

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Mikroalga merupakan mikroorganisme bersel satu, membentuk koloni dan sangat banyak yang dijumpai pada perairan yang besar seperti pada laut, danau, sungai serta perairan payau. Mikroalga merupakan salah satu penghasil karotenoid terbesar dimana komposisi karotenoid yang terkandung dalam mikroalga terdiri dari β -karoten, lutein, astaxantin, zeaxantin, kriptoxantin, serta fukoxantin. Seluruhnya memiliki peran bagi kesehatan manusia. Karotenoid-karotenoid tersebut diproduksi oleh beberapa spesies mikroalga yaitu *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Anthospira platensis*, serta *Nannochloropsis oculata*. Karotenoid dari mikroalga juga telah terbukti sebagai antioksidan yang kuat dan juga telah terbukti dapat mencegah beberapa penyakit degenerative, kardiovaskular dan kanker.

Karotenoid merupakan pigmen yang paling umum yang terdapat dalam dan disintesis oleh semua mikroorganisme fotosintetik dan fungi [1]. Karotenoid berasal dari kelas terpenoid, berupa rantai poliena dengan 40 karbon yang dibentuk dari delapan unit isoprene C_5 , yang memberikan struktur karotenoid yang khas [2]. Karotenoid dikelompokkan menjadi dua kelompok yaitu karoten yang merupakan kelompok hidrokarbon $C_{40}H_{56}$ dan xantofil yang merupakan turunan karoten yang teroksidasi [3]. Semua xantofil disintesis oleh tanaman tinggi sementara violaxantin, anteraxantin, zeaxantin, neoxantin dan lutein, juga dapat disintesis oleh mikroalga.

Senyawa karotenoid merupakan salah satu antioksidan yang banyak dikembangkan. Jenis karotenoid yang telah diketahui sekitar 700 jenis senyawa [4]. Jenis karotenoid diantaranya adalah astaxantin, zeaxantin, lutein, α -karoten, β -karoten, δ -karoten, myxoxantin, fukoxantin, violaxantin, alloxantin, dinoxantin, canthaxantin, gyroxantin, diadinoxantin, kriptoxantin dan peridinin. Beberapa

karotenoid mempunyai kekuatan antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan vitamin A, vitamin C, ataupun vitamin E[5].

Penggunaan mikroalga untuk produksi karotenoid mulai banyak diminati. Beberapa keuntungan penggunaan mikroalga untuk produksi karotenoid adalah siklus hidupnya pendek sehingga waktu panennya lebih cepat, serta dapat dikultivasi di tempat yang tidak terlalu luas. Beberapa mikroalga yang banyak dikembangkan sebagai sumber antioksidan adalah *Spirulina platensis*, *Spirulina maxima*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella ellipsodea*, *Chlorella vulgaris*, dan *Chlorella zofingiensis* [3].

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif, sehingga dapat merusak sel[1]. Antioksidan memiliki peran penting untuk menjaga kesehatan. Hal ini disebabkan oleh kemampuan oksidan dalam menghambat radikal bebas. Radikal bebas merupakan molekul kimia yang memiliki elektron bebas dan bersifat sangat reaktif untuk mencari pasangan elektron agar menjadi stabil. Saat ini banyak produk biomassa alga diudidayakan untuk nutrisi manusia, bahan kosmetik dan produk kesehatan. Selain pasar makanan, kesehatan juga telah menggunakan mikroalga sebagai suplemen gizi manusia dan hewan untuk waktu yang lama.



Penelitian epidemiologi telah menunjukkan bahwa adanya hubungan terbalik antara mengkonsumsi buah-buahan dan sayur-sayuran dengan angka kematian disebabkan oleh penyakit seperti jantung koroner dan kanker yang kemungkinan disebabkan oleh aktivitas antioksidan oleh makanan tersebut [2]. Mikroalga bisa menjadi sumber antioksidan alami yang berkelanjutan dan handal karena dapat dikultivasi dalam skala kecil maupun skala besar. Selain itu kualitas dari sel-sel mikroalga dapat dikontrol sehingga tidak memerlukan herbisida, pestisida, atau zat beracun lainnya.

Mikroalga merupakan sumber daya alam yang dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan alami, terlebih lagi biodiversitasnya luas dibanding tumbuhan tingkat tinggi. Namun, tidak semua kelompok mikroalga dapat digunakan sebagai sumber

antioksidan alami karena tergantung dari komponen target, laju pertumbuhan, kemudahan dalam budidaya, dan faktor lainnya [2].

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas maka dapat dirumuskan suatu permasalahan sebagai berikut:

1. Berapa besar β -karoten yang dihasilkan dari spesies mikroalga *Scenedesmus* dan *Chlorella*.
2. Berapa besar total klorofil dari spesies mikroalga *Scenedesmus* dan *Chlorella*.

