asetat 1 % (9:1) dan dideteksi di bawah lampu UV 254 nm. Hasil dari penelitian Himesh, dkk., (2012) adalah terlihat spot berwarna biru dengan R_f 0,50 pada KLT sampel dan standar asam askorbat yang diujikan menghasilkan R_f 0,51.

Hayati, dkk., (2012) melakukan KLT golongan senyawa steroid ekstrak etil asetat dari tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* Linn.) menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (7:3) dengan pereaksi Lieberman-Burchard dan dideteksi di bawah lampu UV 366 nm. Hasilnya menunjukkan Rf antara 0,06 – 0,82 dengan 9 spot. Noda 1,2 dan 8 menunjukkan warna hijau kebiruan, noda ke 4 menunjukkan warna hijau, noda ke 6 menunjukkan warna ungu yang ditengahnya berwarna biru kehijauan, noda ke 9 menunjukkan warna hijau kebiruan muda. Reveny (2011) melakukan uji fitokimia golongan steroid dari daun Sirih Merah menggunakan eluen n-heksan : etilasetat (8:2) diperoleh Rf 0,41 dan 0,29 (ungu merah), dengan perbandingan (6:4) diperoleh Rf 0,84 dan 0,76 (ungu merah) dengan pereaksi Liebermann-Burchard. Sulastry dan Kurniawati (2010) melakukan KLT senyawa steroid dari ekstrak methanol daun bluntas (*Plucea indica* L) dengan hasil eluen terbaik adalah campuran n-heksana : etil asetat (8:2).

BAB III

METODOLOGI

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia dan Laboratorium Fisiologi Tumbuhan Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan November 2013 – April 2014.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *beaker glass*, corong gelas, labu takar 250 mL dan 100 mL, tabung reaksi, bola hisap, corong *buchner*, spatula, cawan porselen, *shaker*, oven, desikator, *rotary evaporator vacuum*, pipet ukur 5 mL dan 10 mL, gelas ukur 50 mL, gelas ukur 100 mL, gelas ukur 500 mL, beaker gelas 500 mL, erlenmeyer 250 mL dan 500 mL, kaca arloji, kuvet, autoklaf, inkubator, pipet tetes, aluminium foil, neraca analitik, *sentrifugase*, spektrofotometer UV-Vis *Varian Carry*, dan spektronik 20+.

3.2.2 Bahan

Bahan utama yang digunakan dan penelitian ini yaitu isolat mikroalga jenis *Chlorella sp.* yang diperoleh dari Laboratorium Ekologi Jurusan Biologi Universitas Maulana Malik Ibrahim Malang.

Bahan-bahan lain yang digunakan adalah metanol *p.a.*, etil asetat *p.a.*, kloroform *p.a.*, petroleum eter, n-heksana *p.a.*, tauge (kacang hijau), akuades, larutan DPPH 0,2 mM, HCl 2 N, anhidrida asetat, asam sulfat pekat, serbuk Mg, HCl 37 %, HCl 2 %, etanol 95 %, etanol 99 %, natrium karbonat, reagen Dragendorff, reagen Mayer, reagen Limberman-Burchard, vitamin C, dan BHT.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian eksperimental di laboratorium. Sampel yang digunakan adalah isolat *Chlorella sp.* yang diperoleh dari Laboratorium Ekologi Jurusan Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Isolat *Chlorella sp.* dikultivasi pada Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 % pada pH 7 sebagai media perlakuan. Kultivasi pada MET dilakukan selama 10 hari. Hasil kultivasi kemudian dipanen dengan sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm dan diambil biomassa *Chlorella sp.*. Biomassa yang diperoleh selanjutnya dikeringkan dan diekstraksi komponen aktifnya dengan maserasi.

Ekstraksi komponen aktif pada *Chlorella sp.* dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol *p.a.* Biomassa *Chlorella sp.* diambil 50 gram kemudian dimaserasi dengan pelarut metanol 250 mL selama 24 jam. Selama 24 jam tersebut, sampel *dishaker* selama ± 5 jam. Selanjutnya disaring filtratnya. Residu yang diperoleh diekstraksi kembali dengan pelarut metanol hingga tiga kali pengulangan dan filtrat yang diperoleh digabungkan menjadi satu. Selanjutnya filtrat hasil ekstraksi metanol tersebut dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan hasilnya dialiri gas N₂ sehingga diperoleh ekstrak pekat metanol.

Ekstrak pekat metanol sebanyak 25 gram dihidrolisis dengan katalis HCl 2N sebanyak 50 mL dan distirrer selama 1 jam dengan *hot plate stirrer*. Selanjutnya ditambahkan natrium bikarbonat hingga pH-nya netral dan dipartisi dengan pelarut n-heksana, petroleum eter, kloroform, dan etil asetat. Kemudian ekstrak hasil partisi yang diperoleh, dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan ekstrak pekat tersebut dikeringkan dengan cara dialiri gas N₂ sehingga didapatkan ekstrak kering.

Ekstrak kering tersebut selanjutnya diuji aktivitas antioksidan pada variasi konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, dan 30 ppm, begitu pula untuk pembandingan BHT dan asam askorbat (vitamin C), kemudian dihitung persen aktivitas antioksidannya. Setelah itu dari ekstrak dan pembandingan dihitung nilai EC₅₀ (*effective concentration*) menggunakan persamaan regresi dari program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing dose-response data*”. Fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi diidentifikasi golongan senyawa aktifnya secara kualitatif dengan uji reagen dan kromatografi lapis tipis (KLT) analitik.

3.4 Tahapan Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan melalui tahapan-tahapan berikut:

- 1) Uji taksonomi sampel mikroalga *Chlorella sp.*;
- 2) Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*;
 - a. Sterilisasi Alat;
 - b. Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) ;
 - c. Kultivasi *Chlorella sp.* dalam Media Ekstrak Tauge;

d. Pemanenan mikroalga *Chlorella sp.*

- 3) Preparasi sampel;
- 4) Penentuan kadar air;
- 5) Ekstraksi senyawa aktif mikroalga *Chlorella sp.*;
- 6) Hidrolisis dan partisi ekstrak pekat metanol dengan empat macam pelarut yaitu n-heksana, petroleum eter, kloroform, dan etil asetat;
- 7) Uji aktivitas antioksidan ekstrak pekat metanol, fasa air, etil asetat, kloroform, petroleum eter, n-heksana serta pembanding (BHT dan asam askorbat) dengan metode DPPH pada konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm;
- 8) Identifikasi golongan senyawa aktif secara kualitatif dengan uji reagen.
- 9) Pemisahan senyawa aktif dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) analitik.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Uji Toksonomi Sampel Mikroalga *Chlorella sp.*

Sampel mikroalga *Chlorella sp.* diuji taksonomi di Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Universitas Brawijaya Malang.

3.5.2 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

3.5.2.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan disterilkan ditutup dengan aluminium foil. Kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf dan diatur pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 psi (*per square inchi*). Sterilisasi dilakukan untuk alat selama 15 menit (Hidayati, 2009).

3.5.2.2 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge

Pembuatan medium ekstrak tauge diawali dengan pembuatan larutan stok MET yaitu 100 gram tauge direbus dalam 500 mL akuades yang mendidih selama 1 jam hingga volume ekstrak 200 mL. Medium ekstrak tauge 4 % (v/v) sebanyak 600 mL dibuat dengan cara melarutkan 24 mL ekstrak tauge ke dalam akuades 576 mL dalam erlenmeyer 1000 mL, tanpa perlakuan pH (Prihantini, dkk., 2005).

3.5.2.3 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam Media Ekstrak Tauge

Sebanyak 100 ml isolat *Chlorella sp.* diinokulasikan ke dalam masing-masing 600 mL MET dalam erlenmeyer 1000 mL yang ditempatkan pada rak yang telah dilengkapi dengan pencahayaan menggunakan lampu TL 36 watt (intensitas cahaya 1000 – 4000 lux) dan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap selama 10 hari (Prihantini, dkk., 2005).

3.5.2.4 Pemanenan Biomassa *Chlorella sp.*

Media kultur *Chlorella sp.* disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Biomassa *Chlorella sp.* dipisahkan dari supernatannya kemudian dilakukan penimbangan. Hasil penimbangan dicatat sebagai berat basah.

3.5.3 Preparasi Sampel

Sampel biomassa *Chlorella sp.* diambil seluruhnya kemudian dikeringanginkan pada suhu ruang, 25 – 30 °C selama 48 jam. Selanjutnya dilakukan ekstraksi pada sampel biomassa kering yang diperoleh.

3.5.4 Penentuan Kadar Air

Cawan yang akan digunakan dipanaskan dahulu dalam oven pada suhu 100–105 °C sekitar 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya, kemudian cawan disimpan dalam desikator 10 menit. Cawan tersebut selanjutnya ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Biomassa *Chlorella sp.* ditimbang 1 mg kemudian 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 tercapai berat konstan. Kadar air sampel biomassa *Chlorella sp.* dihitung menggunakan rumus dalam persamaan 3.1 (AOAC, 1984).

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

Dimana : a = bobot cawan kosong

b = bobot sampel + cawan sebelum dipanaskan

c = bobot cawan + sampel setelah dipanaskan

3.5.5 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstraksi komponen aktif pada *Chlorella sp.* yaitu dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Biomassa *Chlorella sp.* kering diambil 50 gram kemudian dimaserasi dengan pelarut metanol 250 mL selama 24 jam. Selama 24 jam tersebut, sampel *dishaker* selama ±5 jam. Selanjutnya disentrifugasi kemudian disaring filtratnya. Residu yang diperoleh diekstraksi

kembali dengan pelarut metanol hingga tiga kali pengulangan dan filtrat yang diperoleh kemudian digabungkan menjadi satu. Ekstrak dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak pekat metanol dan dihitung rendemennya dengan persamaan 3.2.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kasar yang diperoleh}}{\text{Berat sampel yang digunakan}} \times 100 \% \dots\dots\dots(3.2)$$

Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian dikeringkan dengan dialiri gas N_2 sehingga diperoleh ekstrak kering.

3.5.6 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Pekat Metanol

Ekstrak pekat metanol sebanyak 1 gram dihidrolisis dengan katalis HCl 2N sebanyak 2 mL dan distirrer selama 1 jam dengan *hot plate stirrer*. Selanjutnya ditambahkan natrium bikarbonat hingga pH-nya netral. Kemudian dipartisi dengan pelarut n-heksana. Fasa organik (n-heksana) dipisahkan dari fasa airnya. Fasa air dipartisi dengan petroleum eter. Kemudian fasa organik (petroleum eter) dipisahkan dari fasa air. Fasa air dipartisi dengan pelarut kloroform. Selanjutnya fasa organik (kloroform) dipisahkan dari fasa airnya. Fasa air yang tersisa dipartisi dengan pelarut etil asetat.

Masing-masing fraksi pelarut (hasil partisi) dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak pekat n-heksana, petroleum eter, kloroform, dan etil asetat. Selanjutnya dihitung rendemennya dengan persamaan 3.3 :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kasar yang diperoleh}}{\text{Berat sampel yang digunakan}} \times 100 \% \dots\dots\dots(3.3)$$

Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian dikeringkan dengan dialiri gas N₂ sehingga diperoleh ekstrak kering.

3.5.7 Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH

3.5.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Etanol 95 % dipipet sebanyak 6,75 mL kemudian ditambahkan larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 2,25 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dimasukkan ke dalam kuvet hingga penuh. Selanjutnya dicari λ_{maks} larutan dan dicatat hasil pengukuran λ_{maks} untuk digunakan pada tahap selanjutnya (Hanani, 2005; Manik, 2011).

3.5.7.2 Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan

Larutan fraksi pekat (metanol, air, n-heksana, petroleum eter, kloroform, dan etil asetat) 30 ppm diambil sebanyak 6,75 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 2,25 mL. Kemudian waktu kestabilan dicari tanpa inkubasi dan setelah inkubasi pada suhu 37 °C dan rentangan waktu 5 – 100 menit dengan interval 5 menit. Sampel diukur menggunakan spektrometri UV pada λ_{maks} yang telah diketahui pada tahap sebelumnya (Bariyyah, 2013).

3.5.7.3 Pengukuran Potensi Antioksidan pada Sampel

a) Cara pembuatan kontrol: Larutan DPPH dengan konsentrasi 0,2 mM diambil sebanyak 2,25 mL, kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan etanol 95 % sebanyak 6,75 mL. Tabung reaksi ditutup dengan tissue, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama waktu kestabilan yang telah

didapatkan pada tahap sebelumnya. Setelah itu larutan dimasukkan ke dalam kuvet hingga penuh dan diukur absorbansinya dengan menggunakan UV-Vis pada λ_{maks} yang didapatkan pada tahap sebelumnya. (Bariyyah, 2013).

- b) Hasil partisi masing-masing fraksi dilarutkan dalam etanol 95 % dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm. Tiga tabung reaksi disiapkan untuk masing-masing konsentrasi dari tiap fraksi. Kemudian tiap-tiap tabung reaksi diisi dengan 6,75 mL ekstrak dan ditambahkan DPPH 0,2 mM sebanyak 2,25 mL (perbandingan larutan DPPH : ekstrak yang dilarutkan dengan konsentrasi tertentu 1:3). Setelah itu larutan ditutup dengan tisu, diinkubasi dengan suhu 37 °C pada waktu kestabilan yang didapatkan pada tahap sebelumnya, kemudian dimasukkan ke dalam kuvet hingga penuh dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada λ_{maks} yang telah didapatkan sebelumnya. Data absorbansi yang diperoleh dari masing-masing ekstrak dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya.

Nilai persen aktivitas antioksidan diperoleh dengan persamaan 3.4 (Arindah, 2010):

$$\text{Aktivitas antioksidan} = \left(\frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right) \times 100 \% \dots \dots \dots (3.4)$$

- c) Pembanding BHT dan asam askorbat (Vitamin C): diperlakukan seperti sampel akan tetapi sampel diganti dengan larutan BHT dan asam askorbat (vitamin C).

3.5.8 Identifikasi Golongan Senyawa Antioksidan secara Kualitatif dengan Reagen

Identifikasi golongan senyawa antioksidan dilakukan pada ekstrak pekat dari fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dilakukan secara kualitatif yaitu dengan uji reagen.

3.5.8.1 Identifikasi Terpenoid dan Steroid

Ekstrak kasar diambil dan dilarutkan dengan kloroform sebanyak 0,5 mL, lalu ditambah dengan 0,5 mL anhidrida asetat. Campuran ini selanjutnya ditambah dengan 1-2 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya terpenoid, sedangkan jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid (Harbone, 1987).

3.5.8.2 Identifikasi Flavonoid

Ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam 1-2 mL metanol panas 50%. Setelah itu ditambah logam Mg dan 0,5 mL HCl pekat. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk, menunjukkan adanya flavonoid (Harbone, 1987).

3.5.8.3 Identifikasi Alkaloid

Ekstrak kasar dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 0,5 mL HCl 2 % selanjutnya larutan dibagi dalam dua tabung. Tabung I ditambahkan 2-3 tetes 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 (Indrayani, dkk., 2006).

3.5.8.4 Identifikasi Asam Askorbat

Masing-masing 5 mg ekstrak dilarutkan dalam akuades 5 ml, kemudian ditambahkan 10 ml larutan KMnO_4 0,1 %. Jika terbentuk warna cokelat maka menunjukkan adanya asam askorbat (Auterhoff dan Kovar, 1987).

3.5.9 Uji Senyawa Aktif dengan KLT Analitik

Uji senyawa aktif dengan KLT dilakukan terhadap golongan senyawa yang positif dari hasil uji senyawa aktif dengan uji reagen. Identifikasi dengan KLT digunakan plat silika gel F_{254} yang sudah diaktifkan dengan pemanasan dalam oven pada suhu $60-80^\circ\text{C}$ selama 30 menit. Masing-masing plat dengan ukuran $1 \times 10 \text{ cm}^2$. Fraksi partisi yang memiliki aktivitas antioksidan paling besar ditotolkan sebanyak 1 mL pada jarak $\pm 1 \text{ cm}$ dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler kemudian dikeringkan dan dielusi dengan masing-masing fase gerak golongan senyawanya. Setelah gerakan fase gerak sampai pada garis batas, elusi dihentikan. Noda-noda pada permukaan plat diperiksa di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, kemudian diamati pada masing-masing hasil nodanya. Pengembang dan reagen penguji masing-masing golongan senyawa adalah sebagai berikut:

1. Golongan senyawa steroid : digunakan eluen n-heksana : aseton (7:3) (Syamsudin, dkk., 2007), n-heksana:etil asetat (7:3) (Hayati, 2012), n-heksana : etil asetat (9:1), n-heksana : etil asetat (8:2) (Sulastry dan Kurniawati, 2010), n-heksana : etil asetat (6:4) (Reveny, 2011), dengan pereaksi Lieberman Buchard

dideteksi di bawah lampu UV 366 nm akan terbentuk noda berwarna hijau terang, hijau kekuningan, hijau kecoklatan, hijau kebiruan, hijau kehitaman, dan ungu yang tengahnya berwarna hijau kebiruan.

2. Golongan asam askorbat menggunakan eluen etanol:asam asetat 10 % (9:1) (Harbone, 1987), etanol:asam asetat glasial (9:1), etanol:asam asetat 1% (9:1) (Himesh, dkk., 2012), etanol:asam asetat glasial:toluen (5,5:1:1,5) (Kondawar, dkk., 2011), etil asetat:asam asetat glasial:asam format:air (6:1:1:2) (Patel dan Telange, 2011), dilihat di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm menghasilkan spot biru gelap.

3.6 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menghitung persen (%) aktivitas antioksidan yang diperoleh dari data absorbansi dari masing-masing ekstrak dan pembanding asam askorbat (vitamin C) dan BHT. Nilai EC_{50} dihitung dengan menggunakan *software* “*GraphPad prism6 software*” dengan persamaan regresi non linear “*Regression for analyzing dose-response data*” yang menyatakan hubungan antara log konsentrasi ekstrak (x) dengan persen (%) aktivitas antioksidan (y) (Bariyyah, 2013). Semakin kecil nilai EC_{50} maka semakin tinggi kemampuan ekstrak sebagai antioksidan.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini terdiri dari 11 tahapan, yaitu (1) uji taksonomi mikroalga *Chlorella sp.*; (2) kultivasi mikroalga *Chlorella sp.*; (3) pemanenan mikroalga *Chlorella sp.*; (4) preparasi sampel; (5) penentuan kadar air mikroalga *Chlorella sp.*; (6) ekstraksi senyawa aktif mikroalga *Chlorella sp.*; (7) hidrolisis asam dilanjutkan partisi ekstrak pekat metanol dengan empat macam pelarut yaitu n-heksana, petroleum eter, kloroform, dan etil asetat; (8) uji aktivitas antioksidan ekstrak pekat metanol, fasa air, etil asetat, kloroform, petroleum eter, dan n-heksana dengan metode DPPH; (9) identifikasi golongan senyawa aktif secara kualitatif dengan uji reagen; dan (10) pemisahan senyawa aktif dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) analitik.

4.1 Uji Taksonomi

Uji taksonomi terhadap mikroalga yang digunakan sebagai sampel utama dalam penelitian ini bertujuan untuk memastikan jenis mikroalga yang digunakan, karena mikroalga jenis Chlorophyta memiliki spesies yang beragam. Uji taksonomi dilakukan di Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Universitas Brawijaya Malang. Hasil uji taksonomi menunjukkan bahwa mikroalga *Chlorella sp.* dengan klasifikasi pada Tabel 4.1 (Lampiran 9).

Tabel 4.1 Hasil Uji Taksonomi Mikroalga

Familia	: <i>Chlorellaceae</i>
Genus	: <i>Chlorella</i>
Species	: <i>Chlorella sp.</i>

Menurut Sidabutar (1999) bahwa *Chlorella sp.* merupakan mikroalga hijau bersel tunggal, mempunyai sel bentuk bulat dengan diameter 2 – 8 μm , hidup menyendiri atau berkelompok. Hasil uji taksonomi *Chlorella sp.* yang dilakukan Barriyah (2013) terlihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Mikroalga *Chlorella sp.* perbesaran 100 x (Bariyyah, 2013)

4.2 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

Kultivasi *Chlorella sp.* bertujuan untuk memperbanyak sel dari *Chlorella sp.* sehingga mendapatkan biomassa yang banyak pula. Kultivasi *Chlorella sp.* dilakukan dalam Medium Ekstrak Tauge (MET). MET dipilih sebagai medium kultur karena tauge kacang hijau mengandung makronutrien, mikronutrien, vitamin, asam amino, serta gula yang dibutuhkan bagi pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* Nutrien anorganik dalam MET yang tergolong makronutrien, yaitu K, P, Ca, Mg, dan Na dibutuhkan oleh sel mikroalga sebagai komponen penyusun sel. Mikronutrien seperti Fe, Zn, Mn, dan Cu dibutuhkan oleh sel baik sebagai kofaktor enzim, maupun sebagai komponen pembentuk klorofil. Unsur Mn, Zn, Cu, Mo, B, Ti, Cr, dan Co yang terdapat dalam media kultur akan mengaktifkan fotosintesis pada mikroalga. Fotosintesis yang berlangsung efektif akan mempengaruhi produk yang dihasilkan (Wulandari, dkk., 2010). Selain itu hasil

penelitian Wulandari, dkk. (2010) menunjukkan bahwa penggunaan MET menghasilkan pertumbuhan mikroalga yang sangat pesat dibandingkan dengan medium lainnya yaitu Medium Air Laut (MAL) dan Medium Guillard (MG). MET merupakan media alami yang digunakan untuk menumbuhkan mikroalga *Chlorella sp.* yang mengandung unsur makro dan mikro, vitamin, mineral serta asam amino yang dibutuhkan bagi pertumbuhan mikroalga.

Ekstrak taugé terbuat dari perebusan taugé kacang hijau dalam air mendidih selama ± 1 jam. Kemudian media yang digunakan untuk kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* adalah MET 4 % (hasil pengenceran ekstrak taugé dengan akuades). Hasil penelitian Prihantini, dkk. (2005) menunjukkan bahwa *Chlorella sp.* yang dikultivasi dalam MET dengan konsentrasi 4 % dapat menghasilkan kerapatan sel yang cukup tinggi yaitu sebesar 5.677.625 sel/mL pada hari ke-10. Hasilnya, ekstrak taugé atau air hasil rebusan taugé berwarna kekuningan, keruh dan kental sedangkan hasil MET 4 % yang diperoleh berupa cairan tidak berwarna, bening dan lebih encer yang terlihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Ekstrak taugé sebelum dan sesudah pengenceran (MET 4 %)

- (1) Ekstrak taugé sebelum pengenceran
- (2) Ekstrak taugé setelah pengenceran (MET 4 %)

Pada penelitian ini *Chlorella sp.* dikultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 % selama 10 hari. Pencahayaan menggunakan lampu TL (*Tube Lamp*) 36 watt (intensitas cahaya 1000 – 4000 lux) sebagai pengganti sinar matahari dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap. Tujuan dari pengaturan fotoperiodisitas gelap terang adalah untuk mengatur pencahayaan *Chlorella sp.* dalam fotosintesis.

Kultivasi *Chlorella sp.* dilakukan pada temperatur ruang (25 – 30 °C). Kondisi temperatur tersebut merupakan kisaran temperatur yang baik untuk pertumbuhan mikroalga termasuk *Chlorella sp.* Rostini (2007) menumbuhkan *Chlorella sp.* menggunakan medium air laut dengan temperatur berkisar antara 20 – 27 °C.

Derajat keasaman (pH) juga merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Menurut Amaliyah (2013), derajat keasaman (pH) media menentukan kelarutan dan ketersediaan ion mineral sehingga mempengaruhi penyerapan nutrien oleh sel. Perubahan nilai pH yang drastis dapat mempengaruhi kerja enzim serta dapat menghambat proses fotosintesis dan pertumbuhan beberapa mikroalga. Penelitian ini menggunakan MET 4 % tanpa perlakuan pH ($\text{pH} \pm 7$) sebagai medium kultur *Chlorella sp.*. Menurut Prihantini dkk., (2005) kisaran pH yang sesuai untuk pertumbuhan mikroalga yaitu 4,5 – 9,3.

Pertumbuhan *Chlorella sp.* saat dikultivasi juga dapat dimaksimalkan dengan adanya sterilisasi alat. Sterilisasi alat dilakukan sebelum proses kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* ke dalam Medium Ekstrak Tauge (MET). Sterilisasi alat

bertujuan untuk meminimalkan adanya kontaminasi mikroorganisme yang tidak diinginkan sehingga dapat mengganggu pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.*

Selama masa kultivasi terjadi perubahan warna kultur pada yang semula berwarna hijau kekuningan menjadi hijau tua hingga pada hari ke-10 kultivasi. Gradasi warna hijau selain menunjukkan peningkatan populasi sel *Chlorella sp.*, juga mengindikasikan peningkatan kadar klorofil yang merupakan pigmen utama yang terdapat dalam sitoplasma sel. Volesky (1970) dalam Rostini (2007) menyebutkan bahwa warna hijau pada *Chlorella sp.* ditimbulkan oleh pigmen yang terkandung di dalam sel *Chlorella sp.* Sel *Chlorella sp.* mengandung pigmen berupa karoten, xanthofil, serta klorofil a dan b dalam jumlah yang besar. Perubahan warna kultur *Chlorella sp.* selama kultivasi dapat dilihat pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Warna kultur *Chlorella sp.* pada hari berbeda

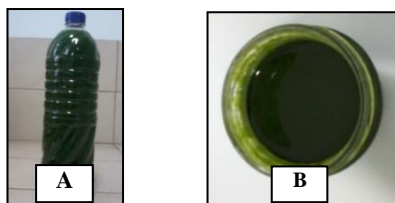
4.3 Pemanenan Mikroalga *Chlorella sp.*

Pemanenan mikroalga *Chlorella sp.* bertujuan untuk memperoleh biomassa *Chlorella sp.* yang akan digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini. Pemanenan biomassa *Chlorella sp.* dilakukan pada hari ke-10 yang merupakan fase stasioner dari fase pertumbuhan *Chlorella sp.*. Kurva pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* oleh Khamidah (2013) menunjukkan bahwa fase eksponensial dimulai dari hari ke-0 sampai hari ke-8, fase stasioner terjadi pada hari ke-8

sampai hari ke-11 dan fase kematian setelah hari ke-11 dan seterusnya. Disamping itu, pada fase stasioner hari ke-10 kepadatan sel *Chlorella sp.* berada dalam jumlah sel tertinggi, yaitu 4.880.000 sel/mL. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol *Chlorella sp.* tiap fase yang dilakukan Khamidah (2013) menunjukkan bahwa ekstrak metanol *Chlorella sp.* dari fase stasioner memiliki aktivitas antibakteri yang tertinggi dibandingkan dengan fase lainnya yaitu pada hari ke-10.

Pada fase stasioner terjadi metabolisme sekunder yang merupakan keseluruhan proses sintesis dan perombakan produk metabolit primer. Selain itu, terjadi penumpukan produk beracun dan kehabisan nutrisi (Pelczar dan Chan, 2005 dalam Yudha, 2008), serta menghasilkan komponen-komponen (metabolit sekunder) yang berfungsi untuk pertahanan hidup. Contoh produk senyawa metabolit sekunder seperti senyawa fenol, alkaloid, triterpenoid (Yudha, 2008).

Proses pemanenan *Chlorella sp.* dilakukan dengan cara mengumpulkan biomassa dan filtrat dalam wadah botol. Filtrat dan biomassa dari hasil pemanenan dipisahkan menggunakan sentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Hasil yang diperoleh berupa biomassa *Chlorella sp.* berwarna hijau tua dengan tekstur yang masih cukup berair. Hasil pemanenan biomassa *Chlorella sp.* dapat dilihat pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4. Biomassa *Chlorella sp.* hasil kultivasi.

Keterangan : A : sebelum disentrifuse

B : biomassa *Chlorella sp.* sesudah disentrifuse

4.4 Preparasi Sampel

Preparasi sampel biomassa mikrolaga *Chlorella sp.* dilakukan dengan cara pengeringangan biomassa *Chlorella sp.* selama 48 jam menggunakan kipas angin. Mohammad (2007) melakukan pengeringan terhadap biomassa *Spirulina fusiformis* dengan AC, suhu ruang (dengan kipas angin), dan *blowerheat*. Dari berbagai macam pengeringan terhadap biomassa *Spirulina fusiformis*, pengeringan dengan menggunakan kipas angin pada suhu ruang menghasilkan kadar fikosianin, klorofil, dan total protein lebih tinggi daripada pengeringan menggunakan AC ataupun *blowerheat*.

Preparasi sampel dengan cara pengeringangan bertujuan untuk mengurangi kandungan air dari biomassa *Chlorella sp.*. Hal ini dilakukan agar kerusakan akibat degradasi oleh mikroorganisme dapat diminimalkan serta mencegah tumbuhnya jamur sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama dan tidak merusak komposisi kimia di dalamnya. Selain itu, juga memudahkan pelarut untuk mengekstrak senyawa aktif yang diinginkan pada saat ekstraksi. Menurut Robinson (1995) dalam Daniel (2010), beberapa metabolit sekunder mudah rusak pada suhu tinggi. Pengeringan tidak dilakukan dengan menggunakan oven karena dikhawatirkan pengovenan dengan suhu tinggi dapat merusak senyawa yang terkandung di dalam biomassa *Chlorella sp.*

Hasil yang diperoleh dari proses pengeringan biomassa *Chlorella sp.* (lampiran 4) adalah 12,0423 gram biomassa kering dari total 423,2000 gram biomassa basah. Rendemen biomassa mikroalga *Chlorella sp.* setelah pengeringangan selama 48 jam adalah sebesar 2,8455 %. Khamidah (2013)

melakukan pengeringan *Chlorella sp.* pada suhu kamar selama \pm 12 jam dengan hasil rendemen pengeringan adalah 14,096 %. Hasil rendemen pengeringan sampel *Chlorella sp.* penelitian ini lebih kecil dibandingkan dengan rendemen pengeringan pada penelitian Khamidah (2013). Perbedaan hasil rendemen dipengaruhi lamanya waktu pengeringan.

4.5 Penentuan Kadar Air *Chlorella sp.*

Kadar air adalah banyaknya air dalam suatu bahan yang ditentukan dari pengurangan berat suatu bahan yang dipanaskan pada suhu pengujian. Penentuan kadar air dilakukan untuk mengetahui kadar air yang terkandung dalam sampel. Selain itu berfungsi untuk mengetahui ketahanan sampel terhadap penyimpanan. Menurut Nurmillah (2009) semakin rendah nilai kadar air bahan maka akan semakin memudahkan pelarut untuk mengekstrak komponen senyawa aktif yang diinginkan. Setyowati (2009) dalam Nurmillah (2009) menyebutkan bahwa dalam proses ekstraksi, maksimum kadar air yang disyaratkan agar proses ekstraksi dapat berjalan lancar yaitu sebesar 11%.

