POTENSI PIGMEN FIKOBILIPROTEIN SEBAGAI AGEN ANTIOKSIDAN DAN TOKSISITAS HAYATI DARI SIANOBAKTERIA *Chroococcus turgidus*

(Potency of Phycobiliprotein Pigment as Antioxidant and Biological Toxicity Agents from Cyanobacteria *Chroococcus turgidus*)

Noor Hidhayati¹, Ni Wayan Sri Agustini¹, Marsiti Apriastini¹, Claudia Margaretha²

¹Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Jl Raya Bogor KM 46, Cibinong, Bogor 16911, Indonesia

²Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jl Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta 12640, Indonesia

Email: nourhyda@gmail.com

Diterima 05 September 2019, Revisi akhir 12 Februari 2020, Disetujui 12 Maret 2020

ABSTRAK. Fikobiliprotein merupakan kompleks pigmen-protein yang dimiliki oleh sianobakteria dan menunjukkan berbagai aktivitas biologi yang luas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan toksisitas hayati dari pigmen fikobiliprotein *Chroococcus turgidus* yang diekstrak menggunakan berbagai pelarut polar, yaitu air, kalsium klorida dan buffer fosfat. Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode perendaman radikal bebas DPPH sedangkan uji toksisitas hayati dengan BSLT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pigmen fikobiliprotein berhasil diekstraksi menggunakan ketiga macam pelarut. Hasil terbaik dicapai oleh pelarut air dengan kadar pigmen 0,296 mg/mL. Berdasarkan uji aktivitas, pigmen fikobiliprotein yang diekstrak menggunakan pelarut air bersifat aktif sebagai antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 198,706 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan hasil ekstraksi menggunakan kalsium klorida dan buffer fosfat tidak aktif sebagai antioksidan dengan nilai IC_{50} berturut-turut adalah 1255,430 $\mu\text{g/mL}$ dan 1508,130 $\mu\text{g/mL}$. Hasil uji toksisitas menunjukkan pigmen fikobiliprotein yang diekstrak menggunakan air tidak bersifat toksik dengan nilai LC_{50} sebesar 1920,430 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan pigmen yang diekstrak menggunakan kalsium klorida dan buffer fosfat bersifat toksik dengan nilai LC_{50} berturut-turut sebesar 534,070 $\mu\text{g/mL}$ dan 221,050 $\mu\text{g/mL}$. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa pigmen fikobiliprotein sianobakteria *C. turgidus* dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan alami. Aktivitas toksisitas yang dimilikinya memberikan gambaran untuk pengujian lebih lanjut ke arah potensi dan seleksi senyawa antikanker.

Kata kunci: antioksidan, *C. turgidus*, fikobiliprotein, toksisitas

ABSTRACT. Phycobiliprotein is a pigment-protein complex owned by cyanobacteria and exhibits a wide variety of biological activities. This study was aimed to determine antioxidant activity and biological toxicity of phycobiliprotein pigments from *Chroococcus turgidus*, extracted using various polar solvents, namely, water, calcium chloride and phosphate buffer. The antioxidant activity assay was analysed using the DPPH free radical reduction method while the biological toxicity assay was analysed using BSLT method. The results showed that the phycobiliprotein pigment was successfully extracted using three types of solvents. The best result was obtained by water solvent with pigment levels of 0.296 mg/mL. Based on the activity, the phycobiliprotein pigment extracted using a water solvent was active as an antioxidant with an IC_{50} value of 198.706 $\mu\text{g/mL}$, while the extraction results using calcium chloride and phosphate buffer were not active as an antioxidant with IC_{50} values were 1255.430 $\mu\text{g/mL}$ and 1508.130 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Toxicity assay showed that phycobiliprotein pigments extracted using water was non-toxic with LC_{50} values of 1920.430 $\mu\text{g/mL}$ while pigments extracted using calcium chloride and phosphate buffer were toxic with LC_{50} values of 534.070 $\mu\text{g/mL}$ and 221.050 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The results of this study prove that phycobiliprotein pigment from *C. turgidus* can be used as a natural antioxidant. Its toxicity activity provides an overview for further study towards the potential and selection of anticancer compounds.

