

Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Lutein dari Mikroalga *Dunaliella salina* dengan Metode ASE (Accelerated Solvent Extraction)

Mochammad Fathurohman*, Shania Ulfa Oktaviani, Firman Gustaman, Anindita Tri Kusuma Pratita
Program Studi Farmasi, Universitas Bakti Tunas Husada, Tasikmalaya, Indonesia

*Corresponding author: mochamadfathurr@gmail.com

Abstract

*Microalgae are generally known as aquatic biota that can be used as bioindicators to see the quality of a body of water. Lutein is used as a food coloring, beverage and cosmetic. The purpose of this study is to characterize and test antioxidant activity. The extraction stages include microalgae cultivation, ase method wet biomass isolation, then extracted and characterized using an FTIR spectrophotometer. Based on the results of cultivation, the cell density of the *Dunaliella salina* microalgae for 14 days obtained a total cell density of 363×10^{-4} cfu / mL. On lutein extraction using a new extraction method using a mixture of KOH alcohol and dichloromethane to isolate and extract lutein from the microalgae *Dunaliella salina*. Lutein compounds from the microalgae *Dunaliella salina* can be isolated using the ASE (Accelerated Solvent Extraction) method. The results of the characterization of the lutein mikroalga *dunaliella salina* compound using the FTIR spectrophotometer showed the presence of hydroxyl, alkyl, alkene, and alkenyl groups. The content of antioxidant activity in the lutein extract of the microalgae *Dunaliella salina* is moderate with an IC_{50} value of 108.9542 ppm while in vitamin C with a concentration of 2.20078 ppm.*

Keywords: ASE; *Dunaliella salina*; FTIR; Lutein; Mikroalga.

Abstrak

Mikroalga secara umum diketahui sebagai biota air yang dapat dijadikan sebagai bioindikator untuk melihat kualitas suatu perairan. Lutein digunakan sebagai pewarna makanan, minuman dan kosmetik. Tujuan dari penelitian ini mengkarakterisasi dan menguji aktivitas antioksidan. Tahapan ekstraksi meliputi kultivasi mikroalga, isolasi biomassa basah metode ASE, kemudian diekstraksi dan dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer FTIR. Berdasarkan hasil kultivasi, kepadatan sel mikroalga *Dunaliella salina* selama 14 hari didapatkan total kepadatan sel yaitu 363×10^{-4} cfu/mL. Pada ekstraksi lutein dengan menggunakan sebuah metode ekstraksi baru yang menggunakan campuran KOH alkohol dan diklorometana untuk mengisolasi dan mengekstrak lutein dari mikroalga *Dunaliella salina*. Senyawa lutein dari mikroalga *Dunaliella salina* dapat diisolasi menggunakan metode ASE (Accelerated Solvent Extraction). Hasil karakterisasi senyawa lutein mikroalga *Dunaliella salina* menggunakan spektrofotometer FTIR menunjukkan adanya gugus hidroksil, alkil, alkena, dan alkenil. Kandungan aktivitas antioksidan pada ekstrak lutein mikroalga *Dunaliella salina* yaitu sedang dengan nilai IC_{50} 108,9542 ppm sedangkan pada vitamin C dengan konsentrasi 2,20078 ppm.

Kata Kunci: ASE; *Dunaliella salina*; FTIR; Lutein; Mikroalga.

PENDAHULUAN

Keragaman hayati (*biodiversity* atau *biological diversity*) merupakan istilah yang digunakan untuk menggambarkan kekayaan berbagai bentuk kehidupan di bumi ini mulai dari organisme bersel tunggal sampai organisme tingkat tinggi. Keragaman hayati mencakup keragaman habitat, keragaman spesies (jenis) dan keragaman genetik (variasi sifat dalam spesies) (Siboro, 2019).

Pemanfaatan mikroalga sebagai bahan pangan dinilai efektif, karena selain sumber pangan alternatif juga kandungan zat gizi mikroalga sangat baik bagi kesehatan. Mikroalga mempunyai potensi besar untuk menghasilkan berbagai senyawa biokimia penting untuk makanan, pengobatan medis, penelitian, dan pemanfaatan lain dan masih banyak senyawa biokimia penting yang belum

ditemukan dari mikroalga (Syahrul & Dewita, 2016).

Nutraceuticals merupakan produk makanan yang secara bersamaan dapat memberikan nutrisi dan manfaat farmasi bagi tubuh seperti pencegahan dan pengobatan penyakit. *Nutraceuticals* dapat berupa produk makanan utuh atau suplemen makanan di mana senyawa *nutraceutical* dapat dikonsentrasikan untuk memberikan manfaat kesehatan yang diklaim (Alsenani *et al.*, 2015).

Lutein merupakan pigmen tumbuhan yang termasuk dalam kelompok karotenoid yang terkenal. Lutein dengan β -karoten, salah satu karotenoid yang paling banyak didistribusikan dalam buah-buahan dan sayuran yang sering dikonsumsi oleh populasi yang berbeda (Granado *et al.*, 2010). Karena lutein warna kuning yang intens, maka banyak digunakan sebagai pewarna makanan alami (Ochoa Becerra *et al.*, 2020).

Lutein digunakan untuk pewarnaan jaringan hewan dan produknya, selain itu sebagai pewarna makanan, minuman dan kosmetik. Lutein telah dilaporkan mempunyai aktifitas antioksidan dan mampu menghambat berbagai penyakit seperti penyakit kardiovaskular. Lutein dapat menstimulasi respon imun, mampu menghambat perkembangan katarak, perkembangan awal aterosklerosis, juga menghambat terjadinya kebutaan atau menurunnya penglihatan yang disebabkan faktor bertambahnya usia (Kusmiati *et al.*, 2015).