Analisis kadar air *Chlorella sp.* dilakukan dengan menguapkan sampel dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama 15 menit dan ditimbang hingga diperoleh berat konstan. Banyaknya kandungan air yang telah diuapkan dinyatakan dalam persen selisih berat sampel sebelum dan setelah dikeringkan. Analisis kadar air dilakukan pada biomassa *Chlorella sp.* kering untuk mengetahui kadar air sampel yang akan diekstraksi. Data perhitungan kadar air pada sampel *Chlorella sp.* ditunjukkan pada Lampiran 5.

Kadar air dari biomassa kering *Chlorella sp.* pada penelitian ini adalah 7,8099 %. Bariyyah (2013) melakukan analisis kadar air biomassa kering *Chlorella sp.* dengan hasil sebesar 12,036 %. Perbedaan hasil kadar air biomassa kering *Chlorella sp.* pada penelitian ini dengan penelitian Bariyyah (2013) disebabkan lamanya proses pengeringan pada penelitian ini selama 48 jam sedangkan pada penelitian Bariyyah (2013) hanya selama 12 jam. Kadar air biomassa *Chlorella sp.* kering yang diperoleh dalam penelitian ini di bawah kadar air maksimum yang disyaratkan yaitu 11 %. Sehingga sampel aman dalam penyimpanan dan baik untuk digunakan dalam proses ekstraksi, karena semakin rendah nilai kadar air maka semakin memudahkan pelarut untuk mengekstrak komponen senyawa aktif yang diinginkan.

4.6 Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga *Chlorella sp.*

Ekstraksi adalah suatu cara untuk memisahkan campuran beberapa zat menjadi komponen-komponen yang terpisah (Winarno dkk., 1973), yang bertujuan untuk mendapatkan bagian-bagian tertentu dari suatu bahan yang mengandung komponen aktif. Ekstraksi pada mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol p.a. Maserasi dipilih karena prosesnya mudah, sederhana, dan tidak menggunakan suhu tinggi yang dimungkinkan dapat merusak senyawa aktif pada mikroalga *Chlorella sp.* Metode ini merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik pada temperatur ruangan (Indrayani dkk., 2006).

Bariyyah (2013) melakukan maserasi terhadap *Chlorella sp.* dengan pelarut metanol dan etil asetat dan di uji aktivitas antioksidannya dengan hasil

EC₅₀ ekstrak metanol *Chlorella sp.* sebesar 18,610 ppm sedangkan EC₅₀ ekstrak etil asetat *Chlorella sp.* sebesar 27,320 ppm. Hasil penelitian Bariyyah (2013) ini menunjukkan bahwa pelarut metanol merupakan pelarut yang baik untuk mengekstrak senyawa aktif dalam *Chlorella sp.*

Prinsip ekstraksi ini adalah mengekstrak senyawa aktif yang dapat larut dalam pelarut berdasarkan tingkat kepolaran masing-masing pelarutnya atau dikenal dengan istilah *like dissolves like* (Khopkar, 2003). Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi bahan alam karena selama proses perendaman sampel akan terjadi proses pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar selnya sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan senyawa akan terekstraksi sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan (Lenny, 2006).

Maserasi pada penelitian ini dilakukan dengan cara merendam sampel ke dalam metanol p.a dengan perbandingan sampel : pelarut adalah 1:5 dan dimaserasi selama 24 jam sambil dikocok dengan *shaker* dengan kecepatan 150 *rpm* selama 5 jam untuk mempercepat proses ekstraksi komponen aktif. Hal ini dilakukan agar kontak antara sampel dan pelarut semakin sering terjadi sehingga mengefektifkan proses ekstraksi. Filtrat dipisahkan dengan cara disaring menggunakan corong *Buchner* dan dilapisi kertas saring agar filtrat dan residunya dapat terpisah. Proses maserasi dilakukan penggantian pelarut setiap hari sampai diperoleh filtrat yang bening.

Filtrat yang diperoleh ditampung dan dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* untuk memperoleh ekstrak pekat yang akan digunakan untuk uji tahap selanjutnya. Suhu yang digunakan untuk menguapkan pelarut yaitu 50 °C yang merupakan suhu dibawah titik didih metanol (titik didih metanol 65 °C). Prinsip utama dalam instrumen ini terletak pada penurunan tekanan pada labu alas bulat sehingga pelarut dapat menguap lebih cepat di bawah titik didihnya. Pelarut akan menguap menuju kondensor dan tertampung dalam labu alas bulat penampung sehingga terpisah dari ekstrak. Penguapan pelarut dengan *rotary evaporator vacuum* dihentikan sampai pelarut metanol tidak menetes lagi dari kondensor dan diperoleh ekstrak yang cukup pekat.

Hasil pemekatan dengan *rotary evaporator vacuum* berupa ekstrak pekat berwarna hijau tua pekat. Ekstrak pekat ditimbang dan selanjutnya dikeringkan dengan dialiri gas N₂ dan ditimbang lagi untuk diketahui berat rendemennya. Hasil rendemen ekstraksi maserasi ditunjukkan pada Tabel 4.2 dengan perhitungan rendemen pada Lampiran 4.

Tabel 4.2 Hasil ekstraksi biomassa mikroalga *Chlorella sp.*

Berat biomassa (gram)	Berat ekstrak (gram)	Rendemen (%) (b/b)	Warna Ekstrak Pekat
10,0001	1,3607	13,6069	Hijau tua pekat

Rendemen maserasi sebesar 13,6069 % menunjukkan bahwa pelarut metanol cukup baik dalam mengekstrak senyawa-senyawa dalam *Chlorella sp.*. Senyawa-senyawa yang terekstrak merupakan senyawa yang bersifat polar termasuk metabolit sekunder yang terikat dalam bentuk glikosida. Cannel (1998)

menyatakan bahwa metanol merupakan pelarut polar yang sering digunakan karena penetrasi ke dalam dinding sel lebih efisien sehingga menghasilkan metabolit sekunder lebih banyak.

Bariyyah (2013) mengekstraksi *Chlorella sp.* menggunakan pelarut metanol dan etil asetat dengan rendemen ekstrak metanol dan etil asetat dari hasil maserasi berturut-turut sebesar 7,001 % dan 3,673 %. Hasil rendemen maserasi dengan metanol pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian Bariyyah (2013). Perbedaan ini dapat disebabkan kadar air dari biomassa kering *Chlorella sp.* pada penelitian ini lebih kecil (7,8099 %) daripada hasil penelitian Bariyyah (2013) (kadar airnya 12,036 %). Menurut Nurmillah (2009) semakin rendah nilai kadar air bahan maka akan semakin memudahkan pelarut untuk mengekstrak komponen senyawa aktif yang diinginkan.

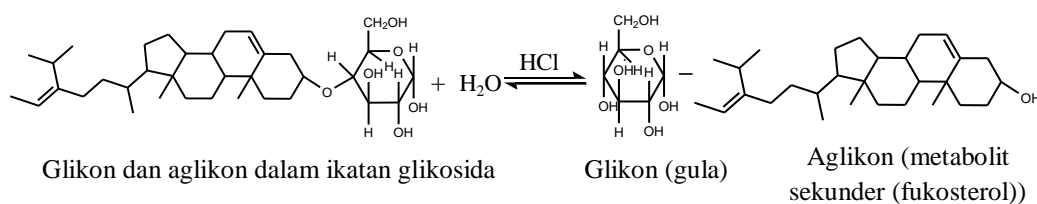
4.7 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol *Chlorella sp.*

Senyawa-senyawa antioksidan yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* umumnya merupakan senyawa metabolit sekunder. Metabolit sekunder kebanyakan di alam berupa glikosida (mengandung komponen gula dan bukan gula). Komponen gula disebut glikon dan komponen bukan gulanya merupakan metabolit sekunder yang disebut aglikon. Pemutusan ikatan glikosida dapat dilakukan dengan reaksi hidrolisis yakni dengan memanaskan larutan dengan air dan sedikit asam (Wilbraham and Matta 1992 dalam Saifudin, dkk., 2006). Prinsip hidrolisis asam adalah peruraian suatu senyawa dengan cara memutus ikatan glikosida menggunakan air dan katalis asam (Saifudin dkk., 2006). Mardiyah (2012) melakukan hidrolisis ekstrak metanol mikroalga

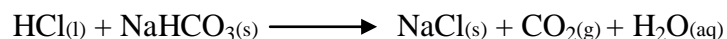
Eucheuma spinosum dengan katalis HCl 2 N dan dilanjutkan dengan partisi menggunakan pelarut yang berbeda kepolarannya.

Pada proses hidrolisis ekstrak pekat metanol *Chlorella sp.* diambil 1 gram kemudian dihidrolisis dengan katalis HCl 2 N sebanyak 2 mL, dan distirrer selama 1 jam dengan *hot plate stirrer*. Hidrolisat yang diperoleh dari proses hidrolisis kemudian dinetralkan dengan natrium bikarbonat (NaHCO_3) hingga pH-nya netral yang dicek menggunakan indikator universal.

Tujuan penambahan HCl 2N (asam kuat) adalah sebagai katalis untuk mempercepat pemutusan ikatan glikosida antara senyawa glikon (gula) dan aglikon (bukan gula). Asam kuat lebih mudah melepas ion H^+ secara sempurna didalam air. Konsentrasi ion H^+ inilah yang mempengaruhi kecepatan reaksi pemutusan ikatan glikosida. Pemilihan HCl sebagai katalis karena sifat garam yang terbentuk pada penetralan (NaCl) tidak menimbulkan gangguan. Penetralan bertujuan menghentikan reaksi hidrolisis. Reaksi hidrolisis merupakan reaksi *reversible* (dapat balik), sehingga apabila tidak dihentikan maka akan terbentuk kembali ikatan glikosida antara glikon dan aglikon (Handoko, 2006). Pengadukan dengan stirrer selama 1 jam agar proses hidrolisis dapat terjadi menyeluruh dan lebih maksimal. Dugaan reaksi pemutusan ikatan glikosida yang terjadi saat hidrolisis terlihat pada Gambar 4.5. dan reaksi yang terjadi ketika penambahan natrium bikarbonat (penetralan) ditunjukkan pada Gambar 4.6.



Gambar 4.5 Dugaan reaksi hidrolisis ikatan *O*-glikosida



Gambar 4.6 Reaksi penetralan dengan natrium bikarbonat

Proses partisi (ekstraksi cair-cair) yang dilakukan dalam penelitian ini adalah partisi bertingkat yaitu hidrolisat ekstrak metanol *Chlorella sp.* yang sudah netral dipartisi dengan pelarut dengan urutan n-heksana, kemudian petroleum eter, kloroform dan yang terakhir dengan etil asetat. Proses partisi dengan pelarut yang berbeda kepolaran ini dimaksudkan agar senyawa-senyawa yang memiliki kepolaran yang berbeda dapat terekstrak ke dalam pelarut yang sesuai. Urutan partisi dimulai dari pelarut yang memiliki kepolaran paling rendah hingga yang terbesar. Wijono (2003) telah melakukan isolasi flavonoid dari daun kati dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol. Kemudian ekstrak etanol ini dilarutkan dalam air panas, disaring kemudian diekstraksi secara bertingkat dengan n-heksana, kloroform, etil asetat, dan n-butanol.

Pada saat proses partisi terbentuk 2 lapisan yang tidak saling bercampur yaitu lapisan fasa air yang bersifat polar dan lapisan fasa organik yang bersifat semi polar atau nonpolar. Fasa air (polar) mengekstrak komponen gula (glikon) sedangkan fasa organik (semi polar maupun non polar) mengekstrak metabolit sekunder (aglikon) yang telah terpisah dengan komponen gulanya. Metabolit sekunder ini yang diindikasikan sebagai golongan senyawa aktif sebagai antioksidan. Ekstrak hasil partisi dari masing-masing fraksi dipisahkan dengan *rotary evaporator vacuum* hingga pelarut hampir teruapkan semua, kemudian ekstrak dialiri gas N_2 dan dihitung rendemen masing-masing ekstrak.

Tabel 4.3 Hasil ekstraksi dan rendemen dari masing-masing fraksi hasil partisi

Fraksi	Warna filtrate	Warna ekstrak pekat	Rendemen (%) (b/b)
n-Heksana	Hijau tua	Hijau kehitaman	45,6132
Petroleum eter	Hijau tua	Hijau kehitaman	8,1854
Kloroform	Hijau kecoklatan	Hijau kecoklatan	7,5573
Etil asetat	Hijau pudar	Hijau	7,4377
Air	Hijau pudar	Hijau	10,0897

Nilai rendemen dari masing-masing ekstrak pada Tabel 4.3. menunjukkan bahwa pada pelarut n-heksana memiliki hasil rendemen tertinggi yaitu sebesar 45,6132 %. Hasil memberikan informasi bahwa sebagian besar senyawa pada ekstrak metanol *Chlorella sp.* yang telah dihidrolisis memiliki kepolaran sesuai dengan kepolaran n-heksana (non polar).

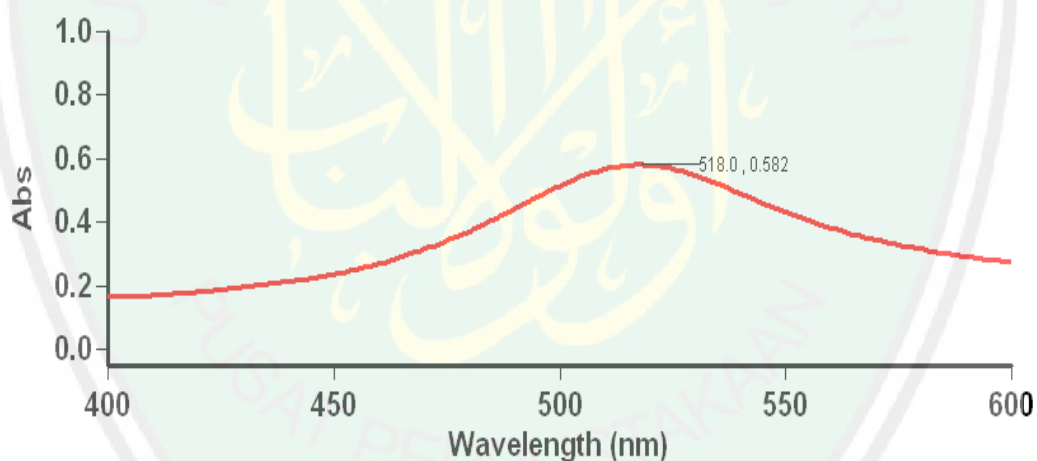
4.8 Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*)

4.8.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal. Menurut Rohman dan Abdul (2007), pada panjang gelombang maksimum kepekaannya juga maksimal karena pada panjang gelombang tersebut perubahan absorbansi untuk setiap satuan konsentrasi adalah yang paling besar.

Metode DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel (Hanani, 2005). Radikal DPPH yang memiliki elektron tidak berpasangan memiliki warna komplementer ungu dan menghasilkan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 515 – 520 nm (Prakash, 2007).

Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan DPPH diawali dengan penentuan panjang gelombang maksimum (λ_{maks}). Hasil yang diperoleh menunjukkan panjang gelombang maksimum DPPH 0,2 mM sebesar 518,0 nm dengan nilai serapan 0,582. Hal ini sesuai dengan penelitian Bariyyah (2013) tentang uji aktivitas antioksidan ekstrak *Chlorella sp.* dengan DPPH 0,5 mM, diperoleh λ_{maks} larutan DPPH adalah 518,0 nm. Kemudian juga dilaporkan bahwa larutan DPPH memiliki panjang gelombang maksimum sebesar 515,1 nm, 516 nm, dan 518,0 nm (Mardiyah, 2012; Wulansari, 2011; Syukur, dkk., 2011). Hasil spektra UV-Vis larutan DPPH 0,2 mM ditunjukkan pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Hasil Spektra UV-Vis larutan DPPH 0,2 mM

4.8.2 Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan

Pengukuran waktu kestabilan penting dilakukan karena untuk mengetahui waktu sampel dan DPPH sudah bereaksi secara stabil yang ditunjukkan dengan tidak adanya lagi penurunan absorbansi. Setiap senyawa memiliki waktu

kestabilan yang berbeda untuk dapat bereaksi secara sempurna (Brand dan William, 2001).

Penentuan waktu kestabilan dilakukan pada ekstrak metanol, hasil partisi fraksi n-heksana, petroleum eter, kloroform, etil asetat, fasa air, serta pembanding BHT dan vitamin C. Sehingga masing-masing sampel diukur waktu kestabilan tanpa inkubasi dan dengan inkubasi pada suhu 37 °C selama 5 – 100 menit (atau sampai diperoleh batas atas waktu kestabilannya) dengan interval 5 menit. Hasil penentuan waktu kestabilan masing-masing ekstrak terhadap DPPH menggunakan inkubasi pada suhu 37 °C dan tanpa inkubasi disajikan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Waktu kestabilan masing-masing ekstrak

Sampel	Waktu kestabilan dengan inkubasi (menit)	Waktu kestabilan tanpa inkubasi (menit)
Vitamin C	25-50	40-65
BHT	35-75	65-90
Ekstrak Metanol	15-65	60-95
Ekstrak n-Heksana	45-90	55-85
Ekstrak Petroleum Eter	55-85	65-95
Ekstrak Kloroform	55-90	75-105
Ekstrak Etil Asetat	60-90	85-120
Ekstrak Fasa Air	55-95	75-120

Hasil penentuan waktu kestabilan masing-masing ekstrak menunjukkan bahwa sampel yang ditambahkan dengan DPPH dengan inkubasi pada suhu 37 °C memiliki waktu kestabilan yang lebih cepat dicapai dan nilai absorbansi yang lebih stabil dibandingkan tanpa inkubasi. Data dapat dilihat pada Lampiran 6. Sebagaimana menurut Suroso (2007), sampel dengan inkubasi cenderung lebih stabil dan memiliki penurunan nilai absorbansi yang lebih rendah dibandingkan tanpa inkubasi.

Pada proses inkubasi, reaksi yang terjadi antara radikal DPPH dengan senyawa metabolit sekunder akan berlangsung lebih cepat dan optimal akibat adanya peningkatan suhu, dan senyawa radikal DPPH akan tereduksi menjadi DPPH-H yang ditandai dengan adanya perubahan warna. Proses inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C karena diduga suhu tersebut merupakan suhu yang telah terkondisikan agar reaksi antara radikal DPPH dan senyawa antioksidan berlangsung lebih cepat dan optimal.

Bariyyah (2013) melakukan pengujian antioksidan ekstrak metanol dan etil asetat *Chlorella sp.* dengan hasil waktu kestabilan dengan inkubasi pada suhu 37 °C untuk ekstrak metanol adalah 30–55 menit dan ekstrak etil asetat adalah 45–80 menit. Sedangkan untuk waktu kestabilan tanpa inkubasi dari masing-masing ekstrak tidak stabil. Kemudian Hanani, dkk., (2005) melakukan pengujian antioksidan larutan ekstrak spons *Callyspongia sp.* yang telah ditambahkan DPPH dengan diinkubasi pada suhu 37 °C pada waktu 30 menit.

4.8.3 Pengukuran Potensi Antioksidan pada Mikroalga *Chlorella sp.*

Uji kuantitatif potensi antioksidan pada ekstrak *Chlorella sp.* dalam penelitian ini dilakukan dengan metode DPPH. Metode DPPH didasarkan pada perubahan warna radikal DPPH dari warna ungu menjadi warna kuning dan diukur menggunakan instrumen spektrofotometer *UV-Vis*. Perubahan warna tersebut disebabkan oleh reaksi antara radikal bebas DPPH dengan satu atom hidrogen yang dilepaskan senyawa yang terkandung dalam bahan uji untuk membentuk senyawa *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin* yang berwarna kuning. Pada

metode ini absorbansi yang diukur adalah absorbansi larutan DPPH sisa yang tidak bereaksi dengan senyawa antioksidan (Josephy, 1997).

Pengujian potensi antioksidan ini dilakukan pada ekstrak metanol *Chlorella* sp. (sebelum dihidrolisis), fraksi hasil partisi n-heksana, petroleum eter, kloroform, etil asetat dan sisa fasa air. Disamping itu juga diukur aktivitas antioksidan untuk pembanding yaitu BHT dan vitamin C (asam askorbat). Pengukuran potensi antioksidan dari masing-masing sampel dilakukan pada berbagai variasi konsentrasi sampel yaitu konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm, selanjutnya diinkubasi sesuai waktu kestabilan yang telah didapatkan pada masing-masing ekstrak. Kemudian sampel diukur serapannya pada panjang gelombang 518,0 nm (hasil panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh dari pengukuran sebelumnya).

Pengukuran aktivitas antioksidan pada sampel menggunakan larutan kontrol DPPH 0,2 mM. Larutan DPPH kontrol digunakan untuk memberikan kestabilan pada saat pengukuran aktivitas antioksidan pada sampel (Arindah, 2010). Menurut Molyneux (2003), nilai absorbansi kontrol dapat berkurang dari hari ke hari dikarenakan kehilangan aktivitasnya saat dalam stok larutan DPPH, tetapi nilai absorbansi kontrol tetap dapat memberikan *baseline* untuk pengukuran saat itu.

Tiap sampel mengalami perubahan warna setelah diinkubasi pada suhu 37 °C sesuai dengan waktu kestabilannya. Perubahan warna pada tiap sampel yang berbeda menandakan bahwa pada tiap sampel memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang berbeda-beda. Pengurangan intensitas warna yang terjadi

berhubungan dengan jumlah elektron DPPH yang menangkap atom hidrogen dari senyawa antioksidan. Pengurangan intensitas warna mengindikasikan peningkatan kemampuan antioksidan untuk menangkap radikal bebas (Prakash, 2001). Data perubahan warna sebelum dan sesudah diinkubasi disajikan pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Perubahan warna tiap sampel sebelum dan setelah diinkubasi

Sampel	Warna sebelum inkubasi	Warna setelah inkubasi
Ekstrak metanol	Ungu tua	Merah muda keunguan
Ekstrak n-heksana	Ungu tua	Ungu pudar
Ekstrak petroleum eter	Ungu tua	Ungu pudar, kuning
Ekstrak kloroform	Ungu tua	Ungu pudar
Ekstrak etil asetat	Ungu tua	Merah muda keunguan
Ekstrak air	Ungu tua	Ungu
Vitamin C	Ungu, kuning	Kuning
BHT	Ungu, kuning	Jingga, kuning

Hasil pengukuran masing-masing ekstrak pada Tabel 4.5 menunjukkan bahwa ekstrak yang ditambahkan larutan DPPH tidak sepenuhnya mengalami perubahan warna dari ungu menjadi kuning. Ekstrak fraksi petroleum eter saja yang mengalami perubahan dari ungu menjadi kuning (untuk konsentrasi 30 ppm). Perubahan warna dari ungu menjadi kuning berarti ada senyawa-senyawa antioksidan dalam ekstrak *Chlorella sp.* yang meredam radikal DPPH.

Absorbansi kontrol dan absorbansi sampel yang diperoleh secara spektrofotometri *UV-Vis* selanjutnya digunakan untuk menentukan persen (%) aktivitas antioksidan maupun EC_{50} . Persen (%) aktivitas antioksidan dan nilai EC_{50} merupakan parameter yang digunakan untuk mengetahui potensi antioksidan dalam ekstrak *Chlorella sp.*

Persen aktivitas antioksidan menunjukkan banyaknya atom hidrogen dari senyawa antioksidan yang menangkap radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi

DPPH-H (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyn*) (Rahayu dkk., 2010). Persen aktivitas antioksidan dinyatakan dalam persen (%). Semakin besar persen aktivitas antioksidannya maka semakin besar kemampuan ekstrak dalam meredam radikal DPPH.

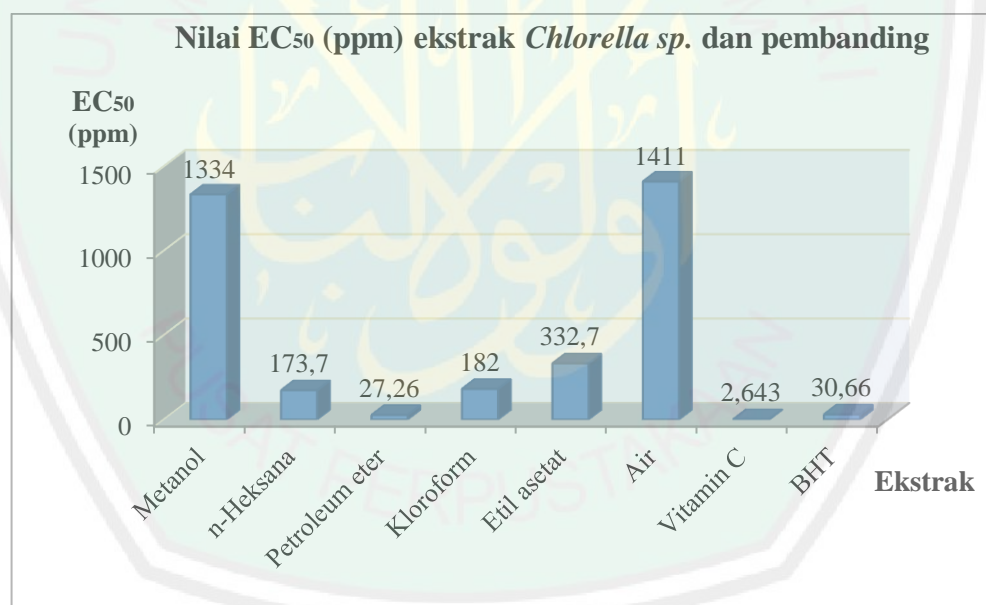
Persen (%) aktivitas antioksidan dari ekstrak *Chlorella sp.* dan pembanding ditunjukkan dalam Tabel 4.6. Penggunaan pembanding untuk mengetahui seberapa kuat potensi antioksidan yang ada pada ekstrak *Chlorella sp.* jika dibandingkan dengan antioksidan sintetis yang sudah sering dipakai seperti BHT dan vitamin C (asam askorbat).

Tabel 4.6 Persen aktivitas antioksidan ekstrak *Chlorella sp.* dan pembanding

No.	Ekstrak	% aktivitas antioksidan pada tiap konsentrasi					
		5 ppm	10 ppm	15 ppm	20 ppm	25 ppm	30 ppm
1.	Metanol	0,6098	0,6646	0,8864	1,2065	1,8387	2,0957
2.	n-Heksana	0,1480	0,4425	0,4901	0,5234	0,6388	1,7564
3.	Petroleum eter	0,7068	1,8652	2,5287	7,8273	37,6118	64,8839
4.	Kloroform	0,8342	0,8476	4,8666	5,3512	7,9819	8,0472
5.	Etil asetat	0,8618	4,6571	4,7180	5,7809	7,1768	9,4496
6.	Air	0,9902	1,2737	1,6327	1,7731	2,5699	3,4392
7.	Vitamin C	71,2814	76,0809	94,4278	94,8744	95,4452	95,9923
8.	BHT	9,9193	20,6979	34,0538	38,1616	40,1994	51,1178

Hasil pengukuran persen aktivitas antioksidan pada Tabel 4.6 menunjukkan bahwa ekstrak fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* pada konsentrasi 30 ppm memiliki persen (%) aktivitas antioksidan yang paling besar dibandingkan ekstrak *Chlorella sp.* lainnya. Persen aktivitas antioksidan ekstrak fraksi petroleum eter pada konsentrasi 30 ppm lebih tinggi dibandingkan pembanding BHT tetapi lebih kecil dibandingkan dengan vitamin C (pada konsentrasi 30 ppm).

Parameter selanjutnya untuk mengetahui potensi antioksidan dalam sampel adalah nilai EC_{50} (*effective concentration*). EC_{50} dapat didefinisikan sebagai konsentrasi larutan sampel yang akan menyebabkan reduksi terhadap aktivitas DPPH sebesar 50 %. Semakin kecil nilai EC_{50} maka aktivitas antioksidannya semakin tinggi (Molyneux, 2004). Nilai EC_{50} diperoleh dengan mengolah data persen aktivitas antioksidan dan dianalisis menggunakan persamaan regresi non linear dengan menggunakan “*GraphPad prism6 software, Regression for analyzing dose-response data*”. Data hasil nilai EC_{50} ditunjukkan pada Gambar 4.8.



Gambar 4.8 Nilai EC_{50} ekstrak *Chlorella sp.* dan pembandingan

Data nilai EC_{50} dari masing-masing ekstrak yang terdapat pada Gambar 4.8. Ekstrak metanol merupakan ekstrak *Chlorella sp.* sebelum dihidrolisis, kemudian ekstrak n-heksana, petroleum eter, kloroform, dan etil asetat merupakan ekstrak hasil hidrolisis asam ekstrak metanol *Chlorella sp.* yang dilanjutkan dengan partisi pelarut. Sedangkan ekstrak air adalah sisa fasa air saat proses

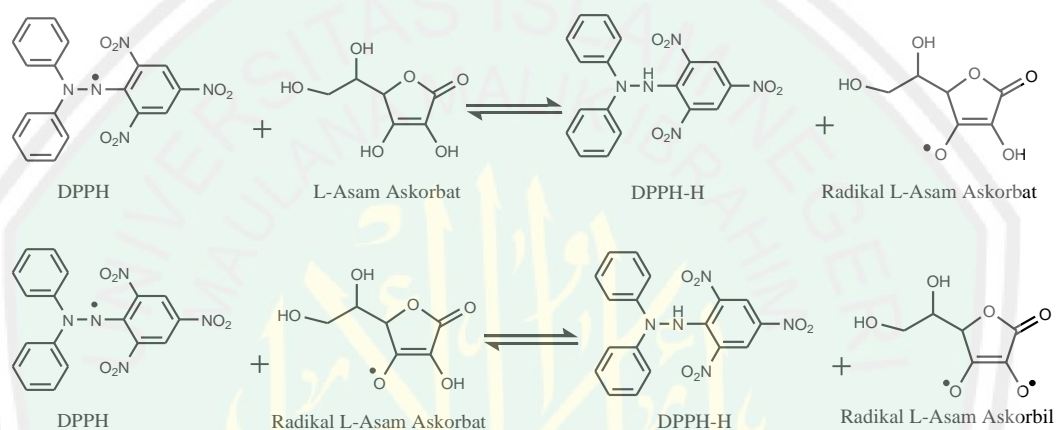
partisi. Vitamin C dan BHT merupakan pembanding senyawa antioksidan yang telah sering digunakan.

