

UJI AKTIVITAS PENGANGKAPAN RADIKAL 2,2-DIFENIL-1-PIKRILHIDRAZIL (DPPH) PIGMENT BAKTERIAL SIMBION DARI *SARGASSUM POLYCYTRUM*

Lia Kusmita¹, Sri Achadi Nugraheni², Handung Nuryadi³

¹ STIFAR “Yayasan Farmasi” Semarang, ² Universitas Diponegoro, ³ Magister Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana

ABSTRACT

Carotenoids are pigments that are found in plants, animals, microorganisms and humans. The pigment has many functions, one of which is as an antioxidant. There have been many studies of carotenoids in plants, but the types of carotenoids in bacteria is very rarely observed when the potential is not lost. The ability of marine bacteria is well known to produce carotenoids. Bacterial symbionts associated with *Sargassum polycytrum* can produce neoxanthin. This research will test the antioxidant activity by DPPH method on bacterial symbionts pigment extracts as compared with extracts of *S. polycytrum*. Based on the results obtained IC_{50} of 3.01 ± 2350 ppm was obtain for extract pigments *S. polycytrum*, 645 ± 2.11 ppm for pigment extract bacterial symbionts, and 564 ± 2.26 ppm for β -carotene as a comparison.

Keywords: antioxidants, *Sargassum polycytrum*, neoxanthin, fucoxanthin

PENDAHULUAN

Kekayaan hayati laut Nusantara sangat beragam, disebabkan bervariasi dan khasnya lingkungan abiotik laut. Keunikan relung ekologi ini memfasilitasi tumbuh kembang makro dan mikroorganisme serta kandungan senyawa metabolit sekundernya yang khas hanya dijumpai di lautan. Berbagai jenis metabolit sekunder banyak ditemukan di lautan, misalnya: terpenoid, alkaloid, klorofil, dan karotenoid (Radjasa, dkk., 2007).

Pigmen karotenoid adalah contoh senyawa bioaktif yang banyak ditemukan pada organisme laut seperti rumput laut,

terumbu karang, alga dan bakteri. Karotenoid, yang merupakan pigmen pemberi warna kuning-merah dan sering digunakan sebagai pewarna makanan (Bauernfied, 1981). Bauernfeind (1981) serta Britton telah memanfaatkan karotenoid dalam bidang kesehatan.

Rumput laut merupakan salah satu sumber daya hayati laut yang sangat beraneka ragam di Indonesia. Berdasarkan catatan Van Bosse (melalui ekspedisi Laut Siboga pada tahun 1899-1900) di Indonesia terdapat kurang lebih 555 jenis dari 8642 spesies rumput laut yang terdapat di dunia. Dengan kata lain perairan Indonesia sebagai

wilayah tropika memiliki sumberdaya plasma nutfah rumput laut sebesar 6.42% dari total biodiversitas rumput laut dunia (Santosa, 2003; Surono, dkk., 2004).

Dalam ekosistem laut, rumput laut memegang peran biologis dan ekologis yang penting karena organisme ini menyediakan nutrisi, tempat reproduksi dan lingkungan hidup bagi organisme lain (Wahber, 1997; Fleurence 1999; Fleurence dkk., 1999; Wilson 2002). Peranan tersebut menjadikan rumput laut sebagai organisme penting dalam menjaga kestabilan ekosistem laut (Dere dkk., 2003). Salah satunya adalah bakteri yang bersimbion dengan rumput laut. Kurang dari 2% mikrobial baru diperkirakan berhasil diisolasi dari lingkungan laut sebagai kultur murni. Dilaporkan juga bahwa terdapat asosiasi mikroorganisme dengan organisme laut yang juga mensintesa metabolit sekunder seperti organisme inangnya termasuk mensintesa pigmen karotenoid (Proksch dkk., 2002; Burgess, dkk., 2003). Hal ini dapat dijadikan salah satu solusi alternatif pengganti penghasil pigmen karotenoid.

Dengan mengidentifikasi kandungan biopigmen yang dihasilkan oleh bakteri simbiosis pada rumput laut dapat menjadi suatu senyawa biopigmen baru. Hasil

penelitian ini akan lebih jauh memberikan pilihan alternatif untuk menghasilkan sumber pigmen baru yang potensial sebagai sumber antioksidan.

