

## METABOLIT SEKUNDER EKSTRAK *Chlorella sorokiniana* HASIL KULTUR PADA MEDIA LIMBAH TAHU DENGAN VARIASI WAKTU PANEN

Lusi Nurul Safitri<sup>1</sup>, Devy Susanty<sup>1\*</sup>, Nurlela<sup>1</sup>, Ade Ayu Oksari<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Nusa Bangsa, Bogor, 16166;

<sup>2</sup>Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Nusa Bangsa, Bogor, 16166

\*e-mail: dvsusanty@gmail.com

### ABSTRAK

Mikroalga *Chlorella sorokiniana* telah diketahui mampu tumbuh pada media limbah cair tahu. Ekstrak etanol *C. sorokiniana* yang dikultur pada media limbah tahu dan dipanen pada hari ketujuh menunjukkan adanya kandungan flavonoid dan fenolik. Perbedaan waktu panen dapat mempengaruhi kandungan metabolit sekunder pada *C. sorokiniana*. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan metabolit sekunder, total flavonoid, total fenolik dan aktivitas antioksidan dari ekstrak *C. sorokiniana* yang dikultur pada media limbah cair tahu 30% pada waktu panen 7, 14, dan 21 hari. Biomassa *C. sorokiniana* yang dipanen pada tiga waktu berbeda diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol. Metabolit sekunder pada ekstrak diketahui dengan uji fitokimia secara kualitatif. Total flavonoid diuji menggunakan  $AlCl_3$ , total fenolik diuji menggunakan *Follin Ciocalteu*, dan antioksidan pada ekstrak diuji dengan menggunakan 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Hasil uji fitokimia menunjukkan ketiga ekstrak mengandung alkaloid, flavonoid, steroid, saponin dan tannin. Total flavonoid dan total fenolik pada ekstrak dengan waktu panen biomassa hari ke-21 lebih tinggi berturut-turut 36,70 mgQE/g dan 5,27 mgGAE/g. Uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa ketiga ekstrak tidak memiliki aktivitas antioksidan.

**Kata kunci:** *Chlorella sorokiniana*; Flavonoid; Fenolik; Media Limbah Tahu; Metabolit Sekunder.

### PENDAHULUAN

Antioksidan merupakan senyawa yang pada konsentrasi rendah dapat mencegah terjadinya reaksi oksidasi oleh radikal bebas (Rosahdi et al., 2015). Radikal bebas dapat mengakibatkan kerusakan sel dan menyebabkan timbulnya penyakit seperti auto imun dan kanker. Mikroalga diyakini sebagai sumber senyawa antioksidan alami karena mengandung senyawa metabolit sekunder (Qiu et al., 2020). Mikroalga yang diduga memiliki potensi sebagai antioksidan yaitu *Chlorella sorokiniana*. Spesies ini merupakan alga bersel satu yang kecil dengan diameter 2-4,5  $\mu m$  yang mampu tumbuh pada kondisi mixotropik dengan berbagai sumber karbon dan nitrogen (Ramanna et al., 2014).

Mikroalga *C. sorokiniana* dipilih karena mengandung metabolit sekunder terutama golongan fenolik dan flavonoid sehingga memiliki kemampuan sebagai antioksidan (Wijihastuti et al., 2022). Pembentukan metabolit sekunder merupakan proses yang kompleks dan terjadi interaksi antara proses biosintesis dan degradasi yang umumnya hanya terdapat pada organisme atau jaringan tertentu (Hardarani & Dewi,

2019). *C. sorokiniana* dapat tumbuh dan berkembang biak pada limbah cair yang relatif keruh seperti pada limbah peternakan (Susanty & Oksari, 2020), air limbah domestik (Ramanna et al., 2014), dan limbah tahu (Mursandi, 2021).

Limbah cair tahu dapat digunakan sebagai media kultur *C. sorokiniana* karena mengandung senyawa organik berupa protein 40-60%, karbohidrat 25-50%, dan lemak 10% yang secara alami dapat dimanfaatkan sebagai sumber makanan mikroalga (Elystia et al., 2020). Penelitian Mursandi, (2021) mengenai pertumbuhan *C. sorokiniana* pada beberapa konsentrasi menunjukkan bahwa *C. sorokiniana* dapat tumbuh dengan baik pada media limbah cair tahu 30%. Ekstrak etanol *C. sorokiniana* yang dikultur memiliki aktivitas antioksidan dengan  $IC_{50}$  288,95 mg/L pada waktu panen 7 hari. Aktivitas antioksidan *C. sorokiniana* yang dilakukan pada waktu panen berbeda belum diketahui. Pada penelitian ini, dilakukan kultur mikroalga *C. sorokiniana* pada media limbah Cair Tahu (LCT) 30% dengan variasi waktu panen hari ke-7, hari ke-14 dan hari ke-21, kemudian diuji aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol mikroalga *C. sorokiniana*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan *C. sorokiniana* yang dilakukan pada waktu panen hari ke-7, hari ke-14 dan hari ke-21.

## METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan untuk penelitian ini yaitu eksperimental deskriptif. Tahapan penelitian yang dilakukan adalah: persiapan media limbah cair tahu, persiapan kultur mikroalga *C. sorokiniana*, perhitungan kelimpahan sel, pengumpulan biomasa, penetapan kadar air, ekstraksi menggunakan metode maserasi pengujian fitokimia, total fenolik, total flavonoid, dan aktivitas antioksidan metode DPPH.