Keywords: antioxidant, *C. turgidus*, phycobiliprotein, toxicity

1. PENDAHULUAN

Meningkatnya level stres oksidatif dan spesies oksigen reaktif (ROS) dalam tubuh dapat mengganggu dan menimbulkan kerusakan protein, lipid dan DNA di dalam sel yang mengarah pada munculnya berbagai penyakit kronis pada manusia (Bermejo-Bescos *et al.*, 2008)) seperti kanker, kardiovaskuler, hingga penyakit degeneratif (Benedetti *et al.*, 2004). Tubuh membutuhkan senyawa antioksidan yang memiliki peranan penting sebagai penghambat dan penangkal radikal bebas sehingga mampu melindungi tubuh dari bahaya akibat kerusakan oksidatif ini (El-aty *et al.*, 2014). Selama ini banyak digunakan antioksidan sintetik, seperti BHA (*Butylated Hydroxyl Anisole*) dan BHT (*Butylated Hydroxyl Toluene*). Penggunaan antioksidan sintetik yang berlebihan di sisi lain dapat menimbulkan efek negatif karena bersifat toksik, karsinogenik dan dapat memicu kerusakan hati (Hussain *et al.*, 2008). Bertolak dari fenomena ini, para peneliti giat melakukan penelitian untuk menemukan sumber antioksidan alami yang lebih aman.

Sianobakteria merupakan prokariot fotosintetik paling primitif dan telah mengalami stres lingkungan yang ekstrim selama proses evolusi, sehingga tidak mengherankan apabila sianobakteria kaya akan metabolit sekunder dan enzim antioksidan sebagai pertahanan diri (Singh *et al.*, 2017). Mekanisme perlindungan dan perbaikan yang ditunjukkan oleh sianobakteria terhadap spesies oksigen reaktif (ROS) melibatkan antioksidan enzimatis dan non enzimatis (Keshari *et al.*, 2011). Strategi secara enzimatis dilakukan melalui aktivasi berbagai enzim, seperti superoksida dismutase, katalase, glutathione reduktase dan askorbat peroksidase (Bharanidharan *et al.*, 2013; Guedes *et al.*, 2013), kemudian diperkuat dengan senyawa-senyawa antioksidan non enzimatis seperti asam askorbat, fenol, flavonoid (Wu *et al.*, 2010) dan fikobiliprotein.

Pigmen fikobiliprotein merupakan kompleks pigmen-protein yang larut dalam air, berwarna cerah dan sangat berfluoresensi yang terdiri dari fikosianin (pigmen biru), allofikosianin (pigmen hijau kebiruan) dan fikoeritrin (pigmen merah). Pada sianobakteria, kandungan fikobiliprotein dapat mencapai 40% dari kandungan total protein terlarut (Maurya *et al.*, 2014; Pandey *et al.*, 2013). Pemanfaatan pigmen ini sangat beragam. Selain dimanfaatkan sebagai pewarna alami pada makanan dan kosmetik, pigmen fikobiliprotein juga dapat dimanfaatkan dalam bidang farmasi dan biomedis, yaitu sebagai

penanda berpendar (*fluorescent marker*) (El-aty *et al.*, 2014). Pigmen ini terbukti menunjukkan aktivitas antioksidan, antikanker, antimikroba dan antiinflamasi (Manirafasha *et al.*, 2016). Hasil penelitian menunjukkan potensi fikobiliprotein sebagai antioksidan, menghambat kematian neuron melalui mekanisme pembersihan radikal bebas (Eriksen, 2008). Fikobiliprotein bahkan disebut sebagai salah satu antioksidan kuat (Singh *et al.*, 2005). Cara kerja pigmen fikobiliprotein dalam mengurangi produksi ROS adalah dengan menyerap dan menghilangkan energi eksitasi sebagai panas dan secara efisien mentransfer energi yang diserap ke pusat reaksi fotosintesis (Wada *et al.*, 2013). Pada sianobakteria, lebih dari 99% UV-B diserap oleh protein pengikat klorofil dan kompleks pemanen cahaya fikobilisom, yang melekat pada permukaan luar membran tilakoid (Valuta *et al.*, 2015). Kandungan pigmen fikobiliprotein ini dapat bervariasi, tergantung pada ketersediaan nutrisi dan faktor lingkungan seperti cahaya, suhu dan pH (Pandey *et al.*, 2013).

Berdasarkan hal tersebut, dilakukan penelitian ini untuk mengkaji potensi antioksidan dan toksisitas hayati pigmen fikobiliprotein dari sianobakteria *C. turgidus*. Pengujian toksisitas memiliki korelasi dengan uji sitotoksik sehingga dapat digunakan sebagai studi pendahuluan dalam seleksi senyawa antikanker.

2. METODE PENELITIAN

Kultivasi *C. turgidus* (Becker, 1994)

Sianobakteria *C. turgidus* dikultivasi pada media Johnson yang mengandung $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/L), MgCl_2 (1,5 g/L), NaHCO_3 (0,045 g/L), KH_2PO_4 (0,035 g/L), KNO_3 (0,5 g/L), NaCl (27 g/L) dan mikronutrisi A5 (1 mL/L) dengan kondisi intensitas cahaya 2500 lux dan aerasi secara kontinyu. Pertumbuhan sel di evaluasi setiap hari secara turbidimetri menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-160) pada panjang gelombang 680 nm. Kurva pertumbuhan dibuat dengan cara memplotkan antara waktu kultur dengan kepadatan jumlah populasi sel mikroalga. Kultivasi dilakukan selama 10 hari hingga sel mencapai fase logaritmik akhir. Pemanenan kultur dilakukan dengan sentrifugasi (Heraeus Biofuge 22 R) pada kecepatan 6000 rpm selama 5 menit.

