

**UJI TOKSISITAS DENGAN METODE BSLT SENYAWA STEROID
FRAKSI PETROLEUM ETER MIKROALGA *Chlorella sp.***

SKRIPSI

Oleh:
NURIA MILLATI
NIM. 12630066



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

**UJI TOKSISITAS DENGAN METODE BSLT SENYAWA STEROID
FRAKSI PETROLEUM ETER MIKROALGA *Chlorella sp.***

SKRIPSI

Oleh:
NURIA MILLATI
NIM. 12630066

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

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

**UJI TOKSISITAS DENGAN METODE BSLT SENYAWA STEROID
FRAKSI PETROLEUM ETER MIKROALGA *Chlorella sp.***

SKRIPSI

Oleh:
NURIA MILLATI
NIM. 12630066

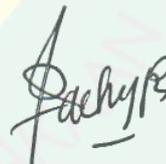
Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 25 Agustus 2016

Pembimbing I



A.Ghanaim Fasva, M.Si
NIP. 19828616 200604 1 002

Pembimbing II



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

Mengetahui,

Ketua Jurusan Kimia



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

**UJI TOKSISITAS DENGAN METODE BSLT SENYAWA STEROID
FRAKSI PETROLEUM ETER MIKROALGA *Chlorella sp.***

SKRIPSI

Oleh:
NURIA MILLATI
NIM. 12630066

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal: 25 Agustus 2016

Penguji Utama	: Diana Candra Dewi, M.Si NIP. 19770720 200312 2 001	(.....)
Ketua Penguji	: Ahmad Hanapi, M.Sc NIDT. 19851225 20160801 1 069	(.....)
Sekretaris Penguji	: A. Ghanaim Fasya, M.Si NIP. 19820616 200604 1 002	(.....)
Anggota Penguji	: Ahmad Abtokhi, M.Pd NIP. 19761003 200312 1 004	(.....)

Mengesahkan,

Ketua Jurusan Kimia


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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nuria Millati
NIM : 12630066
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Uji Toksisitas dengan Metode BSLT Senyawa Steroid
Fraksi Petroleum Eter Mikroalga *Chlorella sp.*

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

Malang, 8 September 2016
Yang membuat pernyataan,



Nuria Millati
NIM. 12630066

KATA PENGANTAR

Assalamu 'alaikum Wr. Wb.

Syukur Alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan studi di Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sekaligus menyelesaikan tugas akhir/skripsi ini dengan baik.

Selanjutnya penulis haturkan ucapan terima kasih seiring do'a dan harapan jazakumullah ahsanal jaza' kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr. Mudjia Raharjo, M.Si selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Bayyinatul Muchtaromah, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. A. Ghanaim Fasya, M.Si, Ahmad Hanapi, M.Sc dan Ahmad Abtokhi, M.Pd selaku dosen pembimbing skripsi, yang telah banyak memberikan pengarahan dan pengalaman yang berharga.
5. Segenap civitas akademika Jurusan Kimia, terutama seluruh dosen, terima kasih atas segenap ilmu dan bimbingannya.
6. Ayahanda dan Ibunda tercinta yang senantiasa memberikan do'a dan restunya kepada penulis dalam menuntut ilmu.
7. Kakak dan adik penulis yang selalu memberikan semangat kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
8. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materiil maupun moril.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga skripsi ini bisa memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya bagi penulis secara pribadi. *Amin Ya Robbal Alamin.*

Wassalamu 'alaikum Wr. Wb.

Malang, 8 September 2016

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
ABSTRAK	xi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Manfaat Penelitian	8
1.5 Batasan Masalah	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tumbuhan dalam Al-Qur'an	9
2.2 Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	11
2.3 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam MET	12
2.4 Ekstraksi Senyawa Aktif	16
2.5 Hidrolisis dan Partisi	18
2.6 Senyawa Steroid	20
2.7 Pemisahan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis	21
2.8 Uji Toksisitas Senyawa Aktif Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	23
2.8.1. Morfologi Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	23
2.8.2. Uji Toksisitas terhadap Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach dengan BSLT	25
2.9 Analisis Probit	28
2.10 Spektrofotometer FTIR	28
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Pelaksanaan Penelitian	30
3.2 Alat dan Bahan	30
3.2.1 Alat	30
3.2.2 Bahan	30
3.3 Rancangan Penelitian	31
3.4 Tahapan Penelitian	32
3.5 Pelaksanaan Penelitian	33
3.5.1 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	33
3.5.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%	33
3.5.1.2 Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam MET 4%	33

3.5.1.3	Pemanenan Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	33
3.5.2	Preparasi Sampel Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	33
3.5.3	Analisis Kadar Air Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	34
3.5.4	Ekstraksi Komponen Aktif.....	34
3.5.5	Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	35
3.5.6	Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	35
3.5.7	Uji Fitokimia Senyawa Steroid	35
3.5.8	Pemisahan Senyawa Steroid Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif.....	36
3.5.9	Uji Toksisitas Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> terhadap Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	37
3.4.9.1	Penetasan Larva Udang <i>Artemia salina</i> Leach	37
3.4.9.2	Uji Toksisitas.....	37
3.5.10	Identifikasi Senyawa Steroid dengan FTIR	38
3.6	Analisa Data.....	38
BAB IV PEMBAHASAN		
4.1	Kultivasi Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	39
4.2	Pemanenan Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	40
4.3	Preparasi Sampel Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	40
4.4	Analisis Kadar Air Biomassa Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	41
4.5	Ekstraksi Komponen Aktif	42
4.6	Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	43
4.7	Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	44
4.8	Uji Fitokimia Senyawa Steroid dalam Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> ,	45
4.9	Pemisahan Senyawa Steroid Menggunakan KLT Preparatif.....	46
4.10	Uji Toksisitas Senyawa Steroid Menggunakan Metode BSLT	49
4.10.1	Penetasan Larva	49
4.10.2	Uji Toksisitas	50
4.11	Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer FTIR	53
4.12	Pemanfaatan Mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dalam Prespektif Islam.....	55
BAB V PENUTUP		
5.1	Kesimpulan	60
5.2	Saran	60
DAFTAR PUSTAKA		61
LAMPIRAN		68

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Pelarut organik dan sifat fisiknya.....	17
Tabel 2.2	Kategori toksisitas bahan	25
Tabel 4.1	Hasil KLT preparatif senyawa steroid fraksi petroleum eter mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dideteksi di bawah lampu UV λ 366 nm...	48
Tabel 4.2	Hasil uji toksisitas ekstrak metanol, ekstrak fraksi petroleum eter dan isolat steroid menggunakan metode BSLT.....	51
Tabel 4.3	Interpretasi spektrum inframerah dari isolat	54



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	11
Gambar 2.2	Kurva pertumbuhan mikroalga <i>Chlorella sp.</i>	15
Gambar 2.3	1,2-siklopentenoperhidrofenantren (a), kerangka dasar karbon steroid dan sistem penomoran (b)	20
Gambar 2.4	Larva udang <i>Artemia salina</i> Leach.....	23
Gambar 4.1	Reaksi hidrolisis glikosida dan reaksi penetralan HCl dengan natrium bikarbonat.....	44
Gambar 4.2	Dugaan reaksi fukosterol dengan reagen Liebermann-Burchard	46
Gambar 4.3	Hasil senyawa steroid pada fraksi petroleum eter mikroalga <i>Chlorella sp.</i> dideteksi di bawah lampu UV λ 366 nm.....	47
Gambar 4.4	Kurva mortalitas larva udang <i>Artemia salina</i> Leach pada ekstrak metanol dengan nilai LC_{50} = 54,7793 ppm.....	51
Gambar 4.5	Kurva mortalitas larva udang <i>Artemia salina</i> Leach pada fraksi petroleum eter dengan nilai LC_{50} = 38,8814 ppm	52
Gambar 4.6	Kurva mortalitas larva udang <i>Artemia salina</i> Leach pada isolat senyawa steroid dengan nilai LC_{50} = 19,6889 ppm.....	52
Gambar 4.7	Spektra FTIR isolat senyawa steroid hasil KLT preparatif	54

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Rancangan Penelitian	68
Lampiran 2	Skema kerja	69
Lampiran 3	Perhitungan dan pembuatan reagen dan larutan.....	75
Lampiran 4	Data pengamatan dan perhitungan	80
Lampiran 5	Data kematian larva dan perhitungan LC ₅₀ uji toksisitas ekstrak metanol, ekstrak fraksi petroleum eter dan isolat senyawa steroid	87
Lampiran 6	Dokumentasi gambar.....	95



ABSTRAK

Millati, N. 2016. **Uji Toksisitas dengan Metode BSLT Senyawa Steroid Fraksi Petroleum eter Mikroalga *Chlorella sp.***. Pembimbing I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Pembimbing II: Ahmad Abtokhi, M.Pd; Konsultan: Ahmad Hanapi, M.Sc.

Kata Kunci: *Chlorella sp.*, toksisitas, Steroid

Telah dilakukan penelitian tentang uji toksisitas senyawa steroid dari mikroalga *Chlorella sp.* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Al-Qur'an surat Luqman ayat 10 menjelaskan bahwasanya Allah SWT telah menumbuhkan bermacam-macam jenis tanaman yang baik dan dapat dimanfaatkan oleh manusia, salah satunya adalah sebagai obat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat toksisitas dari senyawa steroid yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.*

Isolasi senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan maserasi menggunakan pelarut metanol p.a dan diikuti dengan hidrolisis menggunakan HCl 2 N dan partisi dengan petroleum eter. identifikasi senyawa steroid fraksi petroleum eter menggunakan uji fitokimia dan dilanjutkan dengan pemisahan senyawa steroid menggunakan KLTP. Senyawa steroid hasil KLTP diuji toksisitasnya terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Data kematian *Artemia salina* Leach dianalisis dengan analisis probit untuk mengetahui nilai LC₅₀ dan diidentifikasi gugus fungsi senyawa steroid menggunakan FTIR.

Hasil penelitian menunjukkan senyawa steroid fraksi petroleum eter toksik terhadap *Artemia salina* Leach dengan nilai LC₅₀ sebesar 19,6889 ppm. Berdasarkan hasil analisis spektrofotometer FTIR isolat toksik dari fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* diduga mengandung senyawa steroid yang memiliki gugus fungsi -OH, C=C, C=O, C-OH sekunder, dan gem dimetil (-C(CH₃)₂).

ABSTRACT

Millati, N. 2016. **Toxicity Test using BSLT Method of Steroid Compound in Petroleum ether Fraction from Microalgae *Chlorella sp.*** Supervisor I: A. Ghanaim Fasya, M.Si; Supervisor II: Ahmad Abtokhi, M.Pd; Consultant: Ahmad Hanapi, M.Sc.

Keyword: *Chlorella sp.*, toxicity, Steroid

Research on the toxicity test using shrimp larvae *Artemia salina* Leach of steroid compound from *Chlorella sp.* had been done. Al-Qur'an surah Luqman verse 10 shows that Allah SWT grewed plants can be utilized by humans, such as a medicine. This study was aimed to determine the toxicity level of steroid compound from *Chlorella sp.*

Isolation of steroid compound from *Chlorella sp.* was conducted by maseration with methanol p.a and was followed by hydrolysis with HCl 2 N and partition with petroleum ether. Identification of steroid compound in petroleum ether fraction by phytochemical test and was continued by separation of steroid compound using preparative thin layer chromatography (PTLC). Toxicity test of steroid compound to shrimp larvae *Artemia salina* Leach. Mortality data of *Artemia salina* Leach was analyzed by probit analysis to determine LC₅₀ Value and identified the functional group of steroid using FTIR.

The result of this study showed that the steroid compound in petroleum eter fraction toxic to *Artemia salina* Leach with LC₅₀ value of 19,6889 ppm. Based on FTIR analysis of the toxic isolates suspected the steroid compound that have functional group of -OH, C=C, C=O, C-OH secondary and geminal dimethyl (C-(CH₃)₂).

المخلص

ملتى، ن. ٢٠١٦. اختبار السمية بطريقة محلول ملحي اختبار الروبيان الفتك (BSLT) الستيرويد من جزء بترول الإيثر الطحالب شلوريلا المشرف الأول: احمد غناعم فاشا الماجستير، المشرف الثاني: أحمد ابطاكي الماجستير، مستشارة: احمد حنفي الماجستير.

كلمات البحث: شلوريلا، السمية، الستيرويد

قد فعل البحث عن اختبار سمية الستيرويد من الطحالب شلوريلا ليرقات الروبيان الأرتيميا سالينا ليتش. وفي سورة لقمان آية ١٠ ان تعالى قد انبت أنواع مختلفة من النباتات ينفعها الناس، واحد منها للدواء. وتهدف الدراسة هي لتعرف مستويات السمية مركبات لستيرويد من الطحالب شلوريلا.

عزل الستيرويد من الطحالب شلوريلا مع طريق النقع بالميثانول p.a وتليها التحليل المائي باستخدام حمض الهيدروكلوريك ٢N والتقسيمها ببتترول الإيثر. لتعرف الستيرويد من جزء بترول الإيثر باستخدام اختبار الكيمائي النباتي ثم تفصلها بإعدادي طبقة رقيقة اللوني (KLTP). وكان الستيرويد منها تختبر السميته ليرقات الروبيان الأرتيميا سالينا ليتش. ثم يتحلل بيانات الوفيات من اليرقات الروبيان الأرتيميا سالينا ليتش مع تحليل الاحتمالية لتعرف قيمة LC₅₀ ثم يحدد المجموعات الوظيفية الستيرويد باستخدام التحليلي فورييه مطياف الأشعة تحت الحمراء (FTIR).

ونتائج الدراسة يدل ان الستيرويد من جزء بترول الإيثر سامة ليرقات الروبيان الأرتيميا سالينا ليتش بعدد LC₅₀ من جزء ١٩,٦٨٨٩ في المليون. من تحليل ي فورييه مطياف الأشعة تحت الحمراء (FTIR) ان تعزل السامة من جزء بترول الإيثر الطحالب شلوريلا يعتقد أنها تحتوي على مركبات الستيرويد التي لديها المجموعة الوظيفية -OH، ، C = C، C = O، C-OH، والثانوية، والأحجار الكريمة ثنائي ميثيل (-C(CH₃)₂).

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tingginya keanekaragaman hayati laut Indonesia, menjadikan negara Indonesia memiliki potensi kekayaan laut yang berlimpah. Kekayaan ini memberi peluang kepada masyarakat untuk memanfaatkan biota laut secara optimal dalam berbagai bidang. Telah disebutkan dalam al-Qur'an surat Luqman ayat 10 bahwa Allah SWT telah menciptakan tanam-tanaman dan buah-buahan dengan khasiat di dalamnya yang dapat dimanfaatkan oleh makhluk hidup di muka bumi.

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرْوَنَهَا وَأَلْقَى فِي الْأَرْضِ رَوْسِي 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 memperkembangbiakkan 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)

Tumbuhan yang baik menurut tafsir al-mishbah adalah tumbuhan yang subur dan bermanfaat (Shihab, 2002). Allah SWT telah menumbuhkan bermacam-macam tumbuhan yang baik untuk makhluk-Nya yaitu tumbuhan yang bermanfaat. Salah satu manfaatnya yaitu digunakan sebagai obat, sebagaimana hadits Rasulullah yang diriwayatkan oleh Imam Bukhari.

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

“Allah SWT tidak menciptakan suatu penyakit tanpa menciptakan pula obat untuknya.” (HR. Bukhari)

Salah satu tumbuhan yang berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai obat adalah mikroalga. Mikroalga merupakan mikroorganisme perairan, baik diperairan darat maupun laut. Mikroalga lebih dikenal dengan fitoplankton (alga laut bersel tunggal). Mikroalga memiliki keunggulan dibandingkan dengan makroalga dan tumbuhan tingkat tinggi lainnya, diantaranya mudah dibudidayakan karena hidupnya tidak tergantung musim, tidak memerlukan tempat yang luas dan tidak memerlukan waktu yang lama untuk memanennya (Borowitzka, 1988).

Salah satu jenis mikroalga yang saat ini banyak diteliti adalah dari golongan chlorophyta yaitu mikroalga *Chlorella sp.* *Chlorella sp.* merupakan tumbuhan ganggang hijau bersel tunggal, hidup menyendiri atau kelompok, tidak mempunyai batang, akar, dan daun sebenarnya. Menurut Sachlan (1982), *Chlorella sp.* memiliki kelebihan untuk tumbuh dan berkembangbiak dengan cepat. Setiap sel *Chlorella sp.* mampu berkembangbiak menjadi 10.000 sel dalam waktu 24 jam.

Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* memiliki kemampuan bioaktivitas. Khamidah, dkk. (2014) menyatakan ekstrak metanol *Chlorella sp.* memiliki aktivitas sebagai antibakteri yaitu pada konsentrasi 20 % menghasilkan zona hambat terbesar (16,5 mm) terhadap bakteri *E. coli* dan konsentrasi 25 % menghasilkan zona hambat terbesar (13 mm) terhadap bakteri *S. aureus*. Sedangkan menurut Anggraeni, dkk. (2014) fraksi petroleum eter *Chlorella sp.* memiliki aktivitas antioksidan yang paling tinggi dengan nilai EC_{50} yaitu 27,26 ppm.

Budidaya *Chlorella sp.* dapat dilakukan dengan cara kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET). MET merupakan salah satu media alami yang digunakan untuk pertumbuhan mikroalga. MET mengandung nutrisi organik seperti karbohidrat, protein, vitamin, dan lemak yang dibutuhkan sebagai sumber energi bagi pertumbuhan mikroalga (Prihartini, dkk., 2007). MET juga memberikan pertumbuhan yang pesat terhadap mikroalga dibandingkan pada MAL (Medium Air Laut) dan MG (Medium Guillard) (Wulandari, dkk., 2010). Anggraeni, dkk. (2014) menyebutkan bahwa kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dalam MET 4 % selama 10 hari dan selama masa kultivasi terjadi perubahan warna kultur yang semula berwarna hijau kekuningan menjadi hijau tua hingga pada hari ke-10 kultivasi. Gradasi warna hijau menunjukkan peningkatan populasi sel *Chlorella sp.* selain itu juga mengindikasikan peningkatan kadar klorofil yang merupakan pigmen utama yang terdapat dalam sitoplasma.

Kaweroe (2008) melaporkan bahwa mikroalga *Chlorella sp.* mengandung senyawa metabolit primer seperti protein, karbohidrat, asam lemak tak jenuh, vitamin dan enzim. Selain itu, mikroalga *Chlorella sp.* juga memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder. Senyawa metabolit sekunder tersebut dapat dihasilkan pada fase stationer (Anggraeni, dkk., 2014). Fase stationer adalah fase dimana terjadi keseimbangan antara fase reproduksi dan fase kematian (Bariyyah, dkk., 2013). Menurut Herbert (1995), pada fase stationer terjadi metabolisme sekunder yang merupakan keseluruhan proses sintesis dan perombakan produk metabolit primer. Kurva pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* menunjukkan bahwa fase stationer pada hari ke-10 dengan kelimpahan sel *Chlorella sp.* berada dalam jumlah sel tertinggi, yaitu 4.880.000 sel/mL (Khamidah, dkk., 2013).

Senyawa metabolit sekunder dapat diekstrak menggunakan pelarut yang memberikan efektivitas paling tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa aktif dalam pelarut tersebut. Secara umum pelarut metanol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam karena metanol lebih efisien untuk penetrasi ke dalam dinding sel sehingga menghasilkan metabolit sekunder lebih banyak (Bariyyah, dkk., 2013). Bariyyah dkk. (2013) mengatakan bahwa randemen ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* lebih banyak (7,001 %) daripada ekstrak etil asetat (3,673 %).

Senyawa metabolit sekunder umumnya ditemukan dalam bentuk glikosida (berikatan dengan gula). Untuk memecah ikatan antara gugus gula (glikon) dan gugus bukan gula (aglikon) pada glikosida dilakukan dengan cara hidrolisis menggunakan HCl 2 N (Ardianti, dkk., 2008). Hasil penelitian Auliawan dan Bambang (2014) menunjukkan kadar fenolat total hasil hidrolisis ekstrak daun iler (*Coleus scutellarioides*) menggunakan HCl 2 M lebih besar (180,37 mg GAE/g bobot sampel kering) daripada tanpa hidrolisis (156,38 mg GAE/g bobot sampel kering). Senyawa metabolit sekunder dalam bentuk aglikon kemudian dapat diekstrak dengan proses partisi atau ekstraksi cair-cair. Desianti, dkk. (2014) melaporkan bahwa ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* setelah dihidrolisis menggunakan HCl 2 N dan dipartisi dengan petroleum eter memiliki toksisitas tertinggi yaitu 32,6710 ppm dan golongan senyawa aktif yang terdapat pada fraksi tersebut adalah golongan senyawa steroid.

Menurut Harlim (1982) steroid dapat diperoleh dari bahan alam yang berasal dari hewan, tumbuhan darat, dan tumbuhan laut. Senyawa steroid terdapat dalam setiap makhluk hidup. Steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan

disebut fitosterol, sedangkan yang ditemukan dalam jaringan hewan disebut kolesterol (Robinson, 1995). Reaksi warna yang digunakan untuk uji warna pada steroid adalah dengan reaksi Lieberman-Burchard yang menghasilkan warna hijau biru. Bariyyah, dkk. (2013) menyatakan bahwa hasil identifikasi ekstrak metanol *Chlorella sp.* mengandung senyawa steroid yang ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan (Khamidah, dkk., 2014).

Steroid dapat dipisahkan dan diidentifikasi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pemisahan senyawa golongan steroid dengan KLT dapat menggunakan beberapa variasi eluen. Eluen yang digunakan merupakan eluen yang memang khusus untuk memisahkan senyawa steroid. Menurut Marlina (2007), Identifikasi tepenoid/steroid memberikan hasil positif yang ditandai dengan timbulnya noda berwarna ungu hitam ($R_f = 0,06$), ungu merah ($R_f = 0,16$), ungu gelap ($R_f = 0,24$), ungu ($R_f = 0,37; 0,74$) dengan menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (4:1). Selain itu, Hidayah, dkk. (2015) menyatakan bahwa hasil pemisahan senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* ekstrak petroleum eter secara KLT dengan eluen n-heksana : etil asetat (8:2) diperoleh 8 spot yang dinyatakan positif senyawa steroid yang ditunjukkan dengan terbentuknya warna pink, hijau kecoklatan, ungu, hijau terang, dan ungu kebiruan setelah disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard.

Beberapa penelitian telah menyebutkan bahwa senyawa steroid memiliki kemampuan sebagai bioaktivitas. Sapar, dkk. (2004) melaporkan bahwa senyawa steroid yaitu β -sitosterol isolat kristal *Biemna triraphis* bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan nilai LC_{50} sebesar 76 ppm. Begitu pula dengan hasil penelitian Diastuti dan Warsinah (2010) yang menunjukkan bahwa

senyawa dari golongan steroid yaitu 4-metil-kolest-24-en-3-ol dan 4-metil-stigmast-22-en-3-ol ekstrak klorofom hasil partisi ekstrak etanol kulit batang *R. mucronata* memiliki sitoksisitas tertinggi terhadap sel kanker myeloma dengan IC_{50} sebesar 5 $\mu\text{g/mL}$

Uji toksisitas digunakan untuk mengetahui kemampuan racun (molekul) yang dapat menimbulkan kerusakan ketika masuk kedalam tubuh dan lokasi organ yang rentan terhadapnya (Soemirat, 2005). Adanya korelasi positif antara metode BSLT dengan uji sitotoksik menggunakan kultur sel kanker sehingga metode ini sering dimanfaatkan untuk skrining senyawa antikanker (Carballo, dkk., 2002). Selain itu, metode ini memiliki beberapa keuntungan antara lain lebih cepat, murah, mudah, tidak memerlukan kondisi aseptis dan dapat dipercaya (Meyer, *et al.*, 1982).