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah biakan murni *Chlorella sorokiniana* (InaCC M28), limbah cair tahu (diambil dari Ciriung, kabupaten Bogor), indikator pH universal, akuades, alkohol 70%, NaOH 2N, asam galat, asam klorida, asam sulfat, asam asetat anhidrida, Etanol p.a. (Merck), 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH) (Sigma Aldrich), folinciactalteu (Merck), pereaksi dragendroff, pereaksi wagner, dan pereaksi Mayer,  $FeCl_3$ ,  $Na_2CO_3$ ,  $AlCl_3$  10%, kloroform, kuersetin, pita Mg,

### Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah neraca analitik, lampu TL (3000-4000 lux), mikroskop, *haemocytometer*, autoklaf, *laminar air flow*, oven, *sentrifuge*, *water bath*, *rotary evaporator*, spektrofotometer UV-VIS (Bell Photonics Uv-M51), dan peralatan gelas laboratorium.

### Persiapan Media Limbah Cair Tahu (Mursandi, 2021)

Bahan yang digunakan sebagai media *C. sorokiniana*, yaitu limbah cair tahu yang diperoleh dari pabrik tahu Ciriung, Kabupaten Bogor. Limbah yang diambil merupakan limbah hasil pengepresan tahu. Limbah cair tahu diambil dengan cara menghomogenkannya kemudian diukur pH sebelum digunakan sebagai media kultur. Selanjutnya, media limbah cair tahu dibuat konsentrasi 30% kemudian limbah tersebut ditambahkan dengan larutan NaOH 2N dan diukur kembali pH sampai mencapai pH optimal yaitu 7 (pH netral).

**Kultivasi Mikroalga *Chorella sorokiniana* (Kurnia et al., 2020)**

Kultivasi mikroalga *C. sorokiniana* dilakukan pada media limbah cair tahu dengan konsentrasi 30%, dilakukan sterilisasi dengan suhu 121<sup>0</sup>C, dan tekanan 1 atm selama 1 jam. Media limbah cair tahu steril diberikan biakan mikroalga *C. sorokiniana* dengan kepadatan awal, yaitu 10<sup>5</sup> sel/ml. Kultivasi menggunakan kondisi suhu ruang dan intensitas cahaya dari lampu TL (3000-4000 lux).

Sel *C. sorokiniana* diambil dengan pipet, diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 40x10 dan dihitung jumlah kelimpahan sel mikroalga *C. sorokiniana* dengan 3 kali pengulangan. Perhitungan kelimpahan sel *C. sorokiniana* dilakukan dengan menggunakan *haemocytometer improved neubeur*.

**Pengumpulan Biomasa *Chlorella sorokiniana* (Mursandi, 2021)**

Pemanenan mikroalga *C.sorokiniana* dilakukan pada hari ke 7, 14, dan 21. Biomassa sel mikroalga *C.sorokiniana* dipanen dengan cara memisahkan antara media dengan mikroalga menggunakan alat *sentrifuge* dengan kecepatan 3.600 rpm selama 5 menit. Selanjutnya, biomassa sel tersebut dikeringkan dengan suhu ruang sampai didapatkan biomassa kering

**Kadar Air Mikroalga *C. sorokiniana* (SNI-BSN, 1992)**

Biomassa sebanyak 0,5 g ditimbang ke dalam labu timbang yang diketahui beratnya. Biomassa dikeringkan selama 3 jam pada suhu 105 °C menggunakan oven, didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Pengulangan dilakukan hingga bobot simplisia sudah tetap. Perhitungan kadar air menggunakan rumus:

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{((\text{Bobot cawan} + \text{Simplisia}) - \text{Bobot setelah pemanasan})}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100 \%$$

**Ekstraksi Mikroalga *C.sorokiniana* (Mursandi, 2021)**

Biomasa *C.sorokiniana* diekstrak dengan menggunakan etanol p.a dengan perbandingan 1:10 dan diaduk menggunakan *shaker* selama 3 hari. Ekstrak dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 60<sup>0</sup>C dan tekanan 1 atm sampai tidak ada lagi pelarut yang menetes. Selanjutnya, sisa pelarut diuapkan dengan menggunakan *water bath*.

**Uji fitokimia**

Penentuan metabolit sekunder dilakukan secara kualitatif untuk melihat adanya alkaloid (menggunakan pereaksi Dragendroff, Wagner dan Mayer), saponin, flavonoid, tannin, dan steroid/terpenoid. Pengujian saponin dilakukan dengan melihat pembentukan busa stabil. Uji Flavonoid dilakukan dengan pengujian menggunakan pita Mg dan HCl pekat. Uji Tanin dilakukan menggunakan larutan FeCl<sub>3</sub> 10%, dan uji steroid/terpenoid dilakukan dengan penambahan 2-3 tetes asam asetat anhidrat kepada 1 mL ekstrak, diikuti dengan penambahan asam sulfat pekat (Fithriani et al., 2015).

