

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN TERHADAP DPPH DAN IDENTIFIKASI
GOLONGAN SENYAWA AKTIF EKSTRAK KASAR MIKROALGA *Chlorella sp.*
HASIL KULTIVASI DALAM MEDIUM EKSTRAK TAUGE**

Siti Khairul Bariyyah, A. Ghanaim Fasya, Munirul Abidin, A. Hanapi

Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRACT

Chlorella sp. is one of the low-level plants that have the potential to be utilized, as stated in al Quran surah asy Syu'ara: 7. *Chlorella sp.* is one species of microalgae containing antioxidant compound, such as flavonoid, tanin, phenolic compound, terpenoid, chlorophyll and karotenoid. Purpose this research was to determine potential antioxidant activity and active compound of *Chlorella sp.*

Chlorella sp. was cultivated in Tauge Extract Medium (TEM) 4 % and harvesting at 10th day. Extraction of *Chlorella sp.* was estimated by maceration method using two variationsolvent, methanol and ethyl acetate. Antioxidant activity of crude extract *Chlorella sp.* wasestimated by DPPH assay with spectrofotometryUV-Vis. Identification of active compound was estimated by phytochemical reagent assay, as alkaloid, flavonoid, steroid, triterpenoid, tanin, and ascorbic acid.

The result showed that the highest number of cells ($4,6 \times 10^5$ cell/mL) when *Chlorella sp.* cultivation in TEM occured at 10th day. The rendemen of methanol and ethyl acetate extract of *Chlorellasp.* as follows7,001 % and 3,673 %. EC₅₀ value of methanol and ethyl acetate extract *Chlorellasp.* were 18,610 ppm and 27,320 ppm. The identification result of active compound of crude extract *Chlorellasp.* showed that methanol extract contains steroid, tannin, and ascorbic acid, while ethyl acetate extract contains tannin and ascorbic acid.

Keywords : *Chlorella sp.*, Tauge Extract Medium, Antioxidant, DPPH

ABSTRAK

Chlorella sp. merupakan salah satu tumbuhan tingkat rendah yang mempunyai potensi untuk dimanfaatkan, sebagaimana Firman Allah Swt. dalam al-Quran surat asy Syu'ara ayat 7. *Chlorella sp.* termasuk dalam spesies mikroalga dari kelompok Chlorophyta yang mengandung senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan seperti flavonoid, tanin, senyawa fenolik, terpenoid, klorofil dan karotenoid. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi aktivitas antioksidan dan golongan senyawa aktif dari *Chlorella sp.* yang ditumbuhkan dalam Medium Ekstrak Tauge (MET).

Chlorella sp. dikultivasi dalam MET 4 % dan pemanenan dilakukan pada hari ke-10. Ekstraksi *Chlorella sp.* dilakukan dengan metode maserasi menggunakan dua variasi pelarut yaitu metanol dan etil asetat. Aktivitas antioksidan ekstrak kasar *Chlorella sp.* dilakukan dengan uji DPPH secara spektrofotometri sinar tampak. Identifikasi golongan senyawa aktif dilakukan dengan menggunakan uji reagen secara kualitatif yang meliputi alkaloid, flavonoid, steroid, triterpenoid, tanin, dan asam askorbat.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kerapatan sel tertinggi ($4,6 \times 10^5$ sel/mL) saat kultivasi *Chlorella sp.* dalam MET terjadi pada hari ke-10. Rendemen dari ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat *Chlorellasp.* berturut-turut adalah 7,001 % dan 3,673 %. Ekstrak metanol *Chlorella sp.* mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai EC₅₀ sebesar 18,610 ppm, begitu juga dengan ekstrak etil asetat yang mempunyai nilai EC₅₀ sebesar 27,320 ppm. Hasil identifikasi golongan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak kasar *Chlorella sp.* menunjukkan bahwa ekstrak metanol mengandung steroid, tanin dan asam askorbat, sedangkan ekstrak etil asetat mengandung tanin dan asam askorbat.

Kata kunci : *Chlorella sp.*, MET, Antioksidan, DPPH

I. PENDAHULUAN

Chlorella sp. merupakan tumbuhan ganggang hijau bersel tunggal, hidup menyendiri atau berkelompok, tidak

mempunyai batang, akar, dan daun sebenarnya. *Chlorella sp.* tumbuh di air tawar, air payau, dan air asin. Beberapa keunggulan mikroalga *Chlorella sp.*,

diantaranya berkembang biak dengan cepat, mudah dalam membudidayakannya (Sidabutar, 1999) karena hidupnya tidak tergantung musim, tidak memerlukan tempat yang luas dan tidak memerlukan waktu yang lama untuk memanennya (Borowitzka, 1988), keseluruhan organnya dapat dimanfaatkan, mengandung senyawa pemacu pertumbuhan. Selain itu, *Chlorella sp.* mengandung berbagai nutrisi seperti protein, karbohidrat, asam lemak tak jenuh, vitamin, enzim (Kawaroe, 2008), klorofil a, klorofil b, serta karotenoid. Klorofil dan karotenoid ini dapat berfungsi sebagai antioksidan.

