



Isolasi Dan Identifikasi Mikroalga Sebagai Sumber Antioksidan Di Kawasan Teluk Tomini

**Mahdalena Sy. Pakaya¹, Mohamad Adam Mustapa², Fika Nuzul Ramadhani³,
Dizky Ramadani Putri Papeo⁴, Multiani S. Latif⁵, Sitty Rahma Hutami Kongkolu⁶**

^{1,2,3,4,5,6} Jurusan Farmasi, Fakultas Olahraga Dan Kesehatan, Universitas Negeri Gorontalo,
Jl. Jenderal Sudirman No. 06 Kota Gorontalo 96128, Indonesia

* Penulis Korespondensi. Email: mahdalena@ung.ac.id

ABSTRACT

The use of synthetic antioxidants such as butylated hydroxyanisole (BHA) can cause carcinogenic side effects. Antioxidants are compounds that counteract free radicals, with natural sources including microalgae. Microalgae have the potential to serve as antioxidants, preventing and inhibiting free radicals. This study aimed to isolate and identify microalgae with antioxidant potential from the waters of Tomini Bay. The study utilized experimental methods in the Pharmaceutical Microbiology Laboratory and the Natural Pharmaceutical Materials Laboratory. Identification was carried out using microscopic morphological observation techniques, serial dilution techniques for isolation, and the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method for antioxidant testing, analyzed using a UV-Vis spectrophotometer. The identification results revealed five types of microalgae belonging to the groups Chlorophyta, Cyanophyta, Euglenophyta, and Bacillariophyta. The isolated microalgae included MA1a (Chlorophyta), and MA2a, MA3b (Cyanophyta). Qualitative tests showed positive antioxidant results in the n-hexane extracts of MA1a, MA2a, and MA3b. The antioxidant activity values (IC₅₀) for MA1a and MA3b were 128.15 µg/mL and 102.50 µg/mL, respectively, categorized as moderate. The IC₅₀ of the n-hexane extract of MA2a was 98.51 µg/mL, categorized as strong. Statistical analysis using ANOVA (*p*-value < 0.05) indicated significant differences in antioxidant activity between MA1a, MA2a, MA3b, and the Vitamin C control.

Keywords: Microalgae.; Chlorophyta; Cyanophyta; Antioxidant Activity; Tomini Bay

Received:
2024-06-05

Accepted:
2024-07-30

Online:
2024-07-30

ABSTRAK

Penggunaan antioksidan sintesis seperti butil hidroksianisol (BHA) menimbulkan efek samping bersifat karsinogenik. Antioksidan merupakan senyawa yang menangkal radikal bebas, adapun sumber antioksidan alami salah satunya mikroalga. Mikroalga memiliki potensi sebagai sumber antioksidan, yang mencegah dan menghambat radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi mikroalga yang berpotensi sebagai antioksidan yang berada di salah satu kawasan perairan Teluk Tomini. Penelitian ini menggunakan metode eksperimen yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Farmasi dan Laboratorium Bahan Alam Farmasi dengan teknik pengamatan morfologi secara mikroskopis untuk identifikasi, teknik pengenceran berseri untuk isolasi, dan teknik DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) untuk pengujian antioksidan yang dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil identifikasi didapatkan 5 jenis mikroalga yang termasuk dalam kelompok alga *Chlorophyta*, *Cyanophyta*, *Euglenophyta*, dan *Bacillariophyta*. Mikroalga

yang berhasil diisolasi yaitu MA1a merupakan kelompok (*Chlorophyta*), dan MA2a, MA3b termasuk kelompok (*Cyanophyta*). Hasil uji kualitatif menunjukkan hasil positif antioksidan pada ekstrak n-heksan MA1a, MA2a dan MA3b. Serta memiliki nilai aktivitas antioksidan dengan IC_{50} (MA1a dan MA3b) secara berturut-turut 128,15 $\mu\text{g/mL}$ dan 102,50 $\mu\text{g/mL}$ termasuk kategori sedang. Serta IC_{50} ekstrak n-heksan (MA2a) sebesar 98,51 $\mu\text{g/mL}$ termasuk kategori kuat. Analisis data secara statistik uji anova dimana ($p\text{-value}<0,05$) menunjukkan perbedaan yang signifikan antara aktivitas antioksidan MA1a, MA2a, MA3b dan kontrol Vitamin C

Kata Kunci: Mikroalga; Chlorophyta; Cyanophyta; Aktivitas Antioksidan; Teluk Tomini

Diterima:
05-06-2024

Disetujui:
30-07-2024

Online:
30-07-2024

1. Pendahuluan

Reactive Oxygen Species (ROS) merupakan senyawa radikal bebas yang menjadi penyebab munculnya beberapa penyakit pada makhluk hidup. Senyawa ini sangat reaktif dan tidak stabil karena memiliki elektron tidak berpasangan pada kulit terluarnya. Selain itu ROS juga terdiri kelompok senyawa non radikal bebas seperti hidrogen peroksida (H_2O_2), ozon (O_3) dan hipoklorit (OCl^-) [1]. Senyawa ROS membutuhkan donasi elektron dari senyawa lain yang dikenal sebagai senyawa antioksidan.

