

# Optimalisasi Produksi Fikosianin pada Sianobakteria Laut BTM 11 dan Uji Aktivitas Antioksidannya (Optimization of Phycocyanin Production of Marine Cyanobacteria BTM 11 and Its Antioxidant Properties Test)

BASO DIDIK HIKMAWAN<sup>1</sup>, SWASTIKA PRAHARYAWAN<sup>2</sup>, KINTOKO<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman, Jl. Muara Muntai, Gn. Kelua, Samarinda Ulu, Samarinda, Kalimantan Timur, 75242, Indonesia

<sup>2</sup>Pusat Riset Mikrobiologi Terapan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Jl. Raya Jakarta-Bogor KM 46, Cibinong, Bogor, Jawa Barat, 16911, Indonesia

<sup>3</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Jl. Prof. Dr. Soepomo, S.H., Janturan, Warungboto, Umbulharjo, Yogyakarta, 55164, Indonesia

Diterima 17 Februari 2022, Disetujui 10 Maret 2022

**Abstrak:** Pigmen fikosianin (PC) dari sianobakteria telah banyak menunjukkan efek farmasetikal termasuk salah satunya efek antioksidan. Biosintesis PC oleh sianobakteria dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya ketersediaan nitrogen dan intensitas cahaya yang dipaparkan selama kultivasi. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh kadar nitrogen dan intensitas cahaya optimum untuk biosintesis PC serta mengetahui aktivitas antioksidan dari PC yang diisolasi dari sianobakteria laut BTM 11. Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorium dengan mengamati respon PC dari variasi pemberian natrium nitrat ( $\text{NaNO}_3$ ) sebagai sumber nitrogen dalam media serta intensitas cahaya yang berbeda. PC dari hasil nitrogen dan intensitas cahaya yang optimum diuji aktivitas antioksidannya dengan metode penangkapan radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Data hasil perlakuan variasi  $\text{NaNO}_3$  dan intensitas cahaya dianalisis dengan *one-way* ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Duncan apabila  $p < 0,05$ . Hasil penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan signifikan respon kadar PC dari tiap variasi konsentrasi  $\text{NaNO}_3$ . Kadar PC tertinggi didapat dari media dengan konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  525,0 mg dan intensitas cahaya optimum 4.500 lux. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan PC memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai  $\text{IC}_{50}$  sebesar 91,89  $\mu\text{g/mL}$  sedangkan  $\text{IC}_{50}$  dari asam askorbat sebesar 2,39  $\mu\text{g/mL}$ .

**Kata kunci:** Antioksidan, DPPH, fikosianin, intensitas cahaya, konsentrasi nitrogen, sianobakteria laut BTM 11

**Abstract:** Phycocyanin (PC)-producing cyanobacteria have many pharmaceutical applications, the main one being their antioxidant properties. The biosynthesis of PC-producing cyanobacteria is affected by many factors, such as nitrogen availability and light intensity during cultivation. This study aimed to determine the optimum concentration of nitrogen and light intensity during the cultivation of PC biosynthesis in marine cyanobacteria BTM 11 and to identify its antioxidant properties. This study used an experimental laboratory method, and the PC level was determined through the variation of sodium nitrate ( $\text{NaNO}_3$ ) as a source of nitrogen dissolved in media and using different light intensities. The optimum nitrogen and light intensity values of PC were determined by its antioxidant activity using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical capture method. Data were analyzed using one-way ANOVA and post-hoc Duncan's test to determine whether  $p < 0.05$ . The results showed that there was a significant difference in the PC level cultivated with variation in  $\text{NaNO}_3$  concentrations. The highest PC level was observed in media containing 525 mg  $\text{NaNO}_3$  and an optimum light intensity of 4500 lux. The result of the antioxidant activity assay showed that the BTM11's PC's antioxidant activity had its  $\text{IC}_{50}$  at 91.89  $\mu\text{g/mL}$  and the  $\text{IC}_{50}$  of ascorbic acid was 2.39  $\mu\text{g/mL}$ .

**Keywords:** Antioxidant, DPPH, light intensity, marine cyanobacteria BTM 11, nitrogen concentration, phycocyanin

## PENDAHULUAN

RADIKAL bebas pada konsentrasi rendah sampai sedang mempunyai dampak menguntungkan, karena molekul ini terlibat dalam berbagai sistem fisiologis. Radikal bebas terlibat dalam proses imunologi, sinyal transduksi seluler, respon mitogen, dan regulasi reduksi-oksidasi (redoks). Namun pada konsentrasi tinggi, radikal bebas dapat menyebabkan adanya stress oksidatif dan nitrosatif dan berakibat pada kerusakan biomolekul seperti lipid, protein, dan asam deoksibonukleat (DNA)<sup>(1)</sup>.

Antioksidan adalah senyawa-senyawa yang berperan di dalam sel dalam bentuk pasangan redoks (*redox couple*) untuk mengurangi konsentrasi *reactive oxidative species* (ROS) dan mempertahankan sel pada kondisi redoks yang rendah. Sel mampu mengekspresikan beberapa faktor endogen yang dapat bertindak sebagai antioksidan, meliputi glutathione peroksidase (GPx), superoksida dismutase (SOD), dan katalase (CAT). Pada suatu kondisi, level antioksidan endogen akan berkurang dan guna menurunkan stres oksidatif secara sistematis di dalam sel, diperlukan tambahan antioksidan eksogen. Antioksidan jenis ini dapat diperoleh melalui diet, mencerna (*ingestion*), maupun memasukkan suatu senyawa antioksidan yang telah dimurnikan<sup>(2,3)</sup>.

