

UJI FITOKIMIA, KANDUNGAN TOTAL FENOL DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MIKROALGA *Spirulina* sp., *Chlorella* sp., DAN *Nannochloropsis* sp.

Phytochemical Screening, Total Phenol Content and Antioxidant Activity of Microalgae Spirulina sp., Chlorella sp. and Nannochloropsis sp.

Diini Fithriani^{1*}, Sri Amini¹, Susiana Melanie¹, dan Rini Susilowati¹

¹ Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Jl. K.S. Tubun Petamburan VI, Jakarta Pusat, Indonesia

* Korespondensi Penulis: diini_fithriani@yahoo.com

Diterima: 20 Agustus 2015; Disetujui: 3 November 2015

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan fitokimia, total fenol, dan aktivitas antioksidan dari mikroalga *Spirulina* sp., *Nannochloropsis* sp., dan *Chlorella* sp. Mikroalga diekstrak dengan ekstraksi tunggal menggunakan etanol. Skrining fitokimia dilakukan secara kualitatif. Analisis total fenol dilakukan secara spektrofotometri dengan metode *Folin-Ciocalteu*. Analisis antioksidan dilakukan dengan metode *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH) dan *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP). Skrining fitokimia menunjukkan keberadaan tanin, flavonoid, steroid, glikosida, dan alkaloid pada ekstrak etanol ketiga jenis mikroalga, sedangkan saponin hanya terdeteksi pada ekstrak etanol *Spirulina* sp. dan *Chlorella* sp., adapun triterpenoid tidak terdeteksi pada ekstrak etanol ketiga jenis mikroalga. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan total fenol, aktivitas antioksidan (IC₅₀), dan kapasitas antioksidan (FRAP) tertinggi diperoleh pada ekstrak etanol *Spirulina* sp. dengan nilai berturut turut sebesar $0,32 \pm 0,025$ mg GAE g⁻¹D.W., 518,94 ppm, dan $49,95 \pm 2,02$ ($\mu\text{mol Fe}^{2+}$ eq.g⁻¹D.W). Dalam penelitian ini diketahui bahwa kandungan fenol total memiliki korelasi yang kuat dengan kapasitas antioksidan metode FRAP (R²= 0,84), dan aktivitas antioksidan metode DPPH (R²= 0,79).

KATA KUNCI: mikroalga, DPPH, FRAP, uji fitokimia, kandungan total fenol

ABSTRACT

This study investigated the phytochemical composition and antioxidant activity of the ethanol extracts of microalgae Spirulina sp., Nannochloropsis sp. and Chlorella sp. Microalgae was extracted using a one-step extraction with ethanol. Phytochemical screening was conducted qualitatively. Analysis of total phenolic content was carried out using spectrophotometry with Folin-Ciocalteu method. The antioxidant assays was analyzed by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP). Method the phytochemical screening revealed the presence of tannin, flavonoid, steroid, glycoside and alkaloid in all microalga, while saponin was only detected in Spirulina sp. and Chlorella sp. and triterpenoid was not detected in any species microalgae. The result showed that etanolic extract of Spirulina sp. has the highest content of total phenolic content, antioxidant activity and antioxidant capacity i.e. 0.32 ± 0.025 mg GAE g⁻¹D.W, 518.94 ppm and 49.95 ± 2.02 ($\mu\text{mol Fe}^{2+}$ eq.g⁻¹D.W) respectively. Total phenolic content had strong correlation to the antioxidant capacity of FRAP method (R² =0.84) and antioxidant activity of DPPH method (R² =0.79).

KEYWORDS: microalgae, DPPH, FRAP, phytochemical test, total phenolic content

PENDAHULUAN

Banyak orang percaya bahwa produk dengan label "alami" lebih aman dan baik untuk tubuh. Organisasi kesehatan dunia (WHO) mengestimasi bahwa 80%

penduduk dunia menjadikan pengobatan herbal untuk menjaga kesehatan primer mereka (Erlich, 2011). Eksplorasi bahan hayati dan potensinya sebagai obat herbal saat ini banyak dilakukan. Salah satu komoditas yang belum banyak dieksplorasi di

Indonesia dan mempunyai potensi tinggi dalam pengembangan obat herbal adalah mikroalga. Mikroalga kaya akan sumber karbohidrat, protein, enzim dan serat. Di samping itu mikroalga mengandung vitamin dan mineral seperti vitamin A,C,B1,B2,B6, niasin, iodin, kalium, besi, magnesium dan kalsium (Priyadarshani & Rath, 2012).

Mikroalga adalah jenis rumput laut atau alga yang berukuran mikroskopis. Dalam siklus makanan di perairan, mikroalga berperan sebagai produsen utama. Diperkirakan bahwa 40% fotosintesis secara global dilakukan oleh mikroalga (Aung *et al.*, 2013). Mikroalga dapat menjadi alternatif sumber produk alami yang kontinyu dan terpercaya, karena mikroalga dapat dikultivasi dalam bioreaktor dalam skala besar (Chen, 1996). Selain itu kondisi sel mikroalga dapat dikontrol, dengan menggunakan media yang bersih dalam pertumbuhannya, sehingga mereka tidak terkontaminasi herbisida, pestisida dan substansi toksik lainnya (Lubian *et al.*, 2000). Mikroalga telah dikenal sebagai sumber berbagai pigmen berharga yaitu *chlorophyll a*, *zeaxanthin*, *canthaxanthin* and *astaxanthin* (Rocha *et al.*, 2003). Saat ini beberapa spesies mikroalga sudah di produksi dalam skala besar yaitu *Spirulina* sp. dan *Chlorella* sp. untuk konsumsi multivitamin manusia dan *Nannochloropsis* sp. untuk pakan ikan.

