3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan adalah mikroalga *Chlorella vulgaris* yang didapat dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau Jepara. Sedangkan biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* strain ATCC 6538 dengan kepadatan 10^6 koloni/mL yang merupakan koleksi bakteri dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: sebagai pelarut digunakan etanol p.a (*merck*), etil asetat p.a (*merck*), dan N-Heksan p.a (*merck*). Bahan-bahan pendukung yang digunakan adalah paku steril yang berdiameter 6 mm, cotton swap, aquades, media MHA (*Mueller Hinton Agar*) dengan merek "*merck*" untuk menumbuhkan bakteri *Staphylococcus aureus*, media MHB (*Mueller Hinton Broth*) dengan merek "*oxoid*", kertas saring, kertas label, alumunium foil, Nafis 0,9%, tali, alkohol, spirtus dan plastik.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat untuk ekstraksi antara lain timbangan digital (Mettler Toledo AL 204), gunting, mortar, beaker glass 250 mL, erlenmeyer 250 mL dengan merek "*pyrex*", gelas ukur 100 mL dengan merek "*pyrex*", corong, *hot plate* (Model IKA RH Basic 2), inkubator (Binder BD 53 Germany), *magnetic stirrer* (Model IKA Big squid star), spatula, botol sampel, pipet volume 1 mL dan 10 mL, pipet tetes, corong, *shaker waterbath* (Model Memmert WNB 14), dan *rotary evaporator* (IKA RV 10 D S99 vv 2000). Peralatan yang digunakan untuk analisa adalah LC-MS (*Liquid Cromatography-Mass Spectrometry*) *Hitachi L 6200 Mariner Biospectrometry*

dengan sistem ESI (*Electrospray Ionisation*) yang terdapat pada Laboratorium Pusat Penelitian KIMIA LIPI Serpong Tangerang Selatan, cuvet, tabung reaksi, rak tabung reaksi, penggaris, beaker glass 100 mL dengan merek "*pyrex*", pinset, dan cawan petri. Peralatan untuk pengujian aktivitas antibakteri antara lain erlenmeyer 250 mL dengan merek "*pyrex*", autoklaf (*Hiyama HL-36Ae Chamber capacity*), tabung reaksi dengan merek "*pyrex*", rak tabung, cawan petri, sprayer, jarum ose, dan bunsen.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen. Metode eksperimen bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari penggunaan konsentrasi berbeda pada ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* terhadap kualitas antibakteri. Hipotesis ini dibuktikan dengan melakukan uji daya penghambatan antibakteri dari konsentrasi ekstrak yang berbeda terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Indikator yang ingin dicapai adalah adanya perbedaan diameter hambat (zona penghambatan bakteri) pada setiap konsentrasi yang diberikan dimana semakin lebar zona bening, maka semakin efektif senyawa kimia dari sampel yang berhasil diekstraksi.

Metode eksperimen ini terdiri dari 2 tahap yaitu: (1) Ekstraksi mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan beberapa jenis pelarut berbeda (polar, semi polar, dan non polar) dan lama ekstraksi. (2) Mengetahui pengaruh pH dan suhu tehadap stabilitas antibakteri ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris*.

3.2.1 Penelitian Tahap Pertama

Penelitian tahap pertama dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan jenis pelarut dan lama ekstraksi terbaik yang digunakan hingga memperoleh ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan metode ekstraksi maserasi bertingkat berdasarkan diameter hambat tertinggi. Penelitian tahap pertama dilakukan terhadap mikroalga *Chlorella vulgaris* sebagai sampel bahan baku,

dimana digunakan 3 jenis pelarut dengan sifat kepolaran yang berbeda yaitu etanol (polar), etil asetat (semi polar), dan N-Heksan (non polar). Ketiga pelarut tersebut digunakan untuk mendapatkan hasil ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* yang paling baik.

