

Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Eksopolisakarida dari Mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* dengan Metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Mochamad Fathurohman*, Heri Herdiana, Winda Trisna Wulandari, Anindita Tri Kusuma Pratita
Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Bakti Tunas Husada, Tasikmalaya, Indonesia

*Corresponding author: mfathurohman@universitas-bth.ac.id

Abstract

Microalgae are autotrophic microorganisms that live in both sea and fresh waters with microscopic sizes that can reach up to hundreds of micrometers. Chlorella is a type of microalgae that has an abundance of bioactive compounds. Microalgae exopolysaccharides are biological macromolecular polymers of polysaccharides which are secreted as mucus in the surrounding environment. Microalgae EPS has been widely reported through various studies to have biological activities that can be utilized, one of which is the presence of antioxidants. Antioxidants are compounds that can inhibit oxidation reactions, by binding to free radicals and highly reactive molecules, so they can inhibit cell damage. This study aims to determine the characteristics and antioxidant activity of EPS Chlorella pyrenoidosa using the DPPH method. The stages of the research carried out included microalgae cultivation, EPS isolation, EPS characterization including functional group analysis and total sugar content testing, and finally testing the antioxidant activity of EPS using the DPPH method. The results of the characterization of EPS Chlorella pyrenoidosa by FTIR spectrophotometry obtained typical polysaccharide functional groups including the O-H, C-H, C=O, CH₂, and C-O-C groups. Testing the total sugar content of EPS Chlorella pyrenoidosa obtained a sugar content of 153.246 mg/L. EPS Chlorella pyrenoidosa was detected to have antioxidant activity using the DPPH method with an IC₅₀ value of 301.222 ppm

Keywords: Microalgae, *Chlorella pyrenoidosa*, Exopolysaccharide, Antioxidant, DPPH

Abstrak

Mikroalga merupakan mikroorganisme autotrof yang hidup di perairan baik air laut maupun tawar dengan ukuran mikroskopis yang bisa mencapai hingga ratusan mikrometer. *Chlorella* merupakan salah satu jenis mikroalga yang memiliki kelimpahan senyawa bioaktif. Eksopolisakarida mikroalga merupakan polimer makromolekul biologis dari polisakarida yang disekresikan sebagai lendir di lingkungan sekitarnya. EPS mikroalga telah banyak dilaporkan melalui berbagai penelitian memiliki aktivitas biologis yang dapat dimanfaatkan, salah satunya yaitu adanya kandungan antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang bisa menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif, sehingga bisa menghambat kerusakan sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik serta aktivitas antioksidan EPS *Chlorella pyrenoidosa* dengan metode DPPH. Tahapan penelitian yang dilakukan diantaranya, kultivasi mikroalga, isolasi EPS, karakterisasi EPS meliputi analisis gugus fungsi dan uji kandungan gula total, dan yang terakhir pengujian aktivitas antioksidan EPS dengan menggunakan metode DPPH. Hasil karakterisasi EPS *Chlorella pyrenoidosa* dengan spektrofotometri FTIR didapat gugus fungsi khas polisakarida diantaranya gugus O-H, C-H, C=O, CH₂, dan C-O-C. Pengujian kandungan gula total EPS *Chlorella pyrenoidosa* didapat kadar gula sebesar 153,246 mg/L. EPS *Chlorella pyrenoidosa* terdeteksi memiliki aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dengan nilai IC₅₀ 301,222 ppm.

Kata kunci: Mikroalga, *Chlorella pyrenoidosa*, Eksopolisakarida, Antioksidan, DPPH

PENDAHULUAN

Mikroalga merupakan mikroorganisme autotrof yang mampu membentuk senyawa organik melalui proses fotosintesis. Senyawa organik yang dihasilkan mikroalga diantaranya protein,

lemak, karbohidrat, vitamin dan pigmen (Agustina and Herman, 2016). Pemanfaatan komponen bioaktif dari mikroalga memiliki keunggulan dibandingkan tumbuhan pada umumnya. Keunggulan dari mikroalga yaitu

tidak memerlukan lahan luas, tidak bergantung pada musim, serta dapat dikultur dalam jumlah yang besar. Karbohidrat merupakan salah satu metabolit primer dari mikroalga, sekitar 45-97% dari karbohidrat total dalam mikroalga adalah polisakarida, termasuk eksopolisakarida di dalamnya (Mulyani, Asmadi and Setiawan, 2021).

Chlorella merupakan salah satu dari banyaknya jenis mikroalga yang berpotensi untuk penggunaan di bidang farmasi dan kosmetik karena keanekaragaman senyawa bioaktif yang terkandung. *Chlorella* memiliki beberapa tipe spesies diantaranya *C.vulgaris*, *C.pyrenoidosa*, *C.ellipsoidea*, *C. saccharophila*, dan *C.sorokiniana*. *Chlorella* kaya akan polisakarida, asam amino esensial (lysine dan leucine), asam nukleat, asam lemak tidak jenuh, pigmen seperti karotenoid dan klorofil, vitamin, juga mineral (Chen *et al.*, 2018).

