

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA AKTIF EKSTRAK KASAR MIKROALGA *Chlorella vulgaris* YANG DIKULTIVASI BERDASARKAN SUMBER CAHAYA YANG BERBEDA

Teni Novianti¹⁾, Muhammad Zainuri²⁾, Ita Widowati³⁾

^{*)}Fakultas Teknologi Kelautan dan Perikanan, Universitas Nahdlatul Ulama Cirebon
Jalan Sisingamangaraja No. 33 Cirebon 45112, Jawa Barat, Indonesia
E-mail : teninovianti.83@gmail.com

^{#)}Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jalan Prof. Soedarto Tembalang, Semarang 50275, Jawa Tengah, Indonesia

ABSTRAK

Chlorella vulgaris termasuk salah satu jenis fitoplankton dalam kelas *Chlorophyceae* (alga hijau) yang dapat dimanfaatkan sebagai suplemen maupun sumber obat alami yang berpotensi sebagai antioksidan. Untuk memaksimalkan pertumbuhan dan senyawa bioaktif *C.vulgaris* yang dapat menghasilkan biomassa dan metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antioksidan membutuhkan sumber cahaya buatan terbaik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan golongan senyawa aktif ekstrak kasar mikroalga *C.vulgaris* yang dikultivasi pada sumber cahaya yang berbeda. Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental, sedangkan rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial terdiri atas 6 perlakuan dan 3 kali ulangan. Perlakuannya adalah sumber cahaya neon (32 watt) yang ditambahkan dengan LED Merah, LED Hijau dan LED Biru masing-masing 16 watt dengan KAI *C.vulgaris* yang dikultivasi yaitu 10×10^4 sel/ml dan 100×10^4 sel/ml. Hasil penelitian menunjukkan penggunaan sumber cahaya neon yang ditambahkan LED berwarna merah, hijau dan biru dengan kepadatan awal inokulum 100×10^4 sel/ml memperoleh hasil pertumbuhan *C.vulgaris* tertinggi pada sumber cahaya LED merah sebesar $2057,7 \times 10^4$ sel/ml. Sedangkan sumber cahaya neon yang ditambahkan LED biru menghasilkan aktivitas antioksidan terbaik dengan nilai IC_{50} 38,900 (antioksidan sangat kuat) dan memiliki komponen bioaktif alkaloid, steroid, saponin, flavonoid dan kuinon.

Kata kunci : *Chlorella vulgaris*, sumber cahaya, LED, aktivitas antioksidan

ABSTRACT

Chlorella vulgaris included as one of phytoplankton types in the *Chlorophyceae* (green algae) class which can be used as a supplement or natural medicinal resources potential as antioxidant. To maximalize the growth and the bioactive compound of *C.vulgaris* to produce biomass and secondary metabolites with antioxidant activity, the best synthetic light source is needed. The purpose of this study was to determine the antioxidant activity and the classification of active compound of the *Chlorella vulgaris* microalgae crude extract cultivated in a different light source. The method used was an experimental method, while the design of the study was a complete randomized factorial design consisted of 6 treatments and 3 repetitions. The treatments were light sources neon (32 watt) with an additional red LED, green LED and blue LED each for 16 watt with the *Chlorella vulgaris* inoculum initial density that was cultivated were 10×10^4 and 100×10^4 cells/ml. The result showed that the use of neon light added with red, green and blue LED with the inoculum initial density of 100×10^4 cells/ml produced the highest growth of *C.vulgaris* in the red LED light source for $2057,7 \times 10^4$ cells/ml. Meanwhile the neon light with blue LED produced the best antioxidant activity

with IC₅₀ value of 38.900 ppm (very strong antioxidant) and contained bioactive compounds alkaloid, steroid, saponin, flavonoid and quinone.

Key words : *Chlorella vulgaris*, light source, LED, antioxidant activity

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara tropis yang memiliki potensi sumber daya alam kelautan dan memiliki keanekaragaman hayati yang sangat besar. Salah satu sumberdaya hayati yang potensial dan belum banyak dieksplorasi adalah mikroalga (Karseno *et al.*, 2013). Mikroalga mampu menghasilkan senyawa utama seperti protein, karbohidrat dan lemak, selain itu juga memiliki komponen aktif yang dimanfaatkan dalam bidang industri pangan, kosmetik, *pharmaceutical* dan *neutraceutical* (Abd El-Baky, 2009). Komponen aktif mikroalga mempunyai aktivitas antimikroba, antijamur dan antivirus (Priyadarshani dan Rath, 2012) serta aktivitas antioksidan dan antibakteri (Widowati *et al.* 2015).

Chlorella vulgaris merupakan mikroalga yang termasuk dalam kelas *Chlorophyceae*, memiliki nilai gizi yang baik dan senyawa-senyawa bioaktif alami seperti karotenoid, senyawa fenol, sulfat polisakarida dan vitamin yang salah satu fungsi dari senyawa bioaktif tersebut dapat mempengaruhi regulasi sel, respon kekebalan tubuh dan sebagai antioksidan (de Fretes *et al.*, 2012).

Saat ini penggunaan bahan pengawet dan antioksidan sintesis tidak direkomendasikan oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) karena diduga dapat menginduksi proses karsinogenesis (Nawaly *et al.*, 2013). Karena itu perlu dicari alternatif lain yaitu antioksidan alami yang bersumber dari bahan alam

seperti yang terdapat pada semua tumbuh-tumbuhan dan buah-buahan (Barus, 2009).

Potensi *Chlorella* sebagai antioksidan dapat dijadikan antioksidan alami yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah terjadinya proses oksidasi. Antioksidan sangat bermanfaat bagi kesehatan seperti melindungi tubuh dari berbagai penyakit degeneratif, kanker, proses penuaan atau *antiaging* serta berperan penting untuk mempertahankan mutu produk pangan (Tamat *et al.*, 2007).

Pengujian aktivitas antioksidan mikroalga *C.vulgaris* yaitu pada ekstrak biomassa. Oleh karena itu, *C.vulgaris* dikultivasi terlebih dahulu dalam sumber cahaya yang dapat meningkatkan produksi (biomassa) dan komponen bioaktif yang berpotensi sebagai antioksidan. *Light emitting diode* (LED) merupakan kandidat sumber cahaya artifisial yang ideal. Beberapa karakteristik penting LED sebagai sumber cahaya artifisial dalam produksi mikroalga antara lain masa penggunaan lebih lama, bebas merkuri, lebih hemat energi, dan menghasilkan cahaya monokromatis dengan panjang gelombang tertentu (Blanken *et al.*, 2013; Teo *et al.*, 2014). Selain itu penggunaan LED sebagai sumber cahaya tambahan pada kultur mikroalga dapat menginduksi stres cahaya sehingga mampu menghasilkan metabolisme sekunder beta karoten yang berpotensi sebagai antioksidan (Helena *et al.*, 2016). Oleh karena itu perlu digunakan lampu neon

sebagai cahaya utama pengganti cahaya matahari untuk pertumbuhan *Chlorella vulgaris* dan LED merah, hijau dan biru sebagai sumber cahaya tambahan untuk menginduksi stress cahaya yang dapat menghasilkan aktivitas antioksidan pada ekstrak *C. vulgaris*.

