

Peningkatan Kadar Fenolik Total dari *Chlorella* sp. Menggunakan Cekaman Radiasi Ultraviolet-B

Sri Sedjati*, Endang Supriyantini, Nur Islamiah Sulastrri

Departemen Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro
Jl. Prof. Soedarto, SH. Kampus UNDIP Tembalang, Semarang 50275 Indonesia
E-mail: sedjati69@gmail.com

Abstract

Increased Total Phenolic Content of *Chlorella* sp. Using Ultraviolet-B Radiation Stressing

The treatment of abiotic stressing in microalgae cultures can trigger the production of secondary metabolites that have a variety of bioactivity. Phenolic compounds are one of the secondary metabolites produced by *Chlorella* sp. and have been categorized as an important antioxidants that play a role in the scavenging of free radicals. This research uses ultraviolet (UV)-B (λ 280-320 nm) as a stressing in *Chlorella* sp. cultures. The aim is to determine the effect of UV-B radiation on the biomass production of *Chlorella* sp. and total phenolic content (TPC), as well as its antioxidant activity. The research method used is experimental with a completely randomized design (RAL). The treatment tested was UV-B radiation with different duration of 0 (control), 40, 80, and 120 minutes/day during the culture period. *Chlorella* sp. culture is carried out using 12 glass containers with seawater (salinity 35 ppt) as culture media and enriched by Walne fertilizer (1 mL/L). During the culture period, photosynthetically active radiation (PAR) light and aeration are carried out for 24 hours. Biomass of *Chlorella* sp. was harvested 1 day after the peak of growth, then determined the weight of biomass and ethanol extract, followed by TPC, and antioxidant activity. The TPC test was carried out using the Folin-Ciocalteu reagent, while antioxidant activity used an inhibition test against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). The results showed that UV-B radiation had no significant effect on the biomass ($p=0.122$) and its ethanol extract yield ($p=0.194$), but had a significant effect on TPC ($p=0.003$) and DPPH inhibition percentage ($p=0.036$). The UV-B radiation for 80 minutes/day for 10 days of the *Chlorella* sp. culture can be used to increase phenolic production with a TPC value of 4.906 mg GAE/g extract.

Keywords: UV-B radiation, total phenolic content, antioxidant activity

Abstrak

Pemberian cekaman abiotik pada kultur mikroalga dapat memicu produksi metabolit sekunder yang memiliki beragam bioaktivitas. Senyawa fenolik adalah salah satu metabolit sekunder yang diproduksi oleh *Chlorella* sp. dan telah dikategorikan sebagai antioksidan penting yang berperan dalam penangkalan radikal bebas. Penelitian ini menggunakan cahaya ultraviolet (UV)-B (λ 280-320 nm) sebagai cekaman dalam kultur *Chlorella* sp. Tujuannya adalah untuk menentukan pengaruh radiasi UV-B terhadap produksi biomassa *Chlorella* sp. dan kadar fenolik total/ total phenolic content (TPC), serta aktivitas antioksidannya. Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental dengan desain rancangan acak lengkap (RAL). Perlakuan yang diujicobakan adalah pemberian radiasi UV-B dengan durasi yang berbeda, yaitu 0 (kontrol), 40, 80, dan 120 menit/hari selama masa kultur. Kultur *Chlorella* sp. dilakukan menggunakan 12 wadah kaca dengan media kultur berupa air laut (salinitas 35 ppt) dan ditambahkan pupuk Walne (1 mL/L). Selama masa kultur, pemberian cahaya *photosynthetically active radiation* (PAR) dan aerasi dilakukan selama 24 jam. Biomassa *Chlorella* sp. dipanen 1 hari setelah tercapai puncak pertumbuhan, kemudian ditentukan berat biomassa dan ekstrak etanolnya, dilanjutkan uji TPC, dan aktivitas antioksidannya. Uji TPC dilakukan menggunakan reagen Folin-Ciocalteu, sedangkan aktivitas antioksidan menggunakan uji inhibisi terhadap 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Hasil penelitian menunjukkan bahwa radiasi UV-B tidak berpengaruh signifikan terhadap biomassa *Chlorella* sp. ($p=0,122$) dan rendemen ekstrak etanolnya ($p=0,194$), namun berpengaruh signifikan terhadap TPC ($p=0,003$) dan persentase inhibisi DPPH ($p=0,036$). Pemberian radiasi UV-B selama 80 menit/hari selama 10 hari masa kultur *Chlorella* sp. dapat digunakan untuk meningkatkan produksi fenolik dengan nilai TPC sebesar 4,906 mg GAE/g ekstrak.

Kata kunci: radiasi UV-B, kadar fenolik total, aktivitas antioksidan

PENDAHULUAN

Mikroalga laut telah menarik perhatian para peneliti selama puluhan tahun disebabkan oleh kandungan biomolekulnya yang memiliki beragam bioaktivitas. Saat ini, pengembangannya telah sampai pada tahap pemanfaatannya di berbagai bidang seperti industri pangan fungsional, nutrasetikal, dan suplemen makanan (Andrade, 2018), maupun industri pakan untuk biota akuakultur (Andriopoulos *et al.*, 2022). Mikroalga banyak mengandung metabolit primer dan

sekunder yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan pangan, obat, maupun kosmetik (Hamdy *et al.*, 2020). Salah satu metabolit sekunder yang disintesis mikroalga adalah senyawa fenolik. Senyawa fenolik memiliki beragam bioaktivitas yang bisa dimanfaatkan untuk kepentingan manusia. Fenolik dari alga laut memiliki sifat sebagai antimikroba, antivirus, antikanker, antidiabetes, antioksidan, ataupun anti-inflamasi (Mateos *et al.*, 2020 ; Thangaraj *et al.*, 2022). Mikroalga yang kaya senyawa fenolik di antaranya adalah *Chlorella* sp. (Ali *et al.*, 2014; Jayshree *et al.*, 2016; Azaman *et al.*, 2017). Senyawa fenolik juga dikenal sebagai polifenol yaitu senyawa organik yang secara kimiawi terdiri dari satu atau lebih cincin fenolik. Senyawa fenolik dianggap sebagai salah satu golongan antioksidan alami yang penting karena dapat melindungi sel makhluk hidup dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas (Andrade, 2018).