Spirulina sp. adalah mikroalga berbentuk spiral yang karena sifatnya yang bernutrisi tinggi dan kehadiran senyawa bioaktif seperti phycocyanin menjadi salah satu mikroalga yang banyak dipelajari (Moraes *et al.*, 2011). *Chlorella* sp. oleh Bold & Wynne (1985) dikategorikan ke dalam kelompok alga hijau yang memiliki jumlah genus sekitar 450 dan jumlah spesies lebih dari 7500. *Nannochloropsis* sp. adalah alga hijau uniseluler berbentuk bola dengan diameter sekitar 2–5 μm , kelas *Eustigmatophyceae*. *Nannochloropsis* sp. memainkan peranan penting dalam sistem rantai makanan, umumnya digunakan sebagai pakan dan secara luas dikultivasi untuk budidaya ikan dan udang (Gwo *et al.*, 2005)

Skrining fitokimia merupakan metode yang sederhana, cepat, serta sangat selektif, yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi golongan senyawa serta mengetahui keberadaan senyawa-senyawa aktif biologis yang terdistribusi dalam jaringan tanaman (Nohong, 2009; Uddin, 2011). Menurut Sani *et al.* (2014) hasil uji skrining fitokimia pada jenis mikroalga *Tetrahelmsis chui*, menunjukkan bahwa ekstrak etanol *Tetrahelmsis chui* mengandung senyawa fitokimia golongan alkaloid, flavonoid, dan glikosida flavonoid.

Mikroalga diduga juga memiliki kemampuan aktivitas antioksidan. Banyak penelitian tertarik untuk mengeksplorasi kemampuan antioksidan mikroalga

di antaranya pada *Botryococcus* (Rao *et al.*, 2006), *Dunaliella* (Herrero *et al.*, 2006), *Haematococcus* (Cerón *et al.*, 2007) dan 32 mikroalga terpilih (Goiris *et al.*, 2012). Penelitian-penelitian ini menunjukkan bahwa mikroalga memiliki potensi sebagai antioksidan.

Pengujian antioksidan dapat menggunakan metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) dan *ferric reducing antioxidant power* (FRAP). Perbedaan antara kedua metode tersebut adalah metode FRAP merupakan uji antioksidan yang langsung mengukur total antioksidan dalam suatu bahan. Sebaliknya, metode DPPH, tidak secara langsung mengukur total antioksidan, melainkan mengukur kemampuan antioksidan untuk bereaksi dengan radikal bebas yang dihasilkan dalam sistem pengujian. Pada tumbuhan *terrestrial*, kelas antioksidan yang penting adalah senyawa fenolik, yang menunjukkan beberapa mekanisme antioksidan (Pietta, 2000). Antioksidan dari senyawa fenolik yang bersumber dari tanaman meliputi senyawa flavonoid, asam cinamat, kumarin, tokoferol, kerotenoid dan asam polifungsional organik (Shahidi & Wanasundara 1992).

Dalam upaya eksplorasi obat herbal dari mikroalga maka dilakukan penelitian terhadap tiga spesies yang mudah dikultivasi yaitu *Spirulina* sp., *Nannochloropsis* sp., dan *Chlorella* sp. Penelitian ini bertujuan mempelajari kandungan fitokimia, kandungan total fenol dan aktivitas antioksidan dari tiga spesies mikroalga tersebut.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biakan murni mikroalga jenis *Spirulina* sp., *Nannochloropsis* sp., dan *Chlorella* sp. Etanol p.a. (Merck), metanol p.a. (Merck), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich), folin ciocalteu, 2,4,6-tri-piridil-s-triazin (TPTZ) (Sigma-Aldrich), pereaksi Dragendroff, dan pereaksi Mayer.

Metode

Kultivasi dan pemanenan mikroalga jenis *Nannochloropsis* sp., *Chlorella* sp. dan *Spirulina* sp.

Pada media air laut steril diberikan biakan mikroalga *Nannochloropsis* sp., *Chlorella* sp. dan *Spirulina* sp. dengan kepadatan awal masing-masing 1×10^4 sel/ml, kemudian ditambahkan pupuk conway (Amini, 1990). Kultivasi mikroalga dilakukan selama 5-7 hari. Pemanenan dilakukan pada umur *Spirulina*

sp. 5–7 hari pemeliharaan yaitu pada fase eksponensial (fase pertumbuhan). Biomassa mikroalga dipanen dengan menggunakan sentrifuse untuk *Nannochloropsis* sp. dan *Chlorella* sp. dan penyaringan dengan kain satin untuk *Spirulina* sp. Biomassa kemudian dicuci dengan air dengan perbandingan 1 : 20 (biomassa : air) dan disentrifuse menggunakan sentrifuse dengan kecepatan 2455 G, temperatur 10 °C, selama 10 menit. Supernatan dibuang dan endapan biomassa dicuci kembali dengan air. Pencucian ini diulang hingga biomassa memiliki pH 7. Biomassa hasil pencucian kemudian dikeringkan dengan *freeze dryer* hingga diperoleh bubuk mikroalga.

Ekstraksi mikroalga

Mikroalga diekstraksi dengan menambahkan etanol dengan perbandingan biomassa dan etanol 1 : 10, dimaserasi satu hari dan disentrifuse dengan kecepatan 2455 G, dan suhu 10 °C, selama 10 menit. Supernatan yang berwarna pekat dikumpulkan dan kemudian dipisahkan menggunakan rotavapor vakum (Buchi R-205 dan Buchi R-215) sampai tidak ada pelarut yang tersisa. Kemudian ekstrak yang mengering dalam labu rotavapor dimasukkan kedalam botol gelap dan dikeringkan dengan bantuan gas nitrogen. Proses ekstraksi ini diulang sebanyak 3 kali.

