



ISOLASI KLOROFIL a DAN ANALISIS AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI MIKROALGA *C. vulgaris*

Anies Chamidah*, Hefni Citra Afrilia, Mirza Gulam Ahmad, Desy Arisandi

Program Studi Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya
Jalan Veteran, Malang Jawa Timur Indonesia 65145

Diterima: 26 Juli 2024/Accepted: 31 Oktober 2024

*Korespondensi: achamidah@ub.ac.id

Cara sitasi (APA Style 7th): Chamidah, A., Afrilia, H. C., Ahmad, M. G., & Arisandi, D. (2024). Isolasi klorofil a dan analisis aktivitas antioksidan dari mikroalga *C. vulgaris*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 27(11), 1006-1020. <http://dx.doi.org/10.17844/jphphi.v27i11.57470>

Abstrak

Klorofil adalah pigmen hijau yang ditemukan dalam membran tilakoid yang terdiri atas klorofil a, b, c, d, dan e, yang bermanfaat sebagai antioksidan, antiinflamasi, antimutagenik, dan antikanker. Penggunaan klorofil dari mikroalga belum banyak dieksplorasi dibandingkan dengan klorofil dari tanaman darat. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menentukan aktivitas antioksidan klorofil a dari mikroalga *C. vulgaris*. Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimen laboratorium, dengan tahapan ekstraksi mikroalga *C. vulgaris* menggunakan pelarut etanol 96%, fraksinasi *crude* ekstrak *C. vulgaris* dengan n-heksana, identifikasi klorofil dan penentuan eluen terbaik untuk isolasi KLT, isolasi fraksi untuk memperoleh pigmen klorofil selanjutnya diuji KLT, kadar total klorofil dan aktivitas antioksidan. Hasil pengujian meliputi uji rendemen, kromatografi lapis tipis (KLT), kadar total klorofil, dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Hasil penelitian menunjukkan bahwa klorofil a dapat diisolasi melalui ekstraksi menggunakan etanol 96%, fraksinasi dengan n-heksana, dan pemurnian dengan kromatografi kolom menggunakan pelarut petroleum eter (7:3). Nilai IC_{50} dari klorofil a yang dihasilkan adalah $63,99 \pm 5,46$ ppm, yang termasuk dalam kategori antioksidan kuat. Temuan ini menunjukkan bahwa klorofil a *C. vulgaris* memiliki potensi sebagai sumber antioksidan alami yang efektif.

Keywords: ekstraksi, fraksinasi, IC_{50} , kromatografi, mikroalga

Isolation of Chlorophyll a and Analysis of Antioxidant Activity from Microalgae *C. vulgaris*

Abstract

Chlorophyll is a green pigment found in the thylakoid membrane, consisting of chlorophyll a, b, c, d, and e, and is beneficial as an antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic, and anticancer agent. The use of chlorophyll from microalgae has not been extensively explored compared with that from terrestrial plants. This study aimed to isolate and determine the antioxidant activity of chlorophyll-a from *C. vulgaris*. The research method used was laboratory experiments, with stages including the extraction of *C. vulgaris* microalgae using 96% ethanol solvent, fractionation of crude *C. vulgaris* extract with n-hexane, chlorophyll identification and determination of the best eluent for TLC isolation, and fraction isolation to obtain chlorophyll pigments, followed by TLC testing, total chlorophyll content, and antioxidant activity. The test results included the yield test, thin-layer chromatography (TLC), total chlorophyll content, and antioxidant activity test using the DPPH method. The research results show that chlorophyll-a can be isolated through extraction using 96% ethanol, fractionation with n-hexane, and purification by column chromatography using a petroleum ether solvent. (7:3). The IC_{50} value of the produced chlorophyll-a is 63.99 ± 5.46 ppm, which falls into the category of strong antioxidants. These findings indicate that the chlorophyll-a from *C. vulgaris* has the potential to be an effective source of natural antioxidants.

Keywords: chromatography, extraction, fractionation, IC_{50} , microalgae

PENDAHULUAN

Klorofil adalah pigmen hijau yang penting dalam proses fotosintesis, yang memungkinkan tanaman mengubah energi cahaya menjadi senyawa organik. Klorofil terdapat pada makro dan mikroalga, yang merupakan bagian penting dari ekosistem perairan. Makroalga, misalnya ganggang hijau dan rumput laut, serta mikroalga, misalnya *C. vulgaris* dan *Spirulina* sp., menggunakan klorofil untuk fotosintesis, menyediakan oksigen, dan menjadi dasar rantai makanan dalam ekosistem perairan. Klorofil adalah salah satu pigmen yang memiliki peran vital dalam fotosintesis. Pigmen klorofil telah diteliti mempunyai efek biologis untuk meningkatkan kesehatan (Erniati *et al.*, 2018). Pigmen ini terdiri atas beberapa tipe, termasuk klorofil a, b, c, d, dan e, yang masing-masing memiliki manfaat kesehatan yaitu antioksidan (Leite *et al.*, 2018), anti-inflamasi (Zhang *et al.*, 2019), anti-mutagenik (Cenkci & Kaya, 2022), dan anti-kanker (Martins *et al.*, 2023). Keberadaan klorofil dalam diet manusia telah dikaitkan dengan pencegahan berbagai penyakit kronis yang disebabkan oleh stres oksidatif, yaitu penyakit kardiovaskular, diabetes, dan kanker (Theafelicia & Wulan, 2023; Sabrina *et al.*, 2022).

Klorofil dari mikroalga *C. vulgaris* memiliki potensi besar namun masih kurang dieksplorasi dibandingkan dengan klorofil dari tanaman darat (Pratita *et al.*, 2022). Mikroalga memiliki kelebihan mampu memproduksi biomassa 50 kali lebih cepat serta mudah dikultur (Vinata & Wulandari, 2020). *C. vulgaris* memiliki keunggulan dalam produksi biomassa yang cepat, kemudahan budidaya, dan kandungan nutrisi yang tinggi, menjadikannya sumber alternatif yang potensial untuk klorofil (Vinata & Wulandari, 2020). Mikroalga *C. vulgaris* mampu menghasilkan klorofil dengan kemurnian tinggi yang berpotensi digunakan sebagai antioksidan alami (Budiana, 2021).

Peningkatan prevalensi penyakit kronis yang berhubungan dengan stress oksidatif yaitu kanker, tumor dan lain sebagainya, membutuhkan sumber antioksidan alami. Antioksidan merupakan

senyawa yang mampu menghambat oksidasi molekul lain (Sanger *et al.*, 2018). Antioksidan alami mampu melindungi tubuh terhadap kerusakan yang disebabkan spesies oksigen reaktif tanpa efek samping, mampu menghambat penyakit degeneratif. Kebutuhan antioksidan alami meningkat seiring dengan kekhawatiran terhadap efek samping antioksidan sintetik yang sering digunakan dalam produk konsumen (Syawal *et al.*, 2019), sehingga penelitian ini memiliki relevansi tinggi dalam konteks kesehatan masyarakat dan keberlanjutan lingkungan (Manurung *et al.*, 2020). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menentukan aktivitas antioksidan klorofil a dari mikroalga *C. vulgaris*. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi signifikan dalam pemanfaatan mikroalga sebagai sumber antioksidan alami, serta membuka peluang untuk aplikasi lebih lanjut dalam industri makanan dan farmasi.