Senyawa fungsional yang terdapat dalam biomassa mikroalga telah diketahui merupakan sumber antioksidan alami, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai peredam radikal bebas dalam tubuh. Antioksidan alami yang dihasilkan mikroalga termasuk pigmen, fenolik, dan tokoferol (Safafar *et al.*, 2015; Canelli *et al.*, 2022; Yusof *et al.*, 2021). *Chlorella vulgaris* adalah contoh mikroalga yang telah dimanfaatkan sebagai suplemen makanan dan berperan sebagai mediator yang efektif dalam menangkalkan radikal bebas. Skrining fitokimia menunjukkan adanya senyawa alkaloid, glikosida, protein, terpenoid, saponin, kumarin, fenol, dan tannin terdapat dalam ekstrak *C. vulgaris* (Hamdy *et al.*, 2020; Pradhan *et al.*, 2021). Senyawa bioaktif dalam mikroalga yang bertindak sebagai peredam ampuh dari radikal bebas yaitu konstituen fenolik dan flavonoid. Ekstrak *C. vulgaris* telah diuji dan diketahui bersifat antioksidan kuat secara *in vitro* (Pradhan *et al.*, 2021).

Chlorella vulgaris telah banyak diteliti serta memiliki kadar fenolik total yang tinggi dan pada konsentrasi ekstrak 1000 µg/mL menunjukkan aktivitas penghambatan (inhibisi) terhadap radikal bebas *diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH) sampai 92,57 % (Jayshree *et al.*, 2016). Aktivitas antioksidan didukung oleh adanya kandungan senyawa fenolik dalam biomassa mikroalga dan telah dievaluasi. *Chlorella* sp. yang diekstrak dengan etanol menunjukkan kadar fenolik total sebesar 26,65 µg GAE/g biomassa kering, lebih tinggi dari fenolik total alga hijau lainnya, misalnya *Ulva* sp. yang hanya mengandung 2,29 µg GAE/g (Dimova *et al.*, 2019). Keberadaan senyawa fenolik pada metabolit sekunder mikroalga berkorelasi positif dengan aktivitas antioksidannya (Fithriani *et al.*, 2016; Azaman *et al.*, 2017; Hamdy *et al.*, 2020).

Mikroalga menggunakan cahaya dengan panjang gelombang 400-700 nm yang merupakan bagian dari spektrum cahaya matahari atau biasa disebut *photosynthetically active radiation* (PAR) untuk fotosintesis. Satuan intensitas cahaya yang biasa digunakan adalah lumen/m² atau lux (lx) maupun µmol photons/m²/s. Jika dilakukan konversi, 1 lux setara dengan 0,0135 µmol photons/m²/s (Thimijan *et al.*, 1983). Paparan cahaya pada panjang gelombang tertentu akan menghasilkan daya (kekuatan) radiasi yang dinyatakan dalam satuan W/m². Intensitas cahaya dari sumber lampu *light emitting diode* (LED) sebesar 1 lx menghasilkan 0,0086 W/m² (Michael *et al.*, 2020). *Chlorella* spp. dapat dikultur pada kisaran intensitas cahaya PAR 1000-10.000 lx (Asadi *et al.*, 2020), bahkan spesies *C. reinhardtii* mampu hidup pada intensitas tinggi, yaitu pada kisaran 70-1.500 µmol photons/m²/s atau 5.185-111.111 lx. Intensitas cahaya tinggi telah terbukti dapat meningkatkan sintesis metabolit sekunder seperti asam galat, asam klorogenat, dan asam kumarat. Ketiga senyawa tersebut adalah golongan fenolik (Faraloni *et al.*, 2021).

Penggunaan cahaya PAR yang dikombinasikan dengan cahaya ultraviolet (UV)-A (320-400 nm) dan B (280-320 nm) pada beberapa spesies diatom yang dikultur sudah pernah diteliti sebelumnya. Hasilnya menunjukkan bahwa hanya UV-B yang dapat meningkatkan produksi senyawa fenolik (Scholz *et al.*, 2014). Pemberian paparan jenis UV lainnya, yaitu UV-C (<280 nm) tidak disarankan karena berbahaya bagi kelangsungan hidup mikroalga. Cahaya dengan panjang gelombang relatif pendek memiliki energi radiasi lebih tinggi. Klorofil lebih sensitif terhadap radiasi UV-C dibanding UV-B, sehingga dampaknya lebih merusak (Nassour *et al.*, 2017). Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Lung *et al.* (2022), radiasi UV-C dapat mengakibatkan tingkat kematian sampai 91,76 ± 3,33% pada kultur *Chlorella* sp..

Cahaya UV menghasilkan radiasi gelombang elektromagnetik yang lebih tinggi energinya dibandingkan dengan PAR. Paparan radiasi UV-B yang diberikan dengan daya sebesar 0,47-42 W/m² pada kultur mikroalga masih dapat ditoleransi. Dampak yang terjadi adalah penurunan tingkat pertumbuhan, kandungan klorofil, dan kandungan protein yang secara signifikan terlihat setelah terpapar dalam jangka panjang (30 hari). Semua ekstrak dari kelompok spesies diatom yang diteliti menunjukkan respon peningkatan aktivitas antioksidan dan akumulasi senyawa fenolik sebagai akibat dari paparan UV. Faktor utama yang menghasilkan respon yang berbeda adalah panjang gelombang dan durasi paparan radiasi UV. Panjang gelombang UV yang lebih pendek dan waktu paparan yang lebih lama menyebabkan efek yang paling signifikan (Scholz *et al.*, 2014). Hasil penelitian sejenis oleh Ganapathy *et al.* (2017) juga menunjukkan bahwa *C. vulgaris* tahan terhadap efek kerusakan akibat radiasi UV-B selama masa kultur. Hal ini diduga karena efek negatif dari radiasi UV-B terhadap pertumbuhan mikroalga telah diimbangi dengan peningkatan produksi senyawa penyerap cahaya UV, salah satunya berupa senyawa fenolik.

Penggunaan nutrisi terbatas sebagai cekaman abiotik untuk meningkatkan kandungan senyawa fenolik biasa dilakukan pada kultur mikroalga. Namun, cekaman nutrisi bukanlah strategi yang efektif untuk meningkatkan kandungan antioksidan secara keseluruhan pada mikroalga, meskipun mungkin berguna untuk produksi beberapa antioksidan golongan vitamin seperti tokoferol dan asam askorbat (vitamin C) (Goiris *et al.*, 2015). Hal ini menjadi alasan penting untuk mencari strategi kultur autotrofik mikroalga dengan cekaman radiasi UV sehingga produksi metabolit yang diinginkan tercapai. Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan efek pemberian radiasi UV-B dengan durasi yang berbeda terhadap biomassa *Chlorella* sp., serta kadar fenolik total dan potensi aktivitas antioksidannya terhadap radikal DPPH dalam ekstrak etanol. Harapannya, hasil penelitian ini dapat diaplikasikan untuk menghasilkan biomassa *Chlorella* sp. yang kaya senyawa fenolik dan dapat dimanfaatkan sebagai bahan pangan fungsional.

