

J081

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN UJI TOKSISITAS HAYATI PIGMENT FIKOBILIPROTEIN DARI EKSTRAK *Spirulina platensis*

Ni Wayan Sri Agustini

Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI
Jl. Raya Bogor Km. 46 Cibinong, Bogor
Email: wayan_2002@yahoo.com

ABSTRAK

Pigmen fikobiliprotein diketahui dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh, sebagai pewarna alami untuk makanan, kosmetik dan obat-obatan. Salah satu mikroalga penghasil pigmen fikobiliprotein adalah *Spirulina platensis*. Berdasarkan literatur, diketahui bahwa fikobiliprotein dapat meredam radikal bebas dari 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydroxychloride (AAPH) dan mencegah inisiasi reaksi radikal berantai. Pigmen fikobiliprotein diekstraksi dari biomassa *Spirulina platensis* dengan menggunakan larutan kalsium klorida 1%. Ekstrak yang diperoleh diuji aktivitas antioksidan secara peredaman radikal DPPH dan uji aktivitas biologi secara BSLT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada efek peredaman radikal bebas dari pigmen fikobiliprotein dan ada aktivitas biologi dengan menghitung tingkat kematian larva *Artemia salina* Leach. Hasil tersebut dapat dilihat dari nilai IC₅₀ sebesar 96,57µg/ml dan nilai LC₅₀ sebesar 174,66µg/ml.

Kata Kunci: Antioksidan, toksisitas hayati, fikobiliprotein, antioksidan, *Spirulina platensis*.

PENDAHULUAN

Berbagai penyakit degeneratif berkembang pesat seiring dengan perkembangan zaman dan umumnya disebabkan oleh radikal bebas. Radikal bebas adalah molekul yang kehilangan elektron, sehingga molekul tersebut menjadi tidak stabil dan selalu berusaha mengambil elektron dari molekul atau sel lain. Radikal bebas yang beredar dalam tubuh berusaha untuk mencuri elektron atom lain dari DNA dan sel, yang pada gilirannya mengubah atom yang lain menjadi radikal bebas sekunder, sehingga membuat reaksi berantai yang dapat menyebabkan perubahan struktur pada sel dan DNA sehingga dapat menimbulkan sel-sel mutan. Radikal bebas dapat dihasilkan dari hasil metabolisme tubuh dan faktor eksternal seperti asap rokok, sinar ultraviolet, zat kimiawi dalam makanan dan polutan lain. Penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas bersifat kronis, yaitu penyakit yang membutuhkan waktu bertahun-tahun untuk penyakit tersebut menjadi nyata. Penyakit yang sering dihubungkan dengan radikal bebas adalah penyakit jantung, kanker, katarak dan menurunnya fungsi ginjal (http://id.wikipedia.org/wiki/Radikal_bebas)

Tubuh manusia sesungguhnya dapat menetralkan radikal bebas karena tubuh menghasilkan antioksidan alami tetapi jumlahnya seringkali tidak cukup untuk menetralkan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh terutama bila jumlah radikal bebas tersebut berlebih. Tubuh manusia juga didesain untuk mengelola asupan yang bersifat alamiah, sehingga bila menerima masukan seperti asap rokok, akan berusaha untuk mengeluarkan berbagai racun kimiawi ini dari tubuh melalui proses metabolisme, tetapi proses metabolisme ini pun sebenarnya menghasilkan radikal bebas. Untuk mencegah efek radikal bebas yang berlebih di dalam tubuh maka diperlukan asupan suplemen yang mempunyai efek sebagai antioksidan. (http://id.wikipedia.org/wiki/Radikal_bebas)

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menangkal radikal bebas dan merupakan senyawa pemberi elektron atau reduktan. Senyawa ini mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara membentuk radikal. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif, sehingga dapat menghambat kerusakan sel. (Winarsi H., 2007)

Sumber antioksidan dapat berasal dari tanaman, bakteri dan mikroalga. Pada penelitian ini dilakukan penelitian sumber antioksidan dari mikroalga. Mikroalga merupakan mikroorganisme dengan tingkat organisasi selnya termasuk dalam tumbuhan tingkat rendah, yang dikelompokkan ke dalam filum Thallophyta, karena tidak memiliki akar, batang dan daun sejati.

