

## Isolasi dan identifikasi spesies mikroalga air tawar sebagai antioksidan dan antihiperqlikemik

### *Isolation and identification of fresh water microalgae as an antioxidant and antihyperglycemic*

Anggela Marta Tasman<sup>1</sup>, Abdi Dharma\*<sup>2</sup>, dan Syfrizayanti<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Program Pascasarjana Kimia Universitas Andalas  
Limau Manis, Pauh, Kota Padang, Sumatera Barat, Indonesia

<sup>2</sup> Laboratorium Biokimia Universitas Andalas  
Limau Manis, Pauh, Kota Padang, Sumatera Barat, Indonesia

\* Corresponding author:  
e-mail: [abdipogil@gmail.com](mailto:abdipogil@gmail.com)



#### INFO ARTIKEL

##### Sejarah artikel:

Diterima:  
12 Februari 2020  
Direvisi:  
18 Juni 2020  
Diterbitkan  
29 Juni 2020

##### Kata kunci:

mikroalga;  
fenolik;  
antioksidan;  
antihiperqlikemik

##### Keywords:

*microalgae*;  
*phenolic*;  
*antioxidants*;  
*antihyperglycemic*

#### ABSTRAK

Mikroalga memiliki kinerja yang hampir sama dengan tumbuhan bersel banyak, akan tetapi tidak memiliki akar, daun, dan batang untuk berfotosintesis. Mikroalga diibaratkan sebagai pabrik kecil dalam ukuran sel mikro yang mengubah karbondioksida menjadi material potensial. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi mikroalga, mengidentifikasi spesiesnya secara morfologi dan molekuler, selanjutnya menentukan kandungan total fenolik, bioaktivitas antioksidan dan antihiperqlikemik dari ekstrak mikroalga tersebut. Uji antioksidan dilakukan dengan metode DPPH dan uji antihiperqlikemik dengan metode inhibitor enzim  $\alpha$ -amilase. Mikroalga yang berhasil diisolasi termasuk dalam jenis *Chlorella vulgaris*. Ekstrak metanol dari biomassa kering mikroalga memberikan kandungan fenolik total paling tinggi yaitu sebesar 10,8 mg GAE/g jika dibandingkan ekstrak air (1,8 mg GAE/g) dan heksana (1,1 mg GAE/g). Nilai  $IC_{50}$  ekstrak metanol dalam menangkap radikal bebas DPPH adalah 75,9  $\mu$ g/mL dan mampu menginhibisi 50% aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase pada konsentrasi 839,9  $\mu$ g/mL. Berdasarkan hasil uji bioaktivitas ekstrak metanol mikroalga *Chlorella vulgaris* yang diisolasi dari perairan Sungai Kincir Kamba Tigo memiliki kemampuan yang rendah sebagai antioksidan dan antihiperqlikemik.

#### ABSTRACT

*Microalgae have almost the same performance as multicellular plants, but do not have roots, leaves and stems to photosynthesize. Microalgae is likened to a small plant in the size of micro cells that convert carbon dioxide into potential material. This study aims to isolate the microalgae, identify the species morphologically and molecularly, then determine the total phenolic content, antioxidant and antihyperglycemic bioactivity of the microalgae extract. The antioxidant test was carried out by the DPPH method and the antihyperglycemic test by the  $\alpha$ -amylase enzyme inhibitor method. The isolated microalgae was included in the type of *Chlorella vulgaris*. Methanol extract from dry biomass of microalgae provides the highest total phenolic content of 10.8 mg GAE/g compared to water extract (1.8 mg GAE/g) and hexane (1.1 mg GAE/g).  $IC_{50}$  value of methanol extract in capturing DPPH free radicals was 75.9  $\mu$ g/mL and was able to inhibit 50% of the  $\alpha$ -amylase enzyme activity at a concentration of 839.9  $\mu$ g/mL. According to the result, the bioactivity test for methanol extract of *Chlorella vulgaris* isolated from Kincir Kamba Tigo river had low ability as an antioxidant and antihyperglycemic.*

## 1. Pendahuluan

Mikroalga adalah mikroorganisme fotosintetik nutrisi yang berukuran antara satu mikrometer sampai ratusan mikrometer yang memiliki zat hijau (klorofil), hidup di air tawar atau laut, memerlukan karbon dioksida, beberapa nutrisi, dan cahaya untuk berfotosintesis (Chisti, 2007). Mikroalga dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku industri farmasi, karena adanya kandungan berbagai senyawa kimia yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan dasar untuk mengobati dan mencegah berbagai macam penyakit.

Mikroalga memiliki kandungan senyawa metabolit primer seperti karbohidrat (Yingying et al., 2014), lipid (Spiden et al., 2015), protein dan juga kandungan metabolit sekunder seperti alkaloid, karatenoid, terpenoid dan fenolik (Shanab et al., 2012). Senyawa fenolik merupakan senyawa yang banyak ditemukan pada tumbuhan. Senyawa fenolik memiliki cincin aromatis, satu atau lebih gugus hidroksil (OH) dan gugus lain penyertainya seperti gugus karboksilat dan gugus aldehyd. Senyawa fenolik merupakan senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan sebagai respon terhadap stres lingkungan. Senyawa fenolik berfungsi sebagai pelindung terhadap sinar UV-B dan kematian sel untuk melindungi DNA dari dimerisasi dan kerusakan (Lai and Lim, 2011). Gugus hidroksil pada fenolik memiliki potensi untuk memberikan elektronnya pada senyawa oksidan (radikal bebas) yang menghasilkan intermediet radikal yang relatif stabil.

Senyawa fenolik memiliki aktivitas biologik yang beraneka ragam dan banyak digunakan dalam reaksi enzimatik oksidasi kopling sebagai substrat donor H. Reaksi oksidasi kopling, selain membutuhkan suatu oksidator juga memerlukan adanya suatu senyawa yang dapat mendonorkan H. Senyawa fenolik dengan demikian berpotensi sebagai senyawa antioksidan. Senyawa antioksidan merupakan senyawa yang dapat menyekat dan mengurangi jumlah senyawa oksidan. Senyawa oksidan atau radikal bebas adalah suatu atom atau molekul yang setidaknya memiliki satu elektron yang tidak berpasangan pada kulit terluarnya. Setiap senyawa oksidan mengandung oksigen yang dikenal dengan *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS juga terdiri dari non-radikal bebas seperti hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Ozon (O<sub>3</sub>) dan hipoklorit (–OCl) (Anbudhasan et al., 2014). Selain bersifat antioksidan senyawa fenolik juga memiliki kemampuan mengikat protein sehingga dapat menghambat enzim pengurai karbohidrat (enzim  $\alpha$ -amilase dan  $\alpha$ -glukosidase (Mcdougall et al., 2002). Senyawa fenolik dari beberapa tanaman mampu menghambat aktivitas enzim  $\alpha$ -amilase akan tetapi tidak besar potensinya dalam menghambat enzim  $\alpha$ -glukosidase (Mcdougall et al., 2002). Enzim  $\alpha$ -amilase adalah endoenzim yang bekerja dengan menghidrolisis pati pada ikatan  $\alpha$ -1,4 glukosidik menjadi disakarida dan monosakarida. Kerja enzim amilase pada molekul amilosa meliputi dua tahap. Pertama, degradasi amilosa menjadi maltotriosa yang terjadi secara acak. Degradasi ini terjadi sangat cepat dan diikuti dengan penurunan viskositas dengan cepat pula. Pada tahap kedua terjadi

pembentukan maltosa sebagai hasil akhir. Proses ini berlangsung sangat lambat dan terjadi secara tidak acak.

Berdasarkan uraian diatas peneliti ingin mengisolasi dan mengidentifikasi mikroalga air tawar yang berada pada perairan Sungai Kincir Kamba Tigo. Sungai ini merupakan sungai yang hulunya berasal dari danau Singkarak. Di sekitar danau terdapat aktivitas warga budidaya ikan menggunakan keramba jaring apung. Menurut pengamatan penulis, air danau yang akan mengalir ke sungai telah tercemar dengan pakan dan kotoran ikan sehingga diharapkan ada jenis mikroalga yang mampu bertahan hidup diperairan tersebut dan memiliki kandungan metabolit sekunder yang memiliki bioaktivitas antioksidan dan antihiperlipidemik.