MATERI DAN METODE

Mikroalga yang digunakan dalam penelitian ini adalah stok murni *Chlorella* sp. yang diperoleh dari Laboratorium Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP), Jepara. Media kultur berupa air laut dengan salinitas 35 ppt telah disterilisasi dengan cara perebusan selama 2 jam, merujuk pada Hartanto (2013). Metode kultur *Chlorella* sp. mengacu pada Mufidah *et al.* (2019), dilakukan dengan menggunakan 12 wadah kaca (volume 3 L) dengan kepadatan awal $1,50 \times 10^6$ sel/mL. Perbandingan antara bibit dan media kultur yaitu 1:4, kemudian ditambahkan pupuk Walne dengan konsentrasi sebanyak 1 mL/L. Selama masa kultur, pemberian cahaya PAR dan aerasi dilakukan selama 24 jam, suhu berkisar 23-25°C, pH 8-9, dan DO 6-8.

Wadah kultur diletakkan pada area seluas 0,5 m² sesuai rancangan penelitiannya (acak lengkap). Sumber cahaya PAR menggunakan lampu Phillips TL LED (60 V; 20 W) sebanyak 4 buah, kemudian diatur jarak sumber cahaya terhadap media kultur sehingga diperoleh intensitas sebesar ± 4.500 lx. Penentuan intensitas cahaya PAR yang digunakan mengacu pada Fakhri *et al.* (2021). Pemberian radiasi UV dilakukan pada media kultur pada ruangan khusus seluas 0,5 m². Sumber radiasi UV-B menggunakan lampu Phillips TL UV-B (280-320 nm; 56 V; 8 W; daya radiasi UV pada jarak 1 m = 0,172 W/m²). Besaran daya radiasi UV-B yang diaplikasikan mengacu pada Zhang *et al.* (2015). Pemberian radiasi ultraviolet (UV-B) terbagi menjadi 4 kelompok perlakuan dengan durasi paparan yang berbeda, yaitu 0 (kontrol), 40, 80, dan 120 menit/hari selama masa kultur.

Perhitungan kepadatan sel mikroalga *Chlorella* sp. dilakukan setiap hari hingga masa panen. Perhitungan kepadatan sel mikroalga menggunakan *haemocytometer* di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x dan dibantu dengan *handy counter*. Pemanenan biomassa *Chlorella* sp. dilakukan dengan cara mengendapkan mikroalga *Chlorella* sp. dengan aluminium sulfat (Al₂(SO₄)₃) dengan konsentrasi 0,2 gr/L (Hidayati *et al.*, 2015). Pemanenan biomassa dilakukan setelah *Chlorella* sp. memasuki fase stasioner, yaitu 1 hari setelah puncak pertumbuhan (Andriopoulos *et al.*, 2022). Sampel mikroalga yang telah diberikan larutan aluminium sulfat dihomogenkan selama 30 menit,

kemudian wadah kaca ditutup dengan *plastic wrap* dan didiamkan selama 1 malam. Setelah *Chlorella* sp. mengendap, media kultur yang bening di bagian permukaan dibuang perlahan hingga tersisa sedikit cairan dan biomasanya saja. Biomassa *Chlorella* sp. disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm dan selanjutnya dipisahkan dari supernatannya (Bariyyah *et al.*, 2013). Biomassa basah dikeringkan menggunakan cawan petri terbuka pada suhu dingin dalam refrigerator (4°C) dan ditimbang beratnya menggunakan neraca analitik.

Sampel yang sudah kering diekstraksi dengan teknik maserasi menggunakan pelarut etanol p.a 99% dengan perbandingan 1 : 10 (b:v) selama 24 jam dan disaring menggunakan kertas saring Whatmann No 42. Filtrat yang diperoleh dipisahkan dengan *vacum rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak etanol dan kemudian beratnya ditimbang.

Uji fenolik total atau *total phenolic content* (TPC) dari ekstrak *Chlorella* sp. dilakukan menggunakan reagen *Folin-Ciocalteu* menggunakan metode spektrofotometri. Senyawa fenolik yang digunakan sebagai standar adalah asam galat. Kurva standar dibuat dengan seri konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm dengan pelarut etanol p.a 99%. Larutan asam galat dengan berbagai konsentrasi maupun sampel tersebut diambil 2 mL dan ditambahkan 5 mL akuades dan 0,5 mL reagen *Folin-Ciocalteu*. Larutan didiamkan selama 3 menit kemudian ditambah 1 mL larutan Na₂CO₃ 5%, selanjutnya diinkubasi selama 1 jam. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 765 nm (Kurnia *et al.*, 2020). Kadar fenolik total dihitung dari kurva kalibrasi asam galat dan dinyatakan sebagai mg *gallic acid equivalent* (GAE)/g ekstrak etanol.

Uji aktivitas antioksidan ditentukan berdasarkan persentase penghambatan (inhibisi) terhadap radikal bebas *diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH). Ekstrak sampel *Chlorella* sp. yang digunakan untuk uji inhibisi DPPH dibuat dengan konsentrasi 100 ppm. Hasil pengenceran ekstrak diambil 3 mL dan ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,1 mM. Larutan dihomogenkan dan ditutup dengan aluminium foil. Selanjutnya, larutan tersebut diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum DPPH (515 nm) (Sedjati *et al.*, 2020). Kemampuan untuk meredam radikal bebas DPPH (inhibisi) dihitung dengan menggunakan rumus :

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

Grafik data penelitian digambarkan dengan bantuan aplikasi *Excel* 17, sedangkan analisis statistika inferensial dilakukan dengan *SPSS* 25. Data biomassa kering, rendemen, kadar fenolik total, dan inhibisi DPPH dari sampel dianalisis menggunakan uji parametrik *One Way ANOVA* yang sebelumnya sudah dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Selanjutnya, apabila terdapat pengaruh signifikan ($p < 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji Tukey untuk menentukan perbedaan antar kelompok perlakuan.