3.2.2 Perlakuan dan Rancangan Percobaan Tahap Pertama

Pada penelitian tahap pertama, langkah yang dilakukan adalah dengan mencari jenis pelarut dan lama ekstraksi terbaik yang digunakan hingga memperoleh ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* dengan metode ekstraksi maserasi bertingkat. Perlakuan percobaan yang diterapkan dalam penelitian ini adalah jenis pelarut (A) antara lain (A_1) etanol (polar), (A_2) etil asetat (semi polar), (A_3) *n*-hexan (non polar) dan lama ekstraksi (B) terdiri dari (B_1) 24 jam, (B_2) 48 jam, (B_3) 72 jam. Berdasarkan perlakuan percobaan yang diterapkan maka penelitian ini dirancang dengan model Rancangan Acak Lengap (RAL) 2 faktor. Kedua faktor tersebut dilakukan dengan tiga kali ulangan. Jumlah ulangan ditentukan dengan persamaan:

$$(t - 1)\ (r - 1) \geq 15$$

Dimana: t = Perlakuan

r = Ulangan

Sesuai dengan persamaan diatas ulangan dari perlakuan yang diinginkan dapat ditentukan. Banyaknya ulangan dapat dihitung sebagai berikut:

$(t – 1)\ (r – 1) \geq 15$

$(6 – 1)\ (r – 1) \geq 15$

$6\ (r – 1) \geq 15$

$6r – 6 \geq 15$

$6r \geq 15 + 6$

$6r \geq 21$

$r \geq 3$ (penggunaan ulangan sebanyak 3 ulangan)

Metode pengujian data yang digunakan adalah sidik ragam (ANOVA) dimana jika terdapat pengaruh yang nyata atau sangat nyata maka akan dilanjutkan dengan uji *duncan's*. Model statistika yang digunakan dalam penelitian tahap pertama sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Dimana:

Y_{ijk} = Hasil pengamatan untuk faktor jenis pelarut taraf ke-I, faktor lama ekstraksi taraf ke-j, pada ulangan ke –k

μ = Rataan umum

A_i = Pengaruh faktor jenis pelarut pada taraf ke-i

B_j = Pengaruh faktor lama ekstraksi pada taraf ke-j

$(AB)_{ij}$ = Interaksi antara faktor jenis pelarut dan faktor lama ekstraksi pada faktor jenis pelarut taraf ke-I, faktor lama ekstraksi taraf ke-j

ε_{ijk} = Galat percobaan untuk faktor jenis pelarut taraf ke-I, faktor ke faktor lama ekstraksi taraf ke-j pada ulangan ke-k

Perlakuan dan model rancangan percobaan penelitian tahap pertama dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Model rancangan percobaan penelitian tahap pertama

Perlakuan		(A) Jenis Pelarut		
		A_1 (N-Heksan)	**A_2 (Etil Asetat)**	**A_3 (Etanol)**
B Lama Ekstraksi	**B_1 (24 Jam)**	$(A_1B_1).1$	$(A_2B_1).1$	$(A_3B_1).1$
		$(A_1B_1).2$	$(A_2B_1).2$	$(A_3B_1).2$
		$(A_1B_1).3$	$(A_2B_1).3$	$(A_3B_1).3$
	B_2 (48 Jam)	$(A_1B_2).1$	$(A_2B_2).1$	$(A_3B_2).1$
		$(A_1B_2).2$	$(A_2B_2).2$	$(A_3B_2).2$
		$(A_1B_2).3$	$(A_2B_2).3$	$(A_3B_2).3$
	B_3 (72 Jam)	$(A_1B_3).1$	$(A_2B_3).1$	$(A_3B_3).1$
		$(A_1B_3).2$	$(A_2B_3).2$	$(A_3B_3).2$
		$(A_1B_3).3$	$(A_2B_3).3$	$(A_3B_3).3$

3.2.3 Prosedur Penelitian

Pada penelitian tahap pertama, dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi bertingkat (Widayanti, 2012). Pertama, *Chlorella vulgaris* kering (bubuk) dilarutkan menggunakan pelarut N-Heksan yang bersifat non polar dengan perbandingan 1:5 (b/v), setelah itu dimasukkan kedalam erlenmeyer dan ditutup dengan alufo, kemudian dishaker dalam waterbath dengan suhu 27^0C dengan kecepatan 5 mBar. Perendaman dalam waterbath ini dilakukan dengan waktu yang telah ditentukan yaitu, 24 jam (B_1), 48 jam (B_2), dan 72 jam (B_3). Setelah direndam kemudian disentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 10^0C selama 30 menit. Kemudian disaring untuk mendapatkan filtrat dan residu. Adapun filtrat kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* suhu 35^0C kecepatan 2 mBar tekanan 1 atm untuk mendapatkan ekstrak N-Heksan.