Eksopolisakarida (EPS) dikenal sebagai biopolimer ekstraseluler yang diproduksi mikroalga, tanaman maupun hewan. EPS mikroalga merupakan polimer makromolekul biologis dari polisakarida yang disekresikan sebagai lendir di lingkungan sekitarnya (Zhang *et al.*, 2019). Senyawa EPS adalah biopolimer yang mempunyai aplikasi yang sangat luas, termasuk sebagai antioksidan. Winahyu Astika and Primadimanti (2020) telah berhasil mengembangkan produk lotion dari mikroalga *Spirulina sp* dengan memanfaatkan kandungan antioksidan senyawa dari senyawa eksopolisakarida yang terkandung. Berdasarkan studi literatur yang telah dilakukan, potensi adanya kandungan antioksidan eksopolisakarida dari mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* sangat besar, sehingga diharapkan kandungan antioksidan EPS *Chlorella pyrenoidosa* dapat dikembangkan menjadi produk yang dapat digunakan secara komersial terutama dibidang farmasi.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Kultur mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* (BPPT Jepara), NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄, MgCl₂,

NaHCO₃, aquadest, FeCl₃, EDTA, Dextrose, KNO₃, pupuk TSP, NaOH, TCA, Aseton p.a, Fenol 5%, H₂SO₄, Glukosa, ABTS, Kalium perisulfat, DPPH, vitamin C, Metanol P.A.

Alat

Botol kaca 1L, pH meter, aerator, Haemocytometer (*Improved Neubaur*), Salinometer, mikroskop binokuler, lampu TL 19 watt, selang kecil, vial, pipet tetes, kertas saring, sentrifugator (*LC-04S*), autoklaf (*Biobase*), Spektrofotometri FTIR (*Cary 630*), Spektrofotometri UV-Vis (*Genesys IOS UV-Vis*)

Metode

Pembuatan air laut buatan (ALB)

Lakukan penimbangan 24,6 gram NaCl; 0,6 gram KCl; 1,36 gram CaCl₂; 6,2 gram MgSO₄; 4,66 gram MgCl₂ dan 0,18 gram NaHCO₃. Dibuat untuk 1 liter dengan aquadest. Kemudian ALB disaring agar terbebas dari partikel atau kotoran

Pembuatan Media pertumbuhan

Nutrisi pertumbuhan yang digunakan terdiri dari, 33 gram FeCl₃ sebagai sumber nitrat dilarutkan dalam 35 gram EDTA, 45 gram dekstrosa sebagai sumber energi, 84 gram KNO₃ sebagai sumber nitrogen, dan 54 gram pupuk TSP sebagai sumber fosfat yang dilarutkan dalam 18,9 gram EDTA kemudian dilarutkan dalam 1 liter aquadest. Media pertumbuhan ALB yang telah dibuat kemudian dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring untuk memisahkan kotoran yang ikut terbawa. Kemudian media pertumbuhan dan botol kaca untuk kultivasi dilakukan sterilisasi terlebih dahulu dengan menggunakan autoclave dengan suhu 120°C selama 15 menit untuk mencegah adanya mikroorganisme asing (Julianti *et al.*, 2018)

Kultivasi mikroalga

Kultur mikroalga dibuat 3 batch yang dilakukan dalam botol kaca 1L sebagai reaktornya. Siapkan larutan medium pertumbuhan yang telah dibuat. Siapkan 450 mL ALB dan masukkan kedalam botol kaca 1L, lakukan sterilisasi media pertumbuhan dan ALB dengan

autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit untuk mencegah adanya mikroorganisme asing. Biarkan suhu media pertumbuhan dan ALB menurun kemudian lakukan optimasi pH dengan kondisi netral dan salinitas dengan rentang 22-24 ppt. Tambahkan nutrisi ke dalam botol yang berisi ALB dan masukkan 450 mL indukan mikroalga ke dalam botol (Julianti *et al.*, 2018). Kultivasi dilakukan selama 14 hari dengan pengaturan pencahayaan dan pasokan sistem aerasi yang disesuaikan. Sumber pencahayaan yang digunakan didapat dari lampu Philips LED 19 watt 2300 lumen, dengan pengaturan pencahayaan gelap-terang yang dilakukan setiap 12 jam sesuai dengan kondisi asli di alam. Untuk sistem aerasi yang digunakan selama 14 hari selama kultivasi, digunakan alat aerator. Sistem aerasi ini digunakan untuk mencegah terjadinya penggumpalan atau pengendapan pada kultur *Chlorella pyrenoidosa*. Aerator akan menyempatkan gelembung-gelembung halus udara yang kemudian naik sehingga terjadi kontak oksigen dengan air di udara. Selama kultivasi berlangsung lakukan pengamatan pertumbuhan mikroalga dengan menggunakan haemocytometer dengan bantuan mikroskop binokuler.

Isolasi biomassa basah

Isolasi biomassa basah dilakukan dengan mematikan sistem aerasi pada hari ke-14, kemudian hasil kultur dibiarkan selama semalaman. Mikroalga yang mengendap kemudian dipisahkan dengan membuang air medium pertumbuhan. Selanjutnya endapan di sentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C (Fathurohman *et al.*, 2022) Proses sentrifugasi dilakukan beberapa kali agar hasil endapan dan supernatant dapat terpisah dengan baik.

Isolasi senyawa eksopolisakarida

EPS diisolasi dari supernatant hasil sentrifugasi biomassa basah. Metode isolasi senyawa EPS yang dilakukan mengacu pada penelitian Anindita (2020), meliputi presipitasi aseton dan deproteinase yang kemudian dikeringkan

menggunakan metode *freeze dry*. Prinsip isolasi EPS dengan metode presipitasi aseton yaitu supernatant dilakukan pemisahan melalui proses pengendapan EPS dengan penambahan aseton. Kemudian dilakukan penambahan aseton dengan perbandingan 1:2, campuran supernatant dengan aseton kemudian dibiarkan overnight selama 24 jam. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C dan dilakukan pengulangan sampai didapatkan endapan yang maksimal pada tabung sentrifugasi. Endapan yang terbentuk diidentifikasi sebagai EPS kasar.