Ekstraksi Pigmen Fikobiliprotein (Silveira *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2017)

Ekstraksi pigmen dilakukan dengan metode *freezing-thawing* modifikasi menggunakan

berbagai pelarut polar. Sebanyak masing-masing 1 g biomassa ditambahkan dengan masing-masing 15 mL kalsium klorida 1%, *buffer* fosfat dan air, kemudian di vortex hingga homogen. Sampel dibekukan dalam *freezer* selama 24 jam kemudian dicairkan kembali pada kondisi gelap dan dipisahkan antara supernatan dan pelet dengan sentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Supernatan tersebut merupakan ekstrak pigmen fikobiliprotein. Ekstrak pigmen selanjutnya dikeringkan dengan metode pengeringan beku (*freeze drying*).

Identifikasi dan Perhitungan Kadar Pigmen Fikobiliprotein

Identifikasi pigmen fikobiliprotein dilakukan dengan mengukur spektrum menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 300-700 nm. Panjang gelombang maksimum fikobiliprotein yaitu 610-620 nm (Richa *et al.*, 2011). Perhitungan kadar pigmen fikobiliprotein dilakukan dengan mengukur serapan supernatan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 540 nm, 620 nm dan 650 nm. Penetapan kadar fikobiliprotein dihitung dengan menggunakan rumus seperti yang tersaji dalam persamaan (1-4) berikut (Becker, 1994; Soni *et al.*, 2006).

$$\text{Fikosianin } [C - PC] \text{ (mg/mL)} = \frac{A_{620 \text{ nm}} - 0,7 \times A_{650 \text{ nm}}}{7,38} \dots\dots\dots (1)$$

$$\text{Allofikosianin } [C - APC] \text{ (mg/mL)} = \frac{A_{650 \text{ nm}} - 0,19 \times A_{620 \text{ nm}}}{5,65} \dots\dots\dots (2)$$

$$\text{Fikoeritrin } [C - PE] \text{ (mg/mL)} = \frac{A_{540 \text{ nm}} - 2,8 \times [C - PC] - 1,34 \times [C - APC]}{12,7} \dots\dots\dots (3)$$

$$\text{Fikobiliprotein (mg/mL)} = [C - PC] + [C - APC] + [C - PE] \dots\dots\dots (4)$$

Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode Perendaman DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Blois, 1958)

Sebanyak 1 mL larutan 0,4 mM DPPH dalam metanol ditambahkan ke dalam 4 mL ekstrak pigmen fikobiliprotein yang dilarutkan dalam metanol yang sebelumnya telah dibuat pada berbagai konsentrasi (100, 250, 400, 550 dan 700 µg/mL). Vitamin C (asam askorbat) digunakan sebagai kontrol positif dan dibuat pada konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 µg/mL dengan prosedur yang

sama. Larutan DPPH dalam metanol digunakan sebagai blangko. Sampel, kontrol positif dan blangko diinkubasi pada waterbath suhu 37°C selama 30 menit. Serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Persentase hambatan/inhibisi dihitung dengan rumus seperti yang disajikan dalam persamaan (5) berikut:

Hambatan (%) =

$$\frac{(\text{serapan blangko} - \text{serapan sampel})}{\text{serapan blangko}} \times 100 \dots\dots\dots (5)$$

Grafik hubungan antara konsentrasi dan hambatan dibuat untuk menentukan nilai IC₅₀ melalui persamaan regresi linear $y = a + bx$, dengan $y = 50$ dan nilai x menunjukkan IC₅₀. Nilai IC₅₀ (*Inhibition Concentration* 50) adalah konsentrasi antioksidan (µg/mL) yang mampu meredam radikal bebas sebanyak 50% dibanding kontrol. Ekstrak dinyatakan aktif sebagai antioksidan apabila nilai IC₅₀ < 200 µg/mL (Molyneux, 2004).

