

EKSTRAKSI FIKOSIANIN DARI *SPIRULINA PLANTESIS* SEBAGAI BIOPIGMENT DAN ANTIOKSIDAN

EXTRACTION OF PHYCOCYANIN FROM *SPIRULINA PLANTESIS* FOR BIOPIGMENT AND ANTIOXIDANT

SI Rahmawati^{1a}, S Hidayatulloh¹, dan M Suprayatmi¹

¹ Program Studi Teknologi Pangan, Fakultas Ilmu Pangan Halal, Universitas Djuanda Bogor
Jl. Tol Ciawi No. 1, Kotak Pos 35 Ciawi, Bogor 16720.

^a Korespondensi: Siti Irma Rahmawati, E-mail: siti.irma.rahmawati@unida.ac.id
(Diterima: 28-01-2017; Ditelaah: 28-01-2017; Disetujui: 03-03-2017)

ABSTRACT

Recently, biopigment known as a pigment which has no impact and easy to degraded in human body and better than artificial pigment. Biopigment can be resulted from the extraction of algae that are living in the water. *Spirulina plantesis* is one of algae resulting a pigment and known as phycocyanin. In this research, extraction of phycocyanin was done by three method of extractions; maceration, Ultrasound-Assisted-Extraction (UAE) and Freeze-thaw. Those extraction methods were compared to decide which method that resulted highest yield of extraction and has highest antioxidant activities. From the resulted data, the highest yield and highest phycocyanin concentration was obtained by freeze-thaw extraction method. Phycocyanin concentration from freeze-thaw extract was 26,53% (w/w). However, the highest antioxidant activities was obtained by maceraion extraction mehod. The IC50 of extract from maceration was 49,59 ppm. Hence, all extracts from different extraction methods resulted high antioxidant activities.

Keywords: antioksidant, biopigment, extraction, phycocyanin, *Spirulina plantesis*.

ABSTRAK

Pewarna alami lebih disukai karena tidak memiliki efek yang negatif terhadap tubuh manusia sehingga mempunyai tingkat keamanan pangan yang tinggi, selain itu juga pewarna alami mudah diuraikan. Bahan pewarna alami bisa diperoleh dari berbagai jenis sumber, salah satunya yaitu spesies alga yang merupakan tumbuhan tingkat rendah di perairan. Alga terdapat 2 jenis yaitu makroalga yang berukuran besar dan mikroalga yang berukuran kecil (renik). Spesies mikroalga yang dapat menghasilkan pewarna alami salah satunya adalah *Spirulina*. Jenis pewarna alami yang terkandung pada mikroalga tersebut yaitu fikosianin. Pada penelitian ini, dilakukan ekstraksi fikosianin dari *Spirulina platensis* dengan menggunakan tiga metode berbeda yaitu Maserasi, Ultrasound-Assisted-Extraction (UAE) dan Freezing untuk mengetahui metode mana untuk menghasilkan yield dan antioksidan tertinggi dari ekstrak yang dihasilkan. Hasil dari penelitian ini didapatkan bahwa berdasarkan nilai yield tertinggi dan kandungan fikosianin, freezing merupakan metode ekstraksi terbaik dengan kandungan fikosianin yang paling tinggi yaitu sebesar 26,53%. Sedangkan nilai aktivitas antioksidan terbesar dihasilkan oleh metode ekstraksi maserasi dengan nilai IC50 sebesar 49,59 ppm. Fikosianin yang dihasilkan dari ketiga metode ekstraksi termasuk antioksidan kuat.

Kata kunci: antioksidan, biopigmen, ekstraksi, fikosianin, *Spirulina plantesis*.

PENDAHULUAN

Pewarna adalah bahan tambahan pangan yang sering kali digunakan dengan tujuan untuk membuat suatu produk pangan menjadi lebih menarik. Hal ini disebabkan karena penampilan warna suatu produk adalah salah satu indikator yang menentukan pertimbangan konsumen untuk membeli produk tersebut (Steinkraus 1983). Oleh karena itu, dalam industri khususnya makanan penggunaan pewarna sangat banyak dilakukan, dua jenis pewarna yang biasa digunakan adalah pewarna alami serta pewarna sintetis. Pada umumnya pewarna sintetis lebih sering digunakan pada industri makanan karena lebih murah, ketersediaan banyak, lebih stabil, dan tahan lebih lama walaupun memiliki tingkat keamanan pangan yang lebih rendah jika dibandingkan dengan pewarna alami. Perbandingan pewarna sintesis dengan pewarna alami, pewarna sintesis lebih berbahaya bagi kesehatan jika penggunaannya berlebihan.

