

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pengenalan Mikroalga *Spirulina platensis*

Spirulina platensis adalah mikroalga yang punya warna hijau kebiruan (Widawati *et al.*, 2022), dengan zat warna *Cyanophysin* (hijau kebiruan) yang dimiliki *Spirulina platensis* dapat dikelompokkan pada kelas *Cyanophyceae* (Phang *et al.*, 2000). *Spirulina platensis* termasuk jenis cyanobacteria atau bakteri yang punya kandungan klorofil serta bisa bertindak menjadi organisme yang dapat melaksanakan fotosintesis untuk menghasilkan makanan sendiri. Bentuk tampilannya spiral (Gambar 2.1) dan punya kandungan fikosianin tinggi sehingga warna cenderung hijau biru (Christwardana *et al.*, 2013).

Spirulina diketahui dapat tumbuh dengan baik di perairan danau, air tawar, air laut, dan media tanah lembab (Masithah, 2021). *Spirulina platensis* punya kemampuan untuk tumbuh pada tempat yang punya alkalitas tinggi (pH 8,5 – 11) (Widawati *et al.*, 2022), dimana mikroorganisme pada umumnya tidak bisa tumbuh dengan baik dalam kondisi tersebut (Masithah, 2021). Pertumbuhan yang optimal pada suhu 35-40 °C serta suhu terendah untuk *Spirulina platensis* dapat hidup adalah 15 °C (Widawati *et al.*, 2022). *Spirulina plantesis* dipilih sebagai sumber bahan pangan masa depan dikarenakan beberapa sumber bahan pangan berbentuk jamur dan bakteri mikroorganisme memiliki kadar protein yang sangat tinggi, sehingga disebut sebagai protein sel tunggal (Christwardana *et al.*, 2013). *Spirulina platensis* dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Masithah, 2021):



Gambar 2. 1 Gambar Mikroskopis *Spirulina platensis* (Masithah, 2021)

Kingdom : Protista
 Divisi : Cyanophyta
 Kelas : Cyanophyceae
 Ordo : Nostocales
 Famili : Oscillatoriaceae
 Genus : Spirulina
 Spesies : *Spirulina platensis*

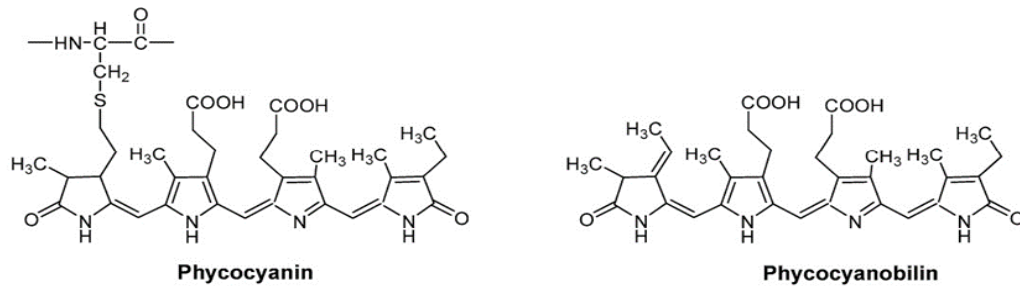
Analisis kimia menunjukkan jumlah mineral esensial yang terdapat dalam *Spirulina platensis* sebanyak 3-7%. Mineral ini berasal dari media pertumbuhan *Spirulina platensis* dan dipengaruhi oleh konsentrasi, pH, suhu serta salinitas dari media tersebut (Christwardana *et al.*, 2013). Kandungan mineral dalam *Spirulina platensis* seperti natrium, klorida, kalium, kalsium, fosfor, kromium, tembaga, besi, magnesium, mangan, selenium, dan seng (Koru 2012). Selanjutnya jumlah protein yang terdapat dalam *Spirulina platensis* yaitu 55-70%. *Spirulina platensis* merupakan mikroalga yang mengandung senyawa protein tinggi sekitar 55-70% dan merupakan sumber mikronutrien (Phang *et al.*, 2000). Asam amino yang sering dijumpai dalam protein *Spirulina platensis* yaitu asam amino esensial seperti metionin (1,3-2,75%), sistein (0,5-0,75%), triptofan (1-1,95%), dan lisin (2,6-4,63%). Jumlah *poly unsaturated fatty acids* (PUFAs) dalam *Spirulina platensis* sekitar 1,3-15% dari jumlah lemak total yaitu 6-6,5%. Asam lemak tertinggi yaitu *gamma linoleic acid* (GLA) yaitu sekitar 25-60% dari jumlah lemak total, kemudian asam palmik (44,6-54,1%), asam oleat (1-15,5%), dan asam linoleat (10,8-30,7%). Kandungan kolesterol dalam *Spirulina platensis* yaitu sekitar 32,5 mg/100 g (Christwardana *et al.*, 2013). Kandungan vitamin yang terdapat dalam *Spirulina platensis* seperti vitamin A, vitamin B, vitamin C, vitamin D, dan vitamin E (Koru, 2012).