BAHAN DAN METODE Ekstraksi Pigmen Klorofil

Bahan yang digunakan adalah serbuk *C. vulgaris* dari Balai Perikanan Budidaya Air Payau Situbondo Jawa Timur. Serbuk diperoleh dari hasil pengeringan *C. vulgaris* menggunakan suhu 50-60°C selama 24 jam. Ekstraksi pigmen klorofil berdasarkan metode dari Novianti *et al.* (2019). Pertama bubuk *C. vulgaris* 30 g dalam Erlenmeyer 500 mL dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 300 mL (1:10). Larutan dihomogenkan menggunakan pengaduk magnet selama 10 menit. Erlenmeyer ditutup dengan foil alumunium dan diletakkan di tempat yang terhindar dari cahaya. Pengadukan dilakukan setiap 6 jam sekali menggunakan spatula kaca agar pigmen dapat terangkat. Ekstraksi dilakukan selama 24 jam, selanjutnya maserat disaring menggunakan kertas saring Whatman No. 42. Proses maserasi diulang sebanyak 3 kali dengan pelarut yang sama hingga semua pigmen terangkat dan diperoleh ekstrak kasar (*crude extract*). Maserat kemudian dipekatkan menggunakan *rotary vacum evaporator* (IKA RV 10 Basic) dengan kecepatan 100 rpm suhu 40°C hingga terbentuk cairan pekat.



Fraksinasi Pigmen Klorofil

Fraksinasi pigmen klorofil berdasarkan Dimara *et al.* (2012) yaitu maserat pekat hasil ekstraksi klorofil dipartisi menggunakan corong pisah dengan perbandingan jumlah maserat dan n-heksana (1:1). Selanjutnya, corong pisah dihomogenkan hingga terbentuk dua fase. Apabila tidak terbentuk dua fase antara pigmen dengan pelarut, maka ditambahkan n-heksana atau larutan garam untuk membantu pemisahannya. Fase bawah yang terbentuk disingkirkan, sedangkan fase atas ditampung kemudian dipekatkan kembali menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga pekat.

Identifikasi Fraksi n-heksana menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pengujian KLT dengan sampel ekstrak kasar atau maserat. Pengujian ini berdasarkan Kondororik *et al.* (2015). Percobaan dilakukan menggunakan berbagai pelarut yaitu aseton, petroleum eter, heksana, dan aseton sebagai fase gerak. Fase gerak (*solvent*) dimasukkan ke dalam masing-masing *chamber* yaitu perlakuan 1= aseton:petroleum eter:heksana (2:3:6), perlakuan 2=aseton:petroleum eter :heksana (1:2:3), perlakuan 3=heksana: aseton (7:3), dan perlakuan 4= petroleum eter:aseton (7:3) dan menutupnya hingga jenuh, selanjutnya menyiapkan plat KLT dengan lebar 2 cm, tinggi 10 cm, dan dibuat garis pada batas bawah dan atas plat setinggi 1 cm dengan pensil 2B. Kemudian maserat (sampel) ditempelkan pada garis bawah yang telah dibuat pada pelat KLT silika gel 60 F254 sebagai fase diam dan dikering anginkan. Selanjutnya memasukkan plat ke dalam *chamber* dan ditunggu hingga solvent mencapai garis batas atas pelat KLT, pengujian ini diulang sebanyak 3 kali. Pola pemisahan, warna bercak dan nilai *retention factor* (Rf) kemudian dicatat. Pelarut yang optimal dipilih berdasarkan nilai Rf yang sesuai dengan Rf klorofil berdasarkan literatur dan kemampuannya memisahkan senyawa target dari bahan awal. Apabila semua pelarut mampu memisahkan noktah, maka pelarut dengan hasil pemisahan noktah paling banyak dan jelas yang dipilih untuk proses isolasi.

Penghitungan nilai Rf menggunakan rumus:

$$Rf = \frac{A}{B} \times 100\%$$

Keterangan:

A = jarak yang ditempuh komponen

B = jarak yang ditempuh eluen

Isolasi Klorofil Menggunakan Kromatografi Kolom

Isolasi klorofil dari *C. vulgaris* dilakukan menggunakan kolom kromatografi menurut Hasanela *et al.* (2020) dengan fase diam silika gel dan fase gerak adalah hasil terbaik KLT fraksi n-heksana yaitu campuran petroleum eter: aseton (7:3). Langkah pertama, fase diam disiapkan dengan melarutkan silika gel 50 g dalam pelarut petroleum eter dan aseton (7:3) kemudian dihomogenkan menggunakan stirer selama 1 jam. Kolom kromatografi disiapkan dengan menegakkan pada statif kemudian bagian ujung bawah diberi *glass wool* dan di atasnya diberi kertas saring. Bubur silika gel yang telah dibuat dimasukkan ke dalam kolom kromatografi secara perlahan kemudian didiamkan kurang lebih 24 jam untuk memadatkan silika gel. Sampel dimasukkan ke dalam kolom dengan menggunakan pipet tetes secara perlahan. Ekstrak pigmen jika sudah meresap pada silika gel, maka dilakukan penambahan fase gerak. Keran pada kolom dibuka selanjutnya akan terbentuk fraksi berwarna yang keluar dari kolom. Hasil masing-masing fraksi ditampung dalam botol vial untuk selanjutnya diidentifikasi menggunakan KLT.

Identifikasi Klorofil Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pengujian KLT dilakukan pada sampel klorofil hasil kromatografi kolom juga mengikuti metode Kondororik *et al.* (2015). Langkah yang dilakukan hampir sama dengan KLT pertama namun pelarut yang digunakan sebagai fase gerak langsung merujuk pelarut yang digunakan dalam kromatografi kolom.

Penghitungan Rendemen (AOAC, 2005)

Rendemen dihitung dengan membandingkan berat antara berat akhir

produk yang dihasilkan dengan berat bahan awal. Besarnya rendemen dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Rendemen} = \frac{A}{B} \times 100\%$$

Keterangan:

A = berat akhir

B = berat awal

Penghitungan Kadar Total Klorofil

Pengujian kadar total klorofil berdasarkan Sumiati (2021) yaitu ekstrak *C. vulgaris* (fraksi n-heksana) 0,1 g dilarutkan dalam 10 mL aseton 80%, selanjutnya, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit kemudian disaring. Hasil filtrat yang diperoleh diambil 1 mL kemudian diencerkan dalam labu ukur 10 mL. Pengujian menggunakan spektrofotometer UV-Vis (LUS B-12) yang telah diatur nilai transmittannya menjadi 100% pada panjang gelombang 663 nm untuk klorofil a dan 645 nm untuk klorofil-b, hasil yang diperoleh dicatat kemudian dihitung kadar total klorofil menggunakan rumus (Arnon, 1949):

$$\text{Klorofil a (mg/L)} = (12,7 \times A_{663}) - (2,69 \times A_{645})$$

$$\text{Klorofil b (mg/L)} = (22,9 \times A_{645}) - (4,68 \times A_{663})$$

$$\text{Total klorofil (mg/L)} = (20,2 \times A_{645}) + (8,02 \times A_{663})$$

Keterangan:

A₆₄₅ = nilai absorbansi ekstrak klorofil pada panjang gelombang 645 nm

A₆₆₃ = nilai absorbansi ekstrak klorofil pada panjang gelombang 663 nm

Uji Warna

Uji warna dilakukan berdasarkan Caliskan & Dirim (2016) menggunakan *colorimeter* dengan sistem warna Hunter L* (*Lightness*), a* (*Redness*), dan b* (*Yellowness*). Sampel maserat klorofil dengan berbagai konsentrasi diukur menggunakan *colorimeter* kemudian nilai L*, a*, dan b* diulang 3 kali setiap sampelnya.