Dewasa ini, produk alami dari laut telah banyak dikembangkan dan digunakan sebagai pengobatan. Produk alami dari laut juga merupakan salah satu sumber terpenting karena mengandung senyawa-senyawa organik yang bermanfaat dan belum dapat teridentifikasi seluruhnya. Namun senyawa yang belum diketahui ini berpotensi dapat dimanfaatkan sebagai pengobatan penyakit serius<sup>(4)</sup>. Salah satu sumber produk alami laut adalah sianobakteria BTM 11.

Sianobakteria merupakan kelompok prokariot fotosintetik yang sudah ada sejak 3,5 milyar tahun yang lalu. Mikroorganisme ini dapat hidup di beberapa kondisi lingkungan seperti danau, sungai, dan lokasi panas. Sianobakteria diakui sebagai salah satu sumber bioteknologi yang digunakan sebagai bahan baku farmasi, makanan, klinis, dan industri pembangkit energi<sup>(5)</sup>.

Sianobakteria BTM-11 (*Jaaginema sp.*) merupakan filamentus sianobakteria dengan sel berbentuk silindris. Sianobakteria BTM-11 memiliki potensi sebagai penghasil pigmen biru yaitu fikosianin, karena kandungannya di dalam sel cukup tinggi (40% per berat kering biomassa). Secara ekonomi, nilai komersial pigmen C-fikosianin yang termasuk ke dalam golongan fikobiliprotein memiliki nilai yang tinggi mengingat harganya yang mahal, untuk *food grade*

fikosianin yaitu US\$ 0,13 per miligram (mg) dan untuk fikosianin analitis (*analytical grade*) berkisar US\$ 15 per mg. Harga tersebut bisa sewaktu-waktu naik, karena tergantung pada tingkat kemurniannya. Maka, usaha untuk mendapatkan pigmen fikosianin dengan kemurnian yang tinggi perlu dilakukan<sup>(6,7)</sup>.

Produksi, akumulasi, dan kemurnian fikobiliprotein, dalam hal ini fikosianin, diregulasi oleh beberapa faktor. Contoh faktor yang mempengaruhi meliputi strain yang digunakan, intensitas cahaya, panjang gelombang yang dipaparkan, suhu, dan komposisi media<sup>(5)</sup>. Penelitian oleh Nur *et al.*<sup>(8)</sup> menyatakan bahwa produksi C-fikosianin dari sianobakteria jenis *Arthrospira platensis* dipengaruhi oleh faktor nutrisi dan lingkungan seperti salinitas, paparan radiasi, ketersediaan nitrogen, dan tata cara kultivasi.

Salah satu produk alami dari laut adalah fikosianin. Fikosianin merupakan senyawa aktif biologis larut air yang diisolasi dan dipurifikasi dari beragam jenis rumput laut atau alga eukariotik, dan sianobakteria. Fikosianin termasuk dalam famili fikobiliprotein yang merupakan salah satu komponen dari fikobilisom dan memiliki absorpsi maksimum sekitar 610-620 nm atau 610-625 nm. Senyawa ini berperan dalam menyerap energi cahaya pada spektrum tertentu – pada umumnya spektrum cahaya kuning sampai merah – dan menjalankan proses fotosintesis<sup>(4,9,10)</sup>. Paparan sinar UV (313 nm) dan cahaya monokromatik tampak (600 nm) selama satu jam akan menyebabkan fikosianin kehilangan pigmen warnanya sebesar 9% dan 15% (pH 5), 12% dan 2% (pH 7)<sup>(7)</sup>.

Faktor yang mempengaruhi produksi fikosianin adalah sumber nitrogen dan intensitas cahaya. Nitrogen berperan sebagai makronutrien yang diperlukan untuk pertumbuhan sianobakteria, pembentukan klorofil, dan menginduksi pembentukan fikosianin. Namun jumlahnya terbilang terbatas. Melalui penambahan *dissolved inorganic nitrogen* (DIN) dan intensitas cahaya yang tepat terbukti berpengaruh besar terhadap produksi metabolit dan biomassa, sehingga pertumbuhan dan konsentrasi produk yang dihasilkan dapat maksimal<sup>(10,11)</sup>.