Pewarna alami tidak memiliki efek negatif jika dikonsumsi dan dapat diuraikan sehingga memiliki tingkat keamanan pangan yang tinggi, tetapi pewarna alami mempunyai kelemahan diantaranya adalah kestabilannya yang kurang terhadap cahaya, panas, dan pH. Selain itu juga mempunyai kekurangan yaitu ketersediannya yang minim di alam. Pewarna alami merupakan solusi untuk makanan yang lebih sehat dan menyehatkan. Astawan dan Kasih (2008), menjelaskan bahwa warna alami yang ada di tumbuhan memiliki berbagai macam khasiat untuk menjaga kesehatan. Bahkan warna-warni alami ini pun memiliki kemampuan sebagai obat untuk suatu penyakit tertentu. Hal ini merupakan potensi yang dapat dikembangkan dari pewarna alami yang salah satunya yaitu spesies alga yang merupakan tumbuhan tingkat rendah di perairan. Alga terdapat 2 jenis yaitu makroalga yang berukuran besar dan mikroalga yang berukuran kecil (renik). Spesies mikroalga yang dapat menghasilkan pewarna alami contohnya adalah Spirulina.

Jenis pewarna alami yang terkandung pada mikroalga tersebut adalah fikosianin, klorofil-a, dan karotenoid yang dipercaya sebagai antioksidan tinggi dan agen antikanker (Pirenantyo 2008). Fikosianin merupakan pigmen yang dapat digunakan untuk pewarna alami dengan warna biru. Pigmen ini mudah larut pada pelarut polar seperti air.

Spolaore *et al.* (2006), dalam penelitiannya menyatakan bahwa pigmen fikosianin mempunyai potensi sebagai pewarna alami. Hirata *et al.* (2000) dan Kato (1994) diacu dalam El-Baky (2003), juga melaporkan bahwa pemanfaatan pigmen fikosianin sebagai bahan pewarna alami pada bahan pangan telah sedari dulu dilakukan. Perusahaan Dainippon Ink & Chemicals (Sakura), bahkan telah mengembangkan produk dengan bahan dasar pigmen fikobiliprotein dengan nama Lina Blue. Produk ini telah diaplikasikan pada beberapa produk makanan seperti permen karet, ice sherberts, popsicles, minuman ringan (*soft drink*), *dairy product*, dan wasabi. Selain sebagai pewarna pada bahan pangan, pigmen fikosianin juga memiliki potensi untuk produk kosmetika sebagai pewarna alami yang mempunyai nilai jual tinggi. Contoh produk yang telah dikembangkan antara lain lipstik dan eyeliners (Spolaore *et al.* 2006).

Fikosianin dari biomassa kering sel *Spirulina platensis* dapat diekstrak menggunakan metode maserasi. Diketahui bahwa dalam 10 gram *Spirulina* mempunyai kandungan 1400 mg pigmen fikosianin. Menurut penelitian Arlyza (2005), fikosianin bersifat larut dalam pelarut polar seperti air.

Pada penelitian ini, dilakukan ekstraksi fikosianin dari *Spirulina platensis* dengan menggunakan tiga metode berbeda yaitu Maserasi, Ultrasound-Assisted-Extraction (UAE) dan Freezing. Menurut Zhang *et al.* (2014), terdapat beberapa hambatan saat melakukan ekstraksi fikosianin dari alga adalah adanya dinding sel berlapis serta kontaminan yang dapat mengurangi keefektifan ekstraksi yang dilakukan. Sehingga dibutuhkan metode ekstraksi yang

tepat untuk mengekstrak fikosianin dari *Spirulina platensis* tanpa banyak merusak fikosianin itu sendiri karena perlakuan yang tidak tepat.

Ekstraksi konvensional pada umumnya membutuhkan waktu ekstraksi yang cukup lama serta melibatkan proses panas yang dapat merusak pigmen sehingga diperlukan ekstraksi dengan metode baru salah satunya adalah dengan menggunakan gelombang ultrasonik. Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) adalah metode alternatif ekstraksi yang tidak menggunakan panas dan diketahui lebih efisien, lebih cepat, serta memungkinkan adanya pengurangan pelarut organik yang digunakan, sehingga menghasilkan ekstrak murni dengan yield yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan ekstraksi konvensional. Metode ini telah diterapkan antara lain untuk mengekstrak komponen bahan pangan seperti komponen aroma, pigmen, dan antibakteri. Parameter penting pada metode ekstraksi diantaranya yaitu pengecilan ukuran sampel, jenis dan rasio penggunaan pelarut, serta waktu ekstraksi.

Ekstraksi fikosianin dilakukan dengan menggunakan pelarut air untuk ketiga metode tersebut untuk menghasilkan ekstrak yang bebas dari bahan kimia dan aman untuk dikonsumsi. Ekstraksi dilakukan dengan air karena fikosianin bersifat mudah larut di dalam air dan air itu sendiri aman apabila dicampurkan ke dalam bahan atau produk pangan. Ekstraksi dengan menggunakan air tidak menghasilkan efek samping (Muchtadi, 1992). Selain itu juga, penggunaan air sebagai pelarut dapat dipastikan halal. Penggunaan pelarut air dalam mengekstraksi fikosianin pada *Spirulina plantesis* juga terhitung aman serta efektif dalam mengekstrak zat-zat aktif di dalamnya. Boussiba dan Richmond (1979) mengungkapkan bahwa, penggunaan air sebagai pelarut pada proses ekstraksi pewarna alami akan lebih mudah untuk melarutkan biomassa sel *Spirulina*. Ditambah lagi menurut Fretes *et al.* (2012), pigmen fikosianin dipengaruhi oleh cahaya, pH, suhu, oksigen, dan pelarut alcohol dalam

hal kestabilannya. Berbeda dengan metanol yang termasuk pelarut organik dan bersifat toksik serta dari segi kehalalannya juga dipertanyakan, sedangkan air bukan pelarut organik dan tidak bersifat toksik.