BAHAN DAN METODE

Metoda *sampling* . Metoda *sampling* yang akan digunakan adalah metoda *sampling* purposif, dimana sampel rumput laut akan diambil dari lokasi perairan Jepara.

Dokumentasi dan identifikasi. Dokumentasi terhadap sampel *S. polycytrum* dilakukan dengan pengambilan gambar secara *in situ* dengan *underwater camera* Canon S50 dan pengambilan gambar pada permukaan segera setelah sampel diambil dari laut.

Isolasi bakteri yang berasosiasi dengan rumput laut. Isolasi bakteri dilakukan dengan metoda sebaran (Radjasa dkk., 2007). Sampel *S. polycytrum* tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang sebagian berisi air laut steril. Selanjutnya dilakukan pemotongan terhadap permukaan jaringan dan hanya bagian dalam dari sampel yang akan digunakan. Selanjutnya dilakukan seri pengenceran terhadap sampel tersebut. Dari masing-masing cawan petri tersebut diambil 10 ml sampel dengan pipet steril, kemudian dimasukkan ke dalam labu erlemeyer berisi

90 ml air laut steril dan akan diperoleh pengenceran sampel sebesar 10^{-1} . Dari pengenceran 10^{-1} tersebut diambil 1 ml sampel dengan pipet steril dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml air laut steril dan akan diperoleh pengenceran 10^{-2} . Demikian selanjutnya sehingga akan diperoleh pengenceran sampel 10^{-3} ; 10^{-4} ; dan 10^{-5} . Dari masing-masing seri pengenceran tersebut, selanjutnya diambil 1 ml sampel dan dimasukkan ke dalam cawan petri steril yang dituangi media agar Zobell 2216E. Cawan petri tersebut kemudian diinkubasikan pada suhu 30°C selama 2 hari. Koloni bakteri berwarna yang tumbuh pada permukaan agar tersebut, kemudian dipisahkan dengan teknik goresan (*streak method*) sehingga diperoleh isolat bakteri berwarna yang berasosiasi dengan invertebrata.

Ekstraksi Pigmen. Pellet bakteri simbion yang sudah didapat diekstraksi dengan menggunakan metanol 100% dan *S. polycytrum* diekstraksi dengan menggunakan pelarut aseton:metanol 7:3. Pada waktu ekstraksi ditambahkan CaCO_3 sebagai agen penetral dan sodium-L-askorbat sebagai antioksidan untuk mencegah terjadinya oksidasi. Ekstraksi dilakukan secepat mungkin untuk menghindari terjadinya oksidasi dan

degradasi enzimatik. Selanjutnya, ekstrak disaring dengan kertas saring, sedangkan residu diekstraksi kembali dengan pelarut yang baru sampai seluruh pigmen terangkat. Selanjutnya, ke dalam larutan tersebut ditambahkan Na_2SO_4 anhidrat, kemudian disaring dan dipekatkan (Britton dkk, 1995; Trujilio dkk., 1998 dalam Rodriguez-Amaya dan Mieko Kimura, 2004).

Identifikasi Pigmen. Ekstrak pigmen dari *Sargassum polycytrum* dan bakteri simbinnya diidentifikasi dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), menggunakan fase diam ODS RP- C_{18} dan fase gerak metanol:asetonitril 70:30 (v/v), dengan kecepatan alir $1 \text{ ml} \cdot \text{menit}^{-1}$. Analisis dilakukan pada panjang gelombang 450 nm.

Uji Aktivitas Antioksidan. Ekstrak dilarutkan dalam aseton dan dibuat berbagai seri konsentrasi. Blanko berupa campuran 4 ml metanol 95% ditambah 1 ml ekstrak, sedangkan larutan sampel terdiri dari 4 ml DPPH ditambah 1 ml ekstrak. Blanko maupun sampel diinkubasi selama 30 menit di ruang gelap, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Tampak berkas tunggal Shimadzu 1240. Aktivitas penghambatan dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{[DPPH]_0 - [DPPH]_s}{[DPPH]_0} \times 100\%$$