Ekstrak petroleum eter memiliki nilai EC_{50} terkecil diantara masing-masing ekstrak *Chlorella sp.*. Nilai EC_{50} ekstrak petroleum eter adalah 27,26 ppm artinya dengan penambahan antioksidan dari ekstrak sebanyak 27,26 ppm larutan uji akan menangkap radikal bebas sebanyak 50 % dari total radikal bebas. Hasil ini juga menunjukkan bahwa ekstrak *Chlorella sp.* setelah dihidrolisis dan dipartisi dengan petroleum eter memiliki potensi antioksidan yang lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak sebelum dihidrolisis (ekstrak metanol). Hal ini terlihat dari nilai EC_{50} ekstrak petroleum eter lebih kecil dibandingkan dengan EC_{50} ekstrak metanol. Rohman, dkk. (2005) menyatakan bahwa semakin kecil EC_{50} suatu senyawa uji maka senyawa tersebut semakin efektif sebagai penangkal radikal bebas.

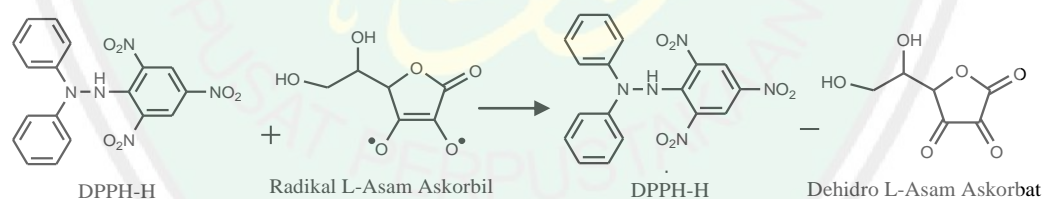
Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai EC_{50} bernilai kurang dari 50 ppm, kuat jika bernilai 50 – 100 ppm, sedang jika bernilai 100 – 150 ppm, lemah jika bernilai 150 – 200 ppm, dan sangat lemah jika bernilai > 200 ppm (Hidajat, 2005). Ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* fraksi petroleum eter termasuk dalam antioksidan sangat kuat ($EC_{50} < 50$ ppm), fraksi n-heksana dan kloroform termasuk dalam antioksidan lemah (EC_{50} 150 – 200 ppm), sedangkan ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan fasa air dapat dikatakan memiliki potensi antioksidan yang sangat lemah karena nilai EC_{50} -nya lebih besar dari 200 ppm.

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan sekunder berfungsi sebagai sistem pertahanan preventif yaitu dengan cara memotong atau memutuskan reaksi

oksidasi berantai dari radikal bebas. Asam askorbat memberikan 2 atom H kepada radikal nitrogen pada DPPH. Meskipun telah mendonorkan atom H-nya, asam askorbat tetap stabil dengan mengubah dirinya menjadi dehidro-L-asam askorbat. Mekanisme aktivitas antioksidan asam askorbat dengan DPPH ditunjukkan pada Gambar 4.9.



Gambar 4.9 Reaksi asam askorbat dengan DPPH (Nishizawa, 2005 dalam Arindah, 2010)

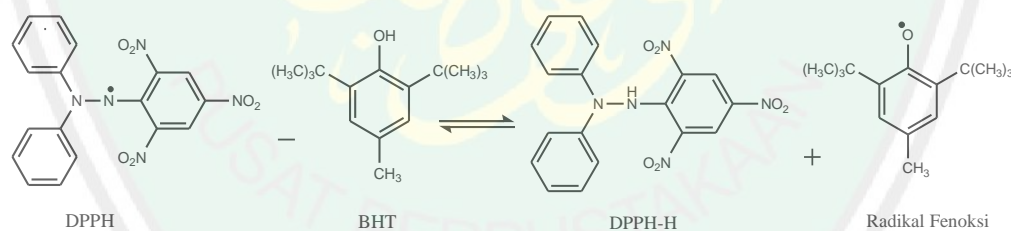


Gambar 4.10 Produk akhir reaksi asam askorbat dengan DPPH (Nishizawa, 2005 dalam Arindah, 2010)

Reaksi pada Gambar 4.9, asam askorbat mampu mereduksi radikal bebas DPPH dengan mendonorkan 1 atom hidrogen sehingga menghasilkan produk radikal L-asam askorbat dan DPPH-H. Radikal L-asam askorbat kemudian akan mendonorkan 1 atom hidrogen pada radikal DPPH dan terbentuk radikal L-askorbil dan DPPH-H. Radikal L-askorbil yang terbentuk bersifat stabil karena

radikal dapat menstabilkan diri yang terlihat pada Gambar 4.10. Dari mekanisme reaksi antara asam askorbat dengan radikal DPPH di atas dapat diketahui bahwa satu molekul asam askorbat dapat meredam 2 molekul radikal DPPH.

Antioksidan BHT merupakan antioksidan sintetik yang juga memiliki kemampuan untuk meredam radikal bebas. Antioksidan BHT merupakan senyawa aromatik yang memiliki satu gugus hidroksil. Antioksidan BHT ini mendonorkan 1 atom hidrogennya pada gugus hidroksil kepada DPPH sehingga radikal DPPH tereduksi menjadi DPPH-H. BHT yang menjadi radikal fenoksi lebih stabil. Kestabilan radikal fenoksi ini disebabkan karena radikal fenoksi dapat mendelokasikan elektronnya (Husnah, 2004). BHT bereaksi dengan radikal DPPH menghasilkan DPPH-H dan radikal fenoksi. Adapun reaksi BHT dengan radikal DPPH dapat dilihat pada Gambar 4.11.



Gambar 4.11 Reaksi BHT dengan DPPH (Brand dan William 1995 dalam Husnah 2004)

4.9 Uji Fitokimia Ekstrak *Chlorella sp.* dengan Reagen

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif pada tanaman secara kualitatif. Uji fitokimia pada penelitian ini dilakukan terhadap ekstrak *Chlorella sp.* yang meliputi ekstrak metanol, fraksi n-heksana, petroleum

eter, kloroform, etil asetat dan fasa air. Hasil uji fitokimia mikroalga *Chlorella sp.* ditunjukkan dalam Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Hasil pengamatan uji fitokimia ekstrak mikroalga *Chlorella sp.*

No.	Golongan Senyawa	Hasil Pengujian Tiap Ekstrak					
		Metanol	n-Heksana	Petroleum eter	Kloroform	Etil asetat	Air
1.	Alkaloid	-	-	-	-	-	-
2.	Flavonoid	-	-	-	-	-	-
3.	Steroid	+	+	+	+	+	+
4.	Terpenoid	-	-	-	-	-	-
5.	Asam askorbat	+	+	+	+	+	+

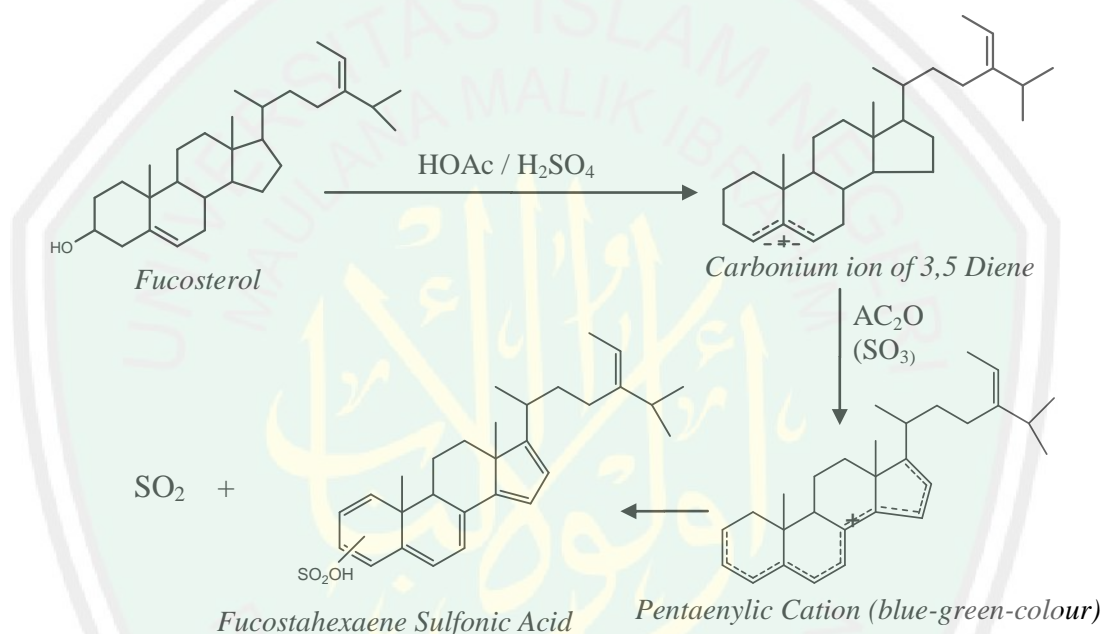
Keterangan : tanda + : terkandung senyawa/warna muda
tanda - : tidak terkandung senyawa/tidak terbentuk warna

Hasil uji fitokimia pada Tabel 4.7 menunjukkan bahwa ekstrak *Chlorella sp.* dari tiap-tiap fraksi mengandung steroid dan asam askorbat. Menurut Sriwahyuni (2010), golongan senyawa aktif yang terdapat dalam tanaman berkaitan dengan aktivitas biologis suatu tanaman. Dari hasil uji fitokimia, golongan senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak *Chlorella sp.* diduga berperan dalam memberikan aktivitas antioksidan, sebagaimana ditunjukkan fraksi petroleum eter yang memiliki nilai EC₅₀ paling rendah.

4.9.1 Steroid

Uji yang digunakan untuk mengidentifikasi adanya golongan senyawa steroid pada ekstrak *Chlorella sp.* yaitu menggunakan reaksi Liebermann-Burchard (anhidrida asetat-H₂SO₄ pekat) yang menghasilkan warna hijau biru. Steroid akan mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat dan menghasilkan produk oksidasi yang memberikan reaksi warna hijau kebiruan. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa ekstrak metanol *Chlorella sp.* mengandung

steroid yang ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan. Gambar 4.12 menunjukkan contoh reaksi senyawa golongan steroid (fukosterol) dengan reagen Liebermann-Burchard. Fukosterol termasuk dalam golongan steroid yang kebanyakan ditemukan pada tumbuhan tingkat rendah. Fukosterol juga merupakan steroid utama pada ganggang coklat (Sirait, 2007).



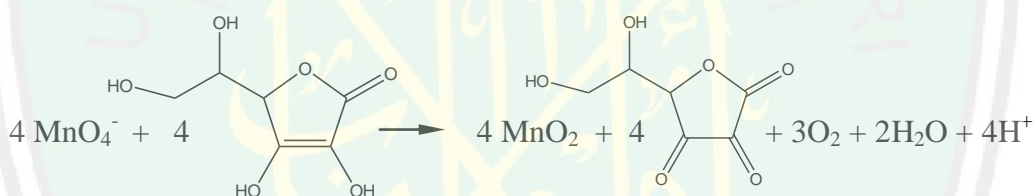
Gambar 4.12 Contoh reaksi Fukosterol dengan reagen Liebermann-Burchard (mengacu pada Burke, dkk., 1974).

Hasil pengamatan menunjukkan ekstrak *Chlorella sp.* baik sebelum maupun sesudah dihidrolisis dan dipartisi memberikan warna hijau kebiruan pada uji golongan senyawa steroid. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mengandung golongan senyawa aktif steroid. Senyawa steroid cenderung bersifat non polar atau semi polar, namun dapat terekstrak dalam pelarut metanol yang bersifat polar. Hal ini diduga karena steroid masih terikat pada glikosidanya sehingga ikut terekstrak dalam pelarut metanol yang bersifat polar. Beberapa

senyawaan steroid mengandung gugus $-OH$ yang sering disebut dengan sterol, sehingga sifatnya cenderung lebih polar (Sriwahyuni, 2010).

4.9.2 Asam Askorbat

Asam askorbat dapat diidentifikasi menggunakan larutan kalium permanganat dalam suhu kamar dengan adanya perubahan warna dari pereduksi kalium permanganat yang semula berwarna ungu berubah menjadi coklat. Reaksi asam askorbat dengan kalium permanganat ditunjukkan pada Gambar 4.13. Ekstrak *Chlorella sp.* positif mengandung asam askorbat yang ditunjukkan dengan terbentuknya warna coklat.



Gambar 4.13 Dugaan reaksi asam askorbat dengan kalium permanganat (Bariyyah, 2013)

4.10 Pemisahan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis Analitik (KLTA)

Kromatografi lapis tipis (KLT) ialah metode pemisahan yang didasarkan pada perbedaan distribusi molekul-molekul komponen diantara dua fasa (fase gerak/eluen dan fase diam/adsorben) yang kepolarannya berbeda. Prinsip pemisahan KLT adalah adanya perbedaan sifat fisik dan kimia dari senyawa yaitu kecenderungan dari molekul untuk melarut dalam cairan (kelarutan), kecenderungan molekul untuk menguap dan kecenderungan molekul untuk melekat pada permukaan fase diam (Hendayana, 2006).

KLT analitik digunakan untuk mengetahui eluen terbaik dalam memisahkan senyawa. Pada penelitian ini, KLTA dilakukan terhadap ekstrak yang menghasilkan nilai EC_{50} terbaik (EC_{50} terkecil) dan memiliki golongan senyawa aktif yang positif pada uji reagen. Sehingga KLTA dilakukan pada ekstrak fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* yang positif mengandung senyawa steroid dan asam askorbat.

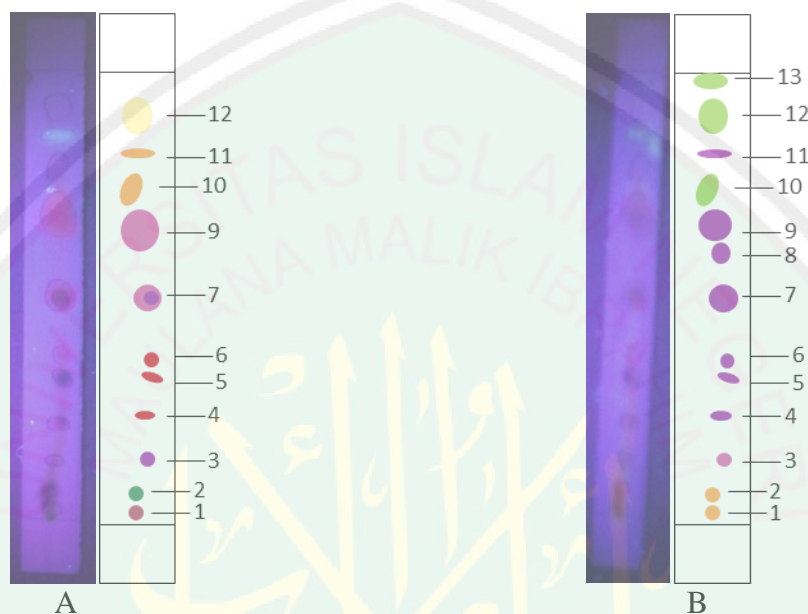
KLTA untuk golongan senyawa steroid menggunakan eluen n-heksana:aseton (7:3) (Syamsudin, dkk., 2007), n-heksana:etil asetat (9:1), n-heksana:etil asetat (8:2) (Sulastry dan Kurniawati, 2010), n-heksana:etil asetat (6:4) (Reveny, 2011), n-heksana:etil asetat (7:3) (Hayati, 2012), dengan pereaksi Lieberman Buchard dideteksi di bawah lampu UV 366 nm. Hasil elusi ditampilkan pada Tabel 4.8.

Tabel 4.8 Data penampakan noda senyawa steroid dari hasil KLTA fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* dengan lampu UV 366 nm

No.	Fase Gerak	Jumlah noda dengan pendeteksi Lieberman- Buchard	Nilai Rf
1.	heksana:aseton (7:3)	13	0,03; 0,06; 0,13; 0,21; 0,31; 0,36; 0,5; 0,69; 0,79; 0,84; 0,93; 0,96; 0,99
2.	heksana:etil asetat (9:1)	6	0,04; 0,08; 0,1; 0,14; 0,44; 0,65
3.	heksana:etil asetat (8:2)	8	0,03; 0,05; 0,09; 0,15; 0,51; 0,55; 0,59; 0,77
4.	heksana:etil asetat (6:4)	3	0,03; 0,1375; 1
5.	heksana:etil asetat (7:3)	12	0,03; 0,13; 0,25; 0,46; 0,53; 0,58; 0,73; 0,74; 0,79; 0,85; 0,93; 0,96

Berdasarkan 5 variasi eluen tersebut, terdapat dua macam campuran eluen yang menunjukkan hasil pemisahan baik yaitu KLT dengan eluen heksana:aseton

(7:3) dan n-heksana:etil asetat (7:3). Hasil KLT dari pemisahan steroid fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* dengan eluen n-heksana : aseton (7:3) dapat ditunjukkan pada Gambar 4.14.



Gambar 4.14 Hasil KLT senyawa steroid pada fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* pada eluen n-heksana:aseton (7:3) dideteksi dibawah lampu UV 366 nm
 (a) hasil elusi sebelum disemprot reagen Lieberman-Burchard
 (b) hasil elusi setelah disemprot reagen Lieberman-Burchard

Gambar 4.14 menunjukkan hasil pemisahan senyawa golongan steroid pada fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* secara KLT dengan eluen n-heksana : aseton (7:3) yang dideteksi di bawah lampu UV 366 nm. Hasil pengamatan merupakan hasil elusi sebelum dan setelah disemprot reagen Lieberman-Burchard. Rincian keterangan warna dan nilai Rf ditampilkan pada Tabel 4.9.

Tabel 4.9 Hasil KLT senyawa steroid pada fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* pada eluen n-heksana:aseton (7:3) dideteksi di bawah lampu UV 366 nm

No.	Rf tiap noda	Warna noda di bawah sinar UV pada λ 366 nm		Dugaan senyawa
		Sebelum disemprot reagen Liebermann-Buchard	Setelah disemprot reagen Liebermann-Buchard	
1	0,03	Merah muda	Orange	-
2	0,06	Hijau	Orange	-
3	0,13	Ungu	Merah muda	Steroid
4	0,21	Merah	Ungu	Steroid
5	0,31	Merah	Ungu	Steroid
6	0,36	Merah	Ungu	Steroid
7	0,50	Merah muda-ungu	Ungu	Steroid
8	0,69	-	Ungu	Steroid
9	0,79	Merah muda-ungu	Ungu	Steroid
10	0,84	Orange	Hijau	Steroid
11	0,93	Orange	Ungu	Steroid
12	0,96	Kuning	Hijau	Steroid
13	0,99	-	Hijau	Steroid

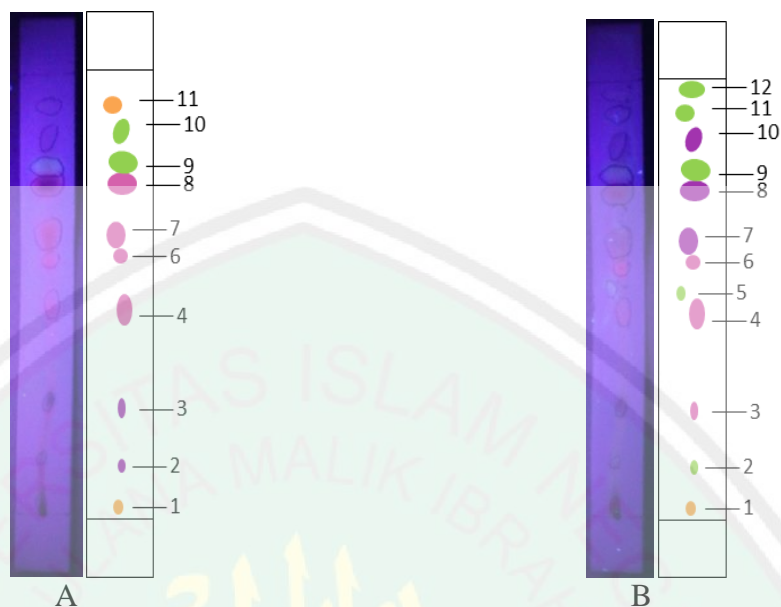
Hasil identifikasi dengan KLT golongan senyawa steroid dalam fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* dengan eluen n-heksana : aseton (7:3) menghasilkan pemisahan yang baik karena dihasilkan 13 spot atau noda jelas dan tidak terjadi *tailing*. Pemisahan dikatakan baik apabila menghasilkan komponen senyawa berupa noda yang banyak, noda yang terbentuk bulat tidak berekor, dan pemisahan nodanya jelas (Gandjar dan Rohman, 2007).

Noda yang berhasil dipisahkan memiliki rentang nilai Rf antara 0,03–0,99 dengan noda 1 dan 2 berwarna orange, noda 3 berwarna merah muda, noda 4–9 dan noda 11 berwarna ungu, kemudian noda 10, 12, 13 berwarna hijau. Pada hasil KLT ini yang diduga senyawa golongan steroid adalah noda dengan warna ungu dan hijau setelah disemprot reagen Liebermann-Burchard dan dideteksi di bawah lampu UV 366 nm. Penelitian sebelumnya (Handayani, dkk., 2008) hasil KLT golongan senyawa steroid dengan pereaksi Lieberman-Burchard menunjukkan

terbentuknya noda berwarna hijau. Biru ungu sampai coklat setelah disemprot pereaksi Lieberman-Burchard dan dideteksi di bawah lampu UV 366 nm (Syamsudin, dkk., 2007).

Eluen yang digunakan adalah campuran n-heksana dengan aseton dengan perbandingan 7:3. Berdasarkan perbandingan tersebut maka komposisi n-heksana lebih banyak dari pada komposisi aseton, sehingga eluen cenderung bersifat nonpolar. Sedangkan plat KLT yang digunakan terbuat dari silika yang dilapisi dengan alumunium, sehingga cenderung bersifat polar. Penelitian ini menunjukkan ada 13 noda yang terpisah, tetapi noda yang diasumsikan mengandung adanya senyawa golongan steroid ada 11 noda yaitu nilai Rf 0,13–0,99. Senyawa steroid pada noda dengan Rf 0,13 cenderung terdistribusi pada fase diamnya sehingga senyawa steroid yang terelusi ini memiliki sifat yang lebih polar dibandingkan dengan noda yang memiliki nilai Rf > 0,13. Tingkat kepolaran senyawa steroid dengan nilai Rf adalah Rf 0,13 > 0,21 > 0,31 > 0,36 > 0,50 > 0,69 > 0,79 > 0,84 > 0,93 > 0,96 > 0,99.

Hasil pemisahan senyawa golongan steroid pada fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* yang juga menghasilkan pemisahan yang baik adalah dengan eluen n-heksana : etil asetat (7:3). Hasil elusi dapat ditunjukkan pada Gambar 4.15 dengan rincian keterangan warna dan nilai Rf ditampilkan pada Tabel 4.10.



Gambar 4.15 Hasil KLT senyawa steroid pada fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* pada eluen n-heksana:etil asetat (7:3) dideteksi dibawah lampu UV 366 nm
 (a) hasil elusi sebelum disemprot reagen Lieberman-Burchard
 (b) hasil elusi setelah disemprot reagen Lieberman-Burchard

Tabel 4.10 Hasil KLT senyawa steroid pada fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* pada eluen n-heksana:etil asetat (7:3) dideteksi di bawah lampu UV 366 nm

No.	Rf tiap noda	Warna noda di bawah sinar UV pada λ 366 nm		Dugaan senyawa
		Sebelum disemprot reagen Liebermann-Buchard	Setelah disemprot reagen Liebermann-Buchard	
1	0,03	Orange	Orange	-
2	0,13	Ungu	Hijau	Steroid
3	0,25	Ungu	Merah muda	Steroid
4	0,46	Merah muda	Merah muda	Steroid
5	0,53	-	Hijau	Steroid
6	0,58	Merah muda	Merah muda	Steroid
7	0,63	Merah muda	Ungu	Steroid
8	0,74	Merah muda	Ungu	Steroid
9	0,79	Hijau	Hijau	Steroid
10	0,85	Hijau	Ungu	Steroid
11	0,93	Orange	Hijau	Steroid
12	0,96	-	Hijau	Steroid

Hasil identifikasi dengan KLT golongan senyawa steroid dalam fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* dengan eluen n-heksana : etil asetat (7:3) menghasilkan pemisahan yang baik karena dihasilkan 12 spot atau noda jelas dan tidak terjadi *tailing*. Noda yang berhasil dipisahkan memiliki rentang nilai Rf antara 0,03–0,96 dengan noda 1 berwarna orange; noda 3, 4, 6 berwarna merah muda; noda 2, 5, 9, 11, 12 berwarna hijau; dan noda 7, 8, 10 berwarna ungu. Noda yang diduga senyawa golongan steroid adalah noda dengan warna merah muda, ungu dan hijau. Hasil pemisahan dengan eluen n-heksana : aseton (7:3) dengan rentang Rf 0,13–0,99 dan n-heksana : etil asetat (7:3) dengan Rf 0,13–0,96 memiliki hasil warna yang sama untuk noda yang diduga senyawa steroid yaitu warna merah muda, hijau dan ungu.

Berdasarkan perbandingan eluen n-heksana:etil asetat (7:3), maka komposisi n-heksana lebih banyak dari pada komposisi etil asetat, sehingga eluen cenderung bersifat nonpolar sedangkan plat KLT cenderung bersifat polar. Hasil penelitian ini menunjukkan ada 12 noda yang terpisah dengan noda yang diasumsikan mengandung adanya senyawa golongan steroid memiliki nilai Rf yang besar. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa steroid cenderung terdistribusi pada fase geraknya sehingga senyawa steroid yang terelusi ini memiliki sifat yang lebih nonpolar daripada fase diamnya dan memiliki koefisien distribusi yang kecil.

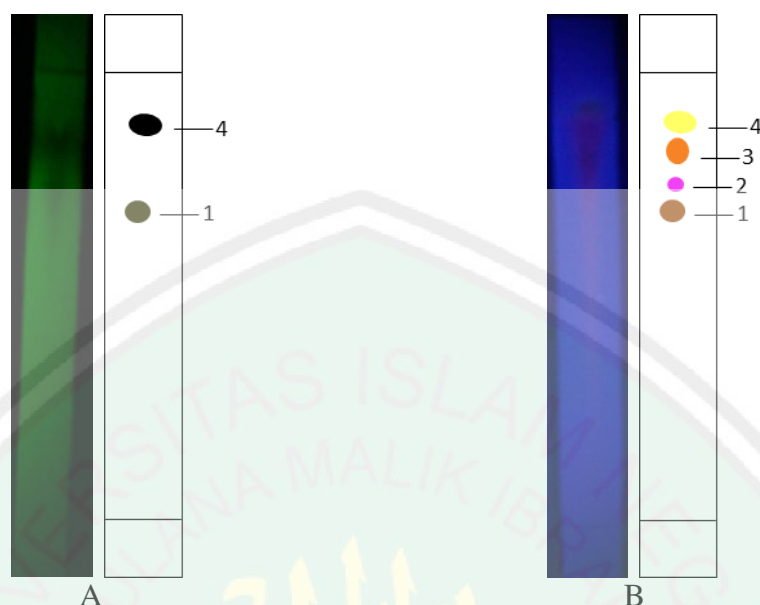
Senyawa yang juga positif terdeteksi dalam fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* adalah asam askorbat. Identifikasi asam askorbat dengan KLTA menggunakan eluen etanol:asam asetat 10 % (9:1) (Harbone, 1987), etanol:asam asetat glasial

(9:1), etanol:asam asetat 1% (9:1) (Himesh, dkk., 2012) , etanol:asam asetat glasial:toluen (5,5:1:1,5) (Kondawar, dkk., 2011), etil asetat:asam asetat glasial:asam format:air (6:1:1:2) (Patel dan Telange, 2011), dilihat dibawah lampu UV 254 nm menghasilkan spot biru gelap-hitam. Tetapi sebagai perbandingan, hasil elusi juga dideteksi di bawah lampu UV 366 nm. Hasil elusi dari tiap eluen ditunjukkan pada Tabel 4.11.

Tabel 4.11 Data penampakan noda senyawa asam askorbat dari hasil KLTA fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* dengan lampu UV 254 nm dan 366 nm

No.	Fase Gerak	Pada 254 nm		Pada 366 nm	
		Noda	Rf	Noda	Rf
1.	etanol:asam asetat 10 % (9:1)	2	0,80; 0,91	4	0,80; 0,86; 0,89; 0,91
2.	etanol:asam asetat glasial (9:1)	1	0,94	2	0,91; 0,96
3.	etanol:asam asetat 1% (9:1)	2	0,79; 0,89	3	0,79; 0,84; 0,89
4.	etanol:asam asetat glasial:toluen (5,5:1:1,5)	1	0,96	1	0,96
5.	etil asetat:asam asetat glasial:asam format:air (6:1:1:2)	1	0,94	1	0,95

Berdasarkan 5 variasi eluen dalam KLT asam askorbat, terdapat eluen yang menunjukkan hasil pemisahan baik yaitu KLT dengan eluen etanol:asam asetat 10 % (9:1). Hasil KLT dari pemisahan asam askorbat fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* dengan eluen etanol:asam asetat 10 % (9:1) dapat ditunjukkan pada Gambar 4.16 dengan rincian keterangan warna dan nilai Rf ditampilkan pada Tabel 4.12.



Gambar 4.16 Hasil KLT asam askorbat pada fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* pada eluen etanol:asam asetat 10 % (9:1)
 (a) hasil elusi dideteksi di bawah lampu UV 254 nm
 (b) hasil elusi dideteksi di bawah lampu UV 366 nm

Tabel 4.12 Hasil KLT asam askorbat pada fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* dengan eluen etanol:asam asetat 10 % (9:1)

No	Rf	Warna noda pada 254 nm	Warna noda pada 366 nm	Dugaan senyawa
1	0,80	Coklat-hitam	Orange-coklat	-
2	0,86	-	Merah muda-ungu	-
3	0,89	-	Orange	-
4	0,91	Hitam	kuning	Asam askorbat

Hasil identifikasi asam askorbat dalam fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* secara KLT dengan eluen etanol:asam asetat 10 % (9:1) terdeteksi 2 spot berwarna coklat hitam dan hitam pada panjang gelombang 254 nm dan 4 spot pada 366 nm dengan warna orange kecoklatan, merah muda-ungu, orange dan kuning. Noda yang diduga senyawa asam askorbat adalah noda 4 dengan Rf 0,91 karena dilihat dibawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm menghasilkan spot biru gelap. Asam askorbat yang bersifat polar lebih terdistribusi ke fasa

geraknya (etanol:asam asetat 10 % (9:1)) yang bersifat lebih polar dari pada plat KLT sehingga memiliki Rf yang besar yaitu 0,91.

Harga Rf untuk senyawa-senyawa murni dapat dibandingkan dengan harga standart. Harga Rf yang diperoleh hanya berlaku untuk campuran tertentu dari pelarut dan penyerap yang digunakan (Sastrohamidjojo, 2007). 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).