Uji Toksisitas dengan BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Uji toksisitas pigmen dengan BSLT mengacu pada metode Meyer *et al.* (1982) dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach. Larva udang diperoleh dari telur *A. salina* yang ditetaskan pada wadah penetasan yang berisi air laut dan dilengkapi dengan pencahayaan dan aerasi. Wadah penetasan ditutup dengan *aluminium foil*. Setelah 48 jam, telur akan menetas menjadi larva udang dan siap digunakan untuk pengujian. Ekstrak pigmen fikobiliprotein dibuat dengan konsentrasi 10, 100 dan 1000 ppm dalam air laut, masing-masing 3 kali ulangan. Jika ekstrak pigmen susah larut maka ditambahkan 2 tetes DMSO (*dimethyl sulfoxide*). Sebanyak 10 ekor larva udang *A. salina* dimasukkan ke dalam vial yg berisi ekstrak pigmen, sementara vial yang tidak berisi ekstrak dijadikan sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam untuk menghitung persentase kematian larva udang. Grafik hubungan antara konsentrasi log dan mortalitas dibuat untuk menentukan nilai *lethal concentration* 50 (LC₅₀) berdasarkan persamaan regresi linier $y = a + bx$. LC₅₀ adalah konsentrasi suatu zat yang menyebabkan kematian 50% dari populasi uji. Suatu ekstrak dikatakan toksik apabila mempunyai nilai LC₅₀ < 1000 µg/mL, dan dikatakan tidak toksik apabila nilai LC₅₀ > 1000 µg/mL (Meyer *et al.*, 1982).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan *C. turgidus* dan Ekstraksi Pigmen Fikobiliprotein

Kultivasi *C. turgidus* dilakukan selama 10 hari. Sianobakteria ini tidak mengalami fase lag dan langsung mengalami fase pertumbuhan logaritmik hingga hari terakhir kultivasi. Hal ini disebabkan oleh OD awal kultur sudah tinggi yaitu 0,5 sehingga kultur sudah cukup beradaptasi dengan lingkungan dan media kultivasi. *C. turgidus* dipanen pada hari ke-10 yaitu pada saat berada di fase logaritmik akhir. Menurut Brown *et al.* (1997), mikroalga yang tumbuh pada fase logaritmik akhir biasanya mengandung 30-40% protein. Komposisi nutrisi ini dapat berubah pada fase stasioner karena kurangnya nitrat pada media kultur sehingga karbohidrat meningkat dan protein cenderung menurun. Biomassa basah yang dihasilkan selanjutnya digunakan untuk proses ekstraksi pigmen fikobiliprotein. Proses ekstraksi merupakan hal yang krusial sehingga kesesuaian metode dalam proses ini akan menentukan keberhasilan dan banyaknya *yield* pigmen fikobiliprotein yang diperoleh. Proses ekstraksi fikobiliprotein dari sianobakteria bisa saja sulit karena resistensi dinding sel dan ukuran sianobakteri yang kecil (Yu, 2017; Yu *et al.*, 2017). Terdapat beberapa metode dalam ekstraksi fikobiliprotein, salah satunya menggabungkan pemecahan dinding sel dan ekstraksi fikobiliprotein yang larut dalam air. Apabila

dibandingkan antar metode, maka *freezing-thawing* merupakan metode paling efisien untuk mengekstrak pigmen dari biomassa basah (Eriksen, 2008). Oleh karena itu, penelitian ini mengacu pada metode ekstraksi tersebut.

Ekstraksi kasar bisa dilakukan dengan cara gangguan mekanis terhadap sel (ultrasonikasi, *bead mill* atau sistem tekanan tinggi) atau dengan ekstraksi osmotik kimia (misal dengan *buffer* fosfat) (Yu *et al.*, 2017). *Buffer* fosfat merupakan pelarut yang umum digunakan dalam ekstraksi fikobiliprotein. Pada metode ini, terjadi homogenasi suspensi sel dalam larutan *buffer* fosfat encer yang akan menyebabkan syok osmotik dan pecahnya dinding sel (Sun *et al.*, 2009). Pada penelitian ini digunakan 3 macam pelarut yaitu air, *buffer* fosfat dan kalsium klorida. Ketiga pelarut ini merupakan pelarut polar, sama halnya dengan pigmen fikobiliprotein. Hasil pengamatan secara visual menunjukkan bahwa pigmen fikobiliprotein yang diekstraksi menggunakan air berwarna biru sedikit kehijauan sedangkan hasil ekstraksi menggunakan kalsium klorida dan *buffer* fosfat berwarna biru cerah (Gambar 1). Warna biru ini dipengaruhi oleh kandungan fikosianin yang dominan diantara pigmen lainnya. Sementara itu, munculnya warna biru kehijauan pada hasil ekstraksi menggunakan air dipengaruhi oleh kandungan allofikosianin yang lebih tinggi jika dibandingkan hasil ekstraksi menggunakan kalsium klorida dan *buffer* fosfat.