Suatu senyawa dapat dikatakan toksik terhadap hewan uji *Artemia salina* Leach dengan metode BSLT apabila nilai LC_{50} kurang dari 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Meyer, *et al.*, 1982). Amaliyah, dkk. (2013) melakukan uji toksisitas pada ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* masing-masing ekstrak diuji menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* menghasilkan nilai LC_{50} lebih rendah 20,516 ppm dibandingkan dengan ekstrak etil asetat 167,417 ppm. Ini menunjukkan bahwa kedua ekstrak memiliki bioaktivitas dimana ekstrak metanol memiliki tingkat ketoksikan lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etil asetat. Sementara Desianti, dkk. (2014) melakukan uji toksisitas pada fraksi etil asetat, klorofom, petroleum eter dan n-heksana mikroalga *Chlorella sp.* dan masing-masing fraksi diuji menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. Hasil

penelitian menunjukkan bahwa keempat fraksi mikroalga *Chlorella sp.* bersifat toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Namun fraksi petroleum eter memiliki nilai LC_{50} paling rendah (32, 6710 ppm). Hal ini menunjukkan bahwa hasil fraksi petroleum eter cenderung lebih bersifat toksik dibanding ketiga fraksi lainnya dan golongan senyawa aktif yang terdapat pada fraksi tersebut adalah senyawa steroid. Sehingga ada kemungkinan bahwa yang memiliki sifat toksik tersebut adalah steroid

Berdasarkan latar belakang tersebut, untuk membuktikan dugaan bahwa senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* memiliki toksisitas maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas hasil isolat senyawa steroid fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dan diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana tingkat toksisitas isolat senyawa steroid hasil KLTP fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach?
2. Bagaimana hasil identifikasi isolat senyawa steroid hasil KLTP fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan spektrofotometer FTIR?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui tingkat toksisitas isolat senyawa steroid hasil KLTP fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* terhadap larva udang *Artemia salina* Leach

2. Untuk mengetahui hasil identifikasi isolat senyawa steroid hasil KLTP fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan spektrofotometer FTIR

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai tingkat toksisitas senyawa steroid terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dan hasil identifikasinya menggunakan spektrofotometer FTIR. Serta dapat dikembangkan untuk meningkatkan ilmu pengetahuan yang nantinya dapat diaplikasikan penggunaannya untuk masyarakat.

1.5 Batasan Masalah

1. Mikroalga *Chlorella sp.* yang digunakan adalah mikroalga yang dikultivasi pada air tawar dengan media tumbuh ekstrak tauge dan diperoleh dari Laboratorium Ekologi Jurusan Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
2. Uji toksisitas yang dilakukan menggunakan senyawa steroid yang diperoleh dengan KLTP metode BSLT
3. Identifikasi senyawa steroid menggunakan spektrofotometer FTIR

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tumbuhan dalam Al-Qur'an

أَلَمْ تَرَ أَنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَسَلَكَهُ يَنْبِيعَ فِي الْأَرْضِ ثُمَّ نُخْرِجُ بِهِ زَرْعًا مُخْتَلِفًا
أَلْوَانُهُ ثُمَّ يَهْبِجُ فَتَرَاهُ مُصْفَرًّا ثُمَّ تَجْعَلُهُ حُطَمًا إِنَّ فِي ذَلِكَ لَذِكْرًا لِأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿٢١﴾

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

Ibnu 'Asyur dalam tafsir Al-Misbah menjelaskan bahwa ayat tersebut menguraikan bukti-bukti keesaan Allah melalui pemaparan aneka ciptaan-Nya, dimulai dari kuasa-Nya menurunkan hujan, menciptakan mata air, menumbuhkan tanaman, sampai dengan proses-proses yang dilaluinya hingga hancur (Shihab, 2002). Dalam tafsir Al-Maraghi dijelaskan bahwa Allah SWT menurunkan air dari langit, lalu mengalir sebagai hujan dengan air itu, maka diairilah bermacam tumbuh-tumbuhan seperti gandum, padi dan lain-lain. Kemudian mereka masak, kering menjadi kuning setelah asalnya hijau segar. Sesudah itu, menjadi hancur berderai-derai. Alangkah mirip keadaan dunia ini dengan keadaan tumbuh-tumbuhan tersebut. Dunia ini begitu cepat selesai dan segera sirna. Maka, hal itu hendaklah diambil pelajaran oleh orang-orang yang berakal (Al-Maraghi, 1980).

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



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

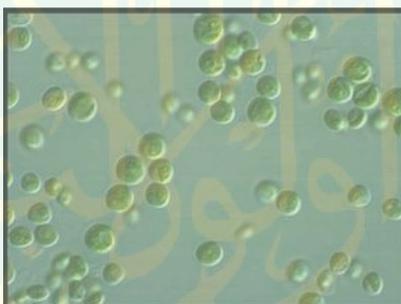
Dalam tafsir Ibnu Katsir dijelaskan bahwa Allah SWT menurunkan air dari langit, lalu mengalir sebagai hujan dengan air itu, maka ditumbuhkan berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang hijau subur (Ad-Dimasyqi, 2001). Dan dikeluarkan dari tumbuh-tumbuhan yang hijau subur itu tersebut berbagai macam tumbuhan yang serupa dan yang tidak serupa. Serupa dalam bentuk, daun dan buahnya, tetapi berbeda dalam warna buah dan rasanya, ada yang manis, masam, dan ada pula yang pahit. Semua itu menunjukkan kekuasaan Yang Membuat dan kebijaksanaan Yang Mencipta (Al-Maraghi, 1980)

Berdasarkan beberapa ayat al-Qur'an tersebut, Allah SWT menciptakan segala sesuatu di muka bumi dengan tidak sia-sia. Allah SWT menciptakan alam dan isinya seperti tumbuh-tumbuhan dengan bermacam-macam bentuk, ukuran, manfaat, warna, bau, rasa, dan lainnya yang mempunyai hikmah yang amat besar. Manusia diberikan kesempatan yang seluas-luasnya untuk mengambil manfaat dari tumbuh-tumbuhan tersebut. Salah satu tumbuhan dengan ukuran mikroskopis

yang diciptakan oleh Allah dengan manfaat didalamnya adalah mikroalga *Chlorella sp.*

2.2 Mikroalga *Chlorella sp.*

Chlorella sp. adalah mikroalga uniselular yang berwarna hijau dan berukuran mikroskopis, diameter selnya berukuran 3 – 8 mikrometer, berbentuk bulat seperti bola atau bulat telur, tidak mempunyai flagella sehingga tidak dapat bergerak aktif, dinding selnya terdiri dari selulosa dan pektin, tiap-tiap selnya terdapat satu buah inti sel dan satu kloroplas. *Chlorella sp.* merupakan alga yang kosmopolit terdapat di air payau, air laut dan air tawar (Kumar dan Singh, 1976).



Gambar 2.1 Mikroalga *Chlorella sp.* (Vashista, 1979 dalam Rostini, 2007)

Klasifikasi *Chlorella sp.* adalah sebagai berikut (Vashista, 1979 dalam Rostini, 2007):

Filum : Chlorophyta
 Kelas : Chlorophyceae
 Ordo : Chlorococcales
 Famili : Chlorellaceae
 Genus : Chlorella
 Spesies : *Chlorella sp.*

Kandungan Kimia *Chlorella sp.* adalah protein, karbohidrat, asam lemak tak jenuh, vitamin dan enzim (Kaweroe, 2008). Khamidah, dkk. (2014) menyebutkan

bahwa mikroalga *Chlorella sp.* mengandung senyawa aktif tanin dan steroid. Menurut Sukoso (2002) *Chlorella sp.* mengandung asam lemak tak jenuh omega 3, 6, dan 9, serat, vitamin, protein, dan mineral. Kandungan beta karoten 900 lebih banyak dibandingkan dengan wortel. Kandungan omega-3 mikroalga lebih banyak dibandingkan minyak ikan, biji rami, dan kedelai, yaitu 50 – 60 %. *Chlorella sp.* menghasilkan suatu antibiotik yang disebut *Chlorellin*, yaitu suatu zat yang dapat melawan penyakit-penyakit yang disebabkan oleh bakteri (Vashista, 1979 dalam Rostini, 2007).

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

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

Menurut Dewi dan Gultom (2009), kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dipengaruhi oleh beberapa faktor lingkungan, antara lain: suhu, Intensitas cahaya, pH, dan unsur hara. Bold dan Wynne (1985) dalam Prabowo (2009) menyatakan bahwa salah satu faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* adalah medium. Medium merupakan tempat hidup bagi kultur *Chlorella* yang pemilihannya ditentukan pada jenis *Chlorella* yang akan dibudidayakan.

Suhu merupakan salah satu faktor terpenting dalam kultur mikroalga, dimana suhu harus terjaga agar mikroalga dapat tumbuh dengan optimal. Dari hasil penelitian Maharsyah, dkk. (2013) didapatkan suhu rata-rata berkisar antara 25 °C – 27 °C. Proses fotosintesis *Chlorella sp.* membutuhkan intensitas cahaya rata-rata 4000 – 3000 lux (Dewi dan Gultom, 2009). Dalam penelitian Prihartini, dkk. (2005), kultur mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan pencahayaan 2 buah lampu TL 36 watt (intensitas cahaya 1000–4000 lux) dan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap.

Prabowo (2009) melaporkan nilai pH merupakan faktor yang menentukan kemampuan biologis mikroalga dalam pemanfaatan unsur hara dalam medium kultur mikroalga. Terlalu tinggi nilai pH akan sangat mempengaruhi aktifitas fotosintesis mikroalga. Berdasarkan hasil penelitian Prihartini, dkk. (2005) nilai derajat keasaman (pH) awal medium ekstrak tauge (MET) berpengaruh terhadap kerapatan sel *Chlorella sp.* adalah pada awal pH 7 yang dicapai pada pengamatan hari ke-10 kultivasi yang ditunjukkan dengan jumlah kerapatan sel tertinggi (5.677.625 sel/mL) sedangkan kerapatan sel terendah (3.374.100 sel/mL) pada awal pH 5.

Unsur-unsur yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroalga terdiri dari unsur mikro dan unsur makro. Makronutrien yaitu unsur-unsur yang dibutuhkan dalam jumlah besar, meliputi C, H, O, N, P, K, S, Si, Ca dan Cl. Mikronutrien adalah unsur-unsur yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit dan merupakan koenzim meliputi Mn, Fe, Zn, Cu dan Mg (Dewi dan Gultom, 2009).

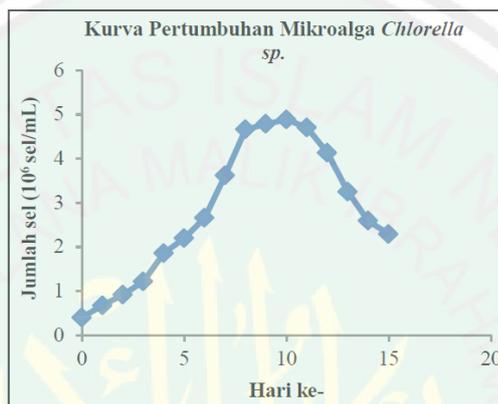
Medium dalam kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium ekstrak tauge. Ekstrak tauge merupakan salah satu

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

Vitamin yang ditemukan dalam tauge adalah vitamin C, tiamin, riboflavin, niasin, asam pantotenik, vitamin B₆, folat, kolin, β -karoten, vitamin A, vitamin E (α -tokoferol) dan vitamin K sebagai *growth factor* dalam pertumbuhan alga. Mineral yang ditemukan dalam tauge adalah kalsium (Ca), besi (Fe), magnesium (Mg), fosfor (P), potasium (K), sodium (Na), Zink (Zn), tembaga (Cu), mangan (Mn), dan selenium (Se). Asam amino esensial bermakna yang terkandung dalam tauge, antara lain: triptofan, treonin, fenilalanin, metionin, lisin, leusin, isoleusin, dan valin (Maulana, 2010)

Wulandari, dkk. (2010) melakukan penelitian dengan membandingkan penggunaan MET 4% dengan medium air laut (MAL) dan medium *Guillard* (MG). Hasil penelitian menunjukkan pada hari ke-10 kultivasi, MAL menghasilkan kelimpahan sel mikroalga *Nitzschia sp.* antara 0 – 10 sel, MG menghasilkan kelimpahan sel antara 11 – 20 sel, sedangkan MET 4% menghasilkan kelimpahan sel antara 21 – tak terhingga. Hasil penelitian Prihartini, dkk. (2007) menunjukkan bahwa konsentrasi MET 4% (v/v) merupakan konsentrasi optimum menghasilkan kerapatan sel tertinggi mikroalga *Scenedesmus* yang dikultivasi selama 10 hari yaitu 3.981.071 sel/mL.

Khamidah, dkk. (2013) menyatakan selama proses kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* melalui empat fase pertumbuhan yaitu fase log atau eksponensial, fase penurunan laju pertumbuhan, fase stasioner dan fase kematian. Berikut kurva pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* selama 15 hari dalam MET 4% :



Gambar 2.2 Kurva pertumbuhan mikroalga *Chlorella sp.* (Fasya, dkk.,2013)

Berdasarkan gambar 2.2 fase eksponensial dimulai pada hari ke-0 sampai hari ke-8 yang ditandai dengan jumlah sel *Chlorella sp.* yang terus meningkat. Fase $\frac{1}{2}$ eksponensial terjadi pada hari ke-4 dengan kelimpahan sel 1.856.000 sel/mL dan $\frac{3}{4}$ eksponensial terjadi pada hari ke-6 dengan kelimpahan sel 2.656.000 sel/mL. Fase penurunan laju pertumbuhan merupakan fase dimana kelimpahan sel *Chlorella sp.* tidak mengalami peningkatan yang cukup signifikan. Fase ini terjadi pada hari ke-8 yakni peningkatan sel hanya sebesar 128.000 sel/mL. Fase stasioner terjadi pada hari ke-8 sampai pada hari ke-11 yang ditandai dengan laju pertumbuhan yang cenderung konstan. Hal ini mengindikasikan sel *Chlorella sp.* tidak mengalami pembelahan sel secara signifikan akibat kurang nutrisi yang tersedia. Fase awal stasioner terjadi pada hari ke-8 dengan kelimpahan sel 4.656.000 sel/mL. kelimpahan sel pada hari ke-10 adalah

4.880.000 sel/mL sehingga pada hari ke-10 merupakan fase stasioner. Kemudian pada hari ke-11 kelimpahan sel cenderung berkurang yang disebabkan kurangnya ketersediaan nutrisi yaitu sebesar 4.704.000 sel/mL sehingga pada hari ke-11 sudah memasuki fase akhir stasioner atau fase awal kematian.

2.4 Ekstraksi Senyawa Aktif

Ekstraksi merupakan peristiwa berpindahannya massa zat aktif yang semula berada di dalam sel, ditarik oleh pelarut tertentu sehingga terjadi larutan zat aktif dalam larutan tersebut (Lenny, 2006). Adapun beberapa faktor yang berpengaruh terhadap proses ekstraksi adalah lama ekstraksi, suhu, dan jenis pelarut yang digunakan. Hal yang perlu diperhatikan dalam pemilihan jenis pelarut adalah daya melarutkan, titik didih, sifat toksik, mudah tidaknya terbakar, dan sifat korosif terhadap peralatan ekstraksi (Karger, dkk., 1973)

Prinsip ekstraksi adalah zat yang akan diekstrak hanya dapat larut dalam pelarut yang digunakan, sedangkan zat lainnya tidak akan larut. Oleh karena itu, pemilihan pelarut yang sesuai akan sangat penting. Gaya yang bekerja dalam proses ekstraksi adalah perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan cairan ekstraksi di luar sel. Bahan pelarut mengalir ke dalam ruang sel sehingga menyebabkan protoplasma membengkak dan menyebabkan kandungan sel akan berdifusi ke luar sel (Achmadi, 1992).

Dalam metode ekstraksi bahan alam dikenal suatu metode maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman sampel pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi bahan alam karena dengan perendaman sampel akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel sehingga

metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa dapat sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan (Lenny, 2006). Penekanan utama pada maserasi adalah tersedianya waktu kontak yang cukup antara pelarut dan jaringan yang diekstraksi (Guenther, 1987)

Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam kedalam pelarut tersebut (Soebagio, 2005). Kepolaran suatu pelarut menunjukkan tingkat kelarutannya terhadap suatu bahan. Suatu bahan yang lebih larut dalam air disebut memiliki sifat yang polar dan sebaliknya apabila lebih larut dalam pelarut organik disebut nonpolar. Tingkat kepolaran ditunjukkan oleh nilai konstanta dielektrik. Semakin besar konstanta dielektrikum suatu pelarut disebut semakin polar (Sudarmadji, dkk., 2003). Konstanta dielektrik beberapa pelarut organik ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Pelarut organik dan sifat fisiknya

Pelarut	Rumus kimia	Titik didih (°C)	Konstanta dielektrikum	Polaritas*	densitas (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	$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-CH}_3$	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

Sumber : Nur dan Adijuwana, 1989

Suatu pelarut harus memiliki titik didih yang cukup rendah sehingga pelarut dapat mudah diuapkan tanpa menggunakan suhu yang tinggi, bersifat inert, dapat melarutkan senyawaan yang sesuai kepolaranya, serta memiliki harga yang terjangkau (Guenther, 1987).

Amaliyah, dkk. (2013) melakukan penelitian untuk menguji toksisitas mikroalga *Chlorella sp.* dengan mengekstrak biomassa *Chlorella sp.* menggunakan variasi pelarut yaitu metanol, etil asetat, dan n-heksana. Hasil penelitian menunjukkan randemen ekstrak tertinggi dihasilkan oleh ekstrak metanol yaitu sebesar 7,001 %. Sedangkan randemen ekstrak etil asetat dan n-heksana secara berturut-turut sebesar 3,673 % dan 0,004 %. Begitu pula Yudha (2008) dalam penelitiannya mengekstraksi mikroalga *Dunaliella sp.* menggunakan variasi pelarut metanol, etil asetat dan n-heksana. Hasil penelitian menunjukkan randemen tertinggi diperoleh dari ekstrak metanol dengan hasil sebesar 2,59 %. Sedangkan randemen ekstrak etil asetat dan n-heksan berturut-turut diperoleh randemen sebesar 1,94 % dan 1,29 %.

2.5 Hidrolisis dan Partisi

Senyawa organik dalam tanaman umumnya berbentuk glikosida, yakni senyawa yang terjadi atas gabungan bagian gula (glikon) yang bersifat polar dan bagian bukan gula (aglikon) yang dapat bersifat polar, semipolar maupun non polar. Senyawa metabolit sekunder tergolong dalam senyawa aglikon. Adanya perubahan struktur ke bentuk glikosida, menyebabkan suatu senyawa mengalami perubahan sifat fisika, kimia dan aktivitas biologi yang berbeda dimana senyawa tersebut akan bersifat lebih polar sehingga diharapkan bila masuk ke dalam tubuh secara per-oral senyawa tersebut akan lebih cepat diabsorpsi. Jika dalam suatu

senyawa terdapat banyak ikatan glikosidanya maka senyawa tersebut cenderung bersifat lebih polar (Saifudin, dkk., 2006).

Pemutusan ikatan glikosida dapat dilakukan dengan reaksi hidrolisis yakni memanaskan larutan dengan air dan sedikit asam. Hidrolisis adalah suatu reaksi antara suatu senyawa dengan air agar senyawa tersebut pecah atau terurai. Reaksi hidrolisis yang menggunakan air berlangsung sangat lambat sehingga memerlukan bantuan katalisator (seperti asam) (Saifudin, dkk., 2006).

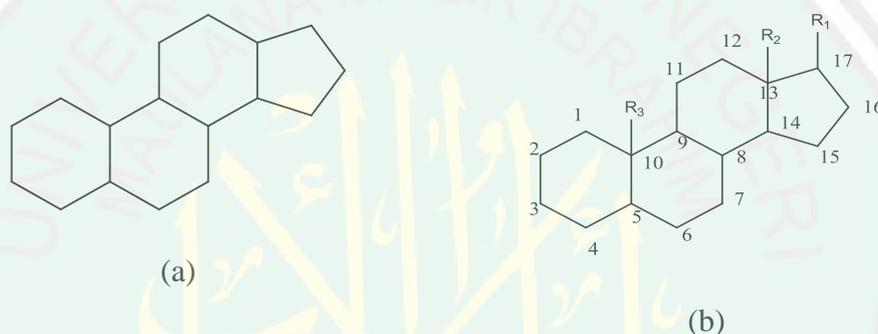
Handoko (2006) menyebutkan bahwa pemilihan asam kuat seperti HCl sebagai katalis disebabkan karena asam kuat akan lebih mudah melepas proton (H^+) secara sempurna didalam air, sedangkan asam lemah relatif lebih sukar sehingga asam lemah memiliki kecenderungan terionisasi sebagian dalam pelepasan ion H^+ . Semakin banyak proton yang terionisasi dalam air, maka semakin kuat peranan proton dalam pemutusan ikatan glikosida.

Anggraeni, dkk. (2014) melakukan penelitian uji antioksidan ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* yang dipartisi secara bertingkat menggunakan pelarut berturut-turut yaitu n-heksana, petroleum eter, klorofom, dan etil asetat. Hasil penelitian menunjukkan randemen masing-masing fraksi hasil partisi secara berturut-turut yaitu 45,6132 %; 8,1854 %; 7,5573 %; dan 7,4377 %. Sehingga dapat dikatakan bahwa pelarut n-heksan memiliki randemen ekstrak tertinggi. Namun, ekstrak yang memiliki kemampuan antioksidan terbesar pada konsentrasi 30 ppm adalah ekstrak petroleum eter. Penelitian selanjutnya oleh Hidayah, dkk. (2015) melaporkan hasil partisi ekstrak metanol hasil hidrolisis HCl 2 N mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan pelarut petroleum eter menghasilkan randemen ekstrak lebih tinggi (78,0548 %) daripada hasil penelitian Imamah, dkk.

(2015) yang melakukan partisi mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan pelarut etil asetat (49,32 %).

2.6 Senyawa Steroid

Steroid adalah kelompok senyawa bahan alam yang kebanyakan strukturnya terdiri atas 17 atom karbon dengan membentuk struktur dasar 1,2-siklopentenoperhidrofenantren (Kristanti, dkk., 2008).



Gambar 2.3. 1,2-siklopentenoperhidrofenantren (a), kerangka dasar karbon steroid dan sistem penomoran (b) (Kristanti, dkk., 2008)

Steroid memiliki inti dengan 3 cincin sikloheksana terpadu dan 1 cincin siklopentana yang tergabung pada ujung cincin sikloheksana tersebut (Poedjiadi, 1994). Steroid tersusun dari isopren-isopren dan rantai panjang hidrokarbon yang menyebabkan sifatnya non-polar. Beberapa senyawaan steroid mengandung gugus -OH yang sering disebut dengan sterol, sehingga sifatnya yang cenderung lebih polar. Beberapa turunan steroid yang penting ialah steroid alkohol atau sterol. Steroid lain antara lain asam-asam empedu, hormon seks (androgen dan estrogen) dan hormon kortikosteroid. Senyawa steroid terdapat dalam setiap makhluk hidup. Steroid yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan disebut fitosterol, sedangkan yang ditemukan dalam jaringan hewan disebut kolesterol. Beberapa senyawa ini

jika terdapat dalam tumbuhan akan dapat berperan menjadi pelindung. Senyawa ini tidak hanya bekerja menolak beberapa serangga tetapi juga menarik beberapa serangga lain (Robinson, 1995). Struktur senyawa steroid ditunjukkan pada Gambar 2.3.

