

Isolasi dan Aktivitas Antioksidan dengan Menggunakan Metode ABTS (2,2 Azinobis (3-Ethylbenzotiazolin) 6 Sulfonat) Senyawa Superoksida Dismutase pada Mikroalga *Chlorrella vulgaris*

Anindita Tri Kusuma Pratita*, Nisrina Rohadatul Aisy, Gatut Ari Wardani, Mochamad Fathurohman
Program Studi Farmasi, Universitas Bakti Tunas Husada, Tasikmalaya, Indonesia

*Corresponding author: aninditapolar@gmail.com

Abstract

Microalgae contain a variety of secondary metabolites that have not been widely used, such as antioxidant compounds. One of the microalgae that contain antioxidants is the microalgae chlorella vulgaris, which contains superoxide dismutase compounds that have the potential as a source of antioxidants. The ABTS method is a method that can be used to determine the antioxidant activity of proteins including superoxide dismutase compounds. The purpose of the study was to determine the characteristics and antioxidant activity of superoxide dismutase compounds from the microalgae chlorella vulgaris using the ABTS method. Microalgae were cultivated and produced wet biomass of $1.17\% \pm 0.34$ and isolated using phosphate buffer pH 7 and EDTA which resulted in extract yields of $0.52\% \pm 0.01$. The results of the characteristic test with FTIR produced (N-H) and (O-H) groups at a wave number of 3271 cm^{-1} and (C-O) at a wave number of 1637 cm^{-1} and for the characteristics with SEM, the average particle size was $6.881\mu\text{m}$. The results of the antioxidant activity test using the ABTS method obtained an IC₅₀ value of $227.317\text{ ppm} \pm 7.311$ which can be categorized as moderate antioxidant.

Keywords : *Microalgae, Chlorella vulgaris, Superoxide Dismutase, ABTS*

Abstrak

Mikroalga mengandung berbagai metabolit sekunder yang belum banyak dimanfaatkan, seperti senyawa antioksidan. Salah satu mikroalga yg mengandung antioksidan adalah mikroalga *chlorella vulgaris* yaitu terdapat senyawa superoksida dismutase yang berpotensi sebagai sumber antioksidan. Metode ABTS merupakan metode yang bisa digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan untuk protein termasuk senyawa superoksida dismutase. Tujuan dari penelitian yaitu mengetahui karakteristik dan aktivitas antioksidan senyawa superoksida dismutase dari mikroalga *chlorella vulgaris* dengan menggunakan metode ABTS. Mikroalga dikultivasi dan dihasilkan biomassa basah sebanyak $1,17\% \pm 0,34$ dan diisolasi dengan menggunakan buffer fosfat pH 7 dan EDTA yang menghasilkan rendemen ekstrak sebanyak $0,52\% \pm 0,01$. Hasil uji karakteristik dengan FTIR dihasilkan gugus (N-H) dan (O-H) pada bilangan gelombang 3271 cm^{-1} dan (C-O) pada bilangan gelombang 1637 cm^{-1} dan untuk karakteristik dengan SEM didapat ukuran partikel rata – rata $6,881\mu\text{m}$. Pada hasil uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode ABTS didapat nilai IC₅₀ yaitu $227,317\text{ ppm} \pm 7,311$ yang bisa dikategorikan dengan antioksidan sedang.

Kata Kunci: Mikroalga, *Chlorella vulgaris*, Superoksida Dismutase, ABTS.

PENDAHULUAN

Laut telah menjadi sumber makanan, mineral dan juga produk alami untuk memenuhi kebutuhan manusia. Negara Indonesia termasuk ke dalam negara yang memiliki kekayaan laut yang sangat melimpah seperti ikan, rumput laut, terumbu karang dan juga mikroalga (Noerdjito, 2019). Mikroalga perlu dioptimalkan karena dilaut Indonesia mikroalga sangatlah banyak dan penggunaannya cukup luas diantaranya bisa

digunakan sebagai suplemen, pangan, pakan, dan juga bahan aktif kosmetik. Tetapi, masih sedikit orang yang memanfaatkannya. Maka dari itu, mikroalga perlu untuk dimanfaatkan (Jelizanur et al.,2019).