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Winarsi, 2007). Keberadaan antioksidan dapat melindungi tubuh dari berbagai penyakit degeneratif dan kanker, serta membantu menekan proses penuaan/ *antiaging* (Tapan, 2005). Saat ini antioksidan yang umum digunakan merupakan antioksidan sintetik diantaranya *Butylated hydroxyanisole* (BHA), *Butylated hydroxytoluene* (BHT), *Propylgallate* (PG) dan *Tert-Butylhydroquinone* (TBHQ) (Sherwin, 1990). Akan tetapi, senyawa tersebut dicurigai dapat menyebabkan keracunan dan efek karsinogenik (Grillo dan Gulout, 1995; Safer and Nughamish, 1999; Shanab, 2007). Oleh karena itu, pengembangan serta pemanfaatan antioksidan yang lebih efektif dan berasal dari alam penting untuk dilakukan (Oktay, *et al.*, 2003).

Pengujian aktivitas antioksidan mikroalga *Chlorella sp.* yaitu pada ekstrak biomassa. Oleh karena itu, *Chlorella sp.* dikultivasi terlebih dahulu dalam media kultur. Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah Medium Ekstrak Tauge (MET). MET ini merupakan salah satu media alami untuk pertumbuhan mikroalga. Tauge kacang hijau merupakan jenis sayuran yang umum dikonsumsi, mudah diperoleh, ekonomis, dan tidak menghasilkan senyawa yang berefek toksik. Media perlakuan MET mengandung

nutrien organik seperti karbohidrat, protein, vitamin dan lemak yang dibutuhkan sebagai sumber energi bagi pertumbuhan mikroalga. Selain itu, media perlakuan MET ini juga mengandung makronutrient anorganik seperti K, P, Ca, Mg, dan Na yang dibutuhkan oleh sel mikroba sebagai komponen penyusun sel, sedangkan mikronutrien seperti Fe, Zn, Mn, dan Cu dibutuhkan oleh sel sebagai kofaktor enzim dan sebagai komponen pembentuk klorofil (Richmond, 2006). Dilaporkan bahwa senyawa-senyawa dalam media kultur juga akan mengaktifkan fotosintesis pada mikroalga. Fotosintesis yang berlangsung efektif akan mempengaruhi produk yang dihasilkan (Wulandari, dkk., 2010). Selain itu, setiap jenis media kultur memberikan pengaruh berbeda terhadap kualitas kandungan mikroalga (Carolina, 1995).

II. METODE PENELITIAN

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik, Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia dan Laboratorium Ekologi Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan Maret – Mei 2013.

Alat

Seperangkat alat gelas, cawan porselen, shaker, oven, desikator, rotary evaporator vacuum, kuvet, inkubator, pipet tetes, aluminium foil, neraca analitik, sentrifuse, spektroskopik 20+, dan spektrofotometer UV-Vis *Varian Carry*.

Bahan

Isolat mikroalga *Chlorella sp.* dari Laboratorium Ekologi Universitas Maulana Malik Ibrahim Malang. Bahan-bahan lain yang digunakan adalah metanol *p.a.*, etil asetat *p.a.*, tauge (kacang hijau), akuades, larutan DPPH, kloroform, anhidrida asetat, asam sulfat pekat, serbuk Mg, HCl 37 %, HCl 2 %, reagen Dragendorff, reagen Mayer, FeCl₃ 1 %, larutan gelatin, kalium permanganat, vitamin C, dan BHT.

Metode Penelitian

A. Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

1. Sterilisasi Alat

Ditutup alat-alat yang akan disterilkan dengan alumunium foil. Dimasukkan ke dalam autoklaf dan diatur pada suhu 121 oC dengan tekanan 15 psi (per square inchi). Sterilisasi dilakukan untuk alat selama 30 menit (Hidayat, 2009).

2. Pembuatan Medium Ekstrak Tauge

Pembuatan medium ekstrak tauge diawali dengan pembuatan larutan stok MET yaitu 100 gram tauge direbus dalam 500 mL akuades yang mendidih selama 1 jam hingga volume ekstrak 200 mL. Medium ekstrak tauge dibuat dengan cara melarutkan ekstrak tauge ke dalam akuades dengan masing-masing konsentrasi 4 % (Prihantini, dkk., 2005).