Sianobakteria dapat dikultivasi dalam media yang mengandung garam anorganik. Nitrogen merupakan nutrient yang penting dan digunakan oleh hampir seluruh *algae* yang berfungsi sebagai regulator produksi biomassa, akumulasi lipid dan karotenoid. Khusus pada sianobakteria, nitrogen berperan penting dalam menjaga viabilitas sel lalu meregulasi sintesis fikobiliprotein, seperti fikosianin. Fikobiliprotein ini kemudian dijadikan sebagai tempat penyimpanan sumber nitrogen, yang disebut fikobilisom<sup>(5)</sup>. Pemberian suplai nitrogen juga dapat digu-

nakan untuk mempertahankan siklus hidupnya melalui proses asimilasi amonium<sup>(12)</sup>. Namun demikian, paparan intensitas cahaya harus optimum. Apabila intensitas cahaya terlalu rendah, sianobakteria akan mencari metode alternatif untuk mendapatkan cahaya dan energi yang diperlukan untuk pertumbuhan. Intensitas cahaya yang terlalu tinggi akan menyebabkan terjadinya fotoinhibisi, seperti yang terjadi pada *Spirulina platensis* yang tidak dapat tumbuh pada intensitas cahaya lebih dari 4000 lux<sup>(13)</sup>. Apabila aliran energi melebihi kapasitas suatu organisme, aktivitas seluler dan produksi ROS meningkat sehingga kondisi dalam sel menjadi lebih toksik dan menyebabkan kematian sel. Namun ada beberapa jenis sianobakteria yang kurang sensitive terhadap kondisi eksogen yang ekstrim ini<sup>(10, 11, 14)</sup>.

Penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi nitrogen optimum dalam media kultur sebagai salah satu nutrisi yang sangat berperan dalam pertumbuhan sianobakteria dalam menghasilkan fikosianin. Selain itu, untuk mengetahui pengaruh intensitas cahaya yang optimal untuk pertumbuhan sianobakteria BTM 11. Perlu dilakukan uji aktivitas antioksidan dari fikosianin yang diperoleh dari sianobakteria BTM 11 hasil optimasi konsentrasi nitrogen serta intensitas cahaya untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari fikosianin yang dihasilkan.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Sianobakteria BTM 11 (koleksi kultur Laboratorium Bioenergi dan Bioproses, Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia), NaNO<sub>3</sub> p.a (Merck), DPPH (Sigma-Aldrich), asam askorbat p.a (Sigma-Aldrich) sebagai standar, metanol p.a (Merck).

**Alat.** Spektrofotometer UV-VIS (Pharmaspec UV-1700 Shimadzu), *centrifuge* (Hitachi Himac CT 6EL), *micro ultracentrifuge* (Hitachi Himac CS 150NX), neraca analitik (Ohaus BT 2245), pH meter (Eutech Instrumen pH 700), autoklaf (Tomy ES-215), mikroskop fluoresen (Olympus BX 53) yang dilengkapi dengan kamera (optik).

**METODE. Kondisi Kultur dan Kultivasi.** Sianobakteria BTM 11 dikultivasi dalam 500 mL menggunakan media SWBT (Tabel 1) dengan pH inisial 7,0. Suhu ruang kultivasi 30±2 °C dengan aerasi terus menerus selama kultivasi. Intensitas cahaya untuk pengamatan pengaruh NaNO<sub>3</sub> terhadap biosintesis pigmen fikosianin adalah 1500 lux, sedangkan konsentrasi NaNO<sub>3</sub> dalam media SWBT untuk pengamatan pengaruh perbedaan intensitas cahaya terhadap biosintesis fikosianin menggunakan

konsentrasi NaNO<sub>3</sub> optimum dari hasil studi pengaruh konsentrasi NaNO<sub>3</sub> terhadap biosintesis fikosianin oleh sianobakteria. Produksi fikosianin menggunakan hasil yang optimal dari kedua perlakuan baik pengamatan pengaruh konsentrasi NaNO<sub>3</sub> dalam media SWBT maupun pengaruh perbedaan intensitas cahaya. Pemanenan dilakukan setelah kultur berumur 7 hari. *Optical density* (OD) dari bibit sianobakteria BTM 11 yang akan ditanam diukur terlebih dahulu dengan metode turbidimetri dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 680 nm. Sebanyak 50 mL bibit sianobakteria dengan OD 1 ditanam pada tiap media perlakuan.

### Pengaruh Konsentrasi Nano<sub>3</sub> terhadap Tabel 1 Komposisi media SWBT dalam 500 mL.

Bahan dan Sampel	Jumlah
NaNO <sub>3</sub>	Sesuai perlakuan
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5 mg
Fe Ammonium Sitrat	0,75 mg
Na EDTA	0,75 mg
Asam Sitrat	27,0 mg
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	2,50 mg
Air Laut	ad 450 mL
Kultur	50 mL

**Produksi Fikosianin.** Variasi konsentrasi NaNO<sub>3</sub> yang digunakan dalam media SWBT untuk mempelajari pengaruh perbedaan konsentrasi NaNO<sub>3</sub> terhadap respon fikosianin oleh sianobakteria laut BTM 11 adalah 131,25 mg; 262,5 mg; 393,75 mg; 525 mg; dan 656,25 mg, dibuat tiga kali replikasi.

**Pengaruh Cahaya terhadap Produksi Fikosianin.** Variasi intensitas cahaya yang digunakan dibuat dengan variasi intensitas cahaya, yaitu 1500, 2500, 3500, 4500, dan 5500 lux; serta cahaya luar ruangan. Respon yang diamati adalah kadar fikosianin yang dihasilkan oleh sianobakteria laut BTM 11 setelah kultivasi selama 7 hari. Dibuat tiga kali replikasi.