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Materi Penelitian

Mikroalga *Chlorella vulgaris* diperoleh dari kultur murni Laboratorium Pakan Alami Budidaya Air Payau, Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPAP) Jepara, Jawa Tengah dan selanjutnya ditumbuhkan dalam medium Walne (Zainuri *et al.*, 2014).

Metode penelitian

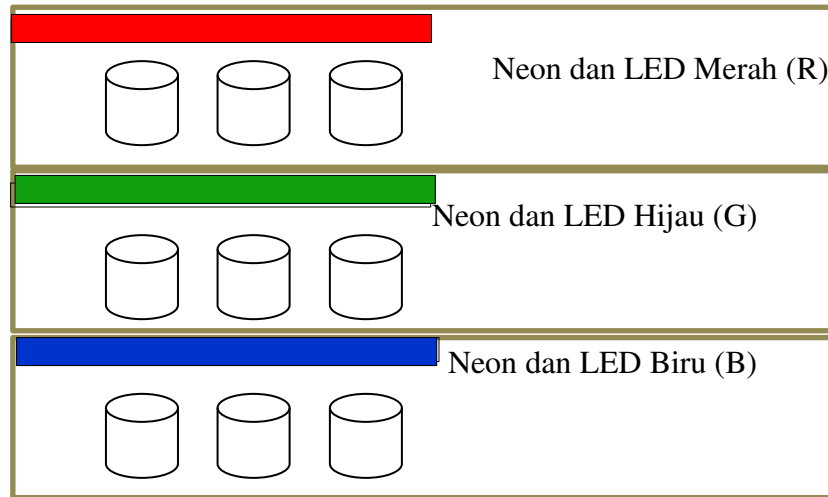
Penelitian terdiri dari 5 tahap yaitu : (1). Kultivasi *C.vulgaris* (eksperimen sumber cahaya), (2). Pemanenan biomassa *C. vulgaris* mengacu pada Bariyyah *et al.*,(2013) dan Kusumaningrum dan Zainuri, (2013), (3). Ekstraksi senyawa aktif *C.vulgaris* mengacu pada Widowati *et al.*, (2014) dan Firdiyani *et al.*, (2015), (4). Uji aktivitas antioksidan mengacu pada metode Widowati *et al.*, (2014) ; Irondi *et al.*,(2012) dan (5) Identifikasi Golongan Senyawa Aktif mengacu pada Kumoro (2015).

Kultivasi *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris dengan kepadatan awal inokulum 100×10^4 sel/ml dikultur dalam botol kaca (*beker glass*) dengan volume media 3500 ml, intensitas cahaya sekitar 2.000-4500 lux. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan dan masing-

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan golongan senyawa aktif ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* yang dikultivasi pada sumber cahaya yang berbeda.

masing tiga ulangan. Perlakuan uji yang diberikan adalah sumber cahaya buatan menggunakan 3 lampu neon putih (Phillips TL-D 32 W) sekitar 2000-2500 lux penyinaran selama pengamatan dan penambahan LED merah (R) dengan panjang gelombang 630-700 nm, LED hijau (G) dengan panjang gelombang 490-560 nm dan LED biru (B) dengan panjang gelombang 430-490 nm (CE ROHS/Emico 16 W) diinduksi sebagai stres cahaya dengan fluks 1500-2000 lux dilakukan selama 12 jam/hari.



Gambar 1. Kondisi Kultur *C.vulgaris* : perlakuan neon yang ditambahkan LED merah (R) ; perlakuan LED hijau (G) ; perlakuan LED biru (B)

Pemanenan Biomasa *Chlorella vulgaris*

Pemanenan dilakukan pada awal fase stasioner kemudian hasil pemanenan dipisahkan menggunakan sentrifuge dengan kecepatan 5500 rpm selama 15 menit. Setelah didapatkan biomassa nya kemudianditimbang masing-masing perlakuan untuk menentukan berat basahnya

Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga *C.vulgaris*

Biomasa kering *Chlorella vulgaris* ditimbang masing-masing sebanyak 14 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan pelarut hingga volume akhir mencapai 140 ml dengan perbandingan 1 : 10 (w/v). Prosedur ekstraksi dilakukan dengan merendam sampel dengan pelarut metanol pada tabung erlenmeyer. Hasil maserasi kemudian disaring dengan kertas saring Whatman sehingga dihasilkan filtrat dan residu. Perendaman dilakukan 3 kali sampai filtrat mendekati bening. Filtrat atau supernatan yang diperoleh kemudian dipekat dengan *vacum rotary*

evaporator pada suhu 40 °C hingga diperoleh ekstrak kasar (*crude extract*) berupa pasta.

Uji Aktivitas Antioksidan dengan DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*)

Konsentrasi ekstrak sampel *Chlorella vulgaris* yang digunakan adalah 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm dan 100 ppm dilakukan 3 kali ulangan. Masing-masing konsentrasi tersebut dipipet 75 µl ekstrak dan dicampurkan dengan 225 µl larutan DPPH. Campuran tersebut dimasukkan kedalam *microtiterplate* 300µL kemudian diinkubasi selama 30 menit pada tempat gelap. Setelah itu diukur absorbansinya dengan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang maksimum (517 nm). Kemampuan untuk meredam radikal bebas DPPH (inhibisi) dihitung dengan menggunakan persamaan :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Sampel}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100\%$$

Keterangan:

A_{DPPH} : absorbansi larutan DPPH (blanko)

A_{Sampel} : absorbansi sampel

Nilai konsentrasi penghambatan aktivitas radikal bebas sebanyak 50% (IC_{50}) dihitung dengan menggunakan persamaan regresi yang diperoleh dari perpotongan garis antara daya hambatan dan sumbu konsentrasi, kemudian dimasukkan ke dalam persamaan $y = a + bx$,

Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar *C.vulgaris*

(1). Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan melarutkan ekstrak dengan 10 tetes asam sulfat 2 N kemudian diuji dengan pereaksi dragendorff. Hasil uji positif diperoleh bila terbentuk endapan merah hingga jingga.