Spirulina platensis merupakan salah satu spesies mikroalga yang berpotensi untuk dikembangkan, karena mengandung komposisi senyawa kimia dengan nilai gizi dan ekonomi tinggi, seperti mengandung protein, asam lemak esensial, vitamin B (B₁, B₃, B₆, B₁₂), A, D, dan E, mineral, dan pigmen fikobiliprotein. Kandungan senyawa kimia ini membuat *Spirulina platensis* berkhasiat sebagai antivirus, antioksidan, dapat menurunkan kolesterol dan tekanan darah, memperbaiki sel-sel yang rusak, dan meningkatkan sistem imun tubuh. (http://wikipwdia.org/wiki/Spirulina_%28dietary_supplement%29)



Pigmen fikobiliprotein pada *Spirulina platensis* terdiri dari pigmen fikosianin, dan allofikosianin. *Spirulina platensis* lebih dominan akan pigmen fikosianin sehingga digolongkan sebagai mikroalga biru-hijau (Cyanophyta). Pigmen fikobiliprotein yang mempunyai struktur mirip dengan bilirubin diketahui mempunyai efek meredam beberapa spesies oksigen reaktif secara *in vivo*. Oleh karena itu, pigmen fikobiliprotein dapat memiliki aktivitas antioksidan dan adanya suatu kemungkinan bahwa aktivitas ini dapat melindungi sel hidup dari stres oksidatif. Berdasarkan literatur, diketahui bahwa pigmen fikobiliprotein pada *Spirulina platensis* memiliki aktivitas antioksidan secara peredaman radikal bebas oleh 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydroxychloride (AAPH). (Hirata T., *et.al.*, 2000)

Potensi antioksidan penangkap radikal bebas dapat ditentukan dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH yaitu suatu radikal yang stabil dalam larutan metanol dan mampu menerima sebuah elektron atau radikal hidrogen. Metode peredaman radikal bebas DDPH merupakan metode pengukuran antioksidan yang sederhana, cepat, peka, memerlukan sedikit sampel dan tidak membutuhkan banyak pelarut seperti halnya uji lain (xantin-xantin oksidase, metode tiosianat, antioksidan total). Hasil pengukuran menunjukkan kemampuan antioksidan sampel secara umum dalam menghambat radikal bebas (Juniarti, dkk., 2009)

Uji toksisitas dilakukan dengan mengamati kematian hewan percobaan dan respon kematian ini dianggap sebagai pengaruh senyawa yang diuji. Uji toksisitas dimaksudkan untuk memaparkan adanya efek toksik dan untuk meneliti batas keamanan dalam kaitannya dengan penggunaan senyawa yang ada dalam tumbuhan tersebut. Uji toksisitas dilakukan dengan metode BSLT menggunakan *Artemia salina* karena mempunyai keunggulan seperti perkembangbiakan cepat, harga murah, metode percobaan mudah, sampel yang diperlukan sedikit, tidak memerlukan laboratorium yang khusus dan hasilnya dapat dipercaya. Sifat toksisitas diketahui berdasarkan jumlah kematian larva udang. Menurut Meyer *et al.* (1982), suatu ekstrak dikatakan toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach apabila mempunyai nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$, dan dikatakan tidak toksik bila nilai $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$.

Berdasarkan hal tersebut diatas maka dilakukan penelitian pigmen fikobiliprotein pada *Spirulina platensis* yang dominan akan pigmen fikosianin sebagai antioksidan. Pengujian dilakukan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH dan diuji toksisitasnya secara BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) untuk mengetahui aktivitas biologinya.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

1. Mikroalga *Spirulina platensis* merupakan strain lokal yang disimpan di Lab. Mikroalga Air Tawar, Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI.
2. Larva udang *Artemia salina* Leach
3. magnesium sulfat hepta hidrat, kalsium klorida dihidrat, urea, kalium sulfat, kalium hidroksida, natrium bikarbonat, trisodium fosfat, asam borat, tembaga (II) sulfat pentahidrat, natrium hidroksida, kalsium diklorida, besi (II) sulfat, etilen diamin tetra asetat (EDTA), aquadest, kalsium klorida 1%, larutan mikroelemen (A₅), DPPH, metanol p.a, vitamin C, larva udang *Artemia salina* Leach., air laut alami, DMSO, toluen, dan etil asetat.
4. pH meter portabel (Jenway), spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu), pendisrupsi ultrasonik (Branson 8200), neraca analitik (Precise 40 sm-200 A), oven (Heraus), sentrifuse (Heraus sepatech biotuge 22 R), pengaduk mekanik (Thermolyne), vortex mixer, alat *freeze drying*, *water bath*, pipet tetes, mikropipet, pipet volume, inkubator, wadah penetas, kaca pembesar, dan lampu TL 18 watt, lempeng silika GF₂₅₄, dan alat- alat gelas.

Cara Kerja

Pembuatan stok kultur *Spirulina platensis*.