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang diatas maka tujuan dari penelitian ini sebagai berikut:

1. Menentukan kadar β -karoten yang dihasilkan dari spesies mikroalga *Scenedesmus* dan *Chlorella*.
2. Menentukan total klorofil dari isolat mikroalga *Scenedesmus* dan *Chlorella*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah :

1. Dapat kadar β -karoten yang dihasilkan dari spesies mikroalga *Scenedesmus* dan *Chlorella*.
2. Mengetahui kadar total klorofil dari spesies mikroalga *Scenedesmus* dan *Chlorella*.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga

Mikroalga merupakan kelompok tumbuhan berukuran renik yang termasuk dalam kelas alga, diameternya antara 3-30 μm , baik sel tunggal maupun koloni yang hidup di seluruh wilayah perairan tawar maupun laut, yang lazim disebut fitoplankton. Di dunia mikrobial, mikroalga termasuk eukariotik, umumnya bersifat fotosintetik dengan pigmen fotosintetik hijau (klorofil), coklat (fikosantin), biru kehijauan (fikobilin), dan merah (fikoeritrin). Morfologi mikroalga berbentuk uniseluler atau multiseluler tetapi belum ada pembagian tugas yang jelas pada sel-sel komponennya. Hal itulah yang membedakan mikroalga dari tumbuhan tingkat tinggi [3].

Mikroalga merupakan salah satu organisme tertua di dunia, merupakan thallophyta (tanaman yang kekurangan akar, batang, dan daun) yang memiliki klorofil sebagai pigmen fotosintesis primer. Mekanisme fotosintesis mikroalga mirip dengan tanaman tingkat tinggi. Mikroalga umumnya lebih efisien mengubah energi surya karena strukturnya yang sederhana. Selain itu, karena sel mikroalga tumbuh pada suspensi berair, mikroalga memiliki akses yang lebih efisien ke udara, CO_2 dan nutrisi lainnya [4].

Isnansetyo dan Kurniastuty (1995), menyatakan bahwa terdapat empat kelompok mikroalga antara lain: diatom (Bacillariophyceae), alga hijau (Chlorophyceae), alga emas (Chrysophyceae) dan alga biru (Cyanophyceae). Penyebaran habitat mikroalga biasanya di air tawar (limnoplankton) dan air laut (haloplankton), sedangkan sebaran berdasarkan distribusi vertikal di perairan meliputi plankton yang hidup di zona euphotik (ephiplankton), hidup di zona disphotik (mesoplankton), hidup di zona aphotic (bathylplankton) dan yang hidup di dasar perairan bentik (hypoplankton) [5].

2.2 Spesies Mikroalga

Mikroalga merupakan senyawa alami untuk berbagai senyawa penting termasuk pigmen. Selain xantofil utama mikroalga juga dapat mensintesis xantofil tambahan misalnya loroxantin, asxatantin, dan kastaxantin. Beberapa jenis mikroalga hijau seperti *Dunaliella sp* dan *Haematococcus pluvialis* dapat menjadi merah ketika mengakumulasi karotenoid dengan konsentrasi tinggi pada kondisi yang sesuai. Ini merupakan beberapa jenis mikroalga yang sering dikultur untuk dimanfaatkan yaitu

a. *Chlorella*

Chlorella merupakan spesies mikroalga hijau yang dijumpai disemua habitat air dan telah diisolasi dari air tawar serta habitat air laut (iwamoto,2004), *Chlorella pyreniodesa* diketahui sebagai penghasil jenis karotenoid seperti β -karoten, α -karoten, lutein, zeaxantin, astaxantin, dan neoxantin. Mikroalga *Chlorella pyreniodesa* menghasilkan senyawa lutein kasar 100 $\mu\text{g/g}$ berat basah selnya. Dari hasil fraksinasi dan purifikasi diperoleh ekstrak lutein murni sebesar 0,078 $\mu\text{g/g}$ berat basah sel mikroalga [6]. Di dalam tubuhnya terdapat kloroplas berbentuk mangkuk. Perkembangbiakannya terjadi secara vegetatif dengan membelah diri. Setiap selnya mampu membelah diri dan menghasilkan empat sel baru yang tidak mempunyai flagel.

Sel *Chlorella sp.* berbentuk bulat atau bulat telur dan umumnya merupakan alga bersel tunggal (unicellular), meskipun kadang-kadang dijumpai bergerombol. Diameter selnya berkisar antara 2-8 mikron, berwarna hijau, dan dinding selnya keras yang terdiri dari selulosa dan pektin, serta mempunyai protoplasma yang berbentuk cawan. *Chlorella sp.* dapat bergerak tetapi sangat lambat sehingga pada pengamatan seakan-akan tidak bergerak (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Morfologi *Chlorella sp.*

Klasifikasi *Chlorella sp.* sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Phylum : Chlorophyta