Spirulina platensis juga memiliki pigmen yang dibedakan berdasarkan kepolarannya. Pigmen polar yang terdapat dalam *Spirulina platensis* berjumlah sekitar $42,272 \pm 0,05$ mg/g dari total berat keringnya, pigmen polar ini merupakan kelompok fikobiliprotein yang terdiri dari alofikosianin (APC, merah); fikoeritrin (PE, pink/ungu); fikoeritrosianin (PEC, orange); dan fikosianin (CPC, biru-hijau), yang mengandung gugus kromofor berbeda seperti fikoeritrobilin (PEB, merah); fikobiliviolin (PXB, ungu); fikourobilin (PUB, kuning); dan fikosianobilin (PCB, biru), sedangkan kandungan pigmen non-polar sebanyak $4,498 \pm 0,06$ mg/g dari total berat kering yang terdiri dari kelompok karotenoid (karoten dan xantofil) dan klorofil a (Sedjati *et al.*, 2012).

2.2 Pigmen Fikosianin

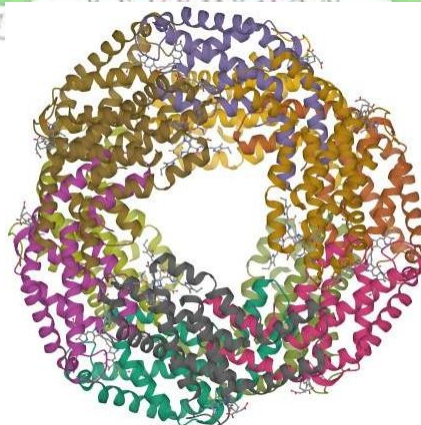
Fikosianin merupakan pigmen utama yang terdapat dalam *Spirulina platensis* dimana jumlahnya sekitar 6,7-11,7% (Christwardana *et al.*, 2013). Fikosianin

termasuk ke dalam kelompok pigmen polarfikobiliprotein yang memberikan warna hijau-biru karena mengandung gugus kromofor tetrapirrol rantai terbuka (fikosianobilin) yang secara kovalen berikatan dengan molekul apoprotein seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.2, sementara struktur proteinnya dalam bentuk kompleks protein-pigmen ditunjukkan pada Gambar 2.3 (Ying Li *et al.*, 2020).