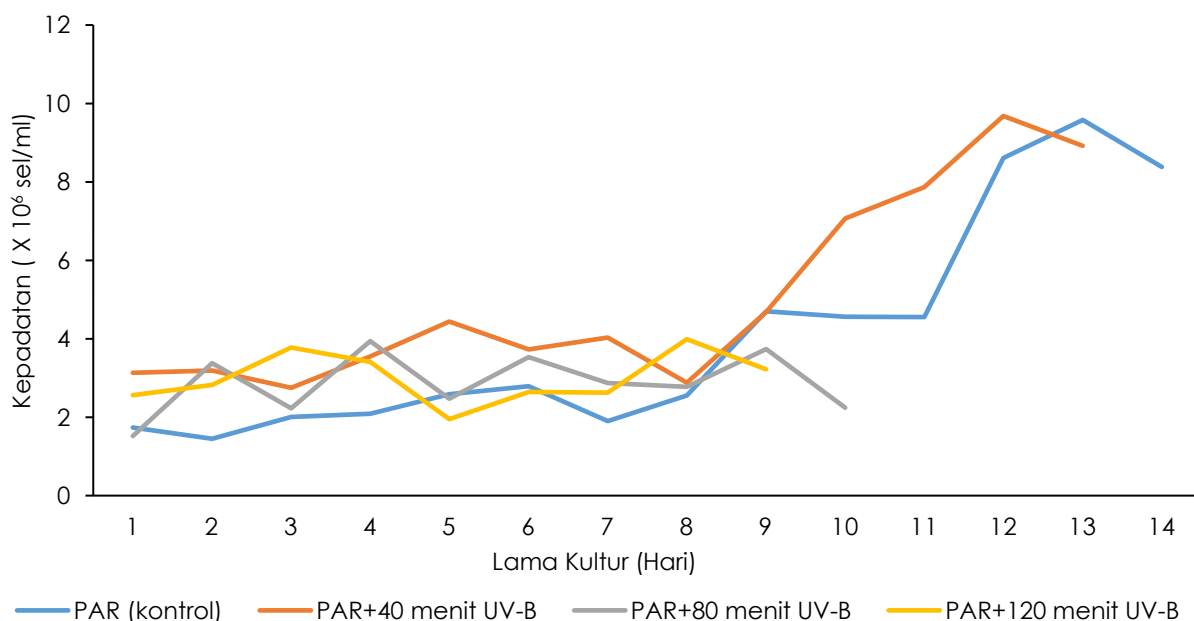
HASIL DAN PEMBAHASAN

Paparan radiasi UV-B dapat terjadi secara alamiah dari sinar matahari dan bisa berdampak bagi kehidupan fitoplankton di perairan laut. Penelitian ini menggunakan radiasi UV-B dengan daya 0,17 W/m² dan terlihat sudah berdampak negatif, terlihat dari pola kurva pertumbuhannya. Kelompok populasi yang terpapar UV-B selama 80 dan 120 menit terlihat pertumbuhannya menurun mulai hari ke-9, berbeda dengan kelompok kontrol dan 40 menit yang masih meningkat. Berdasarkan hasil penelitian Zhang *et al.* (2015), radiasi UV-B dengan daya sebesar 0,16 W/m² sudah berpengaruh negatif terhadap kelangsungan hidup mikroalga. Secara umum, radiasi UV-B memiliki dampak yang nyata pada struktur kloroplas, proses fotosintesis, termasuk pigmentasi, kinerja fotosintesis, dan reaksi asimilasi karbon. Kloroplas adalah target radiasi UV, sementara di dalamnya terdapat grana (tumpukan tilakoid) sebagai tempat terjadinya reaksi terang. Oleh karena itu, kerusakan strukturnya dapat menyebabkan penurunan kapasitas fotosintesis. Reaksi terang

berperan menyediakan energi untuk menggerakkan reaksi gelap yang memfasilitasi proses asimilasi karbon menjadi glukosa. Peneliti lainnya, Wong *et al.* (2011) menambahkan bahwa radiasi UV-B juga mengganggu struktur pusat reaksi fotosistem II (PS II), dan mempengaruhi aktivitas rubisco, sehingga dapat mengurangi laju fotosintesis maupun pertumbuhan mikroalga. Menurut Gruber & Feiz (2018), rubisco (*ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*) adalah enzim yang mengkatalis reaksi kimia dalam siklus Calvin-Benson (reaksi gelap), berfungsi mengubah karbon anorganik (CO₂) menjadi sumber karbon organik yang dapat digunakan secara biologis oleh tumbuhan.

Hasil penghitungan kepadatan sel dan tercapainya puncak pertumbuhan *Chlorella sp.* selama masa kultur berbeda-beda antar kelompok perlakuan seperti terlihat dalam Gambar 1. Selama 4 hari di awal masa kultur, pemberian radiasi UV-B pada semua kelompok perlakuan mampu meningkatkan pertumbuhan *Chlorella sp.*, jika dibandingkan dengan kontrolnya. Namun, di periode selanjutnya hanya kelompok kontrol dan yang diberi 40 menit radiasi UV-B saja yang mampu tumbuh dengan baik seperti terlihat dari peningkatan kepadatan selnya. Terjadinya puncak pertumbuhan tersingkat dicapai oleh kelompok populasi yang diberi PAR dan radiasi UV-B selama 120 menit, yaitu pada hari ke-8 dengan kepadatan sel sebesar $3,99 \times 10^6$ sel/mL. Berikutnya, kelompok yang terpapar radiasi UV-B selama 80 menit terlihat pada hari ke-9 mengalami puncak pertumbuhan dengan kepadatan sel $3,74 \times 10^6$ sel/mL. Kelompok dengan paparan radiasi UV-B yang lebih singkat, yaitu hanya 40 menit mencapai puncak pertumbuhan lebih lama yaitu pada hari ke-12 dengan kepadatan $9,68 \times 10^6$ sel/mL. Sementara itu, kelompok yang hanya diberi PAR saja (kontrol) mencapai puncak pertumbuhan dengan masa terlama yaitu pada hari ke 13 dengan kepadatan sebesar $9,58 \times 10^6$ sel/mL. Fase stasioner mulai terjadi setelah *Chlorella sp.* mengalami penurunan kepadatan sel setelah fase puncak pertumbuhan. Berdasarkan grafik pertumbuhan *Chlorella sp.* (Gambar1) terlihat kecenderungan bahwa cekaman radiasi UV-B menurunkan kepadatan sel serta mempersingkat tercapainya puncak pertumbuhan maupun fase stasioner.