EPS kasar hasil presipitasi kemudian dilakukan deproteinase untuk memisahkan EPS dengan garam atau protein yang ikut mengendap sehingga didapatkan EPS murni. Tahapan deproteinase dimulai dengan melarutkan EPS kasar menggunakan aquades dengan perbandingan 1:1. Kemudian ditambahkan asam trikloroasetat (TCA) 80% dengan perbandingan 25 µL/mL larutan (Anindita, 2020).

Setelah dilakukan deproteinase kemudian dilakukan pengeringan menggunakan metode *freeze dryer* atau pengeringan beku. Sebelum dilakukan *freeze dry*, supernatant EPS disimpan terlebih dahulu ke dalam *freezer* hingga mengalami pembekuan. Pembekuan ini bertujuan untuk mempercepat proses sublimasi dan juga untuk meminimalisir EPS yang terbuang akibat terhisap oleh vakum *freeze dryer*. Setelah membeku, EPS dimasukkan ke dalam vakum dan alat mulai dioperasikan. Waktu yang dibutuhkan untuk pengeringan dengan *freeze dryer* ini yaitu selama 24 jam (Gaidhani *et al.*, 2015)

Karakterisasi menggunakan instrument spektrofotometri FTIR

Isolat diidentifikasi menggunakan spektrofotometri FTIR untuk mengetahui gugus fungsi yang terdapat pada EPS *Chlorella pyrenoidosa*. Gugus fungsi ditentukan berdasarkan puncak serapan dari bilangan gelombang yang terdeteksi pada bilangan

gelombang 4000-600 cm^{-1} (Mutmainnah *et al.*, 2018).

Penentuan kandungan gula total EPS

Penentuan kandungan gula total digunakan metode fenol-sulfat. Sebelum pengujian kandungan gula sampel, dilakukan terlebih dahulu penentuan kurva standar glukosa yang digunakan. Kurva standar glukosa dibuat dengan melarutkan 1 mL larutan glukosa pada konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100 dan 120 ppm kedalam tabung reaksi dan di tambahkan larutan fenol 5% sebanyak 1 mL kemudian kocok. Kemudian tambahkan 5 mL H_2SO_4 pekat secara tegak lurus dan diamkan selama 10 menit kemudian kocok. Setelah itu tempatkan pada penangas air selama 15 menit (Nurhasanah *et al.*, 2020). Pengukuran absorbansi dilakukan dengan Spektrofotometri Uv-Vis pada panjang gelombang 483 nm. Tahapan pengujian kandungan gula sampel sama dengan standar glukosa, hanya saja larutan glukosa 1 mL diganti dengan 1 mL larutan sampel EPS *Chlorella pyrenoidosa*.

Uji aktivitas antioksidan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhidrazyl)

Pengujian aktivitas antioksidan metode DPPH yang dilakukan mengacu pada penelitian Fathurohman *et al.*, (2022) dengan sedikit modifikasi. Larutan DPPH dibuat dengan konsentrasi 500 ppm, sebanyak 12,5 mg DPPH dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL kemudian dilarutkan dengan methanol hingga tanda batas. Larutan sampel EPS *Chlorella pyrenoidosa* dibuat deret konsentrasi 100, 150, 200, 250, 300 dan 350 ppm dari larutan induk 1000 ppm lalu dimasukkan masing-masing kedalam labu takar 5 mL dicukupkan dengan methanol sampai tanda batas. Larutan asam askorbat dibuat deret konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5, dan 6 ppm dari larutan induk 100 ppm lalu dimasukkan masing-masing kedalam labu takar 5 mL kemudian dicukupkan methanol sampai tanda batas. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH diukur pada Spektrofotometer Uv-Vis pada area visible dengan rentang 400- 800 nm. Pengujian

antioksidan EPS *Chlorella pyrenoidosa* metode DPPH dilakukan dengan mengambil 1 mL larutan dari masing-masing deret konsentrasi kemudian dimasukkan ke dalam vial. Ditambahkan 1 mL larutan DPPH kemudian dilakukan ikubasi selama rentang waktu yang diperoleh dari operating time. Absorbansi diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Perlakuan yang sama dilakukan pada asam askorbat sebagai pembanding.