(2). Uji Triterpenoid dan Steroid

Sejumlah 1 gram sampel ekstrak dilarutkan dalam 5 ml eter dalam tabung reaksi yang kering kemudian disaring menggunakan kertas saring. Terbentuk filtrat berwarna hijau kemudian filtrat diuapkan dalam cawan penguap menggunakan kasa asbes kaki tiga hingga kering dan berbentuk serbuk hitam. Setelah itu serbuk dimasukkan ke tabung reaksi ditambahkan 10 tetes pereaksi Liberman Burchard. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya larutan berwarna merah atau ungu untuk pertama kali (senyawa triterpenoid) kemudian berubah menjadi biru dan hijau (senyawa steroid).

(3). Uji Saponin

Saponin dapat dideteksi dengan uji busa dalam air panas. Tabung reaksi yang berisi sampel di rendam pada *backerglass* yang sudah terisi air, kemudian dipanaskan selama 10 menit. Setelah itu angkat dan sampel dikocok kuat kemudian amati.

dengan $y = 50$ dan nilai x menunjukkan IC_{50} . Penggolongan aktivitas antioksidan ini menurut Molyneux (2004) berdasarkan pada nilai IC_{50} yang dimiliki oleh suatu bahan, yaitu sangat kuat ($IC_{50} < 50$ ppm), kuat ($50 \text{ ppm} < IC_{50} < 100$ ppm), sedang ($100 \text{ ppm} < IC_{50} < 150$ ppm), lemah ($150 \text{ ppm} < IC_{50} < 200$ ppm) dan sangat lemah ($IC_{50} > 200$ ppm).

Busa yang stabil akan terus terlihat selama 5 menit dan tidak hilang pada penambahan 1 tetes HCl 2 N menunjukkan adanya saponin.

(4). Uji Flavonoid

Sejumlah 5 ml sampel ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan serbuk magnesium 1 gram dan 5 ml HCL 2 N. *Tube* yang sudah tercampur dimasukkan ke dalam *backerglass* yang telah terisi air kemudian dipanaskan selama 10 menit. Filtrat yang dihasilkan yaitu berwarna coklat muda atau kuning keemasan. Setelah itu filtrat disaring menggunakan kertas saring dan ditambahkan 1 ml Amil Alkohol kemudian campuran dikocok. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol.

(5). Uji Kuinon

Sejumlah 2 ml sampel ekstrak ditambahkan 2 ml NaOH 1 N kemudian diamati perubahan warnanya. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning.

Analisis Data

Hasil dari data aktivitas antioksidan dilakukan pengolahan data menggunakan analisis ragam atau *analisis of variance* (ANOVA) yang sebelumnya terlebih

dahulu dilakukan uji normalitas, uji homogenitas dan uji additivitas. Selanjutnya apabila ada perbedaan maka diuji lanjut dengan uji Tukey berdasarkan nilai signifikansi $p < 0,05$ atau pada tingkat kepercayaan 95%. Dalam pengolahan data

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultivasi *Chlorella vulgaris*

Kultivasi *C. vulgaris* dilakukan dalam Medium Walne menggunakan *beaker glass* 3500 ml. Media Walne merupakan salah satu sumber media yang paling baik digunakan untuk meningkatkan kandungan nutrisi dan pertumbuhan mikroalga *C. vulgaris* (Satriaji *et al.*, 2016). *C. vulgaris* dikultur selama 6 hari dengan perlakuan sumber cahaya yang berbeda. Cahaya mempunyai peranan yaitu sebagai sumber energi dalam proses fotosintesis. Penyinaran dengan lampu neon selama kultur digunakan sebagai cahaya utama pengganti cahaya matahari untuk pertumbuhan *Chlorella vulgaris* dan LED merah, hijau dan biru sebagai sumber cahaya tambahan untuk menginduksi stress cahaya yang dapat menghasilkan aktivitas antioksidan pada ekstrak *C. vulgaris*.

Perkembangan kepadatan sel *Chlorella vulgaris* yang teramati dalam penelitian ini meliputi fase *lag* (adaptasi), fase eksponensial (fase logaritmik), fase puncak dan fase stasioner. Pada setiap fase nya mikroalga *Chlorella vulgaris* mengalami perubahan warna pada media kultur. Pada umur kultur hari ke-1 dan 2, media *Chlorella vulgaris* terlihat masih berwarna hijau bening, setelah hari ke 3 media *Chlorella vulgaris* sudah mulai terlihat perubahan warna menjadi hijau muda dengan adanya biomassa yang mengendap di bawah atau dasar media kultur. Pada umur kultur hari ke-4 dan ke-

menggunakan SPSS 22.0 for windows, sedangkan data identifikasi golongan senyawa aktif ekstrak kasar *C. vulgaris* dianalisis secara kualitatif.

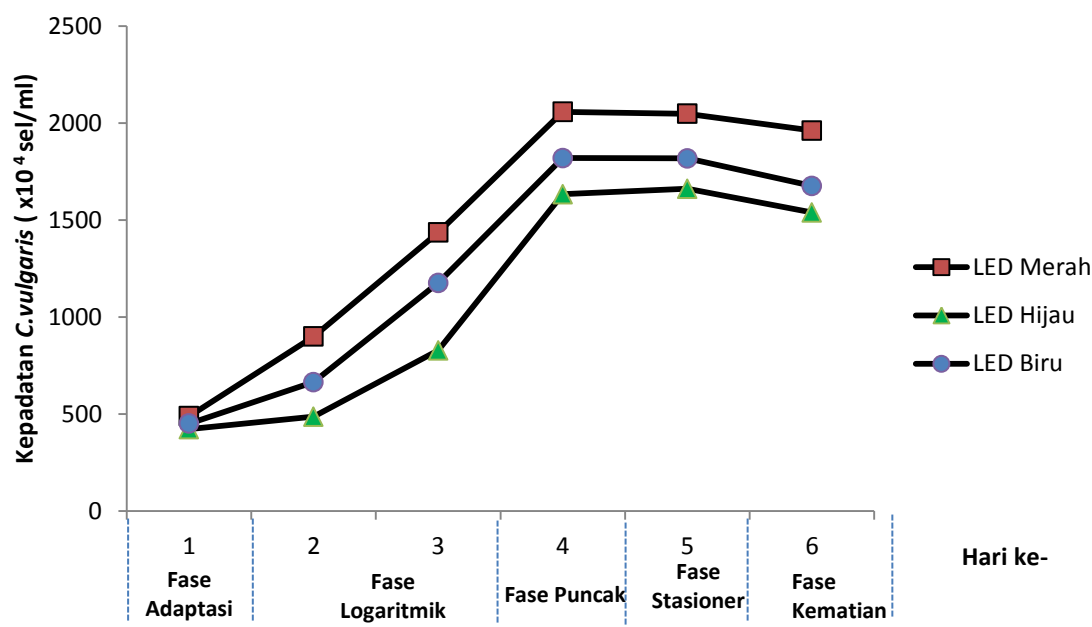
5 terjadi perubahan warna hijau muda menjadi hijau lebih tua dari sebelumnya. Setelah hari ke-5 warna semakin hijau mendekati pekat dengan biomassa yang semakin terlihat jelas dan banyak di sekitar dasar media kultur