Uji fitokimia

Pembuatan larutan uji untuk skrining fitokimia (alkaloid, saponin, tanin, steroid, triterpenoid, glikosida) dilakukan dengan melarutkan ekstrak mikroalga *Spirulina* sp., *Chlorella* sp., dan *Nannochloropsis* sp. dalam etanol p.a. dengan perbandingan 1 : 10.

Pemeriksaan alkaloid dilakukan dengan mereaksikan larutan uji dengan pereaksi Dragendroff dan larutan uji dengan pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan jingga pada reaksi dengan pereaksi Dragendroff dan endapan kuning pada reaksi dengan pereaksi Meyer menunjukkan adanya alkaloid (Famsworth, 1966).

Pemeriksaan saponin dilakukan dengan mengamati pembentukan busa setelah pengocokan. Busa setinggi 1–10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit, dan tidak hilang pada penambahan 1 tetes HCl 2N menunjukkan adanya saponin (Anon., 1995).

Pemeriksaan tanin dilakukan dengan mereaksikan 3 ml larutan uji dengan 5 tetes NaCl 1 % dan 3 tetes larutan gelatin. Apabila terbentuk endapan maka larutan ekstrak positif mengandung tanin (Robinson, 1991, Sarker et al., 2005).

Pemeriksaan steroid dan triterpenoid dilakukan dengan reaksi Liebermann-Burchard. Terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan bila muncul cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid (Ciulei, 1984).

Pemeriksaan glikosida dilakukan dengan Uji Liebermann-Burchard. Terjadinya warna biru atau hijau menunjukkan adanya glikosida (reaksi Liebermann-Burchard) (Anon., 1989).

Pemeriksaan flavonoid terhadap ekstrak etanol mikroalga dilakukan dengan uji Taubeck. Larutan berfluoresensi kuning di bawah UV 366 nm, intensif menunjukkan adanya flavonoid (Anon., 1989).

Uji aktivitas antioksidan

Aktivitas antioksidan ekstrak etanol mikroalga diuji berdasarkan *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH) menurut Li et al. (2006). Sebanyak 10 mg sampel dilarutkan dalam metanol PA kemudian dibuat seri konsentrasi dari 100; 200; 400; 800 ppm. Sebanyak 160 µl ekstrak dari tiap seri konsentrasi sampel, ditambah 40 µl larutan DPPH. Setelah 30 menit pada suhu ruang, absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm. Sebagai kontrol negatif digunakan metanol dengan pengerjaan yang sama dan sebagai blanko digunakan 200 µl metanol p.a. tanpa penambahan larutan DPPH

Persen penghambatan dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Hambatan} = \frac{(A-B) - (C-D)}{(A-D)} \times 100\%$$

Dimana : A = Absorbansi kontrol negatif
B = Absorbansi Blanko
C = Absorbansi kontrol ekstrak
D = Absorbansi ekstrak

Data persentase penghambatan digunakan untuk mencari nilai *Inhibition Concentration 50* dalam ppm, Nilai IC₅₀ ditentukan dengan analisis probit menggunakan *microsoft software excel 2007*.

Uji Kapasitas antioksidan

Kapasitas antioksidan ekstrak etanol mikroalga diuji menggunakan *ferric reducing antioxidant power* (FRAP) menurut Varga et al. (1998) dan Szöllösi & Varga, (2002) yang dimodifikasi. Sebanyak 20 µl ekstrak (1000 ppm), ditambah 150 µl reagen Frap. Setelah 10 menit pada suhu 37 °C, absorbansi diukur pada panjang gelombang 595 nm. Sebagai standar digunakan FeSO₄.7H₂O dengan pengerjaan yang sama. Standar dibuat dengan melarutkan FeSO₄.7H₂O dalam aquades dan dibuat pada konsentrasi 1; 0,9;

0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; dan 0,1 $\mu\text{mol/l}$. Kapasitas antioksidan dikalibrasi terhadap standar $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan diekspresikan sebagai $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ eq.g-1D.W)

Uji total fenol

Pengujian total fenol ekstrak mikroalga diuji berdasarkan metode Chatatikun *et al.* (2013). Ekstrak mikroalga dilarutkan dalam aquades dan dibuat pada konsentrasi 10.000 ppm. Sebanyak 50 μl ekstrak ditambahkan aquades sebanyak 50 μl . Larutan kemudian ditambah 50 μl larutan folin 10 % dan 50 l larutan bicarbonat (60 g/L). Mikroplat selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 60 menit. Absorbansi dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm. Standar asam galat dibuat dengan melarutkan asam galat dalam aquades dan dibuat pada konsentrasi 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 (g/ml). Aquades juga digunakan sebagai blanko. Untuk standar dan blanko diuji dengan cara yang sama seperti sampel. Total fenol dikalibrasi terhadap standar asam galat dan diekspresikan sebagai mg *gallic acid equivalent* (G.A.E.) g-1D.W.

Analisis statistik

Penelitian dilakukan dengan tiga kali ulangan dan hasil diekspresikan sebagai nilai rata rata dengan standar deviasi. Korelasi antara total fenol dan kapasitas antioksidan dihitung dengan menggunakan *microsoft software excel 2007*.

HASIL DAN BAHASAN

Hasil uji fitokimia dari biomassa mikroalga *Spirulina* sp., *Nannochloropsis* sp., dan *Chlorella* sp. menunjukkan bahwa *Spirulina* sp., *Nannochloropsis* sp., dan *Chlorella* sp. mengandung senyawa tanin, flavonoid, steroid, glikosida dan alkaloid. Namun, saponin hanya terdeteksi pada *Spirulina* sp. dan *Chlorella* sp. sedang triterpenoid tidak terdeteksi pada ketiga jenis mikroalga (Tabel 1).