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu berinteraksi dengan radikal bebas dan menghentikan reaksi berantai sebelum merusak sel. Pada tubuh makhluk hidup, khususnya manusia memiliki suatu sistem pertahanan untuk menetralkan radikal bebas, seperti enzim superoksida dismutase, katalase, glutathione peroksidase, dan faktor-faktor non-enzim yaitu vitamin C dan vitamin E. Senyawa tersebut dapat melindungi tubuh dari radikal bebas. Namun pola hidup yang buruk menyebabkan manusia terpapar radikal bebas berlebih dan tidak dapat dinetralkan tubuh. Oleh sebab itu dibutuhkan asupan antioksidan dari luar [2].

Sebagai perlindungan terhadap serangan radikal bebas dibutuhkan konsumsi senyawa antioksidan. Pemanfaatan senyawa butil hidroksi anisol (BHA) dan butil hidroksi toluen (BHT) digunakan secara luas dalam industri makanan dan kosmetik sebagai pengawet dan antioksidan sintetik. Namun senyawa ini berbahaya terhadap kesehatan manusia karena memiliki efek karsinogenik. Kelemahan antioksidan sintetik menyebabkan investigasi antioksidan alami terus dilakukan. Adapun sumber antioksidan alami salah satunya yaitu mikroalga.

Mikroalga banyak ditemukan di seluruh perairan Indonesia, termasuk di kawasan Teluk Tomini. Distribusi spesies dan kelimpahan mikroalga fitoplankton sangat baik di perairan pantai Kabupaten Gorontalo yang termasuk dalam kawasan Teluk Tomini [3]. Teluk Tomini merupakan salah satu teluk terbesar di Indonesia, sehingga masuk dalam kawasan *coral triangle initiative* (segitiga terumbu karang dunia). Teluk Tomini memiliki luas sekitar 59.500 km^2 , daerah ini berbatasan langsung dengan tiga provinsi, yaitu Sulawesi utara, Sulawesi tengah dan Gorontalo. Keindahan alamnya yang menakjubkan, bersama dengan keanekaragaman hayati laut yang melimpah, membuatnya menjadi tempat yang menarik bagi para peneliti, pelancong, nelayan dan wisatawan. Teluk Tomini dikenal karena keanekaragaman hayati lautnya yang luar biasa. Di dalamnya terdapat berbagai spesies ikan, moluska, terumbu karang, dan organisme kecil seperti mikroalga. Mikroalga memiliki peran penting dalam menjaga keseimbangan ekosistem laut. Keunikan geografis dan kekayaan hayati membuat Teluk Tomini menjadi area yang sangat penting bagi lingkungan dan ekonomi.

Mikroalga mengandung kelompok vitamin esensial yaitu vitamin A, B1, B2, B6, B12, C, E dan senyawa antioksidan diantaranya adalah senyawa alkaloid, karotenoid dan fenolik [4]. Senyawa fenolik merupakan senyawa yang banyak ditemukan pada tumbuhan. Senyawa fenolik memiliki cincin aromatis, satu atau lebih gugus hidroksil (OH-) dan gugus lain penyertanya seperti gugus karboksilat dan gugus aldehyd. Senyawa fenolik merupakan senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan sebagai respon terhadap stres lingkungan. Senyawa fenolik berfungsi sebagai pelindung terhadap sinar UV-B dan kematian sel untuk melindungi DNA dari dimerisasi dan kerusakan[5].

Mikroalga merupakan salah satu sumber antioksidan alami yang menjanjikan. Kelimpahannya yang besar di alam, laju pertumbuhan yang tinggi serta memiliki senyawa antioksidan yang cukup lengkap merupakan keunggulan mikroalga sebagai sumber antioksidan [6].

2. Metode

Desain penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah desain ekperimental, dimana telah dilakukan pengujian isolasi dan identifikasi mikroalga dari perairan Teluk Tomini serta uji aktivitas antioksidan terhadap mikroalga.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Autoklaf (*Hirayama*, Japan), Bunsen, Batang Pengaduk, Cawan Petri, Erlenmeyer, Gelas Ukur, Gunting, Inkubator (*Climacell*, Amerika), Inkubator *Shaker* (*Climacell*, Amerika), Kaca preparat, *Laminar air flow* (Mess,China), Mikroskop (*Nikon Eclipse*, Japan), Oven (*Memmert*, German), Objek Glass, Pipet, Pinset, Sendok Tanduk, Sentrifugator (*Eppendorf*, Amerika), Spektrofotometri UV-VIS, Timbangan analitik (*Osuka*, Japan), Tabung Reaksi, dan Tabung Koagulans. Adapun bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Alkohol 70%, Alumunium Foil, $AlCl_3$, Asam Askorbat (*Emsure*, AS), Aquades, Aqua Pro Injeksi (Otsuka; Jepang), *Bold Basal Medium* (*Murashige & Skoog*, USA), Etanol (*Merck*, Germany), DPPH (*Sigma-aldrich*, USA), Metanol (*Merck*, Germany), Etil Asetat (*Emsure*, Germany), $FeCl_3$, H_2SO_4 , Kapas, N-Hexan (*Merck*, Germany), Pelat KLT, Pupuk Walne (*Phytotech*, USA), Spritus.