Spirulina platensis ditanam pada media Zarouk's dengan komposisi (g/L) : magnesium sulfat hidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,2; kalsium klorida hidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,12; etilendiamin tetra asetat (EDTA) 0,64; kalium hidroksida (KOH) 0,5; urea 0,31; kalium sulfat (K_2SO_4) 0,5; natrium karbonat (NaHCO_3) 16,8; besi (II) sulfat hidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,01; trisodium fosfat 0,18; dan larutan A5 1mL/L pada botol 1 liter dengan intensitas



cahaya 2500 Lux. Aerasi dilakukan terus-menerus dengan pH awal pertumbuhan 8,6. Peningkatan jumlah populasi sel mikroalga ini diamati setiap hari untuk mengamati fase pertumbuhannya.

Kultivasi dan Pembuatan Kurva Pertumbuhan Kepadatan Sel *Spirulina platensis*

Kultivasi menggunakan sumber cahaya dari lampu TI (*tube light*) dengan intensitas cahaya 2500 lux pada suhu 35°C dan aerasi dilakukan secara kontinyu dengan aliran udara yang diperkaya karbondioksida 1%. Kurva pertumbuhan sel diukur dengan menggunakan metode Turbidimetri (berdasarkan kekeruhan) dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 680 nm. Serapan yang diperoleh dibuat kurva dengan cara memplotkan antara waktu kultur dengan kepadatan jumlah populasi sel mikroalga. Sampel diambil setiap hari sebanyak 10 mL.

Ekstraksi pigmen fikobiliprotein (Bousiba S. dan Richmond A.E., 1979)

Sebanyak 1g biomassa mikroalga ditambahkan 25 mL kalsium klorida 1% lalu disonikasi dengan kecepatan 4 hertz selama 4 menit. Sampel dibekukan dalam *freezer* selama 24 jam, kemudian biarkan di ruang gelap hingga mencair sempurna, sentrifus kembali dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit sehingga diperoleh supernatan dan endapan. Supernatan yang didapatkan dipisahkan dari endapan. Supernatan tersebut merupakan ekstrak pigmen fikosianin.

Identifikasi pigmen fikosianin dengan mengukur spektrum dan perhitungan kadar pigmen fikosianin

Identifikasi pigmen fikosianin dapat dilakukan mengukur spektrum pigmen fikobiliprotein menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-700 nm. Perhitungan kadar pigmen fikosianin dilakukan dengan mengukur serapan supernatannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 565 nm, 620 nm, 650 nm. Penetapan kadar fikosianin dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Becker, E.W., 1994):

$$\text{Kadar pigmen fikosianin (mg/g)} = \frac{A_{620 \text{ nm}} - 0,7 \times A_{650 \text{ nm}}}{7,38}$$

Persamaan ini ditetapkan menggunakan persamaan simultan oleh Bennet dan Bogorad (1973) dan konstanta persamaan oleh Bryant *et al.* (1979)

Pengujian pigmen fikobiliprotein

a. Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) (Djamil, R., dkk., 2007)

b. Pembuatan larutan DPPH (0,4 mM)

Zat DPPH(BM 394,32) ditimbang lebih kurang 4 mg, lalu dilarutkan dengan metanol p.a hingga 25 mL.

c. Pembuatan larutan blanko

Larutan DPPH dipipet 1 mL (0,4 mM) ke dalam tabung reaksi yang telah ditara 5 mL, lalu ditambahkan metanol hingga tanda, dan dihomogenkan.

d. Pembuatan larutan uji

Ekstrak kering fikobiliprotein ditimbang lebih kurang 10 mg, lalu dilarutkan dalam 10,0 metanol p.a (1000 µg/mL) larutan ini merupakan larutan induk. Sebanyak 25, 50, 125, 250, dan 500 µL larutan induk dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah ditara 5,0 ml untuk mendapatkan konsentrasi sampel 5, 10, 25, 50, dan 100 µg/mL. Masing-masing tabung ditambahkan 1,0 mL larutan DPPH dan ditambahkan dengan metanol p.a sampai tanda 5 mL. Campuran dihomogenkan dan mulut tabung ditutup dengan aluminium foil

e. Pembuatan larutan vitamin C sebagai kontrol positif

Vitamin C ditimbang lebih kurang 10 mg, lalu dilarutkan dalam 10,0mL metanol p.a (1000 bpj), larutan ini merupakan larutan induk. Dipipet 10, 20, 30, 40, dan 50 µL larutan induk ke dalam tabung reaksi yang telah ditara 5,0 mL untuk mendapatkan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 µg/mL. Masing-masing tabung ditambahkan 1,0 mL larutan DPPH (0,4mM) dan ditambahkan dengan metanol p.a sampai tanda 10,0 mL. Larutan dihomogenkan dan mulut tabung ditutup dengan aluminium foil.