3. Kultivasi *Chlorella sp.* dalam Media Ekstrak Tauge

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

4. Pemanenan Biomassa *Chlorella sp.*

Media kultur *Chlorella sp.* disentrifuse selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Biomassa *Chlorella sp.* dipisahkan dari supernatannya.

B. Penentuan Kadar Air

Cawan yang akan digunakan dipanaskan dahulu dalam oven pada suhu 100–105 °C selama 15 menit, kemudian cawan disimpan dalam desikator 10 menit, selanjutnya ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama hingga diperoleh berat cawan yang konstan. Biomassa *Chlorella sp.* ditimbang 1 mg kemudian dimasukkan ke dalam cawan dan dikeringkan di dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama 30

menit, kemudian dimasukkan dalam desikator dan ditimbang. Selanjutnya, dipanaskan kembali dalam oven 30 menit, didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali hingga berat konstan. Kadar air dihitung menggunakan rumus berikut :

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

Dimana :

a = bobot cawan kosong

b = bobot sampel + cawan sebelum dipanaskan

c = bobot cawan + sampel setelah dipanaskan

C. Preparasi Sampel

Sampel biomassa *Chlorella sp.* basah diambil seluruhnya kemudian dikeringanginkan pada suhu ruang selama 12 jam. Selanjutnya dilakukan ekstraksi pada sampel biomassa kering yang diperoleh.

D. Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga

Chlorella sp.

Biomassa *Chlorella sp.* kering diambil 50 gram kemudian dimaserasi masing-masing dengan pelarut metanol dan etil asetat sebanyak 250 mL selama 24 jam dengan *dishaker* selama 5 jam. Maserasi dilakukan tiga kali. Setelah itu dipisahkan antara filtrat dengan residu menggunakan corong buchner. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum* hingga diperoleh ekstrak pekat metanol dan etil asetat.

E. Uji Aktivitas Antioksidan dengan

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

1. Penentuan Panjang Gelombang

Maksimum

Larutan DPPH 0,5 mM sebanyak 5 mL dimasukkan dalam kuvet hingga penuh. Dicari λ_{maks} larutan dan dicatat hasil pengukuran λ_{maks} untuk digunakan pada tahap selanjutnya (Hanani, dkk., 2005).

2. Penentuan Waktu Kestabilan

Pengukuran Antioksidan

Larutan ekstrak 30 ppm dipipet sebanyak 6,75 mL. Ditambahkan larutan DPPH 0,5 mM sebanyak 2,25 mL, kemudian dicari waktu kestabilan tanpa inkubasi dan setelah inkubasi pada suhu 37 °C dan rentangan waktu 5 – 100 menit dengan interval 5 menit. Sampel diukur pada λ_{maks} yang telah diketahui pada tahap sebelumnya.

3. Pengukuran Potensi Antioksidan Pada Sampel

Sampel ekstrak dilarutkan dalam pelarutnya dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm. Ekstrak masing-masing konsentrasi dipipet 6,75 mL dan ditambahkan 2,25 mL DPPH 0,5 mM kemudian diinkubasi dengan suhu 37 °C pada waktu kestabilan yang diperoleh pada tahap sebelumnya, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 518,0 nm. Data absorbansinya yang diperoleh dari tiap konsentrasi masing-masing ekstrak dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya (Arindah, 2010):

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

Selanjutnya, dihitung nilai EC_{50} nya dengan memperoleh persamaan regresi menggunakan program “*GraphPad prism5 software, Regression for analyzing dose-response data*”.

Kontrol yang digunakan yaitu larutan DPPH 0,5 mM dalam metanol *p.a.*

Pembanding BHT dan asam askorbat (Vitamin C) diperlakukan seperti sampel.

F. Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Secara Kualitatif

1. Uji Triterpenoid dan Steroid

Ekstrak kasar diambil dan dilarutkan dengan kloroform sebanyak 0,5 mL, lalu ditambah dengan 0,5 mL anhidrida asetat. Selanjutnya ditambah dengan 1 – 2 mL H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung tersebut. Warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid, jika berupa

cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid.

2. Uji Flavonoid

Ekstrak dilarutkan dalam 1 – 2 mL metanol panas 50 %, kemudian ditambah logam Mg dan 0,5 mL HCl pekat. Senyawa flavonoid akan menimbulkan warna merah atau jingga.