Penurunan kepadatan sel pada kelompok populasi *Chlorella sp.* yang terkena radiasi UV-B ternyata tidak berdampak signifikan terhadap berat biomassa yang dihasilkannya setelah melalui uji statistik (Tabel1). Hasil ini terlihat seperti bertolak belakang dengan hasil perhitungan kepadatan selnya. Hal ini diduga karena perbedaan ukuran/volume selnya berbeda antar kelompok perlakuan. Kelompok kontrol dan yang diberi radiasi UV-40 menit memiliki kepadatan sel tinggi, tetapi ukurannya



Gambar 1. Kepadatan sel *Chlorella sp.* setelah terpapar radiasi UV-B selama masa kultur

lebih kecil dibanding kelompok yang diberi radiasi 80 dan 120 menit, sehingga setelah ditimbang berat biomasnya relatif sama. Hasil ini serupa dengan penelitian Singh *et al.* (2019), pemberian radiasi UV-B dengan daya 15 W/m² dengan durasi 2 jam/hari selama 15 hari pada kultur *Chlorella* sp. dapat meningkatkan kadar protein dan lipidnya. Al-Rashed *et al.* (2016) juga mengamati efek serupa tetapi pada spesies yang berbeda, yaitu pemberian radiasi UV-B terhadap pertumbuhan *Spirulina platensis* dan *Dunaliella salina*. Efek yang terlihat ketika mikroalga terpapar radiasi UV-B (daya 0,5 W/m² selama 3 hari dengan durasi 2 jam/hari) adalah penurunan tingkat pertumbuhan karena terjadi kerusakan pigmen fotosintesis. Namun, dampak positifnya adalah peningkatan produksi protein. Peningkatan sintesis lipid maupun protein diduga berkaitan dengan penambahan massa sel sehingga ukurannya menjadi lebih besar.

Rendemen ekstrak etanol dari *Chlorella* sp. juga tidak terpengaruh oleh paparan radiasi UV-B (Tabel 1). Rendemen ekstrak mencerminkan banyaknya senyawa metabolit sekunder yang terambil oleh pelarut etanol secara keseluruhan. Banyaknya metabolit yang terambil tergantung jenis dan polaritas pelarut yang digunakan. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, ekstrak *Chlorella* sp. mengandung asam amino/protein, asam lemak/lipid, klorofil, karotenoid, vitamin, mineral, enzim, asam nukleat, dan senyawa fitokimia lainnya yang menguntungkan bagi manusia (Singh *et al.*, 2019; Malothu, 2020). Senyawa fitokimia atau metabolit sekunder yang ditemukan di antaranya alkaloid, terpenoid, fenolik, flavonoid, tannin, kuinon, glikosida, dan saponin (Hamdy *et al.*, 2020; Pradhan *et al.*, 2021; Thangaraj *et al.*, 2022). Metabolit sekunder terbesar yang teridentifikasi dalam ekstrak metanol *C. vulgaris* oleh Prabakaran *et al.* (2018) adalah golongan fenolik, diikuti oleh alkaloid, terpenoid, glikosida, flavonoid, dan yang paling kecil adalah tannin. Sementara itu, ekstrak etanol *C. vulgaris* yang diteliti oleh Fithriani *et al.* (2015) mengandung fenolik, flavonoid, tannin, alkaloid, steroid, glikosida, dan saponin.

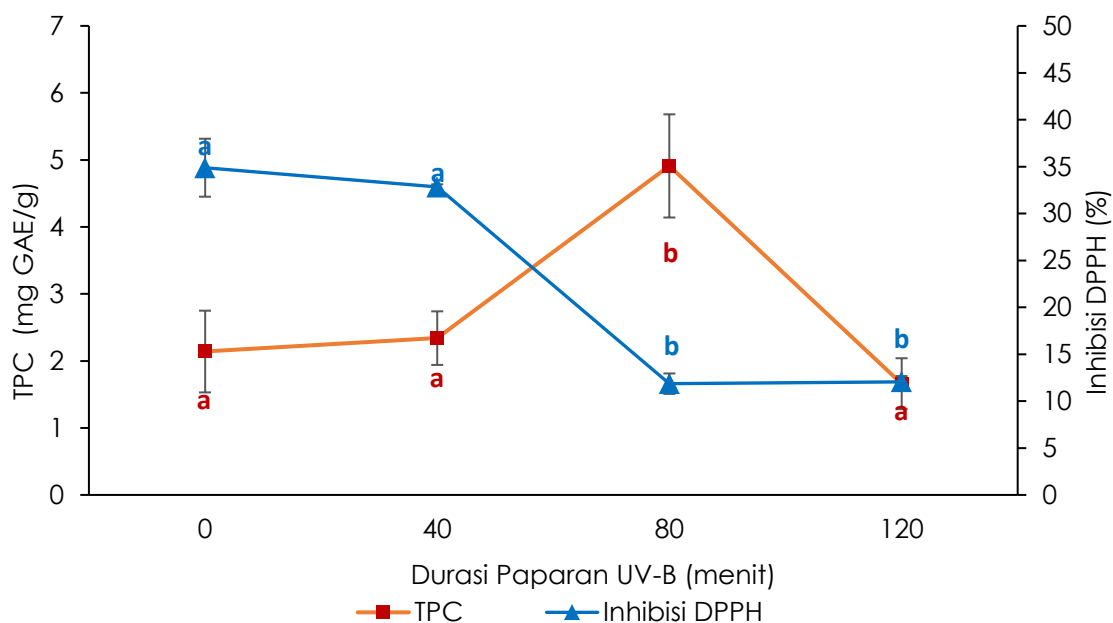
Pemberian radiasi UV-B tidak berpengaruh terhadap rendemen ekstrak *Chlorella* sp., namun menghasilkan efek signifikan terhadap TPC. Uji TPC dianalisis menggunakan reagen *Folin-Ciocalteu*, prinsip kerjanya adalah reaksi oksidasi dan reduksi kolorimetrik untuk mengukur semua senyawa fenolik dalam sampel uji. Asam galat adalah senyawa dari golongan fenol yang biasa digunakan sebagai pembanding atau standar. Setelah dilakukan analisis regresi terhadap kurva kalibrasi standar asam galat maka diperoleh persamaan $y = 0,026x + 0,072$ dan $r^2 = 0,921$ dan digunakan untuk menentukan nilai TPC yang terdapat pada Gambar 2. Kelompok populasi *Chlorella* sp. yang terpapar 80 menit radiasi UV-B/hari selama 10 hari menghasilkan kadar fenolik total tertinggi, yaitu sebesar 4,906 mg GAE/g ekstrak etanol. Hasil terendah terdapat pada pemberian radiasi UV-B dengan durasi 120 menit/hari selama 9 hari dengan nilai 1,667 mg GAE/g ekstrak etanol.