Salah satu mikroalga yang banyak diteliti dan juga dikembangkan yaitu mikroalga *Chlorella vulgaris* dimana mikroalga ini memiliki kandungan yang bermanfaat bagi manusia. Dengan banyaknya manfaat yang diperoleh

dari *Chlorella vulgaris*, maka bisa menjadi peluang dalam mengembangkan perekonomian. *Chlorella vulgaris* memiliki banyak kandungannya seperti karbohidrat, lemak, asam nukleat, dan juga protein termasuk enzim. Pada penelitian yang telah dilakukan oleh Chalid (2010) bahwa mikroalga *Chlorella vulgaris* memiliki kandungan asam lemak omega 3, serat, vitamin, protein, mineral, dan juga enzim SOD yang bermanfaat sebagai antioksidan.

Antioksidan merupakan suatu faktor untuk meningkatkan kekebalan tubuh dan juga sebagai pelindung dari penyakit yang berbahaya (Valko et al., 2006). Seiring berjalannya waktu, pola hidup manusia itu semakin berubah. Perubahan ini yang akan mengakibatkan tubuh dari manusia terpapar dari zat – zat berbahaya dan menyebabkan penyakit degeneratif. Maka dari itu, terjadilah suatu peningkatan minat untuk pencarian sumber baru secara alami yang dapat menampilkan sifat dari radikal bebas, terutama yang digunakan dalam biomedis.

Salah satu yang dapat menghasilkan antioksidan adalah enzim. Ada beberapa enzim antioksidan yang memiliki peran dalam menangkal radikal bebas contohnya seperti enzim superoksida dismutase (SOD), enzim katalase (CAT), dan juga *glutathione peroxidase* (GPx) (Ivanova et al., 2016). Superoksida dismutase (SOD) adalah enzim antioksidan yang berfungsi untuk suatu pertahanan radikal bebas agar tidak terjadi stress oksidatif (Stephenie et al., 2020). Penelitian yang telah dilakukan oleh Kong (2020) bahwa beberapa sel dari *S. thermophilus* diisolasi dan dapat meningkatkan aktivitas SOD sebesar 2750 U/mg dan adapun pada penelitian yang telah dilakukan oleh Zhao (2020) bahwa aktivitas SOD pada alga *Dictyosphaerium sp* yaitu sebesar 940 U/g.

Adapun metode untuk uji aktivitas antioksidan senyawa superoksida dismutase yaitu dengan menggunakan metode ABTS dimana metode ini senyawa dapat langsung berinteraksi dengan larutan ABTS dan metode yang dapat

digunakan untuk menguji antioksidan pada protein seperti enzim (Arthawani, 2021).

BAHAN DAN METODE

Alat

botol kultur 1000 mL, lampu 19 watt (*Philips*), pipa L, botol vial, hemasitometer, selang, pipa cabang selang, salinometer (*Resun*), pH meter (*Ionix*), kaca arloji, aerator (*Tamara*), sentrifugasi (*Oregon*), *freeze dryer* (*Biobase*), timbangan analitik (*AL-204 Analytical Balance*), pengaduk, spatula, botol semprot, kertas payung, benang tali, kasa steril, tisu, tube effendorf, pipet volume, gelas kimia, gelas ukur, labu ukur, Spektrofotometer FTIR (*Cary 630*), Spektrofotometer UV-Vis (*Genesys-10*), *Scanning Electron Microscope* (SEM) (*Phenom Pro X*).

Bahan

Mikroalga *Chlorella vulgaris*, Buffer fosfat (Merck), Etilenadiaminetetraasetat (EDTA) p.a (Merck), ammonium fosfat ((NH₄)₃PO₄) 40%, Nikotinamida adenina dinukleotida (NADH), Natrium Klorida (NaCl) p.a (Merck), Kalium Klorida (KCl) p.a (Merck), Kalsium Klorida (CaCl₂) p.a (Merck), Magnesium Sulfat (MgSO₄) p.a (Merck), Magnesium Diklorida (MgCl₂), Natrium Bikarbonat (NaHCO₃), Aquadest, Natrium Karbonat 1,25%, Besi III Klorida (FeCl₃) p.a (Merck), Dekstrosa, Kalium Nitrat (KNO₃), Pupuk TSP, Ammonium sulfat ((NH₄)₂SO₄), Superoksida dismutase p.a

Pembuatan Air Laut Buatan

Pembuatan air laut buatan diawali dengan menimbang : 24,6 g Natrium Klorida; 0,6 g Kalium Klorida; 1,36 g Kalsium Klorida; 6,2 g Magnesium Sulfat; 4,66 g Magnesium Klorida dan 0,18 g Natrium Bikarbonat dibuat untuk 1 L dengan *aquadest*. Kemudian disaring terlebih dahulu sampai terbebas dari partikel atau kotoran dan diautoklaf (Julianti et al., 2018).

