

Skripsi

**ISOLASI SENYAWA STEROID DARI EKSTRAK *n*-HEKSANA ALGA
HIJAU *Boergesenia forbesii* DAN UJI BIOAKTIVITAS FRAKSINYA
TERHADAP *Artemia salina***

SEPTIAN PRATAMA PASERU

H311 16 307



**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

**ISOLASI SENYAWA STEROID DARI EKSTRAK *n*-HEKSANA ALGA
HIJAU *Boergesenia forbesii* DAN BIOAKTIVITAS FRAKSINYA
TERHADAP *Artemia salina***

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains*

Oleh :

**SEPTIAN PRATAMA PASERU
H311 16 307**



MAKASSAR

2022

LEMBAR PENGESAHAN (TUGAS AKHIR)

ISOLASI SENYAWA STEROID DARI EKSTRAK *n*-HEKSANA ALGA HIJAU *Boergesenia forbesii* DAN UJI BIOAKTIVITAS FRAKSINYA TERHADAP *Artemia salina*

Disusun dan diajukan oleh:

SEPTIAN PRATAMA PASERU

H31116307

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Srajana Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin pada tanggal 21 Februari 2022 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

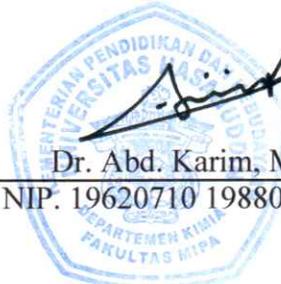
Pembimbing Pertama,


Prof. Dr. Nunuk Hariani S., M.S
NIP. 19601215 198702 2 001


Dr. Firdaus, M.S
NIP. 19600909 198810 1 001

Ketua Departemen Kimia,


Dr. Abd. Karim, M.Si
NIP. 19620710 198803 1 002



PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Septian Pratama Paseru
NIM : H311 16 307
Program Studi : Kimia
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul:

ISOLASI SENYAWA STEROID DARI EKSTRAK *n*-HEKSANA ALGA
HIJAU *Boergesenia forbesii* DAN UJI BIOAKTIVITAS FRAKSINYA
TERHADAP *Artemia salina*

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 21 Februari 2022
Yang menyatakan,



Septian Pratama Paseru

LEMBAR PERSEMBAHAN

“Tetapi carilah dahulu Kerajaan Allah dan kebenarannya, maka semuanya itu akan ditambahkan kepadamu. Sebab itu janganlah kamu kuatir akan hari besok, karena hari besok mempunyai kesusahannya sendiri. Kesusahan sehari cukuplah untuk sehari” – Matius 6:33-34

Skripsi ini saya persembahkan kepada orang-orang yang telah mendukung saya selama masa penyelesaian studi

PRAKATA

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala Berkat dan Karunia-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Isolasi Senyawa Steroid dari Ekstrak *n*-Heksana Alga Hijau *Boergesenia forbesii* dan Uji Bioaktivitas Fraksinya terhadap *Artemia salina***” sebagai salah satu syarat guna memperoleh gelar Sarjana Sains, Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa betapa banyaknya hambatan dan beratnya menyelesaikan tugas ini. Tugas ini tidak akan selesai tanpa dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang tulus kepada:

1. ibu **Prof. Dr. Nunuk Hariani S., M.S** selaku pembimbing utama dan pembimbing akademik penulis, serta bapak **Dr. Firdaus, M.S** selaku pembimbing pertama dan pembimbing akademik penulis yang dengan sabar telah meluangkan waktu, materi, tenaga, pikiran serta masukannya dalam mengarahkan penulis mulai dari penyusunan proposal hingga tersusunnya skripsi ini.
2. tim penguji sarjana, bapak **Dr. Abdul Karim, M.Si** selaku ketua penguji dan ibu **Dr. St. Fauziah, M.Si** selaku sekretaris penguji, terima kasih atas saran dan masukannya.
3. ketua Departemen Kimia, bapak **Dr. Abdul Karim, M.Si**, dan sekretaris Departemen Kimia, ibu **Dr. St. Fauziah, M.Si**, serta seluruh dosen Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin yang telah membagi ilmu kepada penulis selama

menempuh pendidikan.

4. para staf dan seluruh analis Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, terkhusus ibu **Kartini, S.Si**, selaku analis Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Kimia Terpadu (FTIR).
5. teristimewa kedua orang tua tercinta penulis ayah **Alm. Adi Paseru** dan ibu **Yenny Pongrekun** atas segala perhatian, kasih sayang, waktu, materi, pengorbanan, motivasi serta doa yang tulus yang tiada henti kepada penulis serta segenap keluarga besar penulis.
6. teman-teman seangkatan **Kimia 2016**, terkhusus saudara-saudariku **Kromofor 2016** salam“TOTALITAS HINGGA AKHIR”, kakak-kakak 2010, 2011, 2012, 2013, 2014 dan 2015 serta adik-adik 2017, 2018, 2019 dan 2020 yang tak sempat kusebutkan satu persatu.
7. kak **Bahrn**, kak **Septaria**, kak **Feli**, dan seluruh keluarga besar peneliti kimia organik atas saran, motivasi, dan dukungannya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dengan baik
8. seluruh anggota Ena-ena Squad, **Mena, Novi, Alpian, Rey, Eka, Michael, Afhdhal, Dira, Fajar**, dan **Nisya** atas dukungan dan kebersamaannya sekama hari-hari penulis di bangku kuliah.
9. **Febe Eka Risanti**, terima kasih atas dukungan, semangat, motivasi, dan hari-hari yang telah dilewati bersama penulis
10. seluruh teman-teman anggota **GMKI Kom. FMIPA Unhas dan GMKI Cab. Makassar** untuk segala cerita dan tempat penulis melakukan pelayanan bersama-sama, kiranya Sang Kepala Gerakan selalu menyertai

“Ut Omnes Unum Sint”.

11. teman angkatan 2016 di **KM FMIPA Unhas** untuk segala cerita dan kenangan yang baik. USE YOUR MIND BE THE BEST. Salam “SEPERTI SEHARUSNYA”.
12. teman-teman **KKN Gel. 102 Sumber Daya Air**, teman dari berbagai jurusan di Unhas disatukan di Kab. Maros posko Bontomanai yang menjadi bagian dalam perjalanan hidup penulis.
13. orang-orang baik yang memiliki peran baik secara langsung maupun tidak langsung dalam hidup penulis yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Penulis sadar bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih sangatlah jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang sifatnya membangun senantiasa penulis harapkan demi kesempurnaan skripsi ini. Pada akhirnya, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat dalam perkembangan ilmu kimia khususnya bidang Kimia Organik Bahan Alam.