HASIL DAN PEMBAHASAN

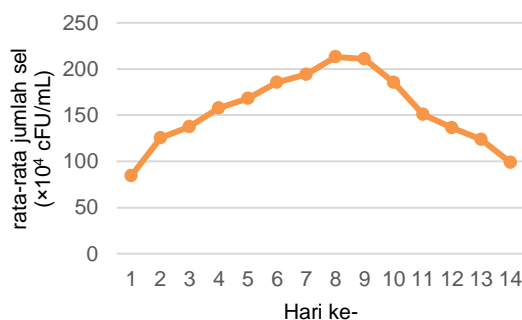
Kultivasi mikroalga *Chlorella pyrenoidosa*

Kultivasi bertujuan untuk mendapatkan kelimpahan sel mikroalga yang tinggi dengan kandungan nutrisi yang baik. Pada proses kultivasi ini, dibutuhkan media pertumbuhan yang disesuaikan dengan habitat aslinya di alam (Fathurohman *et al.*, 2022). Pada penelitian ini, digunakan air laut buatan (ALB) sebagai media pertumbuhan dengan penambahan nutrisi sesuai dengan kebutuhan mikroalga yang digunakan. Pada pembuatan media pertumbuhan perlu dilakukan terlebih dahulu pengecekan nilai salinitas dan pH guna memastikan kualitas ALB yang akan digunakan. Salinitas (kadar garam) berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroalga, hal ini menjadi salah satu faktor yang dapat mempengaruhi tekanan osmotik antara protoplasma sel organisme dengan lingkungannya (Setiasih, Sabdono and Pramesti, 2020). Hasil pengukuran dengan menggunakan salinometer yaitu 23 ppt, sesuai dengan penelitian Delgado,(2017) bahwa nilai salinitas yang baik dan optimal untuk pertumbuhan mikroalga air laut berada pada rentang 20-30 ppt. Salinitas yang lebih tinggi atau lebih rendah akan mengganggu proses metabolisme dan pertumbuhan mikroalga.

Diketahui hasil pengukuran pH ALB yaitu 7,03 yang berarti baik digunakan sebagai media pertumbuhan mikroalga. Berdasarkan penelitian VJ *et al.*,(2009) nilai pH yang digunakan untuk pertumbuhan *Chlorella sp.* berkisar antara 6-8 dimana pada kondisi

tersebut mikroalga *Chlorella sp.* dapat tumbuh dengan optimal.

Selama proses kultivasi berlangsung, dilakukan perhitungan kepadatan sel setiap harinya di waktu yang sama atau setiap 24 jam untuk mengamati laju pertumbuhan *Chlorella pyrenoidosa*. Untuk menghitung pertumbuhan sel digunakan alat *haemocytometer* dengan bantuan mikroskop binokuler dengan perbesaran 10x10. Hasil dari perhitungan kepadatan sel dibuat kedalam bentuk grafik untuk menunjukkan fase pertumbuhan *Chlorella pyrenoidosa*. Grafik pertumbuhan rata-rata *Chlorella pyrenoidosa* selama 14 hari dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik pertumbuhan mikroalga *Chlorella pyrenoidosa*

Pada Gambar 1. menunjukkan grafik pertumbuhan mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* selama 14 hari. Berdasarkan Hadiyanto & Azim, (2012), fase pertumbuhan mikroalga terdiri dari fase adaptasi (fase lag), fase eksponensial (fase log), penurunan fase log, fase stasioner, dan fase kematian. Pada hari ke-1 mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* mengalami fase adaptasi (fase lag) dimana pada fase ini mikroalga masih melakukan penyesuaian terhadap kondisi yang baru dan belum mengalami pembelahan sel sehingga perumbuhannya belum terlalu signifikan. Pada hari ke-2 sampai hari ke-7 mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* mengalami fase eksponensial (fase log) dimana pada rentang waktu tersebut mikroalga mengalami pertumbuhan yang semakin meningkat setiap harinya. Fase ini ditandai dengan terjadinya pertumbuhan sel yang cepat, sel membelah dengan laju

konstan, dan keadaan pertumbuhan seimbang antara supply nutrisi dan peningkatan jumlah sel. Pada hari ke-8 mikroalga mengalami penurunan fase log, dimana laju pertumbuhan *Chlorella pyrenoidosa* mengalami pelemahan. Pada fase ini ketersediaan nutrisi dari medium mulai berkurang karena semakin banyaknya jumlah sel yang tumbuh sehingga menghalangi masuknya cahaya kedalam medium. Pada hari ke-9 mikroalga mengalami fase stasioner, dimana pada fase ini laju pertumbuhan mikroalga relatif konstan dan mulai terjadi kematian akibat keterbatasan nutrisi pada media pertumbuhan. Pada hari ke 10 sampai hari ke-14 mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* memasuki fase kematian. Fase kematian ini terjadi karena kondisi kualitas air yang menurun dan kandungan nutrisi dalam media pertumbuhan yang semakin berkurang. Pada fase kematian ini kepadatan sel semakin berkurang karena laju kematian mikroalga lebih tinggi dibandingkan laju pertumbuhannya (Tewal *et al.*, 2021).

Isolasi biomassa basah

Isolasi biomassa basah dilakukan untuk memisahkan biomassa dengan larutan menggunakan teknik sentrifugasi. Prinsip pemisahan menggunakan metode sentrifugasi didasarkan pada pengendapan partikel yang memiliki massa lebih besar dengan memanfaatkan gaya sentrifugal. Sentrifugasi memungkinkan pemisahan biomassa dengan supernatan dengan cepat dan efisien (Julianti *et al.*, 2018). Hasil isolasi biomassa basah yang didapatkan dari mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* seberat 9,89 g.