Metode pemisahan atau metode isolasi untuk metabolit sekunder lutein dari mikroalga tersebut yaitu menggunakan metode ASE (*Accelerated Solvent Extraction*) dengan menggunakan campuran pelarut alkohol KOH, dan CH_2Cl_2 (Kamal *et al.*, 2013) kemudian dikarakterisasi oleh Spektrofotometer FTIR dan diuji aktivitas antioksidannya menggunakan Spektrofotometer UV-Vis (Kamal *et al.*, 2013). Dalam penelitian (Kusmiati *et al.*, 2015) Senyawa lutein berhasil diisolasi dari bunga kenikir lokal (*Tagetes*

erecta L.) dengan rendemen sebesar 5,26% dan ekstrak lutein sebanyak 32,23%. Analisis dengan spektrofotometer cahaya tampak menunjukkan adanya gugus kromofor terkonjugasi dengan λ max pada 447 nm (Kusmiati *et al.*, 2015).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah mikroalga *Dunaliella salina*, bahan lainnya seperti Na_2EDTA , KNO_3 , Na_2SiO_3 , FeCl_3 , NaCl , KCl , CaCl_2 , MgCl_2 , NaHCO_3 , TSP, aqua DM, alkohol, kalium hidroksida (KOH), metilen klorida (CH_2Cl_2), asam askorbat, methanol p.a 96%, dan DPPH.

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah botol kultur 1000 mL, alat gelas (Pyrex), lampu, selang, aerator (Sea star), mikroskop binokuler (Yazumi), sentrifugator (Hole Oregon), pH meter (Mediatech digital), neraca analitik (Shimadzu), botol semprot, tube effendorf, kertas saring, autoklaf (Bio base), kuvet, *waterbath* (Mettler), mikro pipet (Toppette-Nesco), instrument spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu) dan FTIR (Agilent).

Metode

Pembuatan air laut buatan (ALB)

Untuk membuat 1 liter air laut buatan, dapat dilakukan dengan menimbang terlebih dahulu 24,6 gram natrium klorida (NaCl); 0,6 g kalium klorida (KCl); 1,36 g kalsium klorida (CaCl_2); 6,2 g magnesium sulfat atau garam Inggris (MgSO_4); 4,66 g magnesium klorida (MgCl_2) dan 0,18 g dan natrium bikarbonat (NaHCO_3), kemudian dilarutkan dalam aquadest. Dilarutkan seluruh bahan sampai homogen, kemudian saring larutan tersebut sampai terbebas dari partikel atau kotoran (Julianti *et al.*, 2018).

Pembuatan media pertumbuhan

Larutan medium pertumbuhan mikroalga dapat dibuat dengan menimbang 33 g FeCl_2 dengan 35 g Na_2EDTA ; Dextrose; 84 g KNO_3 ; 54 g TSP dengan 18,9 g EDTA dan urea

kemudian dilarutkan dalam 1 L aquadest (Primaryadi *et al.*, 2015).

Kultivasi mikroalga

Kultivasi mikroalga dibuat dengan 2 batch menggunakan botol kaca 1 liter. Siapkan larutan medium pertumbuhan (FeCl_3 , KNO_3 , Na_2SiO_3 , pupuk TSP) yang telah dibuat. Setelah itu larutkan garam krosok dalam air sampai sanilitasnya mencapai 22-24 ppt. Masukkan 450 mL larutan garam 22-24 ppt ke dalam botol kaca 1 L. Kemudian siapkan air laut buatan (ALB) yang telah dibuat dengan sanilitas 22-24 ppt sebanyak 450 mL ke dalam botol 1 L. Lalu sterilkan medium pertumbuhan, larutan garam dan air laut buatan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Biarkan larutan garam, air laut buatan dan medium pertumbuhan mencapai suhu ruang. Setelah itu masukkan 1,8 mL FeCl_3 , 18 mL KNO_3 , 1,65 mL Na_2SiO_3 , dan 2,4 mL pupuk TSP ke dalam masing-masing botol. Masukkan 450 mL indukan mikroalga ke dalam campuran garam dan medium pertumbuhan. Atur tingkat aerasi pada inokulan dan amati pertumbuhan selama 14 hari (Julianti *et al.*, 2018).

Isolasi biomassa basah

Setelah kultivasi yang dilakukan selama 14 hari matikan aerasi dan biarkan mikroalga mengendap selama 1 malam (skala besar), kemudian pisahkan endapan mikroalga dengan membuang larutan media pertumbuhan dan lanjutkan dengan sentrifugasi endapan dengan 4000 rpm dengan ± 5 menit. Kemudian simpan pellet hasil sentrifugasi pada pendingin bersuhu 4°C (Julianti *et al.*, 2018).