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kultur *C. vulgaris* yang diberi perlakuan sumber cahaya LED Merah mengalami peningkatan kelimpahan sel yang tertinggi sebesar $2057,7 \times 10^4$ sel/ml dihari keempat kultur. Sedangkan kepadatan pertumbuhan sel *C. vulgaris* terendah pada perlakuan LED hijau dengan nilai $1661,3 \times 10^4$ sel/ml dihari kelima kultur. Hal tersebut menandakan bahwa sumber cahaya LED Merah lebih baik dalam menghasilkan kelimpahan sel *C. vulgaris*. Adapun Grafik Pertumbuhan *C. vulgaris* pada perlakuan sumber cahaya yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 2.

LED merah merupakan sumber cahaya yang paling efektif bagi pertumbuhan mikroalga hijau terutama *Chlorella vulgaris*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Syafriyudin *et al.*, (2015), Cahaya berperan utama dalam proses fotosintesis melalui fitokrom yang merupakan protein warna pada tumbuhan dan mengandung susunan atom khusus yang mengabsorpsi cahaya. Fitokrom merupakan penerima atau reseptor cahaya yang paling efektif dalam menyerap atau mendeteksi cahaya dan sebagai sensor fitokrom terangsang oleh cahaya merah dan infra merah dibandingkan dengan cahaya yang lain. Fitokrom dapat

mendeteksi gelombang cahaya dari 300-800 nm dengan sensitifitas maksimum pada cahaya merah (R, 600-700 nm dengan puncak penyerapan pada 660 nm) dan merah jauh (FR, 700-800 nm dengan

puncak penyerapan pada 730 nm). Cahaya yang berpengaruh terhadap pertumbuhan adalah pada spektrum merah dengan panjang gelombang 660 nm.



Gambar 2. Grafik Pertumbuhan *Chlorella vulgaris* pada Perlakuan Sumber Cahaya yang Berbeda

Diperkuat dengan Kimball (2000), menyatakan bahwa proses fotosintesis yang dihasilkan oleh mikroalga dengan cara mereaksikan karbondioksida dan air menjadi gula dengan bantuan energi cahaya matahari dan klorofil. Fotosintesis merupakan proses biologi yang kompleks, proses ini menggunakan nutrisi dan energi cahaya yang dapat dimanfaatkan oleh klorofil yang terdapat dalam kloroplas. Hasil penggunaan sinar LED dengan warna merah, hijau dan biru menghasilkan pertumbuhan tertinggi dengan LED merah karena warna merah dapat menghasilkan

karoten a yang dapat mempercepat proses pertumbuhan. Hal ini sesuai dengan hasil penyelidikan Thomas-Hill *et al.*, (2007) yang menyinari mikroalga *Chlorella* berganti-ganti dengan sinar merah, jingga, kuning, hijau, biru, nila dan ungu maka hasil fotosintesis yang tertinggi adalah sinar merah. Untuk itu penelitian ini sesuai dengan apa yang dilakukan Thomas-Hall *et al.*, (2007) bahwa pertumbuhan mikroalga dengan memberikan sinar merah akan tumbuh dengan cepat dibandingkan dengan sinar lainnya.

Pemanenan Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Biomassa yang digunakan sebagai sampel antioksidan dan fitokimia yaitu

biomasa sel *C.vulgaris* yang dipanen setelah kultur mencapai fase puncak dan memasuki tahap awal stasioner yaitu pada hari ke-5. Proses pemanenan dilakukan

saat sel pada fase awal stasioner, hal ini dikarenakan pada fase ini terjadi pembentukan senyawa metabolit sekunder yang berfungsi untuk pertahanan hidup seperti senyawa fenol, alkaloid, triterpenoid (Bariyyah *et al.*, 2013) dan senyawa bioaktif lainnya seperti betakaroten yang berpotensi sebagai antioksidan (Helena *et al.*, 2016). Hal tersebut juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Rafaelina *et al.*, (2016) bahwa biomasa yang dipakai untuk uji antioksidan dipanen pada saat fase stasioner dengan tujuan untuk mencegah mikroalga *Chlorella* mengalami penurunan jumlah sel yang drastis. Selain itu dikarenakan pada fase ini terjadi metabolisme sekunder yang merupakan

keseluruhan proses sintesis dan perombakan produk metabolit primer

Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Ekstraksi *Chlorella vulgaris* dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Maserasi ini digunakan karena prosesnya mudah, sederhana dan tidak menggunakan suhu tinggi yang dimungkinkan dapat merusak senyawa aktif pada mikroalga *C.vulgaris*. Hasil ekstraksi menunjukkan bahwa ekstrak kasar *C.vulgaris* memiliki persentase rendemen yang cukup tinggi yaitu lebih dari 50% (Tabel 1) dan ekstrak yang dihasilkan berbentuk serbuk berwarna hijau pekat

Tabel 1. Hasil Ekstraksi Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Sumber Cahaya	Berat Kering Sampel (gram)	Berat Ekstrak (gram)	Rendemen Ekstrak (%)
LED Merah	14	7,43	53,07
LED Hijau	14	7,18	51,28
LED Biru	14	7,32	52,28

Pelarut yang dipakai pada saat ekstraksi yaitu menggunakan pelarut metanol yang merupakan pelarut polar dan sering digunakan karena penetrasi kedalam dinding sel lebih efisien sehingga menghasilkan metabolit sekunder lebih banyak. Hal ini menyebabkan maserasi dengan pelarut metanol akan menghasilkan ekstrak dengan kandungan metabolit sekunder lebih banyak dan beragam. Diperkuat dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Firdiyani *et al.*, (2015), bahwa pelarut memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam mengambil senyawa bioaktif suatu sampel. Rendemen terbesar diperoleh dari ekstrak polar seperti metanol karena senyawa polar memiliki

kemampuan untuk mengekstrak senyawa dari kisaran senyawa polar hingga semi polar dan memiliki *momen dipole* yang besar yaitu jumlah vektor momen-momen ikatan lebih besar dari nol.