Penulis,

Februari 2022

ABSTRAK

Penelitian tentang isolasi, identifikasi, dan elusidasi struktur senyawa metabolit sekunder golongan steroid dari ekstrak n-heksana alga hijau *B. forbesii* telah dilakukan. Teknik isolasi dengan cara maserasi, fraksinasi menggunakan kromatografi kolom tekan, dan pemurnian. Penentuan bioaktivitas fraksi didasarkan pada metode *brine shrimp lethality test* (BSLT) menggunakan larva udang *A. salina*, penentuan golongan senyawa yang diperoleh menggunakan uji fitokimia dan elusidasi strukturnya dilakukan berdasarkan analisis data spektroskopi FT-IR, ¹H-NMR, dan ¹³C-NMR. Pada penelitian ini diperoleh 8 fraksi non aktif yaitu fraksi A,B,C,D,E,F,G, dan H serta 1 fraksi aktif yaitu fraksi I. Pada fraksi D berhasil diisolasi satu senyawa golongan steroid yaitu stigmasterol.

Kata kunci : BSLT, uji fitokimia, LC₅₀, steroid, stigmasterol

ABSTRACT

Research about isolation, identification, and structure elucidation of secondary metabolites steroid type from *n*-hexane extract green algae *B. forbesii* was done. Isolation techniques was done with maceration, fractionation with flash chromatography and purification. Determination of fraction bioactivity based on brine shrimp lethality test (BSLT) method using *A. salina* shrimp larvae, determination of compound group based on phytochemical test and structure elucidation done with FT-IR, ¹H-NMR and ¹³C-NMR analysis. In this research obtained 8 inactive fraction that is fraction A,B,C,D,E,F,G, and H and 1 active fraction that is fraction I. From fraction D was isolated one steroid group that is stigmasterol.

Keywords : BSLT, LC₅₀, phytochemical test, steroid, stigmasterol

DAFTAR ISI

	Halaman
PRAKATA	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Maksud Penelitian	4
1.3.2 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Alga Laut <i>Boergesenia forbesii</i>	6
2.2 Metabolit Sekunder	7
2.2.1 Alkaloid	9
2.2.2 Triterpenoid/Steroid	10
2.2.3 Flavonoid	11
2.2.4 Saponin	11
2.2.5 Tanin	11
2.3 Potensi dan Manfaat Metabolit Sekunder Golongan Steroid	12
2.4 Isolasi Metabolit Sekunder	14
2.4.1 Ekstraksi	14
2.4.2 Skrining Fitokimia	14
2.4.3 Pemisahan Senyawa secara Kromatografi	15
2.5 Karakterisasi Senyawa	16
2.5.1 Spektrofotometri UV-Vis	16

2.5.2	Spektrofotometri Inframerah	17
2.5.3	Resonansi Magnetik Inti (RMI).....	18
2.6	Uji Toksisitas	18
2.6.1	<i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT).....	18
2.6.2	Larva Udang (<i>Artemia salina</i> Leach.).....	19
BAB III METODE PENELITIAN		21
3.1	Bahan Penelitian.....	21
3.2	Alat Penelitian.....	21
3.3	Waktu dan Tempat Penelitian.....	21
3.4	Prosedur Penelitian.....	21
3.4.1	Ekstraksi	21
3.4.2	Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Pada Ekstrak ..	22
3.4.2.1	Uji Fenolik	22
3.4.2.2	Uji Flavonoid	22
3.4.2.3	Uji Terpenoid/Steroid.....	22
3.4.2.4	Uji Alkaloid	23
3.4.2.5	Uji Saponin	23
3.4.3	Isolasi.....	23
3.4.3.1	Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom Tekan	23
3.4.3.2	Pemurnian	23
3.4.4	Karakterisasi Senyawa	24
3.4.4.1	Penentuan Titik Leleh.....	24
3.4.4.2	Penentuan Struktur Kimia.....	24
3.4.5	Uji Toksisitas (<i>Brine Shrimp Lethality Test</i>).....	24
3.4.5.1	Menetaskan Telur Udang <i>A. salina</i> Leach.....	24
3.4.5.2	Penyiapan Sampel	25
3.4.5.3	Penentuan LC ₅₀ Sampel	25
BAB IV Hasil dan Pembahasan.....		26
4.1	Hasil Penelitian	26
4.1.1	Maserasi dan Ekstraksi	26
4.1.2	Fraksinasi dan Pemurnian	26
4.1.3	Analisis BSLT	29

4.2 Pembahasan	30
4.2.1 Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi	30
BAB V Kesimpulan dan Saran	35
5.1 Kesimpulan	35
5.2 Saran	35
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN	41

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil uji fitokimia ekstrak <i>n</i> -heksana.....	26
2. Fraksi dan berat hasil fraksinasi ekstrak <i>n</i> -heksana	28
3. Perhitungan BSLT fraksi hasil fraksinasi ekstrak <i>n</i> -heksana	30
4. Data FT-IR isolat 1 dan perbandingan dengan referensi	31
5. Data ¹ H-NMR dan ¹³ C-NMR serta perbandingan dengan referensi	33

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Boergesenia forbesii</i>	6
2. Jalur Biosintesis Metabolit Sekunder	9
3. 3,4-dihidrofenetilamin	10
4. Struktur β -lawsaritol dan saringosterol	12
5. Struktur Kolesterol, β -sitosterol, dan fucosterol	13
6. Kromatogram ekstrak n-heksana eluen kloroform:n-heksana (1:1)	27
7. Kromatogram ekstrak n-heksana eluen kloroform:n-heksana (1,5:8,5)	27
8. Kromatogram hasil fraksinasi ekstrak n-heksana	28
9. Fraksi D dan setelah rekristalisasi	29
10. Kromatogram isolat 1 eluen etil asetat:n-heksana 2:8, 3:7, 4:6.....	29
11. Stigmasterol	34

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Bagan Kerja Ekstraksi <i>B. forbesii</i>	42
2. Bagan Kerja Fraksinasi, Pemurnian, Karakterisasi Ekstrak <i>B. forbesii</i> .	43
3. Bagan Kerja BSLT	44
4. Spektrum FT-IR Isolat 1	46
5. Spektrum ¹³ C-NMR Isolat 1	47
6. Spektrum ¹ H-NMR Isolat 1	48
7. Dokumentasi Penelitian	51