Beberapa metode ekstraksi yang sudah dilakukan oleh sejumlah peneliti sebelumnya untuk mengekstrak Fikosianin dari *Spirulina platensis* adalah metode maserasi (Arlyza 2005). Maserasi adalah cara untuk ekstraksi sampel dengan merendam menggunakan satu atau campuran pelarut selama beberapa waktu.

Fikosianin merupakan pigmen berasosiasi dengan protein yang dapat larut dalam air sehingga bisa dibebaskan secara sederhana oleh penghancuran secara mekanis, seperti perlakuan pembekuan kemudian dihancurkan (freeze-thaw). Dengan pembekuan sel *Spirulina platensis* dalam freezer bersuhu -40 C, dapat mendenaturasi protein yang terikat pada fikosianin sehingga protein akan terdenaturasi dan biopigmen Fikosianin dapat terekstrak dengan baik pada suhu -40 C. Tujuan utama proses freeze-thaw adalah untuk melakukan stressing sel sehingga mempercepat pembebasan pigmen dari sel setelah adanya proses pengeringan biomassa kering *Spirulina platensis* (Farihah 2014).

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui ekstraksi fikosianin terbaik yang dihasilkan dari metode maserasi, Ultrasound-Assisted Extraction, dan Freezing, yang ditentukan dari jumlah fikosianin yang terekstrak. Serta mengetahui aktivitas antioksidan yang dihasilkan dari ekstrak tersebut

MATERI DAN METODE

Materi

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan di laboratorium *Surfactant and Bioenergy Research Centre* (SBRC), Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM), Institut

Pertanian Bogor (IPB), Kampus IPB Baranang Siang, Bogor, Jawa Barat.

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah biomassa kering *Spirulina platensis*, air suling, tissue, DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl), methanol p.a., ethanol 95%, pereaksi CBB (*Comassie Brilliant Blue*), pereaksi BSA (*Bovine Serum Albumin*), buffer sitrat pH 5, buffer fosfat pH 7,0, ethanol absolute (95%), dan asam fosfat pekat (85%).

Alat

Alat yang digunakan adalah neraca analitik, spatula/sudip, corong plastik, botol plastik 100 ml, lemari kulkas, labu semprot, piala gelas 100 ml, gelas ukur 100 ml, *Sonicator* Merk Branson, Spektrofotometer UV Merk *Hitachi U-2900*, kuvet, *sentrifuse*, labu takar 100 ml dan 250 ml, tabung reaksi, rak tabung reaksi, piala gelas 100 ml, piala gelas 500 ml, pH meter, pipet volumetrik, dan *vortex*.

Metode

Penelitian ini terdiri dari dua tahap penelitian yaitu tahap preparasi dan analisis. Berikut penjelasan lebih lengkap mengenai tahapan-tahapan yang dilakukan.

Tahap Preparasi

Tahap preparasi meliputi tahap pengadaan sampel biomassa kering *Spirulina platensis* dan proses ekstraksi fikosianin. Metode untuk mendapatkan ekstrak fikosianin dari *Spirulina platensis* untuk penelitian ini merupakan modifikasi dari metode sebelumnya yaitu metode Arlyza (2005). Sebanyak 1500 mg bubuk biomassa kering *Spirulina platensis* terlebih dahulu direndam dalam 50 ml aquades lalu dilarutkan hingga homogen dengan menggunakan *vortex* selama 1 menit. Kemudian dibuat menjadi tiga perlakuan metode ekstraksi yang berbeda, yaitu P1 : Maserasi selama 2 jam dalam Waterbath bergoyang bersuhu 26 °C, yang merupakan modifikasi metode Arlyza (2005) P2 : *Freezing* 24 jam pada suhu -4 °C,

yang merupakan modifikasi metode Fariyah (2014), dan P3 : *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE) selama 15 menit, yang merupakan modifikasi dari metode Robabeh *et al.* (2015). Masing-masing perlakuan diberi tiga pengulangan. Untuk perlakuan dengan *freezing*, setelah dibekukan selanjutnya dilakukan pencairan pada suhu ruang (*thawing*) selama 15 menit. Kemudian setelah itu disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 3000 rpm untuk semua perlakuan. Setelah didapatkan hasil ekstrak fikosianin, dilanjutkan ke analisis kimia.