**Uji Total Fenolik (Nor et al., 2017)**

Penentuan total fenolik dilakukan dengan menggunakan reagen *Follin Ciocalteu* 10%. Ekstrak mikroalga sebanyak 50 mg diencerkan dengan akuades hingga volume 50 mL, dan sebanyak 1 mL direaksikan dengan 2,5 mL larutan *Follin Ciocalteu* 10%. Larutan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5% ditambahkan setelah 5 menit, dan diinkubasi selama 45 menit.

Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 760 nm. Asam galat sebagai standar dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25 mg/L diperlakukan sama dengan sampel dan diukur absorbansinya.

#### Uji Total Flavonoid (Ukieyana, 2012)

Ekstrak mikroalga *C.sorokiniana* yang telah dilarutkan dalam etanol p.a (50 gram dalam 50 mL larutan) sebanyak 1 mL ditambahkan 0,2 mL  $AlCl_3$  10% dan 0,2 mL natrium asetat, kemudian ditambahkan akuades hingga volume larutan 10 mL. Larutan diinkubasi selama 30 menit dan diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimal. Kuersetin digunakan sebagai standar dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 mg/L diberi perlakuan sama dengan ekstrak. Total flavonoid ekstrak sampel dinyatakan dalam mg kuersetin/g sampel (mgQE/g ekstrak).

#### Uji Antioksidan (Jerez-martel et al., 2017; Kurnia et al.,2020 )

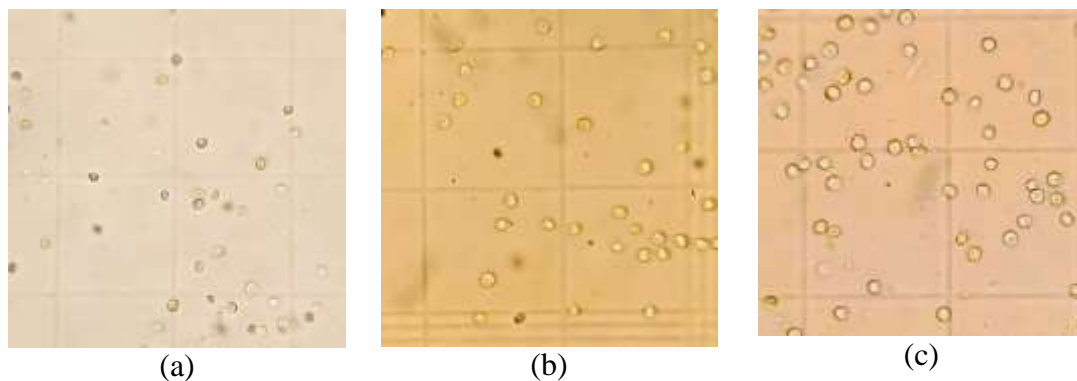
Aktivitas antioksidan ekstrak etanol mikroalga diuji menggunakan 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Larutan ekstrak (1 mg/mL) dibuat dalam berbagai konsentrasi 100, 200, 300, 400, 500 mg/L. Masing-masing konsentrasi larutan sebanyak 1 mL ditambah 2 mL larutan DPPH, didiamkan selama 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 520 nm. Kuersetin digunakan sebagai kontrol positif dengan prosedur yang sama dan sebagai blanko digunakan 1 mL etanol p.a. Aktivitas penangkal radikal dinyatakan sebagai persen inhibisi yang dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ peredaman radikal bebas} = \frac{(\text{abs standar} - \text{abs sampel})}{(\text{abs standar})} \times 100\%$$

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Hasil Kultivasi Mikroalga *Chlorella sorokiniana*

Hasil kultivasi mikroalga *C. sorokiniana* dilakukan pengamatan dibawah mikroskop dengan pembesaran 40 x 10. Menurut hasil yang ditunjukkan pada Gambar 1, morfologi sel mikroalga dari hari ke-7, hari ke-14, dan hari ke-21 ukuran sel terlihat semakin membesar. *C. sorokiniana* merupakan alga bersel satu yang kecil dengan diameter 2-4,5  $\mu\text{m}$  yang mampu tumbuh pada kondisi *mixotropik* dengan berbagai sumber karbon dan nitrogen (Ramanna et al., 2014).



Gambar 1. Hasil kultivasi mikroalga *C. sorokiniana* pada perbesaran 40 x 10 yang dipanen pada (a) hari ke-7, (b) hari ke-14, dan (c) hari ke-21

Hasil perhitungan sel mikroalga menurut Tabel 1 menunjukkan bahwa sel mikroalga *C. sorokiniana* masih mengalami pertumbuhan. Namun, menurut penelitian yang dilakukan oleh Mursandi (2021), sel mikroalga dihari ke-8 sudah mengalami penurunan, jika dibandingkan dengan penelitian tersebut sel mikroalga pada hari ke-21 harus sudah mati. Hal ini disebabkan karena perbedaan waktu dan kondisi saat melakukan kultivasi. Pertumbuhan mikroalga berlangsung dalam fase yang berbeda, yaitu (1) fase lag adalah fase dimana mikroorganisme beradaptasi dengan lingkungannya, (2) fase logaritmik atau eksponensial yaitu fase pertumbuhan mikroorganisme yang cepat yang ditandai dengan adanya sel aktif, dan (3) fase stasioner, yaitu fase dimana pertumbuhan dan kematian seimbang sehingga jumlah mikroalga yang hidup dipertahankan dan berakhir pada fase kematian (Istirokhatun & Aulia, 2017).