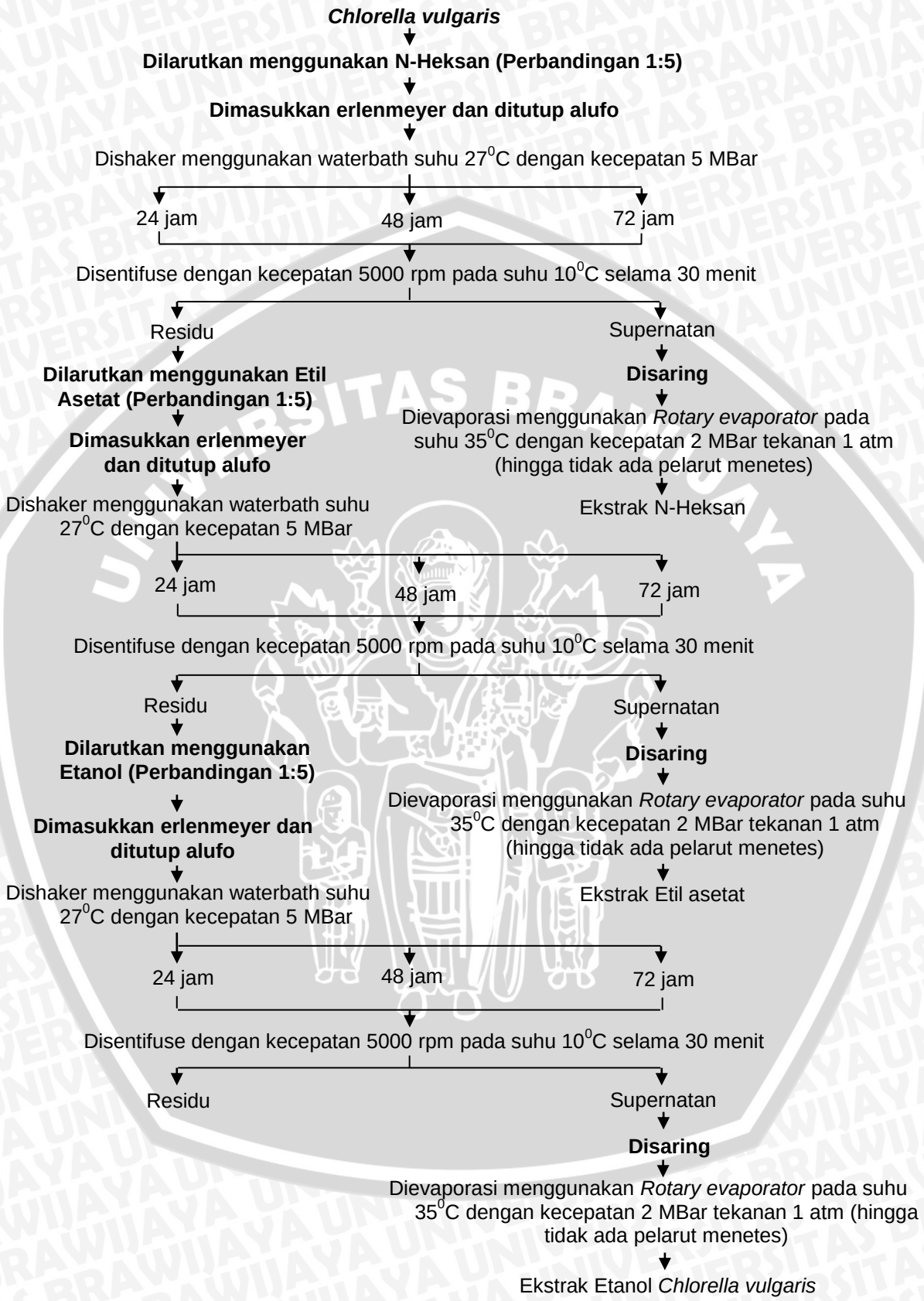
Hasil residu dari ekstrak dengan pelarut non polar diekstrak kembali menggunakan pelarut etil asetat yang bersifat semi polar dengan perbandingan 1:5 (b/v), setelah itu dimasukkan kedalam erlenmeyer dan ditutup dengan alufo, kemudian dishaker dalam waterbath dengan suhu 27^0C dengan kecepatan 5 mBar. Perendaman dalam waterbath ini dilakukan dengan waktu yang telah ditentukan yaitu, 24 jam (B_1), 48 jam (B_2), dan 72 jam (B_3). Setelah direndam kemudian disentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 10^0C selama 30 menit. Kemudian disaring untuk mendapatkan residu dan filtrat. Adapun filtrat kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* suhu 35^0C kecepatan 2 mBar tekanan 1 atm untuk mendapatkan ekstrak etil asetat.