Kelas : Chlorophyceae

Ordo : Chlorococcales

Family : Chlorellaceae

Genus : Chlorella

Species : *Chlorella sp.*



Gambar 2.1 Bentuk sel mikroalga *Chlorella*

b. *Scenedesmus*

Scenedesmus merupakan mikroalga yang bersifat kosmopolit. Sebagian besar *Scenedesmus* dapat hidup di lingkungan akuatik seperti perairan tawar dan payau. *Scenedesmus* juga ditemukan di tanah atau tempat yang lembab. Sel *Scenedesmus* berbentuk silindris dan umumnya membentuk koloni. Koloni *Scenedesmus* terdiri dari 2, 4, 8, atau 16 sel tersusun secara lateral. Ukuran sel bervariasi, panjang sekitar 8-20 μm dan lebar sekitar 3-9 μm . Struktur sel *Scenedesmus* sederhana. Sel *Scenedesmus* diselubungi oleh dinding yang tersusun atas tiga lapisan, yaitu lapisan dalam yang merupakan lapisan selulosa, lapisan tengah merupakan lapisan tipis yang strukturnya seperti membran, dan lapisan luar, yang menyelubungi sel dalam koloni. Lapisan luar berupa lapisan seperti jaring yang tersusun atas pektin dan dilengkapi oleh bristles.

Scenedesmus dapat dibagi menjadi 10 divisi dan 8 divisi algae merupakan bentuk unicellulair. Dari 8 divisi algae, 6 divisi telah digunakan untuk keperluan budidaya perikanan sebagai pakan alami. Setiap divisi mempunyai karakteristik yang ikut memberikan andil pada kelompoknya, tetapi spesies-spesiesnya cukup memberikan perbedaan-perbedaan dari lainnya. Ada 4 karakteristik yang digunakan untuk membedakan divisi mikro algae yaitu ; tipe jaringan sel, ada tidaknya flagella, tipe komponen fotosintesa, dan jenis pigmen sel. Selain itu morfologi sel dan bagaimana sifat sel yang menempel berbentuk koloni / filamen adalah merupakan informasi penting didalam membedakan masing-masing group.

Klasifikasi mikrolaga *Scenedesmus sp*

Kingdom : Plantae

Divisi : Chlorophyta

Kelas : Chlorophyceae

Ordo : Chloococcales

Famili : Scenedesmaceae

Species : *Scenedesmus dimorphus*



Gambar 2.2 Bentuk sel mikroalga *Scenedesmus sp*

2.3 Budidaya Mikroalga

Mikroalga merupakan organisme autotrof yang tumbuh melalui proses fotosintesis. Struktur uniseluler mikroalga memungkinkan mengubah energi menjadi energi kimia dengan mudah. Mikroalga dapat tumbuh dimana saja baik di ekosistem perairan maupun ekosistem darat. Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga, diantaranya faktor abiotik (cahaya matahari, temperatur, nutrisi, O_2 , CO_2 , salinitas), faktor biotik (bakteri, jamur, virus, dan kompetisi dengan mikroalga yang lain), serta faktor teknik (cara pemanenan, dll). Mikroalga dapat tumbuh sangat cepat pada kondisi iklim yang tepat. Umumnya, mikroalga menduplikasikan diri dalam jangka waktu 24 jam atau bahkan 3,5 jam selama dalam fasa pertumbuhan eksponensial [7].

2.4. Fasa Pertumbuhan Mikroalga

Mikroalga mempunyai fase pertumbuhan yang berbeda pada masing-masing jenisnya. Pertumbuhan sel dapat diamati dengan melihat pertumbuhan sel atau mengamati ukuran sel dalam satuan tertentu. Cara kedua lebih sering digunakan untuk mengetahui pertumbuhan mikroalga dalam media kultur dengan menghitung kepadatan sel atau kelimpahan sel setiap waktu [8]. Selama pertumbuhan,

mikroalga mengalami tahap fase pertumbuhan [8].

a. Fase adaptasi

Pada fase ini peningkatan paling signifikan terlihat pada ukuran karena secara fisiologis mikroalga menjadi sangat aktif. Metabolisme terjadi tetapi pembelahan sel terjadi sangat sedikit disebabkan oleh adaptasi sel dengan lingkungan baru.

b. Fase logaritmik (fase eksponensial)

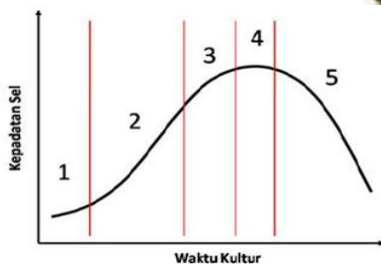
Fase ini dimulai dengan pembelahan sel dengan laju pertumbuhan yang meningkat secara intensif. Jika kondisi kultur optimum maka laju pertumbuhan dapat mencapai nilai maksimal. Pada fase ini merupakan fase terbaik untuk memanen metabolit primer.

c. Fase stasioner

Fase dimana medium pertumbuhan mikroorganisme kekurangan nutrisi yang dibutuhkan untuk mikroorganisme tumbuh sehingga pembelahan sel tidak secepat fase eksponensial.

d. Fase kematian

Fase kematian pada mikroorganisme disebabkan karena nutrisi pada medium habis hingga sel mencapai fase kematian.