f. Pengukuran serapan

Larutan uji dan kontrol positif dengan beberapa konsentrasi diinkubasi dalam tangas air 37°C selama 30 menit, serapan diukur pada panjang gelombang maksimum pada 516 nm menggunakan spektrofotometer ultraviolet-cahaya tampak.

g. Cara perhitungan

Persentase inhibisi dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Hambatan (inhibisi)} = \frac{(\text{serapan blangko} - \text{serapan sampel})}{\text{serapan blangko}} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ (*Inhibition Concentration* 50) adalah konsentrasi antioksidan (µg/mL) yang mampu meredam radikal bebas sebanyak 50% dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis linear. Nilai IC₅₀ diperoleh dari perpotongan garis antara daya hambatan dan sumbu konsentrasi, kemudian dimasukkan ke dalam persamaan $y = a + bx$, dengan $y = 50$ dan nilai x menunjukkan IC₅₀. Ekstrak dinyatakan aktif sebagai antioksidan bila nilai IC₅₀ kurang dari 200 µg/mL (Molyneux, 2004)

Uji toksisitas secara BSLT dengan menggunakan larva *Artemia salina* Leach dilakukan terhadap ekstrak kering pigmen fikobiliprotein.

a. Penetasan telur *Artemia salina* Leach.

Sejumlah lebih kurang 20 mg telur *Artemia salina* Leach dimasukan ke dalam wadah penetas yang disekat sehingga memiliki dua sisi ruang, yaitu sisi terbuka dan tertutup dan telah berisi air laut sintetik yang dibuat dengan cara menimbang 38g garam tanpa iodium dan dilarutkan dalam 1 L air atau dengan air laut langsung, kemudian disaring dengan kertas Whatman dan diberi penyinaran dengan lampu TL 18 Watt. Setelah 24 jam telur yang sudah menetas menjadi *Nauplii* dipindahkan ke tempat lain, 24 jam setelah itu *Nauplii* tersebut sudah dapat digunakan sebagai hewan uji.

b. Persiapan larutan uji

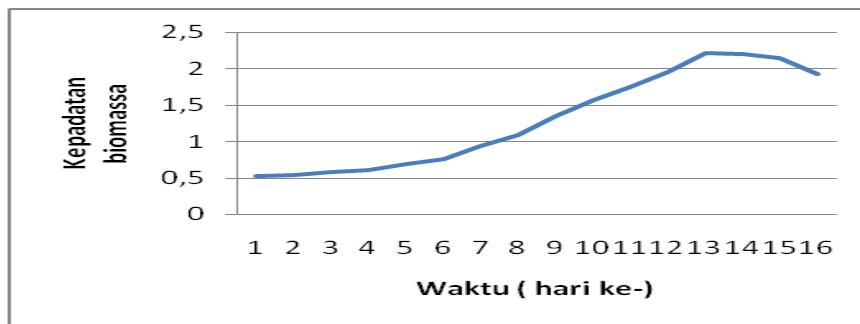
Larutan uji dibuat dengan konsentrasi 1000, 100, dan 10 bpj, masing-masing dengan tiga kali pengulangan. Sebanyak 1 vial digunakan untuk kontrol. Larutan induk dibuat dengan menimbang 50 mg ekstrak yang dilarutkan dalam 5 mL pelarut yang sesuai. Jika sampel sukar larut, ditambahkan dimetil sulfoksida (DMSO) 1% sebanyak 0,1-50,0 µL. Larutan induk tersebut dipipet berturut-turut 500, 50, dan 5 µL dan masing-masing dimasukkan ke dalam vial kemudian diuapkan sampai kering. Masing-masing konsentrasi dibuat dengan tiga kali pengulangan, kemudian ke dalam masing-masing vial dimasukkan 3 mL air laut dan 10 ekor *Nauplii* dan ditambahkan air laut sampai 5 mL. Larutan diaduk sampai homogen kemudian dihitung tingkat kematian atau mortalitas secara regresi linier, yaitu dengan membandingkan antara jumlah larva yang mati dan jumlah total larva. Nilai LC₅₀ diperoleh dengan cara menarik garis pada nilai 50% dari sumbu mortalitas sampai memotong sumbu grafik. Perpotongan garis ditarik ke garis konsentrasi di mana konsentrasi zat yang menyebabkan kematian 50% larva yang disebut LC₅₀. Untuk menghitung LC₅₀ digunakan kurva yang menyatakan log konsentrasi sebagai sumbu x dan % mortalitas sebagai sumbu y. Hasil LC₅₀ diperoleh dari perpotongan garis terhadap kedua sumbu tersebut. Suatu senyawa dinyatakan tidak toksik bila nilai LC50 > 1000 BPJ toksik bila nilai LC50 < 1000 BPJ, dan sangat toksik bila nilai 30 < LC50 < 1000 BPJ. (Meyer B.N. et.al., 1982)