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

<i>B. forbesii</i>	= <i>Boergesenia forbesii</i>
<i>A. salina</i>	= <i>Artemia salina</i>
LC ₅₀	= <i>Lethality Concentration 50</i>
μL	= mikroliter
δ	= geseran kimia
ppm	= <i>part per million</i>
s	= <i>singlet</i>
d	= <i>doublet</i>
dd	= <i>doublet of doublets</i>
t	= <i>triplet</i>
m	= <i>multiplet</i>
<i>J</i>	= Konstanta kopling
KLT	= Kromatografi lapis tipis
¹ H-NMR	= <i>Proton – Nuclear Magnetic Resonance</i>
¹³ C-NMR	= <i>Carbon – Nuclear Magnetic Resonance</i>
FT-IR	= <i>Fourier Transform – Infra Red</i>
BSLT	= <i>Brine Shrimp Lethality Test</i>
R _f	= <i>Retention factor</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara kepulauan di mana dua per tiga wilayah Indonesia merupakan lautan sehingga Indonesia memiliki potensi kelautan yang sangat besar. Potensi kelautan yang dimiliki Indonesia terdiri atas sumber daya alam yang dapat diperbaharui (*renewable*) dan yang tidak dapat diperbaharui (*unrenewable*) yang keduanya sangat melimpah. Contoh sumber daya alam yang dapat diperbaharui seperti hutan *mangrove*, alga laut, terumbu karang, dan perikanan (Darsono, 1999). Alga laut yang tumbuh liar pada perairan pesisir Indonesia memiliki banyak potensi yang dapat dikembangkan lebih lanjut dalam pengobatan. Beberapa penelitian sebelumnya terhadap alga laut menunjukkan adanya berbagai metabolit sekunder yang memiliki sifat bioaktif, bahkan telah ditemukan beberapa molekul yang bermanfaat sebagai antikanker, antibakteri, dan antivirus. Salah satu metabolit sekunder yang telah dikenal luas memiliki potensi dalam pengobatan merupakan metabolit sekunder golongan steroid.

Steroid merupakan golongan metabolit sekunder yang kerangka dasarnya terdiri atas rantai karbon dengan empat cincin, tiga cincin sikloheksana dan satu cincin siklopentana. Pengelompokan steroid didasarkan pada gugus yang terikat pada kerangka dasar rantai karbonnya (Kristanti dkk., 2008). Steroid terdapat pada hewan, tanaman tingkat tinggi, bahkan terdapat pula pada beberapa tanaman tingkat rendah. Secara umum, steroid digunakan dalam pengobatan sebagai kardiotonik, prekursor vitamin D, kontrasepsi oral, dan antiinflamasi. Steroid pada

alga laut, utamanya pada alga hijau memiliki potensi dalam bidang pengobatan. Alga hijau *Ulva prolifera* mengandung steroid jenis kolesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol. β -sitosterol berperan dalam mengurangi kadar kolesterol dalam darah (Rudkowska dkk., 2008) dan stigmasterol memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi (Gabay dkk., 2017) dan antioksidan (Yoshida dkk., 2003). Alga hijau *Ulva australis* mengandung etilkolesterol dan isofucosterol yang berperan dalam menghambat berkurangnya aktivitas enzim pada metabolisme tubuh (Li dkk., 2017). Alga hijau *Ulva clathrata* mengandung fucosterol yang memiliki potensi sebagai antidiabetes, antioksidan, antiinflamasi dan antikanker (Abdul dkk., 2016). Salah satu alga hijau yang memiliki potensi untuk digali lebih jauh mengenai metabolit sekunder yaitu alga hijau *Boergesenia forbesii* (Harvey) Feldmann terutama golongan steroidnya.

Boergesenia forbesii (Harvey) Feldmann merupakan alga liar yang tumbuh di pesisir pantai. *B. forbesii* tersebar di beberapa wilayah di Indonesia, seperti di Sulawesi Selatan (Palallo, 2013) dan Jawa Barat (Setiawati dkk., 2017). Menurut penelitian Rumengan dkk. (2014), ekstrak etanol *B. forbesii* terbukti memiliki aktivitas antipiretik dan pada penelitian yang dilakukan oleh Melati (2021), ekstrak metanol *B. forbesii* memiliki aktivitas antioksidan. Pada ekstrak metanol *B. forbesii* telah berhasil diidentifikasi beberapa metabolit sekunder melalui uji GC-MS. Senyawa tersebut antara lain *methyl stearate*, *phytol*, *methyl arachidonate*, dan *9-octadecenamide* (Melati, 2021). Untuk mengetahui ekstrak atau fraksi dari alga hijau *B. forbesii* memiliki sifat toksik maka dilakukan uji *brine shrimp lethality test* (BSLT).

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) merupakan salah satu metode pendahuluan untuk menentukan suatu ekstrak atau isolat bersifat toksik. Metode BSLT dilakukan sebagai uji pendahuluan karena sederhana, cepat, mudah, murah, dan hasilnya representatif (Kurniawan, 2012). Penelitian yang dilakukan oleh Carballo dkk. (2012) menunjukkan adanya korelasi positif antara metode BSLT dengan uji sitotoksik menggunakan kultur sel kanker sehingga dapat disimpulkan bahwa apabila suatu ekstrak atau fraksi bersifat toksik maka dapat bersifat sebagai antikanker. Apabila ekstrak atau fraksi tidak bersifat toksik maka dapat dikembangkan ke penelitian lebih lanjut untuk mengetahui bioaktivitas lain dari ekstrak atau fraksi tersebut.

Penelitian ini bertujuan untuk menggali informasi lebih lanjut mengenai metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak *n*-heksana alga hijau *B. forbesii*, terutama golongan steroid dan toksisitas fraksinya terhadap *A. salina* Leach. Ekstrak *n*-heksana menjadi ekstrak yang diteliti karena seperti pada beberapa penelitian yang dilakukan oleh Ahmed dkk. (2013), Yana dkk. (2019), dan Mashunah dkk. (2020) bahwa isolat steroid yang didapatkan berasal dari ekstrak *n*-heksana. Hal ini disebabkan karena kebanyakan steroid bersifat non polar dan bersifat hidrofobik sehingga cenderung mudah larut pada pelarut yang bersifat non polar (Lednicer, 2011). Pada penelitian ini telah dilakukan penentuan golongan metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak *n*-heksana, penentuan toksisitas fraksi dari ekstrak *n*-heksana, mengisolasi metabolit sekunder golongan steroid dari fraksi non aktif ekstrak *n*-heksana, dan penentuan struktur molekul steroid yang berhasil diisolasi.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang ditemukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. golongan metabolit sekunder apa saja yang terdapat dalam ekstrak *n*-heksana alga hijau *B. forbesii*?
2. bagaimana bioaktivitas fraksi dari ekstrak *n*-heksana alga hijau *B. forbesii* terhadap *Artemia salina*?
3. metabolit sekunder golongan steroid apa yang dapat diisolasi dari ekstrak *n*-heksana alga hijau *B. forbesii*?
4. bagaimana struktur molekul metabolit sekunder golongan steroid yang berhasil diisolasi dari ekstrak *n*-heksana alga hijau *B. forbesii*?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah untuk mengetahui golongan metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak *n*-heksana alga hijau *B. forbesii*, bioaktivitas fraksi dari ekstrak *n*-heksana alga hijau *B. forbesii*, dan struktur metabolit sekunder golongan steroid yang berhasil diisolasi.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini yaitu:

1. menentukan golongan metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak *n*-heksana alga hijau *B. forbesii*
2. menentukan LC_{50} fraksi dari ekstrak *n*-heksana alga hijau *B. forbesii* berdasarkan analisis BSLT

3. mengisolasi dan mengidentifikasi metabolit sekunder golongan steroid dari ekstrak *n*-heksana alga hijau *B. forbesii*
4. menentukan struktur molekul dari metabolit sekunder golongan steroid yang berhasil diisolasi dari ekstrak *n*-heksana alga hijau *B. forbesii*

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini yaitu:

1. memberikan pemahaman mengenai metode isolasi metabolit sekunder *B. forbesii*.
2. Memberikan informasi tentang jenis dan potensi metabolit sekunder dari ekstrak *n*-heksana alga hijau *B. forbesii*

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga Laut *Boergesenia Forbesii*

Boergesenia forbesii merupakan alga hijau yang tumbuh liar dan tersebar di Indonesia, seperti pada wilayah Makassar Sulawesi Selatan (Palallo, 2013) dan Cianjur Jawa Barat (Setiawati dkk., 2017).

Klasifikasi *Boergesenia forbesii* menurut *World Register of Marine Species* (2020) sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Viridiplantae
Division : Chlorophyta
Subdivision : Chlorophytina
Class : Ulvophyceae
Order : Cladophorales
Family : Siphonocladaceae
Genus : *Boergesenia*
Species : *Boergesenia forbesii*



Gambar 1. *Boergesenia forbesii*

Menurut penelitian dari Rumengan dkk.,2014, ekstrak etanol *Boergesenia forbesii* terbukti memiliki aktivitas antipiretik. Uji aktivitas antipiretik dilakukan dengan menggunakan metode menaikkan suhu tubuh mencit dengan menggunakan pepton 10%, kemudian dimasukkan ekstrak etanol ke dalam mencit dan dilakukan pengukuran suhu selama 120 menit, dimana menggunakan kontrol positif parasetamol. Penelitian yang dilakukan oleh Melati, 2021 *B. forbesii* memiliki aktivitas antioksidan pada ekstrak metanolnya dengan nilai IC_{50} 585,79 ppm menggunakan metode DPPH. Penelitian yang dilakukan oleh Arbi dkk., 2016 pada alga hijau *Ulva lactuca* yang memiliki kelas yang sama dalam tingkatan taksonomi dengan *B. forbesii*, mengandung aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dengan IC_{50} 60,975 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat senyawa metabolit sekunder dalam alga hijau *B. forbesii* yang aktif untuk pengobatan.

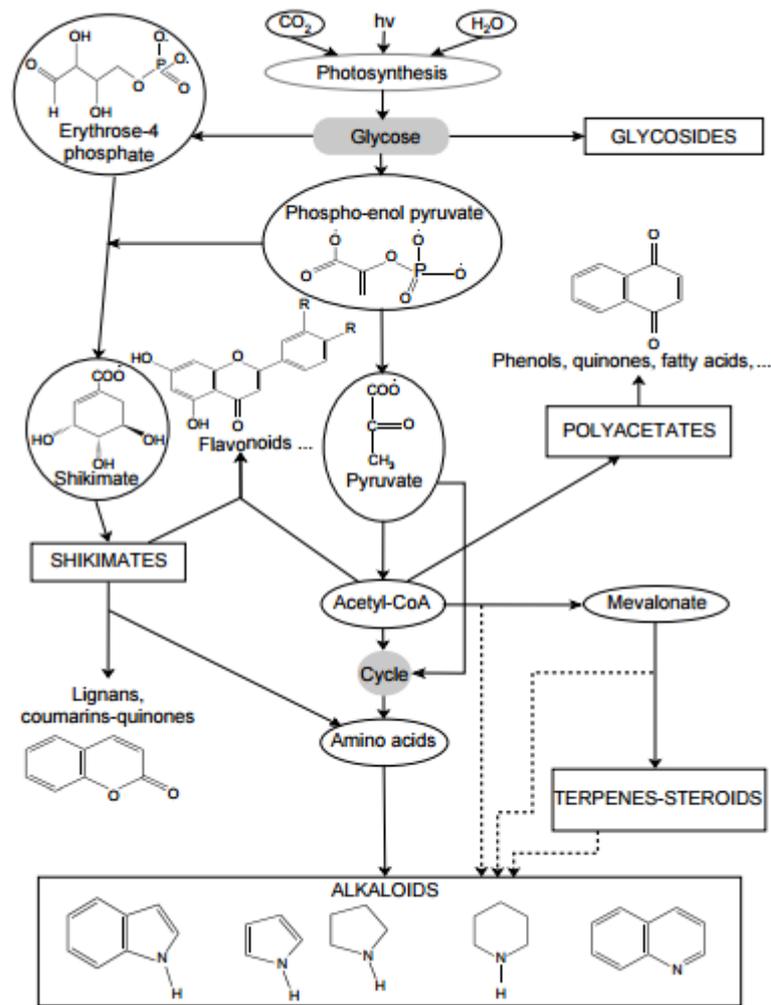
Senyawa yang berhasil diidentifikasi pada ekstrak metanol *B. forbesii* melalui uji GC-MS dan memiliki kelimpahan yang cukup besar diantaranya *methyl stearate*, *phytol*, *methyl arachidonate*, dan *9-octadecenamide* (Melati, 2021). *Methyl stearate* memiliki aktivitas antikanker (Hady dkk., 2017), *phytol* memiliki aktivitas sebagai antioksidan (Syad dkk., 2016), antikanker (Lakshmi dkk., 2016), dan antimikroba (Kumar dkk., 2010), *methyl arachidonate* memiliki aktivitas sebagai *vascular reactivity* (Hady dkk., 2017), dan *9-octadecenamide* memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi dan antibakteri (Idan dkk., 2015).