Tahap Analisis

Analisis Aktivitas Antioksidan (Molyneux 2004)

a. Pembuatan larutan DPPH

DPPH ditimbang sebanyak 4 mg dengan neraca analitik, lalu dilarutkan dengan metanol p.a hingga 25 mL di dalam labu takar.

b. Pembuatan Larutan Blanko

Larutan Standard DPPH 0,4 mM dipipet sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi dan ditera sampai volume 5 mL dengan menggunakan methanol p.a.

c. Pembuatan Larutan Uji

Biomassa kering *Spirulina platensis* ditimbang sebanyak 10 mg lalu dilarutkan dengan 10 ml air suling (menjadi larutan induk 1000 ppm), untuk diekstraksi dengan ketiga metode ekstraksi berbeda. Dibuat deret larutan fikosianin sebanyak 5, 10, 25, 50, dan 500 ppm dari larutan induk. Dipipet dan dimasukkan ke masing-masing deret larutan dalam tabung reaksi yang telah ditera sampai volume 5,0 ml dengan menggunakan methanol p.a. Larutan campuran kemudian dihomogenkan

d. Pembuatan Larutan Vitamin C Sebagai Kontrol Positif

Vitamin C ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan ke dalam 10 mL metanol p.a (menjadi larutan induk 1000 ppm). Dipipet 10, 20, 30, 40, dan 50 µL larutan induk ke dalam tabung reaksi dan ditera dengan methanol p.a sampai volume 5,0 mL untuk mendapatkan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10

ppm. Masing-masing tabung ditambahkan 1 mL larutan DPPH (0,4 mM) dan ditambahkan dengan metanol *p.a* sampai volume 10 mL. Larutan campuran kemudian dihomogenkan.

e. Pengukuran Absorbansi Sampel

Larutan uji, larutan blanko, dan kontrol positif dengan beberapa konsentrasi diinkubasi dalam penangas air pada suhu 37°C selama 30 menit, absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum pada 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis

f. Perhitungan

Persentase inhibisi dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{Hambatan (inhibisi)} = (AB-AS/AB) \times 100\%$$

Keterangan: AB = Absorbansi Blanko; AS = Absorbansi Sampel

Analisis Kadar Biopigmen dan Rendemen Fikosianin (Metode Spektrofotometri)

Analisis biopigmen fikosianin dilakukan dengan mengukur spektrum pigmen fikobiliprotein secara spektrofotometri panjang gelombang 615 nm dan 650 nm. Fikosianin yang sudah diekstraksi diencerkan sesuai dengan masing masing pelarut dan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 615 nm dan 625 nm. Blanko yang digunakan yaitu *aquades*. Konsentrasi fikosianin (PC) dihitung dengan persamaan Bennet dan Bogoard (1973), yaitu:

$$PC = \frac{(OD_{615}) - 0,474(OD_{625})}{5,34}$$

Setelah didapatkan konsentrasi Fikosianin (mg/mL), rendemen hasil ekstrak fikosianin dari beberapa metode ekstraksi dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$Yield = \frac{PC \times V}{DB}$$

Keterangan: PC = Konsentrasi Fikosianin (mg/mL); V = Volume pelarut (mL); DB = Berat biomassa kering (gram).

Uji Kadar Protein Metode Bradford (Bradford, 1976)

Uji Bradford adalah pengujian untuk mengukur konsentrasi protein total secara kolorimetri dalam suatu larutan uji (Bradford 1976). Pengujian protein metode Bradford melibatkan pewarna *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) yang berikatan dengan protein dalam larutan buffer sehingga memberikan warna (kebiruan).

Ekstrak fikosianin setelah melewati proses ekstraksi dan larutan standar sebanyak 0,1 ml direaksikan dengan 5 ml reagen Bradford, lalu divortex. Larutan tersebut akan menghasilkan warna, sehingga secara kolorimetri dapat diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 465 - 595 nm (cahaya tampak). Larutan standar yang digunakan yaitu BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan beberapa konsentrasi yaitu 0, 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisa secara statistik dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan bantuan program SPSS *Statistics* 17.0 untuk mengetahui pengaruh perbedaan metode ekstraksi dalam mendapatkan kadar total dan rendemen terbaik fikosianin dari *Spirulina platensis* dan beberapa respon uji lainnya yaitu kadar protein serta aktivitas antioksidan fikosianin yang dihasilkan pada penelitian ini. Jika hasil yang diperoleh dari uji sidik ragam ANOVA $p < \alpha$ (berpengaruh nyata), maka perlu diuji lanjut nilai tengah perlakuan dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk mengetahui perbedaan pengaruh perlakuan yang berpasang - pasangan. Tingkat kepercayaan atau *significance level* yang digunakan yaitu 95% (taraf $\alpha = 0,05$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Fikosianin

Berdasarkan jumlah yield yang dihasilkan, metode ekstraksi terbaik untuk

mendapatkan fikosianin dari biomassa kering *Spirulina platensis* yaitu metode pembekuan atau freezing, dengan nilai rata-rata yield sebesar 26,53% (Tabel 1).

Tabel 1 Hasil analisis kadar fikosianin dari metode ekstraksi berbeda

Parameter Uji Fikosianin	Metode Ekstraksi		
	Maserasi	UAE	Freezing
Kadar Fikosianin (PC) (mg/ml)	0,42a	0,42a	0,80b

Keterangan: *Huruf yang berbeda menandakan perlakuan menghasilkan nilai yang berbeda nyata menurut uji lanjut Duncan pada $\alpha=0,05$

Menurut Harborne (1987), ekstraksi merupakan proses penarikan suatu komponen zat aktif dari sampel dengan menggunakan pelarut tertentu. Pemilihan metode ekstraksi disesuaikan dengan sifat komponen yang akan diekstrak. Fikosianin bersifat dapat larut dalam air. Setelah dibekukan, lalu di-thawing pada suhu ruang hingga terpisah biomassa dan supernatan. Supernatan lalu dipisahkan menggunakan kertas saring dan diperoleh ekstrak fikosianin berwarna biru pekat.