Isolasi senyawa lutein murni metode ASE

Sebanyak 10 g sampel kering mikroalga dihomogenkan dengan dimetilen klorida (CH_2Cl_2) sebanyak 100 mL dan etanol 10 %, KOH sebanyak 25 mL pada suhu kamar. Selama proses ekstraksi, ditambahkan 10 mL KOH, etanol 10% untuk mempertahankan pH pada 12. Setelah 2 jam campuran disaring dan padatan dicuci dengan etanol 35% sampai diperoleh ekstrak yang jernih. Pelarut

diuapkan dibawah tekanan tereduksi pada sekitar 40°C hingga kering dan padatan diaduk pada suhu kamar dengan larutan etanol 85% selama 10 menit. Lutein diendapkan dari campuran pelarut dengan pengenceran konsentrasi etanol dalam fase air menjadi 8,5 dari 85% dengan air suling. Larutan yang dihasilkan disaring untuk mengisolasi lutein kasar berwarna kuning-oranye (Kamal *et al.*, 2013).

Karakterisasi menggunakan instrument spektrofotometer fourier transform infrared (FTIR)

Isolat diidentifikasi menggunakan FTIR untuk melihat gugus fungsi senyawa yang terdapat didalam ekstrak lutein dari mikroalga *Dunaliella salina*. Sampel dimasukkan ke dalam wadah dan dianalisa menggunakan alat FTIR. (Kusmiati & Agustini, 2012)

Uji aktivitas antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dari ekstrak Mikroalga *Dunaliella salina* dilakukan menggunakan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) dengan asam askorbat sebagai kontrol positif.

a. Pembuatan Larutan DPPH

Pembuatan larutan stok DPPH, dilakukan dengan cara menimbang 50 mg DPPH, kemudian dilarutkan dalam 50 ml metanol p.a sehingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm. Kemudian diecncerkkan dengan konsentrasi 30 ppm (Sadeli, 2016).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan DPPH dengan konsentrasi 30 ppm di pipet sebanyak 1 mL dimasukkan kedalam kuvet, selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi maksimum pada Panjang gelombang 200-800 nm. Konsentrasi DPPH dibuat sedemikian rupa sehingga diperoleh absorbansi dan panjang gelombang maksimum antara 0,2-0,8 untuk mengurangi kesalahan fotometrik (Sadeli, 2016).

c. Penentuan Operating Time

Larutan induk asam askorbat dengan konsentrasi 1000 ppm diambil sebanyak 1 ml lalu ditambahkan 1 mL larutan stok DPPH 30

ppm dan ditambahkan 3 mL metanol p.a. selanjutnya dikocok sampai homogen, kemudian diukur Panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari selang waktu setiap 2 menit selama 60 menit. *operating time* ini ditentukan dari absorbansi yang paling tinggi dan stabil (Sadeli, 2016).

d. Pembuatan Larutan Uji

- Pembuatan larutan induk (konsentrasi 1000 ppm)

Sebanyak 50 mg sampel ekstrak mikroalga *Dunaliella salina* dimasukkan kedalam labu ukur 50 mL, kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas. Sehingga diperoleh konsentasi sampel 1000 ppm sebagai larutan induk.

- Pembuatan larutan seri

Larutan induk sampel 1000 ppm, di encerkan pada konsentrasi 100, 125, 150, 175, 200 ppm. Kemudian dilarutkan dengan menggunakan metanol p.a dalam labu ukur 5 mL sampai tanda batas, kemudian kocok sampai homogen.

- Pengujian

Sebanyak 1 ml sampel dari masing-masing seri konsentrasi yang telah dibuat, ditambahkan larutan DPPH sebanyak 1 mL, kemudian campuran tersebut dimasukan kedalam vial dan di inkubasi selama rentang waktu yang diperoleh dari *operating time* pada pengujian sebelumnya, lalu diukur absorbansinya (Sadeli, 2016).

e. Pembuatan Larutan Vitamin C

- Pembuatan larutan induk (konsentrasi 1000 ppm)

Sebanyak 50 mg vitamin C dimasukan kedalam labu ukur 50 mL, kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sampai tanda batas. Sehingga di peroleh konsentrasi larutan 1000 ppm sebagai larutan induk.

- Pembuatan larutan seri Masing-masing larutan induk asam askorbat 10 ppm, di encerkan pada konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5 ppm. Kemudian dilarutkan dengan menggunakan metanol p.a dalam labu ukur

5 ml sampai tanda batas, kemudian kocok sampai homogen.

- Pengujian

Sebanyak 1 mL vitamin c dari masing-masing seri konsentrasi yang telah dibuat, ditambahkan larutan DPPH 30 ppm sebanyak 1 mL, kemudian campuran tersebut dimasukan kedalam vial dan di inkubasi selama rentang waktu yang diperoleh dari *operating time* pada pengujian sebelumnya, lalu diukur absorbansi Panjang gelombang maksimal (Sadeli, 2016).

f. Penentuan % Inhibisi

Aktivitas penangkal radikal bebas dapat dilihat dari persen inhibisi yang dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs Kontrol (DPPH)} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs Kontrol (DPPH)}} \times 100\%$$

g. Penentuan Nilai IC₅₀ (*Inhibitory concentration*)

Perhitungan nilai IC₅₀ diperoleh dengan membuat persamaan garis regresi linier yang menghubungkan antara % inhibisi terhadap konsentrasi larutan uji tiap sampel sehingga didapatkan persamaan $y = bx + a$. Nilai y diganti dengan angka 50, sehingga didapatkan nilai x yang menunjukkan nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ menggambarkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat 50% oksidasi (Rohiyati *et al.*, 2020).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultivasi mikroalga *Dunaliella salina*