Penelitian sebelumnya (Patel dan Telange, 2011) hasil KLT standar asam askorbat dengan eluen etil asetat:asam asetat glasial:asam format:air (6:1:1:2) dan dilihat di bawah lampu UV 254 nm menghasilkan noda gelap dengan Rf 0,60. Kemudian Himesh, dkk. (2012) memperoleh hasil KLT standar asam askorbat dengan eluen etanol:asam asetat 1% (9:1) yang dideteksi di bawah lampu UV 254 nm menunjukkan noda biru gelap dengan Rf 0,51. Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan hasil Rf standar asam askorbat yang berbeda namun warna noda yang sama yaitu noda gelap.

Perbedaan warna penampakan noda maupun plat KLT pada saat hasil elusi dideteksi di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm dikarenakan plat KLT yang digunakan adalah silika gel F₂₅₄. Lempeng KLT ini tersedia dengan indikator fluoresen (bahan yang berpedar) berupa seng silikat yang mengemisikan suatu fluoresensi hijau ketika disinari lampu UV pada panjang gelombang 254 nm.

4.11 Pemanfaatan Mikroalga *Chlorella sp.* sebagai Antioksidan dalam Perspektif Islam

Tanaman merupakan salah satu nikmat yang diberikan Allah SWT kepada manusia. Dalam al Quran terdapat banyak ayat yang menjelaskan tentang tanaman, dimana pada intinya tanaman memiliki manfaat yang bermacam-macam dan tidak ada yang sia-sia. Firman Allah SWT dalam surat Luqman ayat 10:

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

“Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang. dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik”(QS. Luqman (31):10)

Berdasarkan tafsir al Mishbah (Shihab, 2002), kata كَرِيمٍ yang terdapat dalam surat Luqman ayat 10 berarti tumbuhan yang baik (bermanfaat). Salah satu manfaat dari tanaman adalah sebagai obat. Sebagaimana dalam penelitian ini yang menggunakan mikroalga *Chlorella sp.* sebagai subjek penelitian dengan hasil bahwa *Chlorella sp.* memiliki potensi sebagai antioksidan (bidang farmakologi) dengan golongan senyawa aktif steroid dan asam askorbat.

Manusia yang diciptakan sebagai khalifah di bumi ini mempunyai tugas untuk berpikir, mengkaji, dan mengembangkan penelitian untuk mendapatkan manfaat dari hasil penciptaan Allah tersebut. Sebagaimana Firman Allah SWT dalam al Quran surat Qaaf ayat 7 – 8.

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا وَأَلْفَيْنَا فِيهَا رَوَاسِيَ وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ بَهِيجٍ ﴿٧﴾ تَبَصَّرَةٌ
وَذَكَرَىٰ لِكُلِّ عَبْدٍ مُّنِيبٍ ﴿٨﴾

“Dan Kami hamparkan bumi itu dan kami letakkan padanya gunung-gunung yang kokoh dan Kami tumbuhkan padanya segala macam tanaman yang indah dipandang mata. Untuk menjadi pelajaran dan peringatan bagi tiap-tiap hamba yang kembali (mengingat Allah).” (QS. Qaaf (50): 7-8).

Ayat di atas menjelaskan bahwa Allah SWT menciptakan bumi (alam) ini sebagai media kehidupan bagi semua makhluk ciptaanNya. Segala ciptaan Allah di muka bumi ini, agar dijadikan renungan bagi setiap umat (Mahran dan Mubasyir, 2006). Orang-orang yang mau berfikir tentang manfaat dari tanaman-tanaman akan mengerti betapa besar kekuasaan sang pencipta yaitu Allah SWT.

Kekuasaan Allah SWT melalui ciptaannya telah terbukti dari hasil penelitian ini. Pada hasil penelitian didapatkan bahwa *Chlorella sp.* yang ditumbuhkan dalam medium ekstrak taugé memiliki potensi antioksidan yang tinggi dengan nilai EC_{50} 27,26 ppm untuk ekstrak fraksi petroleum eter. Aktivitas antioksidan tersebut tergolong kuat karena memiliki nilai $EC_{50} < 50$ ppm, dan untuk penelitian lebih lanjut mempunyai potensi untuk dimanfaatkan sebagai antioksidan dalam bahan farmasi (obat-obatan).

Pemanfaatan *Chlorella sp.* sebagai obat merupakan ikhtiar untuk memperoleh kesembuhan dari Allah yang Maha Penyembuh, karena merupakan kewajiban kita untuk berikhtiar mengobati penyakit. Hal ini sejalan dengan sabda Nabi Muhammad SAW yang diriwayatkan Jabir bin Abdillah (Fattah, 2010):

إِنَّ اللَّهَ مَا أَنْزَلَ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ دَوَاءً عِلْمُهُ مَنْ عِلْمَهُ وَجَهْلُهُ مَنْ جَهْلُهُ فَإِنَّ أَصَابَ الدَّوَاءِ الدَّاءَ
بِرًّا بِإِذْنِ اللَّهِ

“Sesungguhnya Allah tidak menurunkan penyakit melainkan menurunkan obatnya, yang diketahui oleh orang yang mengetahuinya dan tidak diketahui oleh orang yang mengetahuinya. Jika obat menimpa penyakit, maka penyakit tersebut hilang dengan seizing Allah” (Fattah, 2010).

Hadits di atas menunjukkan bahwa Allah Maha Adil yang memberikan suatu penyakit beserta penawarnya (obat) dan penyakit tersebut akan sembuh dengan seizin Allah (Fatah, 2010). Ilmu pengetahuanlah yang akan menuntun manusia menemukan obat-obatan dari suatu penyakit. Jika manusia tidak mengembangkan ilmu pengetahuan maka tidak akan tahu bahwa Allah SWT telah menciptakan berbagai macam tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai obat.

Manusia wajib berikhtiar namun harus bertawakal karena sungguh tidak ada yang dapat memberikan kesembuhan kecuali Allah SWT semata. Allah berfirman dalam surat asy Syu'ara ayat 80:

وَإِذَا مَرَضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِ

“ Dan apabila aku sakit, Dialah yang menyembuhkan aku,” (QS. asy Syu'ara (26) :80).

Firman Allah dalam surat asy Syu'ara ayat 80 tersebut menunjukkan bahwa sesungguhnya Allah SWT memberikan nikmat berupa kesembuhan ketika sakit dan Dia kuasa menyembuhkan dengan cara apa pun (Maraghi, 1974). Kesehatan merupakan suatu nikmat besar yang Allah SWT berikan kepada manusia. Sakit merupakan musibah dan ujian yang ditetapkan oleh Allah SWT. Segala penyakit yang diberikan oleh Allah SWT, tentunya sudah tersedia obat yang juga diberikan oleh Nya. Allah SWT menganjurkan umat Nya untuk berserah diri apabila timbul suatu penyakit dengan tetap berusaha.

Hasil penelitian yang menunjukkan mikrolaga *Chlorella sp.* dapat digunakan sebagai antioksidan merupakan salah satu bentuk bukti bahwa Allah SWT menciptakan semua yang ada di dunia ini tidaklah sia-sia dari yang kecil hingga yang besar. Sebagaimana Firman Allah SWT dalam surat Ali Imran ayat 191.

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ
وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

“(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): “Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha suci Engkau, Maka peliharalah Kami dari siksa neraka” (QS. ali Imran (3):191).

Surat ali Imran ayat 191 menjelaskan bahwa Allah SWT menciptakan langit, bumi dan isinya tanpa sia-sia (Maraghi, 1974). Hal ini membuktikan ketauhidan, keesaan dan kekuasaan Allah SWT. Semua yang ada di alam tidaklah terjadi dengan sendirinya, melainkan ada yang menciptakan yakni Allah SWT. Salah satu bentuk “siksa neraka” di dunia adalah sakit, sehingga agar sembuh maka haruslah mencari obat dari penyakit tersebut. Penelitian ini merupakan tindakan nyata dalam menganalisis ciptaan Allah SWT dan mencari obat yaitu sebagai antioksidan. Sehingga dari hasil penelitian ini dapat menimbulkan rasa tawakkal, berserah diri dan mengakui kelemahan diri dihadapan kebesaran Allah SWT.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Nilai EC_{50} dari fraksi etil asetat, kloroform, petroleum eter, n-heksana, air dan ekstrak metanol berturut-turut yaitu 332; 182; 27,26; 173,7; 1.411; dan 1.334 ppm. Fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* memiliki aktivitas antioksidan yang paling tinggi karena mempunyai nilai EC_{50} paling kecil.
2. Hasil identifikasi golongan senyawa dalam ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* dengan uji reagen menunjukkan bahwa ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* mengandung senyawa steroid dan asam askorbat. Hasil KLTA fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* menunjukkan bahwa eluen yang baik untuk pemisahan golongan senyawa steroid adalah heksana:aseton (7:3) dan n-heksana:etil asetat (7:3). Eluen terbaik dalam pemisahan asam askorbat adalah etanol:asam asetat 10 % (9:1).

5.2 Saran

Adapun saran dari penelitian ini yaitu dilanjutkan dengan KLTP untuk pemisahan senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan. Kemudian dapat dilanjutkan dengan identifikasi dengan menggunakan LC-MS.

DAFTAR PUSTAKA

- Arindah, D. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Golongan Senyawa Antioksidan pada Daging Buah Pepino (*Solonum Muricatum aiton*) yang Berpotensi sebagai Antioksidan. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Auterhoff, H. dan Kovar, K.A. 1987. *Identifikasi Obat*, Terbitan Kelima. Terjemahan N.C. Sugiarmo. Bandung: Penerbit ITB.
- 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* Tidak Diterbitkan. Malang : Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Bellinger, E. G. and Sigeo, D. C. 2010. *Freshwater Algae Identification and Use as Bioindicators*. USA: Wiley-Blackwell.
- Bold, H.C. dan Wynne, M.J. 1985. *Introduction to the Algae, Second Edition*. New York : Prentice-Hall Mc. Engelwood Cliffs.
- Borowitzka, M. A. dan Lesley, J. B. 1988. *Microalgae Biotechnology*. London: Cambridge University Press.
- Burke, R.W. Diamondstone, B.A. Velapoidi. R.A. Menis O. 1974. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reaction for Cholesterol. *Clinical Chemistry Journal*. Washington D.C : Analytical Chemistry Division, Institute for Materials Research, National Bureau of Standards. Vol.20. No.7.
- Cahyadi, W. 2006. *Kedelai Khasiat dan Teknologi*. Bandung : Bumi Aksara.
- Chalid, S.Y., Sri A., Suci D.L. 2012. Kultivasi *Chlorella sp.* pada Media Tumbuh yang Diperkaya dengan Pupuk Anorganik dan *Soil Extract*. *Valensi*, Vol. I. No 6: 298-304.
- Daniel. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Fraksi Etil Asetat dari Daun Tumbuhan Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav). Jurusan Kimia Fakultas Mipa Universitas Mulawarman. *Jurnal Mulawarman Scientifie*. Vol. 9. No 1.
- Day, J.R. and Underwood, A.L. 1999. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Jakarta : Penerbit Erlangga.

- De La Noue dan De Pauw. 1988. The Potential of Microalgal Biotechnology : A Review of Production and Uses of Microalgae. *Journal of Biotechnology Advances. Volume 6.*
- Destiana, M., Zandi A.N., Puspasari, S. 2007. *Fisiologi Lingkungan Tanaman.* Yogyakarta : Universitas Gajah Mada.
- Fattah, A.b.A.b.A. 2010. *Shahih Thibbun Nabawi Panduan dan Metode Pengobatan Nabi SAW. Buku.* Jakarta: Pustaka Imam Ahmad.
- Febriany, S. 2004. Pengaruh Beberapa Ekstrak Tunggal Bangle dan Gabungannya yang Berpotensi Meningkatkan Aktivitas Enzim Lipase Secara In Vitro. *Skripsi Tidak Diterbitkan.* Bogor: Fakultas MIPA Institut Pertanian Bogor.
- Fessenden, RJ, Fessenden JS. 1986. *Kimia Organik Cetakan Ketiga.* Pudjaatmaka AH, penerjemah. Bandung: ITB. Terjemahan dari: *Organic chemistry, Third Edition.*
- Fitrianti SA. 2011. *Diferensiasi temulawak, kunyit, dan bangle berdasarkan interpertasi kromatografi lapis tipis menggunakan ImageJ.* Skripsi. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Gandjar, I.G dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis.* Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gordon, M.H. 1990. *The Mechanism of Antioxidants Action in Vitro.* Di dalam: B.J.F. Hudson, editor. *Food Antioxidants.* London: Elsevier Applied Science.
- Hafidz, A.F. 2003. Aktivitas Anti Radikal Bebas DPPH Fraksi Metanol *Fagraea auriculata* dan *Fagraea ceilanica.* *Majalah Farmasi Airlangga, III.*
- Halimah, N. 2010. Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica Linn.*) terhadap Larva Udang *Artemia salina Leach.* *Skripsi Diterbitkan.* Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hamilton, R.J and J.C. Allen.1994. *Rancidity in Foods.* London: Blackie Academic and Professional.
- Hanani, E., Abdul, M., dan Ryany, S. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia sp.* dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian, Vol. II. No 3: 127-133.*

- Handayani D., N. Sayuti dan Dachriyanus. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri *Epidioksi Sterol* dari Spon Laut *Petrosia nigrans*, Asal Sumatera Barat. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II 2008*. Lampung: Universitas Lampung.
- Handoko, D.S.P. 2006. *Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis*. *Jurnal*. Jember: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember. *SIGMA*. Vol.9 No.1 ISSN 1410-5888.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode fitokimia Edisi Kedua*. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung : Penerbit ITB.
- Hart, H. 1987. *Kimia Organik Suatu Kuliah Singkat*. Penerjemah, Achmadi, S. Jakarta: Erlangga.
- Hasanah. 2011. *Mikroenkapsulasi Biomasa Porphyridium Cruentum*. Skripsi Tidak Diterbitkan. Bogor : Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Hayati, K., Jannah, A., Ningsih R. 2012. Identifikasi Senyawa dan Aktivitas Antimalaria *In Vivo* Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting-Anting (*Acalypha Indica* L.). *Molekul*. Vol 7 No 1. Malang : Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Hendayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung: PT Remaja Rosdakarya.
- Hidajat, B. 2005. *Penggunaan Antioksidan pada Anak*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Himesh, S., Singhai, A.K., dan Sarvesh S. 2012. Quantification of Ascorbic Acid in Leaves of *Annona squamosa*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. ISSN. 0975-1491 Vol.4.
- Hoek, V.D., Jahns, H.M., dan Mann, D.G. 2002. *Algae : An Introduction to Phycology*. New York : Cambridge University Press.
- Husnah, M. 2009. Identifikasi dan Uji Aktivitas Golongan Senyawa Antioksidan Ekstrak Kasar Buah Pepino (*Solanum muricatum* aiton) Berdasarkan Variasi Pelarut. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Malang.
- Indrayani, L., Soetjipto, H., dan Sihasale, L. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L.

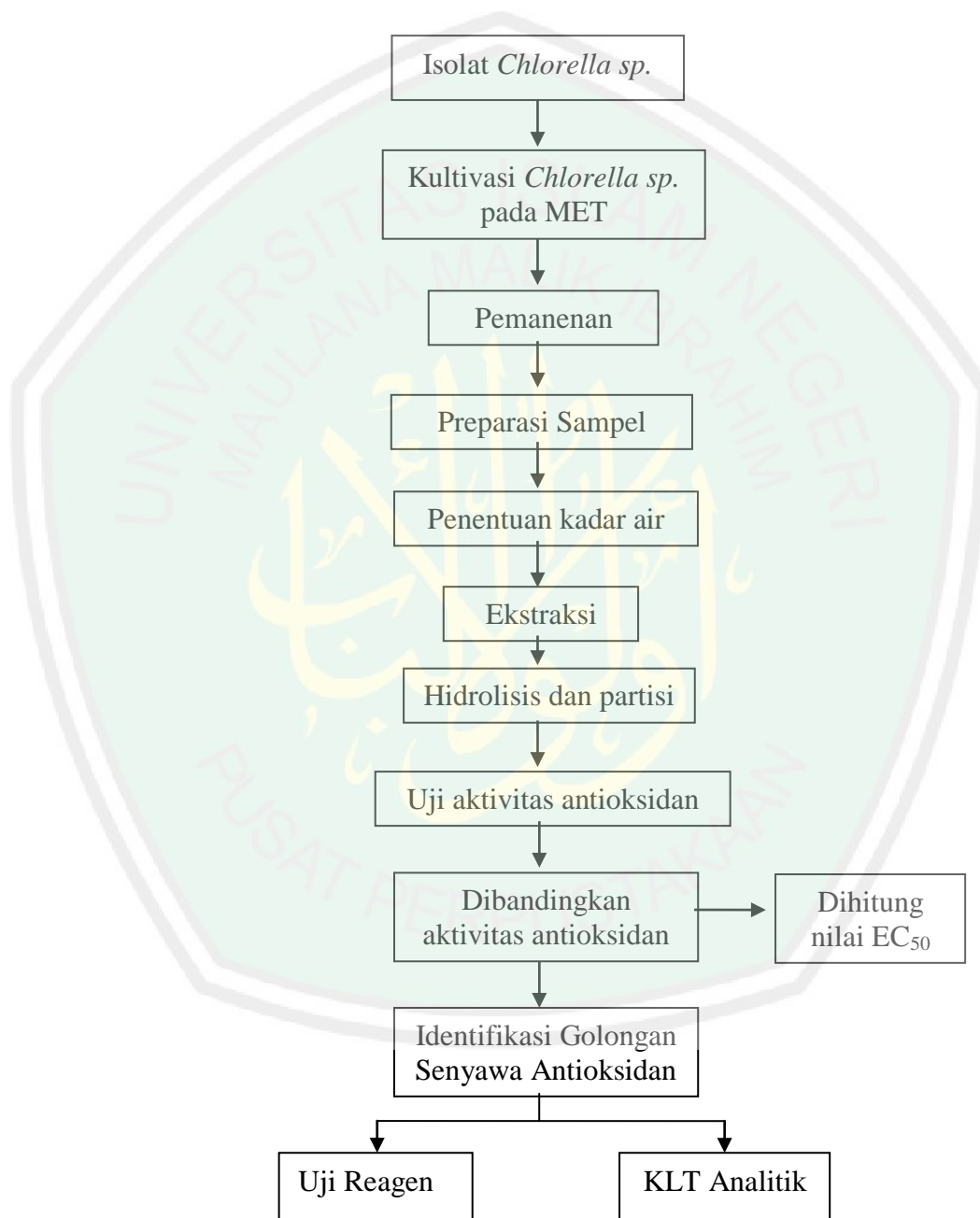
- Vahl) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. Berk. Penelitian. *Hayati, Vol. XII: 57-61.*
- Julyasih, S.M, I.G.P Wirawan, W.S. Harijani, W. Widajati. 2009. Aktivitas Antioksidan Beberapa Jenis Rumpun Laut (*Seaweeds*) Komersial di Bali. *Seminar Nasional*. Fakultas Pertanian dan LPPM UPN “Veteran” Jawa Timur.
- Kawaroe *et al.*, 2010. *Mikroalga Potensi dan Pemanfaatannya untuk Produksi Bio Bahan Bakar*. Bogor: IPB Press.
- Ketaren, S. 1986. *Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan*. Jakarta: UI 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 Tidak Diterbitkan*. Malang : Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Khopkar, S.M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press.
- Kondawar, M.S., Kamble, K.G., dan Mali, D.S. 2011. Quantitative estimation of Gallic acid in a Marketed Herbal Medicine: Triphala Churna by High Performance Thin Layer Chromatography. *International Journal of Pharm Tech Research*. ISSN : 0974-4303. Vol. 3., No. 3.
- Kristanti, A.N., Aminah, N.S., Tanjung, M., Kurniadi, B. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya : Airlangga University Press.
- Kuntorini, E.M. dan M.D. Astuti. 2010. Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bulbus Bawang Dayak (*Eleutherine americana* Merr.). *Sains dan Terapan Kimia, Vol. 4., No. 1: 15-22.*
- Kusmiati, N.W.S.,S.R. Agustini, Tamat, dan I. Mellia. 2010. Ekstraksi dan Purifikasi Senyawa Lutein dari Mikroalga *Chlorella pyreniodosa* Galur Lokal Ink. *Kimia Indonesia, Vol. 5. No. 1: 30-34.*
- Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida dan Alkaloida. *Karya Ilmiah Tidak Diterbitkan*. Medan: MIPA Universitas Sumatera Utara.
- Mahrani, J. dan Mubasyir, A. A. H. 2006. *Al-Qur'an Bertutur Tentang Makanan dan Obat-Obatan*. Yogyakarta: Mitra Pustaka.
- Manik, J. 2011. Karakterisasi Simplisia dan Skrining Fitokimia serta Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak *n*-Heksan Etilasetat dan Etanol Rumpun Laut *Sargassum polycystum* C. Agardh. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Medan: Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara.

- Mardiyah, U. 2012. Ekstraksi Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma spinosum* dari Perairan Banyuwangi. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Mohammad, J. 2007. Produksi dan Karakterisasi Biopigmen Fikosianin dari *Spirulina fusiformis* serta Aplikasinya sebagai Pewarna Minuman. *Thesis* Tidak Diterbitkan. Bogor: Program Studi Teknologi Hasil Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- Al-Maraghi, A.M. 1993. *Terjemah Tafsir Al-Maraghi*. Semarang: CV Toha Putra Semarang.
- Molyneux, P.. 2003. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH), for Estimating Antioxidant Activity. *Science and Technology*, Vol. 26. No. 2: 211-219.
- Nihlati, I., A. Rohman., dan T. Hertiani. Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schleth) dengan Metode Penangkapan Radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). *Farmasi*. Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.
- Nur, M.A, Adijuwana, H.A. 1989. *Teknik Pemisahan dalam Analisis Biologi*. Bogor: Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat, Institut Pertanian Bogor.
- Nurmillah, Ovi, Y. 2009. *Kajian Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Ekstrak Biji, Kulit Buah, Batang dan Daun Tanaman Jarak Pagar (Jatropha curcas L.)*. *Skripsi* diterbitkan. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian IPB.
- Oktay, M., I. Gulcin, and O., Kufrevioglu, 2003. *Determination of In Vitro Antioxidant Activity of Fennel (Foeniculum Vulgare) Seed Extract*. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technology*, Vol. 36: 263-271.
- Parwata, I.M.O.A., Wiwik, S.R. dan Raditya, Y. 2009. Isolasi dan Uji Anti Radikal Bebas Minyak Atsiri pada Daun Sirih (*Piper betle*, Linn) secara Spektroskopi Ultra Violet-Tampak. *Jurnal Kimia*. Vol. 3. No. 1: 7-13.
- Patel, N.V., dan Telange, D.R. 2011. Qualitative and Quantitative Estimation of Gallic Acid and Ascorbic Acid in Polyherbal Tablet. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. ISSN: 0975-8232. Vol. 2. India : School of Pharmacy and Technology Management.
- Prakash, A. 2001. Antioxidant Activity. *Analytical Chemistry Medallion Laboratories: Analytical Progress*, X (2).

- Pranayogi, D. 2003. *Studi Potensi Pigmen Klorofil dan Karotenoid dari Mikroalga Jenis Chlophyceae*. Lampung: Universitas Lampung.
- Pratiwi, D.P., Harapini M.. 2006. Nilai Peroksida dan Aktivitas Anti Radikal Bebas *Diphenyl Picril Hydrazil Hydrate* (DPPH) Ekstrak Methanol *Knema laurina*. *Majalah Farmasi Indonesia*, Vol. 17. No.1: 32-36.
- Pratt, D.E. 1992. *Natural Antioxidants From Plant Material*. Di dalam : M.T. Huang, C.T. Ho, dan C.Y. Lee, editor. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health* H. American Society: Washington DC.
- Pratt D.E., Hudson B.J.F.. 1990. *Natural Antioxidant not Exploited Comercially. Food Antioxidant*. London: Elvisier Applied Science.
- Prihantini, N.H, Putri B., dan Yuliaty R.. 2005. Pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan Variasi pH Awal. *Makara, Sains*, IX (1): 1-6.
- Prihantini, N. B.; Damayanti, D. dan Yuniati, R. 2007. Pengaruh Konsentrasi Medium Ekstrak Tauge (MET) terhadap Pertumbuhan *Scenedesmus* Isolat Subang. *Makara, Sains*, Vol. 11: 1 - 9.
- Rahayu, D.S., Dewi, K., Enny, F. 2010. *Penentuan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun Ketapang (Terminalia catappa L) dengan Metode 1,1 difenil 2 Pikrilhidrazil (DPPH)*. Skripsi Diterbitkan. Semarang: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro.
- Reveny, J. 2007. Daya Antimikroba Ekstrak dan Fraksi Daun Sirih Merah (*Piper betle* L.). Fakultas Farmasi Universitas Sumatra Utara. *Jurnal Ilmu Dasar* .Vol.12 No.1: 6-12.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: ITB.
- Rohman, A., Riyanto. 2005. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia* L.). *Agritech*, Vol. 25. No. 3: 131-136.
- Rostini, I. 2007. Kultur Fitoplankton (*Chlorella sp.* dan *Tetraselmis chuii*) pada Skala Laboratorium. *Karya Ilmiah*. UNPAD.
- Sachlan, M. 1982. *Planktonologi*. Semarang: UNDP FAO.
- Saifudin, A, Suparti, Fuad, Anang dan Da'I, M. 2006. *Biotransformasi Kurkumin Melalui Kultur Suspensi Sel Daun Catharanthus roseus [L] G.Don Berbunga Merah*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah.
- Sastrohamidjojo, H. 1996. *Sintesis Bahan Alam*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

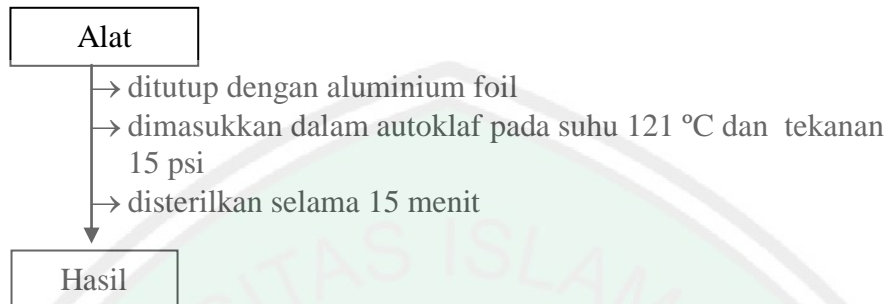
- Sastrohamidjojo, H. 2001. *Spektroskopi*. Yogyakarta : UGM Press.
- Sastrohamidjojo, H. 2007. *Kromatografi*. Yogyakarta: UGM Press.
- Shanab, S.M.M. 2007. *Antioxidant and Antibiotic Activities of Some Seaweeds (Egyptian Isolates)*. *Agriculture and Biology*, IX (2).
- Sherwin, F.R., 1990. *Antioxidant*. In: *Food Additive* (ed. Branen R). NewYork: Marcel Dekker.
- Shihab, M.Q. 2002. *Tafsir Al Mishbah : pesan, kesan dan keserasian Al Quran*. Jakarta : Lentera Hati.
- Sidabutar, E.A.. 1999. Pengaruh Medium Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella sp.* terhadap Aktivitas Senyawa Pemacu Pertumbuhan yang Dihasilkan. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Institut Pertanian Bogor.
- Silalahi, J., 2006. *Makanan Fungsional*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sirait, M. 2007. *Penuntun Fitokimia dalam Farmasi*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Sriwahyuni, I. 2010. Uji Fitokimia Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha Indica Linn*) Dengan Variasi Pelarut Dan Uji Toksisitas Menggunakan Brine Shrimp (*Artemia Salina Leach*). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi, UIN.
- Steenblock, D. 1996. *Chlorella Makanan Sehat Alami*. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama.
- Sudarmadji, S. Haryono, B. dan Suhardi. 2003. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Sulastry, T dan Kurniawati, N. 2010. Isolasi Steroid dari Ekstrak Metanol daun Bluntas (*Plucea indica L*). *Jurnal Chemica Vol. II*. FMIPA UNM
- Suroso, H.C. 2011. *Uji Antioksidan dan Identifikasi Senyawa Aktif pada Tanaman Anting-anting (Achalypa Indica L.)*. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Suseela, M.R. and Toppo. 2006. *Haematococcus pluvialis – A Green Alga, Richest Natural Source of Astaxantin*. *Current Sciense, Vol. XC. No.12*.
- Syamsudin., Tjokrosonto, S., Wahyuono, S dan Mustofa. 2007. Aktivitas Antiplsmodium dari dua Fraksi Ekstrak n-Heksana Kulit Batang Asam Kandis (*Garcinia parvifolia Miq*). *Majalah Farmasi*. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.

- Tapan, E. 2005. *Kanker, Antioksidan, dan Terapi Komplementer*. Jakarta: PT Gramedia.
- Tuminah, S. 2000. Radikal Bebas dan Antioksidan Kaitannya dengan Nutrisi dan Penyakit Kronik. *Cermin Dunia Kedokteran*, 128: 49-51.
- Uma, R., Sivasubramanian, V. dan Devaraj, S.N. 2011. Preliminary Phycochemical Analysis and In Vitro Antibacterial Screening of Green Microalgae, *Desmococcus olivaceus*, *Chlorococcum humicola* and *Chlorella vulgaris*. *Algal Biomass Utilization*, Vol. 2. No. 3: 74-81.
- Wagner, W.L., Herbst D.R., dan Sohmer S.H.. 1999. *Manual of the Flowering Plants of Hawai'i*. 2 vols. Bishop Museum Special Publication 83, University of Hawai'i and Bishop Museum Press, Honolulu, HI.
- Widodo, N. 2007. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid yang Terkandung dalam Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*). *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Semarang: Jurusan Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.
- Winarno, F.G. 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: PT Gramedia.
- Winarno, F.G., Fardias D., Fardias S.. 1973. *Ekstraksi, Kromatografi dan Elektroforesis*. Bogor : Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Wulandari, A.P., Frida N., Annisa E.P., dan Dilaekha R.P.. 2010. Identifikasi Mikroalga di Sekitar Pantai Pangandaran dan Potensi Pertumbuhannya pada Formulasi Medium Ekstrak Tauge (MET). *Prosiding Seminar Nasional Limnologi*, V.
- Yan, X., Nagata, T., and Xiao, F.. 1998. *Antioxidative Activities in Some Common Seaweeds*. *Journal of Plant Foods for Human Nutrition Institute of Oceanology*, LII.
- Yudha, A.P.. 2008. Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Dunaliella sp.* pada Umur Panen yang Berbeda. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Bogor : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Yudiati, E., Sri S., Sunarsih dan Rani A.. 2011. Aktifitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Metanol dan Pigmen Kasar *Spirulina sp.* *Ilmu Kelautan*, Vol. 16. No. 4 : 187 – 192.