**Ekstraksi Fikosianin.** Pemanenan biomassa dilakukan dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Endapan yang diperoleh merupakan *wet biomass*. Fikosianin diekstrak dengan metode *freezing and thawing*. Biomassa hasil panen dari tiap perlakuan dimasukkan dalam buffer fosfat 0,1 M pH 7,0. Kemudian dibekukan pada suhu -20°C, setelah itu dicairkan pada suhu 4°C selama 24 jam secara berulang hingga diperoleh warna biru pada buffer fosfat. Larutan yang diperoleh disentrifugasi pada 6000 rpm selama 10 menit, untuk menghilangkan *cell debris*. Supernatan yang didapatkan dipisahkan dari endapan. Supernatan tersebut merupakan ekstrak pigmen fikosianin (*crude extract*)<sup>(15, 16)</sup>. Prosedur ini dilakukan untuk setiap media perlakuan.

**Perhitungan Kadar Fikosianin dalam Crude Extract.** Perhitungan kadar pigmen fikosianin dilakukan dengan mengukur serapan supernatannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 620 dan 650 nm. Penetapan kadar dihitung dengan menggunakan rumus<sup>(17)</sup>:

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

Persamaan ini ditetapkan menggunakan persamaan simultan oleh Bennett dan Bogobad (1973)<sup>(18)</sup> dan konstanta persamaan oleh Bryant *et al.*, (1979)<sup>(19)</sup>.

**Pemurnian Fikosianin.** Ekstrak kasar (*crude extract*) fikosianin (fikobiliprotein) hasil ekstraksi dari sianobakteria BTM 11 yang dikultivasi di media dengan konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  dan cahaya yang optimum dimurnikan dengan teknik presipitasi amonium sulfat yang dikombinasikan dengan pemberian karbon aktif 1% dan kitosan dengan konsentrasi 0,01 g/L. *Crude extract* diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 15 menit. Setelah 15 menit, larutan disentrifuge dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit<sup>(20)</sup>. Supernatan diambil dan dipresipitasi dengan amonium sulfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Supernatan dipresipitasi dengan 20% w/v dan 50% w/v  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pada suhu 4 °C dengan pengadukan secara terus menerus. Hasil presipitasi diendapkan dengan sentrifugasi dengan kecepatan 27.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C<sup>(15)</sup>. Presipitasi dilakukan dengan cara memasukkan serbuk  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  secara perlahan ke dalam larutan ekstrak fikobiliprotein yang sebelumnya telah diberi perlakuan kitosan-karbon aktif hingga mencapai konsentrasi 20% w/v saturasi sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 1 jam pada suhu 4 °C. Larutan kemudian didiamkan pada suhu 4 °C selama sehari semalam. Endapan dari hasil presipitasi pada saturasi 20% w/v dibuang<sup>(16)</sup>. Supernatan ditambahkan serbuk  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  hingga mencapai konsentrasi 50% w/v saturasi sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 1 jam pada suhu 4 °C. Endapan dikeringkan (pigmen fikosianin) sedangkan supernatan (bening) dibuang. Pigmen fikosianin kering dilarutkan kembali dalam bufer fosfat 0,1 M pH 7,0, kemudian diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kemurnian fikosianin diukur berdasarkan rasio antara absorbansi fikosianin pada panjang gelombang 620 nm dan 280 nm<sup>(22)</sup>.

**Uji Aktivitas Antioksidan.** Uji Kualitatif: Uji kualitatif antioksidan dilakukan dengan cara melarutkan sejumlah fikosianin kemudian ditambah larutan DPPH 0,15 mM dengan perbandingan volume yang sama (1:1). Larutan DPPH yang digunakan

adalah larutan DPPH 0,15 mM dalam metanol p.a. Pembuatan larutan blangko (*blank solution*) dibuat dengan memipet 1,0 mL dari masing-masing seri larutan (baik pada sampel maupun kontrol positif) kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 1,0 mL metanol p.a. Kontrol negatif dibuat dengan mencampur 1,0 mL larutan DPPH 0,15 mM dengan 1,0 mL metanol p.a. Pembuatan larutan uji pigmen fikosianin kering yang telah dimurnikan dengan kitosan-karbon aktif serta presipitasi amonium sulfat dilarutkan dalam metanol p.a dengan konsentrasi konsentrasi sampel 5, 10, 25, 50, 100, 125, dan 150  $\mu\text{g/mL}$ . Larutan vitamin C sebagai kontrol positif: Konsentrasi larutan vitamin C dalam metanol yang digunakan berturut-turut 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; dan 4  $\mu\text{g/mL}$ .

Penentuan *operating time* dilakukan dengan membuat larutan uji dan kontrol positif dengan konsentrasi berturut-turut 50  $\mu\text{g/mL}$  dan 2,5  $\mu\text{g/mL}$  dipipet sebanyak 1,0 mL dihomogenkan dengan 1,0 mL larutan DPPH 0,15 mM, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Untuk penentuan panjang gelombang maksimal ( $\lambda_{\text{maks}}$ ): Larutan uji diamati absorbansinya pada panjang gelombang 400-800 nm. Absorbansi dari larutan kontrol negatif juga diamati absorbansinya pada panjang gelombang 400-600 nm. Pengukuran absorbansi larutan dilakukan pada masing-masing 1,0 mL seri konsentrasi larutan uji dan 1,0 mL seri konsentrasi kontrol positif digojok dengan 1,0 mL larutan DPPH 0,15 mM, campuran larutan kemudian didiamkan di tempat gelap selama *operating time* yang telah diperoleh. Serapan larutan uji diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimal ( $\lambda_{\text{maks}}$ ) yang diperoleh dari pengukuran panjang gelombang maksimal untuk kontrol negatif. Blangko yang digunakan adalah metanol p.a.