Isolasi senyawa eksopolisakarida

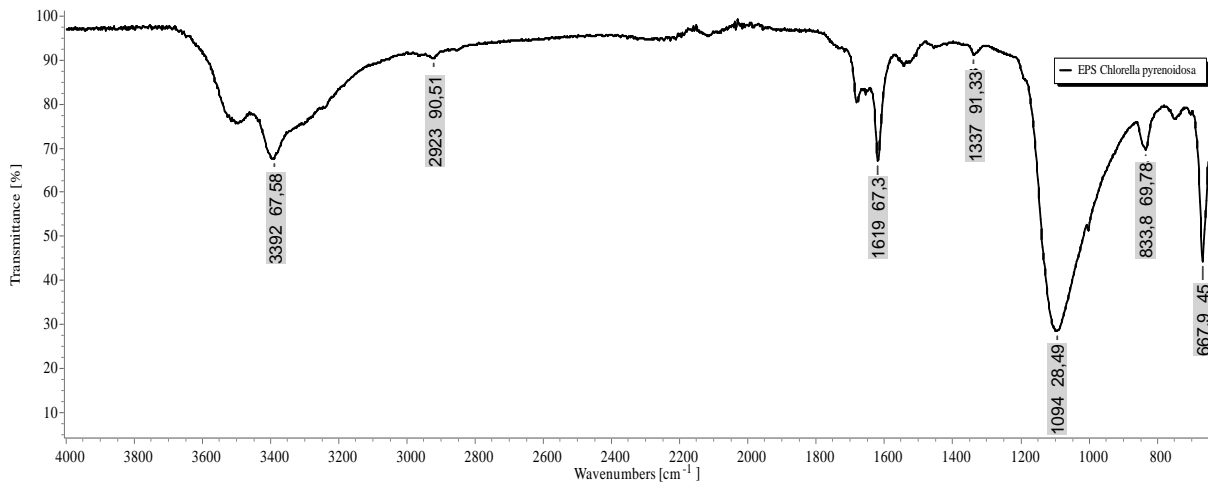
Isolasi senyawa eksopolisakarida dilakukan dengan metode presipitasi aseton dan deproteinase. Metode presipitasi didasarkan pada aseton yang merupakan pelarut organik, dimana pelarut organik memiliki konstanta dielektrik (Kd) lebih kecil daripada air dan tingkat kepolarannya juga lebih kecil daripada

air. Sedangkan EPS memiliki gugus hidroksil yang banyak sehingga memiliki sifat polar dan menyebabkan peningkatan konsentrasi aseton dalam larutan yang berdampak pada kelarutan EPS menjadi berkurang. Dengan kata lain, aseton dapat menyebabkan pengendapan EPS dengan cara menurunkan kelarutan EPS terhadap pelarut. Metode presipitasi aseton dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya, kelarutan aseton, pH dan waktu inkubasi setelah penambahan aseton (Sabilla and Susanti, 2019). Endapan hasil sentrifugasi yang terbentuk diindikasikan sebagai EPS kasar. Berat EPS kasar yang didapatkan dari presipitasi ini sebesar 2,6 g. Sedangkan prinsip deproteinase dengan penambahan TCA 80% ini yaitu terjadinya pengendapan protein akibat kondisi asam sehingga protein mengalami keadaan hidrofobik (Zhang *et al.*, 2021). Deproteinase dilakukan selama 12 jam inkubasi pada suhu ruang, kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit hingga didapat supernatant EPS yang terbebas dari protein.

Pengeringan EPS dilakukan dengan menggunakan metode *freeze dry*. Metode *freeze dry* dapat mengubah suatu bahan yang awalnya memiliki fasa cair menjadi bentuk padatan. Prinsip kerja dari *freeze dryer* yaitu merubah fase padatan (es) menjadi fase gas, sehingga ekstrak EPS yang dihasilkan dari metode ini akan memiliki kandungan air yang sangat kecil. Tujuan dilakukan *freeze dry* yaitu untuk mempertahankan mutu hasil pengeringan EPS, seperti menjaga kestabilan ekstrak serta menghambat terjadinya reaksi kimia yang dapat merusak kandungan kimia dari EPS (Nofrianti, 2013). Hasil ekstrak EPS yang didapatkan pada metode *freeze dry* ini sebanyak 1 g.

Karakterisasi menggunakan instrument spektrofotometri FTIR

Sampel EPS yang telah berbentuk serbuk kemudian dilakukan identifikasi gugus fungsi dengan menggunakan instrumen Spektrofotometri FTIR (ATR-FTIR). Analisis gugus fungsi EPS dengan menggunakan ATR-FTIR memiliki kelebihan diantaranya, proses sampling lebih mudah, variasi spektrum lebih lebar, tanpa menggunakan KBr grinding dan tanpa mempertimbangkan perbedaan ukuran partikel (Sanjiwani *et al.*, 2020). Prinsip kerja yang digunakan yaitu melihat adanya interaksi energi berupa sinar infrared dengan materi berupa senyawa kompleks yang mengakibatkan molekul-molekul bervibrasi. Vibrasi dapat terjadi karena energi yang berasal dari sinar infrared tidak cukup kuat untuk menyebabkan terjadinya eksitasi elektron pada molekul yang ditembak dimana besarnya energi vibrasi tiap atom atau molekul berbeda tergantung pada atom-atom dan kekuatan ikatan yang menghubungkannya sehingga dihasilkan frekuensi yang berbeda pula (Eliyana and Winata, 2017). Penentuan gugus fungsi sampel EPS *Chlorella pyrenoidosa* ditunjukkan dengan adanya puncak pita pada spektrum transmittan suatu bilangan gelombang. Gugus fungsi EPS dianalisis pada bilangan gelombang 4000-600 cm^{-1} . Spektra FTIR yang dihasilkan menunjukkan puncak-puncak serapan bilangan gelombang dari sampel uji. Gugus-gugus fungsi sampel uji ditentukan berdasarkan puncak serapan bilangan gelombang yang terdeteksi. Hasil pengukuran gugus fungsi EPS *Chlorella pyrenoidosa* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Spektrum FTIR eksopolisakarida *Chlorella pyrenoidosa*