Gambar 1. Pigmen fikobiliprotein yang diekstraksi dengan berbagai pelarut (A. pelarut air; B. pelarut kalsium klorida; C. pelarut *buffer* fosfat)

Identifikasi dan Perhitungan Kadar Pigmen Fikobiliprotein

Berdasarkan hasil identifikasi pigmen fikobiliprotein melalui pengukuran spektrum dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 300-700 nm, terlihat adanya serapan

maksimal pada panjang gelombang 616 nm yang dicapai oleh ketiga sampel yang diekstrak dengan air, kalsium klorida, maupun *buffer* fosfat. Hal ini juga didukung dengan serapan pada panjang gelombang yang mendekati dengan panjang gelombang untuk identifikasi fikosianin,

allofikosianin dan fikoeritrin (data tidak ditampilkan). Hasil pengukuran ini sejalan dengan pendapat Richa *et al.* (2011) yang menyebutkan bahwa panjang gelombang maksimum fikobiliprotein yaitu 610-620 nm, sekaligus meyakinkan bahwa proses ekstraksi pigmen berhasil dilakukan. Berdasarkan hasil penelitian, terlihat bahwa kadar pigmen fikobiliprotein tertinggi dicapai oleh ekstraksi menggunakan air, kemudian berturut-turut dicapai oleh kalsium klorida dan *buffer* fosfat (Tabel 1). Hasil ini mengindikasikan bahwa pelarut air efektif digunakan untuk mengekstraksi pigmen fikobiliprotein, meskipun berbagai literatur menyebutkan bahwa *buffer* fosfat paling umum dan efektif digunakan (Sun *et al.*, 2009). Sesuai dengan sifat pigmen fikobiliprotein yang larut dalam air, maka penggunaan air sebagai pelarut

dalam ekstraksi pigmen ini sangatlah tepat. Selain itu dibandingkan kedua pelarut lainnya, maka air paling aman, ekonomis dan mudah didapatkan. Kadar fikobiliprotein merupakan kadar total pigmen yang terdiri dari fikosianin, allofikosianin, dan fikoeritrin (Becker, 1994; Soni *et al.*, 2006). Berdasarkan hasil juga terlihat bahwa kadar fikosianin yang dicapai ketiga pelarut menunjukkan nilai paling tinggi dibandingkan pigmen lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa fikosianin merupakan komponen dominan dalam fikobiliprotein sianobakteria *C. turgidus*. Penelitian yang dilakukan oleh Rai & Rajashekhar (2015) juga memperkuat pendapat ini dengan hasil ekstraksi pigmen fikobiliprotein dari *C. turgidus* sebesar 4,00 mg/g berat kering, dan fikosianin sebagai pigmen dominan.

Tabel 1. Kadar pigmen fikobiliprotein dari *C. turgidus*

No	Pelarut	Kadar Pigmen (mg/mL)			
		Fikosianin	Allofikosianin	Fikoeritrin	Fikobiliprotein
1	Air	0,186	0,078	0,032	0,296
2	Kalsium klorida	0,176	0,064	0,030	0,269
3	<i>Buffer</i> fosfat	0,144	0,054	0,021	0,220

Tabel 2. Aktivitas antioksidan pigmen fikobiliprotein yang diekstrak menggunakan berbagai pelarut

Pelarut	% Hambatan rata-rata + SD pada berbagai konsentrasi					IC ₅₀ (µg/mL)
	100 (µg/mL)	250 (µg/mL)	400 (µg/mL)	550 (µg/mL)	700 (µg/mL)	
Air	48,034±0,443	51,046±0,586	53,278±0,395	56,932±0,650	57,852±0,256	198,706
Kalsium klorida	23,623±1,108	27,942±1,459	31,826±0,920	33,913±0,529	37,391±0,261	1255,430
<i>Buffer</i> fosfat	12,299±1,380	18,990±0,193	21,995±0,142	26,487±0,738	27,819±0,284	1508,130
Vit C	2 (µg/mL)	4 (µg/mL)	6 (µg/mL)	8 (µg/mL)	10 (µg/mL)	4,517
	15,104±6,340	47,950±3,616	75,883±4,792	92,286±1,195	92,854±1,654	

Aktivitas Antioksidan Pigmen Fikobiliprotein

Uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode perendaman radikal bebas DPPH karena cepat, sederhana dan murah (Prakash *et al.*, 2001). Kemampuan reduksi radikal bebas DPPH ditandai dengan adanya penurunan nilai absorbansi pada panjang gelombang 517 nm dan secara visual terlihat dengan terjadinya perubahan warna dari ungu menjadi kuning (El-aty *et al.*, 2014; Prakash *et al.*, 2001). Hasil penelitian menunjukkan adanya aktivitas penghambatan dari pigmen fikobiliprotein terhadap radikal DPPH. Semakin tinggi konsentrasi maka nilai persentase hambatan juga makin besar (Tabel 2). Hal ini

sejalan dengan penelitian El-aty *et al.* (2014) yang menggunakan berbagai ekstrak sianobakteria *Oscillatoria agardhii* dan *Anabaena sphaerica* pada konsentrasi 50, 100 dan 150 µg/mL dan didapatkan nilai penghambatan terbesar pada konsentrasi ekstrak tertinggi.