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar *Chlorella vulgaris*

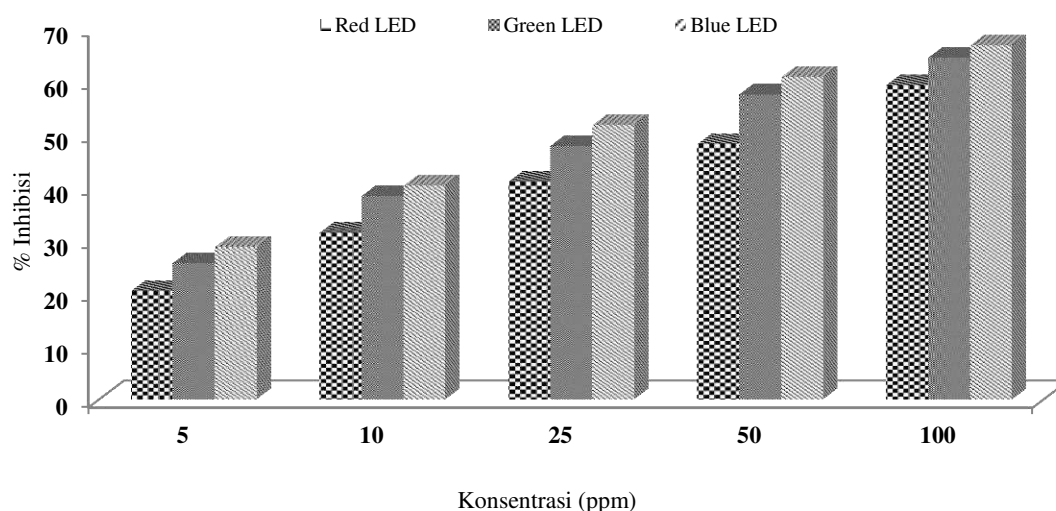
Uji kuantitatif potensi antioksidan pada ekstrak *Chlorella vulgaris* dalam penelitian ini menggunakan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil*). Metode ini didasarkan pada perubahan warna radikal DPPH. Perubahan warna tersebut disebabkan oleh reaksi antara radikal bebas DPPH dengan satu atom hidrogen yang dilepaskan senyawa yang terkandung

dalam bahan uji untuk membentuk senyawa *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin* yang berwarna kuning.

Hasil pembacaan absorbansi ekstrak kasar *C.vulgaris* dengan berbagai konsentrasi ekstrak menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 517 nm. Semakin tinggi aktivitas antioksidan yang ditunjukkan oleh ekstrak yaitu semakin kecil absorbansi yang diperoleh dan semakin tinggi konsentrasi sampel maka semakin tinggi kandungan antioksidannya. Hal ini disebabkan karena kemampuan antioksidan suatu zat dalam sampel untuk meredam radikal bebas

DPPH semakin besar. Jika suatu senyawa memiliki aktivitas sebagai antioksidan, maka akan terjadi penurunan nilai absorbansi DPPH yang ditunjukkan dengan terjadinya degradasi warna ungu DPPH menjadi kuning

Pengujian aktivitas antioksidan dalam ekstrak mikroalga *C. vulgaris* yaitu dengan variasi konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm dan 100 ppm. Hasil aktivitas antioksidan dengan metode DPPH diinterpretasikan dalam parameter nilai persentase inhibisi ekstrak *C.vulgaris* disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Persen Inhibisi Ekstrak Kasar Mikroalga *C.vulgaris* pada Perlakuan Sumber Cahaya Berbeda

Berdasarkan pengujian aktivitas antioksidan ekstrak kasar *C. vulgaris* menunjukkan nilai presentase inhibisi yang berbeda-beda. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin tinggi nilai presentase inhibisinya. Yulianti *et al.* (2015) menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi pelarut, maka semakin tinggi presentase inhibisinya, hal ini disebabkan pada sampel yang semakin banyak, maka

semakin tinggi kandungan antioksidannya sehingga berdampak juga pada tingkat penghambatan radikal bebas yang dilakukan oleh zat antioksidan tersebut.

Data persen inhibisi selanjutnya dilakukan analisis regresi linier sederhana untuk melakukan prediksi nilai konsentrasi dalam melakukan peredaman radikal DPPH 50% (IC_{50}). Menurut Firdiyani *et al.* (2015), besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC_{50} , yaitu

konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka aktivitas antioksidannya

semakin tinggi (Molyneux, 2004). Data nilai IC₅₀ ekstrak kasar *C.vulgaris* yang dikultivasi berdasarkan sumber cahaya berbeda ditunjukkan pada Tabel 2.

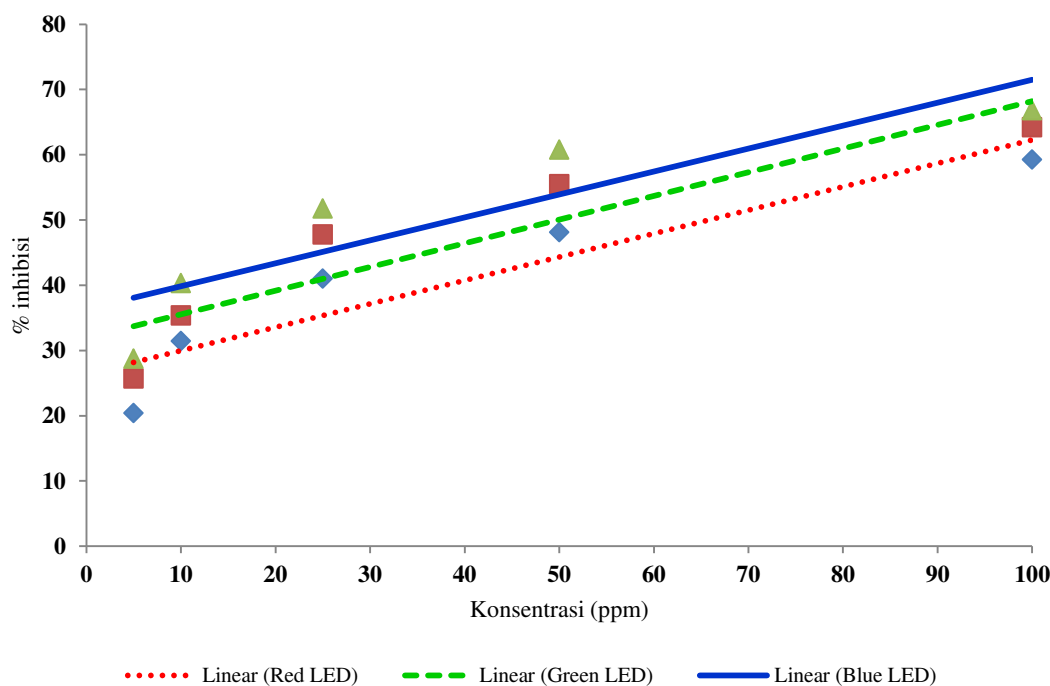
Tabel 2. Nilai IC₅₀ Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella vulgaris* yang Dikultivasi Berdasarkan Sumber Cahaya Berbeda