Tujuan penelitian untuk mengisolasi dan identifikasi spesies mikroalga yang berhasil diisolasi untuk menentukan kandungan fenolik total mikroalga. Pada penelitian ini digunakan tiga jenis pelarut yaitu air, metanol, dan heksana. Pemilihan pelarut didasarkan jenis kepolaran pelarut, ekstrak yang menghasilkan kandungan fenolik tertinggi selanjutnya digunakan untuk uji bioaktivitas antioksidan dan antihiperlipidemik. Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk mengetahui potensi penggunaan mikroalga hasil isolasi sebagai sumber senyawa antioksidan dan antihiperlipidemik

## 2. Metode

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini spektrofotometer *UV-Vis* (Thermo Scientific Genesys 20), autoclave (GEA-YX-18LDJ), aerator (AMARA AA-350), timbangan analitis (Kern-ABJ 220-4M), hot plate (Corning PC-420D), peralatan gelas, petridish, jarum ose, oven (KSC-olching), sentrifus (Health model HC-12 Centrifuge), tabung mikro, pendingin, sonikator, DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), peralatan PCR (BIORAD C1000 Thermo Cycler), UV-transluminator Gel Doc System (BioRad, USA), mikroskop (Binocular Olympus), slang, dan pipet.

Pada penelitian ini digunakan beberapa bahan sebagai berikut, sampel mikroalga yang diisolasi dari Sungai Kincir Kamba Tigo Kecamatan Rambatan, Tanah Datar – Sumatera Barat. Bahan lain yang digunakan adalah medium *Bold Basal* (NaNO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, NaCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, MoO<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, EDTA, KOH, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pupuk *growmore*, aquadest, metanol (96%), DPPH (Aldrich), asam askorbat (Merck), enzim  $\alpha$ -amilase (Sigma) dan acarbose (Dexa medica) .

### 2.1. Pengambilan sampel mikroalga

Mikroalga yang digunakan pada penelitian diisolasi dari Sungai Kincir Kamba Tigo yang berada di Kecamatan Rambatan, Tanah Datar–Sumatera Barat. Pengambilan sampel dilakukan dengan sebuah alat yaitu *plankton net*. Pengambilan sampel dilakukan pada tiga titik lokasi (permukaan pinggir sungai, permukaan tengah sungai dan kedalaman satu meter pada tengah sungai). *Plankton net* didiamkan  $\pm 5$  menit pada setiap lokasi kemudian diangkat, selanjutnya sampel air yang

didapat dicampurkan dengan medium BBM yang telah steril di dalam botol steril. Selanjutnya sampel dikultivasi dengan medium BBM dan pupuk *growmore* (*Growmore* 6-30-30, *Growmore* 10-55-10, *Growmore* 20-20-20, dan *Growmore* 32-10-10).

Pembuatan 1 L medium BBM dilakukan dengan melarutkan 10 mL makronutrien dan 1 mL mikronutrien ke dalam 1 L akuades pada labu ukur. Pembuatan 1 L medium pupuk *Growmore* dilakukan dengan melarutkan 0,6 g pupuk *Growmore* pada 1 L akuades. Larutan medium disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 30 menit. Larutan medium steril didinginkan hingga suhu ruang sebelum digunakan untuk kultivasi mikroalga.

## 2.2. Isolasi mikroalga

Sampel dikultivasi dalam medium BBM steril, selanjutnya sampel diencerkan sampai  $10^{10}$  kali pengenceran menggunakan medium steril. Bagian ujung mikropipet dimodifikasi sehingga ujungnya berbentuk lancip. Sampel yang telah diencerkan diambil dengan mikropipet dan diamati dengan mikroskop untuk memastikan sampel merupakan mikroalga tunggal. Sampel yang didapat dikultivasi dalam botol vial ukuran  $\pm 10$  mL diletakkan ditempat yang terkena cahaya matahari selama  $\pm 10$  hari, selanjutnya diamati kembali dengan mikroskop, jika sudah murni sampel dikultivasi dalam botol 100 mL dengan perbandingan medium BBM (1:9) selama  $\pm 20$  hari dan diamati kembali dengan mikroskop. Jika sampel tidak terkontaminasi, maka sampel dikultivasi dalam botol ukuran 500 mL dengan medium BBM untuk produksi biomassa

## 2.3. Identifikasi mikroalga

Identifikasi mikroalga dilakukan dengan dua metode yaitu secara morfologi menggunakan mikroskop cahaya dan secara molekuler dengan PCR. Langkah identifikasi secara morfologi dimulai dengan mengamati koloni dengan spesies tunggal menggunakan mikroskop dengan perbesaran  $40\times$ , hasil pengamatan selanjutnya akan dicocokkan dengan database yang terdapat pada *website Algae Resource Database*.

Selanjutnya dilanjutkan dengan identifikasi secara molekuler dimulai dengan isolasi DNA, amplifikasi dengan PCR, purifikasi dan sekuensing. Isolasi DNA pada dasarnya terdiri dari perusakan dinding sel, ekstraksi, dan pemurnian DNA (Rukmana, 2015). Mikroalga yang telah mencapai fase stasioner digunakan sebanyak 10 mL untuk disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm. Proses ini bertujuan untuk memisahkan biomassa mikroalga dengan medium. Biomassa yang didapat ditambahkan 400  $\mu$ L buffer AP1 dan 4  $\mu$ L RNase, campuran divortex dilanjutkan dengan inkubasi selama 10 menit pada suhu 65 °C. Selanjutnya ditambahkan 130  $\mu$ L buffer P3 dan didiamkan pada es batu selama 5 menit dan disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 14.000 rpm, proses ini menghasilkan filtrat. *Qiashedder spin column* digunakan untuk tempat filtrat untuk disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Pelet hasil sentrifugasi dipindahkan ke tabung baru. Selanjutnya dicampurkan

dengan 1,5 volume buffer AW1. 650  $\mu$ L campuran DNA dimasukkan ke tabung *DNeasy mini spin column* dan disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Filtrat dikeluarkan dan residu dialihkan ke tabung *column* yang baru dan ditambahkan 500  $\mu$ L buffer AW2 selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm durasi 1 menit, pelet yang dihasilkan ditambah 500  $\mu$ L buffer AW2 lanjut sentrifugasi 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. DNA yang tertangkap pada matriks dicampurkan dengan 100 buffer AE yang telah dipanaskan dan didiamkan selama 5 menit pada suhu ruang, dilanjutkan dengan sentrifugasi 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Proses diteruskan dengan uji kualitatif dan kuantitatif ekstrak DNA (*Quick-Start Protocol Qiagen*).

Selanjutnya 9  $\mu$ L template digunakan untuk amplifikasi PCR dengan menambahkan 5,65  $\mu$ L air destilasi, 4  $\mu$ L PCR buffer, 1,6  $\mu$ L deoksinukleotida trifosfat, 0,8  $\mu$ L primer, dan 0,2  $\mu$ L rTaq Polymerase. Ada 35 siklus yang harus dilewati dalam reaksi PCR, setiap siklus terdiri dari preheating 5 menit di suhu 95°C diikuti oleh denaturation pada suhu 95°C selama 30 detik, lanjut annealing selama 30 detik di suhu 56°C, diakhiri dengan extension selama 2 menit dan termination 7 menit, masing-masing pada suhu 72 °C (Humbert et al., 2002). Campuran 2  $\mu$ L natrium asetat 3 M pH 4,5 dan 40  $\mu$ L etanol absolut dingin disiapkan dalam tabung mikro steril ukuran 1,5 mL untuk 20  $\mu$ L produk PCR, kemudian divortex dan inkubasi pada suhu -20°C dengan durasi 30 sampai 50 menit. Kemudian campuran di sentrifugasi 30 menit dengan kecepatan maksimum 13.000 rpm. Supernatan dan pelet dipisahkan, selanjutnya pelet dicuci menggunakan etanol 70% sebanyak 100  $\mu$ L. Tabung mikro dibolak-balik sebanyak lima kali dan dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan maksimum selama 5 menit. Pelet dikeringkan dengan cara disentrifugasi menggunakan sentrifus *vacum* selama 10 menit. Selanjutnya pelet disuspensi menggunakan 15-25  $\mu$ L buffer TE pH 8. Hasil purifikasi dilihat dengan dua cara yaitu secara kualitatif dengan elektroforesis dan secara kuantitatif dengan spektrofotometer nanodrop (Hegewald and Hanagata, 2017).