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam (ANOVA), menunjukkan bahwa dengan metode ekstraksi fikosianin yang berbeda, berpengaruh nyata terhadap kadar fikosianin (PC) maupun yieldnya ($p<0,05$), sehingga diperlukan uji lanjut Duncan. Berdasarkan uji lanjut Duncan, metode freezing berbeda nyata dengan maserasi dan UAE (Ultrasound Assisted Extraction) dalam menghasilkan kadar fikosianin dan yield terbaik. Adapun metode Maserasi tidak berbeda nyata dengan metode UAE, metode UAE berbeda nyata dengan metode freezing dalam menghasilkan kadar fikosianin terbaik.

Hasil perhitungan yield yang dihasilkan dari semua metode ekstraksi berkisar antara 13–26%. Hasil yang didapatkan sebanding dengan perhitungan terhadap konsentrasi fikosianin yaitu, semakin tinggi kadar fikosianin maka yield ekstrak juga akan

semakin tinggi (Tabel 2). Cisneros *et al.* (2004), menyatakan bahwa berdasarkan kemurniannya terdapat 2 jenis fikosianin, yaitu fikosianin food grade ($PC>0,4$ mg/ml) dan fikosianin analitik ($PC>4$). Jika dilihat dari hasil analisis dan perhitungan kadar fikosianin, maka dapat dikatakan bahwa fikosianin yang telah diekstrak dari biomassa kering *Spirulina platensis* yang didapatkan, bersifat food grade.

Tabel 2 Hasil analisis yield fikosianin dari metode ekstraksi berbeda

Parameter Uji Fikosianin	Metode Ekstraksi		
	Maserasi	UAE	Freezing
Yield (%) b/b)	13,90a	14,15a	26,53b

Keterangan: *Huruf yang berbeda menandakan perlakuan menghasilkan nilai yang berbeda nyata menurut uji lanjut Duncan pada $\alpha=0,05$.

Analisis Kadar Protein Fikosianin

Protein merupakan komposisi kimia terbesar pada *Spirulina*, yaitu 50- 70% dari berat keringnya (Richmond 1988). Fikobiliprotein pada umumnya terdiri dari alofikosianin, fikosianin, dan fikoeritrin, dimana semuanya terbentuk oleh subunit protein a dan b. Setiap fikobiliprotein memiliki rantai prostetik tetrapirrol linear yang berbeda isomer (bilin chromophore) pada susunan ikatan gandanya (Chopra dan Bishnoi, 2008).

Kadar protein fikosianin yang diekstrak dengan menggunakan metode freezing memiliki nilai yang paling tinggi dibanding metode lainnya, yaitu sebesar 546,67 ppm (Tabel 3). Hasil analisis kadar protein fikosianin yang diekstrak dengan tiga metode berbeda dapat dilihat pada Tabel 3. Hasil ini diduga karena ekstraksi metode freezing menggunakan suhu rendah (-4°C), sehingga struktur protein tidak banyak mengalami kerusakan. Freezing dilakukan pada suhu rendah, sehingga dapat menjaga warna, dan penampakan, serta meminimalisasi kerusakan akibat panas untuk nutrien yang sensitif terhadap suhu tinggi (Berk 2009).

Tabel 3 Hasil analisis kadar protein fikosianin dari metode ekstraksi berbeda

Rata-Rata Kadar Protein	Metode Ekstraksi		
	Maserasi	UAE	Freezin g
Protein (ppm)	120,00 ^b	284,44 ^a	546,67 ^c

Keterangan: *Huruf yang berbeda menandakan perlakuan menghasilkan nilai yang berbeda nyata menurut uji lanjut Duncan pada $\alpha=0,05$

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam (ANOVA), menunjukkan bahwa metode ekstraksi, berpengaruh nyata terhadap kadar protein fikosianin ($p<0,05$), sehingga diperlukan uji lanjut Duncan. Untuk kadar protein, Berdasarkan uji lanjut Duncan, ketiga metode ekstraksi berbeda nyata. Metode Maserasi berbeda nyata dengan metode UAE, metode UAE berbeda nyata dengan metode freezing, dan metode freezing berbeda nyata dengan metode maserasi dalam menghasilkan kadar protein fikosianin terbaik.

Analisis Aktivitas Antioksidan

Pigmen fikobiliprotein yang ada pada *Spirulina platensis* terdiri dari dua komponen yaitu pigmen fikosianin dan allofikosianin. *Spirulina platensis* menghasilkan pigmen fikosianin yang lebih dominan sehingga digolongkan sebagai mikroalga biru-hijau (Cyanophyta), meskipun memiliki beberapa komponen pewarna yang lain. Pigmen fikobiliprotein mempunyai struktur mirip dengan bilirubin, serta diketahui mempunyai efek antioksidan (meredam beberapa senyawa oksigen reaktif) secara in vivo. Pigmen fikobiliprotein yang terdapat pada *Spirulina platensis* memiliki aktivitas antioksidan dengan meredam radikal bebas oleh 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) (Hirata *et al.* 2000).