Tujuan dari kultivasi mikroalga yaitu untuk memperbanyak jumlah sel mikroalga untuk mendapatkan biomassa yang sesuai dengan apa yang diharapkan. (Herawati *et al.*, 2014) Pertumbuhan dari mikroalga *Dunaliella salina* dapat digambarkan dengan kepadatan sel yang dihitung setiap hari selama 14 hari masa kultivasi menggunakan alat *haemocytometer*. Berdasarkan hasil kultivasi, kepadatan sel mikroalga *Dunaliella salina* selama 14 hari didapatkan total kepadatan sel yaitu 363×10^{-4} cfu/mL (Fathurohman *et al.*, 2021). Untuk pengukuran kepadatan *Dunaliella salina* dilakukan dengan cara pengambilan 1 mL media kultur dari botol bervolume 1000 mL,

kemudian diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 10x10. Kemudian dihitung kepadatan *Dunaliella salina* pada 4 kotak yang terlihat pada haemocytometer, jumlah *Dunaliella salina* yang terhitung dikalikan 10^4 . Jumlah kepadatan sel dihitung dengan menggunakan rumus dibawah ini:

Kepadatan sel (sel/ml) $N = \text{Jumlah total sel} \times 10^4$.

Kepadatan mikroalga merupakan salah satu parameter pertumbuhan yang dapat digunakan sebagai acuan untuk mengetahui apakah mikroalga tersebut tumbuh atau tidak. Pada fase lag kepadatan sel *Dunaliella salina* relatif sedikit karena masih beradaptasi dengan lingkungan (Fathurohman *et al.*, 2021). Pada fase eksponensial perbedaan kepadatan semakin terlihat signifikan. Fase stasioner pada semua perlakuan tidak terlihat dikarenakan perhitungan kepadatan sel yang hanya dilakukan 1 kali sehari dan fase stasioner terjadi sangat singkat, fase stasioner merupakan akhir dari produksi biomasa sel. Setelah melewati fase stasioner terjadi penurunan jumlah kepadatan sel yang disebut fase kematian, hal ini dikarenakan kandungan nutrisi pada media kultur berada dalam jumlah yang terbatas, menambahkan kandungan nutrisi pada awal kultur yang masih tinggi dimanfaatkan oleh masing-masing sel untuk melakukan pertumbuhan (Febriani *et al.*, 2020). Peningkatan jumlah sel akan terhenti pada satu titik puncak populasi (fase eksponensial), pada fase ini kebutuhan nutrisi akan semakin besar, sedangkan tidak adanya penambahan nutrisi selama masa kultur berlangsung sehingga menyebabkan penurunan jumlah sel dalam waktu yang lebih cepat. Penurunan kepadatan sel juga dapat disebabkan beberapa faktor seperti salinitas dan intensitas cahaya (Febriani *et al.*, 2020).

Fungsi kalium yaitu sebagai mikronutrien dan mempunyai peran dalam pembentukan sel, klorida berperan dalam proses fotosintesis. Magnesium klorida dalam kultivasi mempunyai peran sebagai zat pembentuk klorofil dan pengatur penyerapan unsur lain seperti fosfor

dan kalium. Kemudian, bikarbonat memiliki peran dalam proses fotosintesis dan respirasi seluler mikroalga (Fathurohman *et al.*, 2021).

Nitrogen memiliki peran sebagai nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroalga yaitu sebagai pembentukan klorofil dan protein. Penambahan Na_2EDTA pada Fe bertujuan agar Fe bertahan dalam kondisi pH yang bervariasi, sehingga tetap bisa dipakai meskipun dalam jangka waktu lama, EDTA (*etilenediamine tetraacetic acid*) dalam hal ini disebut buffer pH sekaligus chelating agent untuk menstabilkan FeCl_3 karena hanya larut dalam suasana asam. TSP (*Triple Super Fosfat*) merupakan pupuk anorganik yang mengandung banyak senyawa fosfat, pupuk TSP ini di gunakan sebagai makronutrien untuk pertumbuhan bagi mikroalga. Fosfat merupakan makronutrien utama yang memiliki peran dalam proses metabolisme sel pada mikroalga, untuk pembentuk komponen struktural dan fungsional yang diperlukan oleh sel mikroalga untuk pertumbuhan dan perkembangannya (Febriani *et al.*, 2020).

Dari hasil pengamatan nilai salinitas yang didapat sebesar 22 ppt, berdasarkan literatur nilai salinitas berada pada kisaran 20-30 ppt, nilai salinitas yang terlalu tinggi ataupun rendah akan mempengaruhi proses metabolisme sel pada pertumbuhan mikroalga tersebut. Salinitas merupakan salah satu sifat kimia air yang secara langsung maupun tidak langsung dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. pH yang diperoleh selama penelitian yaitu 7 sesuai dengan pH pertumbuhan mikroalga pada umumnya. pH atau derajat keasaman ini menjadi faktor pembatas bagi pertumbuhan fitoplankton sehingga memiliki ambang batas untuk mendapatkan pertumbuhan optimal mikroalga. Pada penelitian (Febriani *et al.*, 2020) menyatakan bahwa pH 6-9 merupakan kisaran pH terbaik untuk pertumbuhan fitoplankton. Nilai pH selama proses kultur terus mengalami peningkatan dari hari pertama sampai akhir pengamatan. Peningkatan ini disebabkan karena adanya peningkatan jumlah sel dalam kultur oleh aktivitas reaksi antara CO_2 dan air.