Menurut beberapa literatur, senyawa golongan fenolik yang terdapat dalam ekstrak *Chlorella* sp. di antaranya adalah asam ferulat, asam kumarat, asam kafeat (Zakaria *et al.*, 2020), kuarsetin, dan asam galat (Dahmen-Ben *et al.*, 2021). Senyawa fenolik sangat berperan dalam mekanisme penangkalan oksidan (radikal bebas) sehingga termasuk sebagai antioksidan. Selama penelitian, cahaya PAR yang diberikan adalah dengan intensitas sedang secara terus-menerus 24 jam tanpa periode gelap. Harapannya adalah agar dapat memicu produksi senyawa antioksidan. Menurut Yusof *et al.* (2021), mikroalga kaya akan antioksidan alami, namun jenis senyawa, kuantitas, dan kualitas metabolit yang disintesis tergantung spesies mikroalga dan kondisi kulturnya. Selama fotosintesis, peningkatan intensitas cahaya PAR dapat digunakan untuk menginduksi produksi banyak metabolit sekunder pada tanaman. Metabolit yang disintesis tersebut berperan dalam penanggulangan stres oksidatif dan mekanisme toleransi saat kondisi lingkungan berubah. Radiasi aktif oleh PAR dan lamanya pencahayaan (fotoperiod) mempengaruhi akumulasi senyawa antioksidan. Respon terhadap cahaya terus menerus selama 24 jam memicu *C. vulgaris* meningkatkan mekanisme perlindungan dengan cara memproduksi antioksidan alami.

Selanjutnya, cekaman radiasi UV-B yang diterapkan selama kultur *Chlorella* sp. dalam penelitian ini terbukti dapat meningkatkan produksi antioksidan, yaitu golongan senyawa fenolik sampai dengan durasi 80 menit/hari. Namun, ketika durasi radiasi UV-B ditingkatkan sampai 120

menit/hari terlihat sudah terjadi penurunan kadar TPC (Gambar 2), sehingga senyawa fenolik yang berperan menanggulangi tekanan lingkungan termasuk radiasi UV semakin berkurang. Dampak yang terjadi yaitu sel mikroalga sudah tidak mampu lagi beradaptasi yang menyebabkan menurunnya kepadatan sel akibat kematian (Gambar 1). Menurut Zhang *et al.* (2015), kerentanan akibat peningkatan radiasi UV-B sangat bervariasi di antara spesies mikroalga, ditentukan oleh interaksi kompleks antara mekanisme perlindungan dan perbaikan sistem sel terhadap faktor-faktor lain yang dapat menyebabkan kerusakan sel.

Peningkatan kadar fenolik total berkorelasi positif dengan aktivitas antioksidannya (Fithriani *et al.*, 2016; Azaman *et al.*, 2017; Hamdy *et al.*, 2020). Namun, berdasarkan Gambar 2 terlihat bahwa aktivitas antioksidan justru menurun di saat kadar TPC meningkat. Kondisi ini bisa dijelaskan dari sudut pandang cara kerja senyawa antioksidan dalam menangkal radikal bebas. Uji TPC mengukur secara keseluruhan (total) senyawa yang termasuk golongan fenolik. Zhang *et al.* (2022) menyatakan bahwa fenolik dapat diklasifikasikan menurut struktur kimianya menjadi asam fenolik, flavonoid, tanin, lignan dan stilben. Masing-masing kelompok tersebut tidak semuanya memiliki mekanisme penangkal radikal bebas yang bisa terukur dengan uji DPPH. Uji DPPH hanya dapat mengukur kemampuan mendonorkan elektron tunggal dari senyawa antioksidan dalam sampel untuk menetralkan radikal bebas DPPH. Menurut Zeb (2020), selain transfer elektron, aktivitas antioksidan yang dapat dilakukan oleh senyawa fenolik adalah dengan cara mentransfer hidrogen dan sebagai pengkelat logam transisi (oksidator) penyebab terbentuknya oksidan. Beberapa hasil penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa bioaktivitas fenolik tidak terbatas sebagai antioksidan



Gambar 2. Kadar fenolik total (TPC) dan persentase inhibisi DPPH dari ekstrak etanol *Chlorella* sp. Keterangan: n=3, notasi huruf yang berbeda menunjukkan pengaruh signifikan ($p < 0,05$)

Tabel 1. Berat biomassa (*dry weight*) dan rendemen ekstrak etanol *Chlorella* sp.

Durasi Paparan UV-B (menit)	Biomassa (g dw)*	Rendemen Ekstrak (%)*
0	0,90±0,10	1,92±0,07
40	0,75±0,05	1,46±0,15
80	0,70±0,08	1,68±0,30
120	0,73±0,12	1,54±0,32

Keterangan: - Nilai merupakan rerata ± SD (n=3); *Tidak ada pengaruh signifikan ($p \geq 0,05$)

saja, tetapi dapat juga sebagai antimikroba, antivirus, antikanker, antidiabetes, dan anti-inflamasi (Mateos *et al.*, 2020 ; Thangaraj *et al.*, 2022). Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai acuan dalam pemanfaatan cekaman radiasi UV-B untuk memicu peningkatan produksi senyawa fenolik, meskipun tidak berdampak terhadap peningkatan aktivitas penangkalan radikal bebas. Senyawa fenolik memiliki beragam bioaktivitas, sehingga bisa diaplikasikan untuk tujuan selain sebagai antioksidan.