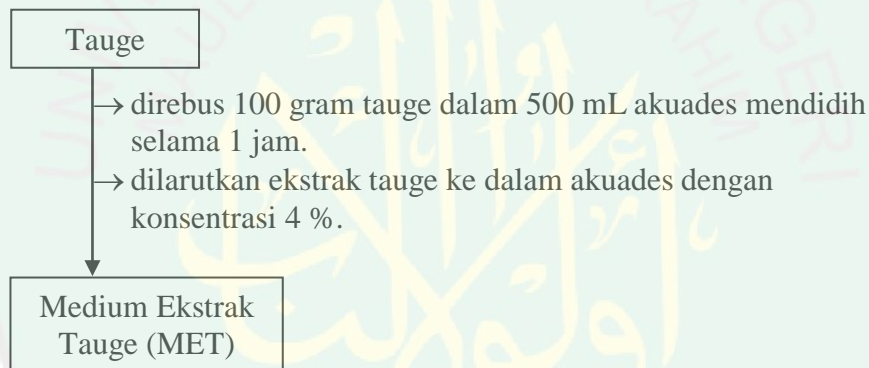
Lampiran 1. Rancangan Penelitian

A. Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

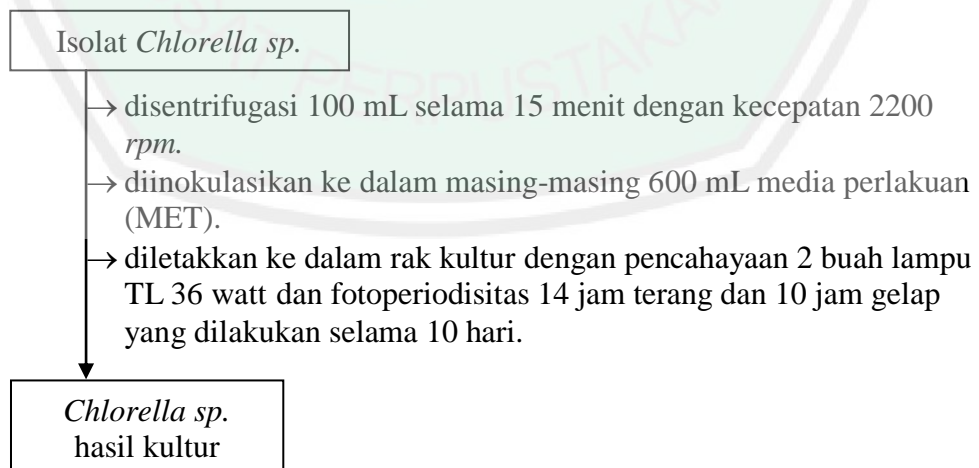
1. Sterilisasi Alat

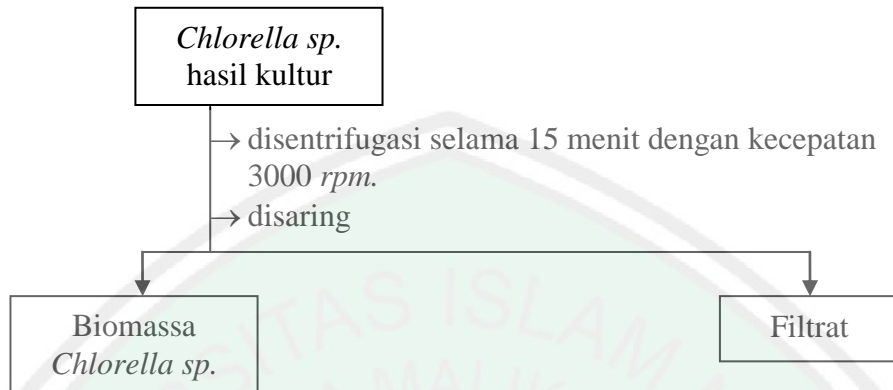


2. Pembuatan Medium Ekstraksi Tauge (MET)

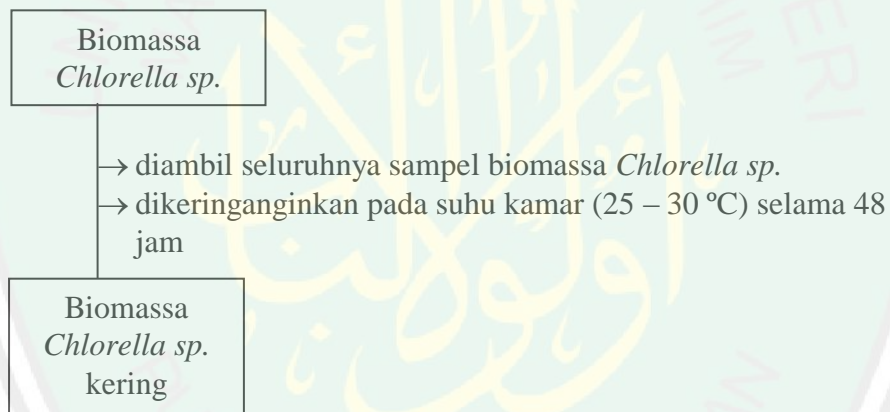


3. Kultivasi *Chlorella sp.* pada MET



4. Pemanenan *Chlorella sp.*

B. Preparasi Sampel



C. Penentuan Kadar Air

Biomassa
Chlorella sp.

- dipanaskan dulu cawan dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama 15 menit.
- disimpan cawan dalam desikator sekitar 10 menit.
- ditimbang berat cawan kosong.
- dimasukkan sampel sebanyak 5 gram dalam cawan porselen
- dimasukkan dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama ±15 menit.
- didinginkan dalam desikator ±10 menit
- dipanaskan kembali dalam oven ±15 menit
- didinginkan kembali dalam desikator.
- diambil dan ditimbang beratnya
- dihitung kadar air menggunakan rumus :

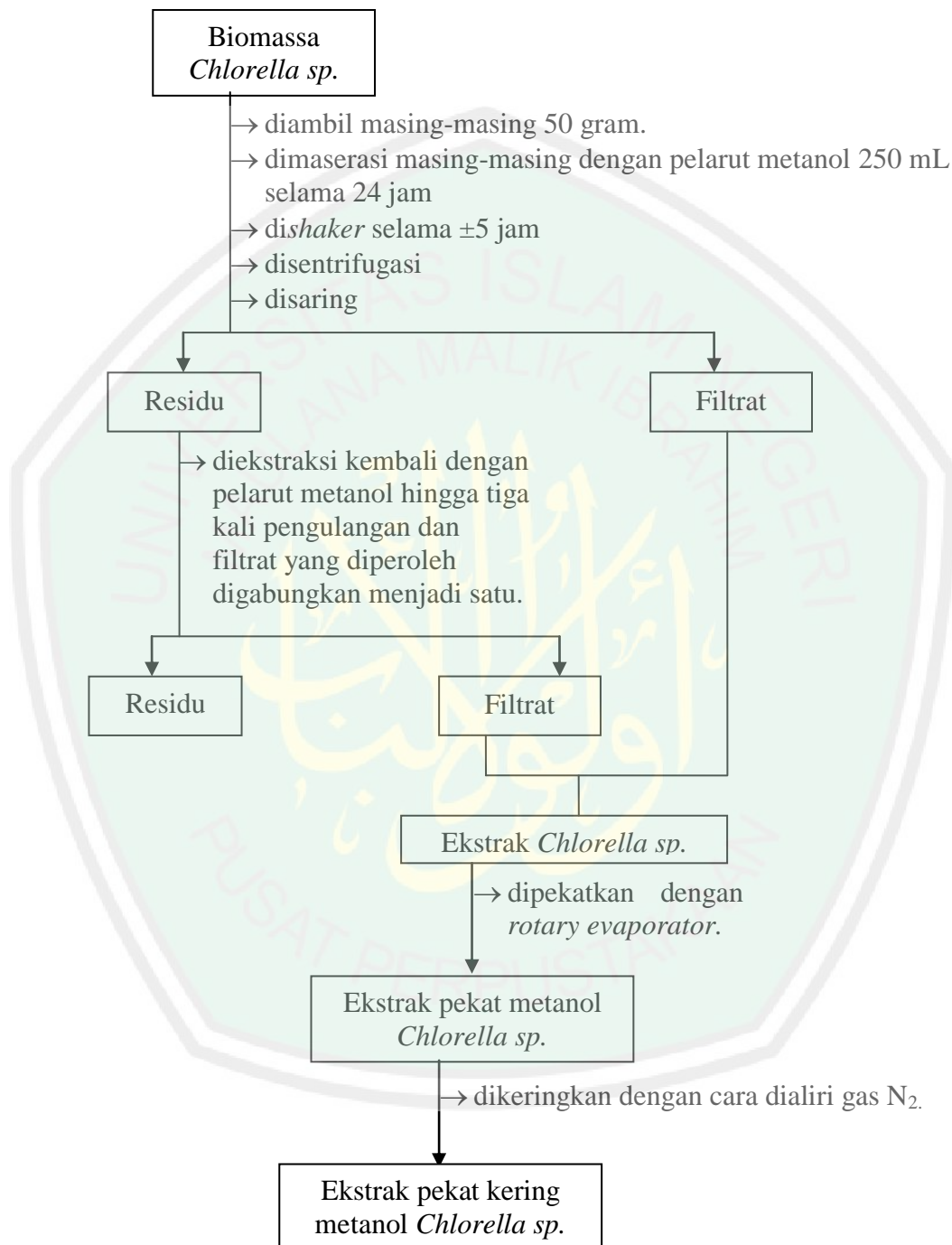
$$\text{Kadar air} = \frac{(b - c)}{b - a} \times 100\%$$

dimana : a = bobot cawan kosong

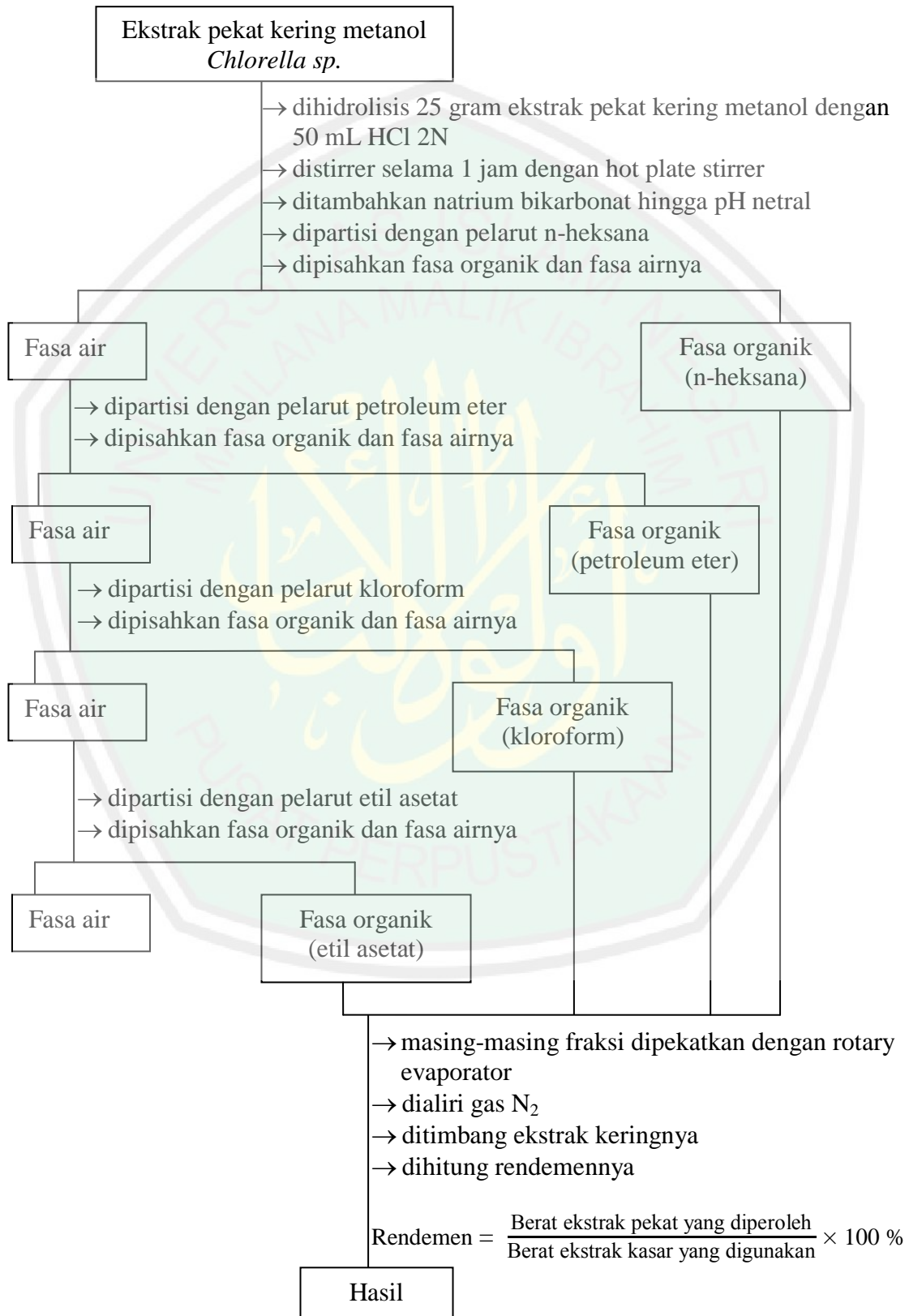
b = bobot sampel + cawan sebelum dikeringkan

c = bobot cawan + sampel setelah dikeringkan

Biomassa
Chlorella sp.

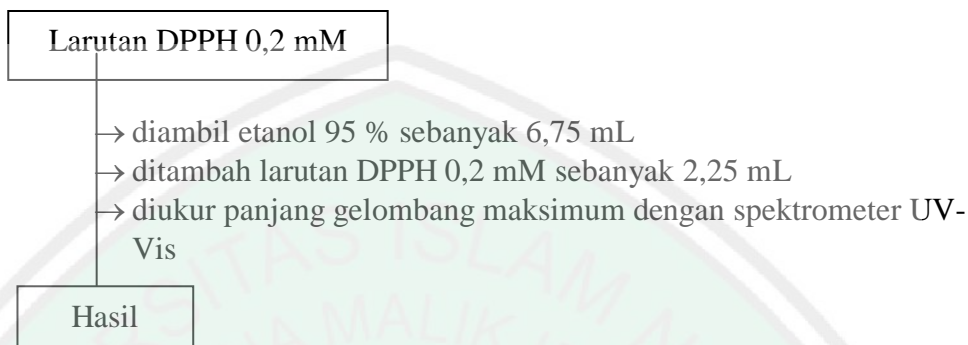
D. Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga *Chlorella sp.*

E. Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Peekat Kering Metanol *Chlorella sp.*

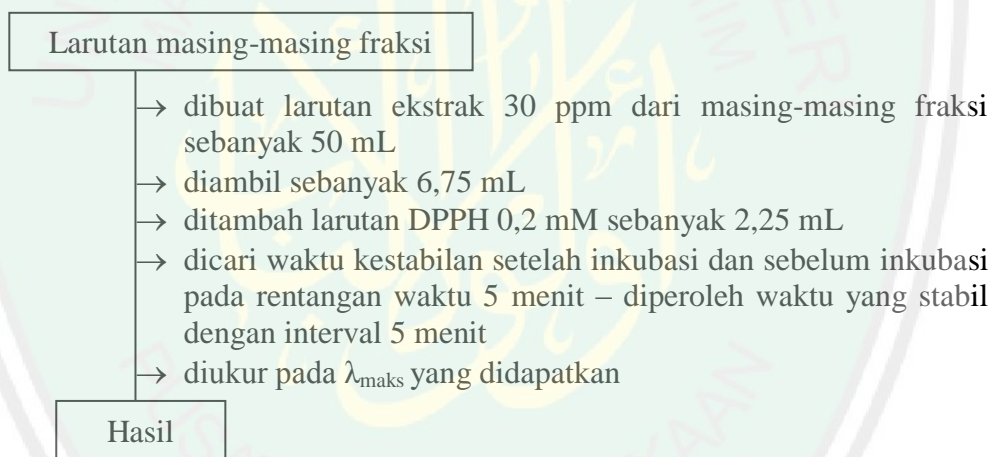


F. Uji Aktivitas Antioksidan

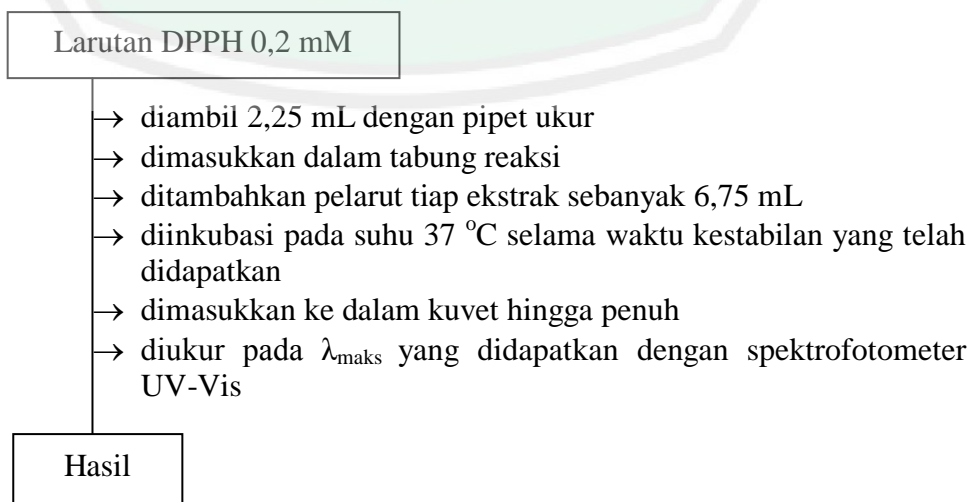
1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum



2. Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan



3. Absorbansi Kontrol



4. Aktivitas antioksidan ekstrak *Chlorella sp.*

Ekstrak kasar metanol, fraksi etil asetat, kloroform, PE, n-heksana dan fasa air

- dilarutkan dalam etanol 95 % dengan variasi konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm
- disiapkan tiga tabung reaksi untuk masing-masing ekstrak
- diisi dengan 6,75 mL
- ditambahkan DPPH 0,2 mM sebanyak 2,25 mL
- diinkubasi pada suhu 37 °C selama waktu kestabilan yang telah didapatkan
- dimasukkan ke dalam kuvet hingga penuh
- diukur pada λ_{maks} yang didapatkan
- dilakukan cara yang sama untuk pembanding BHT dan Vitamin C tanpa ekstrak sampel
- dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya dengan persamaan :

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \left(\frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \right) \times 100\%$$

Hasil

G. Identifikasi Golongan Senyawa Antioksidan secara Kualitatif

1. Uji Reagen

- Identifikasi Terpenoid dan Steroid

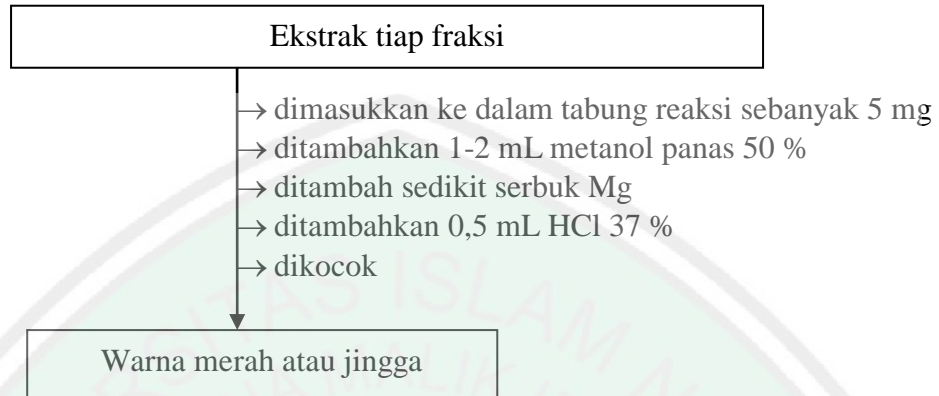
Ekstrak tiap fraksi

- dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform
- di tambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrida
- ditambah 1-2 mL H₂SO₄ pekat.

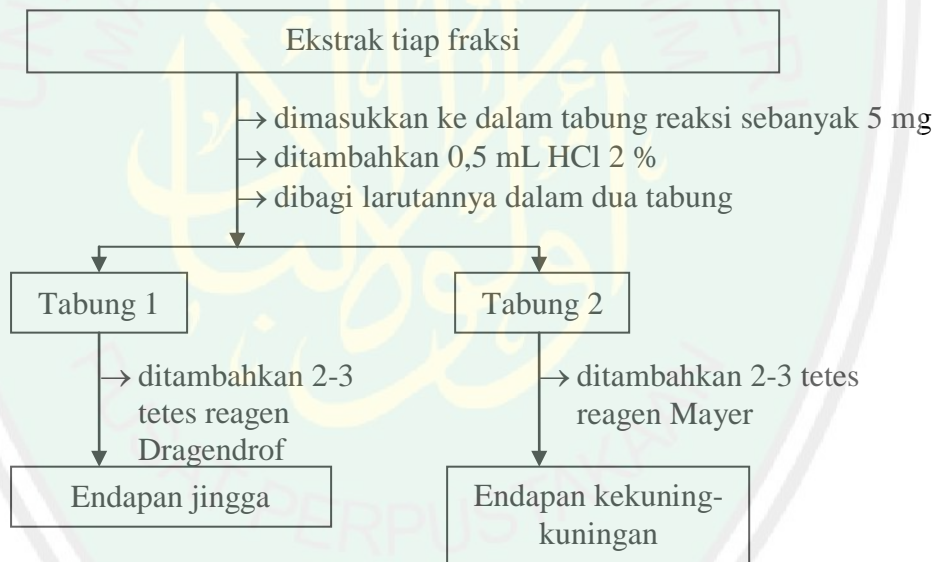
Warna coklat atau violet berbentuk cincin diperbatasan dua pelarut menunjukkan adanya terpenoid

Warna biru sampai hijau menunjukkan adanya steroid

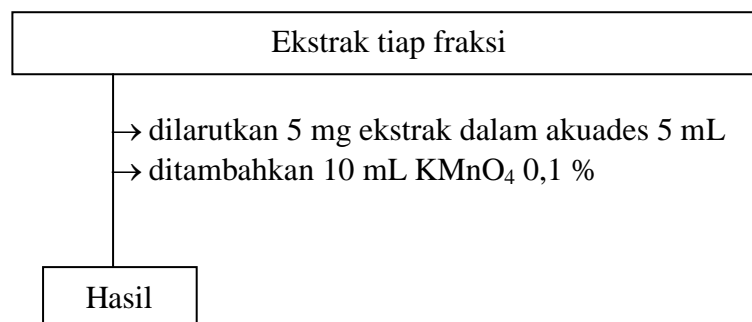
– Identifikasi Flavonoid



– Identifikasi Alkaloid

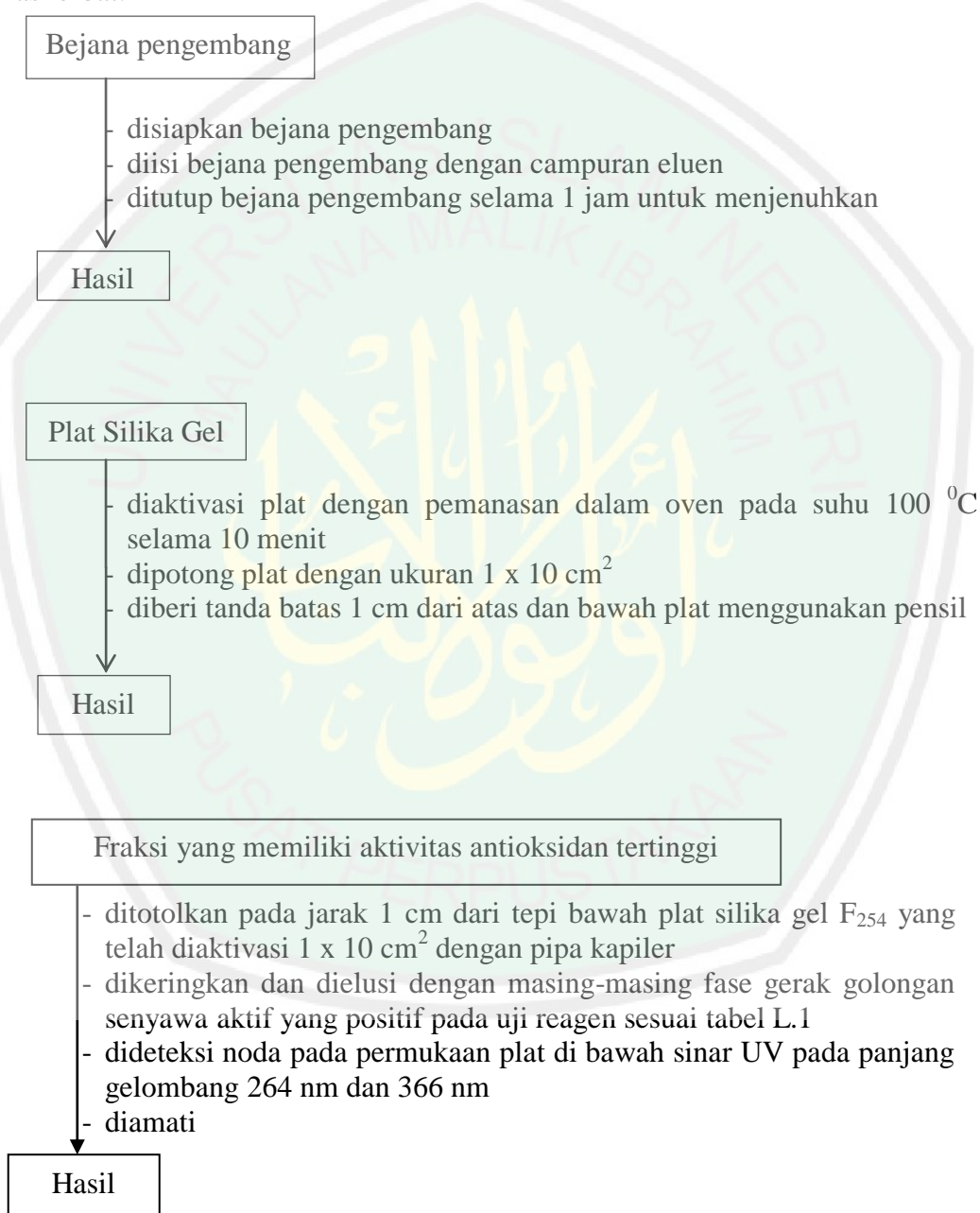


– Identifikasi Asam Askorbat



2. Identifikasi Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji senyawa aktif dengan KLT dilakukan terhadap golongan senyawa yang positif dari hasil uji senyawa aktif dengan uji reagen yaitu steroid dan asam askorbat.



Tabel L.1. Eleun untuk masing-masing golongan senyawa

Golongan Senyawa	Fase Gerak	Pendeteksi	Hasil Warna Noda
Steroid	eluen n-heksana : aseton (7:3) (Syamsudin, dkk., 2007), n-heksana:etil asetat (7:3) (Hayati, 2012), n-heksana : etil asetat (9:1), n-heksana : etil asetat (8:2) (Sulastry dan Kurniawati, 2010), n-heksana : etil asetat (6:4) (Reveny, 2011)	Disemprot dengan pereaksi Lieberman Buchard dan dideteksi di bawah lampu UV 366 nm	Spot hijau, hijau kebiruan, ungu sampai coklat
Asam askorbat	eluen etanol:asam asetat 10 % (9:1) (Harbone, 1987), etanol:asam asetat glasial (9:1), etanol:asam asetat 1% (9:1) (Himesh, dkk., 2012) , etanol:asam asetat glasial:toluen (5,5:1:1,5) (Kondawar, dkk., 2011), etil asetat:asam asetat glasial:asam format:air (6:1:1:2) (Patel dan Telange, 2011)	Dilihat dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm	spot biru kehitaman (gelap)

Lampiran 2. Pengujian Aktivitas Antioksidan

❖ Pembuatan Larutan DPPH 0,2 mM

DPPH 0,2 mM dalam 50 mL etanol 95 %

$$\begin{aligned}\text{Mr DPPH} &= 394,33 \text{ g/mol} \\ &= 394,33 \text{ mg/mmol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Mol DPPH} &= 50 \text{ mL} \times 0,2 \text{ mM} \\ &= 50 \text{ mL} \times \frac{0,2}{1000} \text{ M} \\ &= 0,01 \text{ mmol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{mg DPPH} &= 0,01 \text{ mmol} \times \text{Mr DPPH} \\ &= 0,01 \text{ mmol} \times 394,33 \text{ mg/mmol} \\ &= 3,9433 \text{ mg}\end{aligned}$$

❖ Pengukuran Potensi Antioksidan pada Sampel

➤ Larutan Stok Sampel Tiap Fraksi dan Antioksidan Pembanding 100 ppm (mg/L)

- 100 ppm = 100 mg/L
- 100 ppm (pembanding atau sampel tiap fraksi) dalam 50 mL
mg sampel tiap fraksi atau pembanding = 100 mg/L . 0,05 L
mg sampel tiap fraksi atau pembanding = 5 mg

Jadi, untuk membuat 50 ml larutan stok sampel tiap fraksi dan antioksidan pembanding 100 ppm, diperlukan sampel tiap fraksi 5 mg dan antioksidan pembanding (BHT dan asam askorbat) sebanyak 5 mg.

❖ Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan

Konsentrasi ekstrak sebesar 30 mg/L yang digunakan untuk penentuan waktu kestabilan pengukuran senyawa antioksidan. Konsentrasi ekstrak sebesar 30 mg/L diperoleh dari pengenceran larutan stok ekstrak 100 mg/L

➤ Ekstrak Kasar Metanol

- 30 ppm ekstrak = 30 mg/L dalam 25 mL

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

$$V_1 = \frac{25 \text{ mL} \times 30 \text{ mg/L}}{100 \text{ mg/L}} = 7,5 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 25 mL larutan ekstrak kasar metanol 30 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 7,5 mL.

➤ Fraksi Etil Asetat

- 30 ppm ekstrak = 30 mg/L dalam 25 mL

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

$$V_1 = \frac{25 \text{ mL} \times 30 \text{ mg/L}}{100 \text{ mg/L}} = 7,5 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 25 mL larutan fraksi etil asetat 30 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 7,5 mL.