Kemampuan aktivitas antioksidan dari *Spirulina* dan hasil ekstraknya telah menarik perhatian para peneliti. Romay *et al.* (2003) dalam penelitiannya yang pernah dilakukan, beberapa kandungan *Spirulina platensis* yang berperan sebagai komponen

antioksidan yaitu fikosianin dan klorofil, sedangkan hasil penelitian Wang *et al.* (2007) kandungan yang berperan adalah flavonoid, β -karoten, vitamin A dan alfa tokoferol. Wang *et al.* (2007) melaporkan bahwa jenis spesies *Spirulina* yang berbeda, perbedaan kondisi lingkungan tempat pertumbuhan *Spirulina*, seperti pH media, cahaya matahari, kandungan oksigen dan nitrogen dapat mempengaruhi kandungan komponen fikosianin dan klorofil yang dihasilkan *Spirulina* tersebut. Colla *et al.* (2007) melaporkan bahwa semakin tinggi kandungan nitrogen yang ditambahkan, akan meningkatkan sel dan berbanding lurus dengan peningkatan sintesis komponen fenol. Peningkatan 0,625 g/L sumber nitrogen pada media pertumbuhan *Spirulina* dapat menyebabkan peningkatan kandungan antioksidan sebanyak 6%.

Vitamin C sebagai kontrol positif memiliki IC₅₀ sebesar 5,48 ppm, untuk fikosianin yang diekstrak dengan metode maserasi, memiliki aktivitas antioksidan sebesar 49,59 ppm, fikosianin yang diekstrak dengan metode freezing sebesar 54,46 ppm, dan fikosianin yang diekstrak dengan metode UAE sebesar 58,88 ppm (tabel 4). Berdasarkan analisis sidik ragam (ANOVA) Metode Ekstraksi berpengaruh nyata terhadap aktivitas antioksidan ekstrak bipigmen biru fikosianin pada taraf signifikansi 0,05 ($p < 0,05$). Maka dilanjutkan uji Duncan. Metode maserasi menghasilkan aktivitas antioksidan tertinggi diantara metode lain dengan nilai IC₅₀ sebesar 49,59 ppm. Berdasarkan hasil uji lanjut Duncan, ketiga metode ekstraksi berbeda nyata.

Tabel 4 Hasil analisis aktivitas antioksidan fikosianin

Metode Ekstraksi	IC50 (ppm)
Freezing	54,46 ^b
Maserasi	49,59 ^a
UAE	58,88 ^c

*Huruf yang berbeda menandakan perlakuan menghasilkan nilai yang berbeda nyata menurut uji lanjut Duncan pada $\alpha=0,05$.

Aktivitas antioksidan yang diklasifikasikan Ukieyanna (2012), yaitu aktivitas antioksidan sangat kuat dengan nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm, kuat dengan nilai IC₅₀ antara 50-100 ppm, dan sedang dengan nilai IC₅₀ berkisar antara 150-200 ppm. Berdasarkan klasifikasi aktivitas antioksidan tersebut, fikosianin yang didapatkan dari semua ekstrak dapat dinyatakan sebagai antioksidan kuat karena mempunyai nilai IC₅₀ antara 50-100 ppm.

Potensi antioksidan untuk menangkap radikal bebas dapat ditentukan dengan metode peredaman radikal bebas DPPH. DPPH adalah suatu radikal yang stabil pada larutan metanol serta mampu menerima elektron atau radikal hidrogen. Metode ini merupakan metode pengukuran aktivitas antioksidan yang sangat sederhana, cepat, peka, serta hanya memerlukan sedikit sampel dan tidak membutuhkan banyak pelarut seperti halnya uji lainnya.

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 ada pada pigmen fikobiliprotein, dapat diperoleh nilai IC₅₀ yaitu konsentrasi tertentu yang dapat memberikan 50% efek penghambatan radikal bebas. Hasil uji aktivitas antioksidan dapat dilihat pada table 4.

Hasil tabulasi data kadar dan yield fikosianin, kadar protein, dan nilai aktivitas antioksidan dapat dilihat pada Tabel 5. Kadar fikosianin, yield dan protein fikosianin tertinggi didapatkan dari perlakuan metode ekstraksi dengan freezing. Sementara nilai aktivitas antioksidan terbaik diperoleh dari fikosianin yang diekstrak dengan metode maserasi. Berdasarkan analisis sidik ragam (ANOVA), metode ekstraksi berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap yield, kadar fikosianin dan kadar protein ekstrak biopigmen biru fikosianin. Metode ekstraksi terbaik yaitu metode pembekuan atau Freezing berdasarkan jumlah yield dan kadar fikosianin yang dihasilkan. Berdasarkan uji lanjut Duncan, metode freezing berbeda nyata dengan maserasi dan UAE (Ultrasound Assisted Extraction) dalam menghasilkan yield terbaik.