KESIMPULAN

Pemberian cekaman radiasi UV-B dengan daya 0,17 W/m² dengan durasi 40, 80, dan 120 menit/hari selama masa kultur tidak berpengaruh signifikan terhadap biomassa ($p=0,122$), dan rendemen ekstrak *Chlorella* sp. ($p=0,194$), namun berpengaruh signifikan terhadap kadar fenolik total (TPC) ($p=0,003$) dan potensi aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH ($p=0,036$) pada ekstrak etanolnya. Paparan radiasi UV-B selama 80 menit/hari selama 10 hari masa kultur *Chlorella* sp. dapat meningkatkan produksi senyawa fenolik dengan nilai TPC sebesar 4,906 mg GAE/g ekstrak. Cekaman radiasi UV-B selama masa kultur dapat diaplikasikan untuk meningkatkan produksi senyawa fenolik pada *Chlorella* sp.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, H.E.A., Shanab, S.M.M., Abo-State, M.A.M., Shalaby, E.A A., el Demerdash, U.M.N., & Abdullah, M.A. (2014). Screening of Microalgae for Antioxidant Activities, Carotenoids and Phenolic Contents. *Applied Mechanics and Materials*, 625, 156–159. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMM.625.156.
- Al-Rashed, S.A., Ibrahim, M.M., El-Gaaly, G.A., Al-Shehri, S., & Mostafa, A. (2016). Evaluation of Radical Scavenging System in Two Microalgae in Response to Interactive Stresses of UV-B Radiation and Nitrogen Starvation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(6), 706–712. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.06.010.
- Andrade, L.M. (2018). Chlorella and Spirulina Microalgae as Sources of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements; an Overview. *MOJ Food Processing & Technology*, 6(1), 45-58. doi: 10.15406/mojfpt.2018.06.00144.
- Andriopoulos, V., Gkioni, M.D., Koutra, E., Mastropetros, S.G., Lamari, F.N., Hatziantoniou, S., & Kornaros, M. (2022). Total Phenolic Content, Biomass Composition, and Antioxidant Activity of Selected Marine Microalgal Species with Potential as Aquaculture Feed. *Antioxidants*, 11(7), p.1320. doi: 10.3390/antiox11071320.
- Azaman, S.N.A., Nagao, N., Yusoff, F.M., Tan, S.W., & Yeap, S.K. (2017). A Comparison of The Morphological and Biochemical Characteristics of *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella zofingiensis* Cultured Under Photoautotrophic and Mixotrophic Conditions. *PeerJ*, 5, e3473. doi: 10.7717/peerj.3473.
- Asadi, P., Amini Rad, H., & Qaderi, F. (2020). Lipid and Biodiesel Production by Cultivation Isolated Strain *Chlorella sorokiniana* pa.91 and *Chlorella vulgaris* in Dairy Wastewater Treatment Plant Effluents. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 18, 573–585 doi: 10.1007/s40201-020-00483-y/Published.
- Bariyyah, S. K., Hanapi, A, Fasya, A.G., & Abidin, M. (2013). Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella* sp. Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge. *Jurnal Kimia*, 2(3), 195-204.
- Canelli, G., Tevere, S., Jaquenod, L., Dionisi, F., Rohfritsch, Z., Bolten, C. J., Neutsch, L., & Mathys, A. (2022). A Novel Strategy to Simultaneously Enhance Bioaccessible Lipids and Antioxidants in Hetero/Mixotrophic *Chlorella vulgaris* as Functional Ingredient. *Bioresource Technology*, 347, p.126744. doi: 10.1016/j.biortech.2022.126744.
- Dahmen-Ben, M.I., Masmoudi, M. A., Choura, S., Chamkha, M., & Sayadi, S. (2021). Extraction Optimization Using Response Surface Methodology and Evaluation of The Antioxidant and Antimicrobial Potential of Polyphenols in *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *Biomass Conversion and Biorefinery*. pp.1-14 doi: 10.1007/s13399-021-01850-x.

- Dimova, D., Dobрева, D., Panayotova, V., & Makedonski, L. (2021). DPPH Antiradical Activity and Total Phenolic Content of Methanol and Ethanol Extracts from Macroalgae (*Ulva rigida*) and Microalgae (*Chlorella* sp.). *Scripta Scientifica Pharmaceutica*, 6(2), 37-41. doi: 10.14748/ssp.v7i2.7369.
- Fakhri, M., Riyani, E., Ekawati, A.W., Arifin, N.B., Yuniarti, A., Widyawati, Y., Saputra, I.K., Samuel, P.D., Arif, M.Z., & Hariati, A.M. (2021). Biomass, Pigment Production, and Nutrient Uptake of *Chlorella* sp. Under Different Photoperiods. *Biodiversitas*, 22(12), 5344–5349. doi: 10.13057/biodiv/d221215.
- Faraloni, C., di Lorenzo, T., & Bonetti, A. (2021). Impact of Light Stress on The Synthesis of Both Antioxidants Polyphenols and Carotenoids, as Fast Photoprotective Response in *Chlamydomonas reinhardtii*: New Prospective for Biotechnological Potential of This Microalga. *Symmetry*, 13(11), p.2220. doi: 10.3390/sym13112220.
- Fithriani, D., Amini, S, Susiana Melanie, S., & Susilowati, R. (2016). Phytochemical Screening, Total Phenol Content and Antioxidant Activity of Microalgae *Spirulina* sp., *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis* sp. *JPB Kelautan dan Perikanan*, 10(2), 101–109.
- Ganapathy, K. Chidambaram, K, Janarthanan, R., & Ramasamy, R. (2017). Effect of UV-B Radiation on Growth, Photosynthetic Activity and Metabolic Activities of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 6(2), 53-60.
- Goiris, K., van Colen, W., Wilches, I., León-Tamariz, F., de Cooman, L., & Muylaert, K. (2015). Impact of Nutrient Stress on Antioxidant Production in Three Species of Microalgae. *Algal Research*, 7, 51–57. doi: 10.1016/j.algal.2014.12.002.
- Gruber, A.V., & Feiz, L. (2018). Rubisco Assembly in The Chloroplast. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5(24), 1-11. doi: 10.3389/fmolb.2018.00024.
- Hamdy, O., Karim, A., Farouk Gheda, S., Ismail, G.A., & Abo-Shady, A.M. (2020). Phytochemical Screening and antioxidant activity of *Chlorella vulgaris*. *Delta Journal of Science*, 41, 81-91.
- Hartanto, H.S.B., Hariyati, R., & Retnaningsih, T. (2013). Pertumbuhan Populasi *Chlorella beijerinck* dengan Perlakuan Penambahan Logam Berat Tembaga (Cu) pada Skala Laboratorium. *Jurnal Biologi*, 2(1), 19-27.
- Hidayati, S., Nawansih, O., & Febiana, V. (2015). Harvesting Techniques Microalgae *Nannochloropsis* sp. Cultivated in Liquid Waste Rubber Crumb Media by Aluminium Sulphate Flocculant. *Jurnal Teknologi Industri & Hasil Pertanian*, 20(2), 97-108.
- Jayshree, A., Jayashree, S., & Thangaraju, N. (2016). *Chlorella vulgaris* and *Chlamydomonas reinhardtii*: Effective Antioxidant, Antibacterial and Anticancer Mediators. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78(5), 575-581.
- Kurnia, D., Rosliana, E., Juanda, D., & Nurochman, Z. (2020). Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Fenol Total dari Mikroalga Laut *Chlorella vulgaris*. *Jurnal Kimia Riset*, 5(1), 14-21.
- Lung, W.Q.C., Yeh, H.Y., Yang, S.J., Huang, C.Y., Nan, F.H., & Lee, M.C. (2022). Delayed Signs of UV-C Damage to *Chlorella* sp. Observed through Fluorescent Staining. *Diversity*, 14(5), p.376. doi: 10.3390/d14050376.
- Malothu, R. (2020). Fatty Acids Extraction from Algae *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Engineering Research & Technology*, 9(7), 171-178.
- Mateos, R., Pérez-Correa, J.R., & Domínguez, H. (2020). Bioactive Properties of Marine Phenolics. *Marine Drugs*, 18(10), p.501. doi: 10.3390/md18100501.
- Michael, P.R., Johnston, D.E., & Moreno, W. (2020). A Conversion Guide: Solar Irradiance and Lux Illuminance. *Journal of Measurements in Engineering*, 8(4), 153–166. doi: 10.21595/jme.2020.21667.
- Mufidah, A., Agustono, A., Sudarno, S., & Nindarwi, D. D. (2019). Teknik Kultur *Chlorella* sp. Skala Laboratorium dan Intermediet di Balai Perikanan Budidaya Air Payau (BPBAP) Situbondo Jawa Timur. *Journal of Aquaculture and Fish Health*, 7(2), 50–56. doi: 10.20473/jafh.v7i2.11246.
- Nassour, R., Ayash, A., & Mohamad, I. (2017). The Effect of Ultraviolet Radiation on Chlorophyll in *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Agriculture & Environmental Science*, 4(6), 23–27. doi: 10.14445/23942568/IJAES-V4I6P105.
- Prabakaran, G., Moovendhan, M., Arumugam, A., Dineshkumar, R., Matharasi, A., & Sampathkumar, P. (2018). Quantitative Analysis of Phytochemical Profile in Marine Microalgae *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 8(2), 562-565.