3. Uji Alkaloid

Ekstrak kasar ditambah 0,5 mL HCl 2 %, selanjutnya larutan dibagi dalam dua tabung. Tabung I ditambahkan 2 – 3 tetes reagen Dragendorff, tabung II ditambahkan 2 – 3 tetes reagen Mayer. Jika tabung I terbentuk endapan jingga dan pada tabung II terbentuk endapan kekuning-kuningan menunjukkan adanya alkaloid.

4. Uji Tanin

– Uji dengan $FeCl_3$

Ekstrak ditambahkan dengan 2 – 3 tetes larutan $FeCl_3$ 1 %. Jika larutan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tua, maka mengandung tanin.

– Uji dengan Larutan Gelatin

Ekstrak ditambah dengan larutan gelatin. Jika terbentuk endapan putih, menunjukkan adanya tanin.

5. Uji Asam Askorbat

Masing-masing ekstrak dilarutkan dalam akuades kemudian ditambahkan larutan $KMnO_4$ 0,1 %. Jika terbentuk warna coklat maka menunjukkan adanya asam askorbat.

G. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menghitung persen (%) aktivitas antioksidan yang diperoleh dari data absorbansi kemudian dilakukan perhitungan nilai EC_{50} dengan menggunakan persamaan regresi yang menyatakan hubungan antara konsentrasi ekstrak (x) dengan persen (%) aktivitas antioksidan (y). Sampel yang mempunyai nilai EC_{50} terendah menunjukkan bahwa sampel tersebut memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang tinggi.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Kultivasi Mikroalga *Chlorella sp.*

Kultivasi *Chlorella sp.* dilakukan dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) menggunakan erlenmeyer 1000 mL. MET merupakan salah satu sumber media alami yang dapat digunakan untuk media pertumbuhan mikroalga (Prihantini, dkk., 2005). MET mengandung unsur makro dan mikro, vitamin, mineral serta asam amino yang dibutuhkan bagi pertumbuhan mikroalga. Unsur hara yang terkandung dalam MET seperti K, P, Fe, Na, dan K, sedangkan vitamin yang terkandung dalam media tersebut diantaranya karoten, thiamin, riboflavin, niasin, dan vitamin C (Persagi, 2009).

Chlorella sp. dikultur dalam MET selama 10 hari dengan fotoperiodisitas 14 jam terang dan 10 jam gelap. Cahaya mempunyai peranan yaitu sebagai sumber energi dalam proses fotosintesis. Penyinaran dengan lampu TL selama kultur digunakan sebagai pengganti cahaya matahari agar sel *Chlorella sp.* dapat melakukan proses fotosintesis.

Temperatur selama kultivasi *Chlorella sp.* menggunakan temperatur ruang (biasanya berkisar antara temperatur 25 – 30 °C). Kondisi temperatur tersebut merupakan kisaran temperatur yang baik untuk pertumbuhan mikroalga termasuk *Chlorella sp.* karena untuk pertumbuhan mikroalga yang optimal digunakan temperatur 15 – 30 °C (De La Nouve dan De Pauw, 1988).

Derajat keasaman (pH) pada kultur *Chlorella sp.* selama kultivasi berkisar 7 – 7,2. Kisaran pH ini berada pada kisaran pH yang sesuai untuk pertumbuhan mikroalga yaitu 4,5 – 9,3 (Prihantini, dkk., 2005).

Selama kultivasi terjadi perubahan warna kultur pada media perlakuan yang semula berwarna hijau kekuningan menjadi hijau tua seperti pada Gambar 1. Warna hijau dari kelima media relatif sama. Perubahan warna kultur ini diasumsikan juga diikuti dengan peningkatan kepadatan sel *Chlorella sp.* yang menandakan

terjadinya pemanfaatan nutrisi (unsur hara) yang terkandung dalam MET oleh sel-sel *Chlorella sp.* Begitu juga kesesuaian faktor cahaya, temperatur, dan pH yang digunakan mendukung penyerapan nutrisi oleh sel-sel *Chlorella sp.*



Kultur hari ke-0 Kultur hari ke-5 Kultur hari ke-10
Gambar 1. Warna kultur *Chlorella sp.* pada hari berbeda