➤ Fraksi Kloroform

- 30 ppm ekstrak = 30 mg/L dalam 25 mL

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

$$V_1 = \frac{25 \text{ mL} \times 30 \text{ mg/L}}{100 \text{ mg/L}} = 7,5 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 25 mL larutan fraksi kloroform 30 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 7,5 mL.

➤ **Fraksi petroleum eter**

- 30 ppm ekstrak = 30 mg/L dalam 25 mL

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

$$V_1 = \frac{25 \text{ mL} \times 30 \text{ mg/L}}{100 \text{ mg/L}} = 7,5 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 25 mL larutan fraksi petroleum eter 30 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 7,5 mL.

➤ **Fraksi n-heksana**

- 30 ppm ekstrak = 30 mg/L dalam 25 mL

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

$$V_1 = \frac{25 \text{ mL} \times 30 \text{ mg/L}}{100 \text{ mg/L}} = 7,5 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 25 mL larutan fraksi n-heksana 30 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 7,5 mL.

➤ **Asam askorbat**

- 30 ppm ekstrak = 30 mg/L dalam 25 mL

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

$$V_1 = \frac{25 \text{ mL} \times 30 \text{ mg/L}}{100 \text{ mg/L}} = 7,5 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 25 mL larutan asam askorbat 30 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 7,5 mL.

➤ **BHT**

- 30 ppm ekstrak = 30 mg/L dalam 25 mL

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

$$V_1 = \frac{25 \text{ mL} \times 30 \text{ mg/L}}{100 \text{ mg/L}} = 7,5 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 25 mL larutan BHT 30 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 7,5 mL.

❖ **Pengukuran Potensi Antioksidan pada Sampel**

Larutan sampel dari masing-masing fraksi diperoleh dari pengenceran larutan stoknya 100 mg/L.

➤ **Pembuatan Larutan Sampel 30 ppm**

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

$$V_1 = \frac{25 \text{ mL} \times 30 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} = 7,5 \text{ mL}$$

Jadi, untuk membuat 25 mL larutan sampel 30 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 7,5 mL.

➤ **Pembuatan Larutan Sampel 25 ppm**

$$V_1 = \frac{25 \text{ mL} \times 25 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} = 6,25 \text{ mL}$$

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

Jadi, untuk membuat 25 mL larutan sampel 25 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 6,25 mL.

➤ **Pembuatan Larutan Sampel 20 ppm**

$$V_1 = \frac{25 \text{ mL} \times 20 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} = 5 \text{ mL}$$

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

Jadi, untuk membuat 25 mL larutan sampel 20 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 5 mL.

➤ **Pembuatan Larutan Sampel 15 ppm**

$$V_1 = \frac{25 \text{ mL} \times 15 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} = 3,75 \text{ mL}$$

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

Jadi, untuk membuat 25 mL larutan sampel 15 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 3,75 mL.

➤ **Pembuatan Larutan Sampel 10 ppm**

$$V_1 = \frac{25 \text{ mL} \times 10 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} = 2,5 \text{ mL}$$

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

Jadi, untuk membuat 25 mL larutan sampel 10 ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 2,5 mL.

➤ **Pembuatan Larutan Sampel 5 ppm**

$$V_1 = \frac{25 \text{ mL} \times 5 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} = 1,25 \text{ mL}$$

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

Jadi, untuk membuat 25 mL larutan sampel ppm diperlukan larutan stok 100 ppm sebanyak 1,25 mL.

Lampiran 3. Pembuatan Reagen dan Larutan

➤ **Pereaksi mayer:**

- a. 1,358 g HgCl_2 dalam 60 ml akuades,
- b. KI 5 mg dalam 10 ml akuades.

Larutan a dituangkan ke dalam larutan b, diencerkan dengan akuades sampai 100 ml (HAM, 2006).

➤ **Pereaksi dragendorff :**

$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 8 gr dilarutkan dalam 50 ml HNO_3 pekat dan KI sebanyak 27,2 gr dilarutkan dalam 50 ml aquadest. Kedua larutan dicampur dan jika terbentuk endapan disaring, kemudian disimpan dalam botol coklat (HAM, 2006).

➤ **Pembuatan Larutan Limberman-burchard**

Asam sulfat pekat	= 5 mL
Anhidridat asetat	= 5 mL
Etanol absolut	= 50 mL

Cara pemataunnya adalah disiapkan 5 mL anhidrida asetat dan 5 mL asam sulfat pekat masing-masing dalam beaker glass 50 mL (dilakuakn dalam lemari asam). Kemudian ditambahkan secara hati-hati melalui dinding erlenmeyer yang berisi etanol absolut 50 mL, kemudian didinginkan dalam lemari pendingin. Penggunaan reagen ini digunakan langsung setelah pembuatan (Wagner, 2001).

➤ **Pembuatan HCl 2 %**

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

$$37 \% \times V_1 = 2 \% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,54 \text{ mL}$$

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.

➤ **Pembuatan HCl 2N dalam 100 mL**

Densitas : 1,19 gr/mL

Konsentrasi : 37 %

Volume : 100 mL

Mr HC : 36,5 gr/mol

2N \approx 2M

$$\begin{aligned} \text{Molaritas HCl} &= \frac{\rho \times \text{konsentrasi}}{\text{Mr HCl}} \\ &= \frac{1,19 \text{ gr/mL} \times 37 \times 1000}{36,5 \text{ gr/mol} \times 100} \\ &= 12,063 \text{ M} \end{aligned}$$

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

$$12,063 \text{ M} \times V_1 = 2 \text{ M} \times 250 \text{ mL}$$

$$\begin{aligned} V_1 &= \frac{500 \text{ mL}}{12,063} \\ &= 41,5 \text{ mL} \end{aligned}$$

➤ **Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %**

Volume = 600 mL

$$\text{MET 4 \%} = \frac{24 \text{ mL ekstrak tauge}}{600 \text{ mL larutan}}$$

Cara pembuatannya yaitu ekstrak tauge sebanyak 24 mL dimasukkan dalam erlenmeyer 1000 mL, kemudian ditambahkan akuades sebanyak 576 mL.

➤ **Pembuatan Larutan NaHCO₃ 1000 ppm**

NaHCO₃ 1000 ppm dalam 100 mL

$$1000 \text{ ppm} = \frac{\text{mg}}{0,1 \text{ L}}$$

$$\text{mg} = 1000 \text{ mg/L} \times 0,1 \text{ L}$$

$$= 100 \text{ mg}$$

Jadi untuk membuat larutan NaHCO₃ 1000 ppm dalam 100 mL ditimbang serbuk NaHCO₃ sebanyak 100 mg kemudian dilarutkan dengan akuades hingga 100 mL (labu ukur 100 mL).

➤ **Pembuatan larutan KMnO₄ 0,1 %**

Larutan KMnO₄ 0,1 % dibuat dari pengenceran larutan KMnO₄ 10 %, sehingga dibuat larutan KMnO₄ 10 % terlebih dahulu.

1. Larutan KMnO₄ 10 % sebanyak 10 mL :

$$\% \text{ Konsentrasi} = \frac{\text{g terlarut}}{\text{g terlarut} + \text{g pelarut}} \times 100 \%$$

$$\text{g terlarut} + \text{g pelarut} = \frac{\text{g terlarut}}{\% \text{ konsentrasi}} \times 100 \%$$

$$1 \text{ g} + \text{g pelarut} = \frac{1 \text{ g}}{10 \%} \times 100 \%$$

$$1 \text{ g} + \text{g pelarut} = 10 \text{ g}$$

$$\text{g pelarut} = 10 \text{ g} - 1 \text{ g} = 9 \text{ g}$$

$$\text{volume pelarut (air)} = \frac{\text{g pelarut}}{\rho \text{ pelarut}} = \frac{9 \text{ g}}{1 \text{ g/mL}} = 9 \text{ mL}$$

Cara pembuatan larutan KMnO_4 10 % adalah ditimbang serbuk KMnO_4 sebanyak 1 g kemudian dilarutkan dengan 10 mL akuades.

2. Pembuatan larutan KMnO_4 0,1 % :

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

$$10 \% \times V_1 = 0,1 \% \times 250 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{0,1 \% \times 250 \text{ mL}}{10 \%}$$

$$V_1 = 2,5 \text{ mL}$$

Cara pembuatan larutan KMnO_4 0,1 % adalah dengan mengencerkan 2,5 mL larutan KMnO_4 10 % hingga 250 mL.

Lampiran 4. Perhitungan Rendemen

1. Rendemen Hasil Preparasi Sampel (Pengeringan Sampel)

No.	Berat botol kosong (g)	Berat botol + <i>Chlorella sp.</i> basah (g)	Berat <i>Chlorella sp.</i> basah (g)	Berat <i>Chlorella sp.</i> kering (g)
1.	148,98	210,94	61,96	12,0423
2.	100,38	178,96	78,58	
3.	88,24	191,60	103,36	
4.	85,60	189,45	103,85	
5.	101,53	176,98	75,45	
Total			423,20	

$$\% \text{ Rendemen pemanenan} = \frac{\text{berat kering}}{\text{berat basah}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} \text{Rendemen preparasi sampel} &= \frac{12,0423 \text{ g}}{423,20 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 2,8455 \% \end{aligned}$$

2. Rendemen Hasil Maerasi

Volume pelarut (mL)	Berat sampel (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%) (b/b)
200	10,0001	1,3607	13,6069

$$\text{Berat } \textit{Chlorella sp.} \text{ basah} = 10,0001 \text{ g}$$

$$\text{Berat gelas vial kosong} = 85,1423 \text{ g}$$

$$\text{Berat gelas vial + ekstrak pekat} = 86,5030 \text{ g}$$

$$\begin{aligned} \text{Berat ekstrak pekat} &= (\text{Berat botol kosong} + \text{ekstrak pekat}) - \text{Berat botol} \\ &= 86,5030 \text{ g} - 85,1423 \text{ g} \\ &= 1,3607 \text{ g} \end{aligned}$$

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

$$\% \text{ Rendemen maserasi} = \frac{1,3607 \text{ g}}{10,0001 \text{ g}} \times 100\% = 13,6069 \%$$

3. Rendemen Hasil Hidrolisis

Hidrolisis ke-	Ekstrak metanol yang dihidrolisis (g)	Fraksi n-heksana (g)	Fraksi PE (g)	Fraksi Kloroform (g)	Fraksi etil asetat (g)	Fasa air (g)
1	1,0030	0,4575	0,0821	0,0758	0,0746	0,1012
Rendemen (%) (b/b)	-	45,6132	8,1854	7,5573	7,4377	10,0897

❖ Fraksi n-Heksana

Berat gelas vial kosong = 92,3661 g

Berat gelas vial + ekstrak n-heksana = 92,8236 g

Berat ekstrak n-heksana = berat (gelas vial+ekstrak) – berat gelas vial kosong

$$= 92,8236 \text{ g} - 92,3661 \text{ g} = 0,4575 \text{ g}$$

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat fraksi hasil partisi}}{\text{berat ekstrak metanol yang dihidrolisis}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,4575 \text{ g}}{1,0030 \text{ g}} \times 100 \% = 45,6132 \%$$

❖ Fraksi Petroleum eter (PE)

Berat gelas vial kosong = 94,2468 g

Berat gelas vial + ekstrak PE = 94,3289 g

Berat ekstrak PE = berat (gelas vial+ekstrak) – berat gelas vial kosong

$$= 94,3289 \text{ g} - 94,2468 \text{ g} = 0,0821 \text{ g}$$

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat fraksi hasil partisi}}{\text{berat ekstrak metanol yang dihidrolisis}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,0821 \text{ g}}{1,0030 \text{ g}} \times 100 \% = 8,1854 \%$$

❖ **Fraksi Kloroform**

Berat gelas vial kosong = 85,6516 g

Berat gelas vial + ekstrak kloroform = 85,7274 g

Berat ekstrak kloroform = berat (gelas vial+ekstrak) – berat gelas vial kosong

$$= 85,7274 \text{ g} - 85,6516 \text{ g} = 0,0758 \text{ g}$$

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat fraksi hasil partisi}}{\text{berat ekstrak metanol yang dihidrolisis}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,0758 \text{ g}}{1,0030 \text{ g}} \times 100 \% = 7,5573 \%$$

❖ **Fraksi Etil asetat**

Berat gelas vial kosong = 73,8512 g

Berat gelas vial + ekstrak etil asetat = 73,9258 g

Berat ekstrak etil asetat = berat (gelas vial+ekstrak) – berat gelas vial kosong

$$= 73,9258 \text{ g} - 73,8512 \text{ g} = 0,0746 \text{ g}$$

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat fraksi hasil partisi}}{\text{berat ekstrak metanol yang dihidrolisis}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,0746 \text{ g}}{1,0030 \text{ g}} \times 100 \% = 7,4377 \%$$

❖ **Fasa Air**

Berat gelas vial kosong = 89,6380 g

Berat gelas vial + fasa air = 89,7392 g

Berat fasa air = berat (gelas vial+ekstrak) – berat gelas vial kosong

$$= 89,7392 \text{ g} - 89,6380 \text{ g} = 0,1012 \text{ g}$$

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat fraksi hasil partisi}}{\text{berat ekstrak metanol yang dihidrolisis}} \times 100 \%$$

$$= \frac{0,1012 \text{ g}}{1,0030 \text{ g}} \times 100 \% = 10,0897 \%$$

Lampiran 5. Perhitungan Kadar Air Sampel Kering

Tabel L 5. Kadar Air Sampel Kereng

Pengulangan ke-	Kadar Air Kering (%)	Rata-rata (%)
1	7,9510	7,8099
2	7,5886	
3	7,8900	

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

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

❖ Pengulangan 1

No.	Berat cawan kosong (g)	Berat cawan + sampel sebelum dioven (g)	Berat cawan + sampel setelah dioven (g)
1.	53,8110	54,8118	54,7330
2.	53,8108		54,7327
3.	53,8107		54,7324
4.	53,8107		54,7322
dianggap	53,8107	54,8118	54,7322

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{b - c}{b - a} \times 100 \% \\ &= \frac{54,8118 \text{ g} - 54,7322 \text{ g}}{54,8118 \text{ g} - 53,8107 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,0796 \text{ g}}{1,0011 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 7,9510 \% \end{aligned}$$

❖ **Pengulangan 2**

No.	Berat cawan kosong (g)	Berat cawan + sampel sebelum dioven (g)	Berat cawan + sampel setelah dioven (g)
1.	61,0550	62,0556	61,9864
2.	61,0547		61,9831
3.	61,0550		61,9811
4.	61,0541		61,9796
dianggap	61,0541	62,0556	61,9796

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{b-c}{b-a} \times 100 \% \\
 &= \frac{62,0556 \text{ g} - 61,9796 \text{ g}}{62,0556 \text{ g} - 61,0541 \text{ g}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,0760 \text{ g}}{1,0015 \text{ g}} \times 100 \% \\
 &= 7,5886 \%
 \end{aligned}$$

❖ **Pengulangan 3**

No.	Berat cawan kosong (g)	Berat cawan + sampel sebelum dioven (g)	Berat cawan + sampel setelah dioven (g)
1.	57,0269	58,0250	57,9525
2.	57,0259		57,9493
3.	57,0253		57,9476
4.	57,0250		57,9461
dianggap	57,0250	58,0250	57,9461

$$\begin{aligned}
 \text{Kadar air} &= \frac{b-c}{b-a} \times 100 \% \\
 &= \frac{58,0250 \text{ g} - 57,9461 \text{ g}}{58,0250 \text{ g} - 57,0250 \text{ g}} \times 100 \% \\
 &= \frac{0,0789 \text{ g}}{1 \text{ g}} \times 100 \% \\
 &= 7,8900 \%
 \end{aligned}$$

$$\text{Rata-rata Kadar Air} = \frac{7,9510 \% + 7,5886 \% + 7,8900 \%}{3} = 7,8099 \%$$

Lampiran 6. Hasil Penelitian Antioksidan

• L 6.1 Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan

Ekstrak	Waktu Kestabilan (menit ke-)	
	Tanpa Inkubasi	Inkubasi
Metanol	60 – 95	15 – 65
n-Heksana	55 – 85	45 – 90
Petroleum eter	65 – 95	50 – 85
Kloroform	75 – 100	55 – 90
Etil asetat	85 – 100	60 – 90
Fasa air	75 – 100	55 – 95
BHT	65 – 90	35 – 75
Vitamin C	40 – 65	25 – 50

• Ekstrak Metanol

Menit ke-	Absorbansi	
	Tanpa inkubasi	Setelah inkubasi
0	0,76	0,76
5	0,76	0,76
10	0,76	0,76
15	0,74	0,74
20	0,76	0,74
25	0,76	0,74
30	0,76	0,74
35	0,76	0,74
40	0,76	0,74
45	0,76	0,74
50	0,76	0,74
55	0,76	0,74
60	0,74	0,74
65	0,74	0,74
70	0,74	0,76
75	0,74	0,73
80	0,74	0,74
85	0,74	0,73
90	0,74	0,76
95	0,74	0,76
100	0,76	0,76

- Ekstrak n-Heksana

Menit ke-	Absorbansi	
	Tanpa inkubasi	Setelah inkubasi
0	0,64	0,64
5	0,64	0,63
10	0,64	0,63
15	0,63	0,62
20	0,63	0,62
25	0,62	0,61
30	0,63	0,62
35	0,62	0,61
40	0,63	0,61
45	0,63	0,60
50	0,62	0,60
55	0,61	0,60
60	0,61	0,60
65	0,61	0,60
70	0,61	0,60
75	0,61	0,60
80	0,61	0,60
85	0,61	0,60
90	0,62	0,60
95	0,61	0,59
100	0,60	0,61

- Fraksi Petroleum eter

Menit ke-	Absorbansi	
	Tanpa inkubasi	Setelah inkubasi
0	0,54	0,54
5	0,54	0,53
10	0,53	0,53
15	0,54	0,53
20	0,53	0,52
25	0,53	0,52
30	0,53	0,52
35	0,52	0,51
40	0,52	0,50
45	0,51	0,50
50	0,50	0,49
55	0,51	0,49
60	0,50	0,49
65	0,49	0,49
70	0,49	0,49

75	0,49	0,49
80	0,49	0,49
85	0,49	0,49
90	0,49	0,50
95	0,49	0,49
100	0,51	0,50

- Fraksi kloroform

Menit ke-	Absorbansi	
	Tanpa inkubasi	Setelah inkubasi
0	0,66	0,66
5	0,66	0,65
10	0,65	0,65
15	0,64	0,64
20	0,64	0,64
25	0,64	0,64
30	0,63	0,63
35	0,64	0,63
40	0,63	0,64
45	0,63	0,63
50	0,64	0,63
55	0,65	0,62
60	0,63	0,62
65	0,63	0,62
70	0,63	0,62
75	0,62	0,62
80	0,62	0,62
85	0,62	0,62
90	0,62	0,62
95	0,62	0,61
100	0,62	0,63

- Fraksi etil asetat

Menit ke-	Absorbansi	
	Tanpa inkubasi	Setelah inkubasi
0	0,67	0,67
5	0,67	0,66
10	0,67	0,66
15	0,66	0,64
20	0,66	0,64
25	0,65	0,64
30	0,65	0,63

35	0,65	0,63
40	0,64	0,62
45	0,64	0,62
50	0,64	0,62
55	0,63	0,62
60	0,63	0,61
65	0,63	0,61
70	0,63	0,61
75	0,63	0,61
80	0,63	0,61
85	0,62	0,61
90	0,62	0,61
95	0,62	0,60
100	0,62	0,61

- Fasa air

Menit ke-	Absorbansi	
	Tanpa inkubasi	Setelah inkubasi
0	0,70	0,70
5	0,72	0,70
10	0,71	0,70
15	0,71	0,70
20	0,71	0,70
25	0,71	0,70
30	0,71	0,70
35	0,71	0,70
40	0,71	0,70
45	0,70	0,69
50	0,70	0,69
55	0,71	0,68
60	0,71	0,68
65	0,70	0,68
70	0,70	0,68
75	0,69	0,68
80	0,69	0,68
85	0,69	0,68
90	0,69	0,68
95	0,69	0,68
100	0,69	0,69

- BHT

Menit ke-	Absorbansi	
	Tanpa inkubasi	Setelah inkubasi
0	0,60	0,60
5	0,46	0,44
10	0,40	0,37
15	0,39	0,34
20	0,39	0,32
25	0,38	0,31
30	0,38	0,31
35	0,39	0,30
40	0,38	0,30
45	0,39	0,30
50	0,39	0,30
55	0,38	0,30
60	0,38	0,30
65	0,39	0,30
70	0,39	0,30
75	0,39	0,30
80	0,39	0,31
85	0,39	0,31
90	0,39	0,31
95	0,40	0,30
100	0,40	0,32

- Vitamin C

Menit ke-	Absorbansi	
	Tanpa inkubasi	Setelah inkubasi
0	0,21	0,21
5	0,19	0,20
10	0,18	0,19
15	0,19	0,20
20	0,20	0,20
25	0,20	0,19
30	0,20	0,19
35	0,20	0,19
40	0,19	0,19
45	0,19	0,19
50	0,19	0,19
55	0,19	0,20
60	0,19	0,20
65	0,19	0,19
70	0,20	0,19

75	0,20	0,20
80	0,20	0,20
85	0,20	0,20
90	0,20	0,21
95	0,20	0,21
100	0,20	0,20

L 6.2 Data Hasil Uji Kapasitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Ekstrak	Nilai EC ₅₀ (ppm)
Metanol	1334
n-Heksana	173,7
Petroleum eter	27,26
Kloroform	182
Etil asetat	332,7
Fasa air	1411
BHT	30,66
Vitamin C	2,643

1. Data Hasil Analisa Kapasitas Antioksidan Ekstrak Metanol

Konsentrasi (ppm)	Ulangan (Absorbansi sampel)			Rerata	Log []	Absorbansi Kontrol	Aktivitas antioksidan (%)
	1	2	3				
5	0,5052	0,5053	0,5053	0,5053	0,69897	0,5084	0,6098
10	0,5381	0,5386	0,5375	0,5381	1,00000	0,5417	0,6646
15	0,5031	0,5033	0,5031	0,5032	1,17609	0,5077	0,8864
20	0,4995	0,4993	0,4997	0,4995	1,30103	0,5056	1,2065
25	0,4962	0,4963	0,4968	0,4965	1,39794	0,5058	1,8387
30	0,5277	0,5276	0,5282	0,5279	1,47712	0,5393	2,0957

Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Contoh:

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{(0,5084 - 0,5053)}{0,5084} \times 100\% = 0,6098 \%$$

Nilai EC_{50} dihitung menggunakan program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing dose-response data*” dengan konsentrasi ekstrak 5 - 30 ppm.

[Ekstrak] (ppm)	Log [Ekstrak] (ppm)	Aktivitas antioksidan (%)
5	0,69897	0,6098
10	1,00000	0,6646
15	1,17609	0,8864
20	1,30103	1,2065
25	1,39794	1,8387
30	1,47712	2,0957

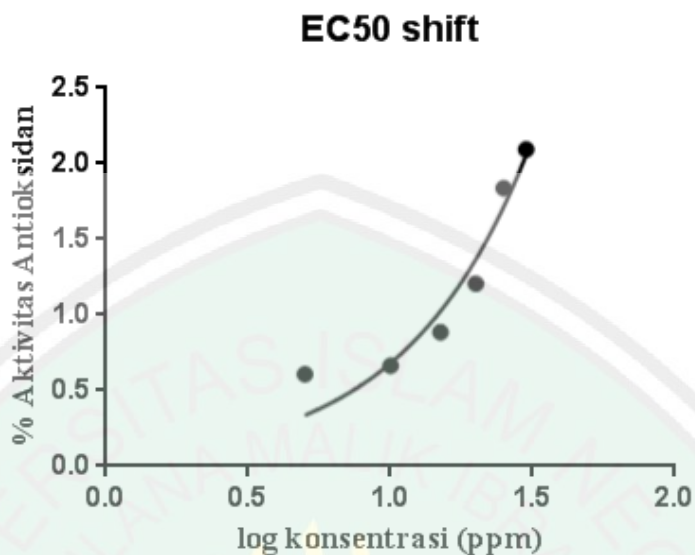
Sehingga diperoleh persamaan:

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

$$Y = 0,0 + (100 - 0,0) / (1 + 10^{(3,125 - X) * 1,018})$$

	% Aktivitas Antioksidan	Global (shared)
Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		LogEC50 different for each data set
Alternative hypothesis		LogEC50 same for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		LogEC50 different for each data set
F (DFn, DFd)		
LogEC50 different for each data set		
Best-fit values		
Bottom		= 0.0
Top		= 100.0
LogEC50		3.125
HillSlope		1.018
EC50		1334
Span		= 100.0
Std. Error		
LogEC50		0.3054
HillSlope		0.1760

95% Confidence Intervals		
LogEC50	2.277 to 3.973	
HillSlope	0.5293 to 1.506	
EC50	189.4 to 9402	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		4
R square	0.9290	
Absolute Sum of Squares	0.1378	
Sy.x	0.1856	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0.0	
Top	Top = 100.0	
LogEC50 same for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0.0	
Top	= 100.0	
LogEC50	3.125	3.125
HillSlope	1.018	
EC50	1334	1334
Span	= 100.0	
Std. Error		
LogEC50	0.3054	0.3054
HillSlope	0.1760	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	2.277 to 3.973	2.277 to 3.973
HillSlope	0.5293 to 1.506	
EC50	189.4 to 9402	189.4 to 9402
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		4
R square	0.9290	0.9290
Absolute Sum of Squares	0.1378	0.1378
Sy.x		0.1856
Constraints		
Bottom	Bottom = 0.0	
Top	Top = 100.0	
LogEC50	LogEC50 is shared	
Number of points		
Analyzed		6



Gambar L.7.1. Grafik ekstrak metanol

2. Data Hasil Analisa Kapasitas Antioksidan Fraksi n-Heksana

Konsentrasi (ppm)	Ulangan (Absorbansi sampel)			Rerata	Log []	Absorbansi Kontrol	Aktivitas antioksidan (%)
	1	2	3				
5	0,6099	0,6056	0,6056	0,6071	0,69897	0,6080	0,1480
10	0,6059	0,6058	0,6109	0,6075	1,00000	0,6102	0,4425
15	0,6088	0,6089	0,6096	0,6091	1,17609	0,6121	0,4901
20	0,6102	0,6097	0,6048	0,6082	1,30103	0,6114	0,5234
25	0,6081	0,6037	0,6080	0,6066	1,39794	0,6105	0,6388
30	0,6028	0,6071	0,6023	0,6041	1,47712	0,6149	1,7564

Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Contoh:

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{(0,6080 - 0,6071)}{0,6080} \times 100\% = 0,1480 \%$$

Nilai EC_{50} dihitung menggunakan program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing dose-response data*” dengan konsentrasi ekstrak 25 - 400 ppm.

[Ekstrak] (ppm)	Log [Ekstrak] (ppm)	Aktivitas antioksidan (%)
5	0,69897	0,1480
10	1,00000	0,4425
15	1,17609	0,4901
20	1,30103	0,5234
25	1,39794	0,6388
30	1,47712	1,7564

Sehingga diperoleh persamaan:

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

$$Y = 0,0 + (100 - 0,0) / (1 + 10^{(2,240 - X) * 2,365})$$

	% Aktivitas Antioksidan	Global (shared)
Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		LogEC50 different for each data set
Alternative hypothesis		LogEC50 same for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		LogEC50 different for each data set
F (DFn, DFd)		
LogEC50 different for each data set		
Best-fit values		
Bottom	= 0.0	
Top	= 100.0	
LogEC50	2.240	
HillSlope	2.365	
EC50	173.7	
Span	= 100.0	
Std. Error		
LogEC50	0.3037	
HillSlope	0.8837	

95% Confidence Intervals

LogEC50 1.397 to 3.083

HillSlope -0.08873 to 4.818

EC50 24.93 to 1211

Goodness of Fit

Degrees of Freedom 4

R square 0.7793

Absolute Sum of Squares 0.3442

Sy.x 0.2933

Constraints

Bottom Bottom = 0.0

Top Top = 100.0

LogEC50 same for all data sets

Best-fit values

Bottom = 0.0

Top = 100.0

LogEC50 2.240 2.240

HillSlope 2.365

EC50 173.7 173.7

Span = 100.0

Std. Error

LogEC50 0.3037 0.3037

HillSlope 0.8837

95% Confidence Intervals

LogEC50 1.397 to 3.083 1.397 to 3.083

HillSlope -0.08873 to 4.818

EC50 24.93 to 1211 24.93 to 1211

Goodness of Fit

Degrees of Freedom 4

R square 0.7793 0.7793

Absolute Sum of Squares 0.3442 0.3442

Sy.x 0.2933 0.2933

Constraints

Bottom Bottom = 0.0

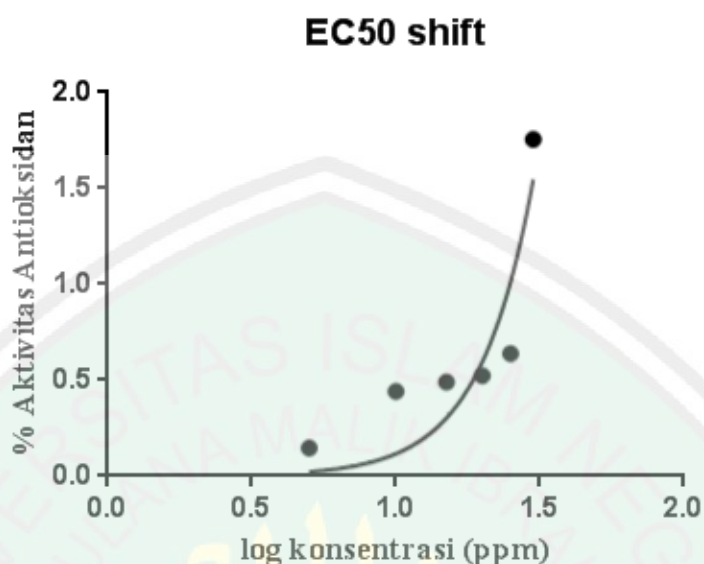
Top Top = 100.0

LogEC50 is shared

LogEC50

Number of points

Analyzed 6



Gambar L.7.2. Grafik ekstrak n-heksana

3. Data Hasil Analisa Kapasitas Antioksidan Fraksi Petroleum Eter

Konsentrasi (ppm)	Ulangan (Absorbansi sampel)			Rerata	Log []	Absorbansi Kontrol	Aktivitas antioksidan (%)
	1	2	3				
5	0,6919	0,6868	0,6866	0,6884	0,69897	0,6933	0,7068
10	0,6682	0,6680	0,6683	0,6682	1,00000	0,6809	1,8652
15	0,6788	0,6781	0,6784	0,6784	1,17609	0,6960	2,5287
20	0,6391	0,6394	0,6431	0,6406	1,30103	0,6950	7,8273
25	0,4337	0,4318	0,4323	0,4326	1,39794	0,6934	37,6118
30	0,2447	0,2452	0,2448	0,2449	1,47712	0,6974	64,8839

Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Contoh:

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{(0,6974 - 0,2449)}{0,6974} \times 100\% = 64,8839 \%$$

Nilai EC_{50} dihitung menggunakan program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing dose-response data*” dengan konsentrasi ekstrak 25 - 400 ppm.