Gugus fungsi yang dihasilkan spektrum FTIR pada Gambar 2. menunjukkan polisakarida yang dilihat dari adanya penyerapan khas eksopolisakarida yang kuat pada daerah

fingerprint. Keterangan dari setiap spektra yang dihasilkan dari pengukuran FTIR dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Gugus fungsi EPS *Chlorella pyrenoidosa*

Hasil pengukuran bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Frekuensi bilangan gelombang (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi
3392	3600-3200	O-H
2923	3000-2850	C-H
1619	1810-1640	C=O
1337	1470-1350	-C-H, CH ₂
1094	1300-1000	C-O-C

Pada **Tabel 1.** menunjukkan adanya beberapa gugus fungsi yang mengindikasikan karakteristik serapan yang berhubungan dengan polisakarida. Bilangan gelombang 3392 cm⁻¹ dengan puncak yang melebar menunjukkan adanya O-H stretching dari ikatan hidrogen intramolekuler dan merupakan karakteristik cincin karbohidrat (Winahyu Astika and Primadiamanti, 2020). Area puncak yang melebar pada bilangan gelombang 333,92 cm⁻¹ yang menunjukkan adanya O-H stretching yang membentuk ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen tersebut disebabkan oleh banyaknya gugus hidroksil yang membentuk ikatan hidrogen (Mulyani, Asmadi and Setiawan, 2021). Pada area *fingerprint* spektrum FTIR menunjukkan vibrasi C=O pada bilangan gelombang 1619 cm⁻¹ yang disebabkan oleh

glukosamin dan galaktosamin yang terdapat pada EPS (Zhang, Liu and Chen, 2019). Pergangan pada bilangan gelombang 2923 cm⁻¹ menunjukkan gugus fungsi C-H stretching golongan metil (Bramhachari and Dubey, 2006). Pada bilangan gelombang 1337 cm⁻¹ menunjukkan adanya tekukan (bending) gugus -C-H atau CH₂ yang menunjukkan adanya gugus karboksil atau karboksilat sebagai indikasi kandungan polisakarida. Gugus glikosil atau C-O-C pada bilangan gelombang 1094 cm⁻¹ menegaskan adanya kandungan polisakarida (Adesulu *et al.*, 2018). Serapan puncak pada 667,9 cm⁻¹ yang berada pada area *fingerprint* menunjukkan adanya ikatan α-glikosidik sesuai dengan penelitian yang dilakukan Chen *et al.*, (2016) pada penelitiannya yang menganalisis gugus EPS

pada berbagai strain, bahwa ikatan α -glikosidik berada pada rentang $835-653\text{ cm}^{-1}$. Beberapa gugus fungsi O-H, C-H, C=O, CH₂, C-O-C yang didapatkan pada pengujian menunjukkan bahwa pada sampel EPS yang dianalisis terdapat gula yang berikatan dengan ikatan glikosida serta menandakan bahwa senyawa yang dianalisis merupakan senyawa polisakarida.

Uji kandungan gula total EPS

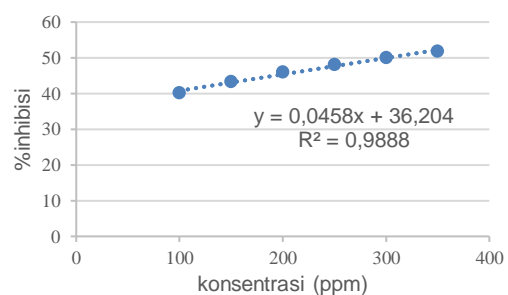
Analisis kandungan gula total EPS dari *Chlorella pyrenoidosa* dilakukan untuk mengetahui kemurnian eksopolisakarida dengan menggunakan metode fenol-asam sulfat. Metode ini digunakan karena struktur dasar eksopolisakarida adalah polimer yang tersusun dari gula dan metode ini mudah, cepat, sensitif, dan spesifik untuk senyawa golongan karbohidrat (Nielsen, 2010). Prinsip dari metode ini didasari pada dehidrasi polisakarida terhidrolisis menjadi turunan furfural selama reaksi dengan asam sulfat pekat yang kemudian membentuk kompleks berwarna dengan adanya fenol (Delattre *et al.*, 2016). Fungsi penambahan fenol dan asam sulfat pekat yaitu untuk mengkomplekskan warna pada sampel sehingga dapat terdeteksi dengan spektrofotometri UV-Vis. Sampel EPS *Chlorella pyrenoidosa* yang telah ditambahkan asam sulfat pekat berubah menjadi kuning kecoklatan. Hasil analisis kandungan gula total EPS *Chlorella pyrenoidosa* didapat nilai kandungan gula total 153,246 mg/L

Uji aktivitas antioksidan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhidrazy)

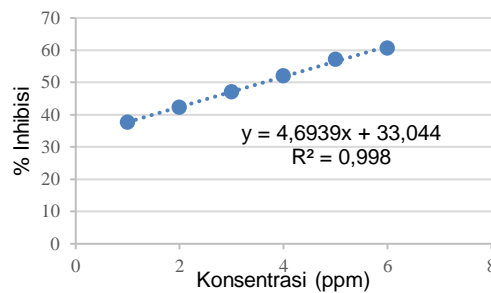
Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH didasarkan pada kemampuan antioksidan pada sampel untuk mendonorkan ion hidrogen. Adanya donor hidrogen pada senyawa antioksidan akan merubah senyawa radikal bebas DPPH yang berwarna ungu menjadi kuning pucat. Pada pengujian yang dilakukan terhadap sampel EPS *Chlorella pyrenoidosa*, perubahan warna yang terjadi yaitu dari ungu pekat menjadi ungu pucat (Pogaga, Yamlean and Lebang, 2020).