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Kultivasi dan kurva pola pertumbuhan *Spirulina platensis*

Kemampuan *Spirulina platensis* dalam menggunakan bahan organik menunjukkan bahwa mikroalga ini mampu tumbuh dalam mediumnya yaitu medium Zarouk's. Penetapan pH 8,3 merupakan pendukung bagi suspensi kultur untuk menghindari terjadinya lisis dari sel. Berdasarkan pengamatan, waktu pertumbuhan optimum mikroalga *Spirulina platensis* adalah 16 hari. Kepadatan biomassa *Spirulina platensis* dapat diukur secara metode Turbidimetri dengan melihat nilai OD (*Optical Density*) mikroalga tersebut menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 680 nm dapat dilihat pada Gambar 1.





Gambar V.14 Kurva pertumbuhan *Spirulina platensis*

Pada grafik pertumbuhan *Spirulina platensis*, dapat dilihat terjadinya pertumbuhan populasi *Spirulina platensis* yang mengikuti pola pertumbuhan normal melalui beberapa fase: fase lag, fase logaritmik, fase linier (stasioner awal), fase stasioner dan fase kematian.

Pada fase awal (hari ke 1-4) terjadi fase lag/adaptasi, ditandai dengan adanya pertumbuhan populasi yang lambat karena alokasi energi dipusatkan untuk penyesuaian diri terhadap media kultur yang baru dan untuk pemeliharaan sehingga hanya sebagian kecil atau tidak ada energi yang digunakan untuk pertumbuhan. Sel yang mempunyai toleransi yang tinggi dapat hidup dan tumbuh.

Fase logaritmik berlangsung pada hari ke 5-12 dan mulai memasuki fase stasioner awal pada hari ke-13. *Spirulina platensis* dipanen pada fase stasioner awal, karena pada fase ini merupakan fase pertumbuhan optimum pigmen fikobiliprotein pada mikroalga *Spirulina platensis*.

Pada saat sel mencapai puncak, tidak terjadi penambahan jumlah sel lagi karena laju pertumbuhan seimbang dengan laju kematian, fase ini disebut fase stasioner. Seiring berjalannya waktu, populasi akan mengalami penurunan kepadatan populasi yang dimulai terjadi pada hari ke-16. Penurunan populasi setelah mencapai puncak populasi maksimum diduga disebabkan oleh terbatasnya nutrisi/unsur hara dan suplai cahaya, pengendapan-pengendapan partikel-partikel nutrisi, umur sel yang tua, menurunnya laju penyerapan CO₂, sehingga menyebabkan proses fotosintesis tidak berjalan sempurna. Faktor-faktor tersebut menyebabkan sel mikroalga mati.

Ekstraksi Pigmen Fikobiliprotein *Spirulina platensis*

Biomassa *Spirulina platensis* diekstraksi dengan larutan kalsium klorida 1%, sebagai media untuk melarutkan pigmen, karena sifat pigmen fikobiliprotein sama seperti protein globular lainnya, yaitu dapat larut dalam air atau larutan garam. Larutan kalsium klorida 1% juga berfungsi untuk merusak dinding sel mikroalga, sehingga pigmen fikobiliprotein dapat keluar dan larut dalam larutan tersebut. Ekstrak dibekukan dalam *freezer* selama 24 jam dan dikeluarkan di suhu ruangan sampai mencair. Proses ini berguna agar pigmen fikobiliprotein dapat keluar dengan sempurna dan larut dalam larutan kalsium klorida 1%.

Supernatan yang diperoleh kemudian dikeringkan secara *freeze drying* untuk mendapatkan ekstrak pigmen fikobiliprotein. Penggunaan teknik pengeringan secara *freeze drying* dimaksudkan untuk mempertahankan stabilitas pigmen fikobiliprotein, karena sifat pigmen fikobiliprotein mudah teroksidasi bila terpapar intensitas cahaya yang tinggi dan panas secara langsung serta dapat mempertahankan warna dan bentuk pigmen fikobiliprotein setelah pengeringan. Supernatan yang dikeringkan untuk menghasilkan ekstrak kering pigmen fikobiliprotein mengalami penyusutan bobot yang dapat dilihat pada Tabel 1.