2.2 Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder merupakan senyawa dalam jumlah terbatas dalam tubuh organisme yang tidak dibutuhkan untuk hidup, namun memiliki peran

dalam interaksi organisme dengan lingkungannya dan memastikan organisme untuk bertahan hidup dalam ekosistem (Verpoorte dan Alfermann, 2000). Metabolit sekunder dapat diklasifikasikan berdasarkan struktur kimianya (seperti memiliki cincin atau bagian gula), komposisi (seperti mengandung nitrogen atau tidak), jalur biosintesis, atau kelarutannya dalam pelarut yang beragam. Secara sederhana metabolit sekunder dapat dibagi menjadi tiga yaitu terpenoid, fenolik, dan senyawa yang mengandung nitrogen (Waksmundzka-Hajnos dkk., 2008).

Metabolit sekunder memiliki tiga jalur utama biosintesis, yaitu jalur asam shikimat, jalur asam mevalonat, dan jalur asetat malonat (**Gambar 2**). Jalur biosintesis metabolit sekunder berasal dari berbagai prekursor metabolisme primer. Prekursor adalah molekul yang digunakan oleh enzim biosintetik sebagai substrat dan dikonversi menjadi suatu produk yang mana produk ini dapat berupa produk intermediet atau produk akhir (Anggraito, 2018).

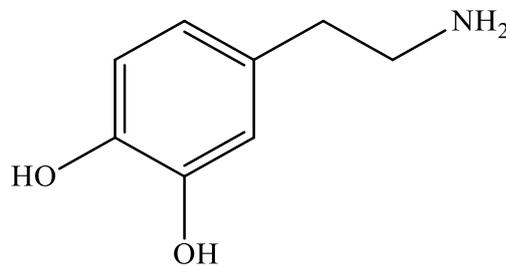


Gambar 2. Jalur Biosintesis Metabolit Sekunder (Waksmundzka-Hajnos dkk., 2008)

2.2.1 Alkaloid

Alkaloid merupakan suatu golongan senyawa organik terbanyak yang ditemukan di alam. Semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom nitrogen yang biasanya bersifat basa dan dalam sebagian besar atom nitrogen ini merupakan bagian dari cincin heterosiklik. Hampir semua alkaloid yang ditemukan di alam mempunyai keaktifan biologis tertentu, ada pula yang sangat berguna dalam pengobatan (Kristanti dkk., 2008). Alkaloid dapat ditemukan dalam berbagai bagian tumbuhan seperti biji, daun, ranting dan kulit batang.

Alkaloid memiliki sifat fisika dan kimia yaitu berupa kristal, amorf dan cair (nikotina dan sparteina), tidak berwarna, larut dalam pelarut organik (bentuk basa). Selain itu garam alkaloid larut dalam air, dan tidak larut dalam pelarut organik. Beberapa senyawa alkaloid yang berhasil diisolasi dari alga hijau diantaranya 3,4-dihidrofenetilamin dari *Monostroma fuscum* (Guyen dkk., 2010) dan caulerpin dari *Caulerpa racemosa*, *C. sertularioides*, dan *C. serrulata* (Aguilar-Santos, 1970).



Gambar 3. 3,4-dihidrofenetilamin (Guyen dkk., 2010)

2.2.2 Triterpenoid/ Steroid

Steroid adalah golongan senyawa triterpenoid yang mengandung inti siklopentana perhidrofenantren dan terdiri dari tiga cincin sikloheksana dan sebuah cincin siklopentana. Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari enam satuan isopren dan secara biosintesis dirumuskan dari hidrokarbon yang kebanyakan berupa alkohol, aldehida dan asam karboksilat. Senyawa ini tidak berwarna, berbentuk kristal, titik leleh tinggi dan bersifat optis aktif (Kristanti dkk., 2008). Salah satu senyawa steroid yang berhasil diisolasi dari alga hijau yaitu 3-O-beta-D-glukopiranosil-stigmasta-5,25-dien dari *Ulva lactuca* (Awad, 2000).

2.2.3 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang banyak terdapat di tumbuh-tumbuhan. Selain itu, flavonoid merupakan senyawa fenil propanoid dengan kerangka karbon C₆-C₃-C₆, yang memiliki arti kerangka karbonnya terdiri dari dua gugus C₆ disambung dengan rantai alifatik tiga karbon. Sebagian besar senyawa flavonoid ditemukan di alam dalam bentuk glikosida, dimana unit flavonoid terikat pada suatu gula (Kristanti dkk., 2008). Flavonoid dapat dibedakan menjadi beberapa kelas diantaranya flavon (flavanon, apigenin, dan luteolin), flavonol (kuersetin, kaemperol, mirisetin, dan fisetin) dan flavanon (hesperetin dan naringenin). Pembagian ini didasarkan pada tingkat oksidasi dan susunan substituen yang terikat pada cincin karbon (Kumar dan Pandey, 2013).

2.2.4 Saponin

Saponin merupakan kelompok senyawa dalam bentuk glikosida terpenoid/steroid. Saponin terdapat pada seluruh bagian tanaman dengan konsentrasi tinggi pada bagian-bagian tertentu dan dipengaruhi oleh varietas tanaman. Dikenal dua jenis saponin, yaitu glikosida triterpenoid alkohol dan glikosida struktur steroid tertentu yang mempunyai rantai samping spiroketal. Kedua jenis saponin ini larut dalam air dan etanol, tetapi tidak larut dalam eter. Saponin triterpenoid mempunyai asam oleanolat sebagai aglikonnya (Kristanti dkk., 2008). Beberapa alga hijau yang mengandung saponin diantaranya *Ulva lactuca* dan *Ulva reticulata* (Leelavthi dan Prasad, 2015).