Uji Antioksidan

Pengujian antioksidan klorofil a dari *C. vulgaris* berdasarkan Molyneux (2004) dengan modifikasi menggunakan metode 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Larutan sampel yang diuji adalah ekstrak *C. vulgaris*. Fraksi *C. vulgaris* dan klorofil a dalam

konsentrasi berbeda yaitu 25, 50, 75, dan 100 ppm menggunakan pelarut etanol. Larutan DPPH dibuat dengan melarutkan 1,97 mg bubuk DPPH menggunakan etanol ke dalam labu ukur 100 mL. Selanjutnya, uji antioksidan dilakukan dengan mereaksikan 3,8 mL DPPH dan 0,2 mL sampel serta dilakukan inkubasi selama 30 menit dengan konsentrasi akhir adalah 4.996×10^{-5} . Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang optimal yaitu 571 nm. % inhibisi dihitung dengan menggunakan regresi liner dengan rumus berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A-B}{B} \times 100$$

Keterangan:

A = absorbansi blangko

B = absorbansi sampel

Analisis Data

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen laboratorium yaitu menentukan pelarut terbaik untuk mengisolasi klorofil *C. vulgaris* menggunakan KLT dengan empat perlakuan pelarut yang berbeda. Perlakuan 1 menggunakan kombinasi pelarut aseton: petroleum eter: heksana (2:3:6), perlakuan 2= aseton: petroleum eter: heksana (1:2:3), perlakuan 3= heksana: aseton (7:3), dan perlakuan 4= petroleum eter: aseton (7:3). Selanjutnya dilakukan identifikasi klorofil dan penentuan eluen terbaik untuk isolasi KLT, isolasi fraksi untuk memperoleh pigmen klorofil, selanjutnya dilakukan uji KLT, kadar total klorofil dan antioksidan. Analisis dan penyajian data dilakukan secara sistematis untuk menggambarkan klorofil dari *C. vulgaris*.

HASIL DAN PEMBAHASAN Rendemen Ekstrak

Rendemen ekstrak *C. vulgaris* pada penelitian ini yaitu $42,46 \pm 2,24\%$. Hasil penelitian ini tergolong tinggi dibandingkan Suhadirman *et al.* (2020), yang memperoleh rendemen ekstrak *C. vulgaris* dengan menggunakan pelarut etanol 70% sebesar 22,37%. Namun, hasil ini masih di bawah penelitian Novianti *et al.* (2019), dengan menggunakan metanol yaitu 50%. Rendemen



dengan pelarut metanol lebih tinggi dari etanol, karena metanol lebih polar daripada etanol, dan lebih sesuai dengan polaritas sampel *C. vulgaris* sehingga lebih maksimal dalam menarik klorofil (Putri *et al.*, 2023). Pemilihan etanol 96% sebagai pelarut dikarenakan sifatnya yang polar serta relatif tidak toksik jika dibandingkan metanol sehingga lebih aman jika digunakan untuk makanan ataupun obat (Hakim & Saputri, 2020). Ekstraksi *C. vulgaris* menggunakan pelarut etanol 96% lebih aman dan tidak toksik dibandingkan metanol karena etanol memiliki toksisitas yang lebih rendah dan lebih aman untuk konsumsi manusia. Selain itu, etanol efektif dalam melarutkan senyawa bioaktif penting dan dapat dengan mudah diuapkan setelah proses ekstraksi. Residu yang tersisa dapat dihilangkan dengan penguapan etanol, sehingga produk akhir menjadi lebih aman dan tidak toksik.

Metanol berisiko tinggi karena dapat menyebabkan keracunan serius, sehingga kurang tepat untuk ekstraksi bahan alami yang berpotensi sebagai bahan pangan dan obat. Nurdin *et al.* (2009) menjelaskan bahwa ekstraksi menggunakan etanol dapat menghasilkan nilai *recovery* serta klorofil dengan kemurnian tinggi. Utomo (2016), menyatakan bahwa etanol 96% banyak digunakan untuk ekstraksi karena toksisitasnya rendah, serta memiliki kemampuan pemisahan yang tinggi. Selain itu pelarut etanol 96% lebih mudah masuk ke dalam dinding sel sampel, menghasilkan ekstrak yang pekat (Wendersteyt *et al.*, 2021) daripada pelarut etanol dengan konsentrasi lebih rendah (Suhadirman *et al.*, 2020). Pelarut etanol 96% memiliki kelarutan yang relatif tinggi dan bersifat inert sehingga tidak bereaksi dengan komponen lainnya (Wahyuni & Setiarso, 2022). Faktor yang memengaruhi rendemen selain jenis pelarut adalah perbedaan keadaan senyawa, sampel, metode, ukuran partikel, lama ekstraksi dan jumlah pelarut yang digunakan (Prasetya *et al.*, 2020).

Fraksi N-Heksana

Klorofil adalah senyawa nonpolar yang akan larut dalam pelarut nonpolar juga, sehingga digunakan n-heksana yang

termasuk pelarut nonpolar (Januarti *et al.*, 2019). Senyawa ini terdapat pada lapisan atas dari proses fraksinasi, sedangkan lapisan bawah adalah etanol yang disingkirkan (Septiani *et al.*, 2018). Penggunaan n-heksana untuk proses fraksinasi klorofil karena memiliki kelebihan yaitu volatil, selektif, dan stabil (Melanie & Fithriani, 2015). Ugrasena *et al.* (2022) melaporkan penggunaan n-heksana memiliki ketetapan dielektrik sebesar 1,89 sehingga mampu menarik senyawa nonpolar yaitu klorofil. Penggunaan n-heksana murni lebih kuat menarik komponen nonpolar *C. vulgaris* jika dibandingkan campuran n-heksana dengan etanol (Constanty, 2021). Fraksinasi dari *C. vulgaris* yaitu $23,57 \pm 0,21\%$ yang lebih tinggi dibandingkan Anjaswati *et al.* (2021) sebesar 18% dan Suhara *et al.* (2020) 4%. Perbedaan rendemen hasil fraksinasi dapat disebabkan oleh sampel yang digunakan tumbuh di tempat yang berbeda. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan Hikmawanti *et al.* (2016), bahwa variasi rendemen dipengaruhi oleh pelarut maupun bahan yang digunakan.

Kadar Total Klorofil

Pigmen utama yang terdapat dalam membran tilakoid kloroplas yaitu klorofil a dan b (Syalma, 2021). Faktor yang memengaruhi pembentukan klorofil adalah cahaya, gen, unsur N, Mg, dan Fe sebagai pembentuk dan katalis dalam sintesis klorofil (Mawarti *et al.*, 2020). Hasil penghitungan kadar klorofil pada sampel ekstrak kasar yang telah diisolasi menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam silika gel dan fase gerak petroleum eter : aseton (7:3) menunjukkan nilai rata-rata kadar klorofil a 20,798 mg/L dan klorofil b 17,509 mg/L dengan total klorofil 40,300 mg/L. Hasil ini lebih rendah dibandingkan Boy *et al.* (2016), pada *Chlorella* sp. total klorofil sebesar 68,64 mg/L. Perbedaan total klorofil *C. vulgaris* dibandingkan *Chlorella* sp. dapat disebabkan karena umur panen, habitat, intensitas cahaya, maupun genetika. Total klorofil *C. vulgaris* secara umum lebih tinggi jika dibandingkan mikroalga lain yaitu *Dunaliella salina* 27,07 mg/mL (Salimah *et al.*, 2022) dan *Tetraselmis chuii* 19,20 mg/g (Adi *et al.*, 2015).