Reaksi tersebut menghasilkan bikarbonat (HCO_3) yang dapat menyebabkan air bersifat lebih basa. Salinitas yang optimum untuk pertumbuhan *Dunaliella salina* yaitu antara 30-38 ppt, namun pada salinitas yang tinggi *Dunaliella salina* mampu memproduksi karotenoid sebagai bentuk pertahanan diri (Febriani *et al.*, 2020).

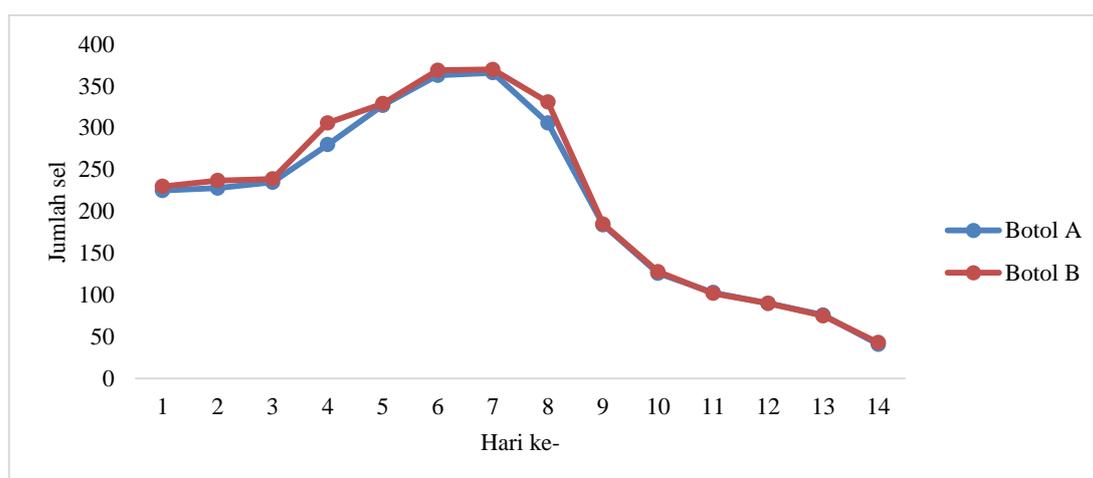
Pada pertumbuhan mikroalga hari ke-0 termasuk ke dalam fase adaptasi sehingga belum menunjukkan adanya pertumbuhan karena sel dari mikroalga belum mengalami pembelahan sel dan adaptasi pada lingkungan yang baru. Fase adaptasi yang merupakan fase penyesuaian diri sel terhadap kondisi lingkungan yang baru hal ini ditandai dengan masih lambatnya pembelahan sel. Selanjutnya fase eksponensial terjadi pada hari ke-3 hingga ke-5 pada fase ini sel telah berhasil beradaptasi, melakukan pembelahan dan optimal dalam pemanfaatan. Pada hari ke 6-7 pertumbuhan populasi dari mikroalga masuk ke dalam fase stasioner hal ini ditandai dengan laju pertumbuhan yang konstan dan terjadi kematian, hal ini dikarenakan meningkatnya akumulasi hasil metabolisme dan keterbatasan nutrisi pada media. Kemudian fase kematian terjadi mulai hari ke-8 sampai hari ke-14 terjadinya penurunan

jumlah sel karena seluruh sel secara alami mengalami kematian selain itu juga ada faktor yang dapat mempercepat fase kematian dari mikroalga yaitu dengan berkurangnya ketersediaan nutrisi untuk makanan dari mikroalga dan juga ada metabolit sekunder mikroalga yang dapat menghambat pertumbuhan sel secara alami. (Faith Dibri Kimberly, Endang Supriyantini, 2019).

Isolasi biomassa basah

Tujuan isolasi biomassa basah tersebut adalah dilakukannya pemisahan antara biomassa yang didapatkan dengan larutan media pertumbuhan, teknik pengambilannya sendiri menggunakan teknik sentrifugasi setelah dilakukan kultivasi selama 14 hari, aerator pada proses kultivasi dilepas, hasil dari kultivasi di

diamkan selama satu malam untuk mengendapkan biomassa sehingga lebih mudah memisahkan antara media pertumbuhan dengan biomassa. Sentrifugasi sampel dilakukan selama 5 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan hasil endapan mikroalga *Dunaliella salina* pada botol A sebanyak 7,6 g dan botol B sebanyak 6,4 g.



Gambar 1 Fase pertumbuhan mikroalga

Ekstraksi lutein

Accerelated Solvent Extraction (ASE) umumnya digunakan pada suhu mulai dari 50 hingga 200°C dan pada tekanan antara 100 dan 150 bar. Oleh karena itu, ekstraksi pelarut yang dipercepat merupakan bentuk ekstraksi pelarut bertekanan (Charland *et al.*, 2021). Pada ekstraksi lutein dengan menggunakan sebuah metode ekstraksi baru yaitu ASE (*Accerelated Solvent Extraction*) dimana sampel di autoklaf terlebih dahulu untuk mensterilkan biomassa yang akan digunakan adapun prinsipnya adalah memanfaatkan keringanan uap dibandingkan dengan udara, sehingga udara terletak di bawah uap. Metode ekstraksi ini menggunakan campuran KOH alkohol dan diklorometana untuk mengisolasi dan mengekstrak lutein dari mikroalga (Kamal *et al.*, 2013). Diklorometana dipilih karena kelarutan lutein yang sangat baik dalam pelarut ini, pelarut diklorometana memiliki sifat lebih polar dibandingkan pelarut lain. Setelah ekstraksi lutein, etanol 85% dipilih untuk mendapatkan lebih banyak lutein, fungsi dari penambahan etanol yaitu untuk melarutkan lemak atau minyak dalam sampel dan untuk menghilangkan sejumlah besar zat yang tidak relevan. Zat-zat ini terdiri dari gugus karboksil dan hidroksil larut dengan baik dalam pelarut polar seperti alkohol. Setelah pemisahan, konsentrasi etanol dalam fase air diencerkan menjadi 8,5 dari 85% dengan air suling untuk mengendapkan lutein. Ekstrak lutein mikroalga *Dunaliella salina* keseluruhan yang dihasilkan adalah 750 mg (Kamal *et al.*, 2013).