Keterangan:

1. Fase lag
2. Fase logaritmik
3. Fase penurunan laju pertumbuhan
4. Fase stasioner
5. Fase kematian

Gambar 2.3 Kurva pertumbuhan mikroalga [8].

2.5. Macam-macam pigmen pada Mikroalga

Karotenoid memainkan peran penting dalam spesies oksigen reaktif (ROS) yang dihasilkan selama fotosintesis, terutama singlet oksigen. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa kontribusi karotenoid yang signifikan dengan total kapasitas anti oksidan dari mikroalga (Jahnke 1999; Takaichi 2011). Produksi mikroalga

sudah dilakukan secara komersial sebagai sumber antioksidan karotenoid (misalnya *Haematococcus* untuk astaxanthin, *Dunaliella* untuk β -karoten) untuk digunakan sebagai aditif dalam aplikasi makanan dan pakan, serta digunakan dalam kosmetik dan suplemen makanan (Pulz dan Gross 2004;. Spolaore et al 2006). Dapat dilihat pada gambar 2.4 merupakan struktur dari β - karoten *Dunaliella salina* dan astaxanthin dari *Haematococcus* [9].

Karotenoid yang memiliki pigmen lipofilik dengan struktur isoprenoid disintesis dalam organisme fotosintetik. Karotenoid utama bertindak sebagai pigmen dalam perkembangbiakan yang dipengaruhi cahaya selama fotosintesis. Karotenoid yang kedua kemungkinan untuk memproteksi cahaya pada pengangkatan oksigen yang reaktif. Karotenoid yang pada umumnya diketahui sebagai antioksidan yang efisien untuk pendinginan oxygen singlet dan penjebakan peroksid radikal dan penting dalam memproteksi kerusakan pada oksidatif. Bioaktivitas astaxantin (seperti proteksi cahaya uv, dan aktifitas anti inflamasi) dilaporkan bermanfaat untuk kesehatan manusia karena aktifitas antioksidan yang sangat kuat [10].

Mikroalga adalah salah satu sumber daya laut yang penting untuk pangan, pakan, dan obat sejak zaman kuno di barat [11]. Mikroalga dikelompokkan dalam tiga divisi utama yaitu Chlorophyceae (alga hijau), Pheophyceae (alga coklat), dan Rhodophyceae (alga merah).

Karotenoid menunjukkan aktivitas biologis sebagai antioksidan, mempengaruhi pertumbuhan sel, dan modulasi ekspresi gen dan kekebalan tubuh. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat mencegah terjadinya proses oksidasi radikal bebas. Pada manusia reaksi oksidasi, didorong oleh spesies oksigen reaktif yang jika tidak dinonaktifkan oleh karotenoid maka akan mengakibatkan kerusakan protein dan mutasi DNA, pada akhirnya menyebabkan penyakit kardiovaskular, beberapa jenis kanker, penyakit degeneratif, dan penuaan. Karotenoid mampu menyerap energy eksitasi singlet radikal kedalam rantai, sehingga melindungi jaringan dari kerusakan kimiawi. Bukti epidemiologi menunjukkan hubungan antara



tingginya asupan konsentrasi karotenoid dengan rendahnya resiko penyakit kronis [12].

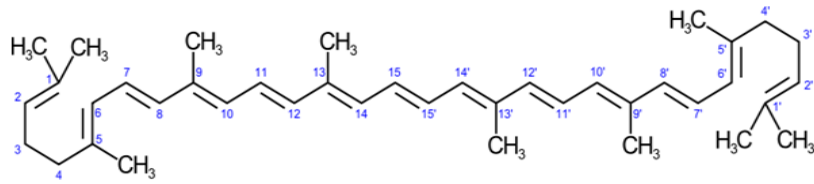
Mikroalga digunakan sebagai makanan dengan manfaat dan potensi gizi serta manfaat bagi industri dan obat-obatan untuk berbagai tujuan [13]. Aktivitas antioksidan *Padina minor* menunjukkan peran yang potensial sebagai produk nutraceutical dan cosmeceutical [14]. Sementara hasil penelitian yang dilakukan oleh Zahra et.al (2007) menunjukkan bahwa alga *Sargassum boveanum* berpotensi menjadi sumber aktioksdan alami. Banyak mikroalga menghasilkan senyawa bioaktif seperti antibiotik, algisida, senyawa farmasi aktif dan pengatur oertumbuhan tanaman [15]. Antibiotik telah diperoleh dari berbagai jenis alga dimana alga juga telah diteliti sebagai sumber vitamin dan precursor vitamin, terutama asam askorbat, riboflavin, dan α , β dan γ tokoferol.