Hasil residu dari ekstraksi dengan pelarut semi polar diekstrak kembali menggunakan pelarut etanol yang bersifat polar dengan perbandingan yang sama yaitu 1:5 (b/v). setelah itu dimasukkan kedalam erlenmeyer dan ditutup dengan alufo, kemudian dishaker dalam waterbath dengan suhu 27^0C dengan kecepatan 5 mBar. Perendaman dalam waterbath ini dilakukan dengan waktu

yang telah ditentukan yaitu, 24 jam (B_1), 48 jam (B_2), dan 72 jam (B_3). Setelah direndam kemudian disentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 10^0C selama 30 menit. Kemudian disaring untuk mendapatkan filtrat dan residu. Adapun filtrat kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* suhu 35^0C kecepatan 2 mBar tekanan 1 atm untuk mendapatkan ekstrak etanol.

Hasil sentrifuse kemudian dipisahkan, dimana endapan yang ada dibuang dan sisanya dievaporasi menggunakan *rotary vacum evaporator* pada suhu 35^oC, kecepatan 2 Mbar dan tekanan 1 atm (hingga tidak ada lagi pelarut yang menetes). Setelah itu dilakukan penguapan menggunakan gas nitrogen dan ditimbang sebagai berat akhir rendemen. Tahapan ekstraksi dengan metode maserasi bertingkat dapat dilihat pada Gambar 3.

Tahap selanjutnya adalah dilakukan uji fitokimia yang bertujuan untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris*. Uji fitokimia meliputi: flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, fenol, dan steroid. Kemudian dilanjutkan dengan dilakukan uji diameter hambat.



Gambar 4. Diagram alir ekstraksi *Chlorella vulgaris* dengan metode maserasi bertingkat
(Modifikasi Widayanti, 2012).

Kultur murni *Staphylococcus aureus* dalam MHA miring yang telah diremajakan

↓

Diambil 1 ose

10 mL media MHB steril → ↓

Inokulasi

↓

Inkubasi suhu 37^{0}C selama 1 hari

↓

Inokulum ***Staphylococcus aureus***

Gambar 5. Diagaram alir pembuatan suspensi bakteri
(NCCLS, 2003)

Inokulum

↓

Diambil 10 µL menggunakan mikropipet

↓

Dimasukkan ke dalam cawan petri

↓

Dituang Media MHA steril

↓

Dihomogenkan dengan digoyang seperti angka 8

↓

Ditunggu media hingga memadat

↓

Dibuat lubang sumuran menggunakan besi pelubang berdiameter 6 mm

↓

Ditetesi 20 µL ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* antimikroba pada lubang sumuran

↓

Inkubasi suhu 37^{0}C selama 1 hari

↓

Zona Bening

Gambar 6. Diagram alir uji aktivitas antimikroba pada bakteri *Staphylococcus aureus*
(NCCLS, 2003)

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

3.2.4 Parameter yang Diamati

Parameter pengamatan pada penelitian tahap pertama ini adalah mengetahui konsentrasi dan jenis pelarut terbaik berdasarkan daya hambat (Sudarmadji,1997), diameter hambat, *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), *Minimum Bacteriocidal Concentration* (MBC) (Bloomfield,1991) Setelah itu diuji dengan metode LC-MS (*Liquid Cromatography-Mass Spectrometry*) untuk menganalisa senyawa bioaktif ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris,* dan Uji kualitatif fitokimia (Sulastri,2011).

