

OVERPRODUKSI ASTAXANTHIN PADA *Haematococcus pluvialis* DENGAN INDUKSI RADIASI UV DAN PENAMBAHAN BHT

Relinda Banatul Awaliyah, Irma Yulianti, Aldo Agustian, Soni Muhsinin*

Fakultas Farmasi Universitas Bhakti Kencana

*E-mail: soni.muhsinin@bku.ac.id

Received: 12 November 2019; Revised: 30 Desember 2019; Accepted: Desember 2019; Available online: Desember 2019

ABSTRACT

H. pluvialis is a microalga that can accumulate astaxanthin up to 5% of the cell dry weight under stressful conditions. Therefore, the objective of the study was increase the production of astaxanthin by physical and chemical induction of stress and a combination of both. *H. pluvialis* was cultivated using Walne media. On the 7th day, *H. pluvialis* culture was treated with the addition BHT (Butylated Hydroxytoluene) with variations in concentrations of 2, 4 and 6 ppm, UV-B light irradiation with varying exposure times 30, 60, 90 minutes, a combination of both with 90 minutes UV-B light irradiation and 4 ppm addition of BHT, and without any treatment as a negative control. Cultures were cultivated for 16 days to induce an of astaxanthin. *H. pluvialis* was extracted by maceration using DMSO. Extracts were analyzed using a spectrophotometer with a maximum wavelength of 490 nm. The quantitative analysis results with a spectrophotometer showed that BHT addition of 4 ppm, 90 minutes of UV-B irradiation and both of combination were able to produce the highest astaxanthin content reaching 0,745 mg/L, 0,916 mg/L, 0,621 mg/L respectively, than control 0,203 mg/L.

Keywords : *H. pluvialis*, Astaxanthin, BHT, UV-B

ABSTRAK

H. pluvialis adalah mikroalga yang dapat mengakumulasi astaxanthin hingga 5% berat kering selnya dalam kondisi stres. Oleh karena itu, dilakukan penelitian yang bertujuan untuk meningkatkan produksi astaxanthin dengan induksi stres secara fisika dan kimia serta kombinasi keduanya. *H. pluvialis* dikultivasi menggunakan media Walne. Pada hari ke-7 kultur diberikan perlakuan induksi stres. Induksi stres secara fisika dilakukan dengan paparan radiasi lampu UV-B dengan waktu keterpaparan 30 menit, 60 menit dan 90 menit. Induksi stres secara kimia dilakukan dengan penambahan BHT (Butylated Hydroxytoluene) dengan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm dan 6 ppm. Induksi stres kombinasi dilakukan dengan radiasi lampu UV-B dengan waktu keterpaparan 90 menit dan penambahan BHT 4 ppm. Kemudian kultur dikultivasi kembali selama 16 hari untuk menginduksi akumulasi astaxanthin. *H. pluvialis* diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut DMSO. Hasil analisis kuantitatif dengan spektrofotometer λ 490 nm menunjukkan bahwa perlakuan induksi radiasi lampu UV-B 90 menit, penambahan BHT 4 ppm, dan kombinasi keduanya mampu menghasilkan kandungan astaxanthin tertinggi mencapai 0,745 mg/L, 0,916 mg/L dan 0,621 mg/L berturut-turut dari pada kontrol sebesar 0,203 mg/L.

Kata kunci : *H. pluvialis*, Astaxanhtin, BHT, UV-B

PENDAHULUAN

Astaxanthin (3,3'-dihidroksi- β -karoten-4,4'-dione) merupakan salah satu metabolit sekunder yang termasuk golongan karotenoid (Higuera-Ciapara dkk., 2006). Astaxanthin juga merupakan produk metabolit sekunder yang bernilai tinggi di bidang farmasi, nutrasetikal dan kosmetik karena potensi antioksidannya yang sangat kuat dengan nilai IC_{50} $39,1 \pm 1,14$ ppm (Infant dkk., 2016). Aktivitas antioksidan yang dihasilkan oleh astaxanthin diketahui 65 kali lebih tinggi dari pada vitamin C, 54 kali lebih kuat dari pada β -karoten, 14 kali lebih tinggi dari pada vitamin E dan 20 kali lebih kuat dari pada bentuk sintetisnya (Capelli dkk., 2013). Karena aktivitas antioksidannya yang sangat kuat tersebut, astaxanthin dapat digunakan dalam terapi penunjang beberapa penyakit degeneratif (Fakhri dkk., 2018).