Proses elektroforesis menggunakan gel *agarose*. Untuk gel *agarose* 1,5% sebanyak 1,5 gram *agarose* dicampurkan dengan running buffer TBE 0,5x (0,1 M Tris; 90 mM Borate; 2,5 mM EDTA; pH8,3) sampai volume 100 mL. Campuran buffer-agaros dididihkan sampai terlarut sempurna kemudian dicetak dengan cetakan gel *agarose* elektroforesis. Sebanyak 4  $\mu$ L DNA dicampurkan 1  $\mu$ L loading dye 6x (50% gliserol, 0,08% (w/v) bromophenol blue, H<sub>2</sub>O), kemudian dimasukkan dalam sumur gel, dan dijalankan dengan running buffer TBE 1x pada voltase 8V/cm. Gel diwarnai dengan pewarna *GelRed* (Biotium, USA) dan divisualisasikan menggunakan *UV-transluminator Gel Doc System* (BioRad, USA). Produk PCR yang telah dimurnikan selanjutnya disekuensing untuk mendapatkan urutan nukleotida dari isolat mikroalga hasil isolasi. Hasil sekuensing selanjutnya dibandingkan menggunakan data GenBank melalui program BLAST. Gen 18s rRNA dianalisis dengan menggunakan software BioEdit dan

dikonstruksi pohon filogenik menggunakan software MEGA 6.0 (Altschul et al., 1997).

## 2.4. Seleksi medium pertumbuhan

Mikroalga hasil isolasi ditumbuhkan dengan lima medium yang berbeda, yaitu *bold basal medium* (BBM), *growmore 6-30-30*, *growmore 10-55-10*, *growmore 20-20-20*, dan *growmore 32-10-10*. Mikroalga dikultivasi dengan perbandingan medium 1:9 dalam botol kaca bening ukuran 500 mL (isi 1/3) yang diberi tanda batas. Untuk menentukan medium terbaik dilihat dari kurva pertumbuhan mikroalga dalam masing-masing medium. Kurva pertumbuhan mikroalga dibuat dengan cara mengukur *optical density* (OD) setiap hari menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Cari panjang gelombang yang menghasilkan absorbansi maksimum. Setiap hari dihitung absorbansinya pada panjang gelombang yang telah ditentukan. Sampel mikroalga diambil menggunakan pipet tetes steril sebanyak  $\pm 3$  mL, ukur absorbansinya. Kalibrasi spektrofotometer dengan menggunakan kuvet berisi aquadest pada panjang gelombang yang telah didapatkan. Setelah pengukuran selesai, botol sampel diisi kembali dengan aquades steril sampai tanda batas. Pengukuran dilakukan sampai hari mikroalga mengalami fase kematian  $\pm 20-25$  hari.

## 2.5. Kultivasi dan pemanenan mikroalga

Pertumbuhan mikroalga dilanjutkan dengan medium terbaik. Menambahkan medium ke botol sampel mikroalga yang mengalami fase kematian sampai  $\pm 500$  mL, pemanenan dilakukan pada hari mikroalga mengalami fase stasioner. Proses pemanenan dilakukan dengan metode pengendapan selama 1 malam, filtrat dibuang dan sisa endapannya di sentrifugasi selama  $\pm 10$  menit dengan kecepatan 4000 rpm. Biomassa yang diperoleh dikeringanginkan dalam ruangan selama  $\pm 3$  hari dan ditimbang berat keringnya untuk digunakan pada tahap selanjutnya.

## 2.6. Pembuatan ekstrak mikroalga

Ekstrak mikroalga dibuat dengan menggunakan tiga pelarut berbeda yaitu air, metanol, dan heksana. Biomassa kering ditimbang sebanyak 0,3 g selanjutnya ditambahkan pelarut 10 mL, dimaserasi selama satu malam kemudian disonikasi selama 15 menit. Filtrat yang diperoleh disaring beberapa kali sehingga pelarut yang terakhir relatif tidak berwarna lagi. Pelarut diuapkan sehingga didapatkan ekstrak kering mikroalga.

## 2.7. Analisa kuantitatif kandungan fenolik total

Kurva kalibrasi asam galat digunakan untuk menganalisa kandungan fenolik total dari ekstrak mikroalga hasil isolasi. 10000  $\mu\text{g}$  (10 mg) asam galat dilarutkan dengan metanol 10 mL dalam labu ukur 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi asam galat sebesar 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Variasi konsentrasi larutan standar dibuat dengan konsentrasi 10; 20; 40; 60; 80 dan 100  $\mu\text{g/mL}$ . Sebanyak 0,5 mL diambil dari masing-masing konsentrasi dan dimasukan kedalam labu ukur 10 mL

lalu ditambahkan 0,5 mL reagen Follin-Ciocalteu. Campuran tersebut diinkubasi selama 5 menit dilanjutkan dengan menambahkan larutan natrium karbonat 20% sebanyak 1 mL dan diencerkan dengan menambahkan akuades sampai tanda batas. Larutan tersebut diinkubasi selama 120 menit kemudian absorbansi diukur dengan panjang gelombang 765 nm. Nilai absorbansi yang didapat menghasilkan kurva kalibrasi. Berdasarkan kurva kalibrasi didapat persamaan regresi dari larutan standar asam galat (Gürlek et al., 2019).

Selanjutnya, ditimbang sebanyak  $\pm 5$  mg ekstrak kering dari masing-masing ekstrak dan dilarutkan dengan masing-masing pelarutnya menggunakan labu 10 mL dan didapat konsentrasi ekstrak 500  $\mu\text{g/mL}$ . Sebanyak 0,5 mL larutan diambil dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL lalu ditambahkan 0,5 mL reagen Follin-Ciocalteu. Campuran tersebut diinkubasi selama 5 menit dilanjutkan dengan menambahkan larutan natrium karbonat 20% sebanyak 1 mL dan diencerkan dengan menambahkan akuades sampai tanda batas. Larutan tersebut diinkubasi selama 120 menit kemudian absorbansi diukur dengan panjang gelombang 765 nm. Kandungan fenolik total dinyatakan dalam *Gallic Acid Equivalent* (GAE). Perhitungan kandungan fenolik total (*total phenolic content*) menggunakan persamaan 1.

$$\text{TPC} = \frac{C \cdot V \cdot fp}{g} \quad (1)$$

C adalah konsentrasi fenolik (nilai X), V adalah volume ekstrak yang digunakan, fp merupakan faktor pengenceran dan g adalah massa sampel yang digunakan.

## 2.8. Uji aktivitas antioksidan

Aktivitas antioksidan dari ekstrak mikroalga dilakukan dengan uji *Scavenging* Radikal bebas DPPH. Sebanyak 2 mL ekstrak metanol mikroalga (dengan varian konsentrasi 50, 100, 150, 200 dan 250  $\mu\text{g/mL}$ ) dicampurkan dengan 2 mL larutan DPPH 0,1 mM. Campuran didiamkan selama 30 menit dalam suhu ruang dan keadaan gelap. Campuran diukur dengan spektrofotometer *uv-vis* dengan panjang gelombang 515 nm (Ghanbari et al., 2015). Aktivitas penangkapan radikal bebas bisa dihitung dengan rumus 2.

$$\text{Penangkapan radikal bebas (\%)} = \frac{\text{Abs (kontrol)} - \text{Abs (ekstrak)}}{\text{Abs (kontrol)}} \times 100\% \quad (2)$$

Data hasil pengukuran serapan dengan spektrofotometer *uv-vis* diolah untuk menentukan berapa persentase senyawa radikal bebas yang berhasil ditangkap oleh ekstrak metanol mikroalga dan standart eror tiap konsentrasi. Grafik dan Nilai  $\text{IC}_{50}$  dari ekstrak metanol mikroalga ditentukan dengan menggunakan aplikasi Graphpad Prism 8.