Pengambilan sampel

Lokasi pengambilan sampel mikroalga di perairan Teluk Tomini, pantai Oluhuta, Kecamatan Kabila Bone, Kabupaten Gorontalo, Gorontalo.



Gambar 1 Lokasi Pengambilan Sampel Mikroalga di Pantai Oluhuta Kec. Kabila Bone, Kab. Bone Bolango, Gorontalo (Dokumentasi Pribadi, 2023)

Pengambilan sampel mikroalga menggunakan plankton net dengan teknik vertikal, yaitu dengan menarik plankton net yang telah ditenggelamkan pada kedalaman 1,5 meter dan ditarik keatas. Pengambilan sampel dilakukan pada tiga titik lokasi (10 m dari pesisir pantai sebagai titik pertama, 25 m dari titik pertama dan 40 m

dari titik kedua). Plankton net didiamkan ± 5 menit pada setiap lokasi kemudian diangkat. Sampel air yang telah disaring dimasukkan ke dalam botol dan diberi label kemudian disimpan dalam *coolbox*. Sampel dibawa ke Laboratorium Mikrobiologi untuk penelitian selanjutnya

Sterilisasi Alat

Alat-alat akan digunakan perlu disterilkan terlebih dahulu. Untuk alat gelas seperti tabung reaksi dan cawan petri disterilkan secara panas kering dalam oven dengan suhu 170°C selama 1 jam, jarum ose dan pinset disterilkan dengan cara pemijaran langsung pada api, dan media disterilkan menggunakan autoklaf dengan tekanan uap air dengan suhu 121°C dan tekanan 15 lbs atau 1 atm selama 15 menit [7].

Identifikasi Morfologi Awal Mikroalga

Pengamatan morfologi sampel mikroalga dilakukan menggunakan mikroskop. Untuk mengetahui spesies mikroalga, morfologi hasil penamatan diidentifikasi menggunakan *Algae Resource Database* [8].

Pembuatan Media

Medium pertumbuhan untuk kultivasi mikroalga yaitu *Bold Basal Medium*. Medium pertumbuhan mikroalga dibuat dengan melarutkan media *Bold Basal* dengan aquades, media tersebut selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C pada tekanan 1 atm selama 15 menit. Medium yang telah disterilisasi ditambahkan pupuk walne [9].

Isolasi Mikroalga

Isolasi mikroalga menggunakan metode pengenceran bertingkat bertingkat (*dillution method*) yang bertujuan untuk mendapatkan satu koloni mikroalga tunggal. Sampel mikroalga diencerkan dari 10^{-1} hingga 10^{-5} atau sampai koloni sel mikroalga tidak terlalu banyak. Sampel mikroalga didalam botol dikocok hingga homogen, selanjutnya 1 ml sampel mikroalga di masukan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 9 ml media *Bold Basal*. Selanjutnya di ambil 1 ml dari tabung reaksi 10^{-1} dan dipindahkan 1 ml sampel ke tabung reaksi 10^{-2} dan dilakukan prosedur pengulangan yang sama hingga tabung reaksi pada pengenceran 10^{-5} [10], [11].

Identifikasi Isolat Mikroalga

Pengamatan isolat morfologi sampel mikroalga dilakukan menggunakan mikroskop. Untuk mengetahui jenis isolat spesies mikroalga, morfologi hasil pengamatan diidentifikasi menggunakan *Algae Resource Database*.

Kultivasi Dan Pemanenan Mikroalga

Kultivasi mikroalga menggunakan teknik kultur berkesinambungan, pertumbuhan mikroalga dilanjutkan dengan penambahan 200 mL medium BBm dan 20 mL pupuk walne dan penambahan pengenceran terakhir yang di buat pada erlenmeyer. Isolat mikroalga di inkubasi pada suhu 27°C di bawah cahaya lampu selama 7-10 hari sampai mikroalga mencapai fase puncak pertumbuhannya. Diatur juga fotoperiode 12 jam terpapar cahaya lampu dan 12 jam kondisi gelap dalam 24 jam. Isolat yang telah berumur 10 hari dilanjutkan dengan proses pemanenan. Proses pemanenan dilakukan dengan disentrifugasi selama ± 30 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Lalu supernatant dan biomassa di pisahkan. Biomassa dikeringanginkan dalam ruangan selama ± 2 hari dan ditimbang berat keringnya untuk digunakan pada tahap selanjutnya[12].

Ekstraksi Mikroalga

Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan etanol. Sebanyak 1 gram biomassa mikroalga kering dilarutkan dalam 100 mL n-heksan. Sampel diaduk menggunakan inkubator shaker selama 3x24 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 120 rpm. Selanjutnya dilakukan penyaringan sehingga terpisah antara filtrat dengan residu. Tahap selanjutnya dilakukan dengan

proses yang sama pada sampel yang sama (bagian residu) untuk pelarut etil asetat dan etanol. Filtrat yang diperoleh dari 3 kali proses maserasi dikumpulkan dan dipekatkan sehingga diperoleh ekstrak pekat n-heksana, etil asetat dan etanol [13].