2.7 Pemisahan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

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

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 yang campuran yang ditempatkan dalam bejana pengembang (Fitrianti, 2011). Terbentuknya noda/bercak pada plat dapat dilakukan dengan menambahkan indikator berfluorosensi berupa lampu UV. Jika senyawa pada bercak yang akan ditampakkan mengandung ikatan rangkap terkonjugasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi kemudian kembali ke keadaan semula dengan melepaskan energi (Gandjar dan Rohman, 2007).

Bercak pemisahan pada plat KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna. Untuk menentukannya dapat dilakukan secara kimia, fisika, maupun biologi. Cara kimia yang biasa digunakan adalah dengan mereaksikan bercak

dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan sehingga bercak menjadi jelas. Mengamati lempeng dibawah lampu ultraviolet yang dipasang pada panjang gelombang emisi 254 nm atau 366 nm untuk menampakkan solut sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluoresensi terang pada dasar yang berfluoresensi seragam (Gandjar dan Rohman, 2007).

Marliana (2007) dalam penelitiannya menyatakan bahwa Identifikasi tepenoid/steroid memberikan hasil positif setelah disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard yang ditandai dengan timbulnya noda berwarna ungu hitam ($R_f = 0,06$), ungu merah ($R_f = 0,16$), ungu gelap ($R_f = 0,24$), ungu ($R_f = 0,37$; $0,74$) dengan menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (4:1). Hidayah, dkk. (2015) melakukan pemisahan senyawa steroid pada mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan KLTA dengan eluen n-heksana : etil asetat dengan variasi perbandingan konsentrasi yaitu 7:3, 7.5:2.5, 8:2, 8.5:1.5, dan 9:1. Hasil penelitian menunjukkan jumlah spot yang diperoleh berturut-turut adalah 10 spot, 11 spot, 13 spot, 8 spot, dan 8 spot. Sehingga dari penelitian ini diketahui eluen terbaik adalah eluen n-heksan:etil asetat dengan perbandingan 8:2. Dari ke-13 spot tersebut diperoleh 8 spot yang tergolong senyawa steroid setelah disemprot dengan reagen Lieberman-Burchard yaitu diantaranya berwarna pink ($R_f 0,06$), hijau kecoklatan ($R_f 0,11$), ungu ($0,14$), pink ($0,16$), pink ($0,25$), ungu ($0,74$), ungu kebiruan ($0,80$) dan hijau terang ($0,91$).

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

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

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

2.8 Uji Toksisitas Senyawa Aktif terhadap Larva Udang *Artemia salina* L.

2.8.1 Morfologi Larva Udang *Artemia salina* Leach

Artemia salina Leach atau *Brine Shrimp* merupakan zooplankton dan tergolong udang primitif. Nama *Artemia* diberikan untuk pertama kali oleh Shlosscer yang menemukannya di suatu danau asin pada tahun 1755. *Artemia* semula diberi nama *Cancer salina* oleh Linnaeus pada tahun 1778 melengkapi jasad renik ini menjadi *Artemia salina* Leach (Harefa, 2003). Klasifikasi *Artemia salina* dalam sistematika hewan adalah sebagai berikut (Bougis, 1979 dalam Fathiyawati, 2008):



Gambar 2.4 Larva udang *Artemia salina* Leach (Sriwahyuni dan Hayati, 2010)

Kingdom : Animal
Filum : Arthropoda
Kelas : Crustacea
Sub kelas : Branchiopoda
Ordo : Anostraca
Famili : Artemilidae
Marga : Artemia
Jenis : *Artemia salina* Leach

Artemia salina L. termasuk crustaceae yang ukurannya mencapai 1–2 cm. Dapat ditemukan pada air yang salinitasnya tinggi, seperti danau asin, air laut, tidak dapat hidup di air tawar. Daur hidup *Artemia salina* L. memerlukan waktu 25 hari (Kristanti, dkk., 2008). Penetasan telur *Artemia salina* L. yang baik perlu memperhatikan beberapa faktor yaitu: hidrasi dari kista-kista, aerasi, penyinaran, suhu, derajat keasaman (pH), dan kepadatan telur dalam media penetasan (Hendrawati, 2009).

Telur *Artemia salina* L. dapat bertahan dalam kondisi kering dan dapat disimpan cukup lama. Telur ini bila diberi air laut pada suhu 23 °C maka ia akan menetes dalam 1 – 2 hari dan dapat langsung digunakan dalam uji toksisitas. Uji toksisitas pada hewan uji dimaksudkan untuk ekstrapolasi hasil terhadap manusia untuk mencari dosis yang aman. Parameter yang digunakan dalam uji ini adalah efek toksikan (respon) terhadap hewan uji. Respon tersebut dapat dilihat hanya berupa immobilisasi ke dalam tiap tabung berisi konsentrasi toksikan yang berbeda dimasukkan 10 ekor hewan uji, disertai dengan tabung kontrol. Immobilisasi ini sudah dianggap sebagai kematian untuk hewan uji seperti *Artemia salina* Leach. Nilai LC₅₀ diperoleh dengan ekstrapolasi kurva (Soemirat, 2005).

Penetasan telur dilakukan dengan memasukkan telur *Artemia salina* Leach ke dalam air laut sambil diaerasi untuk mengontakkan dengan udara selama 4 jam.

Proses penetasan *Artemia salina* Leach ada beberapa tahapan yaitu tahap hidrasi, pecahnya cangkang dan tahap payung atau tahap pengeluaran. Tahap hidrasi terjadi penyerapan air sehingga telur yang diawetkan dalam bentuk kering tersebut akan menjadi bulat dan aktif bermetabolisme. Tahap selanjutnya yaitu tahap pecahnya cangkang yang disusul dengan tahap pecahnya payung yang terjadi beberapa saat sebelum naupli (larva) keluar dari cangkang (Isnansyio dan Kurniastuty, 1995 dalam Farihah, 2008).

2.8.2 Uji Toksisitas terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach dengan Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)

Toksisitas (toxicity) merupakan ukuran relatif derajat racun antara satu bahan kimia terhadap bahan kimia lain pada organisme yang sama kemampuan racun (molekul) untuk menimbulkan kerusakan apabila masuk kedalam tubuh dan lokasi organ yang rentan terhadapnya (Soemirat, 2005). Cahyono (2004) menyatakan bahwa toksisitas adalah kemampuan suatu zat untuk menimbulkan kerusakan pada organisme hidup.

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

Tabel 2.2 Kategori toksisitas bahan

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

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

Pengujian dilakukan pada ekstrak sampel dengan berbagai konsentrasi dan kontrol. Bila dalam larutan kontrol terdapat larva yang mati, maka jumlah larva udang sampel adalah jumlah larva udang pada tiap-tiap konsentrasi dikurangi jumlah larva pada larutan kontrol (Mc. Lughin, 1991).

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{Tes-kontrol}}{\text{jumlah larva uji (10 ekor)}} \times 100\% \dots\dots\dots (2.2)$$

Beberapa kelebihan dari uji bioaktivitas dengan *Brim Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva udang adalah cepat waktu ujinya sederhana (tanpa teknik aseptik), murah (tidak serum hewan), jumlah organisme banyak, memenuhi kebutuhan validasi statistik dengan sedikit sampel (Meyer, *et al.*, 1982). Mekanisme kematian larva berhubungan dengan fungsi-fungsi senyawa-senyawa yang terkandung dalam selnya yang dapat menghambat daya makan larva. Cara kerja senyawa-senyawa tersebut adalah dengan bertindak sebagai *stomach*

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

Amaliyah, dkk. (2013) melakukan uji toksisitas ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat mikroalga *Chlorella sp.* dengan menggunakan metode BSLT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua ekstrak bersifat toksisitas terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan nilai LC_{50} 20,516 ppm (ekstrak metanol) dan 167,417 ppm (ekstrak etil asetat). Desianti, dkk. (2014) melaporkan bahwa uji toksisitas fraksi etil asetat, klorofom, petroleum eter dan n-heksana hasil ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* dengan menggunakan metode BSLT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa keempat fraksi bersifat toksisitas larva udang *Artemia salina* Leach dengan nilai LC_{50} 43,3044 ppm (fraksi etil asetat); 32,9023 ppm (fraksi kloroform); 32,6710 ppm (fraksi petroleum eter) dan 34,2133 ppm (fraksi n-heksana). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak bersifat toksik terhadap *Artemia salina* Leach dan berpotensi antikanker.

Uji toksisitas dilakukan terhadap 10 ekor larva udang *Artemia salina* L. yang dimasukkan menggunakan pipet tetes kedalam larutan sampel uji dan ditambahkan air laut sampai volume 5 mL. pengulangan uji toksisitas dari tiap-tiap konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan (Indrayani, dkk., 2006) (Rahayu, dkk., 2013) (Sapar, dkk., 2004).

2.9 Analisis Probit

Salah satu metode statistika yang digunakan untuk menentukan LC_{50} adalah dengan menggunakan analisis probit menggunakan MINITAB. LC_{50} didesain untuk menggambarkan respon yang mematikan komponen dalam populasi dari suatu organisme terhadap senyawa kimia dalam konsentrasi yang bervariasi. Hubungan yang ditunjukkan berbentuk sigmoid. Analisis probit berfungsi untuk mengubah hubungan yang sigmoid menjadi linear (Kanwar, 2007). Keuntungan MINITAB adalah dapat digunakan dalam pengolahan data statistik untuk tujuan sosial maupun teknik. Apabila di bandingkan dengan program statistik lainnya, program MINITAB telah diakui sebagai program statistika yang sangat kuat dengan tingkat akurasi taksiran statistik yang tinggi (95%) (Iriawan dan Astuti, 2006).

2.10 Spektrofotometer FTIR

Saleh (2009) melaporkan hasil penelitiannya bahwa spektrum IR senyawa steroid hasil isolasi dari tumbuhan sidawayah (*Woodfordia floribunda Salisb.*) memberikan informasi pita serapan karakteristik seperti OH pada daerah bilangan gelombang $3365,6 \text{ cm}^{-1}$ yang diperkuat oleh serapan $1049,2 \text{ cm}^{-1}$. Pita serapan ini memberikan gambaran bahwa senyawa isolat merupakan suatu senyawa siklik (steroid) yang mengandung gugus OH. Serapan $2850,6 - 2933,5 \text{ cm}^{-1}$ merupakan serapan ulur CH dari CH_2 dan CH_3 . Serapan $1652,9 \text{ cm}^{-1}$ merupakan serapan karakteristik untuk C=C non konjugasi, serapan $1375,2 - 1458,1 \text{ cm}^{-1}$ merupakan serapan tekukan CH dari CH_3 dan CH_2 .

Imamah, dkk. (2015) melaporkan bahwa senyawa steroid dari mikroalga *Chlorella sp.* hasil pemisahan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dua

dimensi menunjukkan gugus fungsi karakteristi seperti –OH pada daerah 3450,61 cm^{-1} yang melebar. Pita serapan 2926,28 cm^{-1} dan 2857,60 cm^{-1} merupakan serapan rentangan –CH alifatik. Hal yang mengindikasikan adanya gugus metil (CH_3) dan metilen (CH_2) (Socrates, 1994). 1465,93 cm^{-1} dan 1387,09 cm^{-1} merupakan serapan tekukan C-H yang mengindikasikan adanya gugus gem dimetil yang lazim ditemukan pada senyawa terpenoid dan steroid (Astuti, 2014). Pita serapan 752,22 cm^{-1} dan 670,59 cm^{-1} merupakan serapan dengan intensitas lemah dari rentangan C-H pada gugus alkena (Skoog, 1998). 1638,98 cm^{-1} merupakan serapan C=C, 1737,22 cm^{-1} merupakan serapan C=O. 1254,92 cm^{-1} merupakan serapan C-O dan 1164,47 cm^{-1} dan 1064,03 cm^{-1} merupakan serapan C-O tersier dan C-O primer.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Pelaksanaan Penelitian

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

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *heater*, neraca analitik, cawan penguap, *hotplate*, gelas arloji, corong pisah, statif, desikator, lemari asam, oven, kaca arloji, cawan petri, wadah penetasan, aerator, lampu penetasan, pengaduk gelas, spatula, lampu TL 36 watt, *shaker incubator*, pipet tetes, pipet ukur 1 mL, pipet ukur 5 mL, pipet ukur 10 mL, pipet mikro, labu ukur 10 mL, penjepit kayu, *beaker glass* 100 mL, *beaker glass* 500 mL, bola hisap, erlenmeyer 250 mL, erlenmeyer 1000 mL, erlenmeyer 500 mL, gelas ukur 100 mL, gelas ukur 500 mL, saringan, corong kaca, corong *buchner*, *rotary evaporator vacuum*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, aluminium foil, kertas saring, botol vial, gelas, pinset, lampu UV, seperangkat KLTP dan seperangkat instrumen spektrofotometer FTIR.

3.2.2 Bahan

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

sebagai bahan medium ekstrak taugé (MET), dan hewan uji *Artemia salina* Leach yang berasal dari telur *Artemia salina* Leach.

Bahan-bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah metanol p.a, petroleum eter, n-heksana, etil asetat, ragi roti, natrium bikarbonat, HCl 37%, plat KLT G₆₀F₂₅₄, dimetil sulfoksida (DMSO), reagen Liebermann-Buchard (asam asetat anhidrat, etanol absolut, H₂SO₄ pekat) dan aquades.

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini dilakukan melalui pengujian eksperimental di laboratorium. Percobaan diawali dengan dilakukan kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dalam medium ekstrak taugé (MET) 4 % selama 10 hari yaitu pada akhir fase stasioner dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap. Hasil kultivasi kemudian dipanen dengan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm sehingga dihasilkan biomassa *Chlorella sp.* dan filtrat. Biomassa *Chlorella sp.* dikeringanginkan pada suhu ruang (25 – 30 °C) selama ± 48 jam. Selanjutnya dilakukan analisis kadar air terhadap biomassa *Chlorella sp.* sesudah dikeringanginkan. Biomassa *Chlorella sp.* yang diperoleh diekstraksi maserasi dengan pelarut metanol p.a selama 24 jam dengan perbandingan 1:5 (b/v) menggunakan shaker dengan kecepatan 120 rpm sehingga didapatkan ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.*.

Ekstrak metanol *Chlorella sp.* dihidrolisis dengan HCl 2 N dengan perbandingan 1:2 (b/v) dan distirrer menggunakan *hotplate stirrer* kemudian ditambahkan natrium bikarbonat hingga pH-nya netral. Ekstrak hasil hidrolisis dipartisi dengan petroleum eter. Diuji fitokimia kandungan senyawa steroid dalam *Chlorella sp.* dengan reagen Liebermann-Burchard. Dipisahkan senyawa steroid

dengan KLTP menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (4 :1) (Marliana,2007). Isolat yang dinyatakan positif steroid diuji toksisitasnya pada variasi konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm. Perlakuan ini dilakukan 3 kali pengulangan dan dihitung nilai LC₅₀ dengan menggunakan analisis probit dengan MINITAB 17 dengan tingkat kepercayaan 95%. Diidentifikasi senyawa steroid menggunakan spektrofotometer FTIR.

3.4 Tahapan Penelitian

1. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* :
 - a. Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4%
 - b. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dalam MET 4%
2. Pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella sp.*
3. Preparasi sampel biomassa mikroalga *Chlorella sp.*
4. Analisis kadar air biomassa mikroalga *Chlorella sp.*
5. Ekstraksi komponen aktif biomassa mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan pelarut metanol p.a
6. Hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan HCl 2 N
7. Partisi ekstrak metanol hasil hidrolisis mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan pelarut petroleum eter
8. Uji fitokimia golongan senyawa steroid dalam mikroalga *Chlorella sp.*
9. Pemisahan senyawa steroid menggunakan KLTP dengan eluen n-heksana : etil asetat (4 :1)
10. Uji toksisitas menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach.
11. Identifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR
12. Analisis data

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

3.5.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %

Medium ekstrak tauge (MET) dibuat dengan cara melarutkan ekstrak tauge kedalam aquades dengan konsentrasi 4 % (Prihartini, dkk., 2005). Ekstrak tauge dibuat dengan cara merebus 100 gram tauge kedalam 500 mL aquades yang mendidih sampai tauge matang.

3.5.1.2 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.* dalam MET 4%

Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan mengambil 150 mL isolat *Chlorella sp.* kemudian diinokulasikan kedalam 900 mL ekstrak tauge 4 % (36 mL ekstrak tauge dalam 864 mL aquades) dalam erlenmeyer 1000 mL. Ditempatkan pada rak yang telah dilengkapi dengan pencahayaan menggunakan lampu TL 36 Watt (intensitas cahaya 1000 – 4000 lux) pada suhu ruang. Selanjutnya kultur *Chlorella sp.* tersebut diinkubasi selama 10 hari dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap (Prihartini, dkk., 2005).

3.5.1.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan pada hari ke-10 kultivasi dengan cara media kultur *Chlorella sp.* disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Biomassa *Chlorella sp.* yang dihasilkan kemudian dipisahkan dari cairannya selanjutnya dilakukan penimbangan dan dicatat sebagai berat basah (Desianti, dkk., 2014).

3.5.2 Preparasi Sampel Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Preparasi sampel dilakukan dengan cara biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dikering-anginkan pada suhu ruang (25 – 30 °C) selama \pm 2 hari kemudian

dikerok dan ditimbang. Hasil yang diperoleh selanjutnya dicatat sebagai berat kering mikroalga *Chlorella sp.* (Desianti, dkk., 2014).

3.5.3 Analisis Kadar Air Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Analisis kadar air dilakukan pada sampel kering mikroalga *Chlorella sp.* dengan cara sampel ditimbang sebanyak 0,5 gram, dimasukkan dalam cawan yang sebelumnya telah dihitung berat konstannya, kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama 1 jam. Selanjutnya sampel didinginkan dalam desikator, ditimbang, kemudian dioven kembali. Perlakuan ini diulangi sampai diperoleh berat konstan. Kadar air sampel biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dihitung menggunakan rumus berikut (AOAC, 1984):

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

Keterangan:

a = berat cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat cawan + sampel setelah dikeringkan

3.5.4 Ekstraksi Komponen Aktif

Ekstraksi maserasi komponen aktif mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan cara menimbang 30 gram mikroalga *Chlorella sp.* kering, dimasukkan dalam erlenmeyer kemudian direndam dengan pelarut metanol p.a. sebanyak 150 mL. Ekstraksi dilakukan selama 24 jam dengan pengocokan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm pada suhu kamar selama ± 5 jam. Kemudian disaring dengan corong *buchner* menghasilkan residu dan filtrat. Bagian residu dimaserasi

kembali hingga 5 kali proses maserasi. Filtrat yang diperoleh digabung menjadi satu kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* hingga diperoleh ekstrak pekat metanol mikroalga *Chlorella sp.* dihitung randemennya dengan menggunakan persamaan (Khopkar, 2003):

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

3.5.5 Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

Hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan cara menambahkan 5 mL HCl 2 N dalam 2,5 gram ekstrak pekat metanol dan distirrer dengan *hot plate stirrer* selama 1 jam pada suhu ruang. Selanjutnya dinetralkan pH-nya dengan menambahkan natrium bikarbonat.

3.5.6 Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

Partisi ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* hasil hidrolisis dilakukan dengan menggunakan pelarut petroleum eter. Ditambahkan 12,5 mL pelarut petroleum eter ke dalam ekstrak kemudian dikocok dan didiamkan maka terbentuk dua lapisan yaitu lapisan organik dan lapisan air. Kedua lapisan tersebut kemudian dipisahkan. Lapisan air dipartisi kembali sampai 5 kali proses partisi. Ekstrak hasil partisi dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya dengan dialiri gas N₂. Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian ditimbang dan dihitung randemennya.

3.5.7 Uji Fitokimia Senyawa Steroid

Identifikasi golongan senyawa steroid dilakukan dengan cara dimasukkan ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* dalam tabung reaksi, kemudian dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform dan ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Lalu

ditambahkan 1 – 2 mL H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung. Terbentuknya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid (Hayati dan Nur, 2010).

3.5.8 Pemisahan Senyawa Steroid Menggunakan KLT Preparatif

Pemisahan senyawa steroid dilakukan pada ekstrak hasil partisi fraksi petroleum eter menggunakan KLTP. Pemisahan dengan KLTP menggunakan plat silika G₆₀F₂₅₄ berukuran 10 x 20 cm yang telah diaktivasi dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama 30 menit. Pemisahan senyawa steroid dilakukan dengan cara ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* ditotolkan pada jarak ± 1 cm dari tepi bawah plat dengan pipa kapiler sebanyak 7 kali total yang diselingi dengan pengeringangan. Kemudian dielusi menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (4 :1) (Hanif, 2015). Noda/bercak hasil pemisahan selanjutnya dideteksi dengan menyemprotkan Lieberman-Burchard (LB) dan diamati dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Desianti, dkk., 2014). Noda yang didapatkan diamati dan dikerok noda yang diduga steroid kemudian dilarutkan dengan petroleum eter dilanjutkan pelarut etil asetat. Kemudian campuran divortex dan disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 3500 rpm untuk mengendapkan silikanya. Supernatan yang didapatkan kemudian diuapkan pelarutnya sehingga diperoleh isolat pekat berdasarkan harga RF dari senyawa steroid.

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

3.5.9.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina* Leach

Penetasan larva udang *Artemia salina* Leach dilakukan dengan cara dimasukkan 250 mL air laut dalam wadah penetasan, kemudian dimasukkan 2,5 mg telur *Artemia salina* Leach lalu diaerasi dan diberi pencahayaan. Telur akan menetas dalam waktu \pm 24 jam dan siap untuk digunakan sebagai target uji toksisitas pada umur 48 jam (Halimah, 2010).

3.5.9.2 Uji Toksisitas

Uji toksisitas dilakukan pada isolat senyawa steroid hasil KLT preparatif dengan variasi konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm. Masing-masing konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Kontrol yang digunakan adalah kontrol pelarut dan kontrol DMSO. Dibuat larutan stok 760 ppm pada isolat steroid dengan cara ditimbang 3,8 mg isolat steroid dan dilarutkan dengan menggunakan pelarut yang sesuai sampai 5 mL.

Dipipet larutan stok 760 ppm sebanyak 32,9 μ L, 65,8 μ L, 98,7 μ L, 131,6 μ L, 164,5 μ L, dan 197,4 μ L. Kemudian dimasukkan kedalam botol vial dan pelarutnya diuapkan hingga kering. Ditambahkan 50 μ L dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti (3 mg/ 5mL air laut), dan 2 mL air laut kemudian dikocok sampai ekstrak dapat larut dalam air laut. Dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L. dan ditambahkan air laut sampai volume 5 mL. Vial-vial diletakkan dibawah lampu pijar selama 24 jam dan dihitung jumlah larva *Artemia salina* L. yang mati. Selanjutnya dihitung persentase larva *Artemia salina* L. yang

mati setelah 24 jam, dibandingkan dengan kontrol dan hasilnya dianalisis untuk menentukan nilai LC_{50} .