[Ekstrak] (ppm)	Log [Ekstrak] (ppm)	Aktivitas antioksidan (%)
5	0,69897	0,7068
10	1,00000	1,8652
15	1,17609	2,5287
20	1,30103	7,8273
25	1,39794	37,6118
30	1,47712	64,8839

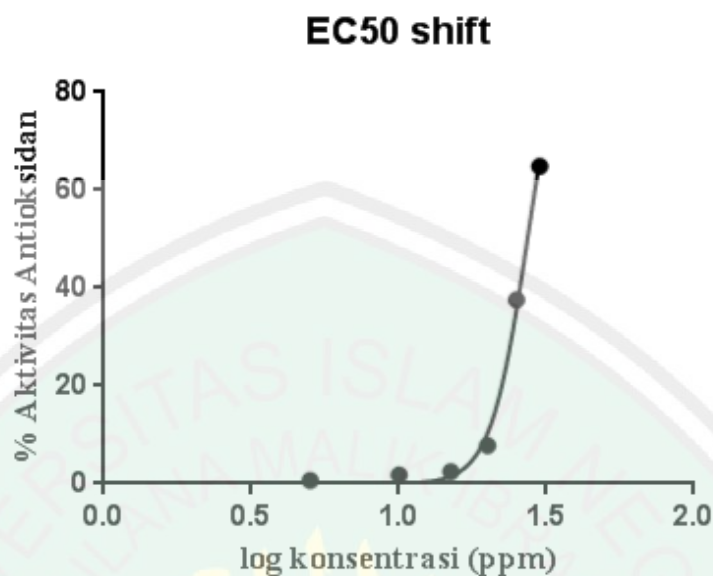
Sehingga diperoleh persamaan:

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

$$Y = 0,0 + (100 - 0,0) / (1 + 10^{(1,435 - X) * 6,926})$$

	% Aktivitas Antioksidan	Global (shared)
Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		LogEC50 different for each data set
Alternative hypothesis		LogEC50 same for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		LogEC50 different for each data set
F (DFn, DFd)		
LogEC50 different for each data set		
Best-fit values		
Bottom	= 0.0	
Top	= 100.0	
LogEC50	1.435	
HillSlope	6.926	
EC50	27.26	
Span	= 100.0	
Std. Error		
LogEC50	0.003991	
HillSlope	0.5037	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	1.424 to 1.447	
HillSlope	5.528 to 8.324	
EC50	26.57 to 27.96	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		4

R square	0.9950	
Absolute Sum of Squares	17.51	
Sy.x	2.093	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0.0	
Top	Top = 100.0	
LogEC50 same for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0.0	
Top	= 100.0	
LogEC50	1.435	1.435
HillSlope	6.926	
EC50	27.26	27.26
Span	= 100.0	
Std. Error		
LogEC50	0.003991	0.003991
HillSlope	-0.5037	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	1.424 to 1.447	1.424 to 1.447
HillSlope	5.528 to 8.324	
EC50	26.57 to 27.96	26.57 to 27.96
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		4
R square	0.9950	0.9950
Absolute Sum of Squares	17.51	17.51
Sy.x		2.093
Constraints		
Bottom	Bottom = 0.0	
Top	Top = 100.0	
LogEC50	LogEC50 is shared	
Number of points Analyzed		6



Gambar L.7.3. Grafik ekstrak petroleum eter

4. Data Hasil Analisa Kapasitas Antioksidan Fraksi Kloroform

Konsentrasi (ppm)	Ulangan (Absorbansi sampel)			Rerata	Log []	Absorbansi Kontrol	Aktivitas antioksidan (%)
	1	2	3				
5	0,6543	0,6538	0,6533	0,6538	0,69897	0,6593	0,8342
10	0,5383	0,5382	0,5377	0,5381	1,00000	0,5427	0,8476
15	0,5455	0,5455	0,5453	0,5454	1,17609	0,5733	4,8666
20	0,5427	0,5430	0,5433	0,5430	1,30103	0,5737	5,3512
25	0,5305	0,5304	0,5300	0,5303	1,39794	0,5763	7,9819
30	0,5299	0,5303	0,5304	0,5302	1,47712	0,5766	8,0472

Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Contoh:

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{(0,5766 - 0,5302)}{0,5766} \times 100\% = 8,0472 \%$$

Nilai EC_{50} dihitung menggunakan program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing dose-response data*” dengan konsentrasi ekstrak 5 - 30 ppm.

[Ekstrak] (ppm)	Log [Ekstrak] (ppm)	Aktivitas antioksidan (%)
5	0,69897	0,8342
10	1,00000	0,8476
15	1,17609	4,8666
20	1,30103	5,3512
25	1,39794	7,9819
30	1,47712	8,0472

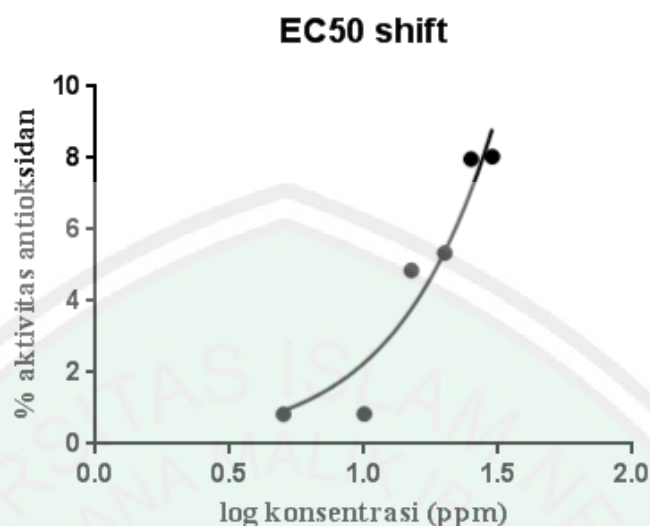
Sehingga diperoleh persamaan:

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

$$Y = 0,0 + (100 - 0,0) / (1 + 10^{(2,260 - X) * 1,296})$$

	% aktivitas antioksidan	Global (shared)
Comparison of Fits		Can't calculate LogEC50 different for each data set
Null hypothesis		LogEC50 same for all data sets
Alternative hypothesis		
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF LogEC50 different for each data set
Preferred model		
F (DFn, DFd)		
LogEC50 different for each data set		
Best-fit values		
Bottom	= 0.0	
Top	= 100.0	
LogEC50	2.260	
HillSlope	1.296	
EC50	182.0	
Span	= 100.0	
Std. Error		
LogEC50	0.2041	
HillSlope	0.2971	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	1.693 to 2.827	
HillSlope	0.4710 to 2.121	
EC50	49.35 to 671.1	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		4

R square	0.9119	
Absolute Sum of Squares	4.598	
Sy.x	1.072	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0.0	
Top	Top = 100.0	
LogEC50 same for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0.0	
Top	= 100.0	
LogEC50	2.260	2.260
HillSlope	1.296	
EC50	182.0	182.0
Span	= 100.0	
Std. Error		
LogEC50	0.2041	0.2041
HillSlope	0.2971	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	1.693 to 2.827	1.693 to 2.827
HillSlope	0.4710 to 2.121	
EC50	49.35 to 671.1	49.35 to 671.1
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		4
R square	0.9119	0.9119
Absolute Sum of Squares	4.598	4.598
Sy.x		1.072
Constraints		
Bottom	Bottom = 0.0	
Top	Top = 100.0	
LogEC50	LogEC50 is shared	
Number of points Analyzed		6



Gambar L.7.4. Grafik ekstrak kloroform

5. Data Hasil Analisa Kapasitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat

Konsentrasi (ppm)	Ulangan (Absorbansi sampel)			Rerata	Log []	Absorbansi Kontrol	Aktivitas antioksidan (%)
	1	2	3				
5	0,6223	0,6208	0,6205	0,6212	0,69897	0,6266	0,8618
10	0,5980	0,5977	0,5977	0,5978	1,00000	0,6270	4,6571
15	0,5996	0,5999	0,5999	0,5998	1,17609	0,6295	4,7180
20	0,5889	0,5913	0,5897	0,5900	1,30103	0,6262	5,7809
25	0,5863	0,5856	0,5857	0,5859	1,39794	0,6312	7,1768
30	0,5690	0,5693	0,5692	0,5692	1,47712	0,6283	9,4496

Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Contoh:

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{(0,6283 - 0,5692)}{0,6283} \times 100\% = 9,4496 \%$$

Nilai EC_{50} dihitung menggunakan program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing dose-response data*” dengan konsentrasi ekstrak 5 - 30 ppm.

[Ekstrak] (ppm)	Log [Ekstrak] (ppm)	Aktivitas antioksidan (%)
5	0,69897	0,8618
10	1,00000	4,6571
15	1,17609	4,7180
20	1,30103	5,7809
25	1,39794	7,1768
30	1,47712	9,4496

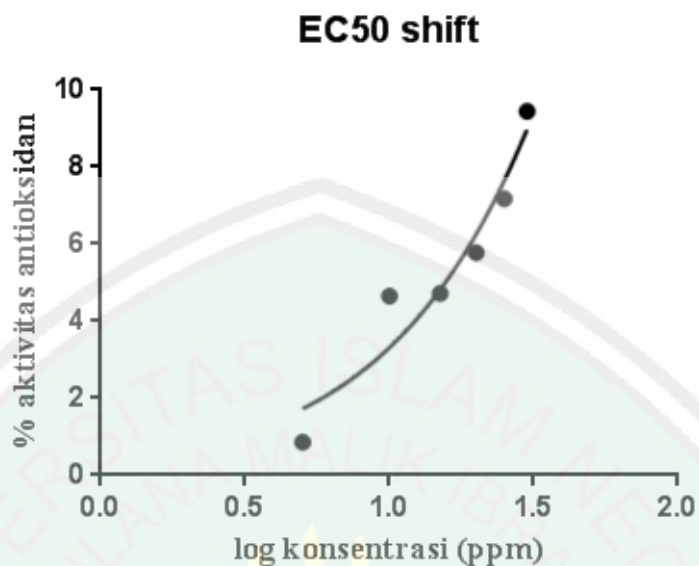
Sehingga diperoleh persamaan:

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

$$Y = 0,0 + (100 - 0,0) / (1 + 10^{(2,522 - X) * 0,9624})$$

	% aktivitas antioksidan	Global (shared)
Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		LogEC50 different for each data set
Alternative hypothesis		LogEC50 same for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		LogEC50 different for each data set
F (DFn, DFd)		
Best-fit values		
Bottom	= 0.0	
Top	= 100.0	
LogEC50	2.522	
HillSlope	0.9624	
EC50	332.7	
Span	= 100.0	
Std. Error		
LogEC50	0.2287	
HillSlope	0.1863	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	1.887 to 3.157	
HillSlope	0.4452 to 1.480	
EC50	77.09 to 1436	
Goodness of Fit		

Degrees of Freedom	4	
R square	0.9217	
Absolute Sum of Squares	3.236	
Sy.x	0.8994	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0.0	
Top	Top = 100.0	
LogEC50 same for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0.0	
Top	= 100.0	
LogEC50	2.522	2.522
HillSlope	0.9624	
EC50	332.7	332.7
Span	= 100.0	
Std. Error		
LogEC50	0.2287	0.2287
HillSlope	0.1863	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	1.887 to 3.157	1.887 to 3.157
HillSlope	0.4452 to 1.480	
EC50	77.09 to 1436	77.09 to 1436
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		4
R square	0.9217	0.9217
Absolute Sum of Squares	3.236	3.236
Sy.x		0.8994
Constraints		
Bottom	Bottom = 0.0	
Top	Top = 100.0	
	LogEC50 is	
LogEC50	shared	
Number of points		
Analyzed	6	



Gambar L.7.5. Grafik Ekstrak Etil Asetat

6. Data Hasil Analisa Kapasitas Antioksidan Fasa Air

Konsentrasi (ppm)	Ulangan (Absorbansi sampel)			Rerata	Log []	Absorbansi Kontrol	Aktivitas antioksidan (%)
	1	2	3				
5	0,6992	0,7014	0,6991	0,6999	0,69897	0,7069	0,9902
10	0,6959	0,6984	0,6985	0,6976	1,00000	0,7066	1,2737
15	0,6985	0,6986	0,6996	0,6989	1,17609	0,7105	1,6327
20	0,6997	0,6972	0,6972	0,6980	1,30103	0,7106	1,7731
25	0,6889	0,6892	0,6920	0,6900	1,39794	0,7082	2,5699
30	0,6960	0,6967	0,6962	0,6963	1,47712	0,7211	3,4392

Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Contoh:

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{(0,7066 - 0,6976)}{0,7066} \times 100\% = 1,2737 \%$$

Nilai EC_{50} dihitung menggunakan program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing dose-response data*” dengan konsentrasi ekstrak 5 - 30 ppm.

[Ekstrak] (ppm)	Log [Ekstrak] (ppm)	Aktivitas antioksidan (%)
5	0,69897	0,9902
10	1,00000	1,2737
15	1,17609	1,6327
20	1,30103	1,7731
25	1,39794	2,5699
30	1,47712	3,4392

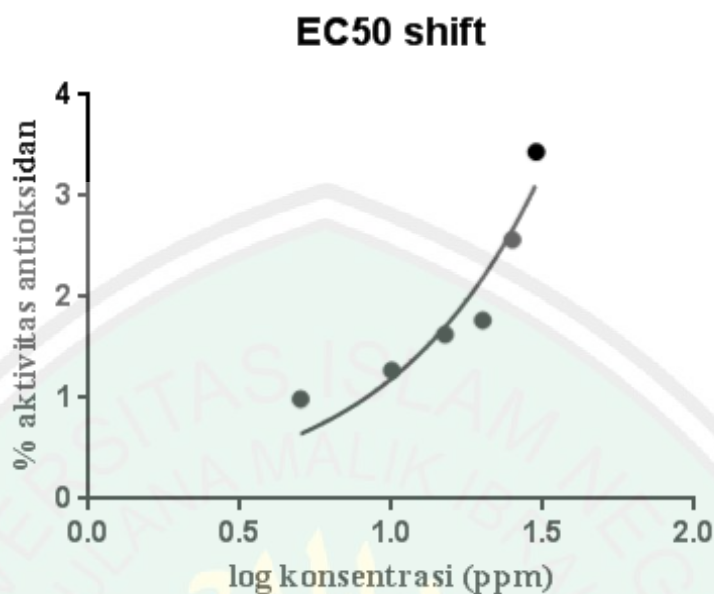
Sehingga diperoleh persamaan:

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

$$Y = 0,0 + (100 - 0,0) / (1 + 10^{(3,150 - X) * 0,8921})$$

	% aktivitas antioksidan	Global (shared)
Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		LogEC50 different for each data set
Alternative hypothesis		LogEC50 same for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		LogEC50 different for each data set
F (DFn, DFd)		
LogEC50 different for each data set		
Best-fit values		
Bottom	= 0.0	
Top	= 100.0	
LogEC50	3.150	
HillSlope	0.8921	
EC50	1411	
Span	= 100.0	
Std. Error		
LogEC50	0.3649	
HillSlope	0.1803	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	2.136 to 4.163	
HillSlope	0.3915 to 1.393	
EC50	136.9 to 14546	
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		4

R square	0.8986	
Absolute Sum of Squares	0.4172	
Sy.x	0.3229	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0.0	
Top	Top = 100.0	
LogEC50 same for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0.0	
Top	= 100.0	
LogEC50	3.150	3.150
HillSlope	0.8921	
EC50	1411	1411
Span	= 100.0	
Std. Error		
LogEC50	0.3649	0.3649
HillSlope	0.1803	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	2.136 to 4.163	2.136 to 4.163
HillSlope	0.3915 to 1.393	
EC50	136.9 to 14546	136.9 to 14546
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		4
R square	0.8986	0.8986
Absolute Sum of Squares	0.4172	0.4172
Sy.x		0.3229
Constraints		
Bottom	Bottom = 0.0	
Top	Top = 100.0	
LogEC50	LogEC50 is shared	
Number of points Analyzed		6



Gambar L.7.6. Grafik ekstrak fasa air

7. Data Hasil Analisa Kapasitas Antioksidan BHT

Konsentrasi (ppm)	Ulangan (Absorbansi sampel)			Rerata	Log []	Absorbansi Kontrol	Aktivitas antioksidan (%)
	1	2	3				
5	0,4571	0,4567	0,4593	0,4577	0,69897	0,5081	9,9193
10	0,3320	0,3316	0,3317	0,3318	1,00000	0,4184	20,6979
15	0,2750	0,2744	0,2744	0,2746	1,17609	0,4164	34,0538
20	0,3069	0,3058	0,3058	0,3061	1,30103	0,4950	38,1616
25	0,2461	0,2458	0,2457	0,2459	1,39794	0,4112	40,1994
30	0,2447	0,2452	0,2448	0,2449	1,47712	0,5010	51,1178

Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Contoh:

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{(0,5081 - 0,4577)}{0,5081} \times 100\% = 9,9193 \%$$

Nilai EC_{50} dihitung menggunakan program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing dose-response data*” dengan konsentrasi ekstrak 5 - 30 ppm.

[Ekstrak] (ppm)	Log [Ekstrak] (ppm)	Aktivitas antioksidan (%)
5	0,69897	9,9193
10	1,00000	20,6979
15	1,17609	34,0538
20	1,30103	38,1616
25	1,39794	40,1994
30	1,47712	51,1178

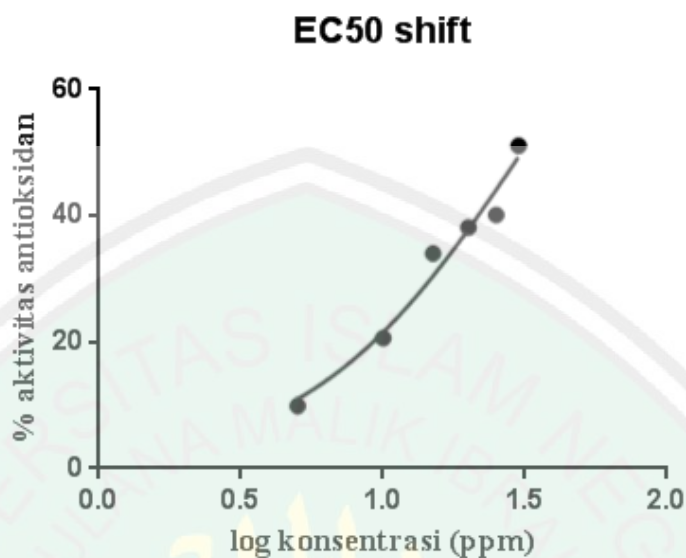
Sehingga diperoleh persamaan:

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

$$Y = 0,0 + (100 - 0,0) / (1 + 10^{(1,487 - X)}) \cdot 1,151$$

	% aktivitas antioksidan	Global (shared)
Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		LogEC50 different for each data set
Alternative hypothesis		LogEC50 same for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		LogEC50 different for each data set
F (DFn, DFd)		
LogEC50 different for each data set		
Best-fit values		
Bottom	= 0.0	
Top	= 100.0	
LogEC50	1.487	
HillSlope	1.151	
EC50	30.66	
Span	= 100.0	
Std. Error		
LogEC50	0.03085	
HillSlope	0.1302	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	1.401 to 1.572	
	0.7895 to	
HillSlope	1.512	
EC50	25.17 to 37.34	
Goodness of Fit		

Degrees of Freedom	4	
R square	0.9694	
Absolute Sum of Squares	33.29	
Sy.x	2.885	
Constraints		
Bottom	Bottom = 0.0	
Top	Top = 100.0	
LogEC50 same for all data sets		
Best-fit values		
Bottom	= 0.0	
Top	= 100.0	
LogEC50	1.487	1.487
HillSlope	1.151	
EC50	30.66	30.66
Span	= 100.0	
Std. Error		
LogEC50	0.03085	0.03085
HillSlope	0.1302	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	1.401 to 1.572	1.401 to 1.572
	0.7895 to	
HillSlope	1.512	
EC50	25.17 to 37.34	25.17 to 37.34
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom		4
R square	0.9694	0.9694
Absolute Sum of Squares	33.29	33.29
Sy.x		2.885
Constraints		
Bottom	Bottom = 0.0	
Top	Top = 100.0	
	LogEC50 is	
LogEC50	shared	
Number of points		
Analyzed	6	



Gambar L.7.7. Grafik BHT

8. Data Hasil Analisa Kapasitas Antioksidan Vitamin C

Konsentrasi (ppm)	Ulangan (Absorbansi sampel)			Rerata	Log []	Absorbansi Kontrol	Aktivitas antioksidan (%)
	1	2	3				
5	0,1779	0,1785	0,1788	0,1784	0,69897	0,6212	71,2814
10	0,1465	0,1475	0,1491	0,1477	1,00000	0,6175	76,0809
15	0,0326	0,0328	0,0327	0,0327	1,17609	0,5868	94,4278
20	0,0302	0,0298	0,0300	0,0300	1,30103	0,5853	94,8744
25	0,0267	0,0268	0,0266	0,0267	1,39794	0,5862	95,4452
30	0,0248	0,0247	0,0250	0,0249	1,47712	0,6213	95,9923

Aktivitas antioksidan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Contoh:

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{(0,6212 - 0,1784)}{0,6212} \times 100\% = 71,2814 \%$$

Nilai EC_{50} dihitung menggunakan program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing dose-response data*” dengan konsentrasi ekstrak 5 - 30 ppm.

[Ekstrak] (ppm)	Log [Ekstrak] (ppm)	Aktivitas antioksidan (%)
5	0,69897	71,2814
10	1,00000	76,0809
15	1,17609	94,4278
20	1,30103	94,8744
25	1,39794	95,4452
30	1,47712	95,9923

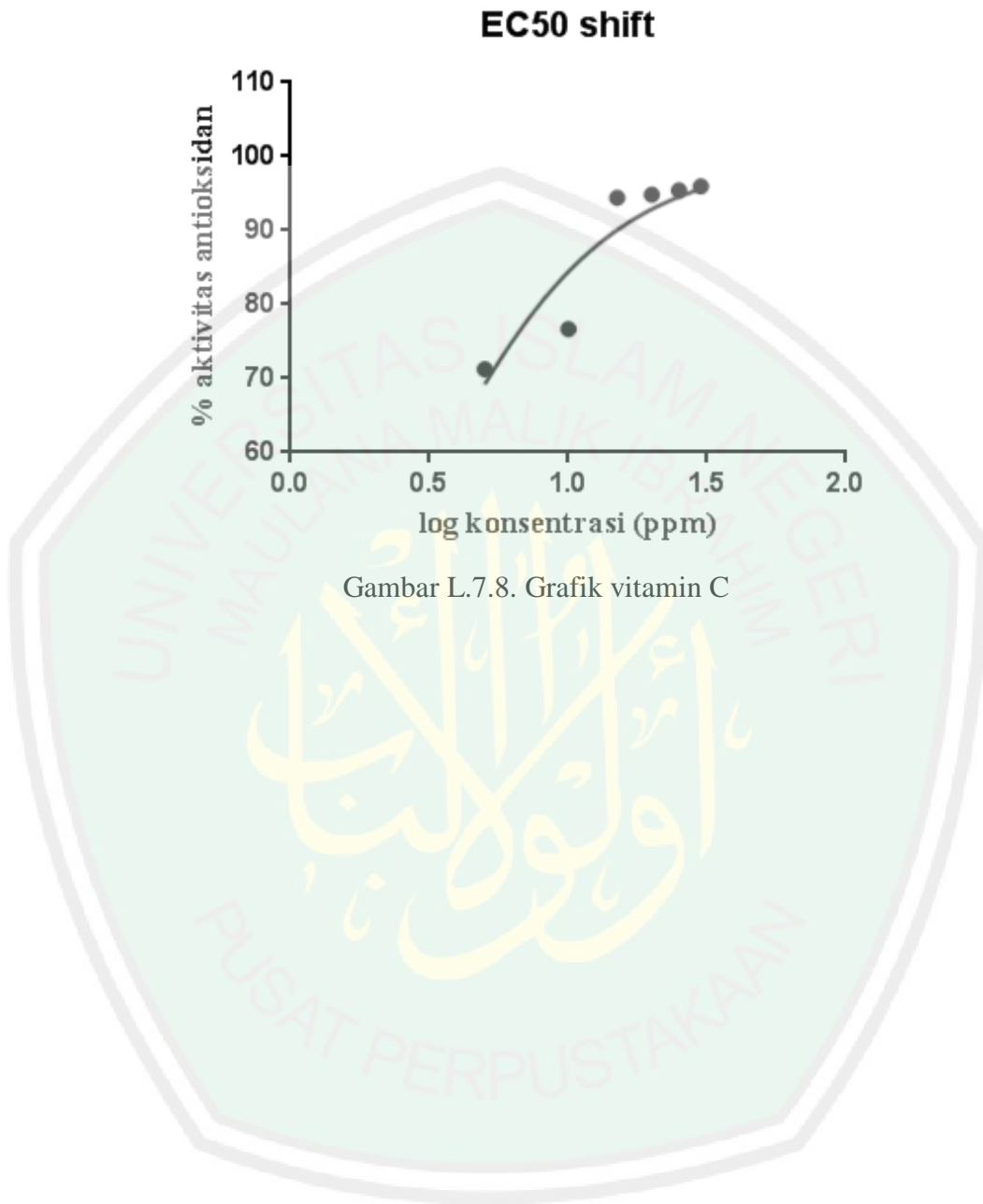
Sehingga diperoleh persamaan:

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

$$Y = 0,0 + (100 - 0,0) / (1 + 10^{(0,4221 - X) * 1,271})$$

	% aktivitas antioksidan	Global (shared)
Comparison of Fits		Can't calculate
Null hypothesis		LogEC50 different for each data set
Alternative hypothesis		LogEC50 same for all data sets
P value		
Conclusion (alpha = 0.05)		Models have the same DF
Preferred model		LogEC50 different for each data set
F (DFn, DFd)		
LogEC50 different for each data set		
Best-fit values		
Bottom	= 0.0	
Top	= 100.0	
LogEC50	0.4221	
HillSlope	1.271	
EC50	2.643	
Span	= 100.0	
Std. Error		
LogEC50	0.1242	
HillSlope	0.3027	
95% Confidence Intervals		
LogEC50	0.07728 to 0.7670	
HillSlope	0.4306 to 2.111	
EC50	1.195 to 5.848	

Goodness of Fit			
Degrees of Freedom		4	
R square		0.8569	
Absolute Sum of Squares		88.10	
Sy.x		4.693	
Constraints			
Bottom	Bottom = 0.0		
Top	Top = 100.0		
LogEC50 same for all data sets			
Best-fit values			
Bottom	= 0.0		
Top	= 100.0		
LogEC50	0.4221		0.4221
HillSlope	1.271		
EC50	2.643		2.643
Span	= 100.0		
Std. Error			
LogEC50	0.1242		0.1242
HillSlope	0.3027		
95% Confidence Intervals			
	0.07728 to		
LogEC50	0.7670		0.07728 to 0.7670
HillSlope	0.4306 to 2.111		
EC50	1.195 to 5.848		1.195 to 5.848
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom			4
R square		0.8569	0.8569
Absolute Sum of Squares		88.10	88.10
Sy.x			4.693
Constraints			
Bottom	Bottom = 0.0		
Top	Top = 100.0		
	LogEC50 is		
LogEC50	shared		
Number of points Analyzed			6



Gambar L.7.8. Grafik vitamin C

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

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

1. KLTA untuk Steroid

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

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

$$R_{f1} = \frac{0,2}{8} = 0,03$$

$$R_{f8} = \frac{5,5}{8} = 0,69$$

$$R_{f2} = \frac{0,5}{8} = 0,06$$

$$R_{f9} = \frac{6,3}{8} = 0,79$$

$$R_{f3} = \frac{1}{8} = 0,13$$

$$R_{f10} = \frac{6,7}{8} = 0,84$$

$$R_{f4} = \frac{1,7}{8} = 0,21$$

$$R_{f11} = \frac{7,4}{8} = 0,93$$

$$R_{f5} = \frac{2,5}{8} = 0,31$$

$$R_{f12} = \frac{7,7}{8} = 0,96$$

$$R_{f6} = \frac{2,9}{8} = 0,36$$

$$R_{f13} = \frac{7,9}{8} = 0,99$$

$$R_{f7} = \frac{4}{8} = 0,5$$

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

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

$$R_{f1} = \frac{0,3}{8} = 0,04$$

$$R_{f4} = \frac{1,1}{8} = 0,14$$

$$R_{f2} = \frac{0,62}{8} = 0,08$$

$$R_{f5} = \frac{3,5}{8} = 0,44$$

$$R_{f3} = \frac{0,8}{8} = 0,10$$

$$R_{f6} = \frac{5,2}{8} = 0,65$$

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

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

$$R_{f1} = \frac{0,2}{8} = 0,025$$

$$R_{f5} = \frac{4,1}{8} = 0,5125$$

$$R_{f2} = \frac{0,4}{8} = 0,05$$

$$R_{f6} = \frac{4,4}{8} = 0,55$$

$$R_{f3} = \frac{0,7}{8} = 0,0875$$

$$R_{f7} = \frac{4,7}{8} = 0,5875$$

$$R_{f4} = \frac{1,2}{8} = 0,15$$

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

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

$$R_{f1} = \frac{0,2}{8} = 0,025$$

$$R_{f3} = \frac{8}{8} = 1$$

$$R_{f2} = \frac{1,1}{8} = 0,1375$$

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

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

$$R_{f1} = \frac{0,2}{8} = 0,025$$

$$R_{f7} = \frac{5}{8} = 0,725$$

$$R_{f2} = \frac{1}{8} = 0,125$$

$$R_{f8} = \frac{5,9}{8} = 0,7375$$

$$R_{f3} = \frac{2}{8} = 0,25$$

$$R_{f9} = \frac{6,3}{8} = 0,7875$$

$$R_{f4} = \frac{3,7}{8} = 0,4625$$

$$R_{f10} = \frac{6,8}{8} = 0,85$$

$$R_{f5} = \frac{4,2}{8} = 0,525$$

$$R_{f12} = \frac{7,4}{8} = 0,925$$

$$R_{f6} = \frac{4,6}{8} = 0,575$$

$$R_{f13} = \frac{7,7}{8} = 0,9625$$

2. KLTA untuk Asam Askorbat

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

- a. Eluen etanol p.a.:asam asetat 10% (9:1)