Tabel 5 Hasil analisis parameter uji fikosianin dari metode ekstraksi berbeda

Parameter Uji	Metode Ekstraksi		
	Maserasi	UAE	Freezing
Kadar Fikosianin (mg/ml)	0,42 ^a	0,42 ^a	0,8 ^b
Yield Fikosianin (%)	13,9 ^a	14,15 ^a	26,53 ^b
Kadar Protein (ppm)	120 ^b	284,44 ^a	546,67 ^c
Aktivitas Antioksidan (ppm)	49,59 ^a	58,88 ^c	54,46 ^b

*Huruf yang berbeda menandakan perlakuan menghasilkan nilai yang berbeda nyata menurut uji lanjut Duncan pada $\alpha=0,05$.

Berdasarkan uji lanjut Duncan, metode freezing berbeda nyata dengan maserasi dan UAE (Ultrasound Assisted Extraction) dalam menghasilkan kadar fikosianin terbaik. Untuk kadar protein, Berdasarkan uji lanjut Duncan, ketiga metode ekstraksi berbeda nyata. Metode maserasi menghasilkan aktivitas antioksidan terbaik sebesar 49,59 ppm. Berdasarkan uji lanjut Duncan, ketiga metode ekstraksi berbeda nyata.

Metode ekstraksi dengan metode freezing memberikan hasil terbaik jika dilihat dari yield Fikosianin dan kadar protein fikosianin

dibandingkan dengan dua metode lainnya, hal ini sesuai dengan penelitian Antelo et al. (2010) yang menyatakan bahwa fikosianin akan lebih stabil apabila diisolasi pada kondisi suhu rendah karena chromoprotein (polipeptida α dan β) sensitif terhadap suhu. Suhu inkubasi yang digunakan pada ekstraksi pigmen fikosianin adalah -4°C dan 25-27°C. Kadar pigmen fikosianin tertinggi berada pada suhu inkubasi -4°C untuk ekstraksi pigmen kasar fikosianin lebih optimal menggunakan suhu rendah dibandingkan dengan suhu ruang.

Kadar protein fikosianin yang diekstrak dengan menggunakan metode *freezing* memiliki nilai yang paling tinggi dibanding metode lainnya. Hasil yang tinggi ini diduga karena ekstraksi metode *freezing* menggunakan suhu rendah (-4°C), sehingga struktur protein tidak banyak mengalami kerusakan. *Freezeing* dilakukan pada suhu rendah, sehingga dapat menjaga warna, dan penampakan, serta meminimalisasi kerusakan akibat panas untuk nutrisi yang sensitif terhadap suhu tinggi (Berk 2009).

Metode ekstraksi dengan maserasi memberikan hasil terbaik jika dilihat dari aktivitas antioksidan yang dihasilkan ekstraknya. Hal ini diduga karena adanya komponen dari kelompok lain diluar fikosianin yang ikut terekstrak dan memiliki kemampuan untuk mereduksi radikal bebas DPPH sehingga mampu menurunkan nilai IC₅₀. Romay *et al.* (2003) dalam penelitiannya yang pernah dilakukan, beberapa kandungan *Spirulina platensis* yang berperan sebagai antioksidan adalah fikosianin dan klorofil, sedangkan hasil penelitian Wang *et al.* (2007) kandungan yang berperan adalah flavonoid, β-karoten, vitamin A dan α-tokoferol.

KESIMPULAN DAN IMPLIKASI

Berdasarkan nilai yield tertinggi dan kandungan fikosianin, *freezing* merupakan metode ekstraksi terbaik dengan kandungan fikosianin tertinggi yaitu sebesar 26,53%. Berdasarkan uji lanjut *Duncan*, metode *freezing* berbeda nyata dengan maserasi dan UAE (*Ultrasound Assisted Extraction*) dalam menghasilkan kadar fikosianin dan yield terbaik.

Sementara itu, nilai aktivitas antioksidan terbaik, metode ekstraksi dengan maserasi memberikan hasil terbaik jika dilihat dari aktivitas antioksidannya dengan nilai IC₅₀ sebesar 49,59 ppm. Berdasarkan data tersebut pula fikosianin yang dihasilkan dari ketiga metode ekstraksi termasuk antioksidan kuat.