- Pradhan, B., Patra, S., Dash, S. R., Nayak, R., Behera, C., & Jena, M. (2021). Evaluation of The Anti-Bacterial Activity of Methanolic Extract of *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck] with Special Reference to Antioxidant Modulation. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1), 1-11. doi: 10.1186/s43094-020-00172-5.
- Safafar, H., Wagenen, J. van, Møller, P., & Jacobsen, C. (2015). Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to The Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater. *Marine Drugs*, 13(12), 7339–7356. doi: 10.3390/md13127069.
- Scholz, B., Rúa, A., & Liebezeit, G. (2014). Effects of UV Radiation on Five Marine Microphytobenthic Wadden Sea Diatoms Isolated from The Solthörn Tidal Flat (Lower Saxony, Southern North Sea) - Part I: Growth and Antioxidative Defence Strategies. *European Journal of Phycology*, 49(1), 68–82. doi: 10.1080/09670262.2014.889214.
- Sedjati, S., Pringgenies, D. & Fajri, M. (2020). Determination of the Pigment Content and Antioxidant Activity of the Marine Microalga *Tetraselmis suecica*. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 13(1), 55-58.
- Singh, R., Upadhyay, A.K., Singh, D.V., Singh, J.S., & Singh, D.P. (2019). Photosynthetic Performance, Nutrient Status and Lipid Yield of Microalgae *Chlorella vulgaris* and *Chlorococcum humicola* Under UV-B Exposure. *Current Research in Biotechnology*, 1, 65–77. doi: 10.1016/j.crbiot.2019.10.001.
- Thangaraj, M., Saravana, B.P., Thanasekaran, J., Joen-Rong, S., Manubolu, M., & Pathakoti, K. (2022). Phytochemicals of Algae, *Arthrospira platensis* (Spirulina) *Chlorella vulgaris* (Chlorella) and *Azolla pinnata* (Azolla). *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 19(2), 023–043. doi: 10.30574/gscbps.2022.19.2.0167.
- Thimijan, R. W., Heins, R.D., Thimijan, R.W., & Heins, R.D. (1983). Photometric, Radiometric, and Quantum Light Units of Measure A Review of Procedures for Interconversion. *Hortscmnce*, 18(6), 818-820.
- Wong C.Y., Teoh M.L., Phang S.M, & Chu W.L. (2011). Effect of Ultraviolet Radiation (UVR) on The Tropical Microalga *Chlorella vulgaris*. *Malaysian Journal of Science*, 30(1), 3-5.
- Yusof, N.S., Yeong, Y.S., Zakeri, H.A., Wahid, M.E.A., Ghafar, S.N.A., & Yusuf, N. (2021). Photoperiod Influenced The Growth and Antioxidative Responses of *Chlorella vulgaris*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chuii*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 11(4), 125–134. doi: 10.7324/JAPS.2021.110415.
- Zakaria, S.M., Kamal, S. M. M., Harun, R., Omar, R., & Siajam, S. I. (2020). Characterization on Phenolic Acids and Antioxidant Activity of *Chlorella* sp. Microalgae Using Subcritical Water Extraction. *Sains Malaysiana*, 49(4), 765–774. doi: 10.17576/jsm-2020-4904-05.
- Zeb, A. (2020). Concept, Mechanism, and Applications of Phenolic Antioxidants in Foods. *Journal of Food Biochemistry*, 44(9), e13394. doi: 10.1111/jfbc.13394.
- Zhang, X., Tang, X., Zhou, B., Hu, S., & Wang, Y. (2015). Effect of Enhanced UV-B Radiation on Photosynthetic Characteristics of Marine Microalgae *Dunaliella salina* (Chlorophyta, Chlorophyceae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 469, 27–35. doi: 10.1016/j.jembe.2015.04.002.
- Zhang, Y., Cai, P., Cheng, G., & Zhang, Y. (2022). A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity. *Natural Product Communications*, 17(1), 1-14. doi: 10.1177/1934578X211069721.