Pembuatan Media Pertumbuhan

Media pertumbuhan berfungsi untuk menumbuhkan dan mengembangbiakan mikroalga. Media pertumbuhan dibuat dengan menimbang 33 g FeCl₃ dengan 35 g EDTA; 45 g Dekstrosa; 84 g KNO₃; 54 g

pupuk TSP dengan 18,9 g EDTA, kemudian dilarutkan dalam 1 L *aquadest* (Julianti et al., 2018).

Kultivasi Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Proses kultivasi dilakukan dalam botol kaca 1000 mL. Disiapkan larutan medium pertumbuhan yang telah dibuat. Kemudian disiapkan juga ALB dengan nilai salinitasnya 22 ppt. Setelah itu, ALB dimasukkan sebanyak 450 mL ke dalam botol kaca 1000 mL dan disterilisasi media pertumbuhan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Biarkan media pertumbuhan dan air laut buatan hingga suhunya menurun menjadi suhu ruang. Kemudian, 24,5 mL media pertumbuhan ditambahkan ke dalam botol. Setelah itu, masukkan 450 mL indukan mikroalga ke dalam medium pertumbuhan. Atur tingkat aerasi dan atur cahaya 12 jam terang dan 12 jam gelap serta amati pertumbuhannya selama 14 hari (Julianti et al., 2018).

Pengamatan Pertumbuhan Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Pengamatan dilakukan selama 14 hari. Ambil 1 – 2 tetes kemudian letakan dalam hemasitometri dan tutup dengan objek glass. Simpan dibawah mikroskop binokuler dan amati pada pembesaran 400 – 1000. Kemudian hitung rata rata pertumbuhan dengan rumus (Kusdarwati et al., 2011) :

$$\text{Jumlah Pertumbuhan Sel} = \frac{\Sigma A + \Sigma B + \Sigma C + \Sigma D}{4} \times 10^4$$

Keterangan :

ΣA = Banyaknya mikroalga di bilik A

ΣB = Banyaknya mikroalga di bilik B

ΣC = Banyaknya mikroalga di bilik C

ΣD = Banyaknya mikroalga di bilik D

Pemanenan Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Mikroalga *Chlorella vulgaris* didiamkan 1 hari dalam suhu ruang dan di sentrifugasi.

Isolasi Senyawa Superoksida Dismutase

Isolasi senyawa superoksida dismutase yang berasal dari biomassa mikroalga *Chlorella vulgaris* dilakukan dengan menimbang 0,6 g biomassa mikroalga. Kemudian ditambahkan

2.4 mL buffer fosfat (pH 7). Selanjutnya ditambahkan larutan EDTA 0,1 M sebanyak 1 mL. Setelah itu, disentrifugasi dengan 4000 rpm. Sentrifugasi dilakukan selama 15 menit (Tri Panji et al., 2009).

Supernatan yang dihasilkan dilakukan pengendapan secara bertingkat dengan ammonium sulfat. Pengendapan pertama, ekstrak kasar dari superoksida dismutase diendapkan dengan ammonium sulfat 40% kemudian disentrifugasi dengan 3500 rpm sekitar 5 menit. Untuk pengendapan kedua, dilakukan dengan amonium sulfat 80% dan disentrifugasi kembali dengan kondisi yang sama yaitu 4000 rpm sekitar 10 menit. Endapan yang dihasilkan dilarutkan kembali menggunakan buffer fosfat dengan pH 7 dan hasilnya didialisis selama 24 jam dengan suhu 4°C dengan menggunakan kantong selofan di dalam buffer fosfat dengan pH 7. Lalu, endapan diambil dan ditambahkan dengan buffer fosfat pH 7. Dihasilkan superoksida dismutase murni (Rahman et al., 2012)