Mikroalga *Haematococcus pluvialis* merupakan mikroorganisme yang menunjukkan kapasitas tertinggi hingga 5% untuk mengakumulasi astaxanthin alami pada kondisi stres karena pengaruh lingkungan yang tidak menguntungkan (Masojidek dan Torzillo, 2014). Keadaan stres tersebut diantaranya dapat disebabkan oleh adanya stres cahaya (Imamoglu dkk., 2009), defisiensi nutrisi (Chekanov dkk., 2014), stres salinitas (Sarada dkk., 2002) dan penambahan zat kimia tertentu seperti BHT (*Butylated Hydroxytoluene*) yang dapat menginduksi stres (Zhao dkk., 2018). Namun menurut Zahra (2017), penggunaan satu jenis cekaman (stres) saja hanya dapat menginduksi sintesis dan akumulasi astaxanthin dalam level yang rendah. Maka dari itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kombinasi induksi stres sebagai upaya peningkatan produksi astaxanthin.

Melalui penelitian ini, dilakukan induksi stres pada kultur mikroalga *Haematococcus pluvialis* secara fisika dengan radiasi lampu UV-B, secara kimia dengan penambahan BHT (*Butylated Hydroxytoluene*) serta kombinasi keduanya sebagai upaya peningkatan produksi astaxanthin alami.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol kaca kapasitas 1 liter, aerator pompa udara 2 lubang (Amara BS-410), pipa kaca dengan diameter 0,2 cm *letter L*, sumbat karet dua lubang dengan diameter 0,2 cm, selang plastik berwarna bening dengan diameter 0,5 cm, kuvet kuarsa (Hellma Analytics), *microtube* 1,5 ml (Biologix), vial kapasitas 10 ml, mikropipet 100-1000 μ l (*Fisherbrand*TM), tip mikropipet, mikroskop cahaya (Yazumi), *autoclave*, 2 lampu TL Phillips, lampu UV-B 200 13 Watt (Exoterra), lampu UV λ 254 nm dan λ 365 nm, *haemocytometer* (Neubauer), luxmeter (Smart Sensor AS803), termometer, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV1800), *microcentrifuga* (MPW-55) dan sonikator (Elma S 40 H).

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroalga hijau air tawar *Haematococcus pluvialis* yang diperoleh dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara Jawa Tengah, air mineral AQUA, media Walne yang diperoleh dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara Jawa Tengah, BHT (*Butylated Hydroxytoluene*) yang diperoleh dari Laboratorium Institut Teknologi Bandung. Bahan-bahan seperti etanol 96%, aquades, DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*), larutan KOH 5% (w/v) dalam metanol 30% (v/v), plat KLT silica gel 60 F₂₅₄, aseton, asam format dan n-heksana diperoleh dari Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Bhakti Kencana.

Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan yang tahan panas dilakukan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit.

Aklimatisasi

Aklimatisasi dilakukan dengan cara stok bibit yang didapat kemudian didiamkan 2-3 hari dalam suhu ruang (Arifah, 2014).

Aktivasi (Peremajaan Sel)

Setiap botol kaca berkapasitas 1 L diisi dengan inokulum kultur mikroalga sebanyak 10% (v/v), yaitu 90 ml kultur cair mikroalga ditambahkan dengan air mineral steril 810 ml dan media Walne yang sebanyak 500 μ l. Aktivasi dilakukan pada kondisi suhu ruang ($25 \pm 1^\circ$ C). Penyinaran dilakukan menggunakan lampu TL dengan fotoperiode 12 jam terang : 12 jam gelap dan intensitas cahaya 3000 lux. Pemberian aerasi dilakukan terus-menerus selama 24 jam (Witono dkk., 2018; Rohimawati dan Marwani, 2017).

Kultivasi

Kultivasi mikroalga dilakukan pada kondisi yang sama dengan kondisi aktivasi (peremajaan sel), namun kepadatan sel inokulum kultur mikroalga yang digunakan adalah 1×10^6 sel dihitung dengan menggunakan *haemocytometer* di bawah mikroskop cahaya perbesaran 400x.

Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Mikroalga yang sedang dikultivasi kemudian dipanen dengan cara dikocok, dimasukkan ke dalam vial. Kultur cair tersebut diukur serapannya menggunakan spektrofotometer dengan λ 680 nm. Kemudian nilai absorbansi diplotkan pada grafik dengan sumbu x adalah usia kultur dan sumbu y adalah nilai absorbansi atau *Optical Density*, sehingga didapatkan kurva pertumbuhan (Witono dkk., 2018).

Induksi Stres

Pada akhir fase logaritmik, dilakukan induksi stres dengan radiasi lampu UV-B, penambahan BHT (*Butylated Hydroxytoluene*) serta kombinasi keduanya. Untuk kontrol negatif, kultur tidak diberi perlakuan induksi stres. Induksi stres secara fisika dilakukan dengan dipaparkan pada sinar UV-B dengan variasi waktu keterpaparan 30 menit, 60 menit dan 90 menit. Induksi stres secara kimia dilakukan dengan ditambahkan BHT pada kultur dengan variasi konsentrasi 2 ppm, 4 ppm dan 6 ppm. Larutan induk BHT terlebih dahulu dilarutkan dalam etanol 96% (Zhengyun dkk., 2010; Zhao dkk., 2018). Kemudian induksi stres kombinasi keduanya dilakukan dengan dipaparkan pada lampu UV-B dengan waktu keterpaparan 90 menit dan ditambahkan BHT 4 ppm.

Ekstraksi

Pada usia kultur ke 12, 13, 14, 15, dan 16 hari pasca induksi, 10 ml kultur dipanen kemudian disentrifuga. Supernatan dibuang, pelet dibilas dengan aquades, lalu disentrifuga kembali. Supernatan dibuang, lalu pelet diberikan perlakuan penambahan 1 ml larutan KOH 5% (w/v) dalam metanol 30% (v/v) dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit lalu disentrifuga kembali. Supernatan dipindahkan pada wadah lain untuk dipantau kandungan klorofilnya. Kemudian pelet ditambahkan DMSO, dilakukan sonikasi selama 10 menit dan diinkubasi pada *waterbath* dengan suhu 45°C selama 20 menit (Boussiba dan Vonshak, 1991 dalam Zhao dkk., 2018).

Pemantauan Supernatan

Supernatan yang diduga mengandung klorofil ditotolkan pada plat KLT silica gel F₂₅₄, kemudian dielusikan dengan fase gerak n-heksana-aseton-asam format (4:2:10 tetes). Kemudian plat KLT dipantau dibawah sinar UV λ 254 nm dan UV λ 366 nm.

Analisis Kuantitatif Astaxanthin

Estimasi kadar astaxanthin pada ekstrak ditentukan dengan metode pendekatan (estimasi) menggunakan spektrofotometer dengan λ maksimum 490 nm. Estimasi kadar astaxanthin (mg/L) dihitung dengan rumus menurut Davies (1976) dalam Boussiba dan Vonshak (1991), Zhao dkk (2018) dan Zheng dkk (2017) sebagai berikut:

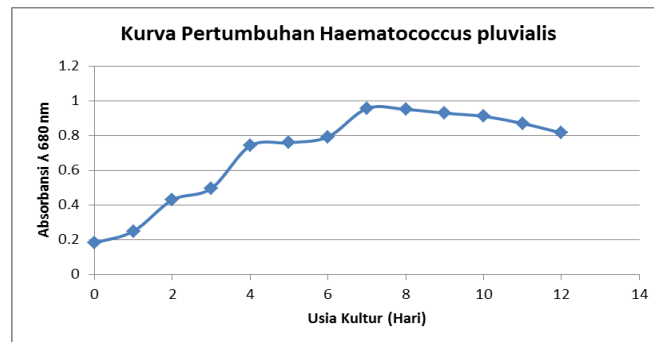
$$C \text{ (mg/L)} = 4,5 \times A_{490} \times \frac{V_a}{V_b}$$

Keterangan

- V_a : Volume DMSO (ml)
- V_b : Volume sampel sel mikroalga (ml)
- A₄₉₀ : Absorbansi ekstrak pada λ 490 nm
- C : Konsentrasi astaxanthin pasca induksi (mg/L)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kurva Pertumbuhan