3.3 Penelitian Tahap kedua

Penelitian tahap kedua ini merupakan penelitian yang dilakukan berdasarkan hasil yang terbaik dari penelitian tahap pertama, pada penelitian tahap kedua ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH pada ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.3.1 Perlakuan dan Rancangan Percobaan Tahap Kedua

Penelitian ini menggunakan sampel ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* (C) dari serbuk mikroalga *Chlorella vulgaris* selanjutnya karakterisasi menjadi 4 taraf perlakuan derajat keasaman (pH) yaitu (C_l) pH 4, (C_2) pH 5, (C_3) pH 6, (C_4) pH 7, dan (C_5) pH 8.

Berdasarkan perlakuan yang diterapkan, maka penelitian ini dirancang menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) sederhana yang dilanjutkan dengan uji BNT (beda nyata terkecil) 3 kali ulangan.

Metode analisis yang digunakan adalah sidik ragam yang mengikuti model sebagai berikut:

$$Yij(t) = \mu + P(t) + \varepsilon(t)$$

Dimana:

Yij(t) = nilai pengamatan pada baris ke- i dan kolom ke- j dengan perlakuan ke- t

μ = nilai rata-rata umum

P(t) = pengaruh perlakuan ke- t ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* (pH 4, 5, 6, 7, 8)

ε(t) = pengaruh dari galat yang mendapat perlakuan ke- t

Perlakuan dan model rancangan percobaan pada tahap kedua ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Model rancangan percobaan tahap kedua

Perlakuan pH	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
C_1	$(C_1).1$	$(C_1).2$	$(C_1).3$
C_2	$(C_2).1$	$(C_2).2$	$(C_2).3$
C_3	$(C_3).1$	$(C_3).2$	$(C_3).3$
C_4	$(C_4).1$	$(C_4).2$	$(C_4).3$
C_5	$(C_5).1$	$(C_5).2$	$(C_5).3$

3.3.2 Karakterisasi pH pada Ekstrak Kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* (Naufalin *et al*.,2007)

Penggunaan pH yang berbeda digunakan untuk mengetahui pH ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* yang terbaik untuk uji stabilitas antibakteri. pH yang digunakan adalah pH 4, 5, 6, 7, dan 8. Dalam karakterisasi pH pada ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris*, pertama-tama diukur pH awal ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris*. Kemudian untuk meningkatkan nilai pH ditambahkan larutan basa yakni NaOH 0,1 N sedangkan untuk menurunkan pH ditambahkan larutan asam yakni HCl 0,1 N. Penambahan larutan buffer dilakukan sedikit demi sedikit hingga mendapatkan pH yang diinginkan. Dalam proses ini perlu dilakukan pengecekan pH secara berkala hingga mendapatkan pH yang sesuai.

Prosedur pengujian pH menurut Azizah *et al*. (2012), menggunakan pH meter, dengan cara sebagai berikut:

1. Menyalakan pH meter sampai diperoleh keadaan stabil selama 15 sampai 30 menit.
2. Elektroda pH meter dibilas dengan akuades dan dikeringkan. Kemudian pH meter dikalibrasi dengan buffer pH 4 dan buffer pH 7 lalu dikeringkan dengan tissue.
3. Elektroda dicelupkan kedalam larutan sampel dan nilai pH dapat diketahui setelah diperoleh pembacaan yang stabil dari pH meter.
4. Catat pH sampel.

3.3.3 Parameter Yang Diamati

Parameter pengamatan pada penelitian tahap kedua adalah mengetahui diameter hambat dengan perlakuan pH yang berbeda, uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*), dan MBC (*Minimum Bacteriocidal Concentration*) (Modifikasi Kirby-Bauer, 1996).