Ekstrak kental mikroalga dipantau menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fasa diam silika gel F254 dan fasa gerak n-heksana, etil asetat dan metanol. Hasil pemisahan pada KLT kemudian disemprot menggunakan larutan penampak bercak yaitu DPPH dan diamati pada lampu UV254 dan 365 nm.

Karakterisasi Mikroba Simbion

Uji Kualitatif

Uji kualitatif dilakukan dengan menggunakan metode DPPH. Sebanyak 1 mL larutan sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 4 mL larutan DPPH sedikit demi sedikit. Adanya antioksidan ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi kuning [14].

Uji Kuantitatif

a). **Pembuatan larutan DPPH**

Larutan induk DPPH dibuat dengan menimbang sebanyak 5 mg dengan neraca analitik, dilarutkan dalam metanol p.a 100 ml sebagai larutan induk.

b). **Pembuatan larutan ekstrak mikroalga**

Sebanyak 50 mg dari masing-masing ekstrak kental dilarutkan dalam 50 mL metanol p.a sebagai larutan induk. Selanjutnya diencerkan sehingga diperoleh larutan seri konsentrasi 5, 15, 25, 35 dan 45 µg/ml.

c). **Pembuatan larutan vitamin C**

Sebanyak 50 mg vitamin C standar (asam askorbat) dilarutkan ke dalam metanol p.a 50 ml kemudian dibuat larutan seri konsentrasi 5, 15, 25, 35 dan 45 µg/ml.

e). **Uji perendaman DPPH**

Larutan seri ekstrak mikroalga ditambahkan larutan DPPH dengan perbandingan 1:1 (v/v). Hal yang sama dilakukan pula pada larutan vitamin C sebagai standar pembanding. Campuran sampel dan DPPH diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dalam kondisi gelap. Aktivitas perendaman DPPH dilakukan dengan mengukur serapan campuran menggunakan spektrofotometri sinar tampak pada panjang gelombang 517 nm. Data absorbansinya yang diperoleh dari tiap konsentrasi masing-masing ekstrak dihitung nilai persen (%) aktivitas antioksidannya [15].

Uji aktivitas antioksidan:

$$\% \text{ Inhibisi (I)} = \frac{(A_0) - (AS)}{(A_0)} \times 100\%$$

Keterangan: I = Persen penurunan absorban DPPH

A₀ = Absorban larutan DPPH

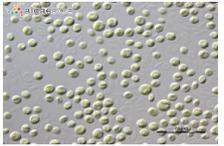
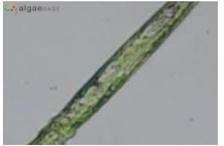
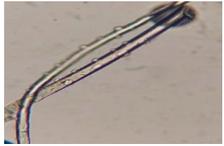
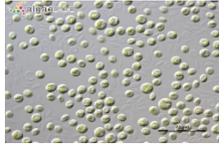
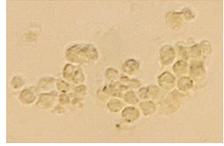
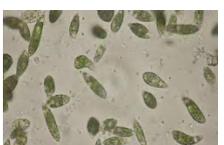
AS = Absorban larutan sampel setelah ditambahkan DPPH

f). **Analisis Data**

Analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan cara menghitung persen (%) aktivitas antioksidan yang diperoleh dari data absorbansi ekstrak mikroalga dan dilakukan perhitungan nilai IC₅₀ dengan menggunakan persamaan regresi yang menyatakan hubungan antara konsentrasi mikroalga (x) dengan persen (%) aktivitas antioksidan (y). Dibandingkan nilai IC₅₀ pada masing-masing sampel. Selanjutnya, membandingkan nilai IC₅₀ pada sampel dengan kontrol. Apabila sampel memiliki nilai IC₅₀ rendah, maka menunjukkan bahwa sampel tersebut memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang tinggi [16].

3. Hasil dan Pembahasan Identifikasi Awal Morfologi Mikroalga

Tabel 1. Hasil Identifikasi morfologi awal sampel mikroalga

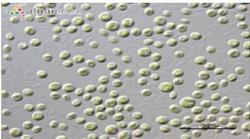
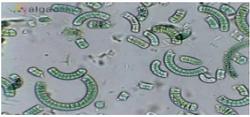
Lokasi	Algae Resource Database	Hasil	Kode
MA1			MA1 a
			MA1 b
MA2			MA2 a
			MA2 b
			MA2 c
MA3			MA3 a
			MA3 b

Identifikasi morfologi awal sampel mikroalga dari perairan Teluk Tomini dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40×, terdapat lima jenis mikroalga didalamnya. Selanjutnya morfologi mikroalga dibandingkan dengan Algae Resource Database. Adapun mikroalga yang didapatkan pada titik I terdapat 2 jenis yang masuk pada kelompok mikroalga *Chlorophyta* (MA1 a) dan *Bacillariophyta* (MA1 b). Pada titik II didapatkan 3 jenis yaitu *Chlorophyta* (MA2 a), *Cyanophyta* (MA2 b) dan *Euglenophyta* (MA2 c). Sedangkan pada titik III didapatkan 2 jenis kelompok mikroalga yaitu *Bacillariophyta* (MA3 a) dan *Cyanophyta* (MA3 b). Pada titik 1 dan titik 2 dengan kode MA1 a dan MA2 b memiliki kesamaan jenis mikroalga yaitu termasuk jenis mikroalga kelompok *Chlorophyta* atau alga hijau yang ditandai dengan berwarna hijau,