Karakterisasi Senyawa Superoksida Dismutase

a. Gugus Fungsi Senyawa Superoksida dismutase dengan FTIR

Karakterisasi dengan menggunakan FTIR ini dilakukan dengan cara menyalakan PC monitor dan juga menyalakan instrumen FTIR. Setelah itu, buka aplikasi *MicroLab PC* (untuk *running*), aplikasi *MicroLab lite* (untuk pengolahan data). Bersihkan kristal, kemudian blank dimasukkan dan letakan 1 tetes sampel diatas kristal. Hasil yang didapat adalah spektrum yang kemudian diukur bilangan gelombangnya pada 4000 – 650 cm^{-1} dengan menggunakan aplikasi *SpectraGryph* (Kristianingrum, 2016) .

b. Morfologi Senyawa Superoksida dismutase dengan *Scanning Electron Microscope (SEM)*

Sampel ditimbang 5 mg kemudian diletakan diatas tempat sampel dengan isolasi double-side. Sampel kemudian dilapisi emas, lalu dimasukkan ke dalam instrumen SEM. Struktur superoksida

dismutase diamati dilayar monitor dengan menggunakan skala pembesaran 3000x. Hasil pengamatannya kemudian difoto dengan menggunakan kamera digital dan untuk partikelnya diukur dengan menggunakan aplikasi *Image J* (Subraiman et al., 2019).

Uji Aktivitas Antioksidan Superoksida dismutase dengan Metode ABTS (2,2 Azinobis (3-Ethylbenzotiazolin) 6-Sulfonat)

Dibuat larutan ABTS yaitu dengan menimbang 7 mg garam ABTS dan 3,5 mg kalium persulfat. Kemudian, dilarutkan dalam labu ukur 5 mL *aqua pro injection* dan ad dalam labu ukur 25 mL. inkubasi selama 12-16 jam. Setelah itu dipipet 1 mL dan masukan ke dalam labu ukur 10 mL ad sampai tanda batas dan ukur panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis pada 400-800 nm. Sampel dibuat larutan stok sebanyak 1000 ppm dan dibuat dalam 5 deret konsentrasi (50;100;150;200;250). Kemudian, sampel di pipet dan campurkan dengan larutan ABTS dimasukan pada vial coklat. Diinkubasi dan ukur absorbansi pada pajang gelombang maksimum (Kurniawati & Sutoyo, 2021). Aktivitas penangkal radikal bebas dapat dilihat dari persen inhibisi yang dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut (Sami & Rahimah, 2015) :

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

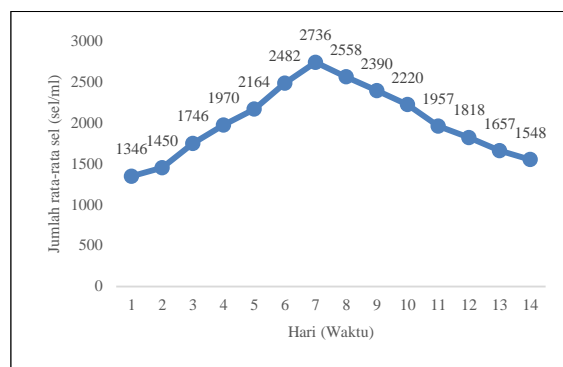
Kemudian hitung dengan persamaan regresi linier $y = ax+b$ (Sari et al., 2014).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Biomassa Basah Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Biomassa basah mikroalga dihasilkan dari suatu proses kultivasi yaitu yang dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh sejumlah besar sel pada mikroalga. Untuk memperoleh biomassa yang banyak, maka diperlukan nutrisi yang baik dan media yang sesuai (Roy, 2017).

Jumlah pertumbuhan sel rata rata pada mikroalga *Chlorella vulgaris* selama 14 hari mengalami peningkatan hingga hari ke-7. Sedangkan, dari hari ke-8 hingga hari ke-14 mikroalga *Chlorella vulgaris* mengalami penurunan. Hasil rata – rata dari keseluruhan jumlah sel pada mikroalga *Chlorella vulgaris* yaitu sebesar 501 ± 105 (sel/mL).