Gambar 1. Kurva Pertumbuhan *H. pluvialis*

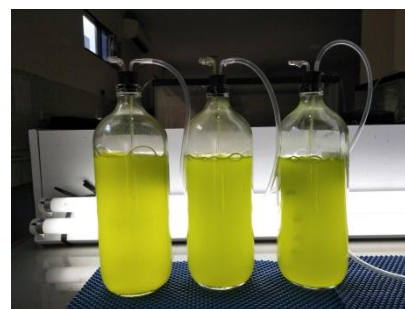
Fase pertumbuhan logaritmik (*log phase*) terjadi sejak awal usia kultur. Pada awal usia kultur, terlihat secara makroskopis kultur masih berwarna bening seperti pada gambar 2. Fase logaritmik merupakan fase dimana sel membelah dengan cepat sehingga terjadi penambahan jumlah sel. Pada akhir fase logaritmik yaitu pada hari ke-7, terlihat secara makroskopis kultur sudah berwarna hijau seperti pada gambar 3, dan pada hari tersebut dilakukan induksi stres dengan tujuan agar semakin banyak jumlah sel mikroalga yang mengakumulasi astaxanthin. Sejalan dengan penelitian Shang dkk (2016), induksi stres yang dilakukan pada akhir fase logaritmik menghasilkan kadar astaxanthin lebih tinggi dibandingkan dengan induksi stres yang dilakukan pada fase lainnya.

Fase penurunan laju pertumbuhan terjadi pada usia kultur hari ke-8, merupakan fase dimana tetap terjadi penambahan jumlah sel, namun laju pertumbuhannya mengalami penurunan. Hal ini terjadi karena adanya kompetisi yang tinggi dalam media kultur, dimana zat makanan yang tersedia tidak sebanding dengan jumlah sel, sehingga hanya sebagian sel yang mendapatkan makanan yang cukup dan dapat melangsungkan kehidupannya (Wijoseno, 2011).

Fase *stationer* terjadi pada usia kultur 8 sampai dengan 10 hari, merupakan fase dimana terjadi pemberhentian pertumbuhan. Pada fase ini jumlah sel kurang lebih adalah tetap. Hal ini disebabkan karena habisnya nutrisi dalam media atau karena menumpuknya hasil metabolisme yang beracun, sehingga mengakibatkan pertumbuhan mikroalga terhenti (Wijoseno, 2011).



Gambar 2. Kultur *H. pluvialis* pada hari ke-0



Gambar 3. Kultur *H. pluvialis* pada hari ke-7

Ekstraksi

Pada penelitian ini, telah dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut organik Dimetil Sulfoksida (DMSO). DMSO merupakan pelarut polar aprotik yang dapat melarutkan senyawa polar ataupun nonpolar. Ekstraksi dengan menggunakan pelarut DMSO disebut juga sebagai metode ekstraksi "*sucking process*" atau ekstraksi dengan proses menghisap karena DMSO dapat meningkatkan permeabilitas dinding sel mikroalga *H. pluvialis* yang tebal dan dapat berpenetrasi baik

tanpa merusak dinding selnya (Wang dkk., 2018). Selain itu, menurut literatur yang membandingkan jenis pelarut organik untuk ekstraksi astaxanthin, DMSO adalah pelarut yang dapat menghasilkan ekstrak dengan kandungan astaxanthin yang cukup tinggi, yaitu $66,64 \pm 0,61\%$ (Sarada dkk., 2006). Sebelum dilakukan proses ekstraksi, telah dilakukan tahapan saponifikasi dengan penambahan larutan KOH 5% (w/v) dalam metanol 30% (v/v). Saponifikasi ini dilakukan dengan tujuan untuk menghilangkan klorofil yang semula bersifat lipofilik. Penambahan alkali seperti KOH pada klorofil akan menyebabkan perubahan klorofil menjadi *chlorophyllin* dan *phytol* yang sifatnya cenderung lebih lipofobik (Ferruzzi dan Blakeslee, 2007). Berdasarkan reaksi saponifikasi ini, klorofil akan dengan mudah terpisah dari senyawa biokimia lain yang sifatnya lipofilik. Sehingga dengan perlakuan ini, supernatan akan terlihat berwarna hijau dan pelet terlihat berwarna kuning hingga jingga seperti pada gambar 4.