Kandungan senyawa fitokimia dipengaruhi berbagai faktor yaitu spesies, varietas, kondisi pertumbuhan, variasi musim, metode pengolahan dan penyimpanan (Pyo *et al.*, 2014). Tanin berfungsi sebagai antioksidan sekunder, karena tanin memiliki kemampuan mengkelat ion besi dan memperlambat oksidasi (Amarowicz, 2007). Flavonoid adalah senyawa yang terdapat secara luas di alam dan dikategorikan menurut struktur kimia ke dalam flavonol, flavon, flavanon, isoflavon, katekin, antosianin, dan kalkon (Buhler & Miranda, 2002). Flavonoid adalah salah satu dari banyak molekul yang digunakan oleh sel untuk melindungi bahaya reaktif oksigen spesies

(Procházková *et al.*, 2011). Flavonoid saat ini menjadi fokus perhatian karena potensinya yang menguntungkan terhadap kesehatan dan flavonoid dilaporkan mengandung anti virus, anti alergi, anti platelet, anti inflamasi, anti tumor, dan aktivitas antioksidan (Heim *et al.*, 2002). Posisi grup hidroksil dan grup lain dalam struktur kimia flavonoid sangat penting untuk mencegah radikal bebas (Buhler & Miranda, 2002). Alkaloid digunakan sebagai agen anastesi dan banyak ditemukan pada tanaman obat (Herouart, 1988 dalam Wadood *et al.*, 2013). Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa *Spirulina* sp. dan *Chlorella* sp. mengandung saponin. Saponin memiliki efek terhadap level kolesterol, kanker, kesehatan tulang, dan menstimulasi sistem imun. Bagian bukan gula dari saponin juga memiliki aktivitas antioksidan yang memiliki manfaat seperti menurunkan risiko kanker dan penyakit hati.

Hasil uji kandungan total fenol menunjukkan bahwa total fenol bervariasi antara $0,1062 \pm 0,003$ – $0,3172 \pm 0,06$ mg GAE g⁻¹D.W. Pada mikroalga *Chlorella* sp. nilai yang diperoleh yaitu $0,1062 \pm 0,003$ mg GAE g⁻¹D.W berada di bawah kisaran total fenol yang diteliti terhadap 6 *batch Chlorella* sp. oleh Goiris *et al.* (2012) yaitu $0,25 \pm 0,09$ – $3,04 \pm 0,20$ mg GAE g⁻¹D.W. Total fenol yang dihasilkan mikroalga *Nannochloropsis* sp. adalah $0,2613 \pm 0,09$ lebih rendah daripada mikroalga *Nannochloropsis* yang diteliti Goiris *et al.* (2012) yaitu $1,65 \pm 0,10$ – $2,17 \pm 0,03$ mg GAE g⁻¹D.W. Adanya perbedaan total fenol pada spesies yang sama dimungkinkan karena total fenol dipengaruhi beberapa faktor di antaranya stres. Menurut Reyes & Zevallos (2003) cahaya matahari adalah salah satu bentuk pemicu stres yang dapat meningkatkan biosintesis kandungan senyawa fenol pada jaringan tanaman. Lebih jauh cahaya matahari memegang peranan penting dalam *anthocyanin biosynthetic pathway*. Kandungan total fenol pada tanaman dipengaruhi beberapa faktor yaitu genetik, lingkungan dan teknologi yang diterapkan setelah proses pemanenan (Barberán & Espin, 2001).

Hasil uji aktivitas antioksidan metode DPPH disajikan pada Gambar 1 dan Tabel 2. Pada Gambar 1 persentase penghambatan tertinggi diperoleh dari mikroalga *Spirulina* sp. pada konsentrasi 800 ppm dengan hambatan sebesar $60,027\% \pm 0,07\%$. *Chlorella* sp. menunjukkan aktivitas penghambatan terkecil dengan nilai hambatan sebesar $32,84 \pm 0,91$ pada konsentrasi 800 ppm. Sedangkan *Nannochloropsis* sp. menunjukkan persentase hambatan sebesar $44,27 \pm 0,64$.

Data persentase hambatan setiap konsentrasi ini, selanjutnya digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀ dengan menggunakan analisis probit. Nilai IC₅₀ dapat didefinisikan sebagai besarnya konsentrasi yang dapat

menghambat aktivitas radikal bebas sebanyak 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀ menunjukkan semakin besar aktivitas antioksidan pada suatu bahan (Molyneux, 2004). Dalam uji DPPH, nilai IC₅₀ mikroalga bervariasi antara 518,94–1388,85 ppm. Hasil uji menunjukkan bahwa *Spirulina* sp. memiliki aktivitas antioksidan terkuat yang ditandai dengan nilai IC₅₀ terkecil sebesar 518,94 ppm (Tabel 2). Aktivitas antioksidan ekstrak etanol *Spirulina* sp. pada penelitian ini masih lebih rendah dari penelitian Yudiati et al. (2011), dengan IC₅₀ sebesar 383 ppm. Hal ini dimungkinkan karena senyawa antioksidan mikroalga memiliki polaritas yang berbeda-beda (Li et al., 2007). Metanol dapat mengekstrak zat yang ada pada *Spirulina* sp. lebih banyak dibandingkan etanol. Hal ini disebabkan karena metanol mempunyai kemampuan melarutkan *solute* yang lebih besar dibandingkan etanol. Metanol mempunyai parameter polarity (ET) sebesar 55,4 sedangkan nilai ET etanol sebesar 51,9 (Buchori, 2007).