Gambar 1 Kurva jumlah rata – rata sel mikroalga *Chlorella vulgaris*

Isolasi Senyawa Superoksida Dismutase

Isolasi dilakukan untuk memisahkan biomassa basah dengan larutan medianya. Isolasi biomassa basah dilakukan dengan cara sentrifugasi. Setelah itu, dilakukan pemisahan antara pelet dan juga filtratnya. Dalam penelitian ini, yang digunakan yaitu peletnya. Hasil persen rendemen rata-rata dari biomassa basah yaitu sebanyak $1,17 \pm 0,34$ (b/v).

Biomassa basah di *freez dryer* ditimbang dan dilarutkan dengan menggunakan buffer fosfat dengan pH 7. Pelarut buffer fosfat tersebut merupakan pelarut yang digunakan untuk mengisolasi enzim agar menghindari terjadinya inaktivasi enzim. Selain itu, buffer fosfat dapat membantu menjaga pH agar tidak asam atau tidak basa. Enzim akan mengalami denaturasi jika berupa larutan asam atau basa. Denaturasi merupakan suatu proses pemecahan protein yang akan mengakibatkan enzim menjadi tidak aktif (Zin et al., 2022).

Kemudian, biomassa disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Setelah itu, diambil supernatan dan dilakukan pengendapan bertingkat dengan menggunakan ammonium sulfat 40% dan

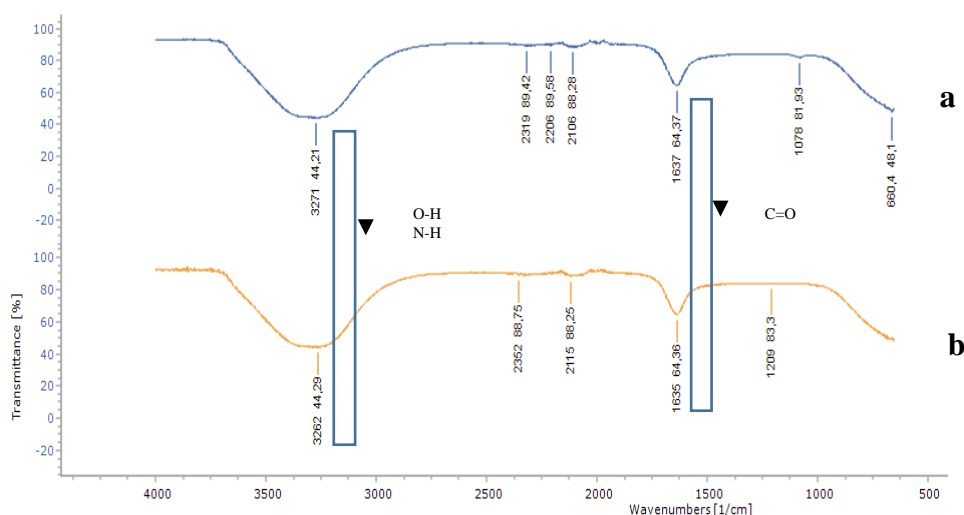
80%. Pengendapan bertingkat dilakukan untuk meningkatkan aktivitas enzim dan juga memperoleh enzim yang murni. Peningkatan konsentrasi pada garam dilakukan untuk memekatkan enzim SOD agar meningkatkan aktivitas dari enzim SOD. Ketika aktivitas enzim semakin tinggi maka akan memperoleh kemurnian yang tinggi juga (Pasaribu et al., 2018).

Untuk memisahkan enzim dengan garam, maka dilakukan dialisis dengan menggunakan kantong selofan. Proses yang akan terjadi yaitu adanya tekanan osmosis antara di dalam kantong selofan dan yang berada diluar kantong selofan. Protein yang memiliki ukuran molekul yang besar akan tertahan di dalam kantong selofan sedangkan untuk garam yang memiliki ukuran molekul yang kecil akan keluar melalui pori – pori pada kantong selofan. Keluarnya molekul garam tersebut dapat menyebabkan ketidakseimbangan di luar kantong selofan sehingga digunakan buffer fosfat dengan pH 7 untuk mengurangi ketidakseimbangan tersebut (Suhito & Christiena, 2017).

Karakterisasi dengan menggunakan FTIR dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui adanya gugus fungsi yang ada pada senyawa SOD. Bilangan gelombang yang digunakan yaitu $4000-650\text{ cm}^{-1}$ (Shameer & Nishath, 2019).