Beta karoten dan karotenoid lainnya (astaxantin dan lutein) merupakan bagian integral dari fotosintesis yang juga ditemukan pada alga dan berfungsi sebagai pigmen aksesori di kompleks pemanen cahaya (light harvesting) dan sebagai pigmen pelindung melawan produk oksigen aktif yang terbentuk dari fotooksidasi. Diantara berbagai produk mikroalga yang telah dieksplorasi potensi komersialnya seperti *Dunaliella*, *Chlorella* dan *Spirulina* merupakan tiga mikroalga yang telah berhasil dikultur untuk menghasilkan senyawa berharga seperti lipid, protein, dan pigmen [16]. Beberapa karotenoid yang penting tersebut adalah sebagai berikut:

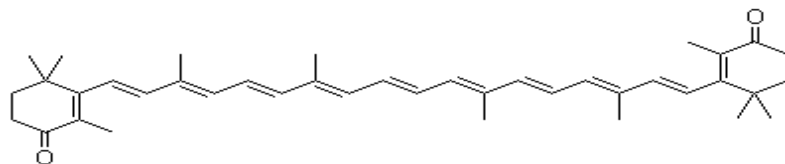
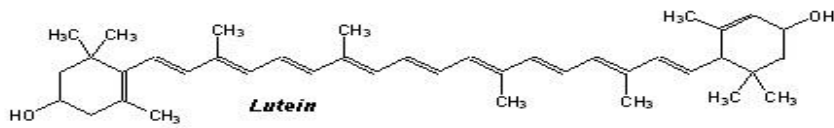
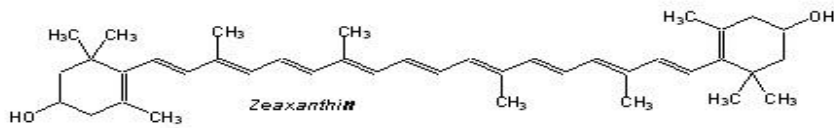
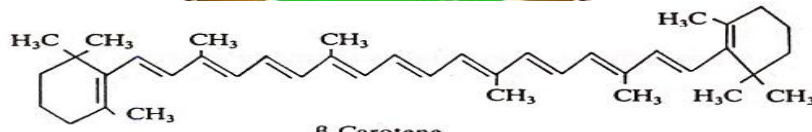
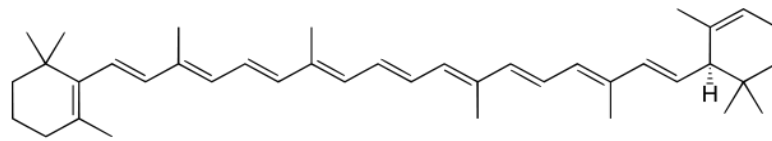
a. Beta-karoten

Beta-karoten merupakan jenis kerotenoid yang paling banyak jumlahnya di alam dan hamper semua tanaman mengandung beta-karoten. *Dunaliella* mampu mengakumulasi beta-karoten dalam konsentrasi yang sangat tinggi saat dikultur dengan kondisi stress lingkungan. Tidak seperti astaxantin, likopen dan kriptoxantin, beta-karoten dapat diubah menjadi vitamin A didalam tubuh. Cincin beta dari beta-karoten didalam tubuh akan diubah menjadi vitamin A oleh enzim 15,15' dioksigenasi menjadi 2 molekul retinal, kemudian molekul retinal akan direduksi menjadi retinol yang merupakan vitamin A [17]. Struktur kimia beta-

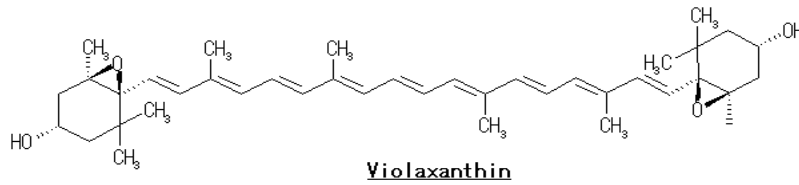
karoten dan beberapa karotenoid lainnya yang diproduksi oleh alga disajikan pada gambar dibawah ini.



likopen



Cantaxantin



Gambar 2.4 Struktur kimia karotenoid yang diproduksi oleh beberapa mikroalga

Karotenoid khususnya beta-karoten memiliki aktifitas antioksidan yang sangat tinggi sehingga mampu mengurangi penyakit jantung, strok, semua penyakit kardiovaskular, dan melindungi tubuh dari resiko kanker paru-paru, payudara, dan prostat [18]. Beta-karoten dalam mendiaktivasi radikal bebas diawali dengan proses peroksidasi lemak, karena beta-karoten merupakan salah satu antioksidan lemak [19]. Aktifitas antioksidan dari trans-beta-karoten lebih tinggi dari is-beta-karoten. Senyawa beta-karoten dalam bentuk isomer trans mempunyai aktivitas provitamin A sebesar 100%. Perubahan struktur kimia dari bentuk trans ke bentuk cis mengalami penurunan aktivitas dari 100% menjadi 30% [20].