3.4 Prosedur Analisis Parameter

3.4.1 Rendemen (Modifikasi Prihanto *et al*.,2011)

Rendemen merupakan persentase total ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* yang dihasilkan dibandingkan dengan jumlah bahan baku serbuk mikroalga *Chlorella vulgaris* yang digunakan. Tujuan perhitungan rendemen yaitu untuk mengetahui persentase ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* yang dihasilkan. Untuk mendapatkan hasil rendemen ekstrak dapat dihitung menggunakan persamaan:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Sampel}} \times 100\ \%$$

3.4.2 Uji Diameter Zona Hambat (Modifikasi Soleha *et al*., 2015)

Pada metode difusi bertujuan untuk mengamati zona bening dari ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris*. Suada (2012) menyatakan bahwa penentuan diameter zona hambat dapat dihitung menggunakan persamaan:

$$\text{Diameter zona hambat (\%)} = \frac{\text{Diameter koloni kontrol - Diameter koloni perlakuan}}{\text{Diameter koloni kontrol}} \times 100\ \%.$$

Adapun tahapan pengamatan uji diameter zona hambat dengan metode difusi agar sumuran yaitu:

1. Dalam pembuatan sumuran pertama-tama dilakukan dengan meletakan pipet steril pada cawan petri steril dengan menggunakan pinset sebelum medium agar dan bakteri dimasukan.
2. Agar dan bakteri dimasukkan, ditunggu sampai media padat.
3. Agar yang sudah padat dan pipet yang sebelumnya diletakkan pada cawan petri tersebut diangkat menggunakan pinset steril sehingga membentuk suatu sumuran pada media dan diberikan label.
4. Sumuran yang telah dibuat sebelumnya diisi dengan ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan konsentrasi yang berbeda (1000 ppm, 2000 ppm, 3000 ppm, 4000 ppm, dan 5000 ppm) menggunakan *micro pipet* pada setiap sumur.
5. Dimasukan ke dalam inkubator pada suhu 37°C dan diamati setelah 24 jam
6. Diukur zona bening yang terbentuk pada media menggunakan jangka sorong.
7. Dicatat hasil pengukuran yang didapat

3.4.3 Uji Diameter Hambat, Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*), dan MBC (*Minimum Bacteriocidal Concentration*) (Bloomfield,1991)

Langkah awal yang dilakukan pada uji difusi sumuran yaitu menyiapkan media pertumbuhan bakteri uji. Media yang digunakan yaitu media MHA untuk menumbuhkan bakteri *Staphylococcus aureus.* Biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* dengan kepadatan 10^8 koloni/mL koleksi milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Peremajaan bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan cara menanam pada media MHA. Kemudian hasil penanaman pada MHA dipanen dan diambil menggunakan kawat ose lalu dimasukkan ke dalam NaFis 9%. Kemudian campuran bakteri tadi dihomogenkan dan ditanam ke media MHA menggunakan *micropipet* sebanyak 20 µL. Kemudian bakteri ditanam dengan metode tebar dan diperbanyak dengan menggunakan metode duplo.

Media padat yang bercampur bakteri uji, dibuat sumuran menggunakan besi pelubang berdiameter 6 mm. Pada sumuran tersebut dilakukan berbagai uji untuk mengetahui aktivitas penghambatan larutan uji terhadap bakteri uji. Larutan uji yang digunakan adalah ekstrak etanol *Chlorella vulgaris* dengan berbagai pH yaitu pH 4, 5, 6, 7, dan 8. Kemudian ekstrak etanol *Chlorella vulgaris* dengan berbagai pH dibuat konsentrasi 1000 ppm, 2000 ppm, 3000 ppm, 4000 ppm, dan 5000 ppm dimasukan dalam lubang sumuran menggunakan *micropipet* pada MHA yang berisi bakteri dan diinkubasi pada suhu 37^0C selama 12 sampai 24 jam. Diamati dan diukur zona penghambatan yang terdapat pada masing-masing daerah lubang sumuran. Pengukuran zona penghambatan dilakukan dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk disekitar lubang sumuran dengan jangka sorong. Penghambatan pertumbuhan bakteri uji oleh ekstrak sampel yang memiliki kandungan antibakteri terlihat zona bening yang tidak ditumbuhi oleh bakteri uji.