Karakterisasi menggunakan instrumen Spektrofotometer Fourier Transform Infrared (FTIR)

Hasil analisis senyawa ekstrak lutein dari mikroalga *Dunaliella salina* dengan spektrofotometer inframerah fourier transform (FTIR) menunjukkan spektrum inframerah yang dapat dilihat pada Gambar 2, sedangkan hasil analisis yang menunjukkan puncak serapannya pada bilangan gelombang dapat dilihat pada Tabel 1.

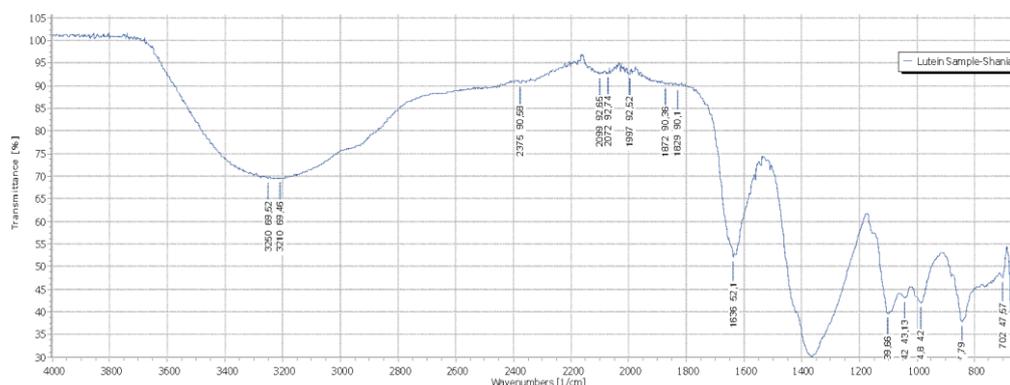
Bilangan gelombang yang dihasilkan menunjukkan gugus fungsi dari senyawa ekstrak yang diidentifikasi. Bilangan gelombang yang melebar dari 3200 cm^{-1} - 3600 cm^{-1} pada ekstrak lutein menunjukkan adanya gugus OH yang terlihat pada spektra. Kemudian adanya gugus alkena pada bilangan gelombang yang melebar 1600 cm^{-1} - 1680 cm^{-1} dan gugus CH pada bilangan gelombang 1350 cm^{-1} - 1470 cm^{-1} . Adanya gugus alkenil yang terlihat pada bilangan gelombang yang melebar dari 686 cm^{-1} - 995 cm^{-1} (Kusmiati & Agustini, 2012). Pada gugus fungsi C-H alkil tidak terbaca serapannya, hal ini terjadi akibat adanya kerusakan atau kontaminan terhadap sampel.

Gambar 1. merupakan pola spektrum FTIR, adapun beberapa gugus fungsi yang menandakan senyawa Lutein dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1 Hasil analisis spektrum FTIR lutein mikroalga *Dunaliella salina*

Bilangan gelombang	Literatur	Ikatan
3250,69	3200 - 3600	O-H
3210,69		Hidroksida
1636,52	1600 - 1680	C=C Alkena
1365,30	1350 - 1470	C-H Alkil
702,47	686 - 995	H
878,9		C=C
984,8		Alkenil

Pada penelitian (Kusmiati & Agustini, 2012) baku standar lutein menunjukkan adanya gugus Alkenil, Alkil, Alkena aromatik, dan hidroksil yang menunjukkan kesesuaian dengan rumus bangun senyawa lutein. Ciri-ciri gugus fungsi yang dihasilkan mempunyai kemiripan dengan struktur molekul dari senyawa lutein yaitu gugus alkana, gugus alkena dan gugus hidroksida.



Gambar 2 Spektrum FTIR Lutein hasil ekstraksi mikroalga *Dunaliella salina*

Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (1,1 Diphenyl-2-picrylhydrazyl)

Metode pengujian menggunakan DPPH merupakan metode yang konvensional dan telah lama digunakan untuk penetapan aktivitas senyawa antioksidan. Selain itu, pengerjaannya juga mudah, cepat dan sensitif untuk menguji aktivitas antioksidan dari ekstrak tanaman menggunakan DPPH secara spektrofotometer. Hasil penentuan operating time vitamin C dengan DPPH bahwa operating time dengan serapan yang stabil terjadi pada absorbansi stabil yaitu pada menit ke 15 sampai 30. Maka pengujian aktivitas antioksidan dilakukan pada menit ke 30 setelah dilakukan penambahan senyawa kompleks radikal bebas DPPH dengan vitamin C. Pengukuran aktivitas antioksidan secara spektrofotometri dilakukan pada panjang gelombang 516 nm, yang merupakan panjang gelombang maksimum DPPH. Metode uji menggunakan DPPH ini didasarkan pada penurunan absorbansi akibat perubahan warna larutan warna DPPH, dimana DPPH akan bereaksi dengan atom hidrogen dari senyawa peredam radikal bebas membentuk DPPH Hidrazin yang lebih stabil (Rahman *et al.*, 2014). Pengujian aktivitas antioksidan kuantitatif digunakan larutan DPPH 1000 ppm. Pengamatan terhadap intensitas warna pada penelitian ini dilakukan pada konsentrasi ekstrak lutein mikroalga *Dunaliella salina* adalah 100; 125; 150; 175; 200 ppm yang bertujuan untuk mengetahui tingkat peredaman warna sebagai akibat adanya senyawa antioksidan yang mampu mengurangi intensitas warna ungu dari DPPH. Berdasarkan hasil yang diperoleh pada