Perlakuan Sumber Cahaya	$y = a + b \cdot x$	R ²	R	IC ₅₀ (ppm)	Kriteria IC ₅₀
LED Merah	$y = 27,644 + 0,367 \cdot x$	0,870	0,933	60,915	Kuat
LED Hijau	$y = 33,248 + 0,355 \cdot x$	0,806	0,898	47,188	Sangat Kuat
LED Biru	$y = 36,307 + 0,352 \cdot x$	0,787	0,887	38,900	Sangat Kuat

Aktivitas antioksidan ekstrak *C. vulgaris* yang dihasilkan selama penelitian cukup potensial sebagai sumber antioksidan dari bahan alami karena nilai IC₅₀ yang dihasilkan antara 38,900-60,915 ppm. Hal ini berarti aktivitas antioksidan yang dihasilkan tergolong pada kriteria sangat kuat sampai kuat. Antioksidan dapat secara efektif mendonorkan sebuah elektron kepada radikal bebas. Apabila radikal bebas telah mendapatkan elektron dari antioksidan maka radikal bebas akan menjadi stabil. Setelah antioksidan mendonorkan sebuah elektronnya, antioksidan akan berubah menjadi radikal bebas, akan tetapi dalam fase ini tidak berbahaya karena mampu menyesuaikan perubahan kehilangan elektron tanpa berubah menjadi reaktif (Panjaitan *et al.*, 2008).

Perbedaan perlakuan dari ekstrak kasar *C. vulgaris* yang dikultivasi berdasarkan sumber cahaya menunjukkan

tren linier persen inhibisi yang berbeda dan nilai aktivitas antioksidan yang berbeda (Gambar 4). Berdasarkan garis tren linieritas menunjukkan bahwa perlakuan LED biru memiliki tren linier persen inhibisi paling tinggi dari pada perlakuan sumber cahaya yang lain dengan persamaan regresi linier $y = 36,307 + 0,352x$, nilai koefisien determinan (R²) sebesar 0,787 dan koefisien korelasi (R) sebesar 0,887. Sedangkan perlakuan LED merah memiliki tren linier persen inhibisi yang paling rendah dengan persamaan regresi linier $y = 27,644 + 0,367x$, nilai koefisien determinan (R²) sebesar 0,870 dan koefisien korelasi (R) sebesar 0,933. Ekstrak kasar *C.vulgaris* perlakuan sumber cahaya LED hijau memiliki persamaan regresi linier $y = 33,248 + 0,355x$ dengan nilai koefisien determinan (R²) sebesar 0,806 dan koefisien korelasi (R) sebesar 0,898.



Gambar 4. Regresi Linier Sederhana dari Persen Inhibisi Ekstrak *C. vulgaris*

Data aktivitas antioksidan ekstrak *C. vulgaris* dari semua perlakuan memiliki kriteria sebagai antioksidan yang baik. Hasil yang didapat berdasarkan nilai IC_{50} sebesar 38,900ppm tergolong antioksidan dengan kriteria sangat kuat karena kurang dari 50 ppm pada perlakuan sumber cahaya LED Biru. Sedangkan hasil aktivitas antioksidan terendah pada perlakuan sumber cahaya LED Merah dengan nilai IC_{50} sebesar 60,915 ppm tergolong kriteria antioksidan kuat karena berkisar antara 50-100 ppm. Kuat atau lemahnya aktivitas antioksidan suatu senyawa dapat dipengaruhi beberapa faktor lingkungan diantaranya yaitu kondisi habitat yang meliputi cahaya, temperatur, salinitas dan media *C. vulgaris* pada saat kultivasi. Diperkuat dengan penelitian yang dilakukan oleh Rafaelina *et al.*, (2016), Proses kultivasi pada *Chlorella sp* dipengaruhi oleh faktor lingkungan yang

secara langsung akan mempengaruhi pertumbuhan dan proses metabolisme.

Berdasarkan hasil uji *One Way Anova* terdapat perbedaan yang nyata antara sumber cahaya yang berbeda dengan variabel antioksidan memiliki nilai signifikansi (Sig.) $0,000 < 0,05$ dan nilai F hitung lebih besar dari F tabel yaitu $540,662 > 4,351$ yang berarti bahwa terdapat perbedaan nyata antar perlakuan. Hal ini mengindikasikan bahwa perlakuan selama kultivasi *C. vulgaris* berdasarkan sumber cahaya yang berbeda mampu memberikan pengaruh terhadap aktivitas antioksidan. Pengaruh tersebut berkaitan dengan perlakuan selama kultur mengakibatkan tekanan atau cekaman lingkungan sehingga dapat menstimulasi aktivitas antioksidan pada *C. vulgaris*. LED biru memiliki aktivitas antioksidan terbaik dibandingkan perlakuan LED hijau dan LED merah. Hal ini dikarenakan LED biru dapat meningkatkan akumulasi beta

karoten dan metabolit sekunder lainnya pada *C. vulgaris*. Diperkuat dengan penelitian Goiris *et al.*, (2012) menyatakan bahwa aktivitas antioksidan dari mikroalga laut seperti *C. vulgaris* bisa berasal dari pigmen seperti klorofil dan karotenoid, vitamin dan prekursor vitamin termasuk α -tokoferol, α -karoten, β -karoten niasin, tiamin, asam askorbat, flavonoid,

terpenoid, peptida, dan zat antioksidatif lain.