Suatu ekstrak dinyatakan aktif sebagai antioksidan apabila nilai IC₅₀ < 200 µg/mL (Molyneux, 2004). Berdasarkan hal tersebut, maka hanya pigmen fikobiliprotein hasil ekstraksi dengan air yang aktif sebagai antioksidan, dengan nilai IC₅₀ sebesar 198,706 µg/mL. Sementara pigmen fikobiliprotein hasil ekstraksi menggunakan kalsium klorida dan *buffer* fosfat

Tabel 3. Aktivitas toksisitas pigmen fikobiliprotein yang diekstrak menggunakan berbagai pelarut

No	Pelarut	Konsentrasi (µg/mL)	% Kematian	LC ₅₀ (µg/mL)	Keterangan
1	Air	1000	47,370	1.920,430	Tidak toksik
		100	15,090		
		10	3,950		
2	Kalsium klorida	1000	56,820	534,070	Toksik
		100	31,820		
		10	7,140		
3	Buffer fosfat	1000	65,220	221,050	Toksik
		100	45,710		
		10	11,110		

tidak aktif sebagai antioksidan karena nilai IC₅₀ nya sangat besar hingga melebihi 1000 µg/mL. Hasil ini juga ikut dipengaruhi oleh kadar pigmen fikobiliprotein yang lebih tinggi (dengan pelarut air) dibandingkan pelarut lainnya. Aktivitas antioksidan yang dimiliki pigmen fikobiliprotein ini tergolong lemah, apalagi jika dibandingkan dengan kontrol positif (vitamin C). Menurut Diantini *et al.* (2012) dan Prakash *et al.* (2001), suatu sampel dinyatakan sangat aktif (memiliki aktivitas antioksidan kuat) apabila nilai IC₅₀ nya 50-100 µg/mL; aktif (antioksidan sedang) apabila IC₅₀ nya 100-150 µg/mL dan antioksidan lemah apabila nilai IC₅₀ berkisar 150-200 µg/mL.

Berbagai penelitian telah dilakukan dan mengungkapkan potensi pigmen fikobiliprotein sebagai antioksidan. Penelitian yang dilakukan Mukund *et al.* (2013) menunjukkan aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol *C. turgidus*, dimana pada konsentrasi 250 µg memberikan aktivitas sebesar 55,1%. Penelitian yang dilakukan oleh Shanab *et al.* (2012) mengungkapkan potensi *Spirulina platensis* sebagai antioksidan dengan aktivitas sebesar 69,3% terhadap radikal DPPH dan menunjukkan aktivitas antikanker sebesar 60,67% dan 54,8% terhadap EACC dan HepG2. Aktivitas ini diduga karena kandungan pigmen fikobiliprotein di dalam *S. platensis*. García *et al.* (2016) juga mengungkapkan efek fikobiliprotein yang diekstraksi dari *Arthrospira maxima* dapat melindungi organisme model (*Saccharomyces cerevisiae*) ketika dipapar dengan uji stres oksidatif.

Nutrisi medium ikut berperan dalam produksi pigmen fikobiliprotein. Hal ini seperti yang dilaporkan oleh Shanab *et al.* (2012) dalam penelitiannya menggunakan sianobakteria *Nostoc muscorum* dan *Oscillatoria* sp., produksi pigmen fikobiliprotein berkaitan dengan kondisi stres lingkungan akibat penambahan atau pengurangan komponen media. Pada kondisi penambahan nitrat,

tercatat adanya peningkatan produksi pigmen fikobiliprotein yang linear dengan meningkatnya aktivitas antioksidan. Sebaliknya ketika terjadi pengurangan nitrat maka terjadi pula penurunan produksi fikobiliprotein, meskipun tidak terlalu berdampak pada menurunnya aktivitas antioksidan karena didukung aktivitas metabolit sekunder yang lain. Hal ini diperkuat oleh pendapat Glazer (1994) bahwa pada kondisi nutrisi yang melimpah, pigmen fikobiliprotein dapat terbentuk sebanyak 40% dari protein sel. Pada penelitian ini sumber nitrat berasal dari media KNO₃ sebesar 0,5 g/L dan tidak ada variasi konsentrasi nitrat. Sementara pada penelitian Shanab *et al.* (2012) menggunakan nitrat yang bersumber dari NaNO₃ dengan berbagai variasi kelimpahan nitrat (3;6;9 g/L), limitasi nitrat (0,75;0,375;0,0 g/L) dan nitrat 1,5 g/L sebagai kontrol. Apabila dibandingkan keduanya maka konsentrasi nitrat yang digunakan dalam penelitian ini tergolong rendah, akan tetapi hasil pigmen fikobiliprotein yang dihasilkan tidak terlalu jauh berbeda yaitu berkisar 0,2 mg/ml.