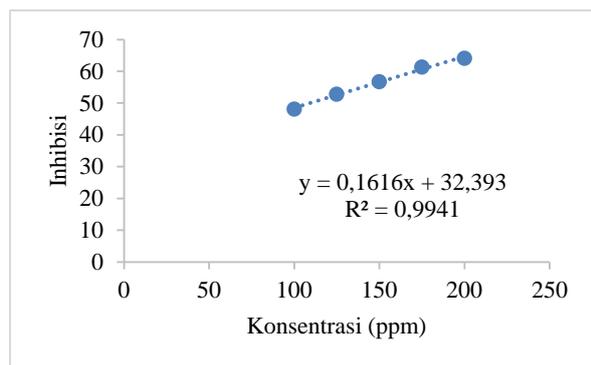
pengukuran absorbansi diperoleh data yang dapat dilihat pada Gambar 3

Berdasarkan Tabel 2 dapat dilihat bahwa ekstrak lutein mikroalga *Dunaliella salina* memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori sedang yang artinya pada konsentrasi 108,9542 µg/mL ekstrak lutein mikroalga *Dunaliella salina* dapat memberikan sedikit efek aktivitas antioksidan (Kusmiati *et al.*, 2018).

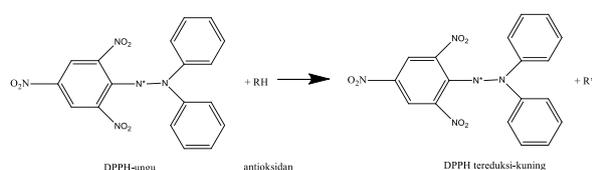
Koefisien y pada persamaan linear bernilai 50 % sedangkan koefisien x pada persamaan linier merupakan konsentrasi sampel yang akan dicari nilainya, x yang diperoleh merupakan besar konsentrasi yang diperlukan untuk merendam 50% aktivitas radikal bebas DPPH. Nilai R² yang mendekati +1 (bernilai positif) menunjukkan korelasi yang baik antara konsentrasi sampel dengan inhibisi (Faliq & Molyneux, 2004).

Tabel 2 Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak lutein mikroalga *Dunaliella salina*

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Rata-rata	%Inhibisi
100	0,416 0,417 0,417	0,416	48,258
125	0,379 0,379 0,379	0,379	52,860
150	0,348 0,348 0,347	0,347	56,840
175	0,311 0,311 0,311	0,311	61,318
200	0,287 0,289 0,289	0,288	64,179



Gambar 3 Kurva ekstrak lutein mikroalga *Dunaliella salina*

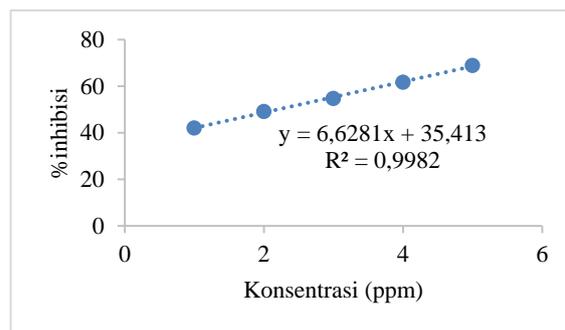


Gambar 4 Mekanisme reaksi DPPH dengan antioksidan

Data pada Gambar 3 juga menunjukkan bahwa nilai absorbansi DPPH semakin berkurang seiring dengan bertambahnya konsentrasi ekstrak lutein mikroalga *Dunaliella salina*. Hal ini dapat terjadi oleh karena adanya reduksi radikal DPPH oleh antioksidan, dimana semakin tinggi konsentrasi ekstrak lutein mikroalga *Dunaliella salina* maka partikel-partikel senyawa antioksidan yang terkandung akan semakin banyak sehingga semakin besar pula aktivitas antioksidannya dan menyebabkan absorbansinya semakin berkurang (Rahman *et al.*, 2014).

Tabel 3 Hasil uji aktivitas antioksidan vitamin C

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Rata-rata	%Inhibisi
1	0,485 0,485 0,485	0,484	42,105
2	0,426 0,425 0,425	0,425	49,162
3	0,379 0,379 0,379	0,379	54,665
4	0,321 0,32 0,32	0,320	61,722
5	0,26 0,26 0,26	0,26	68,899



Gambar 5 Kurva standar vitamin C

Pada vitamin C dengan konsentrasi 2,20078 µg/mL sudah dapat memberikan aktifitas antioksidan. Parameter hasil pengujian dengan metode DPPH adalah d (*inhibition concentration*), yaitu konsentrasi larutan sampel yang menyebabkan reduksi terhadap aktivitas DPPH sebesar 50%, Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm, kuat untuk nilai IC₅₀ 50-100 ppm, sedang 100-150, dan lemah jika nilai IC₅₀ 150-200 ppm. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak lutein mikroalga *Dunaliella salina* memiliki aktivitas antioksidan pada kategori sedang (Kusmiati *et al.*, 2018).