Berdasarkan Gambar 2 bahwa pada bilangan gelombang senyawa Superoksida dismutase yaitu terbentuknya ikatan hidrogen (O-H) dan gugus Amida (N-H) pada bilangan gelombang 3271 cm^{-1} dan gugus karbonil (C=O) pada bilangan gelombang 1637 cm^{-1} . Untuk bilangan gelombang pada standar dari Superoksida dismutase juga terdapat gugus amida (N-H) dan ikatan hidrogen (O-H) pada bilangan gelombang 3262 cm^{-1} , serta gugus karbonil (C=O) pada bilangan gelombang 1635 cm^{-1} . Gugus fungsi pada standar dan juga gugus fungsi pada sampel Superoksida dismutase sudah sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh David (2012) yaitu adanya penyerapan yang khas dari senyawa Superoksida dismutase pada daerah *fingerprint* dan gugus tersebut adalah gugus amida pada bilangan gelombang 1657 cm^{-1} .

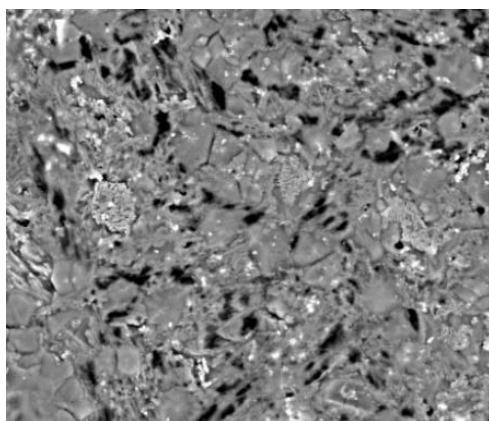
Gugus Fungsi Senyawa Superoksida dismutase dengan FTIR



Gambar 2 Spektrum FTIR a. Sampel superoksida dismutase b. Standar superoksida dismutase

Morfologi Senyawa Superoksida dismutase dengan Scanning Electron Microscope (SEM)

Karakterisasi dari senyawa Superoksida dismutase dilakukan untuk mengetahui morfologi dari senyawa Superoksida dismutase dimana dalam hal ini bisa menganalisis bentuk dan juga ukuran partikel dari senyawa Superoksida dismutase. Karakterisasi untuk senyawa Superoksida dismutase ini menggunakan ukuran 20 μm pembesaran 3000x.



Gambar 3 Karakterisasi Superoksida dismutase dengan Scanning Electron Microscope (SEM)

Hasil morfologi SEM pada sampel senyawa Superoksida dismutase dilihat bahwa struktur mikro pada permukaan sampel yang memiliki ukuran partikel rata – rata sekitar 6,881 μm yang diukur dengan menggunakan aplikasi *Image J (Free)*.

Aktivitas Antioksidan Senyawa Superoksida dismutase dengan Metode ABTS

Adanya aktivitas antioksidan dari senyawa superoksida dismutase ditandai dengan hilangnya warna biru pada pereaksi ABTS (Imrawati et al., 2017). Uji aktivitas antioksidan dilakukan terlebih dahulu penentuan panjang gelombang maksimum dari larutan ABTS. Panjang gelombang maksimum yang dihasilkan adalah 734 nm. Kemudian, dilakukan *operating time* untuk melihat waktu inkubasi optimal bereaksinya sampel dengan ABTS. Berdasarkan hasil penelitian, *operating*

time untuk vitamin C dan senyawa Superoksida dismutase yaitu 30 menit.

Superoxida dismutase merupakan salah satu jenis antioksidan endogen yang mampu mengkatalis radikal bebas dan dijadikan hidrogen peroksida (H_2O_2), sehingga superoksida dismutase disebut sebagai *scavenger* atau pembersih superoksida (O_2) (Morano et al., 2012). Pengujian metode ABTS didasarkan pada kemampuan senyawa dalam membentuk kation radikal (ABTS^+). Kation radikal (ABTS^+) dibuat dengan mereaksikan larutan ABTS dengan kalium persulfat. ABTS ini berfungsi untuk mengukur antioksidan yang mengalami reaksi dengan radikal kation ABTS. Kation radikal (ABTS^+) memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 734 nm. Larutan ABTS akan mengalami reduksi ditandai dengan warna biru-hijau menjadi tidak berwarna (Kurniawati & Sutoyo, 2021).