Toksisitas Pigmen Fikobiliprotein

Aktivitas biologis suatu senyawa yang mengandung zat aktif yang bersifat sitotoksik dapat dilihat dari nilai LC₅₀. Nilai LC₅₀ diperoleh dengan cara menghitung tingkat kematian 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, sehingga metode BSLT banyak digunakan untuk seleksi senyawa antikanker potensial. Selain itu, metode ini juga mudah dikerjakan, murah, cepat dan hanya membutuhkan sedikit sampel. Suatu ekstrak dikatakan toksik terhadap larva udang *Artemia salina* Leach apabila mempunyai nilai LC₅₀ < 1000 µg/mL, dan

dikatakan tidak toksik bila nilai $LC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ (Meyer *et al.*, 1982). Berdasarkan hasil penelitian yang tersaji dalam Tabel 3, pigmen fikobiliprotein hasil ekstraksi dengan air tidak bersifat toksik, sedangkan hasil ekstraksi menggunakan kalsium klorida dan *buffer* fosfat bersifat toksik. Hasil uji toksisitas ini mengungkapkan potensi pigmen fikobiliprotein sebagai agen sitotoksik.

Antioksidan dapat melindungi jaringan sel dari radikal bebas, sehingga mencegah penyakit seperti kanker. Radikal bebas seperti radikal superoksida (O_2), radikal hidroksil (OH) dan spesies oksigen reaktif (ROS) berhubungan dengan karsinogenesis dan mutagenesis (El-aty *et al.*, 2014). Berbagai studi melaporkan, ekstrak alga mampu mencegah kanker, dan hal ini berkaitan dengan senyawa antioksidan yang terkandung di dalamnya (Shanab *et al.*, 2012). Sebagai studi pendahuluan ke arah potensi antikanker, maka hasil uji toksisitas pada penelitian ini tidak menunjukkan adanya korelasi dengan aktivitas antioksidan dari pigmen fikobiliprotein.

4. KESIMPULAN

Pigmen fikobiliprotein berhasil diekstrak menggunakan berbagai pelarut polar. Hasil menunjukkan potensi pigmen fikobiliprotein sebagai antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar $198,706 \mu\text{g/mL}$ dan juga menunjukkan aktivitas toksisitas hayati dengan nilai LC_{50} sebesar $221,050 \mu\text{g/mL}$ dan $534,070 \mu\text{g/mL}$. Uji toksisitas ini merupakan uji pendahuluan dalam seleksi senyawa antikanker, sehingga perlu dilakukan uji sitotoksitas untuk mengetahui potensinya sebagai antikanker. Purifikasi pigmen fikobiliprotein juga penting dilakukan untuk mendapatkan pigmen yang lebih murni dan meningkatkan aktivitas biologisnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Becker, E. W. (1994). *Microalgae biotechnology and microbiology*. England: Cambridge University Press.
- Benedetti, S., Benvenuti, F., Pagliarani, S., Francogli, S., Scoglio, S., & Canestrari, F. (2004). Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Life Sciences*, 75, 2353–2362.
- Bermejo-Bescos, P., Pinero-Estrada, E., & Villar-del-Fresno, A. (2008). Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SHSY5Y neuroblastoma cells. *Toxicology in Vitro*, 22(6), 1496–1502.
- Bharanidharan, M., Sivasubramanian, V., & Nayagam, S. R. V. (2013). Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of cyanobacteria, *Chroococcus turgidus* (Kützinger) Nägeli. *International Journal of Current Microbiology & Applied Sciences*, 2(10), 300–305.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199–1200.
- Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., & Dunstan, G. A. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151, 315–331.
- Diantini, A., Subarnas, A., Lestari, K., Halimah, E. L. I., Susilawati, Y., Julaha, E., ... Yamazaki, C. (2012). Kaempferol-3- O -rhamnoside isolated from the leaves of *Schima wallichii* Korth . inhibits MCF-7 breast cancer cell proliferation through activation of the caspase cascade pathway. *Oncology Letter*, 3, 1069–1072.
- El-aty, A. M. A., Mohamed, A. A., & Samhan, F. A. (2014). In vitro antioxidant and antibacterial activities of two fresh water Cyanobacterial species, *Oscillatoria agardhii* and *Anabaena sphaerica*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(07), 69–75.
- Eriksen, N. T. (2008). Production of phycocyanin — a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(1), 1–14.
- García, I. I. S., Jaritz, N. B. M., & Ramírez, R. O. (2016). Antioxidant effect of phycobiliproteins of the cyanobacteria *Arthrospira maxima* on growth of *Saccharomyces cerevisiae* under oxidative stress. *International Journal of Current Microbiology & Applied Sciences*, 5(10), 233–239.
- Glazer, A. N. (1994). Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. *Journal of Applied Phycology*, 6, 105–112.
- Guedes, A. C., Gao, M. S., Seabra, R., Ferreira, A. C. S., Tamagnini, P., Moradas-Ferreira, P., & Malcata, F. X. (2013). Evaluation of the antioxidant activity of cell extracts from microalgae. *Marine Drugs*, 11, 1256–1270.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Sherazi, S. T. H., & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108, 986–995.
- Keshari, M., Sinha, R. P., & Richa. (2011). Antioxidants as natural arsenal against multiple stresses in cyanobacteria. *International Journal*