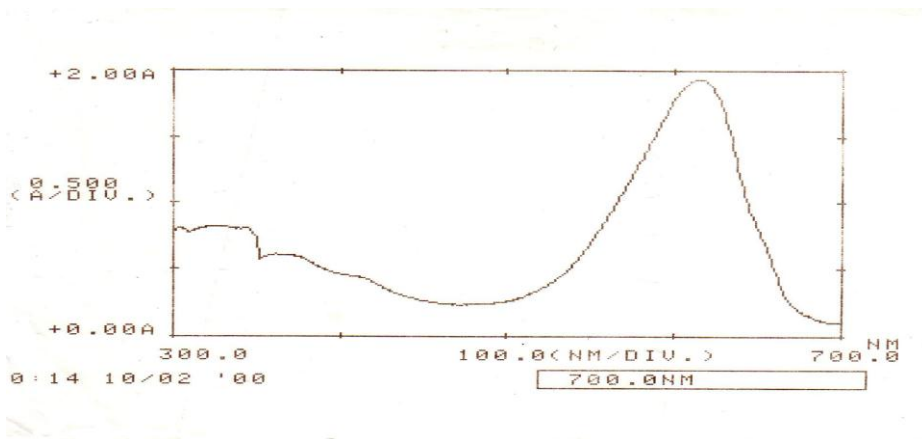
Tabel 1. Hasil ekstraksi pigmen fikobiliprotein

Ekstrak	Bobot biomassa (g)	Bobot ekstrak (g)	Warna ekstrak	Rendemen (%)
Pigmen fikobiliprotein	5,584	2,06	Biru	36,8911

Rendemen diperoleh dengan membandingkan total ekstrak yang didapat dengan bobot biomassa

Identifikasi dengan mengukur spektrum dan penetapan kadar pigmen fikosianin

Identifikasi pigmen fikobiliprotein dilakukan dengan mengukur spektrum pigmen fikobiliprotein pada panjang gelombang 300 – 700 nm.



*** PEAK-PICK ***

-- PEAK --		-- VALLEY --	
λ	ABS	λ	ABS
615.0	1.937	470.0	0.233
361.0	0.612	352.0	0.573
325.0	0.825		

Gambar 2. Spektrum dan panjang gelombang serapan maksimum pigmen fikobiliprotein dari *Spirulina platensis*

Tabel 2 Panjang gelombang maksimum pigmen fikobiliprotein

Pigmen fikobiliprotein	λ maks menurut literatur	λ maks yang didapat
Fikosianin	610 – 620 nm	615 nm

Berdasarkan data diatas, nilai λ maks yang didapat yaitu sebesar 615 nm sesuai dengan λ maks menurut pustaka yaitu 610-620 nm sehingga dapat dinyatakan sebagai bukti pendukung bahwa pigmen tersebut merupakan pigmen fikobiliprotein yang mengandung pigmen fikosianin (Awakairt S., 2007)

Berdasarkan serapan pada panjang gelombang maksimum yang didapatkan dengan mengukur serapan larutan pada panjang gelombang 650 nm, maka dapat dihitung kadar pigmen fikosianin. Pengukuran serapan pada panjang gelombang 616 nm dan 650 nm dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Tabel absorban pigmen fikobiliprotein *Spirulina paltensis*

Panjang gelombang (nm)	Absorban
616	2,474
650	0,723

Berdasarkan hasil perhitungan, diperoleh kadar pigmen fikosianin sebesar 6,6663 mg/g bobot biomassa basah *Spirulina platensis*.

Uji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal bebas DPPH

DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) merupakan suatu radikal bebas yang stabil yang bila bereaksi dengan suatu zat yang dapat menyumbangkan hidrogen (antioksidan) akan tereduksi menjadi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin. Berdasarkan reaksi antara DPPH dan zat antioksidan yang berasal dari pigmen fikobiliprotein, dapat diperoleh nilai IC₅₀ yaitu konsentrasi tertentu yang dapat memberikan 50% efek penghambatan radikal bebas.

Daya hambat terhadap radikal bebas DPPH diukur secara spektrofotometri cahaya tampak berdasarkan perubahan warna yang terjadi. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) bila dilarutkan dengan metanol akan berwarna ungu, dan setelah bereaksi dengan pigmen fikobiliprotein yang berperan sebagai antioksidan, akan berubah menjadi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin yang berwarna kuning. Hasil uji aktivitas antioksidan fase air dapat dilihat pada Tabel 4.



Tabel 4. Hasil uji aktivitas antioksidan pada perhitungan IC₅₀ terhadap pigmen fikobiliprotein dan vitamin C

Sampel	C (µg/mL) (x)	Ab	As	%Hambatan (y)	IC ₅₀ (µg/mL)
Pigmen Fikobiliprotein	5		0,721	15,0766	96,57
	10		0,670	21,0836	
	25	0,849	0,642	24,3816	
	50		0,549	35,3357	
	100		0,422	50,2945	
Vitamin C	2		0,834	14,6366	5,43
	4		0,641	34,3910	
	6	0,977	0,419	57,1136	
	8		0,215	77,9939	
	10		0,049	94,9846	

Keterangan :