Pertumbuhan mikroalga pada kultur juga ditandai dengan bertambah besarnya ukuran sel atau bertambah banyaknya jumlah sel. Pertumbuhan *Chlorella sp.* yang dikultivasi dalam MET pada penelitian ini memiliki pola pertumbuhan yang dimulai dari fase eksponensial, fase stasioner, dan fase kematian. Fase eksponensial dimulai dari hari ke-0 sampai hari ke-8, fase stasioner terjadi pada hari ke-8 sampai hari ke-11 dan fase kematian setelah hari ke-11 sampai hari ke-15. Pola pertumbuhan *Chlorella sp.* tidak mengalami fase lag. Hal ini terjadi karena *Chlorella sp.* yang diinokulasikan tersebut diambil dari fase eksponensial sehingga tidak mengalami fase lag. Salah satu faktor yang menentukan lamanya fase adaptasi adalah umur kultur yang digunakan sebagai inokulum. Fase adaptasi akan menjadi lebih singkat atau bahkan tidak terlihat apabila sel-sel yang diinokulasikan berasal dari kultur yang berada dalam fase eksponensial. Fase adaptasi tidak terlihat secara jelas pada media perlakuan kemungkinan juga disebabkan sel-sel yang diinokulasikan cepat beradaptasi terhadap media kultur yang baru, mampu tumbuh dan membelah dengan cepat (Prihantini, dkk., 2005).

B. Pemanenan Mikroalga *Chlorella sp.*

Pemanenan *Chlorella sp.* dilakukan pada fase stasioner. Fase stasioner

merupakan tahap pertumbuhan yang konstan dimana laju reproduksi sama dengan laju kematian. Meskipun pada fase stasioner nutrisi semakin berkurang, tetapi pembelahan sel masih dapat berlangsung. Hal ini disebabkan sel memiliki cadangan energi sehingga masih dapat menggunakan komponen tersebut untuk melakukan pertumbuhan dan mempertahankannya meski sangat rendah (Schlegel, 1994). Pada fase stasioner juga terjadi metabolisme sekunder yang merupakan keseluruhan proses sintesis dan perombakan produk metabolit primer (Herbert, 1995). Selain itu, terjadi penumpukan produk beracun dan kehabisan nutrisi, serta menghasilkan komponen-komponen (metabolit sekunder) yang berfungsi untuk pertahanan hidup. Contoh produk senyawa metabolit sekunder seperti senyawa fenol, alkaloid, triterpenoid (Yudha, 2008).

Pemanenan *Chlorella sp.* dilakukan pada fase stasioner yaitu pada hari ke-10. Hal ini karena pada hari tersebut, pertumbuhan *Chlorella sp.* mencapai kepadatan sel tertinggi yang ditandai dengan kultur yang berwarna hijau tua dengan jumlah sel $4,6 \times 10^6$ sel/mL. Proses pemanenan *Chlorella sp.* dilakukan dengan cara mengumpulkan biomassa dan filtrat dalam wadah botol. Filtrat dan biomassa dari hasil pemanenan dipisahkan menggunakan sentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Teknik pemisahan biomassa dan filtrat dengan menggunakan sentrifuse merupakan salah satu cara yang efisien (Volshak, 1990).

C. Analisis Kadar Air

Penentuan kadar air dilakukan dengan menguapkan sampel dalam oven pada suhu 100 – 105 °C. Kadar air dari biomassa *Chlorella sp.* ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kadar air biomassa *Chlorella sp.*

Biomassa	Kadar Air (%)
Basah	93,046
Kering	12,036

D. Preparasi Sampel

Preparasi sampel pada mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan cara pengeringan biomassa hasil kultur. Pengeringan biomassa mikroalga *Chlorella sp.* dilakukan dengan cara dikeringanginkan pada suhu ruang selama 12 jam menggunakan kipas angin. Hembusan kipas angin yang dihasilkan kipas angin tidak menimbulkan panas dan dapat membawa uap air yang lebih besar daripada pengeringan AC dan *blowerheat*, sehingga proses pengeringan berlangsung lebih cepat sebelum terjadinya kerusakan bahan (Sopyan, 2001).

Hasil yang diperoleh dari proses pengeringan ini menunjukkan bahwa dari 400 gram biomassa basah didapatkan biomassa kering sebesar 55 gram, yang berwarna hijau pekat.

E. Ekstraksi Senyawa Aktif Mikroalga

Chlorella sp.

Ekstraksi *Chlorella sp.* dilakukan dengan metode maserasi menggunakan dua variasi pelarut yang berbeda kepolarannya, yaitu metanol (polar) dan etil asetat (semipolar). Maserasi ini digunakan karena prosesnya mudah, sederhana, dan tidak menggunakan suhu tinggi yang dimungkinkan dapat merusak senyawa aktif pada mikroalga *Chlorella sp.*

Hasil rendemen ekstrak metanol dan etil asetat ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Rendemen Ekstrak *Chlorella sp.*

Pelarut	Rendemen (%) (b/b)	Warna Ekstrak Pekat
Metanol	7,001	Hijau tua pekat
Etil asetat	3,673	Hijau tua kecoklatan

Rendemen ekstrak metanol lebih besar daripada etil asetat, hal ini karena pelarut metanol yang bersifat polar lebih banyak mengekstrak senyawa aktif daripada pelarut etil asetat yang bersifat semipolar. Metanol merupakan pelarut polar yang sering digunakan karena penetrasi ke dalam 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.