**Analisis Data.** Data dianalisis menggunakan uji *one-way analysis of variance* (ANOVA) dengan aplikasi R Studio. Uji dilanjutkan dengan *post-hoc Duncan* apabila perlakuan berpengaruh terhadap respon ( $p < 0,05$ ). Histogram dibuat dengan aplikasi Microsoft Excel 2019.

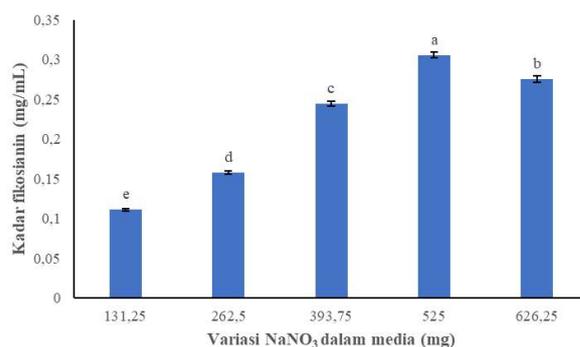
## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Pengaruh Konsentrasi Nitrogen ( $\text{NaNO}_3$ ) terhadap Produksi Fikosianin oleh Sianobakteria Laut BTM 11.** Hasil perhitungan kadar pigmen fikosianin yang diperoleh selama pengamatan dapat dilihat pada Gambar 1 yang menunjukkan keadaan optimum untuk sianobakteria BTM 11 dalam menghasilkan fikosianin. Kadar fikosianin tertinggi diperoleh dari media SWBT dengan penambahan

NaNO<sub>3</sub> sebanyak 525,0 mg. Pada media dengan penambahan NaNO<sub>3</sub> sebanyak 626,25 mg diperoleh kadar fikosianin yang lebih rendah jika dibandingkan dengan kadar fikosianin yang dihasilkan dari media dengan NaNO<sub>3</sub> 525,0. Hal ini menggambarkan konsentrasi optimum kadar NaNO<sub>3</sub> yang ditambahkan ke media pertumbuhan untuk sianobakteria BTM 11 adalah 525,0 mg. Hasil uji statistik menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada masing-masing kadar fikosianin hasil isolasi dari setiap konsentrasi media yang ditambahkan ke dalam media kultivasi.

Pada penelitian ini, kadar fikosianin optimum didapatkan dari media dengan NaNO<sub>3</sub> sebanyak 525,0 mg. Hasil ini menunjukkan bahwa pada kadar tersebut kapasitas sianobakteria BTM 11 dalam mencadangkan nitrogen dalam bentuk fikosianin mencapai kondisi optimum, sehingga pada saat konsentrasi NaNO<sub>3</sub> dinaikkan menjadi 626,25 mg dalam media SWBT, kadar fikosianin yang diproduksi oleh sianobakteria BTM 11 menjadi lebih rendah. Hal ini terjadi karena pada kadar yang terlalu tinggi, kapasitas enzim *nitrate reductase* dan *nitrite reductase* tidak memadai untuk mengubah nitrat dan nitrit menjadi amonia yang terlibat dalam sintesis protein dalam sel, sehingga dengan tingginya kadar nitrat dalam lingkungan sianobakteria dapat berefek toksik dan mempengaruhi produktivitas sianobakteria<sup>(23)</sup>.

Nitrat menjadi bentuk nitrogen yang tersedia bagi alam dan sering dimanfaatkan oleh sianobakteria. Asimilasi nitrat yang terjadi di dalam sianobakteria meliputi tiga proses: 1) Nitrat dialirkan ke sitoplasma



**Gambar 1.** Histogram hubungan kadar fikosianin versus konsentrasi NaNO<sub>3</sub> dalam media. Perlakuan yang memiliki anotasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan.

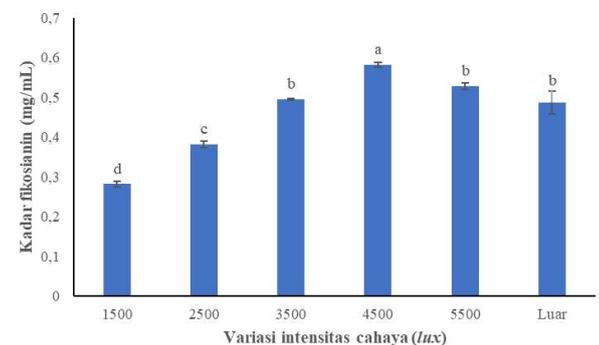
melalui suatu transporter spesifik, 2) Ion nitrat direduksi ke bentuk ion amonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) dengan memanfaatkan dua enzim yaitu *nitrate reductase* (NR) dan *nitrite reductase* (NiR), 3) Ion amonium bergabung ke senyawa karbon yang membentuk seperti  $\alpha$ -amino group L-glutamat pada enzim glutamin sintetase<sup>(23)</sup>.