b. Fukoxantin

Fukoxantin adalah golongan senyawa karotenoid berwarna orange, yang dapat dibedakan dengan anggota karotenoid lain, seperti karoten pada wortel atau likopen yang memberikan warna merah pada tomat. Sebagian fukoxantin berasal dari alga coklat, yakni jenis yang sering digunakan sebagai makanan tradisional jepang wakame (*Undaria pinnatifida*). Fukoxantin memiliki aktifitas kanker pada tikus uji, menghambat pertumbuhan sel tumor, dan menginduksi apoptosis pada sel kanker. Karotenoid tidak hanya bertindak sebagai antioksidan saja, tetapi juga dapat bertindak sebagai prooksidan. Ikatan rangkap terkonjugasi yang dimiliki oleh fukoxantin dan neoxantin dianggap sangat rentan terhadap asam, alkali, dan oksigen. Aktifitas prooksidan inilah yang diduga berperan untuk menginduksi apoptosis pada sel kanker [21].

c. Astaxantin

Astaxantin adalah pigmen karotenoid golongan xantofil yang dikenal sebagai sebagai antioksidan biologis yang baik. Astaxantin bias ditemukan pada mikroalga yang hidup diperairan seluruh dunia, serta pada hewan laut seperti salmon segar,

udang dan lobster [22]. Astaxantin digunakan sebagai sumber pigmentasi yang memberikan warna merah muda pada organisme organisme tersebut. Dalam berbagai penelitian, astaxantin telah terbukti menunjukkan efek pemadaman yang kuat terhadap singlet oksigen, kemudian melepaskan energi dalam bentuk panas, dan menetralkan radikal bebas yang selanjutnya mencegah dan menghentikan reaksi oksidasi [22]. Aktivitas astaxantin diyakini merupakan mekanisme utama dari aktivitas perlindungan dari fotooksidasi oleh sinar UV, inflamasi, kanker, penuaan, dan penyakit yang terkait dengan usia, peningkatan respon system imun, fungsi hati dan jantung, kesehatan mata, persendian, dan prostat [22]. Astaxantin dapat dihasilkan secara bioteknologi oleh sejumlah mikroorganisme, dan yang paling baik adalah oleh *Hematococcus pluvialis* yang mengakumulasi astaxantin sebagai respon terhadap stress lingkungan seperti radiasi, suhu, dan salinitas yang tinggi [23].

d. Lutein dan Zeaxantin

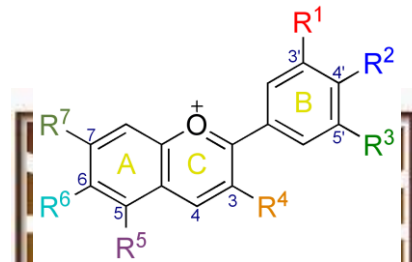
Jenis karotenoid yang lain yaitu lutein dan zeaxantin yang mampu mengobati penyakit kanker kulit dan mata. Beberapa studi telah dilakukan untuk mengetahui hubungan antara kadar plasma lutein dan zeaxantin dan resiko pengembangan penyakit denganarasi macular akibat usia (AMD). Peningkatan asupan makanan atau suplemen yang kaya lutein dan zeaxantin, meningkatkan kadar plasma yang positif dan signifikan yang terkait dengan kepadatan pigmen makula optic sehingga menurunkan resiko pengembangan AMD [24]. Sebagai antioksidan, lutein dan zeaxantin membantu untuk melawan radikal bebas yang dapat membahayakan mata dan melindungi makula mata dari reaksi fotokimia yang merugikan. Manfaat kesehatan lain dari zeaxantin adalah membantu menyaring sinar biru yang berenergi tinggi. Sinar biru dapat menjadi fototoksik bagi retina di makula. Diyakini bahwa zaexantin memblok cahaya biru, sehingga mengurangi resiko kerusakan yang disebabkan cahaya oksidatif yang dapat menyebabkan AMD [25]. Demikian juga karotenoid diekstraksi kususnya dari *Chlorella* yang terbukti dapat menghambat perkembangan kanker pada manusia [26].



e. Antosianin

Antosianin merupakan salah satu zat warna (pigmen) alami dengan sifat antioksidan, serta paling banyak ditemukan didalam bagian-bagian tanaman termasuk mikroalga, dimana pigmen ini termasuk kepada golongan flavonoid yang larut dalam air, memiliki warna merah hingga biru.

Pigmen berwarna kuat ini, ialah penyebab utama tanaman memiliki berbagai warna. Antosianin mengandung glikosida dimana kandungan utamanya merupakan sifat gula (sebagian besar glukosa, namun ada juga galaktosa, silosa, dan arabinosa), letak ikatan gula (3 dan 5- hidroksil).