C = konsentrasi larutan uji

Ab = serapan blangko (kontrol negatif)

As = serapan larutan uji

Vitamin C sebagai kontrol positif memiliki IC₅₀ sebesar 5,43 µg/mL dan pigmen fikobiliprotein memiliki IC₅₀ sebesar 96,57 µg/mL. Pigmen fikobiliprotein dapat dinyatakan aktif sebagai antioksidan karena mempunyai nilai IC₅₀ < 200µg/mL. Hal ini sesuai dengan penelitian Hirata T. *et.al.*, 2000, yang menyatakan bahwa pigmen fikobiliprotein dari mikroalga *Spirulina platensis* mempunyai aktivitas antioksidan yang dapat meredam radikal AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydroxychloride).

Menurut Romay C *et al.* (2003), struktur dari fikobiliprotein mengandung rantai tetrapireol terbuka yang mungkin mempunyai kemampuan menangkap radikal oksigen.

Berdasarkan fungsi antioksidan di dalam tubuh, maka pigmen fikobiliprotein merupakan antioksidan sekunder yang dapat menangkap radikal bebas serta mencegah terjadinya reaksi radikal berantai.

Uji aktivitas biologi secara BSLT

Uji aktivitas biologi ekstrak pigmen fikobiliprotein dari *Spirulina platensis* dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Salah satu organisme yang sangat sesuai dengan hewan uji tersebut adalah *Brine Shrimp* (udang laut). *Brine shrimp* test sudah digunakan untuk berbagai sistem bioassay yaitu untuk menganalisa residu pestisida, mikotoksin, polutan pada air sungai, anestetik, toksik dinoflagellata senyawa yang berupa morfin, toksisitas pada dispersant minyak dan kokarsinogenik ester phorbol. Dalam fraksinasi yang diarahkan dengan bioassay, metode *brine shrimp* telah digunakan untuk memonitor fraksi aktif mikotoksin dan antibiotik pada ekstrak jamur (Abdi, 2001 dalam Lenny, 2006)

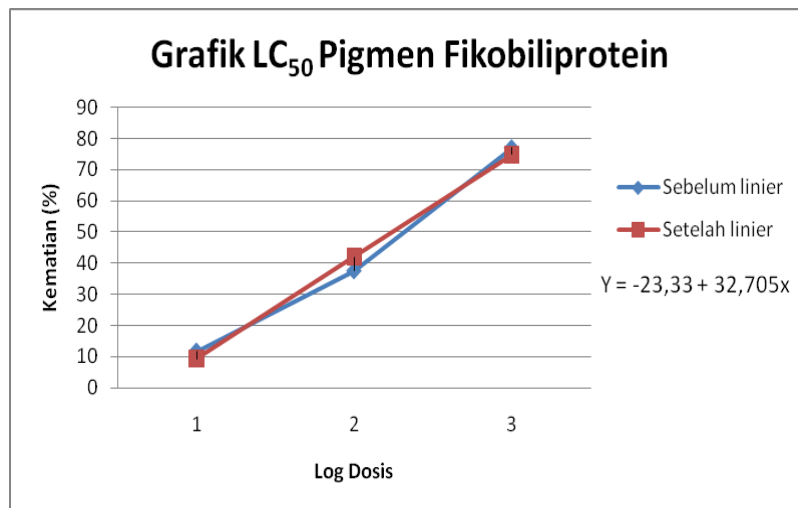
Aktivitas biologis suatu senyawa dalam menunjukkan adanya kandungan zat aktif yang bersifat sitotoksik dapat dari nilai LC₅₀ yang diperoleh. Nilai LC₅₀ didapatkan dengan cara menghitung tingkat kematian atau mortalitas hewan uji dari tiap-tiap log konsentrasi (1000, 100, 10 µg/mL) yaitu dengan membandingkan antara jumlah larva yang mati dengan total larva yang digunakan pada tiap-tiap konsentrasi. Hasil uji toksisitas dengan metode ini telah terbukti memiliki korelasi dengan daya sitotoksik senyawa antikanker. Selain itu, metode ini juga mudah dikerjakan, murah, cepat dan cukup akurat (Meyer, 1982). *Artemia salina* Leach merupakan komponen dari invertebrata dari fauna pada ekosistem perairan laut. *Artemia salina* ini mempunyai peranan yang penting dalam aliran energi dan rantai makanan. Spesies invertebrata ini umumnya digunakan sebagai organisme sentinel sejati berdasarkan pada penyebaran, fasilitas sampling, dan luasnya karakteristik ekologi dan sensitifitasnya terhadap bahan kimia.

Hasil pengamatan kematian *Artemia* setelah 24 jam pada ekstrak fikobiliprotein yang larut dalam metanol terlihat dalam Tabel 5.