Penelitian Kaewdam *et al.*<sup>(24)</sup> menyatakan bahwa nitrogen merupakan salah satu faktor penting untuk pertumbuhan sel dan produktivitas pigmentasi.

Konsentrasi fikosianin tertinggi (2,258 mg/mL) yang dihasilkan oleh *Spirulina plantesis* terdapat pada NaNO<sub>3</sub> konsentrasi 3,5 g/L. Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa total protein dan nitrogen tertinggi dalam *Spirulina plantesis* diperoleh pada perlakuan 100 g NaNO<sub>3</sub> masing-masing sebesar 44,30% dan 7,09<sup>(25)</sup>. Konsentrasi dan rendemen fikosianin terbaik diperoleh pada perlakuan 80 g NaNO<sub>3</sub> sebesar 1,32 mg/mL dan 32,93%.

**Pengaruh Intensitas Cahaya Terhadap Produksi Fikosianin oleh Sianobakteria Laut BTM 11.** Pengaruh intensitas cahaya terhadap produksi fikosianin oleh sianobakteria diamati dengan mengukur kadar fikosianin yang diisolasi dari sianobakteria BTM 11 pada kondisi kultur dengan variasi paparan intensitas cahaya. Hasil perhitungan kadar pigmen fikosianin yang teramati dari kondisi kultur dengan paparan variasi intensitas cahaya yang berbeda-beda dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa ada perbedaan signifikan untuk masing-masing perlakuan, kecuali kadar fikosianin dari perlakuan 3500 lux dan cahaya di luar ruangan tidak menunjukkan adanya perbedaan signifikan serta kadar fikosianin dari perlakuan 5500 lux dan cahaya di luar ruangan tidak terdapat perbedaan signifikan. Intensitas cahaya 3500 dan 5500 lux juga tidak menunjukkan perbedaan signifikan terhadap kadar fikosianin.

Gambar 2 menunjukkan bahwa dari intensitas cahaya 1500, 2500, 3500, dan 4500 lux kadar fikosianin yang disintesis oleh sianobakteria laut BTM 11 semakin besar dan berbanding lurus dengan



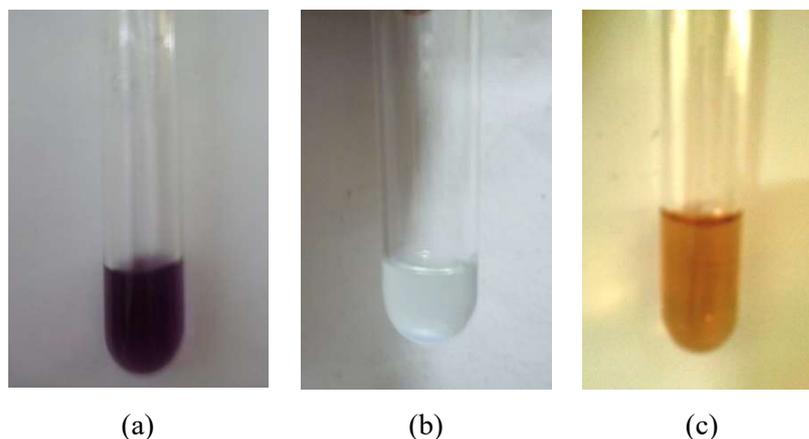
**Gambar 2.** Hubungan kadar fikosianin versus intensitas cahaya dalam media. Perlakuan yang memiliki anotasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan.

pertambahan intensitas cahaya yang dipaparkan. Kadar fikosianin tertinggi dan memberikan perbedaan signifikan diperoleh dari kultur yang dipaparkan cahaya dengan intensitas cahaya 4500 lux. Pada intensitas cahaya yang lebih tinggi lagi, yaitu 5500 lux, kadar fikosianin yang diperoleh lebih rendah jika dibandingkan dengan kadar fikosianin dari intensitas cahaya 4500 lux. Pada kultur yang ditempatkan di luar

ruangan dan mengikuti intensitas cahaya luar. Kadar fikosianin dari kultur yang dikultivasi di luar ruangan (cahaya matahari), tidak lebih bagus jika dibandingkan dengan kadar fikosianin yang diperoleh dari intensitas cahaya 4500 lux. Hal ini menunjukkan jika kultivasi dilakukan tanpa adanya periode gelap dan terang (penyinaran terus menerus selama kultivasi), sianobakteria laut BTM 11 mensintesis fikosianin secara optimum pada intensitas cahaya 4500 lux. Hasil ini lebih efektif jika dibandingkan dengan kultivasi yang dilakukan dengan kondisi adanya periode gelap dan terang (siang dan malam) di luar ruangan. Pada intensitas cahaya 5500 lux, kadar fikosianin yang terukur menurun jika dibandingkan dengan 4500 lux. Hal ini dapat disebabkan karena adanya foto inhibisi yang menyebabkan pigmen sianobakteria BTM 11 menurun.

**Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode Penangkapan Radikal DPPH.** Fikosianin memiliki struktur rantai tetrapirrol terbuka yang dikenal sebagai fikosianobilin yang melekat secara kovalen pada apoprotein dan memiliki struktur kimia yang mirip dengan bilirubin. Bilirubin mampu mengikat radikal peroksi dan mendonorkan elektron dari atom hidrogen yang terikat pada atom C nomor 10 dari molekul tetrapirrol<sup>(26)</sup>. Hasil uji kualitatif antioksidan oleh pereaksi DPPH dapat dilihat pada Gambar 3.