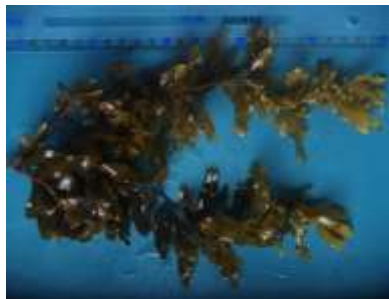
$[DPPH]_0$ = Konsentrasi DPPH awal

$[DPPH]_s$ = Konsentrasi DPPH akhir yang tersisa

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri fotosintetik yang hidup bersimbiosis dengan rumput laut *S. polycystrum*. Berdasarkan identifikasi diperoleh 7 koloni bakteri yang sudah diberi kode untuk masing-masing koloni. Setelah dibiakan hanya 1 jenis bakteri yang

memberikan warna kuning kehijauan yaitu bakteri dengan kode SJ4. Dipilih yang berwarna kuning kehijauan karena warna tersebut mengindikasikan adanya pigmen karotenoid yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. Bakteri tersebut diisolasi dari *S. polycystrum* yang diambil dari perairan Jepara. Berikut ini foto dari *S. polycystrum* yang berhasil diambil saat sampling:



Gambar 1. *S. polycystrum*

Bakteri yang diisolasi adalah bakteri yang memberikan warna hijau, kuning, orange sampai merah yang menunjukkan adanya pigmen fotosintetik didalamnya. Bakteri

yang berhasil diisolasi memberikan warna kuning kehijauan yang ditunjukkan pada gambar di bawah:



A



b

Gambar 2. Pigmen bakteri SJ4 yang bersimbion dengan *S. polycystrum*

a. Pada media padat dan b. Pada media cair

Kenampakan warna secara visual merupakan identifikasi awal adanya pigmen di dalam bakteri. Untuk langkah selanjutnya perlu diekstraksi untuk mengetahui jenis

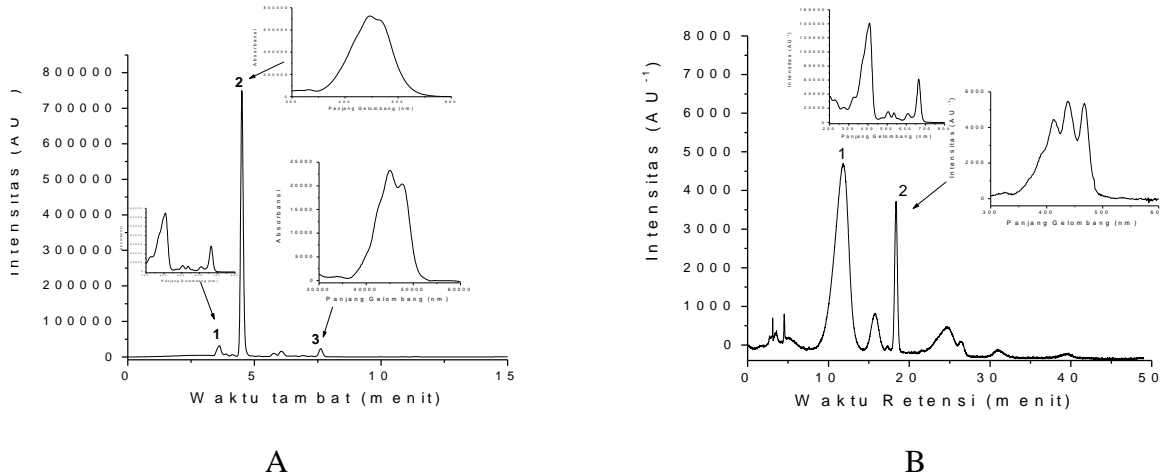
pigmen yang ada pada bakteri tersebut. Pigmen klorofil dan karotenoid adalah pigmen yang bersifat *liposoluble pigment* sehingga digunakan pelarut yang dapat

bercampur dengan air seperti aseton dan metanol. Aseton umumnya digunakan untuk menarik pigmen yang bersifat cenderung non polar seperti: karoten, dan metanol digunakan untuk menarik pigmen yang cenderung polar seperti xantofil. Selain itu kedua pelarut juga dapat digunakan untuk memecah ikatan protein dan pigmen. Karakteristik pigmen dari bakteri tersebut akan dibandingkan dengan inangnya.