Gambar 2. 2 Struktur pigmen fikosianin dan fikosianobilin (Q. Wu *et al.*, 2016)

Fikosianin merupakan pigmen yang memiliki stabilitas sangat rendah, warnanya akan pudar pada suhu diatas 45°C dan pH dibawah 4 (Yuan Biao Zhuxin Li, 2022). Pigmen fikosianin mampu menangkap radiasi yang berasal dari sinar matahari sehingga sangat rentan terhadap kondisi lingkungan seperti panas, cahaya, dan oksigen (Kraseasintra *et al.*, 2022; Yang Li *et al.*, 2022). Fikosianin berpotensi sebagai pewarna alami dikarenakan sifatnya yang polar. Fikosianin juga digunakan sebagai bahan warna pada produk kosmetik, seperti lipstik dan eyeliners (Xie *et al.*, 2015). Dalam bidang kesehatan fikosianin berfungsi sebagai antiplaket, hepatoprotektif, antioksidatif, anti-inflamasi, mengurangi kadar kolestrol, antikanker, dan antidiabetes (Grover *et al.*, 2021) (Borowitzka *et al.*, 2016).



Gambar 2. 3 Struktur protein C-fikosianin dari *Spirulina platensis* (PDB ID: 1GH0) (Wang *et al.*, 2001)

2.2.1 Identifikasi Pigmen Fikosianin

Identifikasi pigmen fikobiliprotein dari ekstrak *Spirulina platensis* dilakukan dengan mengukur spektrum fikobiliprotein pada panjang gelombang 300-700 nm (Agustini, 2012). Salah satu metode yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi fikosianin adalah spektrofotometri. Metode spektrofotometri biasanya digunakan untuk menghitung kadar dan kemurnian dari fikosianin berdasarkan persamaan (Dranseikien *et al.*, 2022). Absorbansi fikosianin diukur pada panjang gelombang 280 nm; 620 nm; dan 652 nm. Panjang gelombang 280 nm menunjukkan absorbansi dari protein total yang terikat pada fikosianin, panjang gelombang 620 nm menunjukkan absorbansi maksimum dari fikosianin (610 – 620 nm), dan panjang gelombang 652 nm menunjukkan absorbansi maksimum Allofikosianin. Rasio kemurnian fikosianin diketahui dengan menghitung rasio 620/280. Fikobiliprotein merupakan suatu fikobilin yang berikatan silang (*cross-linking*) dengan protein, terdiri dari heterodimer sub unit α dan β yang masing-masing kromofornya dihubungkan melalui ikatan tioeter (Chittapun *et al.*, 2020).

Fikosianin merupakan salah satu senyawa pigmen fikobiliprotein yang cukup terkenal, terkandung dalam mikroalga *Spirulina platensis* (Pez Jaeschke *et al.*, 2021). Diantara pigmen-pigmen yang terkandung dalam *Spirulina*, fikosianin adalah pigmen yang paling melimpah, yaitu berkisar hingga 20% dari komposisi keseluruhan (Solanki *et al.*, 2023), pigmen ini terdiri dari subunit alfa (α) dan beta (β) yang memainkan peran penting dalam integritas struktural dan fungsional fikosianin, subunit ini dipelajari secara ekstensif untuk karakteristik struktural dan aplikasi potensial dalam bioteknologi dan kedokteran (Patel *et al.*, 2018)

Bioaktivitas dari fikosianin telah diteliti memiliki beragam aktivitas biologis seperti antioksidan, anti-inflamasi, hingga anti kanker. Berdasarkan kemurniannya, fikosianin dikelompokkan menjadi tiga yaitu, fikosianin sebagai zat warna makanan (*food grade*) dengan nilai kemurnian $\geq 0,7$; sebagai kosmetik (*reactive gradient/reagent grade*) dengan nilai kemurnian ≥ 3 ; dan fikosianin sebagai standar baku *analytical grade* (*clinical drug, medical biotechnologies* seperti fluoresen atau antioksidan) dengan nilai kemurnian >4 (Neti *et al.*, 2018).

Data bioaktivitas fikosianin terdapat pada Tabel 2.1 di bawah.

Tabel 2. 1 Bioaktivitas antioksidan, antiinflamasi dan antikanker fikosianin

No	Sumber fikosianin	Kemurniaan fikosianin	Bioaktivitas			Ref.
			Antioksidan (IC ₅₀ (µg/mL))	Anti-inflamasi (stabilitas (%))	Anti-