Perubahan warna dari ungu pekat menjadi ungu pucat untuk sampel EPS ini mengindikasikan bahwa aktivitas antioksidan yang didapat konsentrasinya tidak terlalu kuat. Sedangkan pada pengukuran terhadap senyawa pembanding vitamin C perubahan warna yang terjadi sudah sesuai, yaitu dari ungu pekat menjadi kuning pucat sehingga diindikasikan untuk vitamin C memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat dibanding sampel EPS *Chlorella pyrenoidosa*. Namun perubahan warna pada saat mereaksikan DPPH dengan sampel tidak dapat menentukan nilai kekuatan antioksidan, parameter yang digunakan untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah Inhibition concentration (IC₅₀) yaitu nilai yang menunjukkan konsentrasi antioksidan dengan kemampuan menghambat 50% aktivitas radikal bebas (Haeria, Hermawati and Dg.Pine, 2016). Kurva regresi antioksidan sampel EPS dan standar vitamin C dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4.

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 (Molyneux, 2004). Berdasarkan Winahyu Astika and Primadiamanti, (2020), tingkat kekuatan antioksidan dengan parameter IC₅₀ dikelompokkan menjadi, <50 ppm (sangat kuat), 50-100 ppm (kuat), 100-150 ppm (sedang) dan >150 ppm (lemah).



Gambar 3. Kurva EPS *Chlorella pyrenoidosa*



Gambar 4. Kurva standar vitamin C

Berdasarkan hasil analisis, sampel EPS *Chlorella pyrenoidosa* memiliki aktivitas antioksidan yang lemah dengan nilai IC_{50} 301,223 ppm. Sedangkan untuk vitamin C sebagai pembanding memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan IC_{50} 3,612 ppm, hal tersebut dikarenakan sifat vitamin C yang lebih stabil. Berdasarkan Wahdaningsih, (2022), suatu zat dikatakan mempunyai aktivitas antioksidan apabila nilai $IC_{50} < 200$ ppm, jika IC_{50} yang diperoleh berkisar antara 200-1000 ppm zat tersebut dikatakan lemah namun masih berpotensi sebagai antioksidan.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, EPS yang dihasilkan dari mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* dengan metode presipitasi aseton didapatkan berat EPS kering 1g dengan kandungan gula total sebesar 153,246 mg/L. Hasil karakterisasi dengan menggunakan FTIR menunjukkan adanya gugus khas Eksopolisakarida diantaranya O-H, C-H, C=O, CH₂, dan C-O-C. Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH, sampel EPS menunjukkan aktivitas antioksidan yang lemah dengan IC_{50} 301,223 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

Adesulu, A. T. *et al.* (2018) 'Production of exopolysaccharide by strains of *Lactobacillus plantarum* YO175 and OF101 isolated from traditional fermented cereal beverage', *PeerJ*, (1-21). doi: 10.7717/peerj.5326.

Agustina, S. and Herman, S. (2016) 'Potensi Mikroalga Sebagai Bahan Kimia ADI', *Portal Kimia dan Kemasan*, 3(1), pp.

122-130.

Anindita, N. S. (2020) 'Identifikasi Glukosiltransferase (Gtf) Penyandi Eksopolisakarida Pada Strain *Weissella Confusa* Probiotik Asal Air Susu Ibu (ASI)', *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 8(2), pp. 75-85.

Bramhachari, P. V. and Dubey, S. K. (2006) 'Isolation and characterization of exopolysaccharide produced by *Vibrio harveyi* strain VB23', *Letters in Applied Microbiology*, 43(5), pp. 571-577. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.01967.x.

Chen, L. *et al.* (2018) 'Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs', *Oncotarget*, 9(6), pp. 7204-7218. Available at: www.impactjournals.com/oncotarget/.

Chen, Z. *et al.* (2016) 'Isolation of exopolysaccharide-producing bacteria and yeasts from Tibetan kefir and characterisation of the exopolysaccharides', *International Journal of Dairy Technology*, 69(3), pp. 410-417. doi: 10.1111/1471-0307.12276.

Delattre, C. *et al.* (2016) 'Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides', *Biotechnology Advances*, 34(7), pp. 1159-1179. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.08.001.

Delgado, E. (2017) 'From Wetland to Saltland: Natural Obstacles and Socioecological Consequences in the Production of Solar Salt in Venezuela', *Society and Natural Resources*, 30(7), pp. 797-811. doi: 10.1080/08941920.2017.1290181.

Eliyana, A. and Winata, T. (2017) 'Karakterisasi FTIR pada Studi Awal Penumbuhan CNT dengan Prekursor Nanokatalis Ag dengan Metode', *Jurnal Fisika dan Aplikasinya*, 13(2), pp. 39-43.