## 2.9. Uji aktivitas antihiperlipidemik

Aktivitas antihiperlipidemik dari ekstrak mikroalga dilakukan dengan cara menghambat kerja enzim  $\alpha$ -

amilase. 1 mL ekstrak mikroalga (dengan varian konsentrasi 200, 400, 600, 800 dan 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) ditambah 1 mL enzim  $\alpha$ -amilase dalam 0,2 M bufer fosfat (pH 6,9 dengan 0,006 M natrium klorida) diinkubasi pada suhu 25°C selama 10 menit. Larutan tersebut ditambahkan 1 mL pati 1% dalam 0,2 M natrium fosfat buffer (pH 6.9 dengan 0,006 M natrium klorida). Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada 25 °C selama 10 menit dan reaksi dihentikan dengan 2 mL 3,5 asam dinitrosalisilat, kemudian dimasukkan ke dalam bak air mendidih selama 5 menit dan didinginkan sampai suhu kamar. Campuran tersebut ditambahkan 10 mL aquades dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm. Inhibisi dapat dihitung dengan rumus 3 (Nair et al., 2013).

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{\text{Abs (control)} - \text{Abs (ekstrak)}}{\text{Abs (control)}} \times 100\% \quad (3)$$

Dari data hasil pengukuran serapan dengan spektrofotometer *uv-vis*, data yang didapat diolah untuk menentukan berapa persentase kerja enzim  $\alpha$ -amilase yang berhasil dihambat oleh ekstrak metanol mikroalga dan standart eror tiap konsentrasi. Grafik dan Nilai  $\text{IC}_{50}$  dari ekstrak metanol mikroalga ditentukan dengan menggunakan aplikasi Graphpad Prism 8.

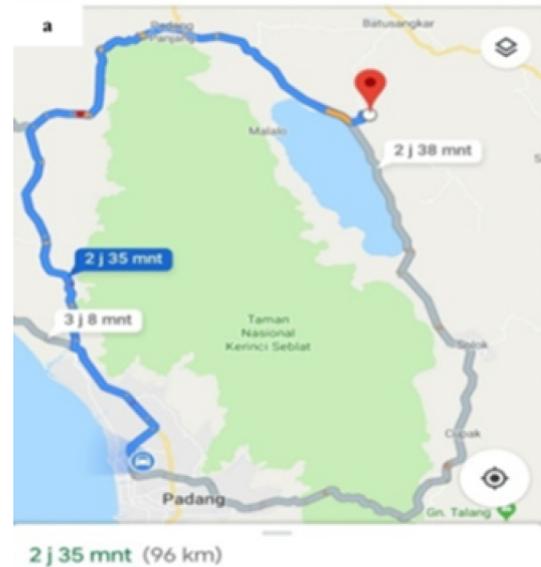
### 3. Hasil dan pembahasan

#### 3.1. Sampel air

Sampel mikroalga diambil dari perairan air tawar yaitu Sungai Kincir Kamba Tigo yang berada di Nagari Simawang, Kecamatan Rambatan, Kabupaten Tanah Datar, Provinsi Sumatera Barat. Lokasi ini berada sekitar 96 km dari kota Padang (Ibu Kota Provinsi), ciri khas dari lokasi ini adalah keberadaan tiga kincir yang memiliki diameter sekitar 14 meter pada sungai yang diperlihatkan pada Gambar 1. Sungai Kincir Kamba Tigo merupakan sungai yang aliran airnya berasal dari Batang Ombilin yang berhulu pada Danau Singkarak (danau yang membentang di dua kabupaten yang terdapat di provinsi Sumatera Barat, Indonesia, yaitu kabupaten Solok dan kabupaten Tanah Datar).

Suhu rata-rata setahun sekitar 22 °C. Bulan terpanas adalah Mei, dengan suhu rata-rata 24 °C, dan terdingin Januari, sekitar 20 °C. Curah hujan rata-rata tahunan adalah 3023 mm. Bulan dengan curah hujan tertinggi adalah November, dengan rata-rata 444 mm, dan yang terendah Juni, rata-rata 124 mm. Sungai ini digunakan warga sekitar untuk kehidupan sehari-hari. Tidak ada pohon besar di sekitar sungai sehingga semua bagian sungai terpapar cahaya matahari. Untuk pertumbuhan mikroalga yang optimal dibutuhkan cahaya yang cukup (Singh and Singh, 2015). Instrumen yang digunakan untuk mengambil sampel mikroalga adalah *plankton net* ukuran 30 mikron, karena ukuran mikroalga rata-rata berkisar antar 1 mikrometer sampai ratusan mikrometer. Sehingga penggunaan *plankton net* ukuran 30 mikron diharapkan bisa menangkap mikroalga yang hidup diperairan tersebut. Pengambilan sampel diambil di tiga titik (permukaan pinggir sungai, permukaan tengah sungai dan di kedalaman  $\pm 1$  meter tengah sungai),

selanjutnya sampel air digabungkan dalam botol steril berisi medium BBM untuk selanjutnya di isolasi di laboratorium.



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel (a) lokasi perairan pada peta (b) kincir air sebagai ciri khusus perairan

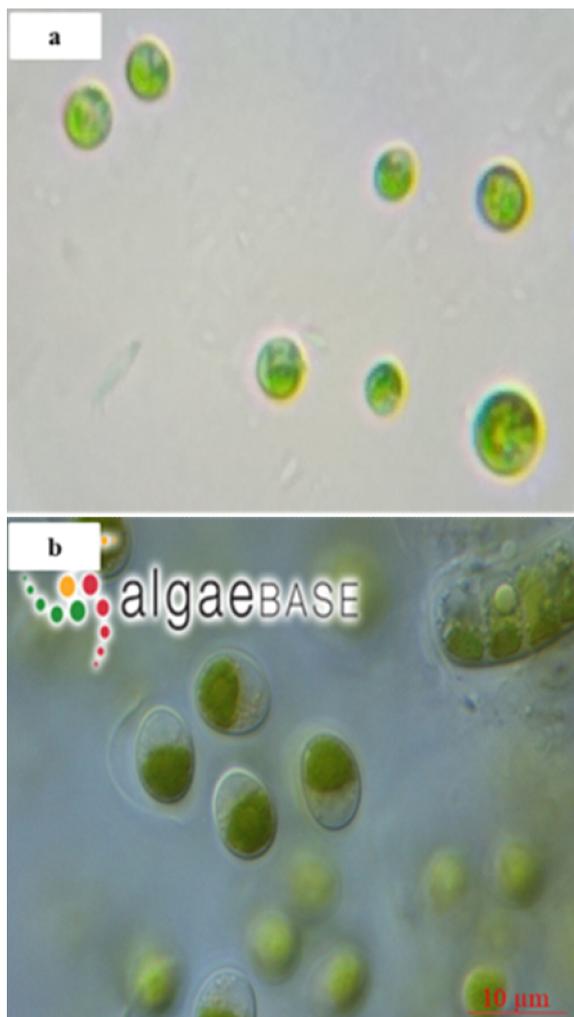
#### 3.2. Isolasi dan morfologi mikroalga

Telah diperoleh isolat mikroalga yang telah diisolasi dari Sungai Kincir Kamba Tigo dengan menggunakan metode pengenceran bertingkat yang dibantu dengan mikropipet modifikasi (Narayanan et al., 2018). Pada penelitian ini didapat satu jenis isolat tunggal mikroalga dan berdasarkan pengamatan morfologi menggunakan mikroskop optik didapatkan bahwa mikroalga hasil isolasi berwarna hijau, uniselular dan berbentuk bulat yang diperlihatkan pada Gambar 2. Berdasarkan literatur database resource algae mikroalga hasil isolasi termasuk kelompok *Chlorophyta* (alga hijau).

Mikroalga dari kelas *Chlorophyta* banyak ditemukan pada sumber perairan air tawar, seperti dilaporkan pada penelitian sebelumnya yang melaporkan penemuan mikroalga dari kelompok *Chlorophyta* dari danau di kota

Bhopal, India (Rahul et al., 2016). Kelompok mikroalga dari kelas *Chlorophyta* juga dilaporkan banyak ditemukan di Sungai Wonorejo, Surabaya, Indonesia diantaranya seperti *Mycrocystis* sp., *Nostoc* sp., *Chlorella* sp., *Tabellaria*, *Synedra*, *Nitzschia*, *Navicul*, dan *Closteriopsis* (Saputro et al., 2019).