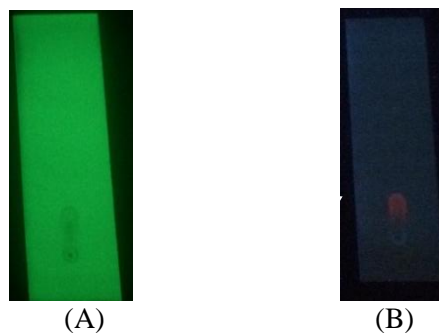


Gambar 4. Supernatan yang diduga mengandung klorofil

Tahapan saponifikasi ini harus dilakukan jika akan mengukur kadar karotenoid dengan menggunakan instrumen spektrofotometer. Hal ini dikarenakan pada daerah serapan karotenoid terdapat pula serapan klorofil, yaitu pada panjang gelombang maksimum 440-490 nm (Li dkk., 2016). Sehingga jika klorofil tidak dihilangkan, maka akan mengganggu pengukuran kadar senyawa karotenoid.

Pemantauan Supernatan

Pemantauan supernatan yang diduga mengandung klorofil dilakukan dengan menggunakan KLT *silica gel* 60 F₂₅₄ dengan fase gerak n-heksana-aseton-asam format (4:2:10 tetes). Hasil kromatogram dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Hasil kromatogram ekstrak yang mengandung klorofil dengan fase diam *silica gel* 60 F₂₅₄; fase gerak n-heksana-aseton-asam format (4:2:10 tetes) (A) Sinar UV λ 254 nm (B) Sinar UV λ 365 nm

Berdasarkan hasil yang didapatkan pada gambar 5, terlihat bercak yang berpendar berwarna merah yang terlihat pada plat KLT dengan penampak bercak lampu UV 365 nm. Menurut Francis (2000), klorofil dan semua derivat klorofil akan menunjukkan warna merah yang berpendar jika dilihat dengan penampak bercak lampu UV. Tahapan ini dilakukan untuk mengkonfirmasi bahwa pada supernatan tersebut benar telah mengandung klorofil, sehingga klorofil sudah hilang dalam pelet mikroalga dan tidak akan mengganggu pengukuran senyawa karotenoid.

Analisis Kuantitatif Astaxanthin

Pada penelitian ini, penentuan profil estimasi kadar astaxanthin diukur hanya dari hasil ekstraksi pelet yang pertama. Namun sebelumnya, terlebih dahulu telah dilakukan pengukuran absorbansi pada ekstrak hasil ekstraksi ke-1, ke-2 dan ke-3 seperti yang terdapat pada gambar 6. Hasil pengukuran menunjukkan nilai absorbansi yang jauh berbeda pada panjang λ 490 nm antara hasil ekstraksi ke-1, ke-2 dan ke-3 seperti yang terdapat pada tabel 1.



Gambar 6. Ekstrak hasil ekstraksi ke-1, ke-2 dan ke-3

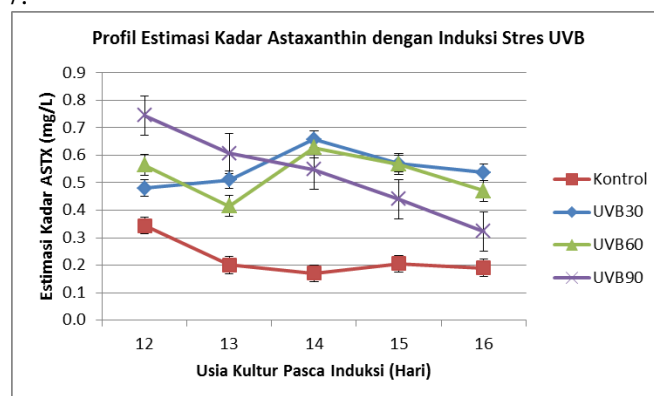
Tabel 1. Nilai Absorbansi Ekstrak pada λ 490 nm

Ekstraksi ke-	Absorbansi
1	0,274
2	0,070
3	0,080

Profil Estimasi Kadar Astaxanthin dengan Induksi Radiasi UV-B

Menurut Xu dkk (2008), radiasi UV-A (320-400 nm) dan radiasi UV-B (280-315 nm) dapat menginduksi produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) pada sejumlah mikroalga dan juga tanaman. Akan tetapi mikroalga dan tanaman memiliki dua jenis antioksidan yang diproduksi untuk mengurangi kerusakan akibat ROS yang diinduksi UV. Diantaranya adalah antioksidan enzimatik seperti superoksida dismutase (SOD), *catalase* (CAT), *glutathione* peroxidase (GPx) dan antioksidan non-enzimatik seperti karotenoid dan flavonoid. Pada mikroalga *H. pluvialis*, akumulasi astaxanthin merupakan respon untuk melindungi diri dari kondisi stres oksidatif (Kindlund, 2011).

Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan profil estimasi kadar astaxanthin dengan induksi radiasi UV-B seperti pada gambar 7.



Gambar 7. Profil estimasi kadar astaxanthin dengan induksi radiasi UV-B

Berdasarkan gambar 7, dapat dilihat bahwa terjadi peningkatan estimasi kadar astaxanthin pada kultur dengan perlakuan induksi radiasi UV-B dibandingkan dengan kontrol negatif. Hal ini sejalan dengan penelitian Zhengyun dkk (2010), bahwa induksi stres UV-B dapat meningkatkan kadar astaxanthin.

Peningkatan estimasi kadar astaxanthin tertinggi umumnya terdapat pada hari ke-14 pasca induksi stres. Namun pada perlakuan induksi stres UV-B dengan waktu keterpaparan 90 menit, peningkatan estimasi kadar astaxanthin tertinggi terjadi lebih cepat, yaitu pada hari ke-12 pasca induksi stres. Hal ini terjadi diduga karena dengan waktu keterpaparan radiasi UV-B 90 menit menyebabkan akumulasi astaxanthin lebih cepat karena banyaknya produksi radikal bebas pada mikroalga.

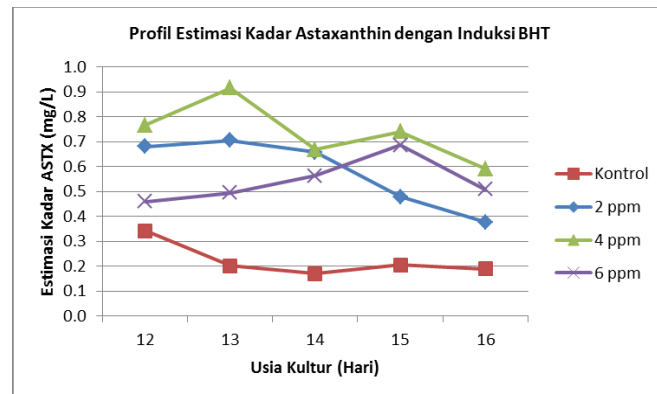
Pada perlakuan induksi stres radiasi UV-B dengan waktu keterpaparan yang berbeda, didapatkan hasil bahwa radiasi UV-B dengan waktu ketepaparan 90 menit menghasilkan estimasi kadar astaxanthin tertinggi pada hari ke-12 pasca induksi, yaitu 0,745 mg/L. Berdasarkan hasil uji *post hoc* dengan analisis LSD, menunjukkan bahwa estimasi kadar astaxanthin hari ke-12 dengan waktu keterpaparan UV-B 90 menit, memiliki perbedaan yang bermakna jika dibandingkan dengan kontrol pada hari yang sama ($p < 0,05$).

Pada perlakuan radiasi UV-B dengan waktu keterpaparan 30 menit dan 60 menit menunjukkan estimasi kadar astaxanthin yang lebih rendah dari pada perlakuan keterpaparan 90 menit. Hal ini

diduga waktu keterpaparan UV-B pada waktu tersebut belum cukup untuk menimbulkan kondisi cekaman pada mikroalga *H. pluvialis*.

Profil Estimasi Kadar Astaxanthin dengan Induksi Penambahan BHT

BHT (*Butylated Hidroxytoluene*) merupakan antioksidan yang dapat menurunkan *Reactive Oxygen Species* (ROS), namun meningkatkan pula NO (*Nitrit Oxyde*) pada mikroalga *H. pluvialis*. Sehingga dengan tingginya kadar NO pada mikroalga, akan menstimulasi akumulasi astaxanthin (Zhao dkk., 2018).