Pada penelitian (Syawal *et al.*, 2019) melakukan pengujian aktivitas antioksidan terhadap mikroalga *Dunaliella salina*, untuk konsentrasi yang dihasilkannya yaitu 445,86 µg/mL, dimana dengan nilai IC₅₀ yang besar pada ekstrak mikroalga *Dunaliella salina* ini maka aktivitas antioksidannya sangat lemah. Pada penelitian (Kusmiati *et al.*, 2018) ekstrak lutein bunga kenikir TC, TK dan TJ memiliki aktivitas antioksidan kuat dengan nilai IC₅₀ berturut-turut sebesar 52,975 µg/mL, 50,641 µg/mL, dan 57,574 µg/mL, berdasarkan metode perendaman DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Senyawa lutein dari mikroalga *Dunaliella salina* dapat diisolasi menggunakan metode ASE (*Accerelated Solvent Extraction*), ekstrak lutein mikroalga *Dunaliella salina* yang dihasilkan sebanyak 750 mg.

2. Senyawa lutein mikroalga *Dunaliella salina* dapat di karakterisasi menggunakan spektrofotometer FTIR menunjukkan adanya gugus Hidroksil, Alkil, alkenil, dan Alkena, ciri-ciri gugus fungsi yang dihasilkan mempunyai kemiripan dengan struktur molekul dari senyawa lutein yaitu gugus alkana, gugus alkena dan gugus hidroksida.
3. Aktivitas antioksidan pada ekstrak lutein mikroalga *Dunaliella salina* berada pada rentan 100-150 yaitu sedang dengan nilai IC₅₀ 108,9542 ppm sedangkan pada vitamin C dengan konsentrasi 2,20078 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

- Faliq, M., & Molyneux, P. (2004). *The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity*. 26.
- Febriani, R., Hasibuan, S., & Syafriadiman. (2020). Pengaruh Salinitas Berbeda terhadap Kepadatan dan Kandungan Karotenoid *Dunaliella salina*. *Jurnal Perikanan Dan Kelautan*, 25(1), 36–46.
- Granado, F., Olmedilla, B., & Blanco, I. (2010). Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *British Journal of Nutrition*, 90(3), 487–502. <https://doi.org/10.1079/bjn2003927>
- Julianti, E., Fathurohman, M., Damayanti, S., & Kartasasmita, R. E. (2018). Isolate of Heterotrophic Microalgae As a Potential Source for Docohexaenoic Acid (Dha). *Marine Research in Indonesia*, 43(2), 79–84. <https://doi.org/10.14203/mri.v43i2.264>
- Kamal, I., Besombes, C., & Allaf, K. (2013). A Novel One-Step Method For Extraction Lutein From Microalgae *Phaeodactylum* Using Accelerated Solvent Extraction (ASE). *First International Scientific Conference, University of Zakho, April 23rd-25th, August*.
- Kusmiati, & Agustini, N. W. S. (2012). Ekstraksi dan karakterisasi senyawa lutein dari dua jenis bunga kenikir lokal. *Prosiding Seminar Biologi*, 698–705.
- Kusmiati, Wijaya, I. G. A. K., & Yadi. (2018). Uji Potensi Antioksidan Ekstrak Lutein Bunga Kenikir (*Tagetes erecta*) Berwarna Kuning dan Jingga Dengan metode FRAP dan DPPH. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*, 4, 274–279. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m040231>
- Ochoa Becerra, M., Mojica Contreras, L., Hsieh Lo, M., Mateos Díaz, J., & Castillo Herrera, G. (2020). Lutein as a functional food ingredient: Stability and bioavailability. *Journal of Functional Foods*, 66(January), 103771. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103771>
- Primaryadi, I. N. B., Anggreni, A. A. M. D., & Wartini, N. M. (2015). Pengaruh Penambahan Magnesium Sulfat Heptahidrat dan Feri Klorida pada Blue Green Medium-11 terhadap Konsentrasi Biomassa Mikroalga *Tetraselmis chuii*. *Jurnal REKAYASA DAN MANAJEMEN AGROINDUSTRI*, 3(2), 92–100.
- Rahman, N., Bahriul, P., & Diah, A. (2014). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Salam (*Syzygium Polyanthum*) Dengan Menggunakan 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil. *Jurnal Akademika Kimia*, 3(3), 143–149.
- Rohiyati, M. Y., Juliantoni, Y., & Hakim, A. (2020). Formulasi Dan Uji Aktivitas Antioksidan Sediaan Masker Peel Off Ekstrak Daun Lidah Buaya (*Aloe vera* Linn .). *Jurnal Kedokteran*, 4(3), 317–322.
- Sadeli, R. A. (2016). *Uji Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH (1,1 Diphenyl-2-picrylhydrazil) Ekstrak Bromelain Buah Nanas (Ananas comosus L. Merr). August*.
- Syawal, Y., Maarisit, W., Tjie Jan, T., & Reinhard Pinontoan, dan. (2019). Skrining Aktivitas Antioksidan dari Mikroalga. *Jurnal Biofarmasetikal Tropis*, 2(2), 23.