Identifikasi dari *S. polycytrum* dan bakteri simbiannya dilakukan dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). *S. polycytrum* yang merupakan inang dari bakteri perlu untuk diidentifikasi sebagai pembanding jenis pigmen yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. KCKT yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan detektor PDA (*PhotoDioda Array*). Perkembangan KCKT merupakan suatu terobosan untuk analisis karotenoid, salah satunya adalah dengan menggunakan detektor PDA. Pada KCKT dengan detektor UV-tampak konvensional, pengukuran hanya dapat dilakukan pada satu panjang gelombang, sehingga untuk menentukan komposisi suatu sampel pada banyak panjang gelombang harus dilakukan pengukuran berulang-ulang. Hal ini berbeda dengan KCKT detektor

PDA, pengukuran dapat dilakukan pada banyak panjang gelombang secara simultan, sehingga dapat diperoleh komposisi suatu sampel pada rentang panjang gelombang yang diinginkan. Keunggulan lain, rentang panjang gelombang dapat menghasilkan pola spektra dari puncak-puncak yang diperoleh sehingga secara kualitatif dapat ditentukan tanpa harus menganalisis marker (Briton, 1995; Choo, 1994).

Penggunaan detektor PDA memberikan beberapa kemudahan. Dengan hanya sekali analisis dapat diperoleh kromatogram pada tiap-tiap panjang gelombang sesuai interval yang dipilih (200-800 nm), sehingga diperoleh pola spektra dari tiap-tiap puncak. Pola spektra ini membantu dalam mengidentifikasi secara kualitatif jenis karotenoid dari tiap puncak tanpa harus menganalisis marker. Jika dibandingkan dengan detektor UV-Tampak konvensional, sekali analisis memerlukan marker sebagai pembanding dan hanya dapat diamati pada satu panjang gelombang. Dapat dibayangkan jika suatu sampel yang terdiri dari 10 komponen, maka diperlukan 10 marker untuk mengidentifikasinya. Hasil dari identifikasi pigmen dengan KCKT ditunjukkan pada gambar dibawah ini:



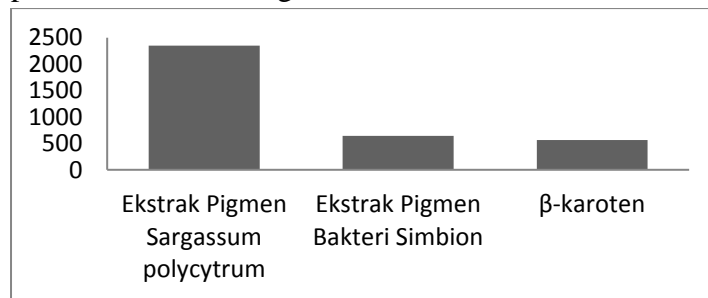
Gambar 3. Analisis KCKT a) *Sargassum Polycytrum* dan b) Bakteri simbion
 Berdasarkan hasil kromatogram yang dihasilkan dan dilihat pola spektra tiap peak maka dapat diidentifikasi pada tabel dibawah ini:

Tabel 1. Identifikasi Hasil Analisis KCKT pada *Sargassum Polycytrum* dan Bakteri Simbion

Peak	Identifikasi		Serapan Maksimum (nm)		Literatur
	Sargassum	Bakteri	Sargassum	Bakteri	
1	Feoforbid <i>a</i>	Feoforbid <i>a</i>	409, 507, 450,609,668	411,506,450,610, 668	Jeffery, 1997
2	Fukosantin	Neosantin	449, 469	416, 439, 468	
3	β -karoten	-	433, 455, 482	-	

Kandungan karotenoid pada bakteri maupun inangnya berbeda. Pada *S. polycytrum* terdapat 2 jenis karotenoid yaitu fukosantin dan β -karoten, sedangkan pada bakteri simbiannya dihasilkan neoksantin. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pigmen yang berperan besar sebagai

antioksidan adalah karotenoid. Selanjutnya dilakukan uji antioksidan dengan DPPH antara kedua ekstrak dan sebagai pembanding digunakan baku β -karoten, Hasil pengujian aktivitas antioksidan ditunjukkan pada gambar 4.



Gambar 4. IC₅₀ Ekstrak pigmen *Sargassum polycytrum*, Ekstrak pigmen bakteri simbion dan β -karoten

Konsentrasi IC_{50} ekstrak pigmen *S. polycytrum* sebesar $2350 \pm 3,01$ ppm, ekstrak pigmen bakteri simbiosis sebesar $645,03 \pm 2,11$ ppm, dan baku β -karoten sebagai pembanding sebesar $564,12 \pm 2,26$ ppm. Konsentrasi antara ekstrak pigmen bakteri simbiosis dan baku β -karoten tidak berbeda jauh, sehingga dapat dikatakan hampir sama.