Uji Fitokimia Ekstrak *Chlorella vulgaris*

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif pada tanaman. Uji fitokimia pada penelitian ini dilakukan terhadap ekstrak metanol *C. vulgaris*. Hasil uji fitokimia mikroalga *C. vulgaris* ditunjukkan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pengamatan Uji Fitokimia Ekstrak Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Perlakuan	Komponen Bioaktif					
	Alkaloid	Triterpenoid	Steroid	Saponin	Flavonoid	Kuinon
LED Merah	++	-	+	+	+	-
LED Hijau	++	-	-	++	++	+
LED Biru	++	-	++	++	++	++

Keterangan :

++ : Ada kuat dalam ekstrak, + : Ada dalam ekstrak, - : Tidak ada dalam ekstrak

1. Alkaloid

Komponen alkaloid pada seluruh perlakuan terdeteksi kuat dalam ekstrak *C. vulgaris*. Uji alkaloid menunjukkan hasil positif ditandai dengan timbulnya endapan berwarna merah hingga jingga dengan pereaksi dragendorf Diperkuat dengan penelitian yang dilakukan oleh Fithriani *et al.*, (2015) bahwa terdapat senyawa alkaloid pada mikroalga *Chlorella* sp. dengan identifikasi terbentuk endapan berwarna jingga. Alkaloid merupakan senyawa yang bersifat semi polar dan digunakan sebagai agen anastesi serta banyak ditemukan pada tanaman obat.

2. Triterpenoid

Komponen triterpenoid tidak terdeteksi atau menunjukkan hasil negatif ditandai dengan tidak terbentuk sama sekali larutan berwarna merah kecoklatan. Hal ini disebabkan karena perbedaan tingkat kepolaran dari pelarut yang digunakan diduga akan berdampak pada

hasil ekstrak dengan senyawa bioaktif yang berbeda juga. Menurut Firdiyani *et al.*, (2015), senyawa triterpenoid bersifat non polar yang dapat dijumpai pada tumbuhan berfungsi sebagai pelindung untuk menolak serangga dan serangan mikroba.

3. Steroid

Komponen steroid memiliki reaksi positif pada ekstrak *C. vulgaris* perlakuan LED merah dan biru dengan terbentuknya filtrat berwarna hijau serta memiliki reaksi negatif pada perlakuan LED hijau. Menurut Firdiyani *et al.*, (2015), jenis pelarut yang digunakan dapat mempengaruhi penarikan komponen senyawa bioaktif. Steroid merupakan senyawa yang tergolong non polar, biasanya senyawa non polar akan tertarik oleh pelarut non polar (*like dissolved like*), akan tetapi senyawa steroid disini menunjukkan positif pada pelarut metanol. Faktor yang mempengaruhi hal tersebut terjadi adalah adanya momen dipol

senyawa polar yang akan menginduksi molekul non polar yang tidak memiliki dipol sehingga akan terjadi gaya elektrostatis di antara keduanya. Gaya ini menyebabkan senyawa non polar dapat larut atau sedikit larut dalam pelarut polar maupun non polar. Steroid memiliki kecenderungan sebagai sumber antibakteri dan antioksidan.

4. Saponin

Saponin merupakan golongan senyawa bioaktif yang bersifat polar dan termasuk golongan fenolik yang diduga dapat menghambat radikal bebas (Firdiyani *et al.*, 2015). Komponen saponin pada seluruh perlakuan menunjukkan reaksi positif pada ekstrak *C. vulgaris* dan terdapat kuat pada perlakuan sumber cahaya LED biru dan LED hijau yaitu terbentuk busa yang stabil dan kuat dengan penambahan 1 tetes HCl 2 N. Diperkuat dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Fithriani *et al.*, (2015), teridentifikasi senyawa bioaktif saponin pada ekstrak mikroalga *Chlorella sp* dengan terbentuknya busa permanen. Timbulnya busa pada uji saponin menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan untuk membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya.

5. Flavonoid

Perlakuan pada saat kultivasi menggunakan sumber cahaya yang berbeda menunjukkan reaksi positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Fithriani *et al.*, (2015) bahwa ekstrak *Chlorella sp* memiliki reaksi positif pada komponen flavonoid. Flavonoid adalah salah satu dari banyak molekul yang

digunakan oleh sel untuk melindungi bahaya reaktif oksigen spesies dan saat ini menjadi fokus perhatian karena potensinya yang menguntungkan terhadap kesehatan diantaranya memiliki aktivitas antioksidan, anti tumor, anti alergi dan anti inflamasi. Posisi grup hidroksil dan grup lain dalam struktur kimia flavonoid sangat penting untuk mencegah radikal bebas (Procházková *et al.*, 2011).

6. Kuinon

Senyawa kuinon banyak ditemukan dalam bentuk glikosida, terdapat dalam vakuola sel dan mudah larut dalam senyawa polar. Selain itu digunakan sebagai antikanker dan antioksidan (Firdiyani *et al.*, (2015). Komponen kuinon pada ekstrak *C. vulgaris* memiliki reaksi positif dan terdeteksi kuat ada pada ekstrak *C. vulgaris* perlakuan LED biru dengan terbentuknya filtrat berwarna kuning. Selanjutnya pada perlakuan LED merah tidak terjadi reaksi positif. Hal ini berkaitan dengan perlakuan sumber cahaya yang diberikan selama kultivasi yaitu pada perlakuan LED biru dapat memicu metabolit sekunder ekstrak *C. vulgaris* seperti terdeteksi kuat pada komponen kuinon yang berpotensi sebagai antioksidan. Diperkuat dengan penelitian yang dilakukan oleh Fithriani *et al.*, (2015), adanya perbedaan reaksi pada identifikasi golongan senyawa bioaktif ekstrak *Chlorella sp*. dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya yaitu stress pada sel mikroalga selama kultur. Sumber cahaya di alam yaitu dengan adanya paparan sinar matahari merupakan salah satu bentuk pemicu stres yang dapat meningkatkan biosintesis kandungan senyawa bioaktif seperti komponen fenol pada jaringan tanaman.

KESIMPULAN

Perlakuan sumber cahaya yang berbeda pada saat kultivasi selain mempengaruhi pertumbuhan tetapi juga berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan ekstrak *C. vulgaris*. Pencahayaan menggunakan neon kombinasi LED merah secara konsisten menghasilkan produksi *C. vulgaris* tertinggi dibandingkan perlakuan pencahayaan neon dengan LED hijau dan LED biru. Sedangkan pencahayaan menggunakan neon