Kontrol yang digunakan dalam penelitian ini ada 2, yaitu kontrol DMSO dan kontrol pelarut. Kontrol DMSO dibuat dengan cara dimasukkan 50 μ L dimetil sulfoksida, setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut kedalam vial dan dikocok. Kemudian dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L. dan ditambahkan air laut sampai volume 5 mL. Kontrol pelarut dibuat dengan 50 μ L pelarut dimasukkan kedalam botol vial, kemudian diuapkan hingga kering. Selanjutnya dimasukkan setetes larutan ragi roti, 2 mL air laut kemudian dikocok. Dimasukkan 10 ekor larva udang *Artemia salina* L. dan ditambahkan air laut sampai 5 mL. Dilakukan pengamatan dibawah lampu pijar selama 24 jam terhadap kematian larva udang.

3.5.10 Identifikasi Senyawa Steroid dengan FTIR

Isolat senyawa steroid hasil KLT Preparatif dari mikroalga *Chlorella sp.* diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR. 0,2 gram pelet KBr ditambahkan dengan isolat yang diduga senyawa aktif, diaduk merata kemudian pres membentuk pelet dan diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR merk IR Buck M500 *Scientific* dengan bilangan gelombang 4000 – 400 cm^{-1} .

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa nilai hasil uji toksisitas pada larva udang *Artemia salina* Leach yang dianalisis untuk mencari nilai LC_{50} dengan menggunakan analisis probit dengan MINITAB 17 yang memiliki tingkat kepercayaan 95%.

BAB IV

PEMBAHASAN

4.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan tujuan untuk menumbuhkan mikroalga *Chlorella sp.* dalam medium pertumbuhan sehingga jumlah sel mikroalga meningkat dan biomassa yang diperoleh semakin banyak. Medium yang digunakan pada penelitian ini adalah medium ekstrak taube dengan konsentrasi 4 % (Wulandari dkk., 2010). Konsentrasi MET 4 % merupakan konsentrasi optimum *Chlorella sp.* dalam menyerap nutrisi dan kelengkapan nutrisi yang terlarut di dalamnya sesuai dengan kebutuhan sel mikroalga *Chlorella sp.* (Prihantini, dkk., 2007).

Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan selama 10 hari pada kondisi suhu ruang dan pencahayaan dengan intensitas cahaya sebesar 1000 – 4000 lux yang setara dengan 2 buah lampu TL 36 watt sebagai pengganti sinar matahari dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap yang bertujuan untuk memberikan energi dalam proses fotosintesis. Selama proses kultivasi terjadi perubahan warna kultur yang awalnya berwarna hijau kekuningan menjadi hijau pekat pada hari ke-10. Bertambah pekatnya warna hijau kultur menunjukkan bahwa sel *Chlorella sp.* dari hari ke-0 sampai hari ke-10 mengalami peningkatan jumlah sel, sehingga kadar klorofil pada mikroalga *Chlorella sp.* ikut meningkat yang merupakan pigmen utama *Chlorella sp.*. Perubahan warna kultur mikroalga *Chlorella sp.* selama dikultivasi pada media ekstrak taube (MET) ditunjukkan pada Gambar 2 dalam Lampiran 6.

4.2 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Pemanenan biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh biomassa *Chlorella sp.*. Pemanenan biomassa *Chlorella sp.* dilakukan pada hari ke-10 yang merupakan fase stasioner pertumbuhan mikroalga (Khamidah, dkk., 2014). Pada fase stasioner terjadi pembentukan metabolisme sekunder yang merupakan keseluruhan proses sintesis dan perombakan produk metabolit primer. Salah satu produk senyawa metabolit sekunder dalam *Chlorella sp.* adalah senyawa steroid.

Pada proses pemanenan biomassa *Chlorella sp.*, hasil kultivasi *Chlorella sp.* dipisahkan antara filtrat dan endapannya dengan menggunakan sentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Hasil yang diperoleh berupa biomassa *Chlorella sp.* berwarna hijau pekat agak kental dan masih mengandung air.

4.3 Preparasi Sampel Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Preparasi sampel mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan cara pengeringan biomassa *Chlorella sp.* selama 2 – 3 hari menggunakan suhu ruang yang bertujuan untuk mengurangi kadar air yang masih terdapat dalam sampel *Chlorella sp.* sehingga tidak mengganggu dalam proses ekstraksi senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam *Chlorella sp.*. Selain itu, kerusakan akibat degradasi mikroorganisme dapat diminimalisir serta mencegah tumbuhnya jamur sehingga tidak merusak komposisi kimia di dalamnya dan dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama.

Hasil dari proses pengeringan biomassa basah *Chlorella sp.* yang diperoleh pada penelitian ini yaitu biomassa kering berbentuk serbuk berwarna hijau dengan

berat 7,87 g dari berat sampel basah 455,78 g sehingga didapatkan randemen hasil pengeringan sebesar 1,726%.

4.4 Analisis Kadar Air Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*

Analisis kadar air dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kadar air dalam sampel kering mikroalga *Chlorella sp.*. Analisis kadar air dilakukan menggunakan metode *thermogravimetri*, yaitu dengan prinsip penghilangan kadar air dalam sampel dengan pemanasan menggunakan oven pada suhu 100 – 105 °C dan penimbangan. Perlakuan seperti ini dilakukan berulang-ulang sampai mencapai berat konstan. Banyaknya kandungan air yang telah diuapkan dinyatakan dengan selisih berat sampel sebelum dan sesudah dioven.

Kandungan air dalam sampel memiliki pengaruh besar terhadap proses ekstraksi. Semakin besar kadar air pada sampel maka metabolit sekunder yang terkandung dalam sampel akan lebih susah terekstrak oleh pelarut. Pelarut metanol akan berikatan hidrogen dengan air yang terdapat pada sampel, sehingga kandungan air dalam sampel juga ikut terekstrak (Harborne, 1987). Kadar air maksimum yang disyaratkan untuk berlangsungnya ekstraksi secara maksimal yaitu sebesar 11 % (Setyowati, 2009 dalam Nurmilla, 2009). Berdasarkan hasil penentuan kadar air pada sampel biomassa *Chlorella sp.* kering, diperoleh kadar air sebesar 10,36 %. Kadar air tersebut tidak melebihi batas maksimum kadar air yang ditentukan sehingga tidak mengganggu jalannya ekstraksi akibat tumbuhnya jamur pada sampel.

4.5 Ekstraksi Komponen Aktif

Ekstraksi mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan untuk mengambil senyawa aktif yang terkandung di dalamnya. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi karena prosesnya yang mudah, sederhana, dan tidak menggunakan suhu tinggi yang dikhawatirkan dapat merusak senyawa aktif pada mikroalga *Chlorella sp.*, yaitu dengan prinsip mengekstrak senyawa aktif yang dapat larut dalam pelarut tertentu berdasarkan tingkat kepolarannya.

Senyawa steroid di alam berikatan glikosida dengan gula sehingga sifatnya menjadi polar. Oleh karena itu, pada penelitian ini proses ekstraksi senyawa steroid mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan pelarut metanol p.a yang bersifat polar dengan harapan senyawa steroid yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* dapat terekstrak sesuai dengan sifat polar dari metanol. Sebagaimana dengan prinsip *like dissolved like* yaitu senyawa akan larut kedalam pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang sama.

Proses maserasi dilakukan dengan cara merendam sampel mikroalga *Chlorella sp.* dalam metanol p.a dengan perbandingan sampel : pelarut adalah 1 : 5 selama 24 jam menggunakan *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama ± 5 jam dengan tujuan untuk memaksimalkan kontak antara sampel dengan pelarut sehingga mempercepat proses ekstraksi senyawa aktif steroid. Metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam metanol dan senyawa akan terekstrak sempurna dikarenakan selama proses perendaman sampel terjadi proses pemecahan dinding dan membran sel akibat adanya perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar selnya (Lenny, 2006). Maserasi dilakukan sebanyak 5 kali ulangan dan dihentikan ketika warna fitrat dari sampel sudah berubah yaitu

menjadi lebih bening dan warna sampel sudah berubah menjadi hijau pucat yang diasumsikan senyawa aktif dalam sampel *Chlorella sp.* telah terekstrak secara maksimal.

Ekstrak metanol *Chlorella sp.* yang diperoleh berwarna hijau tua dan pekat yang kemudian diuapkan sisa pelarut dan sisa air dalam desikator sampai beratnya konstan dengan hasil randemen sebesar 21,8926 %.

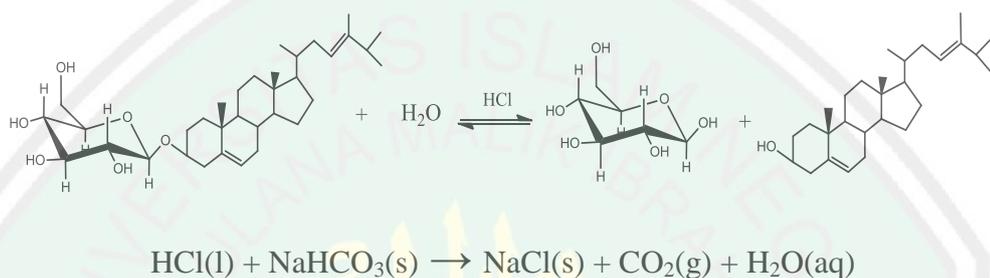
4.6 Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

Proses hidrolisis ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* bertujuan untuk melepaskan senyawa steroid yang terikat oleh gula, karena secara umum senyawa metabolit sekunder di alam ditemukan dalam bentuk glikosida (berikatan dengan gula). Cara memutuskan ikatan glikosida menjadi glikon dan aglikon dapat dilakukan menggunakan air dan katalis asam (Saifudin dkk., 2006) yang disebut proses hidrolisis.

Proses hidrolisis dilakukan pada suhu ruang dengan menggunakan katalis asam HCl 2 N. Proses hidrolisis dilakukan selama 1 jam agar proses hidrolisis dapat seluruhnya terjadi dan lebih maksimal. HCl digunakan sebagai katalis pada proses hidrolisis sebab HCl merupakan asam kuat, dimana asam kuat akan terionisasi secara sempurna di dalam air (Handoko, 2006). Konsentrasi dari ion H^+ inilah yang mempengaruhi kecepatan reaksi pemutusan ikatan glikosida. Selain itu, sifat garam yang terbentuk pada penetralan (NaCl) tidak menimbulkan gangguan.

Penetralan dilakukan dengan larutan basa lemah natrium bikarbonat dengan tujuan untuk menghentikan reaksi hidrolisis yang ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung yaitu gas CO_2 yang mengindikasikan bahwa HCl dan

NaHCO_3 sudah bereaksi. Reaksi hidrolisis merupakan reaksi yang bersifat *reversible* (bolak-balik), sehingga apabila tidak dilakukan penetralan maka reaksi pembentukan ikatan glikosida antara glikon dan aglikon akan terbentuk kembali. Reaksi pemutusan ikatan glikosida dan reaksi penetralan dengan natrium bikarbonat dapat ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Reaksi hidrolisis glikosida dan reaksi penetralan HCl dengan natrium bikarbonat

4.7 Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*

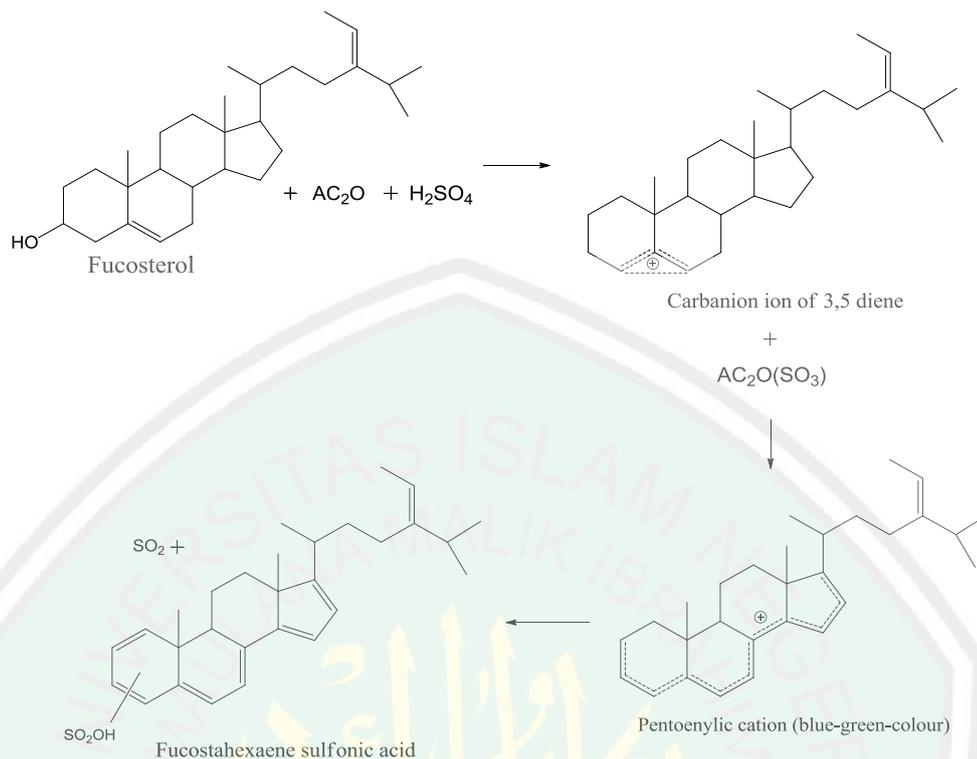
Senyawa steroid yang telah terputus dari gugus gula hasil dari proses hidrolisis selanjutnya dapat dipisahkan menggunakan ekstraksi cair-cair atau partisi. Partisi dilakukan menggunakan pelarut petroleum eter. Hasil partisi menunjukkan terbentuknya dua lapisan yang tidak saling bercampur yaitu lapisan bawah (fase air) dan lapisan atas (fase organik). Lapisan fase air lebih bersifat polar mengekstrak senyawa gula dan garam hasil hidrolisis beserta sisa-sisa H_2O sedangkan pada lapisan fase organik lebih bersifat non polar mengekstrak senyawa metabolit sekunder yang diindikasikan telah terputus ikatannya dengan senyawa gula. Senyawa yang diasumsikan sebagai senyawa dari golongan steroid yang memiliki sifat kepolaran sama dengan petroleum eter.

Lapisan atas (fase organik) berwarna hijau tua dan encer sedangkan lapisan bawah (fase air) berwarna hijau lebih muda dan kental. Proses partisi ini

dilakukan sampai ekstrak pada fase air berwarna pucat yaitu sampai 5 kali proses partisi. Fraksi petroleum eter hasil partisi didiamkan dalam desikator selama 1 hari untuk menguapkan pelarutnya. Hasil fraksi berwarna hijau kehitaman dengan randemen sebesar 50,6299 %

4.8 Uji Fitokimia Senyawa Steroid dalam Mikroalga *Chlorella sp.*

Uji fitokimia merupakan uji kualitatif yang dilakukan untuk mengidentifikasi adanya senyawa steroid yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* menggunakan reagen Liebermann-Burchard (Sukadana, 2011). Terbentuknya warna hijau kebiruan menunjukkan adanya senyawa steroid (Hayati dan Nur, 2010). Perubahan warna yang terjadi diakibatkan adanya reaksi oksidasi golongan senyawa steroid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi (senyawa pentaenilik) (Sriwahyuni, dkk., 2010). Fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* menunjukkan adanya kandungan senyawa steroid yang ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau kebiruan pada larutannya. Berikut dugaan reaksi antara senyawa steroid dengan reagen Liebermann-Burchard (Burke, *et al.*, 1974) :



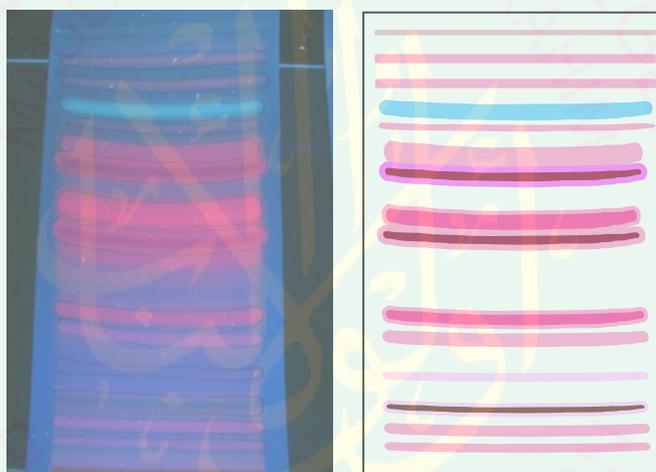
Gambar 4.2 Dugaan reaksi fukosterol dengan reagen Liebermann-Burchard (Burke, *et al.*, 1974).

4.9 Pemisahan Senyawa Steroid Menggunakan KLT Preparatif

Senyawa steroid dipisahkan menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) dengan prinsip pemisahan suatu senyawa berdasarkan pada perbedaan distribusinya diantara dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Pemisahan menggunakan plat silika G₆₀F₂₅₄ berukuran 10 x 20 cm sebagai fase diam dan fase gerak berupa eluen n-heksan : etil asetat (4 : 1) (Hidayah, dkk., 2015).

Plat yang digunakan pada KLT Preparatif sebelumnya diaktivasi dengan dipanaskan dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama 30 menit untuk menghilangkan kadar air pada plat (Sastrohamidjojo, 2007). Ekstrak hasil partisi dilarutkan dengan petroleum eter hingga konsentrasi 10.000 ppm dan ditotolkan

sepanjang plat KLT sebanyak 7 totolan pada jarak 1 cm dari bawah, sisi kanan dan sisi kiri menggunakan pipa kapiler. Sebelum dilakukan proses elusi senyawa, terlebih dahulu dilakukan penjenuhan eluen selama ± 1 jam untuk menjenuhkan uap eluen dalam bejana agar campuran eluen dapat mengelusi ekstrak secara maksimal dan cepat. Spot yang terbentuk selanjutnya dapat dilihat menggunakan lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Hasil pemisahan senyawa steroid dengan KLT preparatif yang diamati pada panjang gelombang 366 nm ditunjukkan pada Gambar 4.3.



Gambar 4.3 Hasil senyawa steroid pada fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* dideteksi di bawah lampu UV λ 366 nm

Hasil pemisahan berdasarkan Gambar 4.3 menunjukkan adanya 15 spot yang artinya terdapat 15 senyawa yang terpisah. Pada Tabel 4.1 disajikan hasil pemisahan ke-15 senyawa tersebut dengan harga Rf masing-masing senyawa.

Tabel 4.1 Hasil KLT preparatif senyawa steroid fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* dideteksi di bawah lampu UV λ 366 nm

No	Warna Spot	Nilai Rf	Dugaan Senyawa
1	Jingga	0,9519	-
2	Pink	0,8757	-
3	Pink	0,8135	-
4	Hijau kebiruan	0,7514	Steroid
5	Pink	0,7146	-
6	Pink menyala	0,6606	-
7	Merah kehitaman	0,6129	-
8	Pink menyala	0,5197	-
9	Merah kehitaman	0,4576	-
10	Pink menyala	0,2994	-
11	Pink	0,2598	-
12	Pink	0,1920	-
13	Coklat	0,1271	-
14	Pink	0,0847	-
15	Pink	0,0508	-

Spot yang diduga positif merupakan senyawa steroid adalah spot dengan warna hijau kebiruan (Sulastri dan Nilam, 2010) yaitu pada penelitian ini ditunjukkan pada spot no. 4. Oleh karena itu, pada pada spot no. 4 tersebut selanjutnya akan dikerok dan dilarutkan menggunakan pelarut petroleum eter dilanjutkan pelarut etil asetat. Penggunaan 2 pelarut tersebut bertujuan untuk memaksimalkan pelarutan senyawa yang mungkin tertinggal di silika. Campuran hasil kerokan dan pelarut selanjutnya divortex untuk menghomogenkan larutan sebelum disentrifugasi. Campuran disentrifuge pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit untuk mengendapkan silika sehingga supernatan yang diambil tidak bercampur dengan silika dan bisa untuk didekantasi. Supernatan yang diperoleh berupa larutan bening yang diduga mengandung senyawa steroid terlarut. Supernatan yang telah terpisah dari silika kemudian diuapkan pelarutnya hingga kering sehingga yang didapat adalah senyawa steroid. KLT preparatif dilakukan

sampai 4 kali untuk memperoleh senyawa steroid yang lebih banyak. Hasil isolat senyawa steroid yang diperoleh dari hasil KLT preparatif adalah senyawa yang berbentuk jarum-jarum bening sebanyak 3,8 mg.

4.10 Uji Toksisitas Senyawa Steroid Menggunakan Metode BSLT

4.10.1 Penetasan Larva

Artemia salina Leach yang digunakan untuk pengujian toksisitas tersedia dalam bentuk telur. Sehingga, sebelum digunakan untuk pengujian, terlebih dahulu dilakukan penetasan telur dalam air laut dengan pencahayaan dan aerasi selama 48 jam. Fungsi dari pencahayaan adalah untuk memberikan rangsangan terhadap *Artemia* untuk menetas karena *Artemia* termasuk dalam organisme fototropik (Amaliyah, dkk., 2013). Sedangkan, fungsi dari aerasi adalah untuk memberikan oksigen yang cukup dalam kelangsungan hidup *Artemia*.

Mekanisme penetasan larva *Artemia salina* Leach. melalui beberapa tahapan yaitu tahap hidrasi, pecahnya cangkang dan tahap payung atau tahap pengeluaran. Tahap hidrasi terjadi penyerapan air sehingga telur yang diawetkan dalam bentuk kering akan menjadi bulat dan aktif bermetabolisme. Selanjutnya tahap pecahnya cangkang yang diikuti tahap payung yang terjadi beberapa saat sebelum naupli (larva) keluar dari cangkang (Sriwahyuni, 2010).

Larva udang *Artemia salina* L. yang baru menetas berwarna kemerah-merahan dan masih mengandung cadangan makanan. Sehingga, *Artemia* dapat bertahan hidup selama ± 2 hari setelah menetas tanpa diberi makanan. Setelah ± 2 hari, cadangan makanan larva habis karena seiring dengan itu, larva mempunyai mulut. Oleh sebab itu, larva mulai membutuhkan makanan untuk kelangsungan

hidupnya. Makanan larva *Artemia* berupa larutan ragi roti yang dibuat dengan takaran setiap 3 mg ragi dalam 5 mL aquades (Amaliyah, dkk., 2013).

Larva *Artemia* yang digunakan untuk pengujian toksisitas adalah *Artemia* dengan umur 48 jam. Hal ini dikarenakan pada umur 48 jam larva berada dalam keadaan paling peka. Organ-organ pada *Artemia* sudah terbentuk lengkap, salah satunya adalah terbentuknya mulut. Dengan terbentuknya mulut, *Artemia* dapat meminum air laut yang mengandung senyawa steroid dari mikroalga *Chlorella sp.*

4.10.2 Uji Toksisitas

Uji toksisitas dengan metode BSLT merupakan salah satu metode untuk menguji sifat toksik dari suatu senyawa menggunakan hewan uji larva *Artemia salina* Leach. Prosedurnya dengan menentukan nilai LC₅₀ dari aktivitas senyawa terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. Suatu senyawa dikatakan bersifat toksik jika harga LC₅₀ < 1000 µg/mL (Meyer, *et al.*, 1982) yaitu konsentrasi dimana suatu senyawa dapat menyebabkan terjadinya 50 % kematian hewan uji larva *Artemia salina* Leach.