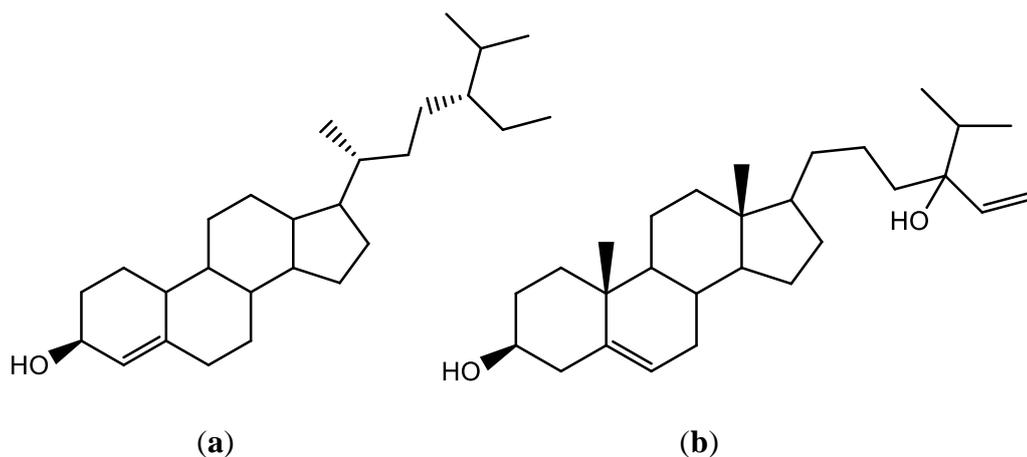
2.2.5 Tanin

Tanin adalah suatu senyawa fenolik dengan berat molekul cukup tinggi yang mengandung hidroksil dan kelompok lain yang cocok (seperti karboksil)

untuk membentuk kompleks yang efektif dengan protein dan makro molekul yang lain di bawah kondisi lingkungan tertentu yang dipelajari. Tanin merupakan bentuk kompleks dari protein, pati, selulosa dan mineral. Tanin mempunyai struktur dengan formula empiris $C_{72}H_{52}O_{46}$ (Kristanti dkk., 2008).

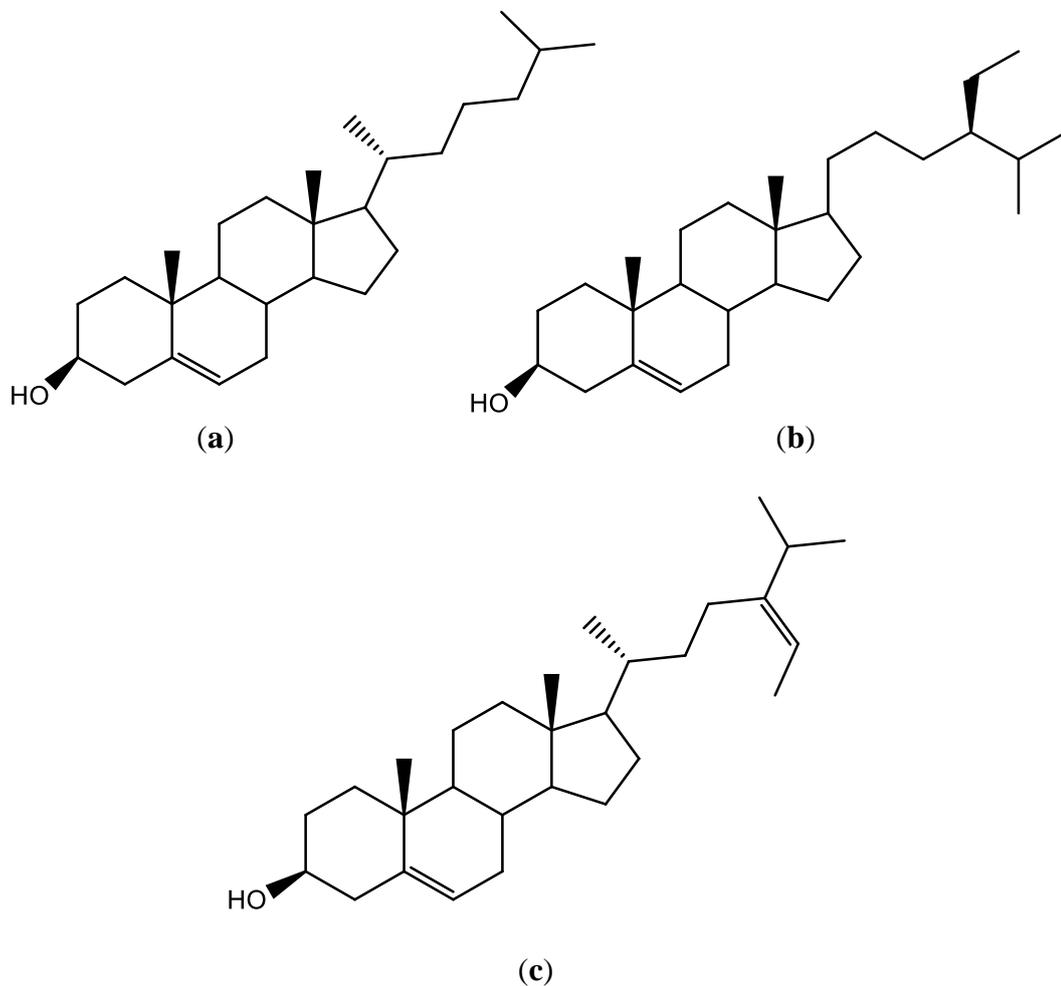
2.3 Potensi dan Manfaat Metabolit Sekunder Golongan Steroid

Steroid yang berhasil diisolasi dari alga hijau memiliki banyak potensi untuk dikembangkan dalam pengobatan. Berdasarkan penelitian dari Shi dkk. (2008), beberapa metabolit sekunder golongan steroid yang berhasil diisolasi dari alga hijau *Chaetomorpha basiretorsa* yaitu β -lawsaritol, saringosterol, dan β -stigmasterol. Struktur β -lawsaritol dan saringosterol ditunjukkan pada **Gambar 4**. Saringosterol memiliki aktivitas terhadap bakteri penyebab tuberkulosis (Wächter dkk., 2001), β -lawsaritol memiliki aktivitas antiinflamasi (Gupta dkk., 1993), dan β -stigmasterol memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi (Gabay, dkk., 2010) dan antioksidan (Yoshida, dkk., 2003).



Gambar 4. Struktur β -lawsaritol (a) dan saringosterol (b) (Shi, dkk., 2008)

Pada alga hijau *Ulva prolifera* berhasil diisolasi beberapa metabolit sekunder golongan steroid yaitu kolesterol dan β -sitosterol (Geng dkk., 2019) dan pada alga hijau *Ulva clathrata* berhasil diisolasi fucosterol dan isofucosterol (Corral-Rosales dkk., 2019). Struktur kolesterol, β -sitosterol, dan fucosterol ditunjukkan pada **Gambar 5**. β -sitosterol memiliki potensi untuk mengurangi *benign prostatic hyperplasia* (Kim dkk., 2012) dan mengurangi kadar kolesterol dalam darah (Rudkowska dkk., 2008), serta fucosterol memiliki potensi sebagai antidiabetes, antioksidan, antiinflamasi, dan antikanker (Abdul dkk., 2016).