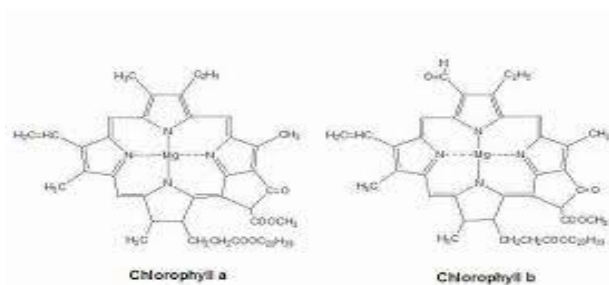


Gambar 2.4 Struktur umum dari Antosianin

f. Klorofi

Klorofil adalah pigmen pemberi warna hijau pada tumbuhan, alga dan bakteri fotosintetik. Senyawa ini yang berperan dalam proses fotosintesis tumbuhan dengan mengubah dan menyerap tenaga cahaya menjadi tenaga kimia. Dalam proses fotosintesis, terdapat 3 fungsi utama klorofil yaitu memanfaatkan energi matahari, memicu fiksasi CO₂ menjadi karbohidrat dan menyediakan dasar energetik bagi ekosistem secara keseluruhan. Dan karbohidrat yang dihasilkan diubah menjadi protein, lemak, asam nukleat, dan molekul organik lainnya.

Pada tanaman tingkat tinggi ada dua macam jenis klorofil yaitu klorofil a yang berwarna hijau tua dan klorofil b yang berwarna hijau muda. Klorofil a dan b paling kuat menyerap cahaya di bagian merah (600-700 nm), sedangkan yang paling sedikit cahaya hijau pada (500-600 nm), sedangkan spektrum biru dari cahaya tersebut diserap oleh karotenoid.



Gambar 2.5 Struktur dari klorofil a dan klorofil b

2.6. Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menangkal radikal bebas dan merupakan senyawa pemberi electron atau reduktan. Selain itu, antioksidan ini juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif, sehingga dapat menghambat kerusakan sel [27]. Reaksi oksidasi didorong oleh spesies oksigen reaktif yang jika tidak dinonaktifkan oleh karotenoid maka akan menyebabkan kerusakan protein dan mutasi DNA dan pada akhirnya dapat menyebabkan penyakit kardiovaskular.

Mikroalga hijau secara umum mengandung senyawa klorofil a dan klorofil b, serta senyawa karoten yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. Umumnya, senyawa kimia yang dihasilkan oleh jenis mikroalga hijau adalah senyawa terpenoid dan senyawa aromatik yang memiliki aktifitas sebagai antiinflamasi, antimikroba, antivirus, antimutagen, dan insektisida [28].

Secara alami, tubuh mempunyai benteng yang dapat mencegah serangan radikal bebas yang disebut anti radikal bebas (antioksidan). Kegunaan utama antioksidan adalah untuk menghentikan atau memutus reaksi berantai dari radikal bebas yang terdapat dalam tubuh. Berdasarkan sumbernya, antioksidan dapat digolongkan menjadi dua yaitu antioksidan alami dan sintetis. Contoh antioksidan alami adalah senyawa-senyawa turunan fenol, flavonoid, asam oksalat, dan asam galat. Sedangkan, contoh antioksidan sintetis adalah BHT dan BHA.

Salah satu pengujian antioksidan yang sering digunakan adalah pengujian metode DPPH, dimana DPPH ini merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu

kamar dan sering digunakan untuk menilai aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam. Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang dan absorbansi pada panjang gelombang 517 nm akan hilang, ini dikemukakan oleh (Green,2004;Gurav et al,2007).

2.7. HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Kromatografi cair berperforma tinggi (HPLC) merupakan salah satu teknik kromatografi untuk zat cair yang biasanya disertai dengan tekanan tinggi. Pemisahan dengan HPLC dapat dilakukan dengan fase normal (jika fase diamnya lebih polar dibandingkan dengan fase geraknya) atau fase terbalik (jika fase diamnya kurang non polar dibandingkan dengan fase geraknya). Berdasarkan pada kedua pemisahan ini, sering kali HPLC dikelompokkan menjadi HPLC fase normal dan HPLC fase terbalik. Selain klasifikasi di atas, HPLC juga dapat dikelompokkan berdasarkan pada sifat fase diam.

Prinsip dasar dari HPLC adalah pemisahan analit-analit berdasarkan kepolarannya. Adapun prinsip kerja dari alat HPLC adalah ketika suatu sampel yang akan diujikan diinjeksikan ke dalam kolom maka sampel tersebut kemudian akan terurai dan terpisah menjadi senyawa kimia (analit) sesuai dengan perbedaan afinitasnya. Hasil pemisahan tersebut kemudian dideteksi oleh detektor pada panjang gelombang tertentu, hasil yang muncul dari detektor tersebut dicatat oleh recorder yang biasanya dapat ditampilkan menggunakan integrator atau menggunakan personal computer (PC) yang terhubung dengan alat HPLC tersebut.