Tabel 1 Hasil uji antioksidan

Sampel	IC ₅₀	Keterangan
Standar Vitamin C	4,211 ppm \pm 0,140	Sangat Kuat
Sampel Superoksida dismutase	227,317 ppm \pm 7,311	Sedang

Metode ABTS ini merupakan metode yang dapat bereaksi dengan cepat dibandingkan dengan metode yang lain, serta pengujiannya yang sederhana, dan mudah untuk diulangi (Faisal, 2019). Nilai IC₅₀ yang tinggi menandakan adanya aktivitas antioksidan yang besar. IC₅₀ merupakan nilai konsentrasi pada larutan sampel yang dibutuhkan untuk meredam 50% aktivitas radikal bebas ABTS. Semakin kecil konsentrasi pada sampel, maka semakin kecil juga nilai absorbansinya dan aktivitas antioksidan dari sampel akan semakin meningkat (Sami & Rahimah, 2015).

Nilai IC₅₀ dari standar vitamin C yang dihasilkan yaitu sebesar 4,211 ppm dan untuk sampel Superoksida dismutase sebesar 227,317 ppm. Nilai IC₅₀ vitamin C dapat dikategorikan sebagai antioksidan yang sangat kuat karena berada pada rentang < 50 ppm dan untuk IC₅₀ pada sampel dikategorikan sebagai antioksidan yang

sedang karena berada pada rentang 100 – 250 ppm.

KESIMPULAN

Karakterisasi dari senyawa Superoksida dismutase yaitu terdapat gugus amida (N-H) dan ikatan hidrogen (O-H) pada bilangan gelombang 3271 cm^{-1} dan gugus karbonil (C-O) yaitu pada bilangan gelombang 1637 cm^{-1} dengan ukuran partikel rata – rata yaitu $6,881\text{ }\mu\text{m}$.

Uji aktivitas antioksidan bisa dilakukan dengan metode ABTS dengan nilai IC_{50} yaitu 227,317 ppm dimana nilai tersebut menjadikan senyawa Superoksida dismutase memiliki potensi cukup baik sebagai antioksidan alami karena tergolong antioksidan sedang.

DAFTAR PUSTAKA / REFERENCE

- Arthawani, G. (2021). Isolasi Protein Double function (Antioksidan dan Antidiabetes Tipe-2) dari Biji Melinjo (Gnetum gnemon) secara Invitro. In *Digital Repository Universitas Jember* (Issue September 2019).
- Chalid, S. Y., Amini, S., & Lestari, S. D. (2010). Kultivasi *Chlorella*, sp Pada Media Tumbuh Yang Diperkaya Dengan Pupuk Anorganik Dan Soil Extract. *Jurnal Kimia VALENSI*, 1(6), 298–304. <https://doi.org/10.15408/jkv.v1i6.242>
- David, C., D'Andrea, C., Lancelot, E., Bochterle, J., Guillot, N., Fazio, B., Marag, O. M., Sutton, A., Charnaux, N., Neubrech, F., Pucci, A., Gucciardi, P. G., & De La Chapelle, M. L. (2012). *Raman and IR spectroscopy of manganese superoxide dismutase, a pathology biomarker. Vibrational Spectroscopy*, 62, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2012.06.003>
- Faisal, H. (2019). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Buah Okra (*Abelmoschus esculentus* L . Moench) Dengan Metode DPPH (1 , 1- *difenil-2-pikrilhidrazil*) dan Metode ABTS. *Regional Development Industry & Health Science, Technology and Art of Life*, 2 (1), 1–5.
- Imrawati, Mus, S., Gani, S. A., & Bubua, K. I. (2017). Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Daun Kersen (*Muntingia calabura* L .) Menggunakan Metode ABTS. *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences*, 2(2), 59–62.
- Jelizanur, Padil, Sri Muria, R. (2019). Kultivasi Mikroalga Menggunakan Media Af6 Pada Berbagai Ph. *Jom FTEKNIK*, 6, 1–5.
- 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>
- Kong, L., Xiong, Z., Song, X., Xia, Y., Zhang, H., Yang, Y., & Ai, L. (2020). *Enhanced Antioxidant Activity in Streptococcus thermophilus by High-Level Expression of Superoxide Dismutase. Frontiers in Microbiology*, 11(November), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.579804>
- Kurniawati, I. F., & Sutoyo, S. (2021). Review Artikel: Potensi Bunga Tanaman Sukun (*Artocarpus Altilis* [Park.] Fosberg) Sebagai Bahan Antioksidan Alami. *UNESA Journal of Chemistry*, 10(1), 1–11.
- Kusdarwati, R., Akhyar, M., & Rahardja, B. S. (2011). Pengaruh Penambahan Vitamin B pada Media Blotong12 Kering terhadap Pertumbuhan Populasi *Dunaliella salina* Effect. *Jurnal Ilmiah Perikanan Dan Kelautan*, 3(1), 73–78.
- Mohamed Shameer, P., & Mohamed Nishath, P. (2019). Exploration and enhancement on fuel stability of biodiesel: A step forward in the track of global commercialization. In *Advanced Biofuels: Applications, Technologies and Environmental Sustainability*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102791-2.00008-8>
- Mohd Zin, Z., Yahaya, N. H., Bashah, N., Ibrahim, K., Rusli, N. D., Smedley, K., Mohd, K. S., & Zainol, M. K. (2022). Effect of pH extraction buffer on antioxidant enzymes activities in water lily's leaves and petioles. *Food*