Hasil uji kapasitas antioksidan FRAP (Tabel 2) menunjukkan bahwa kapasitas antioksidan bervariasi antara 25,39 ± 3,5–49,95 ± 2,02 µmol Fe²⁺ eq.g⁻¹D.W dengan nilai kapasitas antioksidan tertinggi pada *Spirulina* sp. dan terendah pada *Chlorella* sp. Uji FRAP didasarkan pada reaksi transfer elektron dari antioksidan ke senyawa Fe³⁺-TPTZ (Ou et al., 2000). Nilai FRAP yang diperoleh pada mikroalga *Chlorella* sp. adalah 25,39 ± 3,5 (µmol Fe²⁺ eq.g⁻¹D.W). Pada penelitian Goiris et al. (2012) yang meneliti enam *batch Chlorella* sp. diperoleh kapasitas antioksidan sebesar 6,37 ± 0,24 – 64,65 ± 5,80 µmol eq trolox.g⁻¹D.W. Nilai FRAP yang diperoleh oleh

Nannochloropsis pada penelitian ini sebesar 25,39 ± 3,5 µmol Fe²⁺ eq.g⁻¹D.W). sedangkan dua *batch* mikroalga *Nannochloropsis* sp. yang diteliti oleh Goiris et al. (2012) menghasilkan nilai FRAP 40,68 ± 1,6–40,80 ± 1,05 µmol eq trolox.g⁻¹D.W.

Hasil uji aktivitas antioksidan (DPPH) dan hasil uji kapasitas antioksidan (FRAP) untuk mikroalga *Nannochloropsis* sp. dan *Chlorella* sp. cenderung lebih rendah dari *Spirulina* sp. Hal ini dapat disebabkan karena kandungan total fenol dari *Nannochloropsis* sp. dan *Chlorella* sp. lebih rendah dibanding *Spirulina* sp. (Tabel 2). Hasil analisis korelasi antara kapasitas antioksidan (FRAP) dan total fenol adalah R²= 0,84 sedangkan dari hasil analisis korelasi antara aktivitas antioksidan (DPPH) dan total fenol diperoleh R²= 0,79 (Gambar 2). Hasil ini menunjukkan bahwa kandungan total fenol berkontribusi positif dan kuat terhadap aktivitas maupun kapasitas antioksidan baik dengan metode DPPH maupun metode FRAP. Hal ini sesuai dengan beberapa penelitian yang menyimpulkan bahwa fenolik menjadi antioksidan utama di banyak spesies tanaman tingkat tinggi seperti, sayuran, buah dan tanaman medis (Jimenez-Escrig et al., 2001; Cai et al., 2004; Soong & Barlow, 2004; Li et al., 2007). Senyawa fenolik dapat berperan sebagai antioksidan karena kemampuannya untuk mendonasikan atom hidrogen atau elektron untuk membentuk intermediat radikal bebas yang stabil (Karunamoorthy et al., 2012). Hasil ini sejalan dengan penelitian Hajimahmoodi et al. (2009) serta Shetty (2015) yang menyimpulkan bahwa fenol merupakan kontributor utama terhadap aktivitas antioksidan mikroalga. Hasil penelitian Goiris et al. (2012) pada mikroalga

Tabel 1. Hasil uji fitokimia pada ekstrak etanol *Spirulina* sp., *Nannochloropsis* sp., dan *Chlorella* sp.
Table 1. Result of phytochemical test on the etanol extract of *Spirulina* sp., *Nannochloropsis* sp. and *Chlorella* sp.

Uji Fitokimia/ Phytochemical Test	<i>Spirulina</i> sp.	<i>Nannochloropsis</i> sp.	<i>Chlorella</i> sp.	Keterangan/Description
Tanin	+	+	+	Terjadi endapan/Formation of a precipitation
Flavonoid	+	+	+	Fluoresensi kuning intensif/Intensive yellow fluorescence
Steroid	+	+	+	Cincin kehijauan/Greeny ring
Glikosida	+	+	+	Warna biru atau hijau/Blue or green colour
Alkaloid	+	+	+	Endapan jingga/Orange precipitation
Saponin	+	-	+	Busa permanen/Permanent foam
Triterpenoid	-	-	-	Cincin coklat/Brown ring

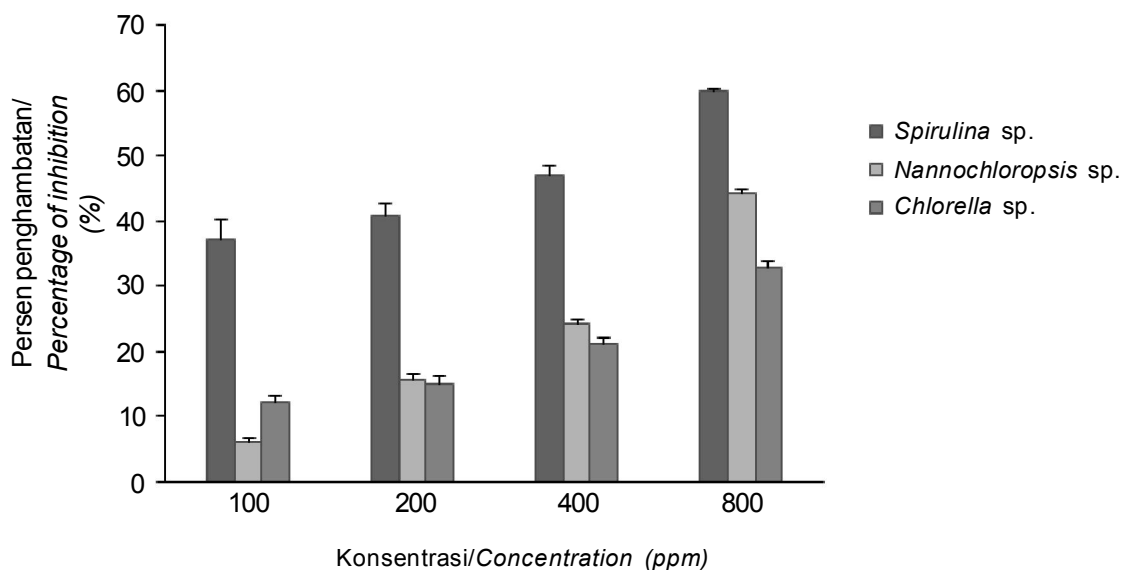
Keterangan/Note: Tanda + ada indikasi senyawa bioaktif dan tanda - tak ada indikasi senyawa bioaktif/
Sign + there are indication of bioactive compounds and the sign - there are no indication of bioactive compounds

menunjukkan bahwa ada korelasi antara kapasitas antioksidan dan kandungan fenol, tetapi dengan nilai R^2 yang lebih rendah (0,541). Sedangkan menurut Reyes & Zevallos (2003) antioksidan utama yang terdapat pada jaringan tanaman adalah senyawa fenolic, vitamin C dan E, dan karotenoid.