Tabel 1. Perhitungan jumlah sel mikroalga *C. sorokiniana*

Waktu Panen (Hari ke-)	Tanggal Pengamatan	Jumlah Sel (sel/mL)
7	10 Oktober 2021	3.256.500
	17 Oktober 2021	2.976.500
	24 Oktober 2021	3.1266.666
	05 Desember 2021	3.020.000
	12 Desember 2021	2.870.000
14	24 Oktober 2021	3.853.333
	31 Oktober 2021	3.543.000
	07 November 2021	3.863.300
	19 Desember 2021	3.436.500
	09 Januari 2022	3.460.000
21	31 Oktober 2021	3.943.000
	07 November 2021	3.653.333
	14 November 2021	4.133.333
	26 Desember 2021	3.256.666
	23 Januari 2021	3.830.000

Pada penelitian ini fase lag tidak diketahui karena sel hanya diamati dimulai pada hari ke-7. Sel mikroalga *C. sorokiniana* kemungkinan pada hari ke 7 merupakan fase eksponensial karena pada fase ini sel mikroalga mengalami peningkatan sebanyak 3.256.000 sel/ $\mu$ l. Fase stasioner pada penelitian ini diperkirakan terjadi pada hari ke-14 dan masih berlanjut sampai hari ke-21. Hal ini ditandai dengan terus meningkatnya jumlah sel namun dengan peningkatan yang tidak banyak (Tabel.1).

Mikroalga dapat tumbuh dalam kondisi fototropik, heterotropik, kondisi mixotropik. Pada kondisi fototropik (autotropik fotosintesis), mikroalga tumbuh bergantung pada cahaya matahari dan CO<sub>2</sub>. Pertumbuhan mikroalga pada kondisi heterotropik memanfaatkan karbon organik sebagai sumber energi. Sedangkan, pada kondisi mixotropik, mikroalga tumbuh dengan memanfaatkan sumber karbon organik dan CO<sub>2</sub>. Glukosa, asetat, dan gliserol merupakan sumber karbon yang dapat dimanfaatkan mikroalga sebagai sumber energi (Gultom, 2018). Limbah cair tahu diketahui mengandung banyak sekali bahan organik, seperti karbohidrat, lemak, protein, besi, dan

fosfor (Makiyah, 2013). Bahan organik tersebut mampu berperan sebagai sumber energi bagi mikroalga *C. sorokiniana*. Mikroalga *C. sorokiniana* dapat memperoleh energi dengan menyerap cahaya matahari dan karbon organik, baik dengan cara bersamaan maupun bergantian. Kemampuan mikroalga untuk tumbuh pada media limbah cair tahu dipengaruhi oleh konsentrasi nutrisi. Ketika nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroalga tidak tersedia atau jumlah limbah terlalu tinggi, maka akan menghambat pertumbuhan mikroalga bahkan dapat beracun atau mematikan mikroalga (Indah, 2008).

### Kadar Air *Chlorella sorokiniana*

Syarat kandungan kadar air dalam ekstrak pada umumnya, yaitu kurang dari 10% (BPOM RI, 2000). Menurut hasil penelitian yang ditunjukkan pada Tabel 2, hasil kadar air *C. sorokiniana* memenuhi standar mutu. Penentuan kadar air suatu ekstrak bertujuan untuk menetapkan batas minimum jumlah air yang terkandung dalam suatu bahan (ekstrak). Semakin tinggi kadar air, semakin mudah jamur dan kapang berkembang biak yang dapat mengurangi potensi ekstrak selama umur simpan. Kadar air tergantung pada lamanya pengeringan simplisia.

Tabel 2. Hasil Kadar Air *C. sorokiniana*

No	Waktu Pengamatan (Hari Ke-)	Kadar Air (%)
1	7	4,51
2	14	5,96
3	21	4,32

### Skrining Fitokimia Ekstrak *C. sorokiniana*

Hasil uji skrining fitokimia pada ekstrak etanol mikroalga *C. sorokiniana* baik dipanen pada hari ke-7, hari ke-14 maupun hari ke-21 memiliki senyawa yang sama. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Abdu et al. (2019) tentang *C. sorokiniana* menunjukkan hasil positif pada semua senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, steroid, saponin, dan tanin. Keberadaan senyawa fenolik dan flavonoid dalam ekstrak etanol mikroalga *C. sorokiniana* mengindikasikan memiliki manfaat sebagai antioksidan (Hardarani & Dewi, 2019).