Berdasarkan hasil pengamatan morfologi setelah dibandingkan dengan database dari AlgaBase serta didukung oleh referensi yang sudah disebutkan sebelumnya, maka diduga isolat mikroalga hasil isolasi Gambar 2(a) memiliki kemiripan dengan kelompok *Chlorophyta*, kelas *Trebouxiophyceae*, orde *Chlorellales*, family *Chlorellaceae*, dan genus *Chlorella*.



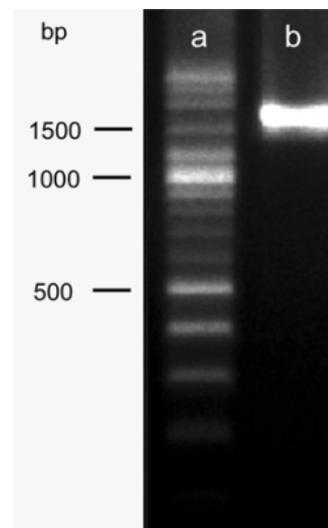
Gambar 2. Morfologi Mikroalga (a) Mikroalga hasil isolasi (b) Mikroalga dari *algaebase*

### 3.3. Identifikasi molekuler

Proses isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan kit Qiagen sampai diperoleh DNA murni. Setelah isolasi DNA, dilakukan amplifikasi, elektroforesis produk PCR, purifikasi dan sequencing (Hernandi et al., 2019). Hasil isolasi DNA yang diperoleh dilakukan PCR, sepasang primer 18s rRNA eukariotik digunakan untuk menentukan spesies mikroalga hasil isolasi. Hasil produk PCR DNA mikroalga diamati dengan elektroforesis. Hasil elektroforesis ditunjukkan pada Gambar 3.

Berdasarkan hasil elektroforesis, dapat dinyatakan bahwa isolasi DNA terhadap isolat mikroalga berhasil dilakukan. Hal ini berdasarkan pita yang dihasilkan merupakan pita tunggal. Pita yang dihasilkan jelas dan tidak ada smear di bawah pita DNA menandakan bahwa hasil isolasi berhasil (Rukmana, 2015). Hasil isolasi DNA selanjutnya disekuensing untuk mendapatkan urutan nukleotida dari isolat mikroalga hasil isolasi. Hasil sekuensing berupa elektroferogram, selanjutnya digabungkan kedua sekuennya (*contig*) untuk mendapatkan hasil sekuensing yang lebih baik. *Contig* dilakukan untuk menyatukan sekuen *forward* dan *reverse*, sehingga sekuen yang mengalami cacat dapat diperbaiki. *Contig* dilakukan dengan menggunakan *software bioedit* (Putri et al., 2016).

Sekuenn yang dihasilkan dari analisis *contig* diidentifikasi dan dibanding dengan *database* NCBI dengan menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Spesies pembanding dipilih berdasarkan proses BLAST. Sekuenn pembanding digunakan untuk analisis filogenetik. Sebelum membuat pohon filogenetik, sekuenn-sekuenn yang digunakan harus dilakukan pensejajaran terlebih dahulu agar dapat melihat homologi antara sampel dengan sekuenn pembanding. Tahap pensejajaran dan pembuatan pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan *software* MEGA 6.0 (Selvarajan et al., 2015). Dari hasil pensejajaran sekuenn-sekuenn tersebut, maka diperoleh pohon filogenetik seperti pada Gambar 4, yang memperlihatkan mikroalga hasil isolasi yang telah dikonstruksi pohon filogenetik.



Gambar 3. Elektroforegram Produk PCR (a) pita DNA ladder (b) pita hasil PCR fragmen 18S rRNA isolat mikroalga yang berukuran lebih kurang 1600 bp pada gel agaros 1,5%

Berdasarkan hasil konstruksi pohon filogenetik dengan menggunakan *software* MEGA 6.0, diperlihatkan tingkat similaritas isolat mikroalga hasil isolasi terhadap gen pembanding yang sebelumnya sudah diperoleh dari NCBI. Tingkat similaritas dapat diidentifikasi berdasarkan jarak genetik antar spesies, dimana dalam penelitian ini jarak genetik isolat mikroalga hasil isolasi adalah sebesar 0,05 dengan tingkat similaritas sebesar 99% terhadap isolat

*Chlorella vulgaris* strain SAG211. Semakin dekat jarak antar sampel maka similaritasnya akan semakin besar. Jarak genetik menunjukkan tingkat perbedaan gen antar spesies. Selain itu, jarak genetik juga menunjukkan dekat atau tidaknya kekerabatan antara sekuen nukleotida yang diamati (Selvarajan et al., 2015).

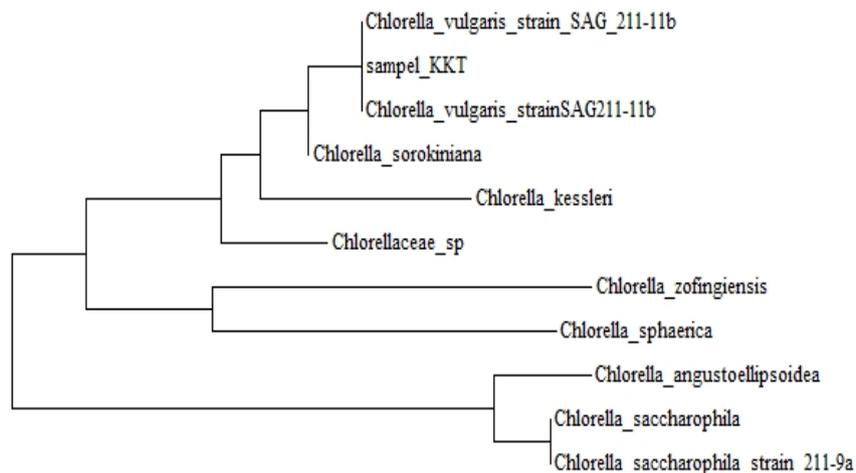
Berdasarkan data penelitian tersebut dapat diduga isolat mikroalga hasil isolasi memperlihatkan tingkat similaritas yang cukup tinggi dengan cabang yang dibentuk pohon filogenetik, dimana isolat mikroalga hasil isolasi sangat dekat kekerabatannya dengan mikroalga genus *Chlorella* spesies *vulgaris*. filogenetik dilakukan dengan menggunakan *software* MEGA 6.0 (Selvarajan et al., 2015). Dari hasil penjejakan sekuen-sekuen tersebut, maka didapatkan pohon filogenetik seperti pada Gambar 4, yang memperlihatkan mikroalga hasil isolasi yang telah dikonstruksi pohon filogenetiknya.

### 3.4. Kurva pertumbuhan mikroalga

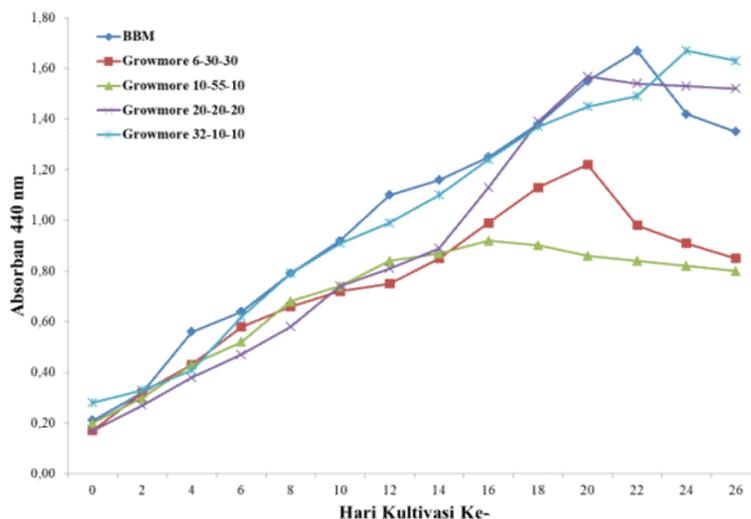
Medium yang digunakan untuk inokulasi mikroalga, yaitu medium BBM dan empat jenis pupuk *growmore* yang berbeda komposisi N, P dan K, yaitu pupuk

*growmore* 6-30-30, 10-55-10, 20-20-20, dan 32-10-10. Tujuannya untuk melihat medium mana yang paling sesuai dalam pertumbuhan mikroalga. Kurva pertumbuhan ini dibuat berdasarkan nilai Absorbansi mikroalga pada masing-masing medium pertumbuhan. Panjang gelombang yang digunakan dalam mengukur *optical density* (OD) adalah 440 nm. Berdasarkan nilai pengukuran OD diperoleh kurva pertumbuhan.