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

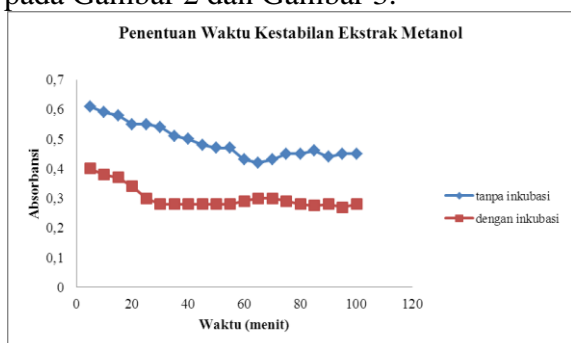
1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Hasil penentuan panjang gelombang DPPH 0,5 mM diperoleh panjang gelombang maksimum sebesar 518,0 nm.

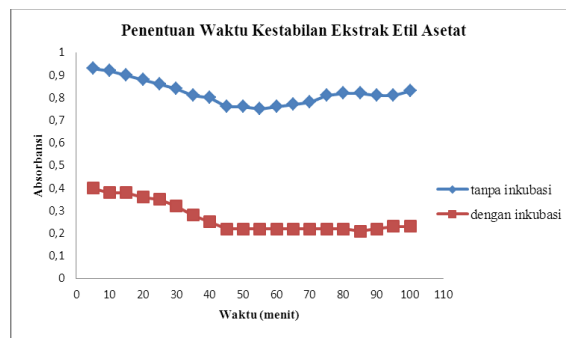
2. Penentuan Waktu Kestabilan Pengukuran Antioksidan

Pengukuran waktu kestabilan dilakukan untuk mengetahui waktu sampel dan DPPH sudah bereaksi secara stabil yang ditunjukkan dengan tidak adanya lagi penurunan absorbansi. Setiap senyawa memiliki waktu kestabilan yang berbeda untuk dapat bereaksi secara sempurna (Brand dan William, 1995).

Penentuan waktu kestabilan pada ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat dilakukan tanpa inkubasi dan dengan inkubasi pada suhu 37 °C selama 5 – 100 menit dengan interval 5 menit. Hasil penentuan waktu kestabilan menunjukkan bahwa sampel yang ditambahkan dengan DPPH dengan inkubasi memiliki nilai absorbansi yang lebih stabil dibandingkan tanpa inkubasi. Grafik penentuan waktu kestabilan ekstrak metanol dan etil asetat setelah ditambah larutan DPPH ditunjukkan pada Gambar 2 dan Gambar 3.



Gambar 2. Penentuan waktu kestabilan ekstrak metanol



Gambar 3. Penentuan waktu kestabilan ekstrak etil asetat

3. Pengukuran Potensi Antioksidan pada Mikroalga *Chlorella sp.*

Uji kuantitatif potensi antioksidan pada ekstrak *Chlorella sp.* dalam penelitian ini dilakukan dengan uji DPPH secara spektrofotometri sinar tampak. 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. Pada metode ini absorbansi yang diukur adalah absorbansi larutan DPPH sisa yang tidak bereaksi dengan senyawa antioksidan (Josephy, 1997).

Pengujian aktivitas antioksidan pada ekstrak metanol dan etil asetat *Chlorella sp.* yaitu dengan variasi konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm, selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 518,0 nm dengan waktu kestabilan yang telah didapatkan pada masing-masing ekstrak.

Parameter yang digunakan untuk mengetahui potensi antioksidan dalam ekstrak *Chlorella sp.* yaitu persen (%) aktivitas antioksidan dan nilai EC_{50} . EC_{50} dapat didefinisikan sebagai konsentrasi larutan sampel yang akan menyebabkan reduksi terhadap aktivitas DPPH sebesar 50 %. Semakin kecil nilai EC_{50} maka aktivitas antioksidannya semakin tinggi (Molyneux, 2004). Data hasil % aktivitas antioksidan dan nilai EC_{50} ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Persen aktivitas antioksidan dan nilai EC₅₀ ekstrak *Chlorella sp.* dan perbandingan

No	Sampel	% aktivitas antioksidan						Nilai EC ₅₀ (ppm)
		5 ppm	10 ppm	15 ppm	20 ppm	25 ppm	30 ppm	
1	Ekstrak Metanol	5,784	6,041	9,590	69,690	85,383	90,139	18,610
2	Ekstrak etil asetat	5,927	7,373	7,404	8,218	15,358	85,580	27,320
3	Asam askorbat	67,620	92,744	95,056	96,190	96,744	96,795	3,527
4	BHT	39,460	66,247	77,674	86,498	89,823	89,879	6,552

Ekstrak mikroalga *Chlorella sp.* fraksi metanol dan etil asetat memiliki potensi antioksidan yang kuat, walaupun lebih rendah jika dibandingkan dengan antioksidan asam askorbat dan BHT.