uniseluler, dan berbentuk bulat. Chlorophyta memiliki ciri kloroplas yang berwarna hijau mengandung klorofil-a dan b serta karotenoid, bervariasi baik dalam ukuran, bentuk maupun susunannya, uniseluler, dan kadang-kadang bergerombol [17]. Pada titik 1 dan titik 3 dengan kode MA1 b dan MA3 a termasuk jenis mikroalga kelompok *Bacilliarophyceae* berciri uniseluler berbentuk seperti batang segiempat memanjang, dan berbentuk seperti huruf S serta berwarna hijau keemasan. Pada titik 2 dan titik 3 dengan kode isolat MA2 a dan MA3 b termasuk jenis kelompok mikroalga *Cyanophyta* atau mikroalga biru berbentuk seperti benang, silindris, filamen yang tersusun dari trikoma multiseluler berbentuk spiral yang bergabung menjadi satu dan tidak bercabang. Mikroalga kelompok ini merupakan alga yang paling primitif dan memiliki sifat-sifat bakterial dan alga, umumnya berbentuk batang uniseluler atau sel tunggal, koloni atau filament [18].

Isolasi Mikroalga

Tabel 2 Hasil Isolasi Mikroalga

Kode Isolat	Algae Resource Database	Hasil
MA1 a		
MA2 a		
MA3 b		

mikroalga yang berhasil diisolasi pada titik lokasi 1 yaitu termasuk kelompok *Chlorophyta* dengan karakteristik mikroalga berwarna hijau, bulat dan uniselular. Sedangkan pada titik lokasi 2 dan 3 termasuk pada kelompok *Cyanophyta* berbentuk silindris, trikoma multiseluler dan helik. Dari kelima jenis mikroalga yang berhasil di isolasi hanya dua jenis mikroalga. Hal ini dikarenakan adanya faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Mikroalga yang tidak dapat bertahan hidup dikarenakan adanya penurunan proses fotosintesis dan respirasi sehingga menghambat pembentukan sel anakan [19]. Pada titik 1 yang berhasil diisolasi yaitu mikroalga yang termasuk dalam kelompok *Chlorophyta* dengan karakteristik morfologinya berwarna hijau, bulat dan uniselular. Sedangkan pada titik 2 dan titik 3 memiliki ciri yang sama yaitu berbentuk seperti benang, silindris, filamen yang tersusun dari trikoma multiseluler berbentuk spiral yang bergabung menjadi satu dan tidak bercabang isolat ini termasuk dalam kelompok *Cyanophyta*.

Kultivasi Dan Pemanenan Mikroalga

Isolat mikroalga dikultivasi dengan teknik kultur berkesinambungan selama 10 hari pada suhu ruang ($\pm 25-27^{\circ}\text{C}$) dengan fotoperiode 12:12 (gelap:terang).

Tabel 3. Hasil Pemanenan Isolat MA1, MA2 dan MA3 Mikroalga

Kode Isolat	Volume Kultivasi (mL)	Berat Biomassa (gram)
MA1 a	290	1,37
MA2 a	290	1,34
MA3 b	290	1,31

mikroalga dipanen dengan cara disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Didapatkan biomassa kering mikroalga pada isolat MA1 a, MA2 a dan MA3 b secara berturut-turut sebanyak 1,37 g, 1,34 g dan 1,31 g. Kultivasi isolat MA1 a, MA2 a dan MA3 b mikroalga diinkubasi pada suhu ruang ($\pm 25-27^{\circ}\text{C}$) dengan perlakuan fotoperiode dilakukan dengan menginkubasi mikroalga di bawah cahaya lampu, dengan periode menyala selama 24 jam dan periode gelap-terang 12:12 jam. Periode terang dan gelap dilakukan untuk menyerupai kondisi seperti di alam sehingga memungkinkan kondisi kultur sesuai dengan habitat aslinya [20]. Dilakukan selama 10 hari, berdasarkan (Lampiran 3) pada hari ke-8 mikroalga memasuki fase eksponensial (*log phase*), hal ini ditunjukkan dengan penambahan jumlah sel yang sangat cepat melalui pembelahan sel mikroalga dan fase ini struktur sel masih berada pada kondisi normal serta nutrisi dalam keadaan seimbang, pada hari kedelapan merupakan pertumbuhan puncak atau maksimal [21].