Efisiensi pemisahan kolom HPLC tidak hanya tergantung pada kualitas kolom, namun juga pada bagaimana kolom digunakan secara umum, kolom yang sering digunakan adalah silika. Kestabilan mekanik yang besar sangat baik sifat permukaan fisikokimia, berbagai ikatan kimia dan kompatibel dengan berbagai pelarut organik.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Andalas dan dimulai pada bulan Mei sampai bulan Oktober.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pompa aquarium, selang (diameter 10 mm), neraca, mikroskop cahaya, spektroskopi UV-Vis Genesys 20, sonikator, autoklaf, sentrifus, HPLC, dan peralatan gelas lainnya.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikroalga *Scenedesmus*(AUMA 25) dan *Chlorella*(AUMA 20) yang diperoleh dari stok yang sudah berada di laboratorium biokimia, media pertumbuhan BBM terdapat pada lampiran 7, aquadest, diklorometil, n-heksan, dan methanol, standar β -karoten.



3.3. Cara Kerja

3.3.1 Pengamatan Sel Mikroalga

Kultur mikroalga *Scenedesmus* dan *Chlorella* yang diperoleh dari stok di laboratorium biokimia diambil sebanyak 10 mL. Sampel mikroalga kemudian ditetaskan pada kaca preparat dan kemudian diamati selnya menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000 kali.

3.3.2 Pembuatan Medium Pertumbuhan untuk

Untuk pemeliharaan sel mikroalga *Scenedesmus* dan *Chlorella* di tumbuhkan pada Bold Basal Medium. Pembuatan medium dilakukan dengan melarutkan nutrient dengan aquades kedalam labu ukur. Larutan dipindahkan kedalam wadah botol steril lalu di panaskan terlebih dahulu agar nutrient larut setelah itu disterilkan dengan autoclave untuk pencegahan kontaminasi. Larutan

didinginkan hingga suhu ruang sebelum pengkulturan. Komponen BBM dapat dilihat pada lampiran 1.

3.3.3 Pemeliharaan Kultur Murni Spesies Mikroalga

Mikroalga yang diperoleh dari stok di laboratorium diidentifikasi dengan mikroskop cahaya untuk memastikan tidak adanya kontaminasi dari spesies yang lain. Kedua mikroalga ini dikultur dengan menambahkan medium bolt basal dengan perbandingan tertentu. Setiap kultur yang terlihat sangat rapat ditambahkan medium kembali untuk menjaga kultur murni ini tidak mati. Setelah stok kultur mencapai fase logaritmik, dilakukan kultivasi ke dalam 3 botol ukuran 2 liter yang telah berisi medium Bolt basal.

3.3.4 Pengamatan Fase Pertumbuhan Spesies Mikroalga

Pengamatan terhadap fase pertumbuhan *Scenedesmus* dan *Chlorella* dilakukan setiap 2 hari sekali hingga mencapai fase kematian. Sebanyak 5,0 ml sampel diukur kepadatan selnya (Optical Density) dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang *Scenedesmus* 680 nm sedangkan *Chlorella* 450 nm. Kurva pertumbuhan dibuat dengan cara memplotkan antara waktu inkubasi (X) dengan nilai serapan (Y).

3.3.5 Ekstraksi Pigmen Klorofil dan Analisis Karotenoid

Ekstraksi pigmen klorofil dilakukan dengan mengekstraks klorofil dari biomasa sebanyak 0,2 gram, kemudian di tambahkan 3 mL pelarut aseton dan dimasukkan kedalam tabung ependorf kemudian di stirer untuk meghomogenkan larutan, ekstrak klorofil yang diperoleh diukur absorbansi pada panjang gelombang 665 nm dan 650 nm dengan spektrofotometer.

Untuk pengukuran Klorofil A dan klorofil B dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut [29]:

$$\text{Klorofil A (mg/g)} = 16,5 A_{665} - 8,3 A_{650}$$

$$\text{Klorofil B (mg/g)} = 33,8 A_{650} - 12,5 A_{665}$$

Kandungan β -karoten dianalisis dengan menggunakan instrumentasi High Performance Liquid Chromatography/ HPLC (Shimadzu, L17844, Japan) menggunakan kolom C18 dan fasa gerak diklorometan :

asetonitril : metanol (20: 70: 10 v/v/v) dengan laju alir 1 mL/min, temperature kolom pada 25°C dan panjang gelombang 450 nm. Larutan standar β -karoten dibuat dengan konsentrasi 0,06 ppm menggunakan pelarut yang sama dengan fasa gerak terdapat pada lampiran 3. Masing-masing larutan standar diinjeksikan kedalam instrumen HPLC sebanyak 0,1 mL. Untuk penentuan β -karoten dari sampel, ekstrak diinjeksikan secara langsung kedalam kolom HPLC sebanyak 0,1 mL. Sistem aliquot digunakan untuk perhitungan persentase β -karoten dalam sampel.