Gambar 5. Struktur Kolesterol (a), β -sitosterol (b) (Geng dkk., 2019), dan fucosterol (c) (Corral-Rosales dkk., 2019)

2.4 Isolasi Metabolit Sekunder

2.4.1 Ekstraksi

Salah satu metode ekstraksi yang cukup umum digunakan yaitu metode maserasi. Maserasi memiliki efektivitas sesuai dengan waktu dan suhu saat maserasi dilakukan. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yulianingtyas dan Kusmartono (2016) serta Amelinda dkk. (2018), maserasi memiliki waktu optimum saat dilakukan. Apabila maserasi yang dilakukan terlalu cepat atau terlalu lama, maka hasil maserasi tidak optimal. Suhu lingkungan pada maserasi akan mempengaruhi hasil maserasi yang dihasilkan (Chairunnisa dkk., 2019). Hal ini disebabkan oleh semakin tinggi suhu, maka akan menyebabkan gerakan partikel ke pelarut semakin cepat dan mempengaruhi koefisien transfer massa (Damanik dkk., 2014). Selain itu, kenaikan suhu juga mempengaruhi permeabilitas sel semakin lemah sehingga memudahkan pelarut untuk mengekstrak zat dalam sampel (Ramadhan dan Phasa, 2010).

2.4.2 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan salah satu metode analisis yang bertujuan untuk mengetahui adanya metabolit sekunder dalam suatu sampel. (Agustina, 2017). Beberapa metabolit sekunder diantaranya flavonoid, alkaloid, saponin, terpenoid, dan steroid dapat diketahui dengan menggunakan skrining fitokimia.

Menurut Harborne (1987), flavonoid dapat diuji dengan cara ekstrak suatu sampel ditambahkan HCl pekat sebanyak 2 tetes, kemudian dikocok kuat lalu ditambahkan serbuk Mg dan dikocok kuat lagi. Sampel positif mengandung flavonoid apabila terdapat buih dan sampel berwarna jingga. Alkaloid dapat diuji dengan cara ekstrak suatu sampel dibagi menjadi dua tabung terpisah, kemudian

salah satu tabung ditambahkan pereaksi Dragendorff dan tabung lainnya ditambahkan pereaksi Wagner. Sampel positif mengandung alkaloid apabila tabung yang ditambahkan pereaksi Dragendorff menghasilkan endapan kemerahan dan tabung yang ditambahkan pereaksi Wagner menghasilkan endapan kecoklatan.

Saponin dapat diuji dengan cara sampel diekstraksi menggunakan kloroform amoniakal dan dikocok kuat-kuat. Apabila timbul busa ditambahkan HCl 2N dan dikocok kuat-kuat kembali. Sampel positif mengandung saponin apabila terdapat busa yang banyak dan bertahan hingga sepuluh menit. Terpenoid dan steroid dapat diuji dengan cara sampel diekstraksi menggunakan kloroform kemudian ekstrak diteteskan ke plat tetes dan didiamkan hingga kering. Ekstrak yang telah kering kemudian diteteskan asam sulfat pekat dan asam asetat anhidrat. Sampel positif mengandung terpenoid apabila mengalami perubahan warna menjadi merah atau coklat dan positif mengandung steroid apabila mengalami perubahan warna menjadi biru, ungu atau hijau.

2.4.3 Pemisahan Senyawa secara Kromatografi

Kromatografi merupakan salah satu teknik pemisahan suatu campuran berdasarkan perbedaan laju senyawa yang dibawa oleh fasa gerak melalui fasa diam. Fasa gerak merupakan fasa yang bergerak melalui fasa diam dan membawa analit dalam campuran tersebut. Fasa gerak dapat berupa gas, cairan, atau cairan superkritis. Fasa diam merupakan fasa yang diam baik di dalam suatu kolom maupun plat yang akan dilalui oleh fasa gerak (Skoog dkk., 2014).

Salah satu jenis kromatografi yang sering digunakan dan yang paling sederhana yaitu kromatografi lapis tipis (Sherma dan Fried, 1996). Kromatografi

lapis tipis secara umum memiliki efisiensi pemisahan yang cukup rendah dibandingkan dengan metode kromatografi dengan instrumen seperti kromatografi gas dan kromatografi cair kinerja tinggi (Kowalska dan Sherma, 2007).

Kromatografi lapis tipis dapat digunakan sebagai kontrol kemurnian dari suatu senyawa, seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Naufal dkk. (2017) dan Fajri dan Handayani (2017). Selain itu, kromatografi lapis tipis juga dapat digunakan sebagai penentuan eluen terbaik sebelum melakukan fraksinasi, seperti yang dilakukan oleh Muharni dkk. (2015).

Pemisahan suatu senyawa dapat dilakukan menggunakan salah satu jenis kromatografi yaitu kromatografi kolom. Kromatografi kolom diterapkan secara luas untuk memisahkan metabolit sekunder. Pemisahan terjadi karena perbedaan daya serap fasa diam terhadap komponen sampel yang digerakkan oleh fasa gerak. Komponen yang berinteraksi paling lemah dengan fasa diam akan keluar terlebih dahulu sedangkan yang interaksinya paling kuat akan keluar paling akhir (Ibrahim dan Sitourus, 2013).

2.5 Karakterisasi Senyawa

2.5.1 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis merupakan salah satu teknik analisis spektroskopi yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat (190-380) dan sinar tampak (380-780) dengan memakai instrumen spektrofotometer. Spektrofotometri UV-Vis melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometri UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif ketimbang kualitatif (Mulja dan Suharman, 1995).

Spektrofotometri UV-Vis digunakan sebagai uji kualitatif dalam penentuan jenis metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak. Pada penelitian yang dilakukan oleh Dhivya dan Kalaichelvi (2017), ekstrak etanol tumbuhan *Acmella calva*, *Carmona retusa* dan *Leptadenia reticulata* memiliki kandungan flavonoid karena memiliki *peak* pada 304 dan 237 nm.