Hasil Ekstraksi Mikroalga

Tabel 4. Hasil Ekstraksi Mikroalga Dengan Metode Maserasi Bertingkat

	Pelarut	Volume Pelarut (mL)	Berat Sampel Awal (mg)	Berat Ekstrak (mg)	Rendemen (%)
MA1 a	N-heksan	50	1000	84,3	8,43
	Etil Asetat	50	872	67,8	7,77
	Etanol	50	650	32,2	4,95
MA2 a	N-heksan	50	1000	78,6	7,86
	Etil Asetat	50	856	53,5	6,25
	Etanol	50	710	45,5	6,40
MA3 b	N-heksan	50	1000	86,2	8,62
	Etil Asetat	50	788	60,1	7,62
	Etanol	50	603	43,5	6,90

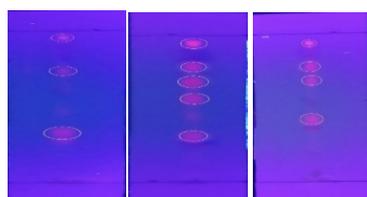
sebanyak 1 g biomassa kering mikroalga diekstraksi secara maserasi bertingkat dengan menggunakan inkubator shaker selama 9 x 24 jam dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan etanol sebanyak 50 mL. MA1a pada pelarut n-heksan, etil asetat dan etanol secara berturut-turut menghasilkan berat ekstrak 84,3 mg, 67,8 mg, 32,2 mg dengan persen rendemen secara berturut-turut 8,43%, 7,77% dan 4,95%. Pada MA2a pelarut n-heksan, etil asetat dan etanol secara berturut-turut menghasilkan berat

ekstrak 78,6 mg, 53,5 mg, 45,5 mg dengan persen rendemen secara berturut-turut 7,86%, 6,25% dan 6,40%. MA3b pelarut n-heksan, etil asetat dan etanol secara berturut-turut menghasilkan berat ekstrak 86,2 mg, 60,1 mg, 43,5 mg dengan persen rendemen secara berturut-turut 8,62%, 7,62% dan 6,90%.

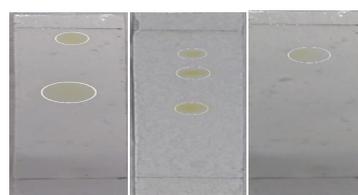
Analisis Kualitatif Antioksidan

Tabel 5. Hasil Uji Kualitatif Aktivitas Antioksidan Ekstrak Mikroalga Dengan Metode DPPH

	Ekstrak	Uji kualitatif (DPPH 0,4mM+sampel)	Hasil
MA1 a	N-heksan	kuning	(+)
	Etil Asetat	ungu	(-)
	Etanol	ungu	(-)
MA2 a	N-heksan	kuning	(+)
	Etil Asetat	ungu	(-)
	Etanol	ungu	(-)
MA3 b	N-heksan	kuning	(+)
	Etil Asetat	ungu	(-)
	Etanol	ungu	(-)



MA1 a MA2 a MA3 b
(A)



MA1 a MA2 a MA3 b
(B)

Gambar 2. Hasil Kromatogram Uji Pendahuluan Aktivitas Antioksidan Secara KLT

ketiga jenis mikroalga hanya ekstrak n-heksan yang positif mengandung senyawa antioksidan. Hal ini ditunjukkan dari perubahan warna larutan DPPH dari ungu memudar menjadi kuning. Dan komposisi eluen yang optimum untuk melulusi ketiga isolat MA1, MA2 dan MA3 mikroalga yaitu dengan perbandingan eluen N-Heksan : Etil Asetat (8:2). Dan setelah disemprot dengan larutan DPPH 0,2%, ketiga isolat menunjukkan hasil positif sebagai antioksidan yang ditandai dengan terbentuknya warna kuning. Uji kualitatif aktivitas antioksidan dalam penelitian ini dilakukan dengan metode DPPH. Metode ini dapat menentukan aktivitas antioksidan suatu sampel berdasarkan kemampuannya dalam menangkalkan radikal DPPH. Radikal DPPH merupakan suatu senyawa organik mengandung atom nitrogen yang elektronnya tidak berpasangan sehingga tidak stabil dan larutannya berwarna ungu. Radikal DPPH tersebut akan tereduksi dan terjadi pemudaran warna menjadi kuning ketika bereaksi dengan senyawa antioksidan [22].

Analisis Kuantitatif Antioksidan

Tabel 6. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH Dengan Spektrofotometer UV-Vis

Konsentrasi (ppm)	% Inhibisi			
	Ekstrak N- heksan MA1 a	Ekstrak N- heksan MA2 a	Ekstrak N- heksan MA3 b	Kontrol Vit C
5	66.86	59.57	65.14	40.12
15	68.27	59.92	67.47	46.87
25	71.01	63.20	68.38	52.97
35	72.96	64.57	71.47	59.61
45	74.56	65.83	75.82	64.15
Persamaan Linier	$y = -0.201x + 75.757$ $R^2 = 0.9904$	$y = -0.1716x + 66.907$ $R^2 = 0.9497$	$y = -0.2536x + 75.997$ $R^2 = 0.9447$	$y = 0.6079x + 37.548$ $R^2 = 0.996$
IC₅₀ (µg/mL)	128,15	98,51	102,50	20,48

pengujian antioksidan isolat ekstrak MA 1, MA 2 dan MA 3 mikroalga menggunakan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) pada panjang gelombang 517 nm dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Pada hasil pengukuran absorbansi larutan pada ketiga ekstrak isolat mikroalga dibuat dengan konsentrasi 5, 15, 25, 35 dan 45, didapatkan nilai IC₅₀ pada isolat ekstrak n-heksan MA1, MA2 dan MA3 serta kontrol vit C secara berturut-turut yaitu 128,15 µg/mL, 98,51 µg/mL, 102,50 µg/mL dan 20,48 µg/mL. Uji aktivitas antioksidan diukur metode DPPH karena efektif dan mudah dikerjakan untuk mempelajari profil ekstrak suatu sampel, serta dapat menunjukkan potensi dari suatu sampel [23]. Prinsip senyawa ini adalah mendonorkan satu atom hidrogen pada radikal bebas sehingga DPPH mengalami reduksi dan menjadi senyawa DPPH non-radikal. Perubahan senyawa radikal DPPH menjadi non-radikal ini ditandai dengan berkurangnya warna ungu pada larutan DPPH dengan disertai penurunan absorbansi yang diukur pada panjang gelombang 517 nm dengan Spektrofotometer UV-Vis.