Selain kandungan fenol yang lebih rendah, lebih rendahnya aktivitas dan kapasitas antioksidan pada *Chlorella* sp. dan *Nannochloropsis* sp dapat pula disebabkan dinding sel *Chlorella* sp. dan *Nannochloropsis* sp. yang cenderung lebih kuat dibandingkan *Spirulina* sp., sehingga proses ekstraksi tidak secara optimal mengeluarkan seluruh zat aktif dari mikroalga *Chlorella* sp. dan *Nannochloropsis* sp. Sebagian dinding sel mikroalga mengandung selulosa dan beberapa spesies memiliki tambahan tri-laminar sheat (TLS) yang mengandung algaenan, substansi yang dikenal memiliki ketahanan terhadap degradasi (Versteegh & Blokker, 2004).

Dalam penelitian ini jika dilihat dari nilai uji DPPH (Tabel 2), mikroalga yang diuji tidak cukup potensial sebagai sumber antioksidan karena tingginya nilai IC_{50} yang diperoleh. Bahan dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat apabila memiliki nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat apabila nilai IC_{50} antara 50–100 ppm, sedang apabila nilai IC_{50} antara 10–150 ppm, lemah apabila memiliki nilai IC_{50} antara 150–200 ppm, dan sangat lemah apabila memiliki nilai IC_{50} lebih dari 200 ppm (Molyneux, 2004).

Berbeda dengan hasil uji DPPH yang menunjukkan potensi antioksidan yang sangat lemah, hasil uji FRAP pada penelitian ini (Tabel 2) menunjukkan tiga spesies mikroalga yang dipelajari berada pada kategori medium dengan nilai $25,39 \pm 3,5$ – $49,95 \pm 2,02 \mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ eq.g}^{-1}\text{D.W}$. Bahan dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat apabila memiliki nilai kapasitas antioksidan lebih dari $500 \mu\text{mol Fe (II) g}^{-1}$, kuat apabila memiliki nilai kapasitas antioksidan antara 100–500

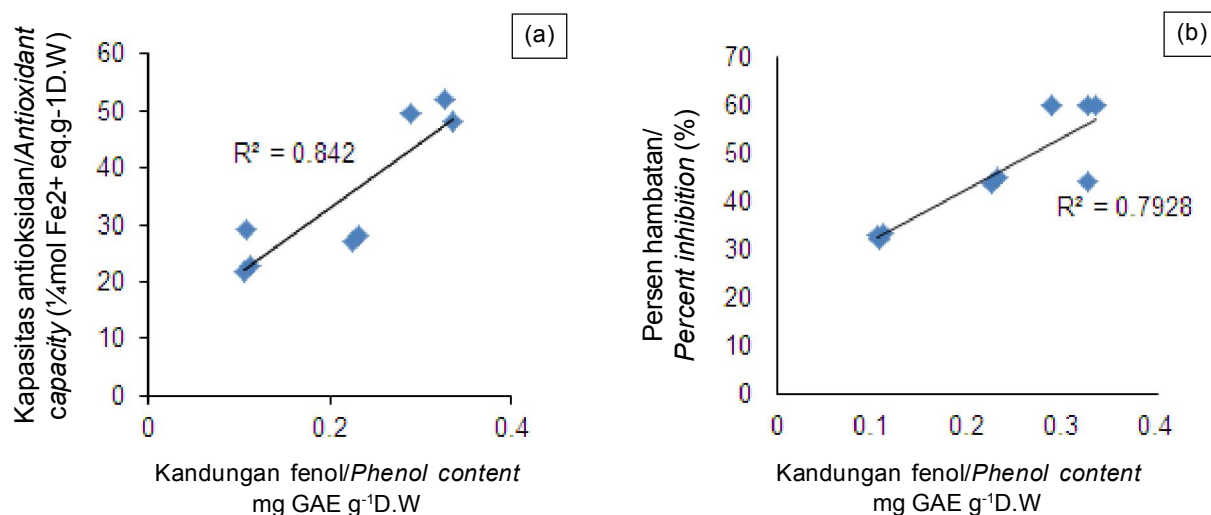


Gambar 1. Persentase penghambatan ekstrak etanol mikroalga terhadap radikal bebas DPPH.
Figure 1. Inhibition percentage of microalgae ethanolic extract on the DPPH free radical.

Tabel 2. Nilai IC_{50} uji DPPH, kapasitas antioksidan dan kandungan total fenol *Spirulina* sp. dan *Nannochloropsis* sp.

Table 2. IC_{50} value of DPPH assay, antioxidant capacity and total phenolic content of *Spirulina* sp. and *Nannochloropsis* sp.

Spesies/Species	Total Fenol/Total Phenolic Content (mg GAE g ⁻¹ D.W)	IC_{50} (ppm)	FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ eq.g}^{-1}\text{D.W}$)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	0.2613 ± 0.09	906.96	26.00 ± 2.75
<i>Spirulina</i> sp.	0.3172 ± 0.06	518.94	49.95 ± 2.02
<i>Chlorrella</i> sp.	0.1062 ± 0.003	1388.85	25.39 ± 3.5



Gambar 2. Korelasi antara kandungan total fenol dengan kapasitas antioksidan metode FRAP (a) dan aktivitas antioksidan metode DPPH (b).