Isolasi Fraksi n-Heksana

Isolasi fraksi n-heksana *C. vulgaris* dilakukan untuk mengetahui komponen senyawa kimia/pigmen yang terdapat pada sampel dan memperoleh eluen terbaik untuk isolasi menggunakan kromatografi kolom, dengan menggunakan empat kombinasi eluen yaitu A= aseton:PE:n-heksana (2:3:6); B= aseton:PE:n-heksana (1:2:3); C= n-heksana:aseton (7:3) dan D= PE:aseton (7:3). Berdasarkan perbedaan jenis eluen tersebut, diperoleh sejumlah noktah pada lempeng KLT dengan nilai Rf yang bervariasi. Hasil pemisahan noktah dengan KLT dapat dilihat pada *Figure 1*.

Hasil KLT dengan empat kombinasi eluen yang berbeda (*Figure 1*) menunjukkan pemisahan komponen senyawa pigmen dalam sampel. Hasil KLT ini dapat dilihat bahwa eluen terbaik untuk pemisahan klorofil a adalah pada perlakuan D yaitu pelarut PE: aseton (7:3) karena menghasilkan noktah paling banyak dan jarak antar noktah berjauhan. Hal ini didukung Notonegoro *et al.* (2022) bahwa eluen terbaik hasil KLT ditentukan secara kualitatif dengan melihat pemisahan noktah yang paling banyak dan jelas. Nilai Rf dari masing-masing fraksi dengan eluen yang berbeda disajikan pada *Table 1*.

Penggunaan dua hingga tiga eluen dengan variasi polaritas, bertujuan untuk

melihat pola kromatogram senyawa yang paling jelas dari sampel (Kurnia *et al.*, 2020). Noktah dengan Rf paling tinggi menunjukkan bahwa senyawa tersebut bersifat nonpolar karena plat silika gel sendiri bersifat polar sehingga ketika dilarutkan dengan eluen maka senyawa nonpolar akan menghasilkan Rf paling besar (Hynstova *et al.*, 2018). Identifikasi pigmen menggunakan KLT didasarkan pada warna noktah dan besarnya nilai Rf. Hasil penelitian menunjukkan jumlah noktah yang berbeda untuk masing-masing kombinasi pelarut yang digunakan. Eluen A yakni kombinasi aseton: PE: n-heksana (2:3:6) menunjukkan bahwa komponen aktif yang dapat ditarik oleh eluen cenderung lebih sedikit dibandingkan kombinasi eluen yang lain karena fase gerak tidak dapat memisahkan senyawa yang terkandung di dalam fraksi sehingga tertahan di bagian bawah dekat garis start. Eluen B yakni kombinasi aseton:PE:n-heksana (1:2:3) dan C yakni kombinasi n-heksana:aseton (7:3) menunjukkan pemisahan komponen aktif yang kurang sempurna. Pemisahan senyawa terbaik terdapat pada pelarut D yakni kombinasi PE:aseton (7:3). Kombinasi eluen PE dan aseton dengan perbandingan (7:3) dapat melarutkan senyawa dengan menghasilkan 9 noktah komponen senyawa aktif yang terpisah dengan baik. Kombinasi PE:aseton

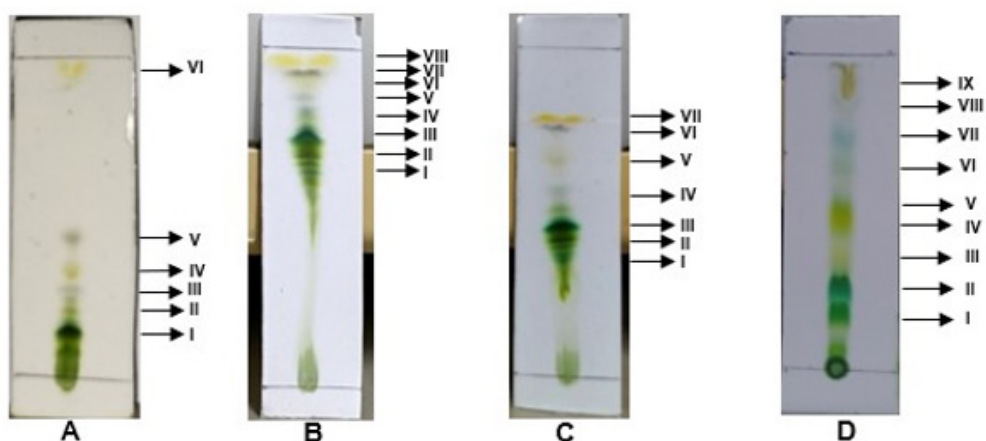


Figure 1 Thin-layer chromatography of *C. vulgaris* (A) Acetone:PE:n-hexane (2:3:6), (B) Acetone:PE:n-hexane (1:2:3), (C) n-hexane:acetone (7:3), (D) PE:acetone (7:3)

Gambar 1 Kromatografi lapisan tipis *C. vulgaris* (A) aseton:PE:n-heksana (2:3:6), (B) aseton:PE:n-heksana (1:2:3), (C) n-heksana:aseton (7:3), dan (D) PE:aseton (7:3)

Table 1 Rf value of thin-layer chromatography results of *C. vulgaris* fractionTabel 1 Nilai Rf kromatografi lapisan tipis fraksi *C. vulgaris*

Eluent	Point	Color	Compound	Rf Point	Rf Reference
Acetone:PE:n-hexane (2:3:6).	I	Green	Chlorophyll b	0.14	0.8-0.14 ^a
	II	Blue green	Chlorophyll b	0.28	0.08-0.35 ^b
	III	Grey	Pheophytin	0.34	0.16-0.54 ^b
	IV	Yellow	Carotene	0.43	0.44 ^c
	V	Grey	Pheophytin	0.44	0.41-0.70 ^b
	VI	Yellow	Carotene	0.96	0.87-1 ^d
Acetone:PE:n-hexane (1:2:3).	I	Green	Chlorophyll b	0.66	0.30-0.57 ^c
	II	Green	Chlorophyll b	0.68	0.30-0.57 ^c
	III	Blue green	Chlorophyll a	0.74	0.73-0.90
	IV	Blue green	Chlorophyll a	0.79	0.73-0.90
	V	Grey	Pheophytin	0.85	0.76-0.89 ^c
	VI	Yellow	Carotene	0.89	0.88-0.93 ^c
	VII	Grey	Pheophytin	0.93	0.76-0.89 ^c
	IX	Yellow	Carotene	0.96	0.87-1 ^d
n-hexane:acetone (7:3)	I	Green	Chlorophyll b	0.36	0.38-0.61 ^c
	II	Green	Chlorophyll b	0.40	0.38-0.61 ^c
	III	Blue green	Chlorophyll a	0.47	0.34-0.48 ^c
	IV	Grey	Pheophytin	0.56	0.41-0.70 ^b
	V	Yellow	Carotene	0.65	0.25-1 ^b
	VI	Grey	Pheophytin	0.75	0.76-0.89 ^c
	VII	Yellow	Carotene	0.79	-.25-1 ^b
PE: acetone (7:3)	I	Green	Chlorophyll b	0.16	0.8-0.14 ^a
	II	Blue green	Chlorophyll c	0.20	0.19-0.22 ^d
	III	Yellow	Santophile	0.34	0.26-0.34 ^c
	IV	Yellow	Santophile	0.45	0.26-0.34 ^c
	V	Green	Chlorophyll b	0.53	0.48-0.56 ^c
	VI	Grey	Pheophytin	0.63	0.41-0.70 ^b
	VII	Blue	Chlorophyll b	0.74	0.73-0.90 ^c
	VIII	Gray	Pheophytin	0.84	0.76-0.89 ^c
	IX	Yellow	Carotene	0.89	0.88-0.93 ^c

^a=Resita *et al.* (2010), ^b=Pesang *et al.* (2019), ^c=Rosahdi *et al.* (2015), ^d=Limantara & Heriyanto (2012)

merupakan kombinasi eluen yang bersifat nonpolar dan semi polar. Tujuan kombinasi eluen dengan polaritas yang berbeda adalah untuk memisahkan komponen senyawa dengan lebih baik (Notonegoro *et al.*, 2022), hal ini disebabkan senyawa polar akan larut dalam pelarut polar sedangkan senyawa nonpolar akan larut dalam pelarut nonpolar serta sebagian besar senyawa polar dan nonpolar juga larut dalam pelarut semi polar (Forestryana & Arnida, 2020).