Hasil Uji One Way ANOVA

Tabel 7. Hasil Uji One Way ANOVA % Inhibisi

Kelompok	Mean ± SD	P-value
Ekstrak N-hensan MA1 a	70,73 ± 3,2	0,000
Ekstrak N-hensan MA2 a	62,62 ± 2,8	
Ekstrak N-hensan MA3 b	69,66 ± 4,1	
Kontrol Vit C	52,74 ± 9,6	

nilai rata-rata dan standar deviasi dari masing-masing kelompok. Untuk kelompok ekstrak MA1 diperoleh nilai rata-rata dan standar deviasi sebesar 70,73 dan 3,2. Untuk kelompok ekstrak MA2 diperoleh nilai rata-rata dan standar deviasi sebesar 62,62 dan 2,8. Untuk kelompok ekstrak MA3 diperoleh nilai rata-rata dan standar deviasi sebesar 69,66 dan 4,1. Sedangkan untuk kelompok kontrol vitamin C diperoleh nilai rata-rata dan standar deviasi sebesar 52,74 dan 9,6. Dari tabel diatas juga diperoleh nilai

uji signifikansi *oneway anova* sebesar 0,000. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar keempat kelompok perlakuan ($p\text{-value}<0,05$). Sedangkan untuk uji *posthoc* diperoleh bahwa kelompok ekstrak MA1 berbeda nyata terhadap kelompok ekstrak MA2 dan kontrol vitamin C serta tidak berbeda nyata terhadap kelompok ekstrak MA3.

Hasil yang diperoleh nilai uji signifikansi *oneway anova* sebesar 0,000. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antar keempat kelompok perlakuan ($p\text{-value}<0,05$). Hal ini membuktikan bahwa dari keempat kelompok yang diuji yaitu MA1 a, MA2 a, MA3 b dan kontrol Vitamin C terdapat perbedaan aktivitas antioksidan. Pada ekstrak n-heksan MA1 a dan MA3 b termasuk pada kategori sedang (128,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 102,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Sedangkan ekstrak n-heksan MA2 a termasuk pada kategori kuat (98,51 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Jika efektivitas antioksidan dengan parameter IC_{50} dibagi menjadi lima kategori yaitu jika $<50\mu\text{g}/\text{ml}$ (sangat kuat), 50 sampai 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (kuat), 100 sampai 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (sedang), 150 sampai 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (lemah), serta jika $>200\mu\text{g}/\text{ml}$ (sangat lemah). Kontrol positif Vitamin C termasuk pada kategori sangat kuat (20,48 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Sedangkan untuk uji *posthoc* diperoleh bahwa kelompok ekstrak MA1 a berbeda nyata terhadap kelompok ekstrak MA2 a dan kontrol vitamin C serta tidak berbeda nyata terhadap kelompok ekstrak MA3 b [24].

4. Kesimpulan

Dari penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa pada identifikasi awal morfologi mikroalga menggunakan teknik mikroskopis didapatkan lima jenis mikroalga yang termasuk dalam empat kelompok mikroalga yaitu *Chlorophyta*, *Cyanophyta*, *Euglenophyta*, dan *Bacillariophyta*. Disalah satu perairan Kawasan Teluk Tomini yaitu di Pantai Oluhuta Kecamatan Kabila Bone, Kabupaten Bone Bolango, Gorontalo berhasil diisolasi terdapat 3 jenis isolat. MA1a adalah jenis mikroalga yang termasuk dalam kelompok alga hijau (*Chlorophyta*). Sedangkan MA2a dan MA3b termasuk dalam kelompok alga biru (*Cyanophyta*). Aktivitas antioksidan ekstrak n-heksan MA1 dan MA3 termasuk pada kategori sedang dengan nilai IC_{50} 128,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 102,50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sedangkan pada ekstrak n-heksan MA2 termasuk pada kategori kuat dengan nilai IC_{50} yaitu 98,51 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Analisis data secara statistik uji *one way anova* dihasilkan ($p\text{-value}<0,05$) maka nilai ini memiliki perbedaan yang secara signifikan antara aktivitas antioksidan MA1a, MA2a, MA3b dan kontrol Vitamin C.