G. Uji Fitokimia Ekstrak *Chlorella sp.* dengan Reagen

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif pada tanaman. Uji fitokimia pada penelitian ini dilakukan terhadap ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat *Chlorella sp.* Hasil uji fitokimia mikroalga *Chlorella sp.* ditunjukkan dalam Tabel 4.

Tabel 4. Hasil pengamatan uji fitokimia ekstrak mikroalga *Chlorella sp.*

No	Golongan Senyawa	Hasil Pengujian	
		Ekstrak Metanol	Ekstrak Etil asetat
1	Alkaloid	-	-
2	Flavonoid	-	-
3	Steroid	+	-
4	Triterpenoid	-	-
5	Tanin	-	-
6	- FeCl ₃	-	-
	- gelatin	+	+
	Asam askorbat	+	+

Keterangan : tanda (+) : terkandung senyawa/warnamuda
 tanda (-) : tidak terkandung senyawa/tidak terbentuk warna

1. Steroid

Uji yang digunakan untuk mengidentifikasi adanya golongan senyawa steroid pada ekstrak kasar *Chlorella sp.* yaitu menggunakan reaksi Liebermann-Burchard (anhidrida asetat-H₂SO₄ pekat) yang menghasilkan warna hijau biru.

Steroid akan mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat dan menghasilkan produk oksidasi yang memberikan reaksi warna hijau kebiruan. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa ekstrak metanol *Chlorella sp.* mengandung steroid yang ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan.

2. Tanin

Uji fitokimia adanya senyawa tanin dalam ekstrak *Chlorella sp.* menggunakan uji dengan FeCl₃ dan uji dengan larutan gelatin. Uji fitokimia pertama yaitu menambah ekstrak dengan larutan FeCl₃ sebagai reagen, hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi hijau kehitaman atau biru tua. Sedangkan uji fitokimia kedua yaitu menambahkan gelatin ke dalam ekstrak dan ditunjukkan dengan adanya endapan putih.

Uji fitokimia dengan penambahan FeCl₃ menunjukkan hasil negatif karena tidak terbentuk warna hijau kehitaman/biru tua. Uji fitokimia dengan penambahan gelatin menunjukkan hasil positif yang ditunjukkan dengan adanya endapan putih.

Uji fitokimia tanin dengan penambahan FeCl₃ menunjukkan hasil negatif sedangkan dengan penambahan gelatin menunjukkan hasil positif. Hal ini diduga karena senyawa tanin yang terkandung dalam ekstrak masih dalam bentuk glikosidanya sehingga sulit berikatan dengan ion logam (mengkelat ion logam). Akan tetapi, dengan penambahan gelatin semua tanin menimbulkan endapan sedikit atau banyak (Harborne, 1987). Hal ini dikarenakan, meskipun masih dalam bentuk glikosidanya, tanin masih mampu

untuk berinteraksi dengan gelatin melalui ikatan hidrogen.

3. Asam Askorbat

Ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat positif mengandung asam askorbat yang ditunjukkan dengan terbentuknya warna coklat. Hal ini didukung bahwa asam askorbat bersifat polar sehingga akan larut dalam senyawa polar maupun semipolar.

IV. KESIMPULAN

Aktivitas antioksidan ekstrak *Chlorella sp.* terhadap DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ditunjukkan dengan nilai EC₅₀. Nilai EC₅₀ dari ekstrak metanol dan ekstrak etil asetat berturut-turut yaitu 18,610 ppm dan 27,320 ppm. Aktivitas antioksidan *Chlorella sp.* tergolong kuat karena mempunyai nilai EC₅₀ kurang dari 50 ppm.

Hasil identifikasi golongan senyawa dalam ekstrak kasar mikroalga *Chlorella sp.* dengan pelarut metanol dan etil asetat menunjukkan bahwa ekstrak metanol mengandung senyawa steroid, tanin, dan asam askorbat, sedangkan ekstrak etil asetat mengandung tanin dan asam askorbat.