Panjang Gelombang 254 nm

$$R_{f1} = \frac{6,4}{8} = 0,80$$

$$R_{f2} = \frac{7,3}{8} = 0,91$$

Panjang Gelombang 366 nm

$$R_{f8} = \frac{6,4}{8} = 0,80$$

$$R_{f9} = \frac{6,9}{8} = 0,86$$

$$R_{f8} = \frac{7,1}{8} = 0,89$$

$$R_{f9} = \frac{7,3}{8} = 0,91$$

- b. Eluen etanol p.a.:asam asetat glacial (9:1)

Panjang Gelombang 254 nm

$$R_{f2} = \frac{7,5}{8} = 0,94$$

Panjang Gelombang 366 nm

$$R_{f8} = \frac{7,3}{8} = 0,91$$

$$R_{f9} = \frac{7,7}{8} = 0,96$$

- c. Eluen etanol p.a.:asam asetat 1% (9:1)

Panjang Gelombang 254 nm

$$R_{f1} = \frac{6,3}{8} = 0,79$$

$$R_{f2} = \frac{7,1}{8} = 0,89$$

Panjang Gelombang 366 nm

$$R_{f8} = \frac{6,3}{8} = 0,79$$

$$R_{f9} = \frac{6,7}{8} = 0,84$$

$$R_{f8} = \frac{7,1}{8} = 0,89$$

- d. Eluen etanol p.a.:asam asetat glacial:toluen (5,5:1:1,5)

Panjang Gelombang 254 nm

$$R_{f2} = \frac{7,7}{8} = 0,96$$

Panjang Gelombang 366 nm

$$R_{f9} = \frac{7,7}{8} = 0,96$$

- e. Eluen etanol p.a.:asam asetat glacial:toluen (5,5:1:1,5)

Panjang Gelombang 254 nm

$$R_{f2} = \frac{7,5}{8} = 0,94$$

Panjang Gelombang 366 nm

$$R_{f9} = \frac{7,6}{8} = 0,95$$

Lampiran 8 Dokumentasi Penelitian

L.8.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge 4 %



Medium Ekstrak Tauge (MET)

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



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 sentrifuse



Pemanenan 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.*



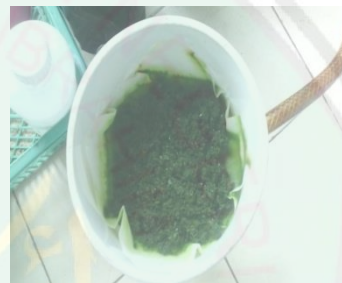
Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Analisis Kadar Air

L.8.6 Ekstraksi

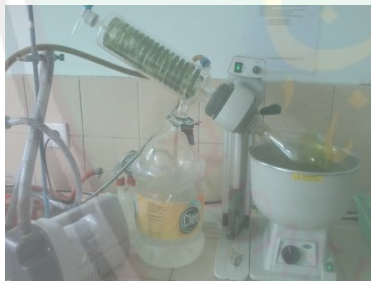
L.8.6.1 Ekstraksi Maserasi



Proses pengadukan (*shaker*)



Proses penyaringan hasil maserasi

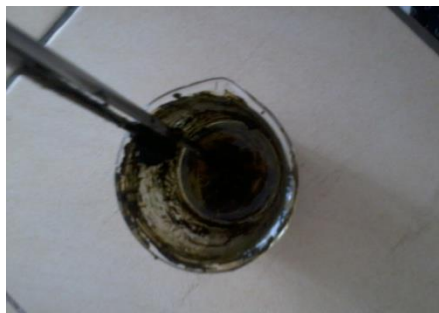


Proses pemekatan (rotary evaporator vacuum)



Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

L.8.6.2 Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*



Hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan katalis HCl 2N

L.8.6.3 Ekstraksi Cair-cair

L.8.6.3.1 Partisi Ekstrak Kasar Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Pelarut n-heksana



Proses partisi
Lapisan atas : n-heksana
Lapisan bawah : fasa air

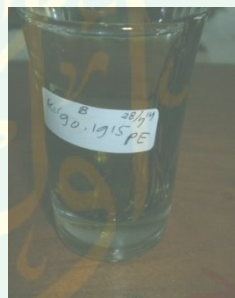


Fraksi n-heksana

L.8.6.3.2 Partisi Ekstrak Kasar Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Pelarut Petroleum Eter



Proses partisi
Lapisan atas : petroleum eter
Lapisan bawah : fasa air



Fraksi petroleum eter

L.8.6.3.3 Partisi Ekstrak Kasar Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Pelarut Kloroform



Proses partisi
Lapisan atas : air
Lapisan bawah : kloroform



Fraksi kloroform

L.8.6.3.4 Partisi Ekstrak Kasar Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Pelarut Etil Asetat



Proses partisi
Lapisan atas : etil asetat
Lapisan bawah : air



Fraksi etil asetat

L.8.6.3.4 Fraksi Air

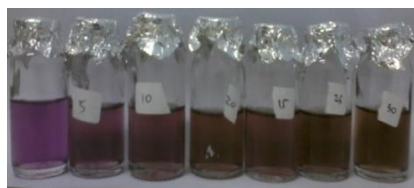


Fasa air

L.8.7 Uji Aktivitas Antioksidan



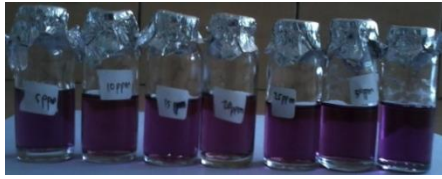
Uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol



Uji aktivitas antioksidan ekstrak PE



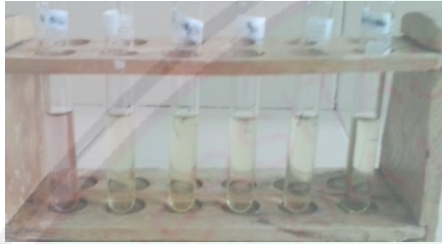
Uji aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana



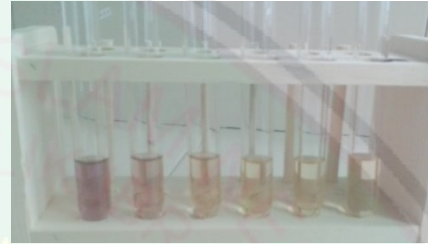
Uji aktivitas antioksidan ekstrak kloroform



Uji aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat



Uji aktivitas antioksidan asam askorbat



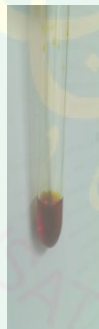
Uji aktivitas antioksidan BHT

L.8.8 Uji Reagen

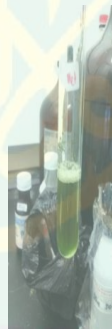
L.8.8.1 Ekstrak Metanol



Alkaloid Mayer (-)



Alkaloid Dragendorff (-)



Flavonoid (-)



Steroid (+)



Asam askorbat (+)
A: tanpa ekstrak
B : dengan ekstrak

L.8.8.2 Ekstrak Etil Asetat



Alkaloid Mayer (-)



Alkaloid Dragendorff (-)



Flavonoid (-)

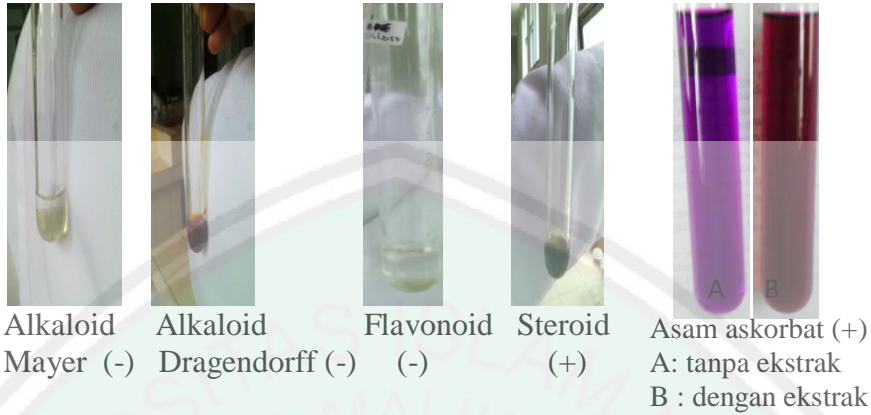


Steroid (+)

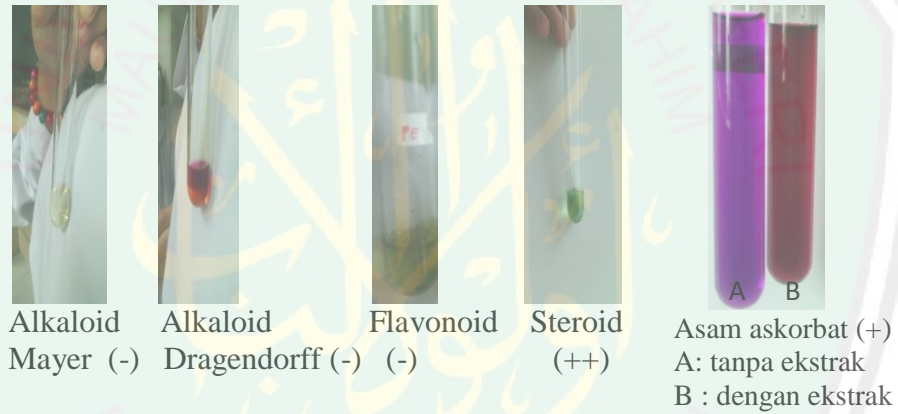


Asam askorbat (+)
A: tanpa ekstrak
B : dengan ekstrak

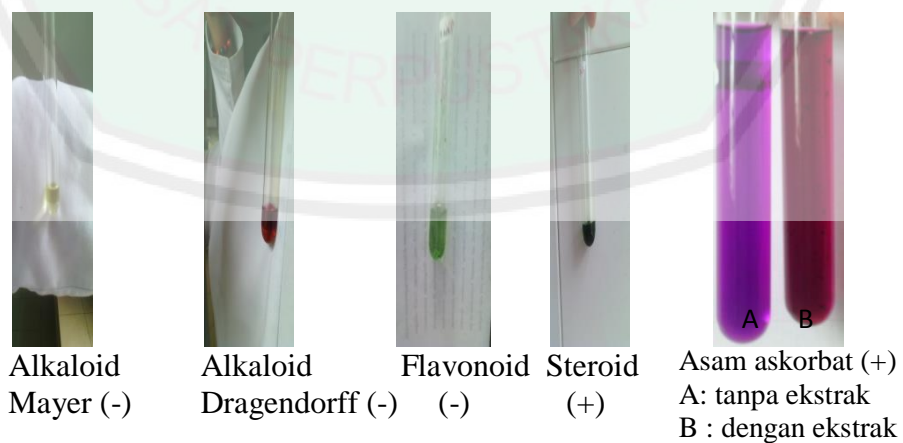
L.8.8.3 Ekstrak Kloroform



L.8.8.4 Ekstrak Petroleum Eter



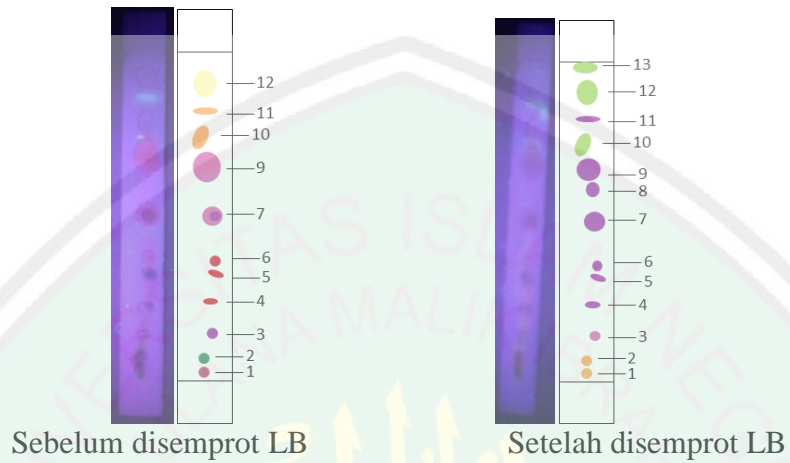
L.8.8.5 Ekstrak n-heksana



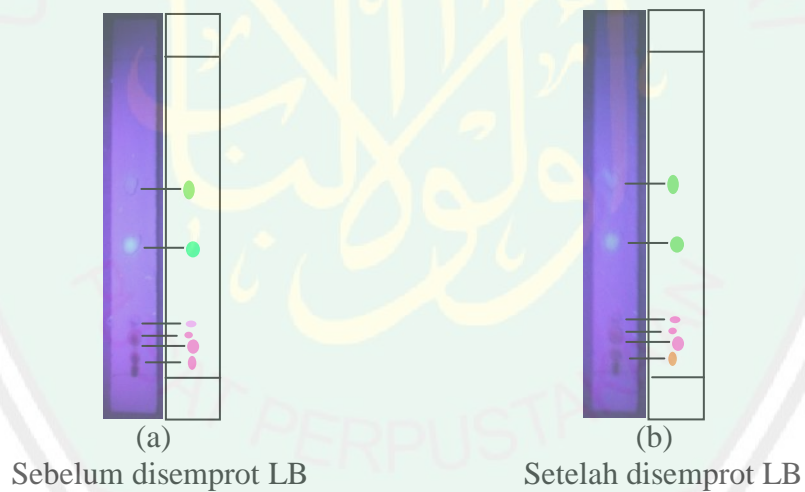
L.8.9 Kromatografi Lapis Tipis

L.8.9.1 Steroid

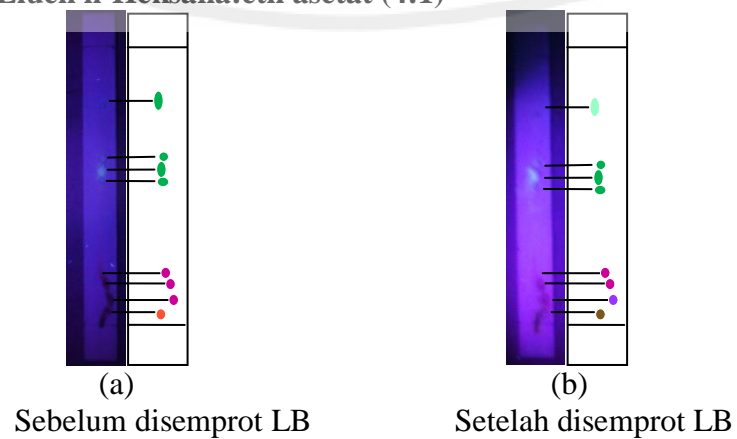
L.8.9.1.1 Eluen n-Heksana:aseton (7:3)



L.8.9.1.2 Eluen n-Heksana:asam asetat (9:1)



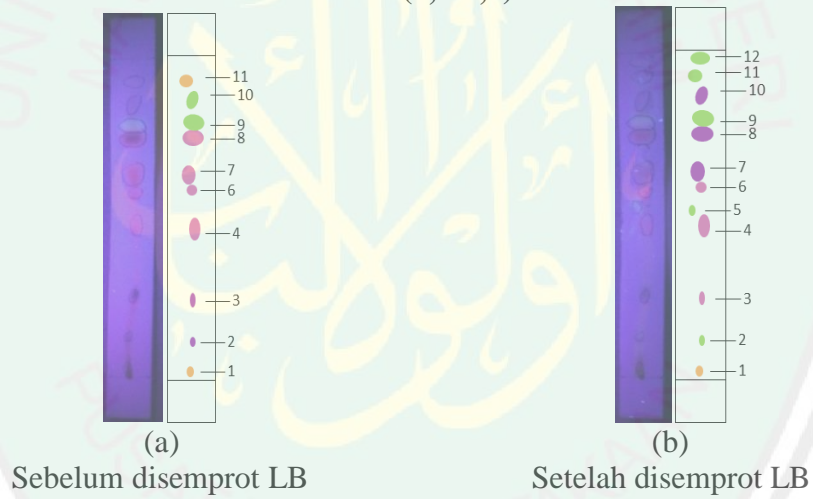
L.8.9.1.3 Eluen n-Heksana:etil asetat (4:1)



L.8.9.1.4 Eluen n-Heksana:etil asetat (3:2)

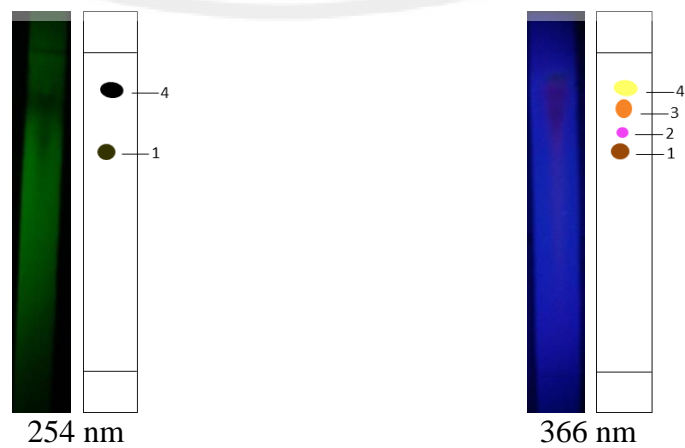


L.8.9.1.5 Eluen n-Heksana:etil asetat (3,5:1,5)

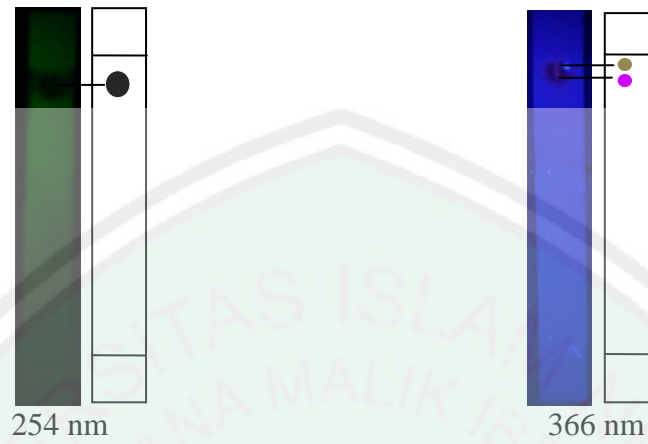


L.8.9.2 Asam Askorbat

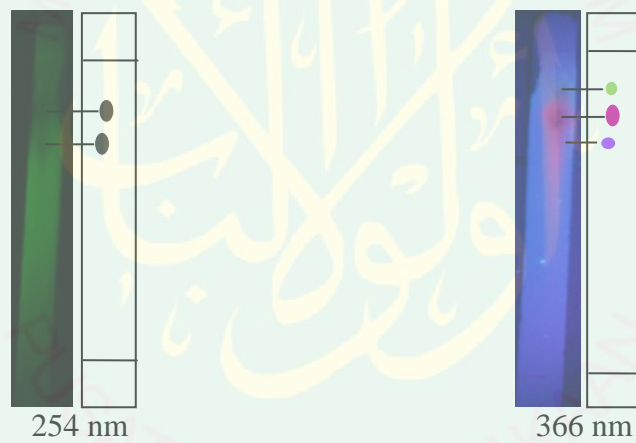
L.8.9.2.1 Eluen etanol p.a : asam asetat 10 % (9:1)



L.8.9.2.2 Eluen etanol p.a : asam asetat glasial (9:1)

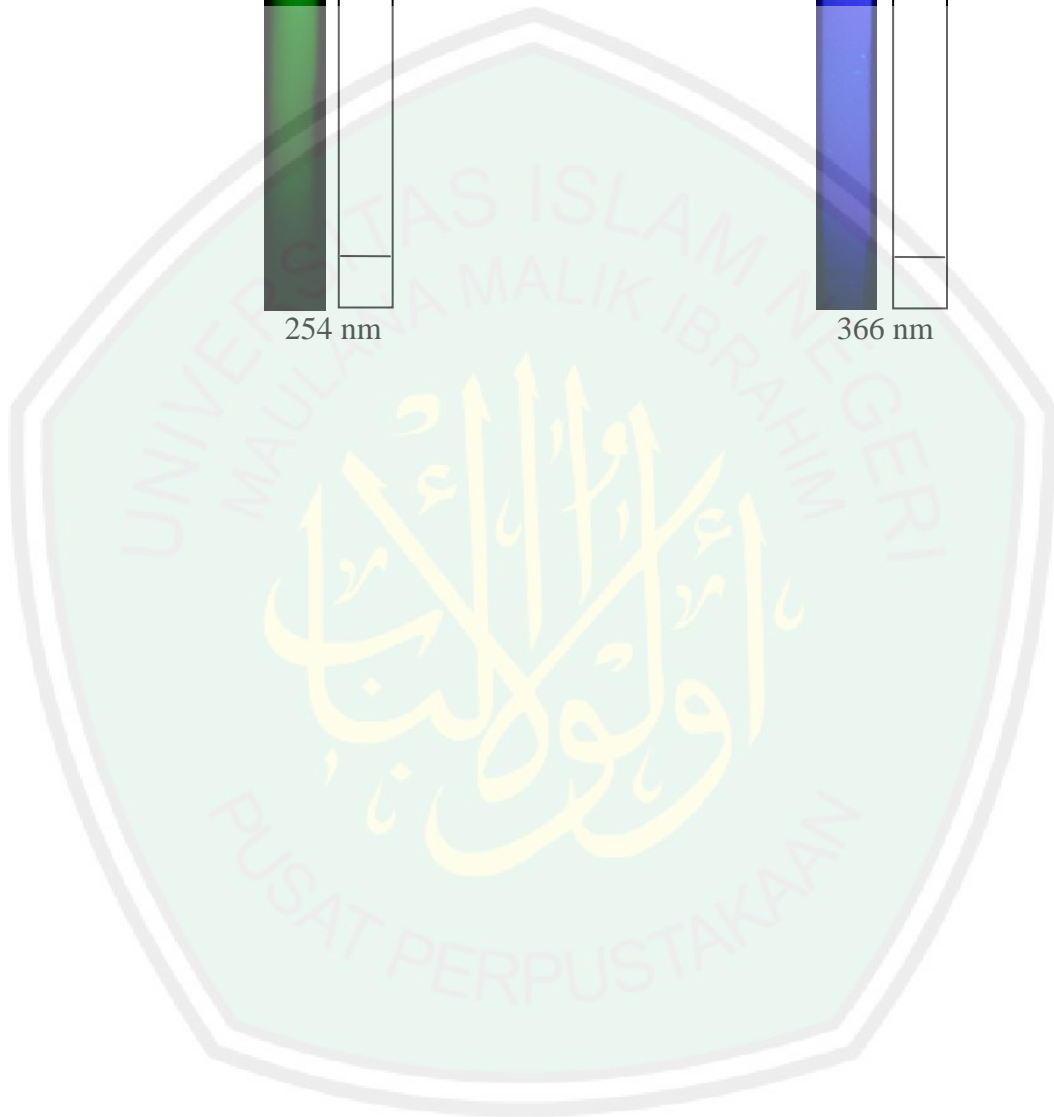
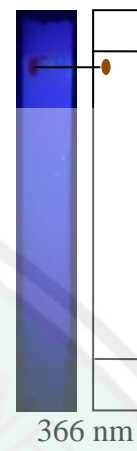


L.8.9.2.3 Eluen etanol p.a : asam asetat 1% (9:1)



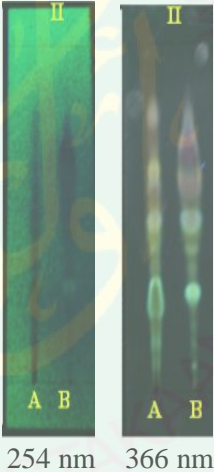
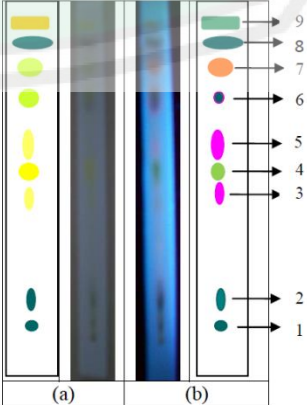
L.8.9.2.4 Eluen etanol p.a : asam asetat glasial : toluen (5,5:1:1,5)

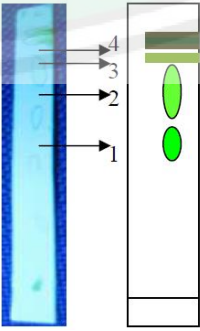


L.8.9.2.5 Eluen etanol p.a : asam asetat glasial : asam format : air (6:1:1:2)

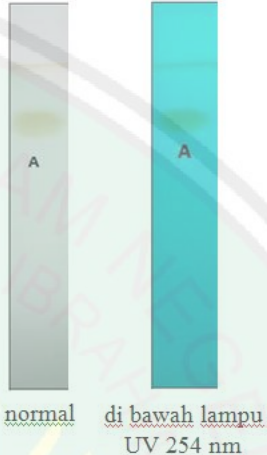
LAMPIRAN 9. RANGKUMAN REFERENSI UNTUK KLTA

L.9.1 KLTA GOLONGAN SENYAWA STEROID

No.	Penulis	Eluen dan pendeteksi	Hasil	Rf
1.	Syamsudin. 2007. <i>Aktivitas antiplasmodium dari dua fraksi ekstrak n-heksana kulit batang asam kandis (Garcinia parvifolia Miq.</i>	KLT dengan menggunakan fase diam silika gel GF254 dan eluen n-heksana:aseton (7:3). Deteksi menggunakan sinar ultra violet 254 dan 366 pereaksi Lieberman – Burchard (LB). • Dugaan steroid: noda berwarna biru ungu sampai coklat	<ul style="list-style-type: none"> • sebelum disemprot LB : Fraksi A : dua noda kuning. Fraksi B : dua bercak kuning. • Setelah disemprot LB : Fraksi A : empat bercak berwarna biru ungu sampai coklat Fraksi B : enam bercak yang berwarna biru ungu sampai coklat yang diduga merupakan golongan senyawa steroid 	—
2.	Hayati, dkk. 2012. <i>Identifikasi Senyawa Dan Aktivitas Antimalaria In Vivo Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting-Anting (Acalypha Indica L.).</i>	KLT golongan senyawa steroid pada tanaman anting-anting menggunakan eluen heksana:etil asetat (7:3). hasil disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard dan diamati di bawah lampu	Terbentuk 9 noda:  (a) hasil elusi sebelum dideteksi dengan lampu UV (b) hasil pengamatan dengan	1= 0,06 2= 0,11 3= 0,38 4= 0,47 5= 0,56 6= 0,68 7= 0,7 8= 0,8 9= 0,83 Steroid : 1,2,4,6,8,9.

		<p>UV 366 nm.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dugaan steroid : noda berwarna hijau, biru ungu sampai coklat. 	<p>lampu UV 366 nm.</p> <p>➤ Dugaan steroid : 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.</p>	
3.	<p>Reveny, J. 2011. <i>Daya Antimikroba Ekstrak dan Fraksi Daun Sirih Merah (Piper betle Linn.)</i>.</p>	<p>KLT menggunakan silika gel F254, dengan eluen n-heksana:etilasetat (8:2), (7:3), (6:4), (5:5) dan penampak noda disemprot Lieberman–Burchard.</p> <p>Dugaan steroid: noda berwarna ungu-merah</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Hasil KLT ekstrak etanol 80% daun sirih merah eluen n-heksana:etilasetat dengan perbandingan : <ul style="list-style-type: none"> - (8:2) = Rf 0,41 dan 0,29 (ungu merah) - (6:4) = Rf 0,84 dan 0,76 (ungu merah) • Hasil KLT fraksi n-heksana daun sirih merah eluen n-heksana:etilasetat dengan perbandingan : <ul style="list-style-type: none"> - (8:2) = Rf 0,42 dan Rf 0,30 (ungu merah). - (6:4) = Rf 0,84 dan Rf 0,74 (ungu merah). 	<p>0,29; 0,30; 0,41; 0,42; 0,74; 0,76; 0,84.</p>
4.	<p>Halimah. 2010. <i>Uji Fitokimia Dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-Anting (Acalypha Indica Linn.) Terhadap Larva Udang Artemia Salina Leach.</i></p>	<p>KLT steroid dengan eluen n-heksana : etilasetat (7:3). Dideteksi dengan reagen Lieberman–Burchard dan dilihat dibawah lampu UV 366 nm.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dugaan steroid : noda berwarna hijau 	<p>Hasil elusi : 4 noda dengan warna noda hijau terang, hijau terang, hijau kekuningan dan hijau kecoklatan.</p> 	<p>0,57; 0,76; 0,94; 0,96</p>

L.9.2 KLTA ASAM ASKORBAT

No.	Penulis	Eluen dan pendeteksi	Hasil	Rf
1.	Patel dan Telange. 2011. <i>Qualitative And Quantitative Estimation Of Gallic Acid And Ascorbic Acid In Polyherbal Tablets.</i>	KLT asam askorbat dengan plat silika gel 60 F ₂₅₄ dan eluen etilasetat : asam asetat glasial : asam format : air (6:1:1:2v/v/v/v). Hasil elusi dideteksi di bawah lampu UV 254 nm. Asam askorbat : noda gelap.	Hasil KLT asam askorbat diperoleh noda warna gelap. 	0,60
2.	Himesh, dkk. 2012. <i>Quantification Of Ascorbic Acid In Leaves Of Annona Squamosa</i>	KLT vitamin C (asam askorbat) menggunakan plat silika gel F dengan eluen etanol: asam asetat 1.0% (9:1). Hasil elusi dideteksi di bawah lampu UV 254 nm. Asam askorbat memiliki noda hitam atau gelap.	Standar asam askorbat membentuk noda biru gelap pada Rf 0,51. Asam askorbat sampel membentuk spot gelap dengan Rf 0,50	0,50 (vit.C sampel) dan 0,51 (standar asam askorbat)
3.	Kondawar, dkk. 2011. <i>Quantitative estimation of Gallic acid and Ascorbic acid in a marketed herbal medicine: Triphala Churna by High Performance Thin Layer Chromatography</i>	KLT asam askorbat dengan plat silika gel 60 F ₂₅₄ dan eluen etanol: asam asetat glasial: toluen (5.5:1:1.5). Hasil elusi dideteksi dengan lampu UV 254 nm. Selanjutnya menggunakan alat Camag UV cabinet, kemudian di scan dengan Camag TLC Scanner, menggunakan winCATS software	Noda berwarna gelap dengan nilai Rf 0.74 ± 0.01	0,74



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

KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 0114/Takso.Identifikasi/03/2013

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

Nama : A. Ghanaim Fasya, M.Si.

Instansi : UIN Malang

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

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

Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.

Malang, 2 Oktober 2013

Kepala Laboratorium
Taksonomi, Struktur dan
Perkembangan Tumbuhan,

LABORATORIUM TAKSONOMI Dr. Serafinah Indriyani, M.Si.
NIP. 19630909198802 2 001