2.5.2 Spektrofotometri Inframerah

Spektroskopi Inframerah dapat membantu dalam mengidentifikasi jenis ikatan yang terdapat dalam suatu senyawa sehingga mampu memperkirakan gugus fungsi ada dalam suatu struktur (Fessenden, 2010). Daerah spektrum inframerah ke kiri yaitu antara $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ disebut daerah gugus fungsi. Bagian spektrum ini menunjukkan absorpsi yang timbul karena adanya ikatan dan gugus dari senyawa. Puncak absorpsi dalam daerah spektrum ini dengan mudah dikenal berasal dari gugus fungsi yang khas. Sementara itu, daerah spektrum inframerah ke kanan yaitu $<1.400\text{ cm}^{-1}$ disebut daerah sidik jari. Banyaknya jumlah ikatan dalam molekul berarti bahwa data yang diperoleh sangat kompleks dan memberikan identitas sidik jari yang unik dan sukar diartikan dalam molekul tersebut (Watson, 2007).

Spektrofotometri inframerah digunakan secara luas untuk menentukan jenis metabolit sekunder yang berhasil diisolasi. Pada penelitian yang dilakukan oleh Khairuddin dkk. (2018), isolat yang didapatkan merupakan senyawa alkaloid karena memiliki spektrum *bending* N – H pada bilangan gelombang $3020,63\text{ cm}^{-1}$, dan pada penelitian yang dilakukan oleh Rumoroy dkk. (2019), isolat yang didapatkan merupakan senyawa fenolik karena memiliki spektrum gugus –OH pada $3580\text{ – }3649\text{ cm}^{-1}$ dan spektrum C=C pada $1620\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$.

2.5.3 Resonansi Magnetik Inti (RMI)

Spektroskopi resonansi magnetik inti memberikan keterangan tentang jumlah setiap jenis hidrogen/karbon. RMI juga memberikan informasi tentang sifat lingkungan dari setiap jenis hidrogen/karbon tersebut (Sastrohamidjojo, 2013). RMI melibatkan perubahan keadaan perputaan momen inti magnetik, ketika intinya mengabsorpsi radiasi elektromagnetik dalam suatu medan magnet. Dua jenis spektroskopi RMI yang digunakan adalah RMI ^1H (proton) dan RMI ^{13}C (karbon-13). Perputaran dari suatu partikel yang bermuatan akan membentuk suatu medan magnet. Isotop dengan inti yang berputar mempunyai medan magnet kecil, kekuatan dan arah inti ini dapat digambarkan oleh suatu vektor yang disebut momen magnet (Fessenden dan Fessenden, 2010).

2.6 Uji Toksisitas

2.6.1 *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) adalah metode yang menggunakan udang laut (*A. salina* Leach) yang mana diajukan sebagai suatu *bioassay* sederhana untuk penelitian produk alamiah. Metode ini menggunakan hewan uji *A. salina* Leach yang merupakan udang-udangan primitif, sederhana dan efektif dalam ilmu biologi dan toksikologi (McLaughlin, 1991).

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) memiliki keuntungan yaitu hasilnya yang diperoleh lebih cepat (24 jam), tidak mahal, mudah pengerjaannya dari pengujian lainnya karena tidak membutuhkan peralatan, latihan khusus, dan sampel yang digunakan relatif sedikit. Efek toksik dapat

diketahui atau diukur dari kematian larva karena pengaruh bahan uji (Mayer dkk., 1982).

Uji toksisitas dengan metode BSLT ini merupakan uji toksisitas akut dimana efek toksik dari suatu senyawa dapat ditentukan dalam waktu singkat, yaitu rentang waktu selama 24 jam setelah pemberian dosis uji. Toksisitas adalah efek berbahaya dari bahan kimia atau suatu obat pada organ target. Umumnya setiap senyawa kimia mempunyai potensi terhadap timbulnya gangguan atau kematian jika diberikan kepada organisme hidup dalam jumlah yang cukup (Mayer dkk., 1982).

Angka kematian hewan coba dihitung sebagai *Median Lethal Dose* (LD₅₀) atau *Median Lethal Concentration* (LC₅₀). Penggunaan LC₅₀ dimaksudkan untuk pengujian ketoksikan dengan perlakuan terhadap hewan coba secara inhalasi atau menggunakan media air. Kematian pada hewan percobaan digunakan sebagai pedoman untuk memperkirakan dosis kematian pada manusia (Mayer dkk., 1982).

Suatu senyawa dinyatakan mempunyai potensi toksisitas akut jika mempunyai harga LC₅₀ kurang dari 1000 µg/mL(ppm). LC₅₀ (*Lethal Concentration 50*) merupakan konsentrasi zat yang menyebabkan terjadinya kematian pada 50 % hewan percobaan yaitu larva *Artemia salina* Leach.

Pengujian BSLT terhadap ekstrak metanol *B. forbesii* yang dilakukan oleh Melati (2021) berdasarkan metode yang dilakukan oleh Meyer (1982), diketahui bahwa nilai LC₅₀ ekstrak metanol *B. forbesii* sebesar 508,74 ppm. Berdasarkan hal ini maka ekstrak metanol *B. forbesii* memiliki sifat toksik terhadap larva *A. salina*.

2.6.2 Larva Udang (*Artemia salina* Leach)

Klasifikasi larva udang (*Artemia salina* Leach) menurut Mudjiman (1998) sebagai berikut:

Kingdom : Animalia
Filum : Arthropoda
Divisio : Crustaceae
Subdivisio : Branchiopoda
Ordo : Anostraca
Famili : Artemiidae
Genus : *Artemia*
Species : *Artemia salina* Leach.

Udang (*Artemia salina* Leach) mengalami beberapa fase hidup, tetapi secara jelas dapat dilihat dalam tiga bentuk yang sangat berlainan, yaitu bentuk telur, larva dan artemia dewasa. Telur yang baru dipanen dari alam berbentuk bulat dengan ukuran 0,2-0,3 mm. Telur yang menetas akan berubah menjadi larva. Telur yang baru menetas ini berukuran kurang lebih 300 μ . Dalam pertumbuhannya larva mengalami 15 kali perubahan bentuk yang merupakan satu tingkatan hidup, setelah itu berubah menjadi artemia dewasa (Mudjiman, 1998).

Waktu yang diperlukan sampai menjadi artemia dewasa umumnya sekitar dua minggu. Berbentuk silinder dengan panjang 12-15 mm. Tubuh terbagi atas bagian kepala, dada dan perut. Pada bagian kepala terdapat dua tangkai mata, dua antena dan dua antenula. Dada terbagi atas 12 segmen yang masing-masing mempunyai sepasang kaki renang. Perut terbagi atas 8 segmen. Dapat hidup dalam air dengan suhu 25-30°C dan pH sekitar 8-9 (Mudjiman, 1998).