Menurut Gambar 5 medium BBM memberikan hasil terbaik pada pertumbuhan mikroalga karena memiliki serapan paling tinggi diantara jenis medium lainnya. Hal ini disebabkan karena perbedaan komposisi makronutrien kandungan BBM berbeda dengan pupuk *growmore*. Selain itu kandungan *micronutrient* yang terdapat pada komposisi BBM tapi tidak ada pada pupuk *growmore*. Mikronutrien adalah nutrisi yang diperlukan dalam jumlah sedikit tapi berperan penting dalam pertumbuhan mikroalga. Biasanya merupakan kelompok logam-logam yang berguna sebagai kofaktor dalam jalur metabolisme pertumbuhan mikroalga (Procházková et al., 2013). Tidak tersedianya mikronutrien tersebut akan menurunkan laju pertumbuhan dari mikroalga karena jalur metabolisme pertumbuhannya terganggu.



Gambar 4. Hasil analisis pohon filogenetik mikroalga hasil isolasi

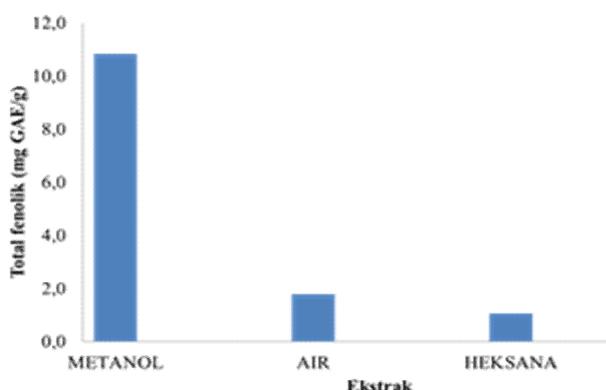


Gambar 5. Kurva pertumbuhan mikroalga

### 3.5. Kandungan fenolik total mikroalga

Kuantitatif total fenolik mikroalga diperlihatkan dalam Gambar 6. Berdasarkan gambar diketahui bahwa ekstrak metanol menghasilkan nilai total fenolik tertinggi sebesar 10,8 mg GAE/g, diikuti oleh ekstrak air 1,8 mg GAE/g, dan ekstrak heksana 1,1 mg GAE/g. Hasil ini sesuai dengan penelitian terdahulu dimana metanol adalah pelarut polar yang mampu mengekstrak senyawa fenolik yang juga bersifat polar (Safafar et al., 2015).

Ekstrak air yang juga bersifat polar, besar fenolik total yang diperoleh jauh dibawah ekstrak metanol. Hal ini disebabkan tidak semua jenis senyawa fenolik larut pada air tapi larut pada metanol. Sedangkan pada ekstrak heksana yang bersifat non polar sangat berbeda dengan sifat kepolaran fenolik sehingga menghasilkan nilai total fenolik yang kecil.



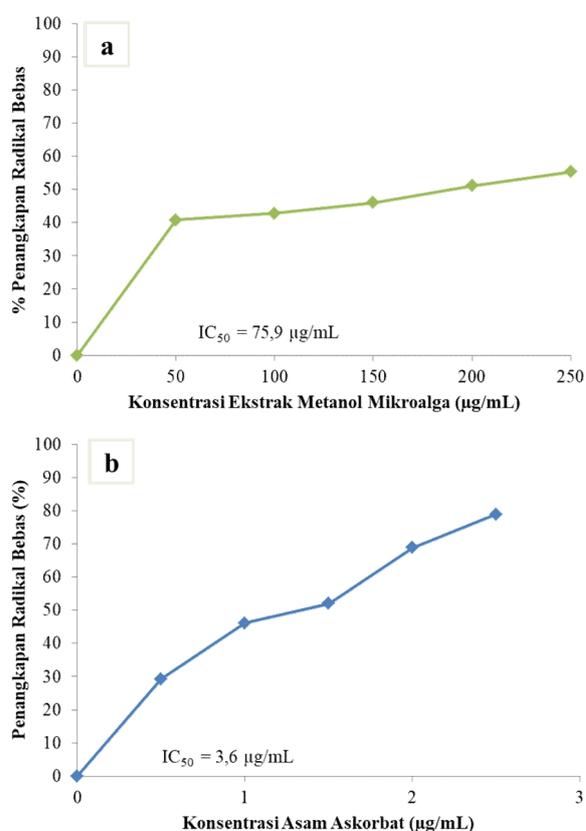
Gambar 6. Grafik fenolik total mikroalga

Perbedaan hasil ekstrak air dan heksana sebanding dengan penelitian yang dilakukan (Hajimahmoodi et al., 2010) dimana hasil total fenolik pada *Chlorella vulgaris* memiliki nilai lebih tinggi pada ekstrak air ( $19.15 \pm 0.04$  mg GAE/g) dibanding ekstrak heksana ( $0.02 \pm 0.001$  mg GAE/g) (Hajimahmoodi et al., 2010). Nilai kandungan fenolik total yang diperoleh pada penelitian ini tergolong rendah, karena ada jenis mikroalga yang memiliki kandungan total fenolik diatas 100 mg GAE/g seperti pada mikroalga spesies *Galdieria sulphuraria* (Gürlek et al., 2019) memiliki kandungan fenolik total sebesar 312 mg GAE/g dengan ekstrak metanol. Penelitian tersebut menyatakan tingginya kandungan fenolik total pada mikroalga spesies *Galdieria sulphuraria* disebabkan oleh suhu yang digunakan untuk pertumbuhan *Galdieria sulphuraria* yaitu 30°C lebih tinggi dari suhu ruang pada umumnya.

Kandungan fenolik total dan aktivitas antioksidan berbanding lurus. Semakin besar kandungan fenolik total dari ekstrak mikroalga maka semakin tinggi aktivitas antioksidan dari ekstrak tersebut (Sylvie et al., 2014). Berdasarkan hasil pengukuran kadar fenolik total, ekstrak yang memiliki kandungan total fenolik tertinggi yaitu metanol, selanjutnya digunakan untuk mengekstrak biomassa mikroalga hasil isolasi untuk uji bioaktivitas antioksidan dan antihiperlipidemik.

### 3.6. Kemampuan antioksidan

Kemampuan mikroalga sebagai antioksidan ditentukan dengan metode uji DPPH. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak mikroalga yang sudah disolasi diperlihatkan dalam Gambar 7. Grafik yang dihasilkan pada gambar 7 tidak linear sehingga untuk mencari nilai  $IC_{50}$  ekstrak metanol mikroalga tidak bisa menggunakan persamaan garis lurus. Pada perhitungan  $IC_{50}$  digunakan aplikasi GraphPad. Berdasarkan perhitungan nilai  $IC_{50}$  ekstrak metanol mikroalga diperoleh sebesar 75,9  $\mu\text{g/mL}$  dengan nilai persen penangkapan radikal bebas berkisar diantara 40-55% (konsentrasi 50-250  $\mu\text{g/mL}$ ). Ekstrak metanol mikroalga dibandingkan dengan asam askorbat memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar 3,6  $\mu\text{g/mL}$  yang nilai persen penangkapan radikal bebasnya berkisar 29-78% (konsentrasi 0,5-2,5  $\mu\text{g/mL}$ ).