- Research, 6(1), 34–44.
[https://doi.org/10.26656/fr.2017.6\(1\).130](https://doi.org/10.26656/fr.2017.6(1).130)
- Morano, K. A., Grant, C. M., & Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4), 1157–1195.
<https://doi.org/10.1534/genetics.111.128033>
- Noerdjito, D. R. (2019). Perkembangan, Produksi, Dan Peran Kultur Mikroalga Laut Dalam Industri. *Oseana*, 42(1), 18–27.
<https://doi.org/10.14203/oseana.2017.vol42no.1.35>
- Pasaribu, E., Nurhayati, T., & Nurilmala, M. (2018). Ekstraksi Dan Karakterisasi Enzim Pepsin Dari Lambung Ikan Tuna (*Thunnus albacares*). *Jphpi 2018*, 21(3), 486–496.
- Rahman, H., Kartawinata, T. G., & Julianti, E. (2012). Uji Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase dalam Ekstrak Mesokarp Buah Merah (*Pandanus conoideus Lamarck*) Menggunakan Densitometri Citra Elektroforegram. *Acta Pharmaceutica Indonesia*, 37(2), 43–47.
- Roy, A. (2017). A review on harvesting and lipid extraction methods for biodiesel production from microalgae. *Research & Reviews in BioSciences*, 12(3), 1–10.
- Sami, F. J., & Rahimah, S. (2015). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Bunga Brokoli (*Brassica oleracea L. var. Italica*) dengan Metode DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) dan Metode ABTS (2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 2(2), 107–110.
- Sari, P. E., Simanjuntak, S. B. I., & Winarsi, H. (2014). Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase Tikus Diabetes Yang Diberi Ekstrak Daun Kapulaga *Amomum cardamomum*. *Scripta Biologica*, 1(3), 196.
<https://doi.org/10.20884/1.sb.2014.1.3.41>
- Stephenie, S., Chang, Y. P., Gnanasekaran, A., Esa, N. M., & Gnanaraj, C. (2020). An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. *Journal of Functional Foods*, 68(March), 103917.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103917>
- Subraiman, K. ., Janavi, G. ., Marimuthu, S., M.Kannan, K.Raja, S.Haripriya, Sharmila, D. J. S., & Moorthy, P. S. (2019). A Textbook on Fundamentals and Applications of Nanotechnology. *Kemampuan Koneksi Matematis (Tinjauan Terhadap Pendekatan Pembelajaran Savi)*, 53(9), 1689–1699.
- Suhito, I. R., & Christiena, A. (2017). *Pemurnian parsial enzim protease dari ekstrak kasar getah pepaya. July 2015*.
- Tri Panji, Suharyanto, & Wijayanti, M. (2009). Produksi, isolasi dan karakterisasi superoksida dismutase dari *Spirulina platensis* yang dibiakkan dalam serum lateks. *Menara Perkebunan*, 77(1), 23–35.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Zhao, Z., Rasool, M. A., Chen, C., Ma, S., Wang, L., & Huang, G. (2020). *Identification and screening of multiple tropical microalgal strains for antioxidant activity in vitro. Food Bioscience*, 36, 100649.
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100649>