Tabel 3. Hasil Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol *Chlorella sorokiniana*

Waktu Pengamatan (Hari ke-)	Alkaloid			Flavonoid	Steroid	Saponin	Tanin
	Dragendorff	Wagner	Mayer				
7	+++	+++	-	+++	+++	+	+++
14	+++	+++	-	+++	+++	++	+++
21	+++	+++	-	+++	+++	+	+++

Keterangan: (-) Negatif, (+) Tidak Pekat, (++) Pekat, (+++) Sangat Pekat

Alkaloid pada ekstrak etanol mikroalga *C. sorokiniana* menunjukkan hasil positif pada pereaksi dragendorff dan wagner sedangkan untuk pereaksi mayer menunjukkan hasil negatif. Perbedaan yang ditemukan dari hasil pengujian alkaloid ini disebabkan karena dipengaruhi oleh perbedaan kandungan senyawa pada masing-masing pereaksi. Pereaksi

mayer mengandung  $\text{HgCl}_2$  dan KI, pereaksi dragendroff mengandung  $\text{HgCl}_2$  dan  $\text{BiNO}_3$  dalam  $\text{HNO}_3$ , dan pereaksi wagner mengandung  $\text{I}_2$  dan KI. Perbedaan utama antara reagen ini tercermin dalam sensitifitas diferensial terhadap gugus alkaloid, sementara reagen mayer kurang sensitif dibandingkan reagen wagner dan dragendroff (Tarakanita et al., 2019)

Hasil uji flavonoid pada ekstrak etanol *C. sorokiniana* ditandai dengan terbentuknya warna kuning-jingga oleh pereaksi pendeteksi flavonoid (Bahriul, 2014). Flavonoid merupakan senyawa yang tersusun dari dua cincin aromatik dengan gugus hidroksil lebih dari satu. Senyawa fenolik dengan gugus hidroksil larut dalam air atau lebih polar. Oleh karena itu, dapat diekstraksi dalam pelarut polar (Robinson, 1995).

Hasil uji steroid pada ekstrak etanol *C. sorokiniana* yaitu terjadinya perubahan warna menjadi biru, uji ini didasarkan pada kemampuan senyawa triterpenoid dan steroid untuk menghasilkan warna dari asam sulfat pekat dalam pelarut asetat anhidrida (Sangi et al., 2008). Hasil uji saponin ekstrak etanol mikroalga *C. sorokiniana* ditunjukkan dengan terbentuknya busa stabil dimana sesuai dengan hasil yang didapatkan bahwa sampel mikroalga *C. sorokiniana* hari ke-14 membentuk busa lebih banyak dibandingkan dengan hari ke-7 dan hari ke-21. Hasil uji tanin ekstrak etanol mikroalga *C. sorokiniana* ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman. Terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru kehitaman pada ekstrak setelah penambahan  $\text{FeCl}_3$  karena tanin akan membentuk senyawa kompleks dengan ion  $\text{Fe}^{3+}$  (Nuryanti & Pursitasari, 2014).

### Total Fenolik Ekstrak *C. sorokiniana*

Pengujian total fenolik *C. sorokiniana* dengan metode *Folin-Cioacalteu* dinyatakan dengan massa ekuivalen asam galat (Pacheco-coello et al., 2020). Berdasarkan hasil yang didapatkan pada Tabel 4, kandungan total fenolik tertinggi terjadi pada waktu panen hari ke-21. Hal ini disebabkan karena senyawa organik yang terkandung dalam limbah cair tahu diserap oleh mikroalga melalui proses respirasi sel. Mikroalga tumbuh dengan cara fotosintesis sehingga memerlukan cahaya untuk pertumbuhan. Sinar matahari merupakan salah satu pemicu stress yang dapat meningkatkan biosintesis senyawa fenolik pada jaringan tanaman (Fithriani et al., 2015).

Tabel 4. Hasil Uji Total Fenolik

No	Waktu Pengamatan	Total Fenolik (mgGAE/g)
1	Hari ke-7	4,89
2	Hari ke-14	5,17
3	Hari ke-21	5,27

Pada penelitian ini, senyawa fenolik pada *C. sorokiniana* sangat rendah jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Nor et al, (2017) yang hasilnya menunjukkan kandungan total fenolik mikroalga *C. sorokiniana*, yaitu 11,56 mgGAE/g. Penelitian Susanty & Oksari (2021) memperoleh total fenolik 14,11 mgGAE/g pada ekstrak kloroform *C. sorokiniana* yang dikultur pada media limbah ternak ayam dan penelitian yang dilakukan oleh Olasehinde et al (2019) memperoleh total fenolik 14,21 mgGAE/g. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi kandungan fenolik pada mikroalga, diantaranya cara kultivasi, tempat produksi, kondisi penanaman, waktu panen dan kualitas dari sampel mikroalga *C. sorokiniana* itu sendiri (Pacheco-coello et al., 2020).

Senyawa fenolik berperan sebagai antioksidan dengan cara mengikat ion logam, mencegah pembentukan radikal bebas dan merangsang system antioksidan tubuh (Cahyani et al., 2022).

Sebelum menentukan kadar total fenol dalam ekstrak etanol *C. sorokiniana*, terlebih dahulu ditentukan panjang gelombang maksimumnya. Hal ini bertujuan untuk memperkecil kesalahan dalam pengukuran absorbansi sehingga didapatkan panjang gelombang maksimal yaitu 760 nm. Asam galat terkandung dalam senyawa fenolik dan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat (Lee et al. 2003). Metode folin-ciocalteu dilakukan berdasarkan daya reduksi gugus hidroksil fenolik, termasuk fenol sederhana, dapat bereaksi dengan pereaksi folin-ciocalteu meskipun tidak efektif sebagai penangkap radikal (anti radikal) (Huang et al. 2005). Adanya inti aromatik pada senyawa fenolik dapat mereduksi fosfomolibdat fosfotungsten menjadi molibdenum yang berwarna biru (Elsha, 2012).