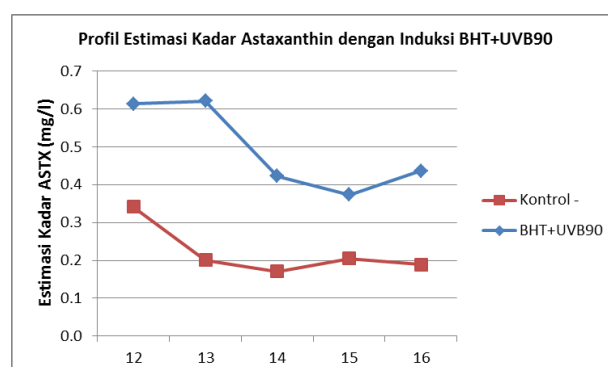


Gambar 8. Profil estimasi kadar astaxanthin dengan induksi BHT

Berdasarkan gambar 8, dapat dilihat bahwa terjadi peningkatan estimasi kadar astaxanthin pada kultur dengan perlakuan induksi penambahan BHT dibandingkan dengan kontrol negatif. Hal ini sejalan dengan penelitian Zhao dkk (2018), bahwa induksi stres dengan penambahan BHT dapat meningkatkan kadar astaxanthin.

Pada perlakuan induksi stres penambahan BHT dengan konsentrasi yang berbeda, didapatkan hasil bahwa penambahan BHT dengan konsentrasi 4 ppm menghasilkan estimasi kadar astaxanthin tertinggi pada hari ke-13 pasca induksi, yaitu 0,916 mg/L. Berdasarkan hasil uji *post hoc* dengan analisis LSD, menunjukkan bahwa estimasi kadar astaxanthin hari ke-13 dengan penambahan BHT konsentrasi 4 ppm, memiliki perbedaan yang bermakna jika dibandingkan dengan kontrol pada hari yang sama ($p < 0,05$). Pada penambahan BHT dengan konsentrasi 2 ppm dan 6 ppm menghasilkan estimasi kadar astaxanthin lebih rendah dari pada penambahan BHT dengan konsentrasi 4 ppm. Diduga pada konsentrasi 2 ppm belum cukup untuk menimbulkan kondisi cekaman pada mikroalga *H. pluvialis*. Kemudian pada konsentrasi 6 ppm diduga kadar tersebut terlalu tinggi dan menyebabkan akumulasi radikal bebas yang berlebih sehingga menghambat keberlangsungan hidup dari mikroalga *H. pluvialis* dan berdampak pada akumulasi astaxanthin yang lebih rendah. Menurut Zhao dkk (2018), penambahan kadar BHT yang terlalu tinggi dapat menyebabkan efek sitotoksik pada sel mikroalga.

Profil Estimasi Kadar Astaxanthin dengan Kombinasi Induksi Stres



Gambar 9. Profil Estimasi kadar astaxanthin dengan kombinasi induksi stres

Berdasarkan gambar 9, dapat dilihat bahwa terjadi peningkatan estimasi kadar astaxanthin pada usia kultur ke-13 dibandingkan dengan kontrol negatif. Peningkatan estimasi kadar astaxanthin tertinggi terdapat pada hari ke-13 pasca kombinasi induksi stres, yaitu 0.621 mg/L. Menurut Zahra (2017), kadar astaxanthin dapat ditingkatkan dengan penggunaan kombinasi dari dua faktor cekaman secara berkelanjutan. Pada penelitian ini telah dilakukan kombinasi cekaman (stres) dengan penambahan BHT dan radiasi UV-B. Namun pada penelitian ini, penggunaan kombinasi induksi stres dengan penambahan BHT dan radiasi UV-B tidak meningkatkan kadar astaxanthin lebih tinggi dari pada induksi stres tunggal.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa induksi stres secara fisika dengan radiasi UV-B, secara kimia dengan penambahan BHT dan kombinasi keduanya dapat meningkatkan produksi astaxanthin pada mikroalga *Haematococcus pluvialis*. Hasil uji menggunakan *One Way ANOVA* menunjukkan bahwa estimasi kadar astaxanthin dengan induksi fisika, kimia dan kombinasi keduanya memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Pada penelitian ini, perlakuan induksi stres secara kimia dengan BHT konsentrasi 4 ppm menghasilkan produksi astaxanthin tertinggi dibanding dengan induksi yang lainnya.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada Belmawa Ristekdikti yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Kreativitas Mahasiswa tahun 2019.