Figure 2. Correlation between total phenolic content with antioxidant capacity using FRAP method (a) and antioxidant activity using DPPH method (b).

$\mu\text{mol Fe (II) g}^{-1}$, medium apabila nilai kapasitas antioksidan antara 10–100 $\mu\text{mol Fe (II) g}^{-1}$ dan apabila memiliki nilai kapasitas antioksidan kurang dari 10 termasuk lemah (Wong *et al.*, 2006).

Kurangnya aktivitas antioksidan pada uji DPPH dapat disebabkan karena tidak semua senyawa antioksidan bereaksi positif terhadap DPPH. Dalam uji DPPH, antioksidan dengan sifat hidrofobik kuat, menunjukkan reaktivitas rendah (Nenadis & Tsimidou, 2002; Musialik & Litwinienko, 2005; Sharma & Bhat, 2009). Ekstrak *Nannochloropsis* sp. berwarna hijau kekuningan yang menunjukkan adanya pigmen karoten yang terekstrak, karoten bersifat hidrofobik. Menurut Lubian *et al.* (2000) *Nannochloropsis* sp., salah satu mikroalga laut yang biasa digunakan dalam budidaya, telah dikenal luas sebagai sumber karotenoid.

Beberapa komplikasi juga dapat disebabkan oleh ionisasi sebagian dari senyawa yang diuji, yang mempengaruhi laju reaksi mereka dengan DPPH, sehingga tergantung pH (Musialik & Litwinienko, 2005). Pada sampel yang mengandung antosianin memicu kerancuan dalam pengukuran aktivitas antioksidan. Antioksidan fenolik bereaksi secara lambat dengan DPPH, mencapai kondisi stabil pada 1–6 jam atau lebih lama (Bondet *et al.*, 1997).

KESIMPULAN

Hasil skrining fitokimia menunjukkan keberadaan tanin, flavonoid, steroid, glikosida dan alkaloid pada ekstrak etanol ketiga jenis mikroalga. Sedangkan

saponin hanya terdeteksi pada ekstrak *Spirulina* sp. dan *Chlorella* sp. Adapun triterpenoid tidak terdeteksi pada ketiga jenis ekstrak mikroalga. Aktivitas antioksidan (IC_{50}), kapasitas antioksidan (uji FRAP) dan kandungan total fenol terbaik ditemukan pada ekstrak etanol *Spirulina* sp. dengan nilai berturut turut 518,94 ppm, $49,95 \pm 2,02$ ($\mu\text{mol Fe}^{2+}$ eq. g^{-1} D.W) dan $0,32 \pm 0,0025$ mg GAE g^{-1} D.W. Dalam penelitian ini diketahui bahwa kandungan total fenol memiliki korelasi yang kuat dengan kapasitas antioksidan metode FRAP dengan $R^2 = 0,84$ dan aktivitas antioksidan metode DPPH dengan $R^2 = 0,79$.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan pada Bapak Muhammad Nursid selaku pembimbing penulisan juga disampaikan kepada Ibu Emi Rusyani yang membantu dalam perolehan kultur.

DAFTAR PUSTAKA

- Amarowicz, R. (2007). Tannins: the new natural antioxidants?. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 109, 549–551.
- Anonim. (1989). *Materia Medika Indonesia*. Jilid V. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Anonim. (1995). *Materia Medika Indonesia*. Jilid VI. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Amini, S. (1990). The biochemical composition of *Isochrysis galbana* clone Tahiti (T. iso). *Jurnal Penelitian Budidaya Pantai*, 6(1), 53–62.