### Total Flavonoid Ekstrak *C. sorokiniana*

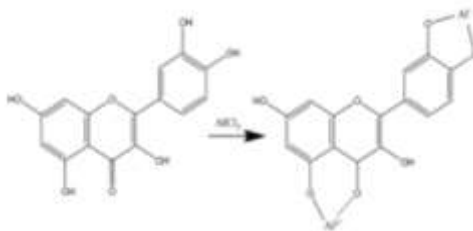
Hasil uji total flavonoid yang disajikan pada Tabel 5 menunjukkan bahwa ekstrak etanol *C. Sorokiniana* hari ke-21 memiliki kandungan flavonoid yang paling tinggi karena *C. sorokiniana* memasuki masa akhir pertumbuhan sehingga keadaan tersebut mendorong produksi senyawa flavonoid. Stres oksidatif pada tanaman disebabkan oleh aktivitas enzim NADPH oksidase dan xantine oksidase. Aktivitas kedua enzim tersebut menghasilkan ROS atau AOS. ROS merupakan molekul yang diproduksi oleh tanaman dalam menanggapi stress biotik dan abiotik, sehingga dapat memicu peningkatan kadar flavonoid total dalam tumbuhan (Sanjaya, 2013). Asam p-kumarat adalah salah satu prekursor penting dalam biosintesis flavonoid. Asam organik ini merupakan komponen utama chlorella membentuk kalkon naringenin, dan diketahui membentuk naringenin yang merupakan prekursor apigenin (Goiris et al., 2014).

Tabel 5. Hasil Uji Total Flavonoid

No	Waktu Pengamatan	Total Flavonoid (mgQE/g)
1	Hari ke-7	22,98
2	Hari ke-14	22,32
3	Hari ke-21	36,70

Penentuan kandungan total flavonoid pada ekstrak etanol *C. sorokiniana* menggunakan metode spektrofotometri UV-VIS. Prinsip dasar metode ini, yaitu  $AlCl_3$  membentuk kompleks asam yang stabil dengan gugus keto C-4 dan gugus hidroksil C-3 atau C-5 dari flavon atau flavonol (Bag & Devi, 2015). Senyawa yang digunakan sebagai standar penentuan kandungan flavonoid adalah kuersetin, karena kuersetin merupakan golongan flavonoid dari flavonol dengan gugus keto pada atom C-4 dan juga gugus hidroksil pada atom C-3 dan C-5 yang berdekatan (Azizah et al., 2014). Pengukuran panjang gelombang maksimum dilakukan pada kisaran sekitar 400-800 nm. Panjang gelombang maksimum kuersetin yang didapatkan adalah 425 nm.





Gambar 2. Reaksi Flavonoid dengan  $\text{AlCl}_3$   
Sumber: Azizah et al (2014)

### Aktivitas Antioksidan

Berdasarkan hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol mikroalga *C. sorokiniana* dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yang disajikan pada Tabel 6 jika dibandingkan dengan tingkat kekuatan antioksidan pada Tabel 1 mengenai tingkat kekuatan antioksidan membuktikan bahwa ekstrak etanol mikroalga *C. sorokiniana* tidak mengandung antioksidan. Kondisi ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol *C. sorokiniana* tidak mampu melawan radikal bebas dari DPPH. Kemampuan ekstrak untuk menghambat antioksidan ditentukan berdasarkan nilai  $\text{IC}_{50}$ . Nilai tersebut mewakili konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi aktivitas radikal bebas DPPH sebesar 50% (Lvarez et al., 2006). Tidak adanya aktivitas antioksidan pada sampel ekstrak etanol mikroalga *C. sorokiniana* yang dikultur pada limbah cair tahu dipengaruhi waktu panen dan media kultur. Semakin lama waktu panen mikroalga maka semakin sedikit nutrisi yang tersisa pada limbah cair tahu, hal ini menyebabkan pertumbuhan mikroalga menjadi terhambat dan mengalami stress oksidatif. Stress oksidatif dapat menyebabkan kerusakan jaringan melalui produksi radikal bebas yang berlebihan dari metabolisme lemak dan protein yang tersimpan dalam sel mikroalga karena kekurangan nutrisi (Parwata,2016).

Tabel 6. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan *C.sorokiniana* dan Kuersetin

No	Parameter Analisis	$\text{IC}_{50}$ (mg/L)
1	Kuersetin	4,05
2	<i>C. Sorokiniana</i> Hari ke-7	865,47
3	<i>C. Sorokiniana</i> Hari ke-14	995,21
4	<i>C. Sorokiniana</i> Hari ke-21	2268,59

Pada penelitian ini, pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis, diperoleh panjang gelombang maksimum 520 nm dengan absorbansi tertinggi 0,7275. Semakin tinggi konsentrasi larutan ekstrak etanol *C. sorokiniana*, maka warna ungu yang dimiliki DPPH akan semakin rendah sehingga dapat berubah warna menjadi kuning (Fithriani et al., 2015). Antioksidan berperan penting dalam mencegah perkembangan dan progresi beberapa penyakit neurodegenerative. Pertahanan antioksidan yang minimal dan kadar asam lemak tak jenuh ganda yang tinggi, sel-sel otak lebih rentan terhadap kerusakan saraf, rentan terhadap serangan radikal bebas yang dapat menyebabkan hilangnya fungsi kolinergik, transmisi dan gangguan kognitif (Olasehinde et al., 2019). Berbagai jenis fenol dapat memiliki aktivitas antioksidan yang berbeda, tergantung pada strukturnya. Fenol termasuk

dalam flavonoid yang ditemukan dalam ekstrak air dan etanol, sehingga antioksidan tidak dapat diukur dengan metode DPPH saja

### KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan didapatkan simpulan bahwa ekstrak etanol mikroalga *Chlorella sorokiniana* yang dipanen pada hari ke-21 memiliki kandungan total flavonoid dan total fenolik yang lebih tinggi dari waktu panen 7 dan 14 hari, namun keberadaan senyawa flavonoid dan flavonoid pada ekstrak tersebut belum menunjukkan aktivitas antioksidan.