Identifikasi Pigmen Klorofil

Pigmen fotosintesis memiliki warna sehingga proses pemisahan dapat diamati dengan mudah secara visual (Rega *et al.*, 2018). Pita-pita pigmen terbentuk pada proses isolasi berdasarkan warna dan tingkat kepolarannya. Pigmen dengan kepolaran tinggi akan terikat kuat pada silika gel sedangkan pigmen dengan kepolaran lebih rendah akan lebih mudah terbawa oleh fase gerak (Hasanela *et al.*, 2020). Komponen yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat. Menurut Sulaiman *et al.*, (2022) pada proses ini, pigmen karotenoid yang bersifat nonpolar akan terelusi terlebih dahulu, selanjutnya diikuti oleh pigmen klorofil.

Pemisahan pigmen menggunakan kromatografi kolom ini menghasilkan 6 warna fraksi yang berbeda. Berdasarkan hasil isolasi dari fraksi *C. vulgaris* setelah dielusi diperoleh jumlah fraksi 1= 20 mL, fraksi 2= 3 mL, fraksi

3= 4 mL, fraksi 4= 15 mL, fraksi 5= 40 mL, dan fraksi 6= 20 mL. Fraksi tersebut menunjukkan warna yang berbeda. Fraksi 1 berwarna kuning cerah, fraksi 2 cokelat, fraksi 3 hijau, fraksi 4 hijau biru, fraksi 5 hijau terang, dan fraksi 6 hijau kuning. Proses isolasi dan hasil pigmen klorofil dapat dilihat pada *Figure 3*.

Identifikasi Fraksi Hasil Pemisahan Kolom Kromatografi

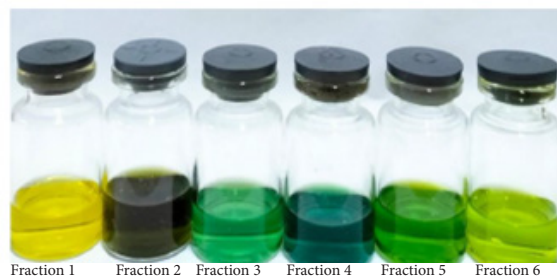
Fraksi *C. vulgaris* yang diperoleh selanjutnya dilakukan identifikasi menggunakan KLT kembali dengan fase diam silika gel dan fase gerak kloroform:etil asetat (9:1). Metode KLT ini digunakan untuk memisahkan komponen senyawa aktif berdasarkan kecepatan migrasi atau rasio distribusi dari komponen campuran fase diam dan fase gerak (Syarifuddin & Sulistyani, 2019). Hasil identifikasi fraksi *C. vulgaris* dengan KLT dapat dilihat pada *Figure 2*.

Fraksi 1 berwarna kuning serta menghasilkan noktah tunggal di KLT dengan nilai R_f 0,9 sehingga diduga sebagai senyawa karotenoid. Hasil KLT fraksi 2 dan 3 terlihat masih banyak bercak yang menunjukkan bahwa belum diperoleh senyawa murni. Fraksi 4 diperoleh 2 noktah dengan sedikit pengotor, R_{f1} sebesar 0,8 yang diduga klorofil b dan R_{f2} sebesar 0,9 yang diduga sebagai klorofil a. Hasil kromatogram fraksi 5 mirip dengan fraksi 6 serta diperoleh 2 noktah yang diduga merupakan klorofil.

Rosahdi *et al.* (2015) menyatakan bahwa klorofil a berada pada nilai R_f 0,57-



(A)



(B)

Figure 2 (A) Pigment separation (B) Isolation results using chromatography column
Gambar 2 (A) Pemisahan pigmen (B) Hasil isolasi menggunakan kolom kromatografi

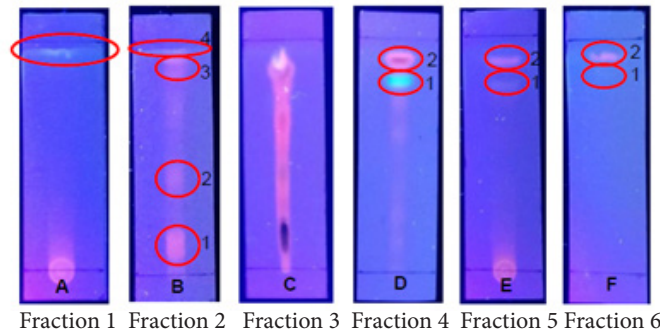


Figure 3 TLC result Fractions 2 to 6 contain chlorophyll
 Gambar 3 Hasil KLT fraksi 2 sampai 6 mengandung klorofil

0,64 sedangkan klorofil b berada pada nilai Rf 0,42-0,56. Suwardi *et al.* (2021) menjelaskan senyawa dapat dikatakan memiliki kemurnian yang tinggi apabila dalam lempeng KLT dihasilkan 1 spot noktah. Hartanto (2012) menyatakan apabila noktah di plat KLT belum tunggal, maka dilakukan pemurnian kembali, sehingga fraksi 4 yang mengandung 2 noktah salah satunya diduga klorofil a karena nilai Rf sebesar 0,64 dilakukan pemurnian kembali.

Pemurnian Pigmen Klorofil a

Fraksi yang menjadi target isolasi untuk memperoleh pigmen klorofil a yaitu fraksi 4, setelah dipekatkan dengan bantuan gas nitrogen kemudian dilanjutkan pemurnian kembali menggunakan kolom kromatografi. Hasil isolasi dikoleksi ke dalam botol vial, untuk warna yang sama digabungkan dan diuji kemurniannya menggunakan KLT. Hasil pengujian dengan KLT dapat dilihat pada *Figure 4*.

Berdasarkan *Figure 4* Fraksi ketiga dan keempat berhasil diidentifikasi, yaitu klorofil

a yang merupakan pigmen fotosintesis utama. Puncak serapan klorofil a utama berada pada daerah 430 dan 660 nm serta memiliki serapan agak lemah pada 580 nm. Adapun fraksi 4 berada pada daerah 426 dan 670 nm, dan serapan agak lemah pada 406, 520, 570 nm. Menurut Hasanela *et al.* (2020) klorofil-a standar yang serapan utama berada pada daerah 430 dan 662 serta serapan agak lemah pada 534, 581, 616 nm.