Pengujian dilakukan terhadap ekstrak metanol, fraksi petroleum eter dan isolat senyawa steroid hasil KLT preparatif. Masing-masing sampel uji dibuat dengan variasi konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25 dan 30 ppm serta sebagai kontrolnya 0 ppm yaitu pelarutnya tanpa sampel dan DMSO dan kontrol DMSO. DMSO digunakan sebagai surfaktan yang memiliki ujung hidrofilik dan hidrofobik sehingga dapat melarutkan ekstrak dalam air laut. DMSO memiliki struktur yang terdiri atas gugus S=O yang bersifat polar dan dua alkil (-CH₃) yang bersifat kurang polar. Gugus polar akan melarutkan air laut sedangkan gugus yang kurang polar akan melarutkan ekstrak yang kurang polar. Sepuluh larva *Artemia salina*

Leach sebagai hewan uji dalam setiap konsentrasi masing-masing perlakuan dan masing-masing dilakukan sebanyak 3 kali ulangan dan nilai yang sering muncul (modus) dinyatakan sebagai banyaknya larva yang mati. Hasil uji toksisitas ekstrak metanol, fraksi petroleum eter dan isolat senyawa steroid hasil KLTP disajikan dalam Tabel 4.2 dan hasil LC_{50} dari masing masing sampel disajikan pada Gambar 4.4; 4.5; dan 4.6.

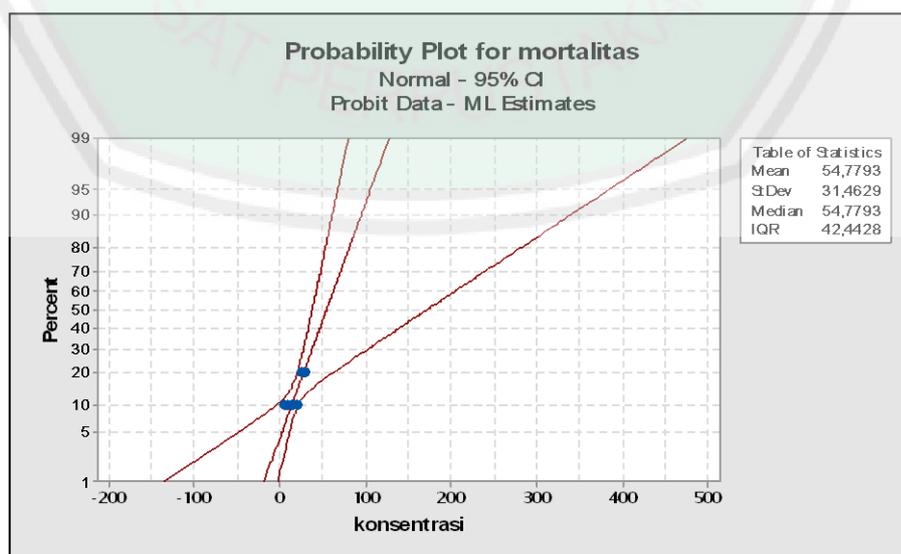
Tabel 4.2 Hasil uji toksisitas ekstrak metanol, fraksi petroleum eter dan isolat steroid menggunakan metode BSLT

Konsentrasi (ppm)	Modus larva yang mati (ekor)			% Mortalitas		
	Ekstrak metanol	Fraksi PE	Isolat steroid	Ekstrak metanol	Fraksi PE	Isolat steroid
0*	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0
5	1	1	2	10	10	20
10	1	1	3	10	10	30
15	1	1	3	10	10	30
20	1	2	4	10	20	40
25	2	3	6	20	30	60
30	2	3	9	20	30	90

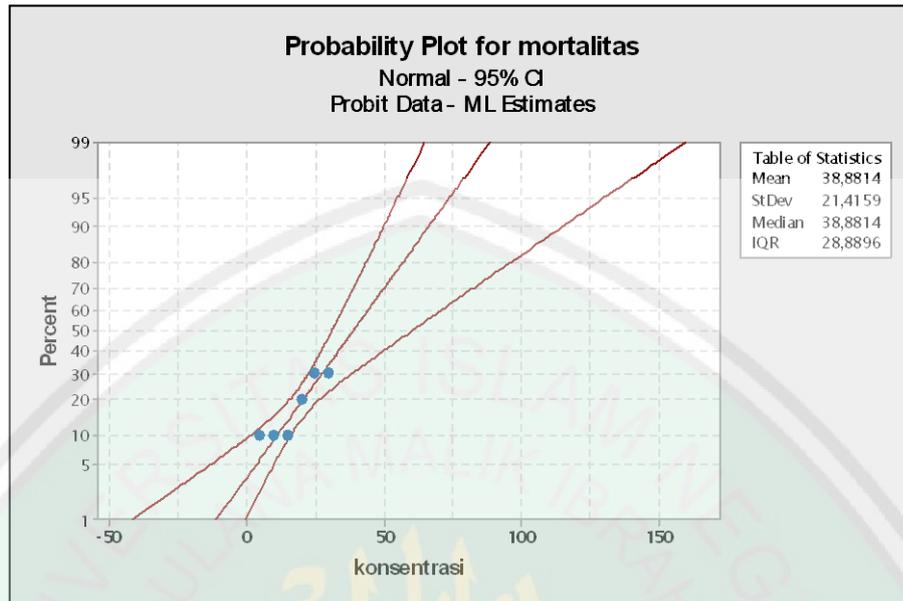
Keterangan : Jumlah total hewan uji 30 ekor *Artemia salina* Leach

0 : kontrol pelarut tanpa sampel dan DMSO

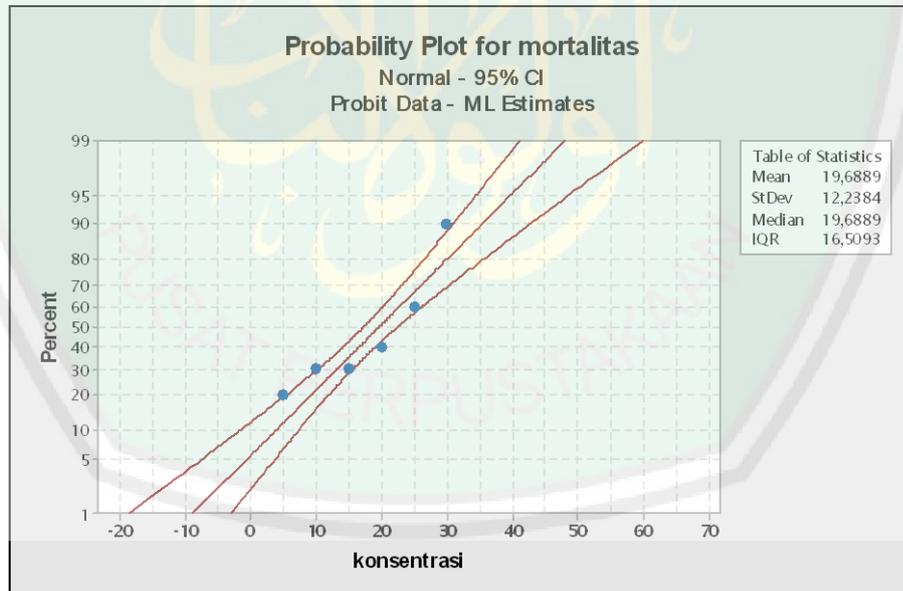
0* : kontrol DMSO tanpa sampel dan pelarut



Gambar 4.4 Kurva mortalitas larva udang *Artemia salina* Leach pada ekstrak metanol dengan nilai LC_{50} = 54,7793 ppm



Gambar 4.5 Kurva mortalitas larva udang *Artemia salina* Leach pada fraksi petroleum eter dengan nilai $LC_{50} = 38,8814$ ppm



Gambar 4.6 Kurva mortalitas larva udang *Artemia salina* Leach pada isolat senyawa steroid dengan nilai $LC_{50} = 19,6889$ ppm

Berdasarkan kurva mortalitas larva udang *Artemia salina* Leach dari masing-masing sampel ekstrak metanol, fraksi petroleum eter dan isolat steroid, masing-masing diperoleh nilai LC_{50} berturut-turut sebesar 54,7793 ppm; 38,8814

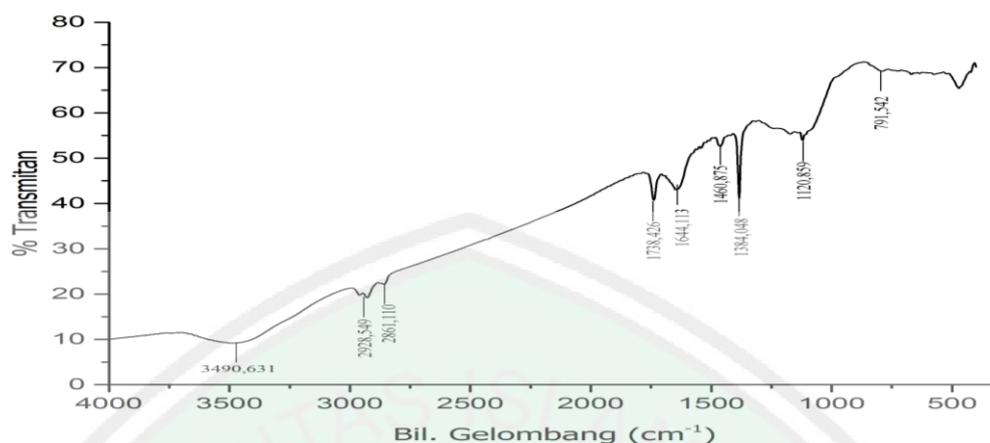
ppm dan 19,6889 ppm. Menurut Meyer, *et al* (1982), Suatu senyawa dikatakan bersifat toksik jika harga LC_{50} antara 30 – 1000 $\mu\text{g/mL}$ dan senyawa yang dikatakan sangat toksik jika nilai $LC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$. Sehingga dari hasil penelitian tersebut, menunjukkan bahwa isolat steroid yang lebih murni cenderung lebih bersifat sangat toksik daripada ekstrak metanol dan fraksi petroleum eter.

Nilai LC_{50} dari ekstrak metanol, fraksi petroleum eter dan isolat steroid mikroalga *Chlorella sp.* menunjukkan kecenderungan aktivitas yang meningkat. Hal ini kemungkinan disebabkan karena dengan jumlah sampel yang sama, kadar steroid dalam sampel isolat lebih besar dari pada kadar steroid dalam sampel fraksi petroleum eter dan kadar steroid dalam sampel fraksi petroleum eter lebih besar dari pada kadar steroid dalam sampel ekstrak metanol.

Isolat senyawa steroid dari mikroalga *Chlorella sp.* dengan nilai LC_{50} sebesar 19,6889 ppm dapat berpotensi sebagai antikanker. Berdasarkan penelitian Carballo, *et al.* (2002) menunjukkan bahwa terdapat korelasi positif antara uji toksisitas (BSLT) dengan uji sitotoksik dalam pengujian aktivitas farmakologi produk bahan alam dari laut, dimana 50% spesies yang aktif dalam BSLT juga aktif dalam uji sitotoksik sebagai antikanker. Marraskuranto, dkk. (2008) melaporkan bahwa fraksi heksan makroalga *U. fasciata* bersifat sangat toksik terhadap *Artemia salina* L. dengan nilai LC_{50} sebesar 19,12 ppm dapat bersifat toksik terhadap sel kanker HeLa ($IC_{50} = 25,6 \text{ ppm}$) dan sel kanker T47D ($IC_{50} = 28,7 \text{ ppm}$).

4.11 Identifikasi Senyawa Steroid dengan Spektrofotometer FTIR

Spektrum inframerah isolat senyawa steroid hasil KLT preparatif ditunjukkan pada Gambar 4.7 dan Tabel 4.3.



Gambar 4.7 Spektra FTIR isolat senyawa steroid hasil KLT preparatif

Tabel 4.3 Interpretasi spektrum inframerah dari isolat

Bilangan gelombang (ν , cm^{-1})	Bentuk pita	Intensitas	Penempatan gugus terkait
3490,631	Melebar	Sedang	O-H (ikatan hidrogen antarmolekul) <i>stretching</i>
2928,549	Tajam	Lemah	$\text{Csp}^3\text{-H}$ <i>stretching</i> ($-\text{CH}_2$)
2861,110	Tajam	Lemah	$\text{Csp}^3\text{-H}$ <i>stretching</i> ($-\text{CH}_3$)
1738,426	Tajam	Sedang	C=O <i>stretching</i>
1644,113	Tajam	Sedang	C=C <i>stretching</i> non konjugasi
1460,875	Tajam	Lemah	C-H pada (CH_2) <i>bending</i>
1384,048	Tajam	Kuat	C-H pada (CH_3) <i>bending</i>
1120,859	Tajam	Lemah	C-OH (alkohol sekunder)
791,542	Tajam	Lemah	$=\text{C-H}$ <i>bending</i> (<i>out of plane</i>)

Hasil spektrum inframerah memperlihatkan bahwa senyawa toksik yang diperoleh menunjukkan serapan melebar pada $3490,631 \text{ cm}^{-1}$ yang diduga adalah serapan ulur (*stretching*) dari gugus Hidroksil O-H ($3200\text{-}3550 \text{ cm}^{-1}$). Serapan pada $2928,549 \text{ cm}^{-1}$ merupakan serapan ulur (*stretching*) C-H alifatik yaitu dari sp^3 atau C-H dari metilen (CH_2), dugaan ini diperkuat dengan adanya serapan bilangan gelombang pada $1460,875 \text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan adanya tekukan C-H dari CH_2 yang memiliki kisaran bilangan gelombang antara $1440\text{-}1480 \text{ cm}^{-1}$ (Socrates, 1994), dan serapan $2861,110 \text{ cm}^{-1}$ diduga adanya gugus metil (CH_3)

yang diperkuat dengan adanya serapan pada $1384,048\text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan adanya CH_3 alifatik (Sudjaji, 1988). Adanya vibrasi C-H tekuk pada spectra inframerah mengindikasikan adanya gugus gem dimetil yang lazim ditemukan pada senyawa terpenoid dan steroid (Astuti, 2014).

Pita serapan $1644,113\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya uluran (stretching) C=C alkena non konjugasi ($1620\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$) dan diperkuat dengan adanya serapan pada bilangan gelombang $791,542\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya tekukan =C-H ($650\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$) (Saleh, 2009) dan adanya rentangan C=O pada serapan $1738,426\text{ cm}^{-1}$. Bilangan gelombang $1120,859\text{ cm}^{-1}$ diduga terdapat serapan dari gugus C-OH sekunder. Berdasarkan hasil ini maka isolat toksik hasil partisi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* diduga merupakan senyawa steroid yang memiliki gugus C=C, C-OH sekunder, hidroksil O-H dan gem dimetil.

4.12 Pemanfaatan Mikroalga *Chlorella sp.* dalam Prespektif Islam

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَطْلًا ۚ ذَٰلِكَ ظَنُّ الَّذِينَ كَفَرُوا ۚ فَوَيْلٌ لِّلَّذِينَ كَفَرُوا مِنَ
النَّارِ

Dan kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada antara keduanya tanpa hikmah. yang demikian itu adalah anggapan orang-orang kafir, Maka celakalah orang-orang kafir itu Karena mereka akan masuk neraka (QS. Shaad: 27).

Allah SWT menciptakan segala sesuatu di muka bumi dengan tidak sia-sia, semua yang diciptakan oleh Allah SWT pasti ada tujuan dan hikmahnya. Semua diciptakan dengan manfaat-manfaat yang dapat diambil oleh manusia yang beriman dan berilmu. Salah satu contohnya adalah penciptaan tumbuh-tumbuhan. Banyak sekali ayat dalam al-qur'an yang menjelaskan tentang tumbuh-tumbuhan

dan manfaatnya. Seperti firman Allah SWT dalam surat al-An'am ayat 99 yang menjelaskan bahwa Allah SWT menurunkan air hujan dari langit, dan dari air itu kemudian ditumbuhkan tumbuh-tumbuhan dengan berbagai macam jenis dan bentuknya. Dari tumbuh-tumbuhan yang telah Allah SWT ciptakan memiliki banyak manfaat yang dapat dimanfaatkan oleh makhluk hidup lain. Berdasarkan beberapa penelitian melaporkan bahwa tanaman dapat dimanfaatkan sebagai obat. Contohnya seperti tanaman mikroalga *Chlorella sp.* dapat digunakan sebagai antibakteri (Khamidah, dkk., 2014) dan antioksidan (Anggraeni, dkk., 2014).

Mikroalga *Chlorella sp.* merupakan salah satu tumbuhan yang diciptakan oleh Allah SWT dari air yang merupakan komponen abiotik yang diciptakan di muka bumi. Selain air, Allah menciptakan komponen abiotik lainnya seperti cahaya, angin, tanah, suhu, garam mineral dan lain-lain. Komponen-komponen abiotik tersebut dapat membantu kehidupan dari komponen-komponen biotik, seperti mikroalga *Chlorella sp.*. Air dari ayat tersebut merupakan medium tumbuh dari mikroalga *Chlorella sp.* dengan garam-garam mineral seperti K, P, Ca, Mg, Mn dan lain sebagainya (Prihantini, dkk., 2007) yang terkandung di dalamnya yang dapat membantu pertumbuhan pada *Chlorella sp.* sehingga *Chlorella sp.* dapat hidup dan menghasilkan senyawa-senyawa yang bermanfaat.

Senyawa-senyawa yang bermanfaat yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.* dalam penelitian ini terbukti memiliki kemampuan sebagai obat. Suatu senyawa yang diciptakan oleh Allah dengan bentuk yang sangat mikroskopis dan bahkan sulit dilihat dengan mata, namun dibalik semua itu Allah memberikan hikmah yang begitu besar, karena Allah SWT menciptakan makhluk-

Nya pasti ada hikmah dibalik penciptaannya. Betapa besar kuasa Allah yang menciptakan segala sesuatu dengan sangat indah dan sempurna.

Kandungan dalam mikroalga *Chlorella sp.* telah dibuktikan dalam penelitian ini mengandung senyawa aktif yang dapat berfungsi sebagai obat. Penggunaan mikroalga *Chlorella sp.* sebagai obat merupakan salah satu bentuk jalan untuk mendapatkan kesembuhan dari Allah SWT, karena segala bentuk penyakit pasti ada obatnya. Seperti hadits yang diriwayatkan oleh Imam Bukhari di dalam shahihnya, dari sahabat Abu Hurairah bahwasanya Nabi bersabda:

عَنْ أَبِي هُرَيْرَةَ رَضِيَ اللَّهُ عَنْهُ عَنِ النَّبِيِّ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ قَالَ : مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً. رَوَاهُ أَبُو خَرِي

Diriwayatkan dari Abu Hurairah r.a bahwa Nabi SAW. pernah bersabda “Tidaklah Allah menurunkan suatu penyakit melainkan Allah turunkan pula obatnya” (HR. Al-Bukhari)

Dan dari riwayat Imam Muslim dari Jabir bin Abdillah dia berkata bahwa Nabi bersabda:

لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءَ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّوَجَلَّ {اخرجه مسلم}

“Setiap penyakit ada obatnya, bila sebuah obat sesuai dengan penyakitnya maka dia akan sembuh dengan seizin Allah SWT” (HR. Muslim).

Pencarian obat dari bermacam-macam penyakit dapat ditemukan dari ilmu pengetahuan, dan dari ilmu pengetahuan kita dapat mengetahui dan menyadari akan kebesaran Allah SWT yang telah menciptakan tanam-tanaman, salah satunya mikroalga *Chlorella sp.* dengan kandungan didalamnya yang dapat dimanfaatkan sebagai obat. Namun, kita tetap harus ingat dan sadar, bahwa obat hanyalah salah satu bentuk usaha manusia untuk mendapatkan kesembuhan dari Allah SWT,

karena pada dasarnya semua penyakit itu datangnya dari Allah, makahanya Allah-lah yang dapat menyembuhkannya.

وَإِذَا مَرَضْتُ فَهُوَ يَشْفِينِي ﴿٨٠﴾

Dan apabila Aku sakit, dialah yang menyembuhkan aku (QS. Asy-Syu'araa: 80)

Setiap tanaman memiliki kandungan tertentu dengan ukuran yang benar-benar telah ditentukan oleh Allah SWT. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya bioaktivitas sebagai antikaner dari senyawa steroid pada tanaman *Chlorella sp.* dengan nilai LC₅₀ sebesar 19,6889 ppm. Sebagaimana firman Allah SWT dalam surat al-Qomar ayat 49:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾

Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukuran (QS. Al-Qomar: 49).

Penelitian terhadap kandungan *Chlorella sp.* yang memiliki banyak manfaatnya menjadikan kita menyadari dan berfikir bahwa sesungguhnya pada penciptaan langit dan bumi terdapat keajaiban-keajaiban didalamnya dan bukti-bukti atas kekuasaan Allah SWT. Dengan melihat tanda-tanda kekuasaan Allah SWT yang begitu besar, sepatutnya kita selalu bertafakkur dan senantiasa berdzikir kepada Allah SWT bagaimanapun keadaanya.

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٠١﴾ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٠٢﴾

Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal, (yaitu) orang-

orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan Ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, Maka peliharalah kami dari siksa neraka (QS. Al-Imran: 190-191).

Manusia diciptakan oleh Allah SWT dengan akal dan pikiran untuk berfikir.

Berfikir merupakan salah satu nikmat di antara nikmat-nikmat Allah yang dianugerahkan kepada umat manusia dan berulang kali al-Qur'an memperingatkan kepada manusia untuk menggunakan akal dan pikirannya. Apabila manusia menggunakan akal dan pikirannya untuk memikirkan tentang penciptaan semesta, maka manusia akan senantiasa terbimbing dalam memahami keesaan Allah SWT sang Maha Pencipta alam semesta ini dan senantiasa mengakui tentang kebijaksanaan dan keagungan ciptaan-Nya.

Seorang ahli biologi, ahli fisika, ahli matematika, ataupun seorang ahli kimia. Semuanya akan terpesona oleh susunan alam semesta yang luar biasa. Manusia akan terasa kecil dihadapan kebesaran alam, alam akan terasa kecil dihadapan kebesaran penciptanya dan akhirnya tidak ada arti diri, tidak ada arti alam, yang ada hanyalah Allah yang maha pencipta. Di akhir ayat 190, manusia yang mampu melihat alam sebagai tanda-tanda kebesaran dan keagungan-Nya, Allah sebut sebagai Ulil Albab (orang-orang yang berpikir). Dijelaskan pada ayat selanjutnya yaitu orang-orang yang selalu berfikir dan berdzikir atas kekuasaan Allah SWT dalam keadaan yang bagaimanapun, baik dalam keadaan berdiri, duduk, atau ketika berbaring.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Isolat senyawa steroid yang diperoleh dari kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) fraksi petroleum eter mikroalga *Chlorella sp.* toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach dengan nilai LC_{50} sebesar 19,6889 ppm.
2. Hasil analisis spektrofotometer FTIR isolat toksik dari mikroalga *Chlorella sp.* diduga merupakan senyawa steroid yang memiliki gugus fungsi $-OH$, $C=C$, $C=O$, $C-OH$ sekunder, dan geminal dimetil ($-C(CH_3)_2$).