### DAFTAR PUSTAKA

- Abdu, M., Saad, M. G., & Shafik, H. M. (2019). Phytochemical screening and antimicrobial activities of some green algae Phytochemical screening and antimicrobial activities of some green algae from Egypt. April.
- Azizah, D. N., Kumolowati, E., Faramayuda, F., Keahlian, K., Farmasi, B., Farmasi, F., Jenderal, U., & Yani, A. (2014). Penetapan Kadar Flavonoid Metode  $AlCl_3$  Pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao *Theobroma cacao L.* 2(2), 45–49.
- Bag, G. C., & Devi, P. G. (2015). *Research Article Assessment of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Methanolic Rhizome Extract of Three Hedychium Species of Manipur Valley I.* 30(28), 154–159.
- Bahriul, P. (2014). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Salam *Syzygium polyanthum* Dengan *Antioxidant Activity Test of Bay Leaf ( Syzygium polyanthum ) Extract Using.* 3(August), 143–149.
- BPOM RI, D. K., Jendera, D., Pengawasan, D., & Tradisional, O. (2000). *615.32 Ind p •*.
- BSN. (1992). Cara Uji Makanan dan Minuman SNI 01-2891-1992. In *Sni* (p. Jakarta (ID): BSN)
- Cahyani, F. R., & Isman, H. S. M. (2022). Potency Of *Chlorella.Sp* As Antioxidant And Anti-Inflammatory Agent. *Journal of Vocational Health Studies*, 5(3), 203.
- Carvalho, E. M. De, Ramos, M. M., Ansilago, M., & Mara, R. (2020). *Meningkatkan Metabolit Sekunder diChlorella sorokiniana menggunakan media alternatif dengan vinasse.*
- Elystia, S., Larasati, D., & Muria, S. R. (2020). Produksi Lipid dari Mikroalga *Scenedesmus sp .* pada Media Limbah Cair Tahu dengan Variasi Konsentrasi Limbah dan Photoperiod. *Jurnal Teknik Lingkungan*, 5(2), 54–61.
- Fithriani, D., Amini, S., Melanie, S., & Susilowati, R. (2015). Uji Fitokimia, Kandungan Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan Mikroalga *Spirulina sp.*, *Chlorella sp.*, dan *Nannochloropsis sp.* *Jurnal Pascapanen Dan Bioteknologi Kelautan Dan Perikanan*, 10(2), 101.
- Gultom, S. O. (2018). Mikroalga: Sumber Energi Terbarukan Masa Depan. *Jurnal Kelautan: Indonesian Journal of Marine Science and Technology*, 11(1), 95.
- Harahap, F., Bariyah, S., Sofyan, N., & Simorangkir, M. (2019). Pemanfaatan Limbah