Pemurnian senyawa klorofil a dengan menggunakan kolom kromatografi menghasilkan 3 warna yang berbeda. Hasil isolasi yang dipilih untuk uji KLT yaitu A dan C karena memiliki warna hijau yang merupakan karakteristik dari klorofil a. Fraksi A dan C menghasilkan noktah tunggal serta memiliki nilai Rf yang sama yaitu 0,54. Munculnya bercak tunggal pada lempeng KLT merupakan salah satu indikator bahwa senyawa yang diperoleh sudah murni dan sesuai dengan Rf klorofil a. Nilai Rf dari A dan C juga serupa dengan penelitian Rosahdi *et al.* (2015), yaitu rentang Rf untuk klorofil a yaitu

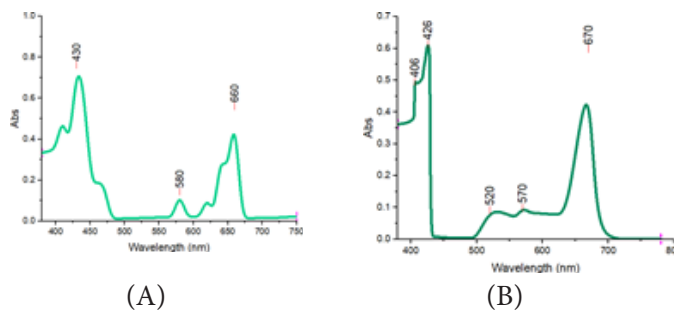


Figure 4 (A) fraction 3 (B) fraction 4
 Gambar 4 (A) fraksi 3 (B) fraksi 4

0,52-0,86. Uji kemurnian ini selaras dengan penelitian Mora *et al.* (2016), suatu senyawa dapat dikatakan memiliki kemurnian yang tinggi apabila diperoleh noktah tunggal pada hasil KLT.

Hasil Uji Warna

Pengujian intensitas warna memberikan gambaran terkait kekuatan warna hijau dari klorofil a. Nilai °Hue menggambarkan sumbu 360°, di mana kuadran 1 menunjukkan warna merah, sementara kuadran 2 menunjukkan warna kuning hijau. Rentang nilai pengategorian warna *red purple* memiliki °hue 342-18, *yellow red* 54-90, *yellow green* 126-162, *green* 162-198, *blue green* 198-234, *blue* 234-270, *blue purple* 270-342. Hasil pengujian warna berdasarkan derajat hue menunjukkan nilai 225,74 yang berarti warna hijau kebiruan/ hijau biru yang sesuai untuk warna klorofil a. Rentang nilai derajat hue untuk warna hijau biru adalah 198 hingga 234. Hal ini didukung oleh penelitian Putnarubun & Valentine (2020). yang melaporkan bahwa klorofil a berwarna hijau biru.

Kekuatan Antioksidan Klorofil a

Pengujian aktivitas menggunakan metode DPPH. Metode ini mengukur

kapasitas antioksidan sampel secara keseluruhan dengan cara mengetahui reaksi penangkapan hidrogen oleh DPPH dari zat antioksidan (Widiawati & Asih, 2024). Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan untuk memperoleh persen inhibisi. Kemampuan sampel untuk menghambat antioksidan ditentukan berdasarkan nilai IC₅₀. Nilai tersebut menunjukkan konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk mengurangi aktivitas radikal bebas (Gazali *et al.*, 2020). Perbandingan dilakukan antara aktivitas antioksidan dari Isolat klorofil a dengan ekstrak dan fraksi *C. vulgaris*. Hubungan konsentrasi dengan persen inhibisi DPPH dan nilai IC₅₀ dapat dilihat pada *Table 2*.

Persen inhibisi klorofil a pada konsentrasi yang sama menunjukkan nilai lebih tinggi dari pada fraksi *C. vulgaris* maupun ekstrak *C. vulgaris*. Nilai IC₅₀ dari klorofil a 63,99 ppm (kuat), fraksi *C. vulgaris* 56,29 ppm (kuat) dan ekstrak *C. vulgaris* 132,25 ppm (sedang). Hal ini sesuai dengan Tristantini *et al.* (2016) bahwa nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm tergolong sangat kuat, 50-100 ppm tergolong kuat, 100-150 ppm tergolong sedang, dan 150-200 ppm tergolong lemah.

Fraksi *C. vulgaris* memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik dibandingkan

Table 2 Antioxidant activity of chlorophyll a

Tabel 2 Kekuatan antioksidan klorofil a

Sample	Concentration (ppm)	% Inhibition	IC ₅₀ (ppm)
Chlorophyll a	25	27.71±1.67	63.99±5.46
	50	43.61±11.18	
	75	62.65±7.11	
	100	91.86±1.88	
Fractination of <i>C. vulgaris</i> N-hexane	25	18.64±3.63	56.29±8.60
	50	34.52±6.79	
	75	61.22±20.12	
	100	78.82±3.81	
<i>C. vulgaris</i> extract	25	11.75±1.98	132.25±2.90
	50	18.73±4.30	
	75	26.29±5.15	
	100	41.27±0.51	



ekstrak *C. vulgaris*. Hal ini sejalan dengan Notonegoro *et al.* (2022) bahwa aktivitas antioksidan dari fraksi akan lebih besar jika dibandingkan dengan ekstrak kasar. Isolasi klorofil a memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi pula jika dibandingkan dengan ekstrak kasar. Hal ini juga didukung Podungge *et al.* (2017) dan Prasetyo *et al.* (2022) bahwa aktivitas antioksidan isolat lebih tinggi jika dibandingkan ekstrak kasar. Namun aktivitas antioksidan isolat klorofil a lebih kecil dibandingkan fraksi *C. vulgaris*. Hal ini sejalan dengan Werdyani *et al.* (2019) yang melaporkan bahwa aktivitas antioksidan pada fraksi lebih besar karena mengandung berbagai senyawa yang bekerja sinergis sehingga memberikan efek antioksidan lebih kuat. Sedangkan ketika suatu senyawa diisolasi dan memiliki persen kemurnian yang tinggi maka tidak ada senyawa lain yang membantu mendukung untuk meningkatkan aktivitas antioksidannya.

KESIMPULAN

Isolasi klorofil dari mikroalga *C. vulgaris* yaitu klorofil a dengan aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 63,99 ppm, yang termasuk dalam kategori antioksidan kuat. Klorofil a dari *C. vulgaris* memiliki potensi sebagai sumber antioksidan alami yang efektif.

DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC] Association of Official Methods of Analytical Chemists. (2005). Official Methods of Analysis of The Association of Official Analytical Chemist, 18.
- Adi, I. A., Anggraeni, A., & Arnata, I. W. (2015). Optimasi salinitas dan pH awal media BG-11 terhadap konsentrasi biomassa dan klorofil *Tetraselmis chuii*. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, 3(4), 51–61.
- Anjaswati, D., Pratimasari, D., & Nirwana, A. P. (2021). Perbandingan rendemen ekstrak etanol, fraksi n-heksana, etil asetat, dan air daun bit (*Beta vulgaris L.*) menggunakan fraksinasi bertingkat. *STIKES*, 1(1), 1–6.
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in beta *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1–5. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- Boy, F., Ma'ruf, W. F., & Sumardianto, S. (2016). Pengaruh umur panen dan lama penyimpanan mikroalga *Chlorella sp.* terhadap kestabilan klorofil setelah fiksasi $MgCO_3$. *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*, 5(2), 10–15.
- Budiana, W. (2021). Uji aktivitas antioksidan ekstrak mikroalga *Porphyridium cruentum* menggunakan metode peredam radikal bebas DPPH. *Journal of Pharmacopolium*, 3(3), 157–165.
- Caliskan G, & Dirim S N. (2015). The effect of different drying processes and the amounts of maltodextrin addition on the powder properties of sumac extract powders. *Journal Powder Technology*. <https://10.1016/j.powtec.2015.10.01>
- Cenkci, S,K & Kaya, B. (2022). Effects of chlorophyll *a* and *b* in reducing genotoxicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-F]quinoxaline (MeIQx). *Biology*, 11, 602. <https://doi.org/10.3390/biology11040602>
- Constanty, I. C. (2021). Aktivitas antioksidan dari fraksi n-heksana kulit batang tumbuhan jambu semarang (*Syzygium samarangense*). In *Jurnal Kimia Riset*. 6(1), 1-7.
- Dellima, B. R. E. M., Putri, M. K., & Liung, A. M. (2023). Penetapan kadar klorofil daun kelor dan aplikasinya dalam formulasi sediaan gel. *Jurnal Jamu Kusuma*, 3(1), 1–6.
- Dimara, L., Tuririday, H., & Yenusi, T. N. (2012). Identifikasi dan fotodegradasi pigmen klorofil rumput laut *Caulerpa racemosa* (Forsskal). *J. Agardh. Jurnal Biologi Papua*, 4(2), 47–53.
- Erniati., Zakaria,F,R., Prangdimurti, E., Adawiyah, D, R., & Priosoeryanto, B, P. (2018). Penurunan logam berat dan pigmen pada pengolahan *geluring* rumput laut *Gelidium sp.* dan *Ulva lactuca*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 21(2), 266–275.
- Forestryana, D., & Arnida, A. (2020). Skrining fitokimia dan analisis kromatografi