Gambar 7. Kurva penangkapan radikal bebas (a) ekstrak mikroalga (b) Asam Askorbat

Hasil ini mengindikasikan bahwa kemampuan aktivitas antioksidan ekstrak metanol mikroalga hasil isolasi bersifat lemah sebagai antioksidan. Hal tersebut sejalan dengan pengukuran total fenolik yang hanya memiliki kandungan total fenolik sebesar 10,8 mg GAE/g. Hasil ini memperlihatkan bahwa senyawa bioaktif yang terkandung didalam ekstrak metanol mikroalga hasil isolasi kurang reaktif terhadap radikal DPPH yang digunakan dalam penelitian ini, sehingga aktivitas antioksidannya menjadi lemah.

Beberapa penelitian sebelumnya melaporkan bahwa ekstrak metanol mikroalga umumnya mempunyai kandungan fenolik dan aktivitas antioksidan yang tinggi, seperti pada penelitian Gürlek et al., (2019) yang mendapatkan kandungan total fenolik pada mikroalga *Galdieria sulphuraria* yang dilarutkan dengan ekstrak metanol sebesar 312 mg GAE/g diikuti dengan kemampuan antioksidannya sebesar  $95 \pm 0.7\%$  (Gürlek et al., 2019). Perbedaan ini dipengaruhi salah satunya adalah perbedaan proses kultivasi, dimana pada *Galdieria sulphuraria* dikultivasi dalam suhu tinggi, sementara dalam penelitian ini digunakan proses kultivasi pada suhu ruang. Penelitian sebelumnya juga menemukan mikroalga yang diekstrak dengan metanol memiliki fenolik total yang rendah seperti, *Tetraselmis chui*, *Botryococcus braunii*, dan *Neochloris oleoabundans* memiliki total fenolik secara berurutan sebesar  $57.5 \pm 8.7 \mu\text{mol GAE g}^{-1}$ ,  $52.9 \pm 2.0 \mu\text{mol GAE g}^{-1}$  dan  $26.6 \pm 2.5 \mu\text{mol GAE g}^{-1}$  (Banskota et al., 2019).

### 3.7. Kemampuan antihiperlikemik

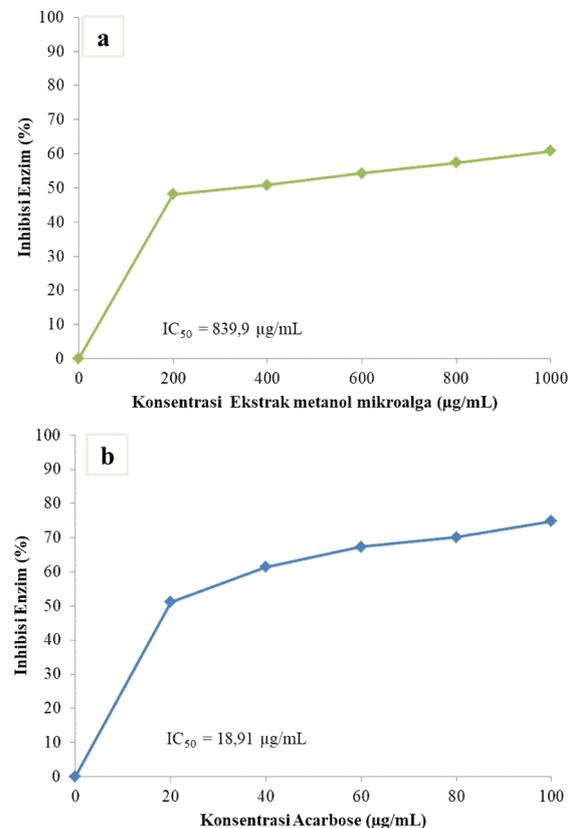
Uji inhibisi terhadap enzim  $\alpha$ -amilase dilakukan untuk mengetahui kemampuan ekstrak metanol mikroalga sebagai antihiperlikemik. Kemampuan ekstrak metanol mikroalga sebagai antihiperlikemik ditunjukkan pada Gambar 8. Grafik yang dihasilkan pada gambar 8 tidak linear sehingga untuk mencari nilai  $\text{IC}_{50}$  ekstrak metanol mikroalga tidak bisa menggunakan persamaan garis lurus. Pada perhitungan  $\text{IC}_{50}$  pada penelitian ini digunakan aplikasi GraphPad. Berdasarkan perhitungan nilai  $\text{IC}_{50}$  ekstrak metanol mikroalga sebagai antihiperlikemik adalah 839,9  $\mu\text{g/mL}$ . Senyawa dikatakan aktif apabila mempunyai nilai  $\text{IC}_{50}$  dibawah 50  $\mu\text{g/mL}$  sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol mikroalga tidak mempunyai potensi yang baik sebagai inhibisi enzim  $\alpha$ -amilase karena  $\text{IC}_{50}$  yang dihasilkan lebih dari 800  $\mu\text{g/mL}$ .

Hal ini sangat berhubungan dengan total fenolik dari mikroalga tersebut karena pada mekanisme fenolik sangat berpengaruh pada proses penurunan glukosa dalam darah (Setyani et al., 2019). Proses ini melibatkan dua mekanisme, pertama melalui aktivitas antioksidan intra-pankreas sehingga mencegah kerusakan sel beta pankreas (Schroeter et al., 2002). Mekanisme kedua melalui mekanisme ekstra-pankreatik yang mengarah kepada pengurangan penyerapan glukosa (Palanisamy et al., 2011). Selain itu senyawa fenolik dapat meningkatkan lapisan mukosa dalam usus sehingga bisa mencegah penyerapan glukosa dalam usus dan signifikan meningkatkan kelarutan glukosa dalam darah yang meningkatkan ekskresi glukosa melalui urin (Palanisamy et al., 2011).

Hasil penelitian ini didukung juga oleh hasil penelitian terdahulu, alga atau mikroalga yang telah diteliti juga tidak memiliki kemampuan antihiperlikemik yang kurang aktif karena memiliki nilai  $\text{IC}_{50}$  diatas 50  $\mu\text{g/mL}$ , dimana pada penelitian tersebut *Ulva lactuca* memiliki nilai  $\text{IC}_{50}$  232  $\mu\text{g/mL}$  *Grateloupia lithophila* memberikan nilai  $\text{IC}_{50}$  427  $\mu\text{g/mL}$ , dan *Stoechospermum marginatum* menghasilkan  $\text{IC}_{50}$  = 318  $\mu\text{g/mL}$  (Singh and Singh, 2015). Penelitian

oleh Muregesan et al., pada tahun 2017 memberikan fakta bahwa alga atau mikroalga merupakan penghambat enzim yang ringan (Murugesan S et al., 2015).

Sebuah penelitian melaporkan bahwa proses fraksinasi memberikan nilai bioaktivitas yang bagus dimana *Pouteria torta* yang awalnya dimaserasi dengan etanol memberikan nilai  $\text{IC}_{50}$  sebesar 73,6  $\mu\text{g/mL}$ , tetapi saat ekstrak etanol difraksi sehingga menghasilkan 8 fraksi, setiap fraksi memberikan kemampuan inhibisi  $\alpha$ -amilase yang berbeda. Fraksi 2 dan fraksi 8 tidak menghasilkan aktivitas inhibisi, fraksi 6 memberikan aktivitas inhibisi tertinggi yaitu 77% dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  9  $\mu\text{g/mL}$  (Sales et al., 2017). Aktivitas enzim diukur berdasarkan hasil absorbansi p-nitrofenol. Apabila memiliki kemampuan menghambat aktivitas enzim  $\alpha$ -glukosidase, maka p-nitrofenol yang dihasilkan akan berkurang. Semakin tinggi selisih absorbansi sampel dengan penambahan enzim dan absorbansi sampel tanpa penambahan enzim, maka persentase inhibisi  $\alpha$ -amilase semakin rendah (Sugiwati et al., 2006).



Gambar 8. Kurva inhibisi enzim  $\alpha$ -amilase (a) ekstrak mikroalga (b) acarbose

## 4. Kesimpulan

Mikroalga yang berhasil diisolasi dan identifikasi dari Sungai Kincir Kamba Tigo pada penelitian ini adalah *Chlorella vulgaris*. Kandungan fenolik total tertinggi mikroalga *Chlorella vulgaris* hasil isolasi adalah ekstrak metanol sebesar 10,8 mg GAE/g. Ekstrak metanol mikroalga memiliki aktivitas antioksidan dan aktivitas antihiperlikemik yang rendah dengan masing-masing nilai  $\text{IC}_{50}$  75,9  $\mu\text{g/mL}$  dan 839,9  $\mu\text{g/mL}$ .