5.2 Saran

1. Hasil pemisahan dengan KLT preparatif menunjukkan adanya 1 spot senyawa steroid dan 14 spot senyawa selain steroid. Oleh karena itu, perlu dilakukan metode pemisahan lain untuk memaksimalkan pemisahan senyawa steroid seperti KLT 2D dan kromatografi kolom serta optimalisasi eluen. Selain itu, perlu dilakukan identifikasi golongan senyawa pada 14 spot lainnya.
2. Diperlukan identifikasi senyawa steroid menggunakan instrumen lain seperti LC-MS agar dapat diketahui golongan senyawa steroid yang terkandung dalam mikroalga *Chlorella sp.*.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi, SS. 1992. *Teknik Kimia Organik*. Bogor : Institut Pertanian Bogor
- Ad-Dimasyqi, A.A.F.I.I.K. 2001. Tafsir Ibnu Kasir Juz 7. Bandung: Sinar Baru Algesindo
- Al-Maraghi, A.M. 1980. *Terjemah Tafsir Al-Maraghi 7*. Semarang : CV. Toha Putra Semarang
- Al-Maraghi, A.M. 1992. *Terjemah Tafsir Al-Maraghi 21*. Semarang : CV. Toha Putra Semarang
- Amaliyah, S., A. Ghanaim F. dan A. Hanapi. 2013. Uji Toksisitas Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *Skripsi*. Jurusan Kimia Malang
- Ardianti, A., Any, G. dan Zainab. 2014. Uji Aktivitas Ntioksidan Fraksi Eter Hasil Hidrolisis Infusa Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dengan Metode DPPH (1,1-Diphenil-2-Picrylhydrazyl). *Pharmaciana*. Vol. 4, No. 1: 1-8
- Anggraeni, O. N., A. Ghanaim F., Munirul, A. dan A. Hanapi. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* *ALCHEMY*. Vol. 3, No.2: 173-188
- AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist, Inc.* Washington DC: Association of Official Analytical Chemists
- Astuti, M.D., Maulana, A., dan Kuntowati, E.M. 2014. Isolasi Steroiddari Fraksi N-Heksana Batang Bajakah Tampala (*Spatholobus littoralis* Hassk.). *Prosiding Seminar Nasional Kimia*. Surabaya: Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Surabaya. ISBN : 978-602-0951-00-3
- Auliawan, R dan Bambang, C. 2014. Efek Hidrolisis Ekstrak Daun Iler (*Coleus scutellarioides*) Terhadap Aktivitas Inhibisi Enzim α -glukosidase. *Jurnal Sains dan Matematika*. Vol. 22, No.1 : 15-19
- Bariyyah, S. K., A. Ghanaim F., Munirul, A., dan A. Hanapi. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *ALCHEMY*. Vol. 2, No.3: 150-204
- 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
- Bougis, P. 1979. *Marine Plankton Ecology*. New York: American Elsevier Publishing Company
- Burke, R. W., B. I. Diamondstone, R. A. Velepoldi, and O. Menis. 1974, Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak Color Reactions for Cholesterol. *Clinical Chemistry Journal*. Washington D.C : Analytical Chemistry Division, Institute for Materials Research, National Bureau of Standards. Vol.20. No.7
- Cahyono, A. B. 2004. *Keselamatan Kerja Bahan Kimia di Industri*. Yogyakarta: UGM press
- Carballo, J. L., Hernandez-Inda, Z. L., Perez, P., and Garcia-Gravalos, M. S., 2002. A comparasion between two brine Shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity marine nature products. *BMC Biotechnology* 2; 17 (5p)
- Colegate, S. M. dan Molyneux, R. J. 2007. *Bioactive Natural Products: Determination, Isolation and Structural Determination Second Edition*. Prancis: CRC Press
- Desianti, N., A. Ghanaim F., dan Tri Kustono A. 2014. Uji Toksisitas dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, dan n-Heksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Dewi, Y. S dan Gultom, Y. H. 2009. Pemanfaatan Algae *Chlorella sp.* dan Enceng Gondok untuk Menurunkan Tembaga (Cu) pada Industri Pelapisan Logam. *Seminar Tugas Akhir*. Semarang: Jurusan Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Diponegoro
- Diastuti, H. dan Warsinah. 2010. Identifikasi Senyawa Antikanker dari Ekstrak Kloroform Kulit Batang *Rhizopora mucronata*. *Majalah Farmasi Indonesia*. Vol. 21, No. 4: 266-271
- Fathiyawati. 2008. Uji Toksisitas Ekstrak Daun *Ficus racemosa* L. terhadap *Artemia salina* Leach dan profil Kromatografi Lapis Tipis. *Tesis* (tidak dipublikasikan). Fakultas Farmasi UMS. Surakarta
- Fasya, A. G., Umi, K., Suci, A., Siti Khairul, B. dan Romaidi. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) pada Fase Pertumbuhan. *ALCHEMY*. Vol. 2, No. 3: 162-169

- Fitrianti, S. A. 2011. *Diferensiasi temulawak, kunyit, dan bangle berdasarkan interpertasi kromatografi lapis tipis menggunakan Image J. Skripsi*. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor
- Gandjar, I. G. dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka belajar.
- Guenther, E. 1987. *Minyak Atsiri*. Jilid I. Terjemahan Ketaren S. Jakarta: Universitas Jakarta
- Halimah, N. 2010. Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn.) terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Skripsi* Diterbitkan. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Handoko, D. S. P. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa pada Variasi Suhu dan Jenis Asam sebagai Katalis. *Jurnal*. Jember. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jember. *SIGMA*. Vol.9, No.1 ISSN 1410-5888.
- Harborne. J.B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Diterjemahkan oleh Kokasih Padmawinta dan Iwang Soediro. Bandung: ITB
- Harefa, F. 1996. Mengenal Sifat Biologis Artemia. Swadaya, Jakarta. <http://www.o-fish.com/>[21 Januari 2010]. Diakses tanggal 5 Januari 2016
- Harlim, T. 1982. Kandungan Steroid Alga Laut di Sekitar Pantai Indonesia. *Disertasi*, Bandung: ITB
- Hayati, E.K. dan Nur Halimah. 2010. Phitochemical Test and Brine Shrimp Lethality Test Against *Artemia salina* Leach of Anting-anting (*Acalypha indica* Linn.) Plant Extract. *ALCHEMY*. Vol. 1, No. 2: 53-103
- Hendayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung: PT. Remaja Rosdakarya
- Hendrawati, A. R. E. 2009. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* Linn.) terhadap Larva *Artemia salina* Leach dengan Metode *Brime Shrimp Lethality Test* (BST). *Laporan Akhir Karya Tulis Ilmiah*. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang
- Hidayah, H., A. Ghanaim F. dan A. hanapi. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid pada Fraksi Petroleum Eter Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasi Menggunakan FTIR. *Skripsi tidak diterbitkan*. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

- Imamah, N., A. Ghanaim F. dan Tri Kustono A. 2015. Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer FTIR. Skripsi tidak diterbitkan. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
- Indrayani, L., Hartati, S. dan Lydia, S. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) terhadap larva Udang *Artemia salina* Leach. *Berk Penel Hayati*. Vol. 12 : 57-61
- Iriawan, N dan Astuti, S. P. 2006. Mengolah Data Statistika dengan Mudah Menggunakan Minitab 14. Yogyakarta: CV Andi Offset
- Isanansetyo, A. dan Kurniastuti. 1995. *Teknik Kultur Phitoplankton dan Zooplankton Pakan Alami untuk Pembenihan Organisme Laut*. Yogyakarta: Kanisius
- Kanwar, A. S. 2007. Brine Shrimp (*Artemia salina*) a marine Animal for Simple and Rapid Biological Assays. *Journal of Chinese Clinical Medicine*. Vol. 2: 236-240
- Kawaroe, M. 2008. Potensi Beberapa Mikroalga Sebagai Bahan Baku Biodiesel. Bogor: Pusat Penelitian Surfaktan Dan Bio energi. Institut Pertanian Bogor
- Karger, B. L., Synder, L., dan Hosvarth C. 1973. *An Introduction to Separation*. Brisbane: John dan Sons
- Khamidah, U., A. Ghanaim F. dan Romaidi. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Skripsi*. Jurusan Kimia UIN Malang
- Khamidah, U., A. Ghanaim F. dan Romaidi. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* pada Fase Stasioner Hasil Kultivasi Dalam Medium Ekstrak Tauge (MET). *ALCHEMY*. Vol. 3, No. 1: 1-7
- Khopkar, S. M. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press
- Kristanti, A. N, dkk. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press
- Kumar, H. D. and H. N. Singh. 1976. *A Text Book on Algae*. London: Macmilan and Co Ltd
- Lenny, S. 2006. Senyawa Terpenoida dan Steroid. *Karya Ilmiah Tidak Diterbitkan*. Medan: MIPA Universitas Sumatera Utara

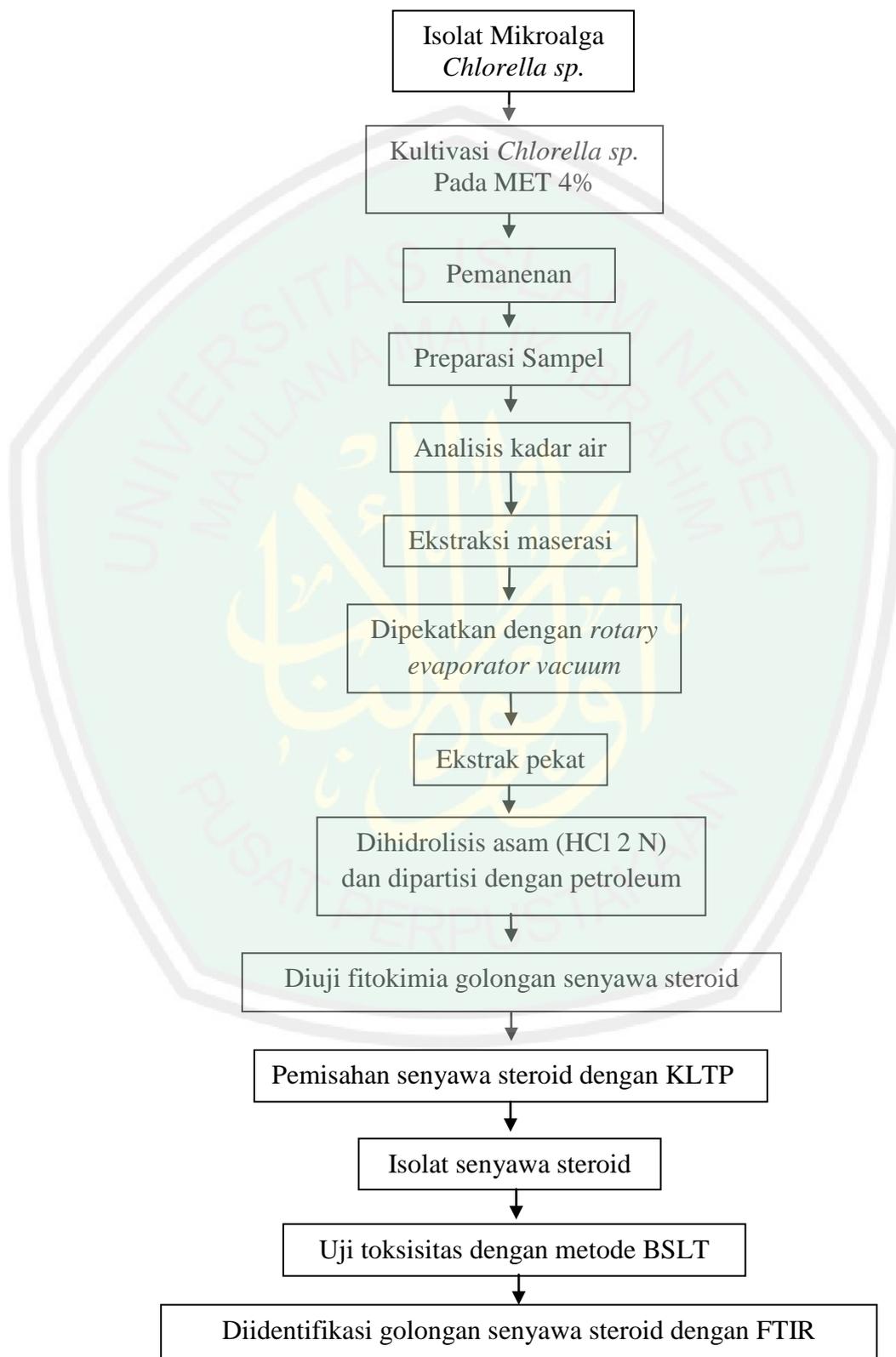
- Maharsyah, T., Musthofa, L., and Wahyunato, A. N. Eferktivitas Penambahan *Plant Growth Promoting Bacteria* (*Azospirillum sp.*) dalam Meningkatkan Pertumbuhan Mikroalga (*Chlorella sp.*) pada Media Limbah Cair Tahu Setelah Proses Anaerob. *Jurnal Keteknikan Pertanian Tropis dan Biosistem*. Vol. 1, No. 3: 258-264
- Marliana, E. 2007. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Batang *Spatholobus ferrugineus* (Zoll & Moritzi) Benth yang Berfungsi sebagai Antioksidan. *Jurnal Penelitian MIPA*. Vol. 1, No. 1: 23-29
- Marraskuranto, E., Nurrahmi, D. F., Hedi, I. D., and Thamrin, W. 2008. Aktivitas Antitumor (HeLa dan T47D) dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Makroalga Hijau *Ulva vasciata*. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Vol.3, No.2: 107-112
- Maulana, A. I. 2010. Pengaruh Ekstrak Tauge (*Phaseolus radiates*) terhadap Kerusakan Sel Ginjal Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Parasetamol. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Surakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta
- Mc Laughlin, J. I. 1991. *Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality : Two Simple Bioassay for Higher Plant Screening and Fractination*. Methods in Plants Biochemistry. Academic Press
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnarn, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E. and Mc Laughlin, J. L. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*. Vol. 45: 31-34
- Nur M., A. dan Adijuwana H. A. 1989. *Teknik Pemisahan dalam Analisis Biologi*. Bogor: Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat, Institut Pertanian Bogor
- Nurmillah, O. 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
- Panjaitan, R. B. 2011. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Batang Pulasari (*Alixiae cortex*) dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *Skripsi*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Program Studi Farmasi Universitas Sanata Dharma
- Poedjiadi, A. dan Supriyanti, F. M. T. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI Press.
- Prabowo, D.A. 2009. Optimasi Pengembangan Media untuk Pertumbuhan *Chlorella sp.* pada Skala Laboratorium. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Bogor: Program Studi Ilmu dan Teknologi Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor.

- Prihantini, N. H., Putri B., dan Yuliati R. 2005. Pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan Variasi pH Awal. *Junal 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, M.R., James,S. dan I Made, D.S. 2013. Uji Toksisitas dan Identifikasi Ekstrak Etanol Spons *Callispongia aerizusa* terhadap Larva *Artemia salina* L. *Cakra Kimia*. Vol.1, No.1 : 1-7
- Richmond, A. E. 1986. *Microalga Culture*. Tokyo: CRC Press
- Richmond, A. E. 1988. *Microalga Culture*. Journal CRC Critical Rev in Biotech. Vol. 4, No. 4: 369-438
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Senyawa Organik Tumbuhan Tinggi*. diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB
- Rostini, I. 2007. Kultur Fitoplankton (*Chlorella sp.* dan *Tetraselmis chuii*) pada Skala Laboratorium. *Karya Ilmiah*. UNPAD
- Sa'adah, A. A. Ghanaim, F., dan A. Hanapi. 2015. Pemisahan Senyawa Aktif Ekstrak Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Identifikasi Menggunakan Spektrofotometer FTIR. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Sachlan, M. 1982. *Planktonologi*. Semarang: Fakultas Peternakan dan Perikanan Universitas Diponegoro
- Saifudin, A., Suparti, Fuad, Anang dan Da'i, M. 2006. Biotransformasi Kurkumin Melalui Kultur Suspensi Sel Daun *Catharanthus roseus [L]* G.Don Berbunga Merah. *Skripsi*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah
- Saleh, C. 2009. Senyawa Steroid dari Tumbuhan Sidawayah (*Woodfordia floribunda* Salisb.). *Jurnal Kimia Mulawarman*, Vol. 6. No. 2. Hal : 1-6
- Sapar, A., A. S. Kumanireng, N.de Voogd dan Alfian, N. 2004. Isolasi dan Penentuan Struktur Metabolit Sekunder Aktif Spons *Biemna triraphis* Asal Pulau Kapodasang (Kepulauan Spermonde). *Marina Chimica Acta*. Vol. 5, No.1: 2-5
- Sastrohamidjojo, H. 1991. *Sintesis Bahan Alam*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Sastrohamidjojo, H. 2007. *Sintesis Bahan Alam*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Mishbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an* Vol.11 dan 12. Jakarta: Penerbit Lentera Hati.
- Socrates. 1994. *Infrared Characteristic group Frequencies -2nd Edition*. England: John Wiley and Sons Ltd.
- Soebagio, Budiasih, E., Ibnu, M. S., Widarti, H. R. dan Munzil. 2005. *Kimia Analitik II*. Malang: UM Press
- Soemirat, J. 2005. *Toksikologi Lingkungan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press
- Sriwahyuni, I. dan Hayati, E. K. 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 Saintek Universitas Islam Negeri Malang
- Sudarmadji, S., Haryono, B. dan Suhardi. 2003. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty
- Sudjadi. 1988. *Metode Pemisahan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sukadana, I. M. 2011. Kandungan Senyawa Steroid-Alkaloid Pada Ekstrak n-Heksana Daun Beringin (*Ficus benjamina* L.). *Jurnal Kimia*. Vol. 8, No. 2: 169-174
- Sukoso. 2002. *Peranan Bioteknologi Molekuler dalam Pembangunan Bidang Perikanan dan Kelautan Indonesia*. Malang: Universitas Brawijaya
- Sulastri, T dan Nilam, K. 2010. ISolasi Steroid dari Ekstrak Metanol Daun Bluntas (*Pincea indica* L.). *Jurnal Chemica*. Vol. 11, No.1: 52-56
- Vashista, R. R. 1979. *Botani for Degree Student*. Published by S. Chan and Company Ltd. Ram nagar. New Delhi
- Wulandari, A. P., Naderia, F., Pattalia, A. E. dan Permata, D. R. 2010. Identifikasi Mikroalga di Sekitar Pantai Pangandaran dan Potensi Pertumbuhannya pada Formulasi Medium Ekstrak Tauge (MET). *Prosiding Seminar Nasional Limnologi V Tahun 2010*. Jatinagor: Jurusan Biologi FMIPA Universitas Padjajaran
- Yudha, A. P.. 2008. Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Dunaliella sp.* pada Umur Panen yang Berbeda. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Bogor : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.

LAMPIRAN

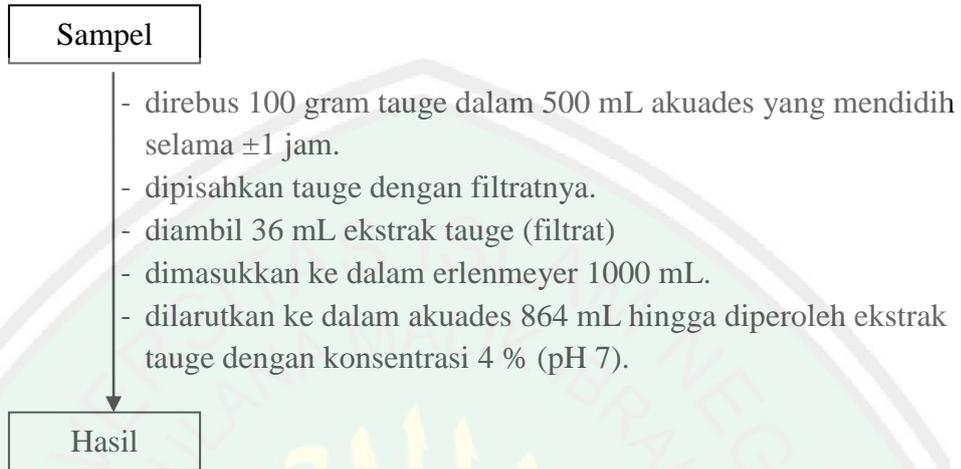
Lampiran 1. Rancangan Penelitian



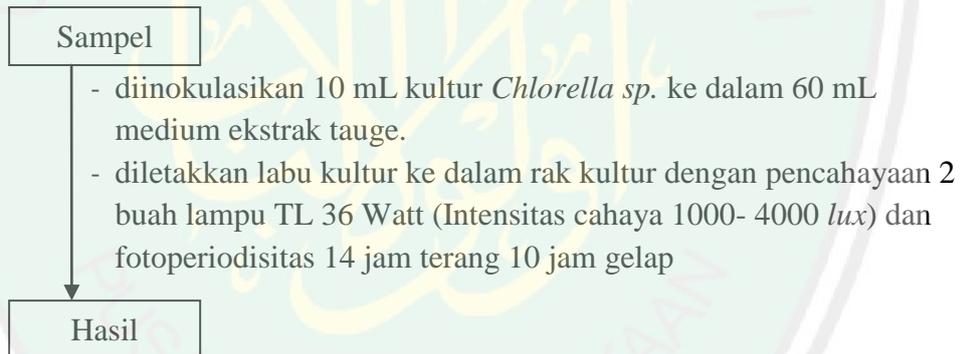
Lampiran 2. Skema Kerja

L.2.1 Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

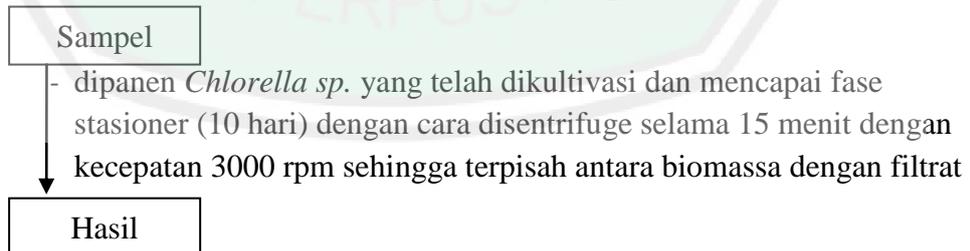
L.2.1.1 Pembuatan Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %



L.2.1.2 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) 4 %



L.2.1.3 Pemanenan Biomassa Mikroalga *Chlorella sp.*



L.2.2 Penentuan Kadar Air Mikroalga *Chlorella sp.*

Sampel *Chlorella sp.*

- dipanaskan cawan dalam oven pada suhu 100 – 105 °C sekitar 15 menit
- disimpan cawan dalam desikator sekitar 10 menit
- ditimbang hingga diperoleh berat konstan
- ditimbang sampel sebanyak 0,5 gram
- dimasukkan dalam cawan porselen
- dikeringkan dengan oven pada suhu 100 – 105 °C selama 30 menit
- didinginkan dalam desikator sekitar ±10 menit
- ditimbang
- diulangi hingga diperoleh berat konstan
- dihitung kadar air dengan rumus :

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

keterangan:

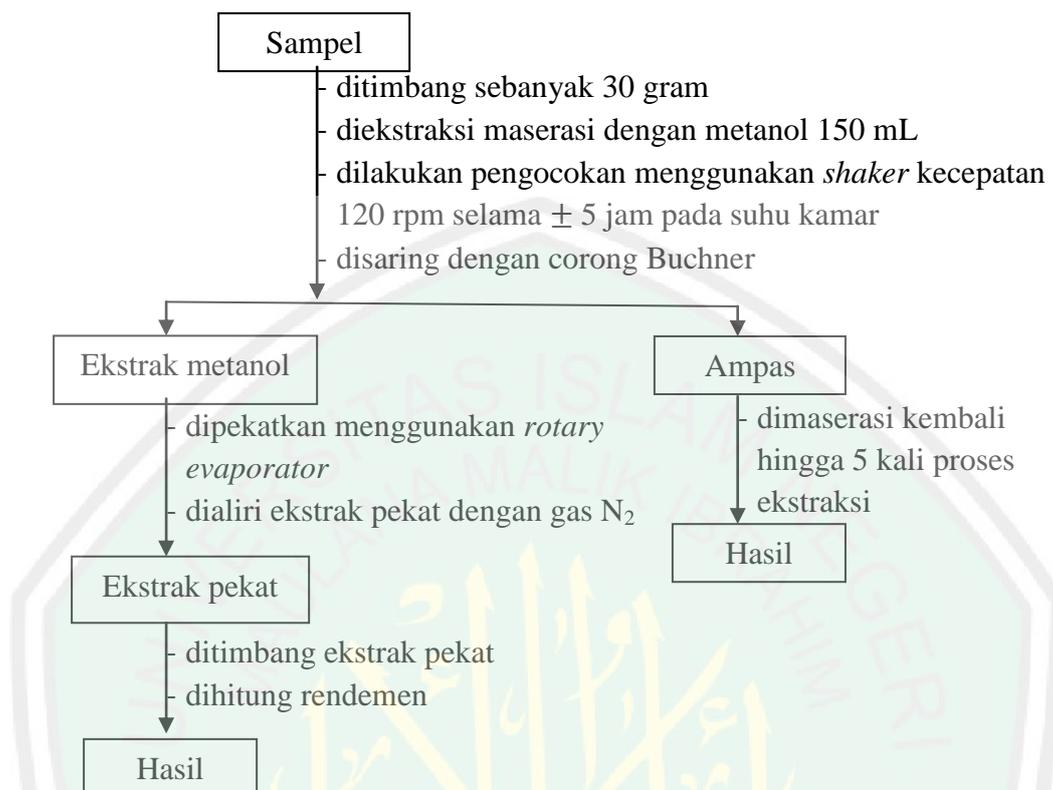
a = bobot cawan kosong

b = bobot sampel + cawan sebelum dikeringkan

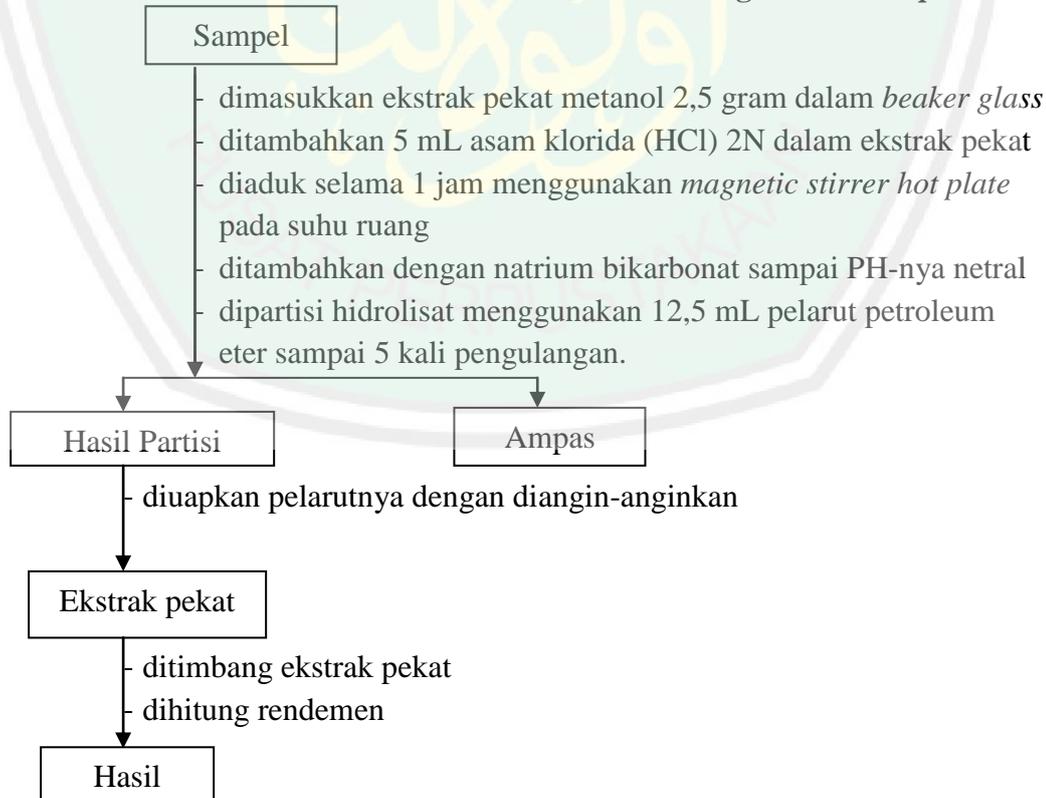
c = bobot cawan + sampel setelah dikeringkan

Hasil

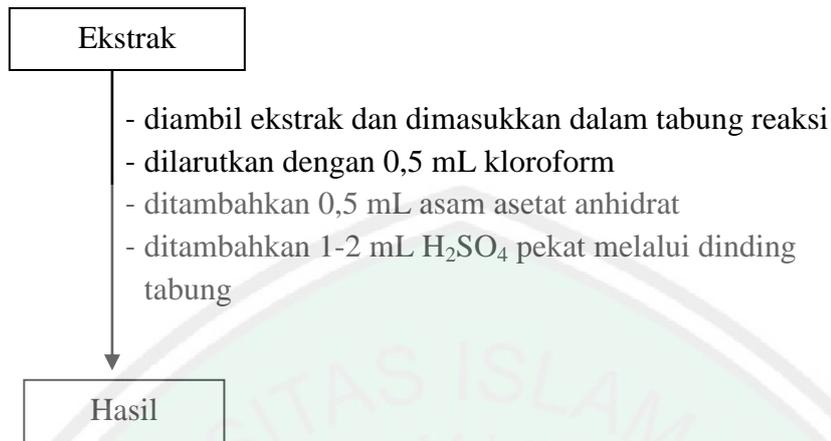
L.2.3 Ekstraksi Mikroalga *Chlorella sp.* dengan Maserasi



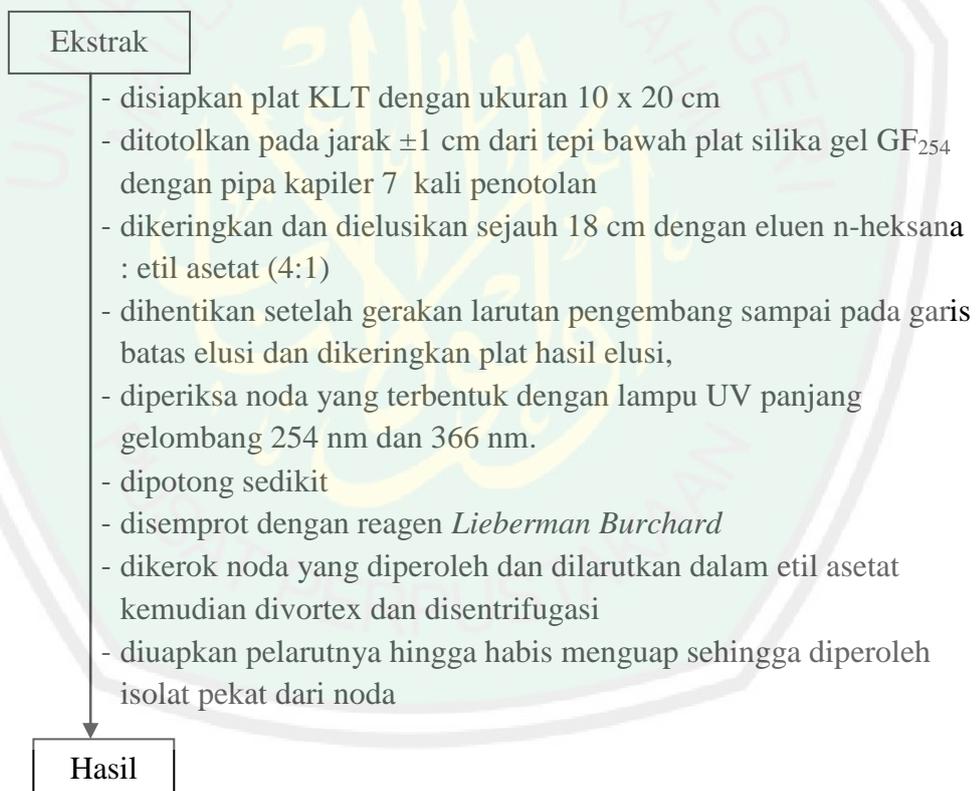
L.2.4 Hidrolisis dan Partisi Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.*



L.2.5 Uji Fitokimia senyawa steroid

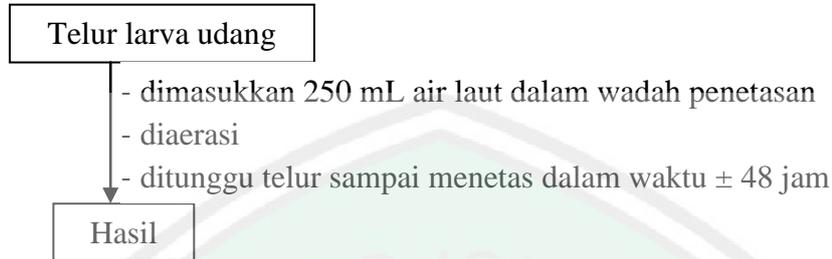


L.2.6 Pemisahan Senyawa Steroid dengan KLTP

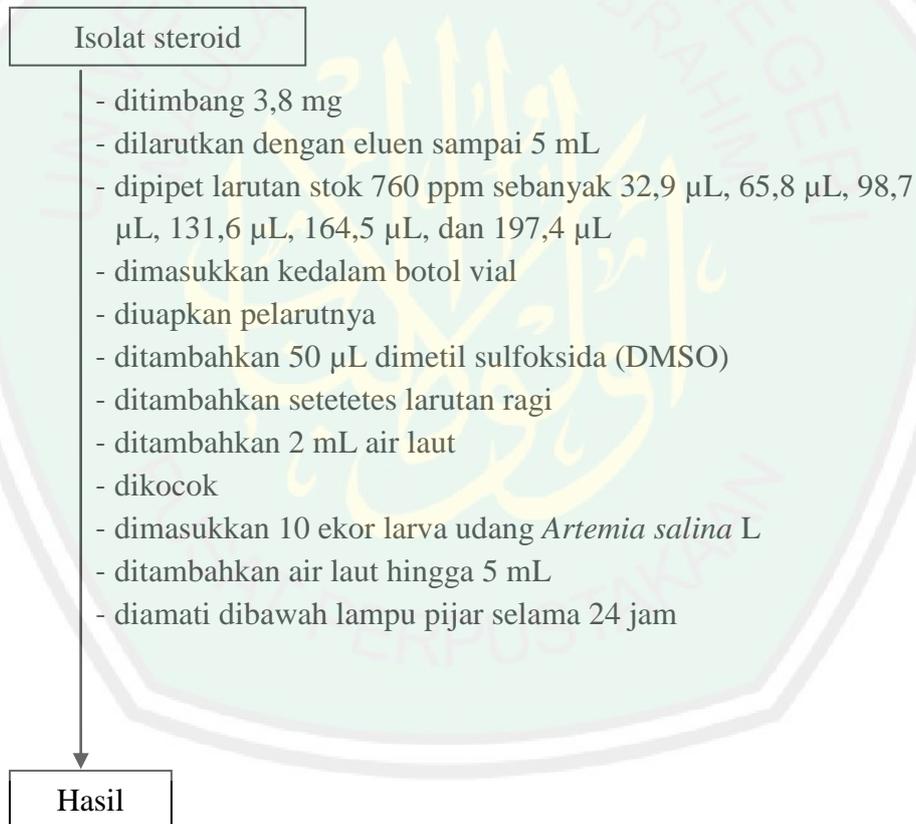


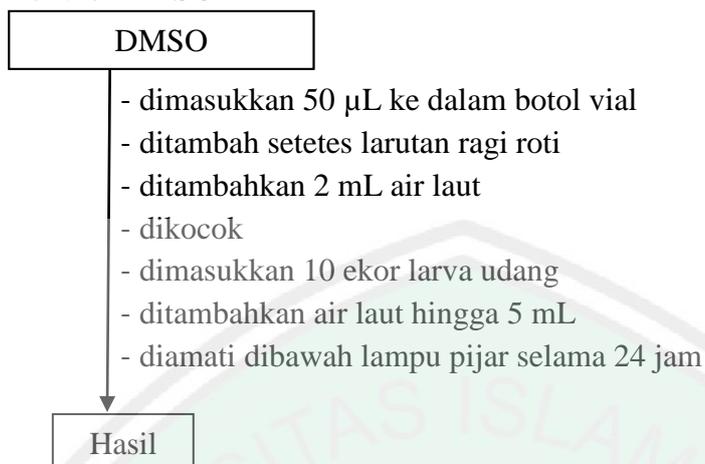
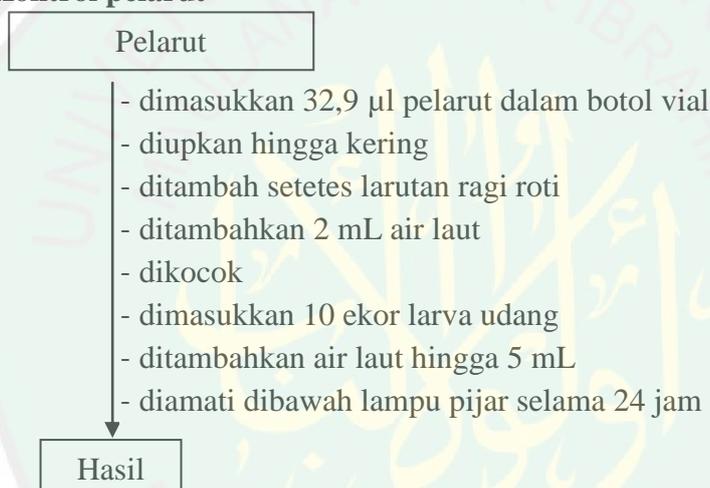
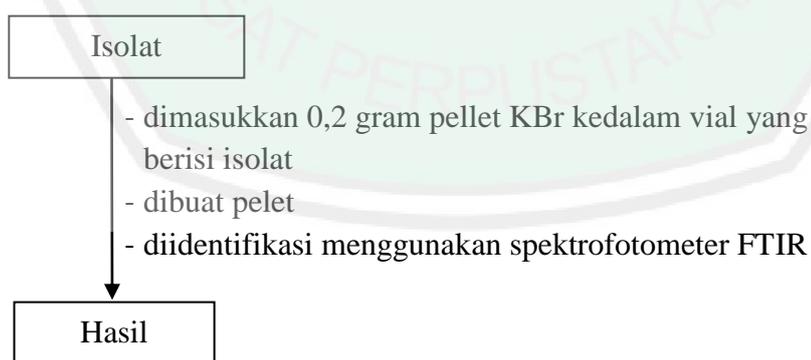
L.2.7 Uji Toksisitas Senyawa Steroid terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach

L.2.7.1 Penetasan Larva Udang *Artemia salina* Leach



L.2.7.2 Uji Toksisitas



a. Kontrol DMSO**b. Kontrol pelarut****L.2.6 Identifikasi Golongan Senyawa Steroid dengan FTIR**

Lampiran 3. Perhitungan dan Pembuatan Reagen dan Larutan

L.3.1 Kultivasi *Chlorella sp.* dalam MET

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

- a. Kultivasi dalam Erlenmeyer 1000 ml dengan Memaksimalkan Daya

Tampung Erlenmeyer

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

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

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

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

- b. Pembuatan MET 4% sebanyak 900 ml

MET = (aquades + ekstrak tauge)

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

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

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

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

$$= 864 \text{ mL}$$

- c. Kultivasi dalam Botol 1500 ml dengan Memaksimalkan Daya Tampung

Erlenmeyer

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

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

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

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

- d. Pembuatan MET 4% sebanyak 1200 ml

MET = (aquades + ekstrak taugé)

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

$$= 48 \text{ mL ekstrak taugé}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume Aquades} &= \text{MET } 4\% - (\text{Volume ekstrak taugé}) \\ &= 1200 \text{ mL} - 48 \text{ mL} \\ &= 1152 \text{ mL} \end{aligned}$$

L.3.2 Pembuatan larutan HCl 2 N

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

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

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

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

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

$$= 1 \times \frac{37 \% \times \text{BJ HCl}}{\text{BM HCl pekat}}$$
$$= \frac{37 \% \times 1190 \text{ g/L}}{36,42 \text{ g/mol}} = 12,09 \text{ N}$$

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

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

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

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

L.3.3 Pembuatan reagen Lieberman-Burchard

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

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

L.3.4 Pembuatan Larutan Senyawa Steroid untuk uji toksisitas

L.3.4.1 Pembuatan Larutan Stok 760 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm} &= \frac{\text{mg}}{\text{L}} \\ 760 \text{ ppm} &= \frac{\text{mg}}{0,005 \text{ L}} \\ \text{mg} &= 3,8 \text{ mg} \end{aligned}$$

L.3.4.2 pembuatan larutan steroid 5, 10, 15, 20, 25 dan 30 ppm

a. 5 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm}_1 \times V_1 &= \text{ppm}_2 \times V_2 \\ 760 \text{ ppm} \times V_1 &= 5 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,03289 \text{ mL} = 32,9 \mu\text{L} \end{aligned}$$

b. 10 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm}_1 \times V_1 &= \text{ppm}_2 \times V_2 \\ 760 \text{ ppm} \times V_1 &= 10 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,06578 \text{ mL} = 65,8 \mu\text{L} \end{aligned}$$

c. 15 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm}_1 \times V_1 &= \text{ppm}_2 \times V_2 \\ 760 \text{ ppm} \times V_1 &= 15 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,09868 \text{ mL} = 98,7 \mu\text{L} \end{aligned}$$

d. 20 ppm

$$\begin{aligned} \text{ppm}_1 \times V_1 &= \text{ppm}_2 \times V_2 \\ 760 \text{ ppm} \times V_1 &= 20 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,13157 \text{ mL} = 131,6 \mu\text{L} \end{aligned}$$

e. 25 ppm

$$\text{ppm}_1 \times V_1 = \text{ppm}_2 \times V_2$$

$$760 \text{ ppm} \times V_1 = 25 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,16447 \text{ mL} = 164,5 \mu\text{L}$$

f. 30 ppm

$$\text{ppm}_1 \times V_1 = \text{ppm}_2 \times V_2$$

$$760 \text{ ppm} \times V_1 = 30 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,19736 \text{ mL} = 197,4 \mu\text{L}$$



Lampiran 4. Data Pengamatan dan Perhitungan

L.4.1 Data hasil pengeringan isolat mikroalga *Chlorella sp.*

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)	Randemen (%)
1.	145,06	280,68	131,62	2,01	1,726
2.	149,44	246,02	96,58	1,29	
3.	200,69	309,21	108,52	1,82	
4.	150,23	269,74	119,06	2,75	
Total			455,78	7,87	

$$\begin{aligned}
 \text{Randemen} &= \frac{\text{Berat kering}}{\text{Berat basah}} \times 100 \% \\
 &= \frac{7,87 \text{ gr}}{455,78 \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= 0,01726 \times 100 \% \\
 &= 1,726 \%
 \end{aligned}$$

L.4.2 Data pengukuran kadar air sampel kering

Ulangan Cawan	Berat Cawan Kosong (gr)				Rata-Rata Berat Konstan (gr)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
A1	65,4845	65,4823	65,4812	65,4811	65,4815
A2	53,7868	53,7919	53,7927	53,7912	53,7919
A3	58,6865	58,6845	58,6825	58,6823	58,6831

Ulangan Sampel	Berat Cawan + Sampel				Rata-Rata Berat Konstan (gr)
	Sebelum dioven	P1	P2	P3	
A1	65,9811	65,9295	65,9267	65,9257	65,9273
A2	54,2912	54,2409	54,2421	54,2400	54,2410
A3	59,1823	59,1290	59,1309	59,1328	59,1309

1. Kadar air ulangan ke-1

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dikeringkan})-(\text{berat cawan+sampel setelah dikeringkan})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dikeringkan})-(\text{berat cawan kosong})} \times 100 \% \\ &= \frac{(65,9811-65,9273) \text{ gr}}{(65,9811-65,4815)\text{gr}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,0538 \text{ gr}}{0,4996 \text{ gr}} \times 100 \% \\ &= 10,76 \% \end{aligned}$$

2. Kadar air ulangan ke-2

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dikeringkan})-(\text{berat cawan+sampel setelah dikeringkan})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dikeringkan})-(\text{berat cawan kosong})} \times 100 \% \\ &= \frac{(54,2919-54,2410) \text{ gr}}{(54,2919-53,7919)\text{gr}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,0502 \text{ gr}}{0,4993 \text{ gr}} \times 100 \% \\ &= 10,05 \% \end{aligned}$$

3. Kadar air ulangan ke-3

$$\begin{aligned} \text{Kadar air} &= \frac{(\text{berat cawan+sampel sebelum dikeringkan})-(\text{berat cawan+sampel setelah dikeringkan})}{(\text{berat cawan+sampel sebelum dikeringkan})-(\text{berat cawan kosong})} \times 100 \% \\ &= \frac{(59,1823-59,1309) \text{ gr}}{(59,1823-58,6831)\text{gr}} \times 100 \% \\ &= \frac{0,0514 \text{ gr}}{0,4991 \text{ gr}} \times 100 \% \\ &= 10,29 \% \end{aligned}$$

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

P1 (%)	P2 (%)	P3 (%)	Total (%)	Rata-rata (%)
10,76	10,05	10,29	31,10	10,36

L.4.3 Data Randemen Hasil Maserasi

Berat sampel (gr)	Berat wadah (gr)	Berat wadah + ekstrak pekat (gr)	Berat ekstrak pekat (gr)	Randemen (%)
30,0005	65,1469	67,7278	6,5679	21,8926
	68,1975	72,1845		

$$\begin{aligned}
 \text{Randemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\
 &= \frac{6,5679 \text{ gr}}{30,0005 \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= 0,218926 \times 100 \% \\
 &= 21,8926 \%
 \end{aligned}$$

L.4.4 Data Randemen Hasil Partisi

Berat ekstrak kasar (gr)	Berat wadah (gr)	Berat wadah + ekstrak pekat (gr)	Berat ekstrak pekat (gr)	Randemen (%)
2,4922	114,6527	115,3145	1,2618	50,6299

$$\begin{aligned}
 \text{Randemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak pekat}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \% \\
 &= \frac{1,2618 \text{ gr}}{2,4922 \text{ gr}} \times 100 \% \\
 &= 0,506299 \times 100 \% \\
 &= 50,6299 \%
 \end{aligned}$$

L.4.5 Perhitungan berat senyawa steroid hasil KLTP

Berat vial kosong (gr)	Berat vial + senyawa (gr)	Berat senyawa (gr)
8,8802	8,8840	0,0038

$$\begin{aligned}
 \text{Berat Senyawa} &= (\text{Berat vial} + \text{senyawa}) - \text{Berat vial kosong} \\
 &= 8,8840 - 8,8802 \\
 &= 0,0038 \text{ gram}
 \end{aligned}$$