Fathurohman, M. *et al.* (2022) 'Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Lutein dari Mikroalga *Dunaliella salina* dengan Metode ASE (Accelerated Solvent Extraction)', *Prosiding Seminar Nasional Diseminasi Hasil Penelitian Program Studi S1 Farmasi*, 2, pp. 185-194.

Gaidhani, K. A. *et al.* (2015) 'Lyophilization / Freeze Drying', *Kunal et al. World Journal of Pharmaceutical Research World Journal of Pharmaceutical Research SJIF Impact Factor* 5, 4(8), p. 517. Available at: www.wjpr.net.

- Hadiyanto and Azim, M. (2012) *Mikroalga :Sumber Pangan dan Energi Masa Depan*. 1st edn. Semarang: UPT UNDIP Press Semarang.
- Haeria, Hermawati and Dg.Pine, A. T. (2016) 'Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Bidara (*Ziziphus spina-christi* L.) Haeria', *Journal of Pharmaceutical and Medicinal Sciences*, 1(2), pp. 57–61.
- Julianti, E. *et al.* (2018) 'Isolate of Heterotrophic Microalgae As a Potential Source for Docohexaenoic Acid (Dha)', *Marine Research in Indonesia*, 43(2), pp. 79–84. doi: 10.14203/mri.v43i2.264.
- Molyneux, P. (2004) 'The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity', *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), pp. 211–219.
- Mulyani, L. N., Asmadi, A. and Setiawan, A. (2021) 'Potensi Mikroalga Symbion Spons Di Perairan Teluk Lampung Sebagai Sumber Senyawa Eksopolisakarida (EPS)', *Jurnal Farmasi Galenika*, 8(2), pp. 76–90.
- Mutmainnah, N. *et al.* (2018) 'Growth Rate and Chemical Composition of Secondary Metabolite Extracellular Polysaccharide (EPS) in Mikroalga *Porphyridium cruentum*', *J.Exp. Life Sci*, 8(2), pp. 97–102.
- Nielsen, S. S. (2010) *Food Analysis Laboratory Manual*. Available at: <http://cst.ur.ac.rw/library/Food Science books/batch1/Food Analysis Laboratory Manual Second Edition.pdf>.
- Nofrianti (2013) 'Metode freeze drying bikin keripik makin crunchy.', *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 2(1).
- Nurhasanah, N. *et al.* (2020) 'Analisis Eksopolisakarida Dari Bakteri Asam Laktat Hasil Fermentasi Kefir Kolostrum', *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*, 5(01), pp. 65–73. doi: 10.23960/aec.v5.i1.2020.p65-73.
- Pogaga, E., Yamlean, P. V. Y. and Lebang, J. S. (2020) 'Formulasi Dan Uji Aktivitas Antioksidan Krim Ekstrak Etanol Daun Murbei (*Morus alba* L.) Menggunakan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl)', *Pharmacon*, 9(3), pp. 349–356.
- Sabilla, I. A. and Susanti, E. (2019) 'Pemurnian Parsial Ekstrak Kasar Selulase *Bacillus Circulans* Dengan Metoda Pengendapan Aseton', *Jurnal Kimia Riset*, 4(1), p. 40. doi: 10.20473/jkr.v4i1.13177.
- Sanjiwani, N. M. S. *et al.* (2020) 'Pembuatan Hair Tonic Berbahan Dasar Lidah Buaya dan Analisis dengan Fourier Transform Infrared', *Widyadari*, 21(1), pp. 249–262.
- Setiasih, I. B., Sabdono, A. and Pramesti, R. (2020) 'Pengaruh Salinitas terhadap Pertumbuhan dan Aktivitas Antioksidan *Dunaliella salina* (Chlorophyceae: Dunaliellaceae)', *Journal of Marine Research*, 9(2), pp. 181–185. doi: 10.14710/jmr.v9i2.27028.
- Tewal, F. *et al.* (2021) 'Laju Pertumbuhan Dan Kepadatan Mikroalga *Dunaliella* sp. Pada Pemberian Timbal Asetat dengan Konsentrasi yang Berbeda', *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis*, 9(1), p. 30. doi: 10.35800/jplt.9.1.2021.33571.
- VJ, D., Murali, S. and MC, N. (2009) 'Phycoremediation efficiency of three micro algae *Chlorella vulgaris*, *Synechocystis salina* and *Geloeocapsa gelatiosa*', *Environmental Science*, 16(1&2), pp. 138–146.
- Wahdaningsih, S. (2022) 'Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol dan Fraksi N-Heksan Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*)', *Jurnal Pharmascience*, 9(2), p. 176. doi: 10.20527/jps.v9i2.13135.
- Winahyu Astika, D. and Primadimanti, A. (2020) 'Bioaktivitas Antioksidan Lotion Senyawa', *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*, 5(02), pp. 169–177.
- Zhang, J. *et al.* (2019) 'Characterization of exopolysaccharides produced by microalgae with antitumor activity on human colon cancer cells', *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, pp. 761–767. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.009.
- Zhang, J., Liu, L. and Chen, F. (2019) 'Production and characterization of exopolysaccharides from *Chlorella zofingiensis* and *Chlorella vulgaris* with anti-colorectal cancer activity', *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, pp. 976–983. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.05.117.
- Zhang, Y. *et al.* (2021) 'Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2



clinical trial', *The Lancet Infectious Diseases*, 21(2), pp. 181–192. doi: 10.1016/S1473-3099(20)30843-4.