Tabel 5. Hasil uji aktivitas biologi ekstrak pigmen fikobiliprotein dengan metode BSLT

Dosis (D) (µg/mL)	Log D (x)	Mati	Hidup	AM	AH	M/T	% ematian (y)	LC ₅₀ (µg/mL)
1000	3	19	11	37	11	0,7708	77,08	174,66
100	2	11	19	18	30	0,3750	37,50	
10	1	7	23	7	53	0,1167	11,67	





Gambar 3. Grafik LC_{50} pigmen fikobiliprotein dari *Spirulina platensis*

Tabel 5 dibuat grafik pada gambar 3 yang menunjukkan hubungan antara persentase kematian larva *A. salina* dengan log konsentrasi ekstrak yang larut dalam metanol. Tabel 5 menunjukkan persentase kematian larva *A. salina* sebesar 11,67-77,08 %. Pada konsentrasi 10 ppm persentase kematiannya sebesar 11,67 %, 100 ppm persentase kematiannya sebesar 37,50 %, dan 1000 ppm persentase sebesar 77,08 % 100 ppm. Persamaan regresi linear didapat nilai $Y = -23,33 + 32,705x$, sehingga mortalitas hewan uji mencapai 50% saat konsentrasi ekstrak senyawa mencapai 174,66 ppm. Berdasarkan Meyer *et al* (1982), suatu sampel dinyatakan memperlihatkan aktivitas biologi terhadap larva udang bila memiliki nilai $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/ml}$. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak pigmen fikobiliprotein dengan dengan nilai LC_{50} 174,66 $\mu\text{g/ml}$ memperlihatkan adanya aktivitas biologi.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan terhadap *Spirulina platensis*, maka diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Pada uji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal bebas DPPH menunjukkan bahwa ekstrak pigmen fikobiliprotein mempunyai aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} 96,57 $\mu\text{g/mL}$.
2. Pada uji hayati pendahuluan secara BSLT menunjukkan ekstrak pigmen fikobiliprotein mempunyai aktivitas biologi dengan nilai LC_{50} 174,66 $\mu\text{g/mL}$, sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak pigmen fikobiliprotein memperlihatkan toksisitas terhadap larva udang.

UCAPAN TERIMAKASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada sdr. Risma D. P. Yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Awakairt, S. (2007). Isolation of phycoerythrin and phycocyanin from red algae and cyanobacteria for using as potential marker dyes in immunofluorescence assay. Thesis. Thailand: Chiang May University; p. 44-45.
- Becker, EW. (1994). *Microalgae biotechnology and microbiology*. England: Cambridge University Press; p. 178-185.
- Boussiba, S., Richmond, AE. (1979). Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green algae *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.* 120:159-179.
- Djamil R, Anelia T. (2009). Penapisan fitokimia, uji BSLT, dan uji antioksidan ekstrak metanol beberapa spesies Papilionaceae. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia.* 7(2):65-71.
- Glazer AN. (2007). Phycobiliprotein. In: Cohen Z., editor. *Chemicals from microalgae*. UK: Taylor and Francis Ltd;1999.p.262-80 dikutip dari Bermejo R, Ruiz E, Acien FG. Recovery of B-Phycoerythrin using expanded bed absorption chromatography: Scale-up of the process. *Enzyme and microbial technology.* 40:927.
- Harborne, JB. (1986). *Metode fitokimia penuntun cara modern menganalisis tumbuhan (2nd ed.)*. (Terj.) Padmawinata K, Soediro I. Bandung: penerbit ITB. h. 13-21, 27-9.
- Hirata, T., Tanaka, M., Ooike, M., Tsunomura, T., Sakaguchi, M. (2000). Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology.* 12:435-9.



- Juniarti, O.D., Yuhernita. (2009). Kandungan senyawa kimia, uji toksisitas (BSLT) dan antioksidan (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) dari ekstrak daun saga. *Makara Sains*. 13(1):50-54.
- Meyer, B.N., et al. (1982). Brine shrimp, a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 45:31-44.
- Molyneux, P. (2004). The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26(2):212.
- Radikal bebas*. (online). http://id.wikipedia.org/wiki/Radikal_bebas. 12/12/2010.
- Romay C, Gonzales R, Ledon N, Ramirez D, Rimbau V. (2003). C-Phycocyanin: A biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current Protein and Peptide Science*. 4:207-216.
- Spirulina platensis* dietary supplement. (online) http://en.wikipedia.org/wiki/Spirulina_%28dietary_supplement%29. 12/12/2010.
- Winarsih H. (2007). *Antioksidan alami dan radikal bebas (5nd ed.)*. Yogyakarta: Kanisius.

DISKUSI

-