- Kulit Durian Dan Daun Sirsak Sebagai Biopestisida Alami. *JBIO : Jurnal Biosains ( The Journal of Biosciences )*, 5(3), 116–120.
- Hardarani, N., & Dewi, I. (2019). Antioxidant Contents on Bawang Dayak at Landasan Ulin Utara Peatland in Different Harvesting Ages. *Prosiding Seminar Nasional Lingkungan Lahan Basah*, 4(April).
- Hardiningtyas, S. D., Purwaningsih, S., Handharyani, E., Agatis, J., & Hewan, F. K. (2014). Aktivitas Antioksidan Dan Efek Hepatoprotktif Daun Bakau Api-Api Putih *Antioxidant Activity and Hepatoprotective Effect of Green Mangrove Leaves*. 17, 80–91.
- Istirokhatun, T., & Aulia, M. (2017). *Potensi Chlorella Sp . untuk Menyisihkan COD dan Nitrat dalam Limbah Cair Tahu*. 14(2), 88–96.
- Jerez-martel, I., García-poza, S., Rodríguez-martel, G., Rico, M., Afonso-olivares, C., & Gómez-pinchetti, J. L. (2017). *Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Crude Extracts from Microalgae and Cyanobacteria Strains*. 2017.
- Kumar, K., Dasgupta, C. N., & Das, D. (2014). Bioresource Technology Cell growth kinetics of Chlorella sorokiniana and nutritional values of its biomass. *Jurnal Bioresurce Technology*, 167, 358–366. 8
- Kurnia, D., Rosliana, E., Juanda, D., & Nurochman, Z. (2020). Aktifitas Antioksidan Dan Penetapan Kadar Fenol Total Dari Mikroalga Laut *Chlorella vulgaris*. *Jurnal Kimia Riset*, 5(1), 14.
- Lizzul, A. M., Lekuona-amundarain, A., & Purton, S. (2018). Characterization of Chlorella sorokiniana , UTEX 1230. *Jurnal biologi*, Page 1-12.
- Lvarez, Ä., Ifuentes, A. L. C., & Ba, E. L. I. (2006). *Optimization of the Extraction of Antioxidants from Dunaliella salina Microalga by Pressurized Liquids*.
- Makiyah, M. (2013). Analisis Kadar N, P dan K pada Pupuk Cair Limbah Tahu dengan Penambahan Tanaman Matahari Meksiko (Thitonia diversivolia ). In *Skripsi Universitas Negeri Semarang* (pp. 1–77).
- Matsukawa, R., Hotta, M., Masuda, Y., Chihara, M., & Karube, I. (2000). *Antioxidants from carbon dioxide fixing Chlorella sorokiniana*. 263–267.
- Meigaria, K. M., Mudianta, I. W., Martiningsih, N. W. (2016). *Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Aseton Daun Kelor (Moringa oleifera)* (1), 1–11.
- Mursandi, H. (2021). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Mikroalga *Chlorella sorokiniana* Hasil Kultur pada Media Limbah Cair Tahu. *Skripsi Universitas Nusa Bangsa*.
- Nor, S., Azaman, A., Nagao, N., Yusoff, F. M., & Tan, S. W. (2017). *A comparison of the morphological and biochemical characteristics of Chlorella sorokiniana and Chlorella zofingiensis cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions*.
- Nuryanti, S., & Pursitasari, D. (2014). Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder Pada Daun Palado *Agave angustifolia* Yang Diekstraksi Dengan Pelarut Air Dan Etanol *Qualitative Test of Secondary Metabolites Compounds in Palado Leaves ( Agave Angustifolia ) Extracted With Water and Ethanol*. 3(August), 165–172.
- Olasehinde, T. A., Odjadjare, E. C., Mabinya, L. V, Olaniran, A. O., & Okoh, A. I. (2019).

- Chlorella sorokiniana and Chlorella minutissima exhibit antioxidant potentials , inhibit cholinesterases and modulate disaggregation of  $\beta$  -amyloid fi brils. *Electronic Journal of Biotechnology*, 40, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.03.008>
- Pacheco-coello, F., Orosco-vargas, C., & Pinto-catari, I. (2020). Determination Of Total Phenolic Compounds And evaluation Of The Antixidant Aktivitiy Of Comericial And Artisanal Green Tea. 37(1), 28–33.
- Parwata, M. O. A. (2016) Bahan Ajar Antioksidan. *Program Pasca Sarjana Universitas Udayana*.
- Rini,I. S. (2008). *Pengaruh Konsentrasi Limbah Cair Tahu Terhadap*. 1–9.
- Qiu, S., Shen, Y., Zhang, L., Ma, B., Amadu, A. A., & Ge, S. (2020). Antioxidant assessment of wastewater-cultivated Chlorella sorokiniana in Drosophila melanogaster. *Algal Research*, 46(November 2019), 101795.
- Ramanna, L., Guldhe, A., Rawat, I., & Bux, F. (2014). Bioresource Technology The optimization of biomass and lipid yields of Chlorella sorokiniana when using wastewater supplemented with different nitrogen sources. *Bioresourc Technology*.
- Rosahdi, T. D., Susanti, Y., & Suhendar, D. (2015). *Uji Aktivitas Daya Antioksidan Biopigmen Pada Fraksi Aseton Dari Mikroalga Chlorella vulgaris*. IX(1), 1–16.
- Samira, C., Mahmah, B., Chetehouna, K., & Mignolet, E. (2010). *Biodiesel production using Chlorella sorokiniana a green microalga Biodiesel production using Chlorella sorokiniana a green microalga*. August 2015.
- Sangi, M., Runtuwene, M. R. J., & Simbala, H. E. I. (2008). Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat, *Chem. Prog. Vol. 1, No. 1, 2008*. 1(1), 47–53.
- Sanjaya, I. G. M. (2013). Pengaruh Waktu Panen Terhadap Kadar Total Flavonoid dan Aktivitas Anti-Inflamasi, *Unesa Journal of Chemistry Vol. 2, No. 1, January 2013*. 2(1), 144–150.
- Sistem, M., Angraini, B., Sutisna, M., & Pratama, Y. (2014). Pengolahan Limbah Cair Tahu secara Anaerob. *Jurnal Institut Teknologi Nasional*, 2(1), 1–10.
- Susanty, D., & Oksari, Ade Ayu (2020). *Growth and secondary metabolites content of chloroform extract of Chlorella sp . and Chlorella sorokiniana cultured on chicken broiler waste media*. 12(1), 28–32.
- Wijihastuti, R. S., Si, S., Phil, M., Noriko, N., & Isi, D. (2022). Pengaruh Waktu Panen dan Metode Kultur Pada Kandungan Protein , *Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Al Azhar Indonesia Januari 2022*.
- Yudhistira, B., Andriani, M., & Utami, R. (2018). Karakterisasi: Limbah Cair Industri Tahu Dengan Koagulan Yang Berbeda (Asam Asetat Dan Kalsium Sulfat). *Caraka Tani: Journal of Sustainable Agriculture*, 31(2), 137.