Mekanisme penangkapan radikal bebas ini yaitu senyawa DPPH direduksi oleh senyawa antioksidan yang terdapat di dalam fikosianin. Hal ini dikarenakan fikosianin mendonorkan elektron dari atom hidrogen kepada radikal DPPH sehingga elektron menjadi berpasangan yang ditunjukkan dengan perubahan



**Gambar 3 Uji kualitatif antioksidan: (a) DPPH dalam metanol p.a, (b) Fikosianin dalam metanol sebelum ditambahkan DPPH (c) Fikosianin setelah ditambahkan DPPH.**

warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang didonorkan (Gambar 3)<sup>(27)</sup>.

Uji kuantitatif aktivitas antioksidan fikosianin didapatkan penangkapan radikal bebas (% inhibisi) dan nilai  $IC_{50}$  dari fikosianin dan vitamin C dapat dilihat berturut-turut pada Tabel 2.

Tabel 2 dan 3 menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi maka semakin besar persen penangkapan radikal bebas DPPH. Hasil analisis diketahui bahwa persamaan garis regresi linear antara konsentrasi senyawa dengan persen penangkapan radikal bebas

DPPH memiliki nilai besaran korelasi ( $r$  hitung) lebih besar daripada  $r$  tabel (dengan probabilitas 0,95) sehingga korelasi kedua besaran tersebut adalah signifikan dan persamaan regresi linear tersebut dapat digunakan.

Data persen penangkapan radikal bebas DPPH pada berbagai konsentrasi sampel dapat dihitung nilai  $IC_{50}$ . Potensi aktivitas antioksidan fikosianin yang diisolasi dari sianobakteria laut BTM 11 dapat dilihat dari nilai  $IC_{50}$ . Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  maka semakin besar kemampuan senyawa sebagai antioksidan.

**Tabel 2 Persen inhibisi dan nilai  $IC_{50}$  fikosianin.**

No	% Inhibisi pada Konsentrasi Fikosianin ( $\mu\text{g/ml}$ )							Persamaan Regresi Linier	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
	5	10	25	50	100	125	150		
1	3,67	8,94	22,42	35,41	50,73	63,60	77,45	$y = 6,1418 + 0,4715 x$	93,02
2	6,49	10,29	22,79	34,55	52,32	62,62	79,41	$y = 7,3279 + 0,4671 x$	91,36
3	5,39	7,96	20,46	36,51	51,34	64,70	80,51	$y = 5,6583 + 0,4888 x$	90,72
4	6,98	10,78	20,83	33,94	53,92	62,13	77,57	$y = 7,3044 + 0,4625 x$	92,31
5	2,81	8,21	23,16	36,02	52,08	63,48	78,30	$y = 5,8745 + 0,4795 x$	92,02
Rata-rata $\pm$ SD									91,89 $\pm$ 0,89
CV (%)									0,97

Keterangan:  $r$  hitung  $>$   $r$  tabel

**Tabel 3 Persen inhibisi dan nilai IC<sub>50</sub> vitamin C.**

No	% Inhibisi pada Konsentrasi Vitamin C (µg/mL)							Persamaan Regresi Linier	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4		
1	24,60	31,54	42,93	50,91	63,35	70,15	82,19	y = 3,9547 + 19,3156 x	2,38
2	23,29	32,19	41,36	53,14	63,61	71,72	82,85	y = 3,6037 + 19,3156 x	2,37
3	22,90	31,02	39,65	49,86	65,05	71,33	83,79	y = 0,4067 + 20,6152 x	2,40
4	22,51	32,46	40,18	50,78	62,82	69,37	80,89	y = 2,7908 + 19,3998 x	2,43
5	21,20	31,80	41,23	51,70	65,57	71,98	81,8	y = 1,0237 + 20,4656 x	2,39
Rerata ± SD									2,39±0,02
CV (%)									0,84

Keterangan: r hitung > r tabel

Nilai IC<sub>50</sub> rata-rata untuk fikosianin dan vitamin C berturut-turut dapat dilihat pada Tabel 2 dan 3. Nilai IC<sub>50</sub> fikosianin lebih dari vitamin C yang berarti kemampuan aktivitas antioksidan vitamin C lebih besar dibandingkan dengan fikosianin yang diisolasi dari sianobakteria laut BTM 11.

### SIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan kadar PC tertinggi didapat dari media dengan NaNO<sub>3</sub> sebesar 525,0 mg, dengan intensitas cahaya optimum adalah pada 4500 lux. Kedua parameter memberikan perbedaan signifikan. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan PC dari sianobakteria BTM 11 memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 91,89±0,89 µg/mL sedangkan IC<sub>50</sub> dari asam askorbat (vitamin C) sebesar 2,39±0,02 µg/mL.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis berterimakasih kepada Prof. Dr. Dwi Susilaningsih, M.Pharm. atas penyediaan isolat BTM-11 sebagai objek penelitian. Penulis juga berterimakasih kepada Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta serta Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) yang telah memfasilitasi penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2015; 30(1): 11–26.
- Henriksen EJ, Role of oxidative stress in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes, 2nd ed. Elsevier Inc., 2019.
- Zulaikhah ST. The role of antioxidant to prevent free radicals in the body. *Sains Medika: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*. 2017. 8(1): 39
- Jiang L, Wang Y, Yin Q, Liu G, Liu H, Huang Y. Phycocyanin: a potential drug for cancer treatment.” *Journal of Cancer*. 2017; (8)17: 3416–3429.
- Zuorro A, Leal-Jerez, AG, Morales-Rivas LK, Mogollón-Londoño SO, Sanchez-Galvis EM, García-Martínez JB, Barajas-Solano AF. Enhancement of phycobiliprotein accumulation in thermotolerant *Oscillatoria sp.* through media optimization. *ACS Omega*. 2021; 6 (16): 10527–10536
- Praharyawan S, Setyaningsih T, Susilaningsih D, Dian Y, Siregar I, Peningkatan kemurnian dan toksisitas ekstrak pigmen c-fikosianin dari sianobakteria laut Jaaginema sp. BTM-11 dengan menggunakan kitosan dan arang aktif *enhancement*. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautanan dan Perikanan*. 2019; 14(1): 21–28
- Buchweitz M. *Natural solutions for blue colors in food*. Elsevier Ltd, 2016.
- Nur MMA, Garcia GM, Boelen P, Buma AGJ. Enhancement of C-phycocyanin productivity by *Arthrospira platensis* when growing on palm oil mill effluent in a two-stage semi-continuous cultivation mode. *Journal of Applied Phycology*. 2019; 31(5): 2855–2867.
- Schipper K, Fortunati F, Oostlander PC, Murakhi MA, Jabri HMSJH, Wijffels RH, Barbosa MJ. Production of phycocyanin by *Leptolyngbya sp.* in desert environments. *Algal Research*. 2020; 47(September 2019): 101875.
- Hoi SK, Winayu BNR, Hsueh HT, Chu H. Light factors and nitrogen availability to enhance biomass and C-phycocyanin productivity of *Thermosynechococcus sp.* CL-1. *Biochemical Engineering Journal*. 2021; 167(1): 107899
- Rivera C, Niño L, Gelves G, Modeling of phycocyanin production from *Spirulina platensis* using different light-emitting diodes. *South African Journal. of Chemical Engineering*. 2021; 37(March): 167–178.
- Zhang H, Yang C. Arginine and nitrogen mobilization in *Cyanobacteria*. *Molecular. Microbiology*. 2019. 111(4): 863–867.
- Chen F, Zhang Y, Guo S. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. *Biotechnology Letter*. 1996; 18(5): 603–608.
- Pagels F, Guedes AC, Amaro HM, Kijjoa A, Vasconcelos V. Phycobiliproteins from cyanobacteria: chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advance*. 2019; 37(2019): 422–443.
- Kumar D, Dhar DW, Pabbi S, Kumar N, Walia S.

- Extraction and purification of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* (CCC540). *Indian Journal of Plant Physiology*. 2014; 19(2): 184–188.
16. Prabakaran P, Ravindran AD. Efficacy of different extraction methods of phycoerythrin from *Spirulina platensis*. *International Journal of Life Science and Pharma Research*. 2013; 1(1): 15–20.
  17. Becker EW. *Microalgae biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press. 1994.
  18. Bennett A, Bogobad L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *Journal of Cell Biology*. 1973; 58(2): 419–435.
  19. Bryant DA, Guglielmi G, de Marsac NT, Castets AM, Cohen-Bazire G. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Archives of Microbiology*. 1979; 123(2): 113–127.
  20. Gantar M, Simović D, Djilas S, Gonzalez W, Mikšovska J. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycoerythrin from *Limnothrix sp.* strain 37-2-1. *Journal of Biotechnology*. 2012; 159(1–2): 21–26.
  21. Silva LA, Kuhn KR, Moraes CC, Burkert CAV, Kalil SJ. Experimental design as a tool for optimization of c-phycoerythrin purification by precipitation from *Spirulina platensis*. *Journal of Brazilian Chemical Society*. 2009; 20(1): 5–12.
  22. Eriksen NT. Production of phycoerythrin - A pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied. Microbiology and Biotechnology*. 2008; 80(1): 1–14.
  23. Esen M, Öztürk Ürek R. Nitrate and iron nutrition effects on some nitrate assimilation enzymes and metabolites in *Spirulina platensis*. *Turkish Journal of Biology*. 2014; 38(5): 690–700
  24. Kaewdam S, Jaturonglumert S, Varith J, Nitatwichit C, Narkprasom K. Kinetic models for phycoerythrin production by fed-batch cultivation of the *Spirulina platensis*. *International Journal of Geomate*. 2019; 17(61): 187–194.
  25. Notonegoro, H, Setyaningsih I, Tarman K. Kandungan senyawa aktif *Spirulina platensis* yang ditumbuhkan pada media *walne* dengan konsentrasi  $\text{NaNO}_3$  berbeda. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautanan dan Perikanan*. 2018; 13(2): 111.
  26. Romay C, González R, Ledón N, Ramirez D, Rimbau V. C-Phycoerythrin: A Biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective effects). *Current Protein and Peptide Science*. 2003; 4: 207–216.
  27. Kedare SB Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. 2011; 48(4): 412–422.