V. DAFTAR PUSTAKA

- Sidabutar, E.A.. 1999. Pengaruh Medium Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella sp.* terhadap Aktivitas Senyawa Pemacu Pertumbuhan yang Dihasilkan. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Institut Pertanian Bogor.
- Borowitzka, M. A. dan Lesley, J. B. 1988. *Microalgae Biotechnology*. London: Cambridge University Press.
- Kawaroe, M. 2008. Mikroalga sebagai Bahan Baku Biofuel. Surfactant and Bioenergy Research Centre, Lembaga Pengabdian Pada Masyarakat, Institut Pertanian Bogor.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Tapan E.. 2005. *Kanker, Antioksidan, dan Terapi Komplementer*. Jakarta: PT Gramedia.
- Sherwin, F.R., 1990. *Antioxidant*. In: *Food Additive* (ed. Branen R). New York: Marcel Dekker.
- Grillo, C.A. and F.N. Dulout. 1995. Cytogenetic Evaluation of Butylated Hydroxytoluene. *Mutat. Res.*, (345) : 73–85.
- Safer, A.M. dan A.L. Nughamish. 1999. Hepatotoxicity Induced by the Antioxidant Food Additive Butylated Hydroxytoluene (BHT) in Rats: An Electron Microscopical Study. *Histol. Histopathol.*, XIV: 391–406.
- Shanab, S.M.M.. 2007. *Antioxidant and Antibiotic Activities of Some Seaweeds (Egyptian Isolates)*. *Agriculture and Biology*, IX (2): 220–225.
- Oktay, M., I. Gulcin, and O., Kufrevioglu, 2003. *Determination of In Vitro Antioxidant Activity of Fennel (Foeniculum Vulgare) Seed Extract*. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technology*, XXXVI: 263-271.
- Richmond, A.E.. 1986. *Microalga Culture*. Tokyo: CRC Press.
- Wulandari, A.P., Frida N., Annisa E.P., dan Dilaekha R.P.. 2010. Identifikasi Mikroalga di Sekitar Pantai Pangandaran dan Potensi Pertumbuhannya pada Formulasi Medium Ekstrak Tauge (MET). *Prosiding Seminar Nasional Limnologi*, V.
- Carolina, S. 1995. Kualitas Algae Bersel Tunggal *Chlorella sp.* pada Berbagai Media. *Seminar Ilmiah*. Balai Pengembangan Teknologi Tepat Guna, Puslitbang Fisika Terapan-LIPI, Subang.
- Hidayati, Nurul. 2009. Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Daun The (*Camellia sinensis* L, v. *assamica*) Tua Hasil Ekstraksi Menggunakan Pelarut Akuades dan Etanol. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Prihantini, N.H, Putri B., dan Yuliati R.. 2005. Pertumbuhan *Chlorella sp.* dalam Medium Ekstrak Tauge (MET) dengan Variasi pH Awal. *Makara, Sains*, IX (1): 1-6.
- Hanani, E., M. Abdul dan Ryany, S. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia sp.* dari Kepulauan

- Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, II (3): 127-133.
- Arindah, D. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Golongan Senyawa Antioksidan pada Daging Buah Pepino (*Solonum Muricatum aiton*) yang Berpotensi sebagai Antioksidan. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Persagi (Persatuan Ahli Gizi Indonesia). 2009. *Tabel Komposisi Pangan Indonesia*. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo.
- De La Noue dan De Pauw. 1988. *The Potential of Microalgal Biotechnology : A Review of Production and Uses of Microalgae*. *Journal of Biotechnology Advances*, VI.
- Schlegel, S. 1994. *Mikrobiologi Umum*. Tedja Baskara, penerjemah. Yogyakarta: Gajahmada University Press.
- Herbert RB. 1995. *Biosintesis Metabolit Sekunder*. Bambang Srigandono, penerjemah. Edisi kedua. Semarang: IKIP Semarang Press.
- Yudha, A.P.. 2008. Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Dunaliella sp.* pada Umur Panen yang Berbeda. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Bogor : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.
- Vonshak, A. 1990. *Recent Advances in Microalgal Biotechnology*. *Biotechnology adv*, VIII.
- Sopyan, I. 2001. Rancangan Awal Alat Pengering Energi Matahari (*Solar Dryer*) untuk Pengeringan Rumput Laut. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Brand-Williams, W. 1995. *Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant activity*. *Lebensmettel – Wissenschaft and Technologie*. Dalam Ratmo. 2007. Potensi Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocotum*) sebagai Antioksidan. www.kimiabrawijaya.ac.id.
- Josephy, P.D. 1997. *Molecular Toxicology*. New York: Oxford University Press.
- Harborne, JB.. 1987. *Metode fitokimia Edisi Kedua*. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah. Bandung: Institut Teknologi Bandung.