kombinasi LED biru memiliki aktivitas antioksidan terbaik karena dapat menstimulasi pembentukan metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antioksidan seperti komponen alkaloid, flavonoid, steroid, saponin dan kuinon yang teridentifikasi positif pada ekstrak *C.vulgaris* yang dapat melawan senyawa radikal bebas dan menghambat bahaya radikal bebas seperti timbulnya penyakit degeneratif dan meningkatkan sistem imunitas.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd El-Baky HH. 2009. Enhancing antioxidant availability in grains of wheat plants grown under seawater-stress in response to microalgae extracts treatments. *African Journal of Biochemistry Research*, 3(4): 077-083.
- Bariyyah SK, Fasya AG, Abidin M. Hanapi A. 2013.. Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella* sp. Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *Jurnal Alchemy UIN Maulana Malik Ibrahim Malang*, 2 (2): 150-204.
- Barus P. 2009. *Pemanfaatan Bahan Pengawet dan Antioksidan Alami pada Industri Bahan Makanan*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Blanken W, Cuaresma M, Wijffels MH, Janssen M. 2013. Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. *Mikroalgal. Res*, 2: 333-340.
- De Fretes H, Susanto AB, Prasetyo, B. Limantara L. 2012. Karotenoid dari Mikroalga dan Makroalga : Potensi Kesehatan Aplikasi dan Bioteknologi. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. XXIII (2): 221-228.
- Firdiyani F, Agustini TW, Ma'ruf WF.. 2015. Ekstraksi Senyawa Bioaktif Sebagai Antioksidan Alami *Spirulina* Platensis Segar dengan Pelarut yang Berbeda. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 18(1): 28-37.
- Fithriani D, Amini S, Melanie S. dan Susilowati R. 2015. Uji Fitokimia Kandungan Total Fenol dan Aktivitas Antuoksidan Mikroalga *Spirulina* sp, *Chlorella* sp. dan *Nannochloropsis* sp. *Jurnal JPB Kelautan dan Perikanan*, 10(2): 101–109.
- Goiris K, Muylaert K, Fraeye I, Foubert I., Brabanter JD, Cooman LD. 2012. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal Appl Phycol*, 1-10. DOI 10.1007/s10811-012-9804-6.
- Helena S, Zainuri M, Suprijanto J. 2016. Mikroalga *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905) Growth using the LED Light (Light Limiting Dioda) and

- Different Media. *Aquatic Procedia* 7 (2016): 226 – 230.
- Irondi G. Oboh, Akintunde JK. 2012. Comparative and Synergistic Antioxidant Properties of Carica Papaya and Azadirachta Indica Leaves. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*. 3(12): 4773-4779.
- Karseno I. Handayani, Setyawati R.. 2013. Aktivitas dan Stabilitas Antioksidan Ekstrak Pigmen Alga *Oscillatoria* sp. *Jurnal Agritech Universitas Jenderal Soedirman*. 33 (4): 371-376.
- Kimball JW. 2000. *Biologi. Edisi Kelima Jilid 1*. Jakarta: Erlangga.
- Kumoro AC. 2015. *Teknologi Ekstraksi Senyawa Bahan Aktif dari Tanaman Obat*. Plantaxia. Yogyakarta.
- Kusumaningrum HP dan Zainuri M. 2013. Aplikasi Pakan Alami Kaya Karotenoid untuk Post Larvae *Penaeus monodon* Fab. *Jurnal Ilmu Kelautan*, 18(3): 143-149. ISSN 0853-7291.
- Molyneux P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin J. Science Technology*, 26(2): 211-219.
- Nawaly H, Susanto AB, Uktolseja JLA. 2013. *Aplikasi Antioksidan dari Rumput Laut*. Prosiding Seminar Nasional X Biologi UNS Vol 10 (1) : 12-19.
- Panjaitan TD, Prasetyo B. Limantara L. 2008. *Peranan Karotenoid Alami Dalam Menangkal Radikal Bebas di Dalam Tubuh*. Prosiding Seminar Nasional Universitas Sumatera Utara. Hal 79-86.
- Priyadarshani I, dan Rath B. 2012. Commercial and industrial applications of micro algae. *Journal Algal Biomass Utiln*. 3(4): 89–100. ISSN: 2229- 6905.
- Procházková, D, Boušová I, Wilhelmová N.. 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Journal Fitoterapia*, 82: 513–523.
- Rafaelina M, Rustam Y, Amini S. 2016. Pertumbuhan dan Aktivitas Antioksidan dari Mikroalga *Chlorella* sp. *Jurnal Bioma*, 12(1): 12-21
- Satriaji DE, Zainuri M. Widowati I. 2016. Study of Growth and C, N, P Content of Microalgae *Chlorella vulgaris* Cultivated in Different Culture Media and Light Intensity. *Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)*, 78:4–2: 27–31.
- Syafriyudin., S. Priyambodo, Saudah S. Ledhe NT. 2015. *Pengaruh Variabel Warna Lampu LED Terhadap Pertumbuhan Tanaman Krisan*. Prosiding Seminar Nasional Teknik Industri “Sustainable Manufacturing”. UPN Jawa Timur : 1-9.
- Tamat SR, Wikanta T, Maulina LS. 2007. Aktivitas antioksidan dan toksisitas senyawa bioaktif dari ekstrak rumput laut hijau *Ulva reticulata* Forsskal. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* 5(1), 31-36.
- Teo CL, Idris A, Wahidin S, Lai LW.. 2014. Effect of Different Light Wavelength on the Growth of Marine Microalgae. *Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)*, 67 (3) : 97–100.
- Thomas-Hall, S., J.H. Mussgnug., J.Rupprecht., A.Foo., V.Klassen., A. McDowall., P.M Schenk., O.Kruse and B. Hankamer. 2007. *Engineering Photosynthetic Light Capture Impact*

On Improved Solar Energy to Biomass Conversion. Journal Plant Biotechnol. Vol 5 : 802-814

Widowati I, Lubac D, Puspita M., Bourgougnon N. 2014. Antibacterial and Antioxidant Properties of the Red Alga *Gracilaria Verrucosa* From the North Coast of Java, Semarang, Indonesia. *International Journal of Latest Research in Science and Technology*, 3(3): 179-185.

Widowati I, Zainuri M., Kusumaningrum HP, Mouget JL. 2015. *Salina Sustainable Valorization of Indonesian Phytoplankton in Aquaculture : New Approaches to Control Infection Deseas*. Laporan Penelitian Kerjasama Luar Negeri dan Publikasi Internasional. Fakultas Kelautan dan Perikanan. Universitas Diponegoro. Semarang.

Yulianti H. Natsir, Wahab AW. 2015. Analisis Kadar Betakaroten dalam Ekstrak Petroleum Eter Daun Kelor dari Daerah Pesisir dan Pegunungan Serta Potensinya Sebagai Antioksidan. *Jurnal Repository Universitas Hasanudin Makasar*. Hal 1-10.

Zainuri M., Kusumaningrum HP, Kusdiyantini E. 2014. Microbiological and Ecophysiological Characterisation of Green Algae *Dunaliella* sp. for Improvement of Carotenoid Production. *Jurnal Natur Indonesia*, 10(2) : 66-69.