DAFTAR PUSTAKA

- Antelo FS, A Anschau, JAV Costa, and SJ Kalil. 2010. *Extraction and Purification of C-phycocyanin from Spirulina platensis in Conventional and Integrated Aqueous Two-phase Systems. J. Braz. Chem. Soc.* 2010, 21, 921–926.
- Arlyza IS. 2005. Fikosianin dari mikroalga bernilai ekonomis tinggi sebagai produksi industri. *Oseana* XXX (3): 27-36.
- Arlyza IS. 2005. Isolasi pigmen biru phycocyanin dari mikroalga *Spirulina platensis*. Oceanologi dan Limnologi di Indonesia. *Pusat Penelitian Oceanografi-LIPI, No. 38*: 79-92.
- Becker EW. 1994. *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, England.
- Bennet A and L Bogorad. 1973. *Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. The Journal of Cell Biology* 58: 419-435.
- Berk Z. 2009. *Food Process Engineering and Technology*. Elsevier Inc, USA.
- Boussiba S and AE Richmond. 1979. *Isolation and characterization of Phycocyanins from the blue-green algae Spirulina platensis. Arch. Microbiol.* 190: 155-159.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganisms quantities of protein in utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72:248-254.
- Cahyadi, W. 2006. Analisis dan aspek kesehatan bahan tambahan pangan. Bumi Aksara, Jakarta.
- Carra and Heocha. 1976. *The photosynthetic pigments In: MARGALITH P.Z. (ed.) Pigment Microbiology*, Cambridge, England.
- Colla LM, CO Reinehr, CJ Reichert, and AV Costa. 2007. *Production of biomass and nutraceutical compounds by Spirulina platensis under different temperature and nitrogen regimes. Bioreso. Technol.* 98: 1489–1493.
- Djamil R dan T Anelia. 2009. Penapisan fitokimia, uji BSLT, dan uji antioksidan ekstrak metanol beberapa spesies

- Papilionaceae. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 7(2):65-71.
- Doke JM. 2005. *An improved and efficient method for the extraction of phycocyanin from Spirulina sp.* *Journal of Food Engineering*. Vol. 1. Issue 5. Article 2.
- Eriksen NT. 2008. *Production of phycocyanin-a pigment with application in biology, biotechnology, food and medicine (abstract)*. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80 (1): 1-14.
- Fu L, Tao Xu B, Rong Xu X, You Gan R, Zhang Y, Qin Xia E, Bin Li H. 2011. *Antioxidant capacities and total phenolic content of 62 fruits.* *Food Chemistry* 129: 345-350.
- Gonzalez R, A Gonzalez, D Ramirez, C Romy, S Rodriguez, O Ancheta, N Merino. 2003. *Protective effects of phycocyanin on galactosamine-induced hepatitis in rats.* *Biotechnology Aplicada* 20: 107-110.
- Harborne JB. 1986. *Metode fitokimia penuntun cara modern menganalisis tumbuhan* (2nd ed.). (Terj.) Padmawinata K, Soediro I. ITB, Bandung.
- Henrikson R. 2009. *Earth Food Spirulina*. Ed Ke-6. Ronore Interprise, Hawaii.
- Hirata T, M Tanaka, M Ooike, T Tsunomura, and M Sakaguchi. 2000. *Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from Spirulina platensis.* *Journal of Applied Phycology*. 12:435-9.
- Kabinawa INK, H Nagase, K Hirata, and K Miyamoto. 1996. *Growing the Cyanobacterium Spirulina platensis in an artificial wastewater medium.* *Annual Report of IC Biotech*. International Center for Biotechnology, Osaka University, Osaka, Japan.
- Mishra SK, A Shrivastav, and S Mishra. 2008. *Effect of Preservatives for Food Grade C-PC from Spirulina platensis.* *Process Biochemistry* 43: 339-345.
- Mohammad J. 2007. *Produksi dan karakterisasi biopigmen fikosianin dari Spirulina fusiformis sera aplikasinya sebagai pewarna minuman.* Skripsi. Departemen Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Kelautan (FPIK). Institut Pertanian Bogor (IPB), Bogor.
- Molyneux P. 2004. *The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity.* *Journal of Science Technology* 26: 211-219.
- Pirenantyo P dan L Limantara. 2008. *Pigmen senyawa Spirulina sebagai senyawa anti kanker.* *Indonesia Journal of Cancer* (4): 155 – 163.
- Richmond A. 1988. *Spirulina*. Di dalam Borowitzka MA dan Borowitzka LJ, editor. *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Silveira ST, JFM Burkert, JAV Costa, CAV Burkert, SJ Kalil. 2007. *Optimization of phycocyanin extraction from Spirulina platensis using factorial design.* *Bioresources Technology* 98: 1629-1634.
- Spolaore P, C Joannis-Cassan, E Duran, and A Isambert. 2006. *Commercial application of microalgae.* *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101(2): 87-96.
- Ukieyann E, Suryani, dan AP Roswiem. 2012. *Aktivitas Antioksidan kadar fenolik dan flavonoid total tumbuhan suruhan.* Skripsi. Departemen Biokimia Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Vinatoru M. 2001. *An Overview Of The Ultrasonically Assisted Extraction Of Bioactive Principles From Herbs.* *Ultrason Sonochem Journal*. 8:303-313.
- Wang B, Z Yu, and LS Hwang. 1995. *Quantitative Analysis of Chlorophylls and their derivatives by thin layer chromatography.* *J. Chinese Agricultural Chemical Society*, 33(5): 550-560.
- WEIL A. 2000. *Green food Spirulina, Blue-green algae and Chlorella.* Diunduh dari <http://www.wellness.com>.
- Winarsih H. 2007. *Antioksidan alami dan radikal bebas.* Edisi 5. Kanisius, Yogyakarta.
- Yudiati E, S Sedjati, Sunarsih, R Agustian. 2011. *Aktivitas antioksidan dan toksisitas ekstrak metanol dan pigmen kasar Spirulina sp.* *Ilmu Kelautan* 16 (4): 187 – 192.