of Pharma and Bio Sciences, 2(2), 168–187.

- Manirafasha, E., Ndikubwimana, T., Zeng, X., Lu, Y., & Jing, K. (2016). Phycobiliprotein: potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 282–296.
- Maurya, S. S., Maurya, J. N., & Pandey, V. D. (2014). Factors regulating phycobiliprotein production in cyanobacteria. *International Journal of Current Microbiology & Applied Sciences*, 3(5), 764–771.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & Mc Laughlin, J. L. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*, 45, 31–34.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar Journal of Science and Technology*, 26(2), 211–219.
- Mukund, S., Sivasubramanian, V., & Kumar, N. S. S. (2013). In-vitro antioxidant activity and enzymatic and non-enzymatic antioxidant potential of *Chroococcus turgidus*. *International Journal of Pharmaceutical Research & Development*, 5(05), 112–120.
- Pandey, V. D., Pandey, A., & Sharma, V. (2013). Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. *International Journal of Current Microbiology & Applied Sciences*, 2(9), 89–97.
- Prakash, A., Rigelhof, F., & Miller, E. (2001). Antioxidant Activity. *Medallion Laboratories Analytical Progress*.
- Rai, S. V., & Rajashekhar, M. (2015). Antioxidant potential of eight species of cyanobacteria isolated from Arabian Sea coast of Karnataka. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(12), 938–942.
- Richa, Kannaujiya, V. K., Kesheri, M., Singh, G., & Sinha, R. P. (2011). Biotechnological potentials of phycobiliproteins. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(4), 446–454.
- 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 Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(8), 608–615.
- Silveira, S. T., Burkert, J. F. M., Costa, J. A. V, Burkert, C. A. V, & Kalil, S. J. (2007). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology*, 98, 1629–1634.
- Singh, D. P., Prabha, R., Verma, S., Meena, K. K., & Yandigeri, M. (2017). Antioxidant properties and polyphenolic content in terrestrial cyanobacteria. *3 Biotech*, 7(134), 1–14.
- Singh, S., Kate, B. N., & Banerjee, U. C. (2005). Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25, 73–95.
- Soni, B., Kalavadia, B., Trivedi, U., & Madamwar, D. (2006). Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* — Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochemistry*, 41, 2017–2023.
- Sun, L., Wang, S., Gong, X., Zhao, M., Fu, X., & Wang, L. (2009). Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica*. *Protein Expression and Purification*, 64, 146–154.
- Valuta, A., Cepoi, L., Rudi, L., Bulhac, I., Bourosh, P., & Bologa, O. (2015). Phycobiliprotein accumulation in cyanobacterium *Nostoc linckia* and modification of antioxidant activity. *Analele Universitatii Din Oradea, Fascicula Biologie*, 22(1), 13–19.
- Wada, N., Sakamoto, T., & Matsugo, S. (2013). Multiple roles of photosynthetic and sunscreen pigments in cyanobacteria focusing on the oxidative stress. *Metabolites*, 3, 463–483.
- Wu, S.-C., Wang, F.-J., & Pan, C.-L. (2010). The comparison of antioxidative properties of seaweed oligosaccharides fermented by two lactic acid bacteria. *Journal of Marine Science and Technology*, 18(4), 537–545.
- Yu, J. (2017). Application of an ultrafine shearing method for the extraction of C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Molecules*, 22, 2023.
- Yu, P., Wu, Y., Wang, G., Jia, T., & Zhang, Y. (2017). Purification and bioactivities of phycocyanin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(18), 3840–3849