- lapis tipis ekstrak etanol daun jeruju (*Hydrolea Spinosa L.*). *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*, 11(2), 113–124.
- Gazali, M., Nurjanah, Ukhty, N., Nurdin, M., & Zuriat. (2020). Skrining senyawa bioaktif daun perepat (*Sonneratia alba* J.E. Smith) sebagai antioksidan asal pesisir Kuala Bubon Aceh Barat. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 23(2), 402-411.
- Hakim, A. R., & Saputri, R. (2020). Narrative review: optimasi etanol sebagai pelarut senyawa flavonoid dan fenolik. *Jurnal Surya Medika (JSM)*, 6(1), 177–180.
- Hartanto, N. H. (2012). Isolasi dan identifikasi senyawa terpen dari ekstrak kulit batang *Aglaiia odorata* Lour (Meliaceae). *UNESA Journal of Chemistry*, 1(1), 93-99.
- Hasanela, N., Gaspersz, N., Silaban, R., & Sohilaht, M. R. (2020). Pengaruh lama penyimpanan ekstrak kasar makroalga *Ulva Lactuca* terhadap kestabilan pigmen fotosintesis. *Jurnal Inovasi Pendidikan dan Sains*, 1(3), 72-78. <https://doi.org/10.51673/jips.v1i3.441>
- Hikmawanti, N. P. E., Hariyanti, C. A., & Viransa, V. P. (2016). Kandungan piperin dalam ekstrak buah lada hitam dan buah lada putih (*Piper nigrum L.*) yang diekstraksi dengan variasi konsentrasi etanol menggunakan metode KLT-densitometri. *Media Farmasi*, 13(2), 173–185.
- Hutabarat, R. L. P., Wartini, N. M., & Antara, N. S. (2021). Karakteristik ekstrak pewarna alami daun singkong (*Manihot esculenta*) pada perlakuan jenis pelarut dan suhu maserasi. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, 9(1), 53–64.
- Hynstova, V., Sterbova, D., Klejduš, B., Hedbavny, J., Huska, D., & Adam, V. (2018). Separation, identification and quantification of carotenoids and chlorophylls in dietary supplements containing *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* using high performance thin layer chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 148, 108–118.
- Januarti, I. B., Wijayanti, R., Wahyuningsih, S., & Nisa, Z. (2019). Potensi ekstrak terpurifikasi daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) sebagai antioksidan dan antibakteri. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*, 2, 61, 60-68.
- Kondororik, F., Martosupono, M., & Susanto, A. B. (2016). Identifikasi komposisi pigmen, isolasi, dan aktivitas antioksidan β karoten pada rumput laut merah *Gracilaria gigas* hasil budidaya. *Jurnal Biologi dan Pembelajarannya*, 3(1), 1–10.
- Kusuma, I. M., Veryanti, P. R., & Chairunnisa, B. (2020). Aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol buah kawista (*Limonia acidissima*) dengan metode DPPH (1, 1- difenil-2-pikrilhidrazil). *Sainstech Farma: Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 13(2), 60–65.
- 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.
- Leite, A.C., Ferreira, A.M., Morais, E.S., Khan, I., Freire, M.G., Coutinho, J.A.P. (2018). Cloud point extraction of chlorophylls from spinach leaves using aqueous solutions of nonionic surfactants. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(1), 590–599.
- Lupitasari, D., Melina, M., & Kusumaningtyas, V. A. (2020). Effect of light and temperature based on the photosynthetic characteristics of *Ceratophyllum demersum* as a phytoremediation agent. *Jurnal Kartika Kimia*, 3(1), 33–38.
- Manurung, F. S., Nurchayati, Y., & Setiari, N. (2020). Pengaruh pupuk daun gandasil D terhadap pertumbuhan, kandungan klorofil dan karotenoid tanaman bayam merah (*Alternanthera amoena* Voss.). *Jurnal Biologi Tropika*, 1(1), 24–32.
- Martins, T., Barros, A. N., Rosa, E., & Antunes, L. (2023). Enhancing health benefits through chlorophylls and chlorophyll-rich agro-food: a comprehensive review. *Molecules*, 28(14), 5344.
- Melanie, S., & Fithriani, D. (2015a). Determination of oil extraction rate from *Spirulina* sp. and *Chlorella* sp. by using cell disruption technique. *Widyariset*,



- 1(1), 61–70.
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radicals diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar Journal of Science and Technology*. 26(2), 211-219.
- Mora, E., Muharini, S., Emrizal, E., Utami, R., & Andriani, M. S. (2016). Isolasi metabolit sekunder dari ekstrak etil asetat kulit batang meranti rambai (*Shorea acuminata Dyer*). *MPI (Media Pharmaceutica Indonesiana)*, 1(1), 19–26.
- Notonegoro, H., Djamaludin, H., Setyaningsih, I., & Tarman, K. (2022). Fraksinasi flavonoid *Spirulina platensis* dengan metode kromatografi lapis tipis dan aktivitas inhibisi enzim α -Glukosidase. *Jurnal Kelautan Tropis*, 25(3), 299–308.
- Novianti, T., Zainuri, M., & Widowati, I. (2019). Aktivitas antioksidan dan identifikasi golongan senyawa aktif ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* yang dikultivasi berdasarkan sumber cahaya yang berbeda. *Barakuda 45: Jurnal Ilmu Perikanan dan Kelautan*, 1(2), 72–87.
- Nurdin, N., Kusharto, C. M., Tanzilha, I., & Januwati, M. (2009). Kandungan klorofil berbagai jenis daun tanaman dan Caturunan klorofil serta karakteristik fisiko- kimianya. *Jurnal Gizi dan Pangan*, 4(1), 13–19.
- Podungge, M. R., Salimi, Y. K., & Duengo, S. (2017). Isolasi dan uji aktivitas antioksidan senyawa flavonoid dari daun miana (*Coleus Scutelleroides Benth.*). *Jambura Journal of Educational Chemistry*, 12(1), 67–74.
- Prasetya, I. W. G. A., Putra, G. P. G., & Wrasati, L. P. (2020). Pengaruh jenis pelarut dan waktu maserasi terhadap ekstrak kulit biji kakao (*Theobroma cacao L.*) sebagai sumber antioksidan. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. 8(1), 150-159.
- Prasetyo, M. Y., Hendri, M., Putri, W. A. E., & Aryawati, R. (2022). Isolasi dan purifikasi senyawa antioksidan pada daun mangrove *Avicennia Alba* dari kawasan muara Sungai Musi Kabupaten Banyuasin. *Maspri Journal: Marine Science Research*, 14(1), 63–78
- Pratita, A. T. K., Aisy, N. R., Wardani, G. A., & Fathurohman, M. (2022). Isolasi dan aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode ABTS (2, 2 Azinobis (3- Ethylbenzotiazolin) 6 Sulfonat) senyawa superoksida dismutase pada mikroalga *Chlorrella vulgaris*. *Prosiding Seminar Nasional Diseminasi Hasil Penelitian Program Studi S1 Farmasi*, 2(1), 177-184.
- Purwanto, D., Bahri, S., & Ridhay, A. (2017). Uji aktivitas antioksidan ekstrak buah purnajiwa (*Kopsia arborea* Blume.) dengan berbagai pelarut. *KOVALEN: Jurnal Riset Kimia*, 3(1), 24–32.
- Putnarubun, C., & Valentine, R. Y. (2020). Pigmen klorofil pada alga *Caulerpa* sp. di Kepulauan Kei. *Jambura Fish Processing Journal*, 2(2), 86–93.
- Putri, F. E., Diharmi, A., & Karnila, R. (2023). Identifikasi senyawa metabolit sekunder pada rumput laut coklat (*Sargassum plagyophyllum*) dengan metode fraksinasi. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia*, 15(1), 40–47.
- Rega, K., Christianto, I., & Setiawan, H. (2018). Implementasi *convolutional neural network* untuk sistem prediksi pigmen fotosintesis pada tanaman secara *real time*. *Jurnal Teknik Informatika dan Sistem Informasi*, 4(2), 330–340.
- Rosahdi T.D., Susanti, Y. & Suhendar, D. 2015. Uji aktivitas daya antioksidan biopigmen pada fraksi aseton dari mikroalga *Chlorella vulgaris*. *Biomol*. 9(1), 1-16.
- Sabrina, A. P., Tania, E., Nurhalifah, N., Veronita, S. C., Puji, S. I., & Nuryamah, S. (2022). Aktivitas imunodulator dari jawer kotok (*Coleus scutellarioides* (L) Benth). *Jurnal Buana Farma*, 2(2), 40–55.
- Salimah, F. N., Santosa, G. W., & Ridlo, A. (2022). Pertumbuhan dan kadar pigmen *Dunaliella salina* (Chlorophyta) pada media dengan penambahan konsentrasi tembaga (Cu) yang berbeda. *Buletin Oseanografi Marina*. 11(1), 51–58.
- Sanger, G., Kaseger, B. E., Rarung, L. K., & Damongilala, L. (2018). Potensi