- Aung, W.L., Kyaw, N. & Nway, N.H. (2013). Biosorption of Lead (Pb²⁺) by using *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences*, 1(2), 2320–4087.
- Barberán, F.A.T. & Espín, J.C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 853–876.
- Buchori, L. (2007). Pembuatan gula non karsinogenik non kalori dari daun stevia. *Reaktor*. 11(2), 57–60.
- Benbrook, C.M. (2005). *Elevating antioxidant levels in food through organic farming and food processing*. Organic Center State of Science, New York.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmitt Wissenschaft Technologie Food Science Technology*, 30, 609–615.
- Bold, H.C. & Wynne, M.J. (1985). *Introduction to the algae: Structure and reproduction*. 2nd ed. Prentice Hall, Inc. [dalam bahasa Indonesia]. Englewood Cliffs.
- Buhler & Miranda, C. (2000). *Antioxidant activities of flavonoids*. Oregon. Department of Environmental and Molecular Toxicology Oregon State University.
- Cai, Y.Z., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 Chinese medicinal plants associated with anti cancer. *Life Sciences*. 74, 2157–2184.
- Cerón, M.C, García-Malea, M.C, Rivas, J., Acien, F.G, Fernández, J.M, Del Río E., Guerrero, M.G, & Molina, E. (2007). Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. *Applied Microbial and Cell Physiology*. 74, 1112–1119.
- Chatatikun, M., & Chiabchalard, A. (2013). Phytochemical screening and free radical scavenging activities of orange baby carrot and carrot (*Daucus carota* Linn.) root crude extracts. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 5(4), 97–102.
- Chen, F. (1996). High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology*, 14, 421–426.
- Ciulei, J. (1984). *Methodology for Analysis of Vegetables and Drugs*. Faculty of Pharmacy, Bucharest
- Erlich, S.D. (2011). *Herbal medicine*. Retrieved from umm.edu/health/medical/altmed/treatment/herbal-medicine.
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., Brabanter, J.D., & De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology*, 24, 1477–1486.
- Gwo, J.C., Chiu, J.Y., Chou, CC, & Cheng, H.Y. (2005). Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (*Eustigmatophyceae*). *Cryobiology*, 50(3), 338–43.
- Hajimahmoodi, M. Faramarzi, M. A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M.R., & Varcheh, N.N. (2010). Evaluation of antioxidant properties and total phenolic content of some strain of microalgae. *Journal of Applied Phycology*. 22(1), 43–50.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., & Bobilya. D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572–584.
- Herrero, M., Jaime, L., Martin-Alvarez, P.J., Cifuentes, A., & Ibanez, E. (2006). Optimization of the Extraction of Antioxidants from *Dunaliella salina* Microalga by Pressurized *Journal of agricultural and food chemistry*, 54, 5597–5603.
- Jimenez-Escrig, A., Jimenez-Jimenez, I., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 530–534.
- Jones, W.P., & Kinghorn, A.D. (2006). Extraction of Plant Secondary Metabolites. In Sarker, S. D., Latif, Z. and Gray, A. I. (eds.). *Natural products isolation* (pp. 341–342). 2nd Ed. Humana Press, New Jersey.
- Karunamoorthy, M., Perumal, A., & Thangavel, B. (2012). Evaluation of antioxidant properties of marine microalga *Chlorella marina* (Butcher, 1952). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 342–S346.
- Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F. & Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102, 771–776.
- Li, Y., Li, X., Lee, U., Kang, J.S., Choi, H.D., & Son, B.W. (2006). A new radical scavenging antracene Glycoside, Asperflavin Ribofuranoside, and Polyketides from Marine Isolate of the Fungus *Microsporium*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54(6), 882–883.
- Lubian, L.M., Montero, O., Moreno-Garido, I., Huertas, E., Sobrino, C., Valle, G., M., & Pares, G. (2000). *Nannochloropsis (eustigmatophyceae)* as source of commercially valuable pigment. *Journal of Applied Phycology*, 2(3-5), 249–255.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211–219.
- Moraes, C.C., Sala, L., Cerveira, G.P. & Kallil, S.J. (2011). C-phycoyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 28, 45–49.
- Musialik, M. & Litwinienko, G. (2005) Scavenging of DPPH radicals by vitamin E is accelerated by its partial ionization: the role of sequential proton loss electron transfer. *Organic Letter*, 7(22), 4951–4954.
- Nenadis, N. & Tsimidou, M. (2002). Observation on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) tests. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 79, 1191–1195.
- Nohong. (2009). Skrining fitokimia tumbuhan *Ophiopogon jaburan lodd* dari kabupaten kolaka provinsi Sulawesi tenggara. *Jurnal Pembelajaran Sains*, 5(2), 172–178.
- Ou, B., Huang, D., Woodill, M.H., Flanagan J.A., & Deemer, E.K. (2000). Analysis of antioxidant activities

- of common vegetables employing oxygen radical absorbancy capacity (ORAC) and Ferric reducing antioxidant power (FRAP) : a comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3122–3128.
- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035–042.
- Priyadarshani, I. & Rath, B. (2012). Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *Journal Algal Biomass Utilization*, 3(4), 89–100.
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82, 513–523.
- Pyo, Y.H., Jin, Y.J., & Hwan, J.Y. (2014). Comparison of the effect of blending and juicing on phytochemical content and antioxidant capacity of typical korean kernel fruit juice. *Preventive Nutrition and Food Science*. 19(2), 108–114.
- Robinson, T. (1991). *Kandungan organik tumbuhan Tingkat Tinggi*. Penerbit ITB, Bandung.
- Rocha, G.J.M.S., Garcia, J.E.C., & Henriques, M.H.F. (2003). Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis*. *Biomolecular Engineering*. 20, 237–242.
- Reyes, L.F., & Zevallos, L.C. (2003). Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of purple-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5296–5300.
- Rao, A.R., Sarada, R., Baskaran, V., & Ravishankar G.A. (2006). Antioxidant activity of *Botryococcus braunii* extract elucidated in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4593–4599.
- Sani, R. N., Nisa, F.C., Andriani, R.D., & Maligan, J.M. (2014). Analisis rendemen dan skrining fitokimia ekstrak etanol mikroalga laut *Tetraselmis chunii*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 2(2), 121–126.
- Shahidi, F., & Wanasundara, P.K. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*. 32, 67–103.
- Sharma, O.P. & Bhat, T.K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*. 113, 1201–1205.
- Shetty, V., Mokashi, K. & Sibi, G. (2015). Variation among antioxidant profiles in lipid and phenolic ekstrak of microalgae from different growth medium. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 10(5), 367–375.
- Szöllösi, R., & Varga, I. S. (2002). Total antioxidant power in some species of *Labiatae* (Adaptation of FRAP method). *Acta Biologica Szegediensis*. 46(3–4), 125–127.
- Soong, Y. Y. & Barlow, P.J. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*, 88, 411–417.
- Uddin, G., Rauf, A., Shaheen, B., Siddiqui, & Shah, S. Q. (2011). Preliminary comparative phytochemical screening of *Diospyros lotus* Stewart. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 10(1), 78–81.
- Versteegh, G.J.M., & Blokker, P. (2004). Resistant macromolecules of extant and fossil microalgae. *Phycological Research*, 52, 325–339.
- Varga, I.S.Z., Matkovics, B., Sasvári, M., & Salgó, L. (1998). Comparative study of plasma antioxidant status in normal and pathological cases. *Current Topics in Biophysics*, 22, 219–224.
- Wadood, A., Ghufuran M., Jamal, S.B., Naem M, & Khan A. (2013). Phytochemical analysis of medicinal plant occurring in local area of Mardan. *Biochemistry & analytical biochemistry*, 2, 144.
- Wong, C.C., Li, H.B., Cheng, K.W., & Chen, F. (2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, 97, 705–711.
- Yudiati, E., Sejati, S., Sunarsih, & Agustian, R. (2011). Aktivitas antioksidan dan toksisitas ekstrak metanol dan pigmen kasar *Spirulina* sp. *Indonesian Journal of Marine Sciences*. 16(4).