Referensi :

- [1] Anbudhasan, P., A. Surendraraj., A. Karkuzhali dan S. Sathishkumar. (2014). "Natural Antioxidants and Its Benefits". *International Journal of Food and Nutritional Sciences*. Vol 3(6): 225-232.
- [2] Handra, I., Syafrizayanti, S., & Chaidir, Z. (2019). Isolasi dan Identifikasi Mikroalga Sebagai Sumber Antioksidan dari Perairan Tirtasari Sonsang, Agam, Sumatera Barat. *Chimica et Natura Acta*, 7(1), 7.
- [3] Kadim K dan S. Arsad. (2015). Distribution and abundance of microalgae based on coastal characteristic and ecology in bone bolango coastal region, Indonesia. *Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sc.* 18 (2): 395-401.
- [4] Richmond, A dan Hu, Q. (2013). *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. 2 nd Edition. Wiley Blackwell. Hal : 3.
- [5] Lai, H.Y. dan Lim, Y.Y. (2014). Evaluation of Antioxidant Activities of The Methanolic Extracts of Selected Ferns in Malaysia, *International Journal of Environmental Science and Development*, Volume 2(6): 442-447.

- [6] Safafar, H. Patrick U.N., Anita L., Susan L.H., Charlotte, J. (2016). Enhancement of Protein and Pigment Content in Two *Chlorella* Species Cultivated on Industrial Process Water. *Journal of Marine Science and Engineering* 4,84.
- [7] A. Mahdalena Pakaya., Julianty Akuba., Dizky R. Papeo, Andi Makkulawu., Putri, "Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Symbion Dari Akar Pare (*Momordica Charantia* L)," *J. Syifa Sci. Clin. Res.*, 2022.
- [8] Oren, A. (2013) 'Cyanobacterial systematics and nomenclature as featured in the international bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy/international journal of systematic bacteriology/international journal of systematic and evolutionary microbiology', *International Journal*.
- [9] Santhanam, A., A. Devi., Shenbaga., Rekha, V., Prasatha, Balaji, B., Nndakumar, R., jeyanthi and Dinesh, K. (2012). *Culture and biofuel producing efficacy of marine microalgae Dunaliella salina and Nannochloropsis sp.*. *Phycospectrum*.
- [10] Apriyatmoko Y. (2015). Isolasi Dan Karakterisasi Mikroalga Yang Berpotensi Sebagai Bahan Baku Biodiesel Di Perairan Estuaria Sungai Porong. *Skripsi*. Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya
- [11] Kurnia, D., Pridayanti, N., Marliani, L., Idar, I. dan Nurochman, Z., (2019), Antiinflammatory Activity from Marine Microalgae *Chlorella vulgaris* Extract Used Human Red Blood Cells Stability Method (HRBC), *Jurnal Kartika Kimia*, 2(2), 57-62
- [12] Suhadirman & Aris. (2020). "The Activity of Marine Microalgae Extract *Chlorella Vulgaris* Against *Propionibacterium Acnes* and Formulated as Emulgel." *Jurnal Kartika Kimia*, vol. 3, no. 1, pp. 25-32.
- [13] A, Rahmawati., A. Muflihunna & LaOde Muhammad Sarif. (2016). Analisis Aktivitas Antioksidan Produk Sirup Buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia* L.) Dengan Metode Dpph. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. Vol. 2, No. 2
- [14] Andersen, R. (2015) '*Algal Culturing Technique*. Elsevier Academic Press. UK.
- [15] Bariyyah, S. Khairul. (2013). Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *Skripsi*. Malang: Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- [16] Ferial, E.W. & Salam, M.A. (2016). Fikologi. *Erlangga*. Jakarta.
- [17] Widaja, Arief., Chao-Chang Chien dan Yi-Hsu Ju. (2009). "Study of Increasing Lipid Production from Fresh Water Microalgae *Chlorella vulgaris*". *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 40, 13-20.
- [18] Mikdarullah & Nugraha, A. (2017). Teknik Isolasi Bakteri Proteolitik dari Sumber Air Panas Ciwidey, Bandung. *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*, 15(1):11-14.
- [19] Wijanarko, A. (2007). Jurnal Teknologi "Pengaruh Pencahayaan Siklus Harian Terhadap Produksi Biomassa *Chlorella vulgaris* Buitenzorg Dalam Fotobioreaktor kolom gelembung". *Teknik Kimia*. Fakultas Teknik Universitas Indonesia.
- [20] Kawaroe, M. 2010. *Potensi Mikroalga dan Pemanfaatannya untuk Produksi Bio Bahan Bakar*. Bogor: IPB Press.
- [21] Astiti Asih, Ida Ayu Raka. Ratnayani, Ketut. Swardana, Ida Bagus. (2012). "Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoid Dari Madu Kelengkeng (*Nephelium longata* L.)". *FMIPA*. Universitas Udayana. Bukit Jimbaran Denpasar.
- [22] Hartati, Emi. (2016). Ekstraksi Dingin dan Panas. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Tulang Bawang Lampung.
- [23] Manurung, H., Susanto, D., & Hapsari, R. Z. (2023). Uji Kandungan Metabolit Sekunder dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Lai (*Durio kutejensis*) (Hassk.) (Becc.) dengan Metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). *EduBiologia: Biological Science and Education Journal*, 3(2), 65.

- [24] Lung, J.K.S. and Destiani, D.P., (2017). Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin A, C, E dengan Metode DPPH. *Farmaka*, 15 (1), pp.53-62.