- beberapa jenis rumput laut sebagai bahan pangan fungsional, sumber pigmen dan antioksidan alami. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 21(2), 208-217.
- Septiani, R., Marianne, M., & Nainggolan, M. (2018). Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol fraksi N-Heksan serta fraksi etil asetat daun jamblang (*Syzygium cumini* L. Skeels) dengan metode DPPH. *Talenta Conference Series: Tropical Medicine (TM)*, 1(2), 361-366.
- Suhadirman, A., Purnamasari, S., & Kurnia, D. (2020). The activity of marine microalgae extract *Chlorella vulgaris* against propionibacterium acnes and formulated as emulgel. *Jurnal Kartika Kimia*, 3(1), 25-32.
- Suhara, N. A., Mauludiyah, E. N., Albab, L. U., dan Maulana, I. T. (2020). Isolasi fraksi senyawa aktif antibakteri *Staphylococcus epidermidis* dari *Chlorella vulgaris* sebagai bahan aktif antiseptik. *Jurnal Ilmiah Farmasi Farmasyifa*, 3(1), 18-25.
- Sulaiman, A., Silalahi, I. H., Shofiyani, A., Widiyantoro, A., & Harlia, H. (2022). Energi celah-pita material TiO₂/kompleks logam-klorofil (M= Zn²⁺, Co²⁺) dari daun singkong (*Manihot esculenta crant*). *Indonesian Journal of Pure and Applied Chemistry*, 5(1), 1-19.
- Sumiati, S. (2021). Penggunaan pelarut etanol dan aseton pada prosedur kerja ekstraksi total klorofil daun jati (*Tectona grandis*) dengan metode spektrofotometri. *Indonesian Journal of Laboratory*, 4(1), 30-35.
- Suwardi, S., Partana, C. F., Salim, A., & Anitasari, D. (2021). Sintesis dibenzil tereftalat melalui depolimerisasi plastik poli (etilena tereftalate) sebagai alternatif daur ulang plastik bekas. *Makara Journal of Technology*, 9(1), 20-25.
- Syalma, S. F. (2021). Chlorophyll content mahogany leaves (*Swietenia macrophylla* King.) as greening plants in padang city. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*, 1(2), 1460-1463.
- Syawal, Y., Maarisit, W., Jan, T. T., & Pinontoan, R. (2019). Skrining aktivitas antioksidan dari mikroalga. *Biofarmasetikal Tropis (The Tropical Journal of Biopharmaceutical)*, 2(2), 23-33
- Syarifuddin, A., & Sulistyani, N. (2019). Profil KLT-Bioautografi dan densitometri senyawa teraktif (Isolat KP13) dari rizosfer kayu putih. *Jurnal Farmasi Sains dan Praktis*, 5(1), 27-33.
- Theafelicia, Z., & Wulan, S. N. (2023). Perbandingan berbagai metode pengujian aktivitas antioksidan (DPPH, ABTS dan FRAP) pada teh hitam (*Camellia sinensis*). *Jurnal Teknologi Pertanian*, 24(1), 35-44.
- Ugrasena, P. Y., Puspitasari, D. R. A., & Rupayantini, D. A. (2022). Perbandingan uji sitotoksik fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan ekstrak purifikasi herba sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees) dengan metode *brine shrimp lethality test* (BSLT). *Journal Pharmactive*, 1(1), 1-6. 67
- Utomo, S. (2016). Pengaruh konsentrasi pelarut (n-heksana) terhadap rendemen hasil ekstraksi minyak biji alpukat untuk pembuatan krim pelembab kulit. *Jurnal Konversi*, 5(1), 39-47.
- Vinata, Y., & Wulandari, Y. (2020). Pembuatan biodiesel dari mikroalga *nannochloropsis* sp. menggunakan metode transesterifikasi insitu dengan bantuan katalis asam sulfat. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi Terapan*, 1(1), 507-514.
- Wahyuni, I. T., & Setiarso, P. (2022). Karakterisasi elektrokimia ekstrak klorofil dari daun salam (*Syzygium polyanthum*) pada pH basa sebagai sensitizer pada *dye sensitized solar cell* (DSSC). *ALCHEMY: Journal of Chemistry*, 10(2), 41-47.
- Wendersteyt, N. V., Wewengkang, D. S., & Abdullah, S. S. (2021). Uji aktivitas antimikroba dari ekstrak dan fraksi ascidian *Herdmania momus* dari Perairan Pulau Bangka Likupang terhadap pertumbuhan mikroba *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* dan *Candida albicans*. *PHARMACON*, 10(1), 706-712.
- Werdyani, S., Hartati, DS. & Jumaryatno, P. (2019). Penentuan fraksi aktif



- antioksidan ekstrak etanol daun benalu (*Scurrula atropurpurea* (Bl.) Denser) yang tumbuh pada pohon rambutan. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 15(2), 70-79.
- Widiawati, & Asih, E. N. A. (2024). Potensi skrining fitokimia dan aktivitas antioksidan ekstrak daun *Avicennia marina* dan *Avicennia alba* dari Selat Madura. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 27(5), 393-406. <http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.v27i5.52421>
- Zhang,R., Chen J., Mao, X., Qi, P., & Zhang, X. (2019). Anti-inflammatory and Anti-aging evaluation of pigment–protein complex extracted from *Chlorella Pyrenoidosa*. *Marine Drugs*. 7(10), 586. <https://doi.org/10.3390/md17100586>