$$\text{Potensi daya hambat} = \frac{\text{diameter hambatan senyawa yang diperiksa}}{\text{diameter senyawa kontrol dengan konsentrasi sama}} \times 100\%$$

MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericiodal Concentration*), digunakan untuk bakteri menurut Bloomfield (1991). Dengan merencanakan logaritma natural (ln) konsentrasi (Mo) di sumbu x dan nilai kuadrat zona inhibisi (Z^2) di sumbu y, nilai yang melintasi x = 0 akan Mt. Selain itu, MIC kemudian dihitung dengan cara 0,25 x Mt dan MBC dihitung dengan cara 4 x MIC.

3.4.4 Uji Kualitatif Fitokimia (Modifikasi Sulastri, 2011).

Uji fitokimia ini digunakan untuk mengetahui senyawa bioaktif yang ada pada ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* yang diperoleh dari ekstraksi menggunakan metode maserasi. Uji fitokimia ini meliputi uji tanin, alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, dan fenol.

3.4.4.1 Uji Tanin

Sampel sebanyak 1 g dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 tetes NaCl 10% kemudian disaring. Filtrat dibagi dalam 3 bagian yaitu A, B, dan C. Filtrat A sebagai blanko, B ditambahkan 3 tetes pereaksi $FeCl_3$ dan filtrat C ditambahkan garam gelatin. Jika terjadi perubahan maka senyawa tanin terdeteksi positif namun jika tidak ada perubahan maka sampel tidak mengandung senyawa tanin.

3.4.4.2 Uji Alkaloid

Sebelum dilakukan uji alkaloid, ekstrak sebanyak 1 g dilarutkan dalam 5 tetes sulfat 2 N dan dihomogenkan. Kemudian dilakukan pengujian dengan 3 pereaksi alkaloid yaitu, pereaksi Meyer, Dragendorff, dan Wagner. Hasil uji dianggap positif mengandung alkaloid apabila endapan berwarna putih kekuningan dengan pereaksi Meyer, endapan berwarna merah jingga apabila

ditambahkan pereaksi Dragendorff, dan endapan berwarna coklat jika ditambahkan pereaksi Wagner.

3.4.4.3 Uji Flavonoid

Sampel ekstrak sebanyak 1 g dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 4 mL alkohol, 0,4 amil alkohol (campuran etanol 95% dan asam klorida 37%) dan 0,1 mg serbuk magnesium. semua bahan dicampurkan dan dihomogenkan. Adanya kandungan flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol.

3.4.4.4 Uji Saponin

Uji saponin dideteksi dengan terbentuknya busa pada sampel yang dicelupkan dalam air panas. Pengujian senyawa saponin ini dilakukan dengan menambahkan 1 tetes HCl 2 N kedalam 1 g ekstrak *Chlorella vulgaris*. Busa yang stabil selama 30 menit dan tidak hilang menunjukkan adanya saponin dalam sampel.

3.4.4.5 Uji Steroid

Pengujian steroid diidentifikasi terhadap warna yang terbentuk. Sampel sebanyak 1 g dimasukkan kedalam tabuk reaksi dan dilarutkan dengan 2 mL klorofom. Ditambakan 3 tetes asam sulfat dan 10 tetes anhidra asetat, kemudian dihomogenkan. Pengujian dinyatakan positif jika terbentuk warna merah terlebih dahulu kemudian berubah menjadi warna biru dan hijau.

3.4.4.6 Uji Fenol

Uji fenol dilakukan dengan menyiapkan 1 g ekstrak sampel yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 2 tetes larutan $FeCl_3$ 5%. Diamati perubahan yang terjadi, jika muncul warna hijau atau hijau biru menunjukkan adanya senyawa fenol dalam sampel.