Konsentrasi IC_{50} terbesar terdapat pada ekstrak pigmen *S. polycytrum*. Konsentrasi dan aktivitas antioksidan berbanding terbalik semakin tinggi nilai IC_{50} maka semakin rendah aktivitas antioksidannya. Sehingga pada penelitian ini dapat dikatakan bahwa aktivitas antioksidan pada ekstrak pigmen sargassum paling rendah dibandingkan dengan bakteri simbiosis maupun marker β -karoten. Telah diketahui bahwa karotenoid yang terdapat pada ekstrak *S. polycytrum* adalah fukosantin dan β -karoten yang telah terbukti memiliki aktivitas antioksidan besar. Kenyataan tersebut terjadi karena kedua jenis karotenoid tersebut bekerja secara antagonis apabila berada secara bersamaan, sehingga menghasilkan aktivitas antioksidan yang rendah dibandingkan kalau bekerja sendiri-sendiri.

KESIMPULAN

Aktivitas ekstrak pigment bakteri simbiosis hampir sama dengan β -karoten, namun lebih besar 4 kalinya dibandingkan dengan ekstrak pigmen *S. polycytrum* yang merupakan inangnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada DIKTI yang telah memberikan dukungan

dana dalam penelitian ini melalui program “Hibah Bersaing” (No.034/O06.2/PP/SP/2012)

DAFTAR PUSTAKA

- Bauernfeind, J.C. 1981. *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*. Academic Press, New York
- Burgess J.G., K.G. Boyd, E. Amstrong, Z. Jiang, L. Yan, M. Berggren, U. May, T. Pisacane, A. Granmo, and D.R. Adams, 2003. Development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling*. 19:197-205
- Britton, G, Liaaen-Jensen, S and Pfander, H. 1995. Carotenoid : isolation and Analysis. Birkhauser Verlag, basel. Boston. Berlin, 328 pp.
- Gross, J.1991. Pigmen in vegetables. Van Nastrand Reinhold, New York, 351 pp.
- Jeffrey, S.W., Mantoura, R. F. C., and Wright, S.W. 1997. Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Method. UNESCO Publishing, Paris, 661 pp.
- Krinsky, N.I and Johnson E.J .2005. Carotenoid actions and their relation to health and disease, *J. Mol. Asp. Med.* 459–516
- Maeda H., Masashi H., Tokute S., Katsura F., Kazuo M., 2005, Fucoxanthin from Edible Seaweed, Undaniria Pinnatifida, Shows Antiobesity Effect Trough UCP1 Expression in White Adipose Tissues, *Biochem.Biophy. Res.Comm* 332: 392-397.

- Maeda, H., T. Tsukui, T. Sashima, M. Hosokawa and K. Miyashita, 2008. Seaweed carotenoid, fucoxanthin, as a multi-functionals nutrient. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 17:196-199.
- Miyashita, K. and M. Hosokawa, 2007. Beneficial health effect of seaweed carotenoid, fucoxanthin. In: *Marine nutraceuticals and functional foods*. United States of America, CRC Press.
- Proksch P, R.A. Edrada, R. Ebel, 2002. Drugs from the seas-current status and microbiological implications. *Appl Microbiol Biot* 59:125-134
- Radjasa, O. K., S.I.O. Salasia, A. Sabdono, J. Weise, J.F. Imhoff, C. Lammler and M.j. Risk, 2007. Antibacterial Activity of Marine Bacterium *Pseudomonas* sp. Associated with Soft Coral *Sinuaria polydactyla* Against *Streptococcus equi* Subsp. *zoopidemicus*. *Int J. Pharmacol.* 3 (2): 170-174.
- Rahayu, D.S., Kusriani. D., Fachriyah. E., 2005. Penentuan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun Ketapang (*Terminalia catappa* L) dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH). *Labortorium Kimia Organik, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro*.
- Wang, B., Yu, Z., dan Hwang, L. S., 1995. *Quantitative Analyses of Chlorophylls and Their Derivatives by Thin Layer Chromatography. Journal of Chinese Agricultural Chemical Society.* **33(5)**. 550-560.