## Ucapan terima kasih

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada analis laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan ilmu Pengetahuan Alam dan analis laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas. Beserta seluruh pihak yang telah membantu dalam penyelesaian dan penyusunan makalah penelitian ini.

## Daftar pustaka

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* 25, 3389–3402.
- Anbudhasan, P., Surendraraj, A., Karkuzhali, S., Sathishkumar, P., 2014. Natural antioxidants and its benefits. *Int. J. Food Nutr. Sci.* 3, 225–232.
- Banskota, A.H., Sperker, S., Stefanova, R., McGinn, P.J., O'Leary, S.J.B., 2019. Antioxidant properties and lipid composition of selected microalgae. *J. Appl. Phycol.* 31, 309–318. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1523-1>
- Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25, 294–206. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00010-8>
- Ghanbari, R., Zarei, M., Ebrahimpour, A., Abdul-Hamid, A., Ismail, A., Saari, N., 2015. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory and antioxidant activities of sea cucumber (actinopyga lecanora) hydrolysates. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 28870–28885. <https://doi.org/10.3390/ijms161226140>
- Gürlek, C., Yarkent, Ç., Köse, A., Tuğcu, B., Gebeloğlu, I.K., Öncel, S., Elibol, M., 2019. Screening of antioxidant and cytotoxic activities of several microalgal extracts with pharmaceutical potential. *Health Technol. (Berl)*. <https://doi.org/10.1007/s12553-019-00388-3>
- Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M.A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M.R., Nafissi-Varcheh, N., 2010. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *J. Appl. Phycol.* 22, 43–50. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9424-y>
- Hegewald, E., Hanagata, N., 2017. Phylogenetic studies on Scenedesmeaceae (Chlorophyta). *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algol. Stud.* 29, 2017. <https://doi.org/10.1127/algol>
- Hernandi, R., Dharma, A., Armaini, A., 2019. Penapisan, isolasi, dan karakterisasi mikroalga yang berpotensi sebagai sumber biodiesel dari perairan Danau Kerinci, Jambi. *J. Litbang Ind.* 9, 11–16.
- Humbert, J.F., Dorigo, U., Be, A., 2002. Comparison of eukaryotic phytobenthic community composition in a polluted river by partial 18S rRNA gene cloning and sequencing. *Microb. Ecol.* 372–380. <https://doi.org/10.1007/s00248-002-2024-x>
- Lai, H.Y., Lim, Y.Y., 2011. Evaluation of antioxidant activities of the methanolic extracts of selected ferns in Malaysia. *Int. J. Environmental Sci. Dev.* 2, 442–447.
- Mcdougall, G.J., Shpiro, F., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., Stewart, D., Crop, S., 2002. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Qual. Heal. Nutr.* 5196.
- Murugesan S, M, A.B., S, B., M, K., S, D.T., 2015. In vitro antidiabetic activity of methanolic extracts of selected marine algae. *Eur. J. Pharm. Med. Res.* 2, 256–260.
- Nair, S.S., Kavrekar, V., Mishra, A., 2013. In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. *Eur. J. Exp. Biol.* 3, 128–132.
- Narayanan, G.S., Kumar, G., Seepana, S., Elankovan, R., Arumugan, S., Premalatha, M., 2018. Isolation, identification and outdoor cultivation of thermophilic freshwater microalgae *Coelastrella* sp. FI69 in bubble column reactor for the application of biofuel production. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.03.022>
- Palanisamy, U., Manaharan, T., Teng, L.L., Radhakrishnan, A.K.C., Subramaniam, T., Masilamani, T., 2011. Rambutan rind in the management of hyperglycemia. *Food Res. Int.* 44, 2278–2282. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.048>
- Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V., Brányik, T., 2013. Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Appl. Phycol.* <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0154-9>
- Putri, M., Chaidir, Z., Syafrizayanti, 2016. Isolasi dan identifikasi mikroalga yang terdapat di perairan Lembah Harau Payakumbuh, Sumatera Barat sebagai salah satu agen penghasil senyawa antibakteri. Universitas Andalas.
- Rahul, V., Agrawal, P., Sharma, M., Shukla, S., 2016. Total phenolics, flavonoids and antioxidant potential of organic extract of fresh water algal sample collected from a marine lake. *Indian J. Geo-Marine Sci.* 45, 1320–1326.
- Rukmana, S., 2015. Perbandingan sekuense kapang *Trichoderma* sp. berdasarkan internal transcribed spacer (ITS) rDNA dengan menggunakan data base NCBI. *Biol. Fak. Sains Dan Teknol. Univ. Malik Ibrahim Malang* 3, 54–67.
- 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, 7339–7356. <https://doi.org/10.3390/md13127069>
- Sales, P.M. de, Souza, P.M. de, Dartora, M., Resck, I.S., Simeoni, L.A., Fonseca-Bazzo, Y.M., Magalhaes, P. de O., Silveira, D., 2017. *Pouteria torta* epicarp as a useful source of  $\alpha$ -amylase inhibitor in the control of type 2 diabetes. *Food Chem. Toxicol.* 109, 962–969. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.015>
- Saputro, T.B., Purwani, K.I., Ermavitalini, D., Saifulloh, A.F., 2019. Isolation of high lipid content microalgae from Wonorejo river, Surabaya, Indonesia and its identification using rbcL marker gene. *Biodiversitas* 20, 1380–1388. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d200530>
- Schroeter, H., Boyd, C., Spencer, J.P.E., Williams, R.J.,

- Cadenas, E., Rice-Evans, C., 2002. MAPK signaling in neurodegeneration: Influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol. Aging* 23, 861–880. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00075-1](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00075-1)
- Selvarajan, R., Felföldi, T., Tauber, T., Sanniyasi, E., Sibanda, T., Tekere, M., 2015. Screening and evaluation of some green algal strains (Chlorophyceae) isolated from freshwater and soda lakes for biofuel production. *Energies* 8, 7502–7521. <https://doi.org/10.3390/en8077502>
- Setyani, W., Setyowati, H., Palupi, D.H.S., Rahayunnissa, H., Hariono, M., 2019. Antihyperlipidemia and antihyperglycemic studies of *Arcangelisia flava* (L.) merr. phenolic compound: incorporation of in vivo and in silico study at molecular level. *Indones. J. Pharm. Sci. Technol.* 6, 84. <https://doi.org/10.24198/ijpst.v6i2.20211>
- Shanab, S.M.M., Mostafa, S.S.M., Shalaby, E.A., Mahmoud, G.I., 2012. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2, 608–615. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60106-3](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60106-3)
- Singh, S.P., Singh, P., 2015. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 50, 431–444. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.024>
- Spiden, E.M., Scales, P.J., Yap, B.H.J., Kentish, S.E., Hill, D.R.A., Martin, G.J.O., 2015. The effects of acidic and thermal pretreatment on the mechanical rupture of two industrially relevant microalgae: *Chlorella* sp. and *Navicula* sp. *ALGAL* 7, 5–10. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.11.006>
- Sugiwati, S., Kardono, L.B.S., Bintang, M., 2006.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity and hypoglycemic effect of *Phaleria macrocarpa* fruit pericarp extracts by oral administration to rats. *J. Appl. Sci.* <https://doi.org/10.3923/jas.2006.2312.2316>
- Sylvie, D.D., Anatole, P.C., Cabral, B.P., Veronique, P.B., 2014. Comparison of in vitro antioxidant properties of extracts from three plants used for medical purpose in Cameroon: *Acalypha racemosa*, *Garcinia lucida* and *Hymenocardia lyrata* 4, S625–S632. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.201414B168>
- Yingying, S., Hui, W., Ganlin, G., Yinfang, P., Binlun, Y., 2014. The isolation and antioxidant activity of polysaccharides from the marine microalgae *Isochrysis galbana*. *Carbohydr. Polym.* 113, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.058>