L.4.6. Data KLT Preparatif dan perhitungan nilai Rf masing-masing senyawa

➤ **KLTP 1 (10.000 ppm)**

No	Warna spot	Rf
1	Jingga	0,9604
2	Pink	0,9039
3	Pink	0,8361
4	Hijau kebiruan	0,7966
5	Pink	0,6949
6	Pink menyala	0,6045
7	Merah kehitaman	0,5423
8		
9	Merah kehitaman	0,3672
10	Pink menyala	0,2824
11	Pink	0,2316
12	Pink	0,1807
13	Coklat	0,1073
14	Pink	0,0819
15	Pink	0,0564

$$\text{Rf noda 1} = \frac{17 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,9604$$

$$\text{Rf noda 9} = \frac{6,5 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,3672$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{16 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,9039$$

$$\text{Rf noda 10} = \frac{4,5 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,2824$$

$$\text{Rf noda 3} = \frac{14,8 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,8361$$

$$\text{Rf noda 11} = \frac{4,1 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,2316$$

$$\text{Rf noda 4} = \frac{14,1 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,7966$$

$$\text{Rf noda 12} = \frac{3,2 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,1807$$

$$\text{Rf noda 5} = \frac{12,3 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,6949$$

$$\text{Rf noda 13} = \frac{1,9 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,1073$$

$$\text{Rf noda 6} = \frac{10,7 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,6045$$

$$\text{Rf noda 14} = \frac{1,5 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,0819$$

$$\text{Rf noda 7} = \frac{9,6 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,5423$$

$$\text{Rf noda 15} = \frac{1 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,0564$$

➤ **KLTP 2 (5000 ppm)**

No	Warna spot	Rf
1	Jingga	0,9542
2	Pink	0,8657
3	Pink	0,7714
4	Hijau kebiruan	0,7257
5	Pink	0,6171
6	Pink menyala	0,5428
7	Merah kehitaman	0,4910
8		
9	Merah kehitaman	0,3371
10	Pink menyala	0,2057
11	Pink	0,1885
12	Pink	0,1285
13	Coklat	0,0685
14	Pink	0,0571
15	Pink	0,0285

$$\text{Rf noda 1} = \frac{16,7 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,9542$$

$$\text{Rf noda 9} = \frac{5,9 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,3371$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{15,15 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,8657$$

$$\text{Rf noda 10} = \frac{3,6 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,2057$$

$$\text{Rf noda 3} = \frac{13,5 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,7714$$

$$\text{Rf noda 11} = \frac{3,3 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,1885$$

$$\text{Rf noda 4} = \frac{12,7 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,7257$$

$$\text{Rf noda 12} = \frac{2,25 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,1285$$

$$\text{Rf noda 5} = \frac{10,8 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,6171$$

$$\text{Rf noda 13} = \frac{1,9 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,0685$$

$$\text{Rf noda 6} = \frac{9,5 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,5428$$

$$\text{Rf noda 14} = \frac{1 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,0571$$

$$\text{Rf noda 7} = \frac{8,6 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,4910$$

$$\text{Rf noda 15} = \frac{0,5 \text{ cm}}{17,5 \text{ cm}} = 0,0285$$

➤ **KLTP 3 (10.000 ppm)**

No	Warna spot	Rf
1	Jingga	0,9638
2	Pink	0,8944
3	Pink	0,8388
4	Hijau kebiruan	0,7777
5	Pink	0,7388
6	Pink menyala	0,6777
7	Merah kehitaman	0,6333
8	Pink menyala	0,5555
9	Merah kehitaman	0,4777
10	Pink menyala	0,3194
11	Pink	0,2888
12	Pink	0,2222
13	Coklat	0,1388
14	Pink	0,0972
15	Pink	0,0583

$$\text{Rf noda 1} = \frac{17,35 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,9638$$

$$\text{Rf noda 9} = \frac{8,6 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,4777$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{16,1 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,8944$$

$$\text{Rf noda 10} = \frac{5,75 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,3194$$

$$\text{Rf noda 3} = \frac{15,1 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,8388$$

$$\text{Rf noda 11} = \frac{5,2 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,2888$$

$$\text{Rf noda 4} = \frac{14 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,7777$$

$$\text{Rf noda 12} = \frac{4 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,2222$$

$$\text{Rf noda 5} = \frac{13,3 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,7388$$

$$\text{Rf noda 13} = \frac{2,5 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,1388$$

$$\text{Rf noda 6} = \frac{12,2 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,6777$$

$$\text{Rf noda 14} = \frac{1,75 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,0972$$

$$\text{Rf noda 7} = \frac{11,4 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,6333$$

$$\text{Rf noda 15} = \frac{1,05 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,0583$$

$$\text{Rf noda 8} = \frac{10 \text{ cm}}{18 \text{ cm}} = 0,5555$$

➤ **KLTP 4 (10.000 ppm)**

No	Warna spot	Rf
1	Jingga	0,9519
2	Pink	0,8757
3	Pink	0,8135
4	Hijau kebiruan	0,7514
5	Pink	0,7146
6	Pink menyala	0,6610
7	Merah kehitaman	0,6129
8	Pink menyala	0,5197
9	Merah kehitaman	0,4576
10	Pink menyala	0,2994
11	Pink	0,2598
12	Pink	0,1920
13	Coklat	0,1271
14	Pink	0,0847
15	Pink menyala	0,0508

$$\text{Rf noda 1} = \frac{16,85 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,9519$$

$$\text{Rf noda 9} = \frac{8,1 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,4576$$

$$\text{Rf noda 2} = \frac{15,5 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,8757$$

$$\text{Rf noda 10} = \frac{5,3 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,2994$$

$$\text{Rf noda 3} = \frac{14,4 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,8135$$

$$\text{Rf noda 11} = \frac{4,6 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,2598$$

$$\text{Rf noda 4} = \frac{13,3 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,7514$$

$$\text{Rf noda 12} = \frac{3,4 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,1920$$

$$\text{Rf noda 5} = \frac{12,65 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,7146$$

$$\text{Rf noda 13} = \frac{2,25 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,1271$$

$$\text{Rf noda 6} = \frac{11,7 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,6610$$

$$\text{Rf noda 14} = \frac{1,5 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,0847$$

$$\text{Rf noda 7} = \frac{10,85 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,6129$$

$$\text{Rf noda 15} = \frac{0,9 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,0508$$

$$\text{Rf noda 8} = \frac{9,2 \text{ cm}}{17,7 \text{ cm}} = 0,5197$$

Lampiran 5. Data kematian larva dan perhitungan LC₅₀ uji toksisitas ekstrak metanol, ekstrak fraksi petroleum eter dan isolat senyawa steroid

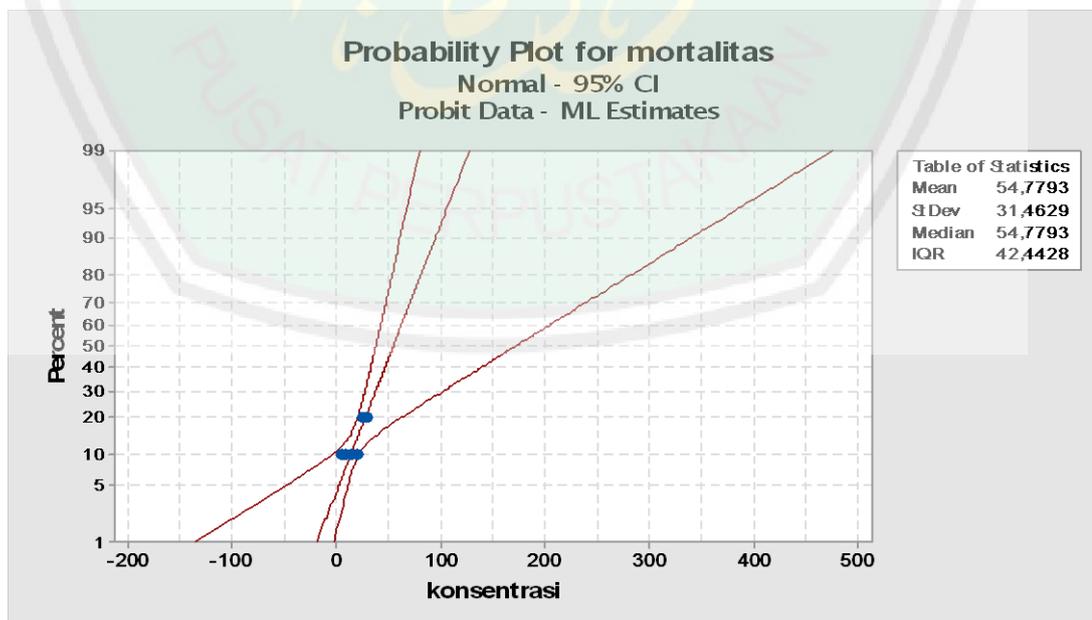
L.5.1 Ekstrak kasar metanol

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

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{\text{Tes - kontrol}}{\text{jumlah larva uji (10 ekor)}} \times 100\%$$

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

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



Probit Analysis: mortalitas; n versus konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	24
	Non-event	186
n	Total	210

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1,74108	0,250724	-6,94	0,000
konsentrasi	0,0317835	0,0123231	2,58	0,010
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -71,084

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	3,05576	5	0,691
Deviance	4,10015	5	0,535

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95,0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	54,7793	14,7219	25,9249	83,6337
StDev	31,4629	12,1988	14,7154	67,2706

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95,0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-18,4143	14,5911	-134,628	-1,75862
2	-9,83755	11,4035	-99,1840	3,39484
3	-4,39588	9,43047	-76,8024	6,77092
4	-0,302324	7,99245	-60,0698	9,41473
5	3,02747	6,87132	-46,5752	11,6814
6	5,86165	5,97137	-35,2295	13,7510
7	8,34666	5,24505	-25,4608	15,7449
8	10,5717	4,66813	-16,9534	17,7695
9	12,5953	4,22879	-9,54424	19,9388
10	14,4580	3,92081	-3,17342	22,3849
20	28,2995	5,42205	20,7982	63,9306
30	38,2801	8,67490	27,8835	104,088
40	46,8083	11,7543	33,2031	139,135
50	54,7793	14,7219	37,9819	172,087
60	62,7503	17,7315	42,6733	205,125
70	71,2784	20,9776	47,6395	240,526

80	81,2591	24,7968	53,4107	281,997
90	95,1006	30,1147	61,3717	339,554
91	96,9633	30,8317	62,4405	347,302
92	98,9869	31,6108	63,6010	355,720
93	101,212	32,4678	64,8765	364,976
94	103,697	33,4253	66,3003	375,315
95	106,531	34,5178	67,9234	387,107
96	109,861	35,8017	69,8293	400,963
97	113,954	37,3809	72,1711	417,997
98	119,396	39,4810	75,2821	440,644
99	127,973	42,7931	80,1817	476,342

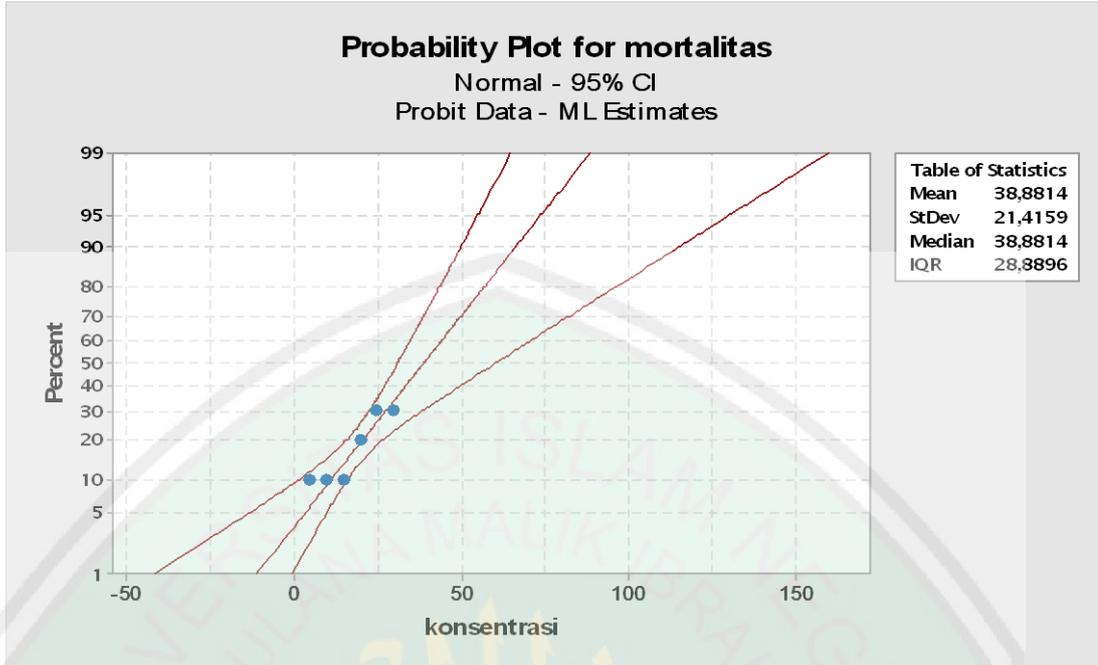
L.5.2 Ekstrak fraksi petroleum eter

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

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{\text{Tes - kontrol}}{\text{jumlah larva uji (10 ekor)}} \times 100\%$$

Mortalitas	Jumlah hewan uji (ekor)	Konsentrasi (ppm)
0	30	0
3	30	5
3	30	10
3	30	15
6	30	20
9	30	25
9	30	30

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



Probit Analysis: mortalitas; n versus konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	33
	Non-event	177
n	Total	210

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1,81554	0,249776	-7,27	0,000
konsentrasi	0,0466942	0,0119896	3,89	0,000

Natural Response 0

Log-Likelihood = -82,830

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	2,94389	5	0,709
Deviance	3,81772	5	0,576

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95,0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	38,8814	5,68907	27,7311	50,0318
StDev	21,4159	5,49894	12,9472	35,4241

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95,0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-10,9395	7,96813	-41,6772	-0,313403
2	-5,10152	6,55094	-30,0884	3,73389
3	-1,39752	5,67364	-22,7808	6,34676
4	1,38886	5,03137	-17,3205	8,34940
5	3,65536	4,52516	-12,9137	10,0131
6	5,58450	4,11012	-9,19739	11,4636
7	7,27599	3,76224	-5,97466	12,7712
8	8,79051	3,46734	-3,12714	13,9801
9	10,1679	3,21654	-0,578522	15,1206
10	11,4358	3,00403	1,72269	16,2153
20	20,8573	2,41679	16,0562	27,1158
30	27,6509	3,28759	22,6339	38,7336
40	33,4558	4,45807	27,1766	49,7383
50	38,8814	5,68907	31,1181	60,3285
60	44,3071	6,98129	34,9308	71,0476
70	50,1119	8,39962	38,9364	82,5893
80	56,9055	10,0860	43,5708	96,1505
90	66,3270	12,4512	49,9448	115,010
91	67,5949	12,7710	50,7995	117,552
92	68,9723	13,1188	51,7274	120,313
93	70,4869	13,5016	52,7470	123,350
94	72,1783	13,9294	53,8849	126,742
95	74,1075	14,4179	55,1818	130,612
96	76,3740	14,9924	56,7043	135,160
97	79,1604	15,6994	58,5745	140,753
98	82,8644	16,6403	61,0584	148,189
99	88,7023	18,1255	64,9691	159,915

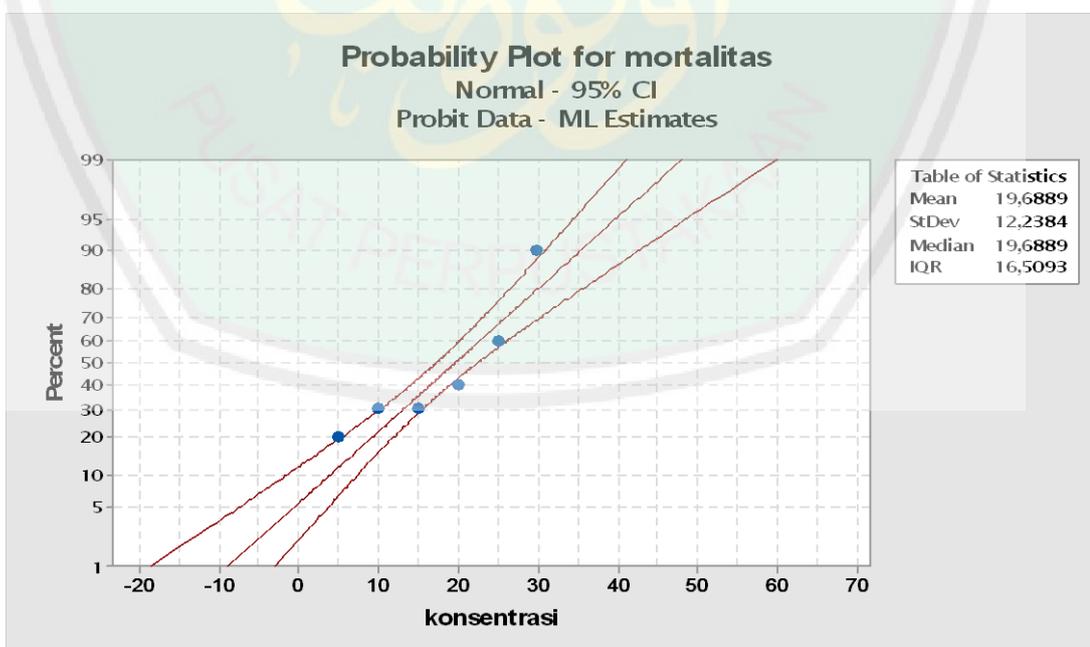
L.5.3 Isolat senyawa stroid

Konsentrasi (ppm)	Jumlah larva yang mati (ekor)				% Mortalitas
	I	II	III	Modus	
0*	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0
5	2	2	3	2	20
10	3	3	3	3	30
15	3	3	4	3	30
20	4	4	5	4	40
25	6	6	6	6	60
30	8	9	9	9	90

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{\text{Tes - kontrol}}{\text{jumlah larva uji (10 ekor)}} \times 100\%$$

Mortalitas	Jumlah hewan uji (ekor)	Konsentrasi (ppm)
0	30	0
6	30	5
9	30	10
9	30	15
12	30	20
18	30	25
27	30	30

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



Probit Analysis: mortalitas; n versus konsentrasi

Distribution: Normal

Response Information

Variable	Value	Count
mortalitas	Event	81
	Non-event	129
n	Total	210

Estimation Method: Maximum Likelihood

Regression Table

Variable	Coef	Standard Error	Z	P
Constant	-1,60879	0,212199	-7,58	0,000
konsentrasi	0,0817103	0,0111771	7,31	0,000
Natural Response	0			

Log-Likelihood = -107,260

Goodness-of-Fit Tests

Method	Chi-Square	DF	P
Pearson	9,4307	5	0,093
Deviance	10,9266	5	0,053

Tolerance Distribution

Parameter Estimates

Parameter	Estimate	Standard Error	95,0% Normal CI	
			Lower	Upper
Mean	19,6889	1,26697	17,2057	22,1722
StDev	12,2384	1,67408	9,36026	16,0014

Table of Percentiles

Percent	Percentile	Standard Error	95,0% Fiducial CI	
			Lower	Upper
1	-8,78175	3,70332	-18,5551	-2,97371
2	-5,44558	3,27515	-14,0525	-0,287272
3	-3,32889	3,00780	-11,2043	1,42574
4	-1,73659	2,80957	-9,06744	2,72015
5	-0,441376	2,65060	-7,33383	3,77759
6	0,661056	2,51720	-5,86210	4,68147
7	1,62767	2,40194	-4,57508	5,47741
8	2,49316	2,30028	-3,42583	6,19320
9	3,28029	2,20927	-2,38355	6,84710
10	4,00485	2,12688	-1,42693	7,45180
20	9,38887	1,57611	5,55569	12,0712
30	13,2711	1,29871	10,3399	15,6528
40	16,5884	1,20504	14,1189	19,0222
50	19,6889	1,26697	17,3240	22,4983
60	22,7895	1,45537	20,2551	26,2486
70	26,1067	1,75076	23,1923	30,4598

80	29,9890	2,16715	26,4836	35,5343
90	35,3730	2,80935	30,9166	42,7033
91	36,0976	2,89920	31,5063	43,6749
92	36,8847	2,99747	32,1456	44,7318
93	37,7502	3,10625	32,8471	45,8953
94	38,7168	3,22853	33,6290	47,1964
95	39,8192	3,36891	34,5190	48,6821
96	41,1145	3,53494	35,5623	50,4297
97	42,7068	3,74045	36,8422	52,5811
98	44,8235	4,01564	38,5397	55,4449
99	48,1596	4,45308	41,2077	59,9659



Lampiran 6. Dokumentasi Gambar

Gambar 1. Pembuatan medium ekstrak taube



Tauge Perebusan taube Ekstrak taube pekat Medium ekstrak taube 4%

Gambar 2. Kultivasi mikroalga *Chlorella sp.*



Gambar 3. Pemanenan Biomassa *Chlorella sp.*



Biomassa *Chlorella sp.* Biomassa sebelum disentrifuge Biomassa setelah disentrifuge Biomassa hasil sentrifuge setelah dikumpulkan

Gambar 4. Preparasi biomassa *Chlorella sp.*



Pengeringan Biomassa



Biomassa kering setelah dikumpulkan

Gambar 5. Analisis kadar air



Cawan Kosong dalam desikator



Cawan dalam oven



Cawan berisi sampel dalam desikator

Gambar 6. Ekstraksi



Proses maserasi



Penyaringan ekstrak

Gambar 7. Hidrolisis



Proses Hidrolisis ekstrak metanol dengan HCl 2 N

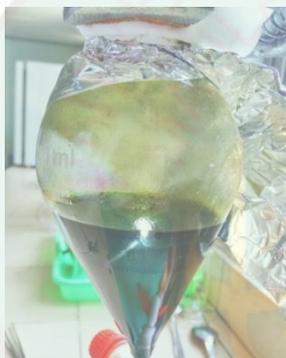


Penetralan dengan NaHCO_3



pH 7 setelah penetralan

Gambar 8. Partisi



Proses partisi ekstrak hasil hidrolisis



Pemisahan fase air dengan fase organik



Fraksi petroleum eter

Gambar 9. Uji fitokimia senyawa steroid

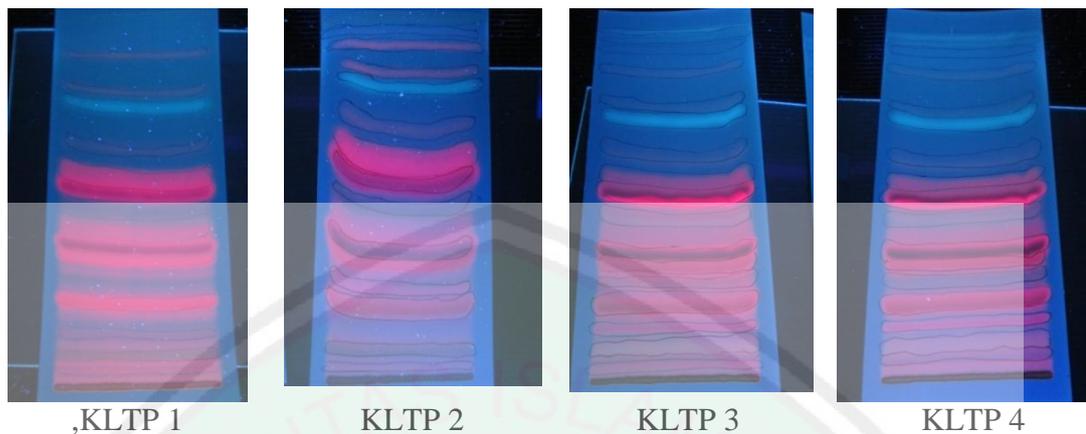


Ekstrak sebelum ditetesi reagen LB



Ekstrak setelah ditetesi reagen LB

Gambar 10. Pemisahan senyawa steroid dengan KLT preparatif



Gambar 11. Uji toksisitas