DAFTAR PUSTAKA

- Arifah, S., 2014. *Studi Kemampuan Nannochloropsis Sp. Dan Chlorella sp. sebagai Agen Bioremediasi Logam Berat Merkuri (Hg) dan Pengaruhnya terhadap Pertumbuhan*. Surabaya.
- Capelli, B., Baghci, D., Cysewsky, G., 2013. Synthetic Astaxanthin is Significantly Inferior to Algal-based Astaxanthin as an Antioxidant and may not be suitable as a Human Nutraceutical Supplement. *Nutrafoods*.
- Chekanov, K., Lobakova, E., Selyakh, I., Semenova, L., Sidorov, R., Solovchenko, A., 2014. Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the White Sea coastal rocks (Russia). *Marine Drugs*. 12, 4504–4520.
- Fakhri, S., Abbaszadeh, F., Dargahi, L., Jorjani, M., 2018. Astaxanthin: A Mechanistic Review on its Biological Activities and Health benefits. *Pharmacological Research*.
- Infant, S.B., Elumalai, S., Rajes, K.G., 2016. Antioxidant and Anti-skin Cancer Potential of a Ketocarotenoid pigment Astaxanthin Isolated from a Green Microalga *Haematococcus pluvialis* Flotow. *International Journal of Scientific & Engineering Research*. 7.
- Kindlund, P.J., 2011. Astaxanthin To Delay Skin Aging. *Nutra Foods*. 10, 27–31.
- Li, T., Xu, J., Wu, H., Wang, G., Dai, S., Fan, J., He, H., Xiang, W., 2016. A Saponification Method for Chlorophyll Removal from Microalgae Biomass as Oil Feedstock. 14, 162.
- Liu, J., Sun, Z., Gerken, H., Liu, Z., Jiang, Y., Chen, F., 2014. *Chlorella zofingiensis* as an Alternative Microalgal Producer of Astaxanthin: Biology and Industrial Potential. *Mar. Drugs*. 12, 3487–3515.
- Masojidek, J., Torzillo, G., 2014. Mass Cultivation of Freshwater Microalgae.
- Panis, G., Rosales Carreon, J., 2016. Commercial Astaxanthin Production Derived by Green Alga *Haematococcus pluvialis*: A Microalgae Process Model and a Techno-economic Assessment all through Production Line. 18, 175–190.
- Rohimawati, R., Marwani, E., 2017. Produktivitas Astaxanthin dari *Haematococcus pluvialis* pada Pemberian Konsentrasi Nitrogen Berbeda dalam Fotobioreaktor. 2, 1–5.
- Shah, M.M.R., Liang, Y., Cheng, J.J., Daroch, M., 2016. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Biological and Agricultural Engineering*. 7.
- Shang, M., Ding, W., Zhao, Y., Xu, J.W., Zhao, P., Li, T., Ma, H., Yu, X., 2016. Enhanced Astaxanthin Production from *Haematococcus pluvialis* using Butylated hydroxyanisole. *Journal of Biotechnology*. 236, 199–207.

- Wang, S., Meng, Y., Liu, J., Cao, X., Xue, S., 2018. Accurate Quantification of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using DMSO Extraction and Lipase-catalyzed Hydrolysis Pretreatment. *Alga Research*. 35, 427–431.
- Witono, J.R., Miryanti, A., Santoso, H., Kumalaputri, A.J., Novianty, V., Gunadi, A., 2018. Studi Awal Pertumbuhan dan Induksi Mikroalga *Haematococcus pluvialis*. *Jurnal Rekayasa Hijau*. 2, 275–281.
- Yu, X., Chen, L., Zhang, W., 2015. Chemicals to Enhance Microalgal Growth and Accumulation of High-value Bioproducts. *Frontiers in Microbiology*. 6.
- Zhao, Y., Yue, C., Ding, W., Li, T., Xu, J.W., Zhao, P., Ma, H., Yu, X., 2018. Butylated hydroxytoluene Induces Astaxanthin and Lipid Production in *Haematococcus pluvialis* under High-light and Nitrogen-deficiency conditions. *Bioresource Technology*.
- Zheng, Y., Li, Z., Tao, M., Jiancheng, L., Hu, Z., 2017. Effects of Selenite on Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: Bioaccumulation of Selenium and Enhancement of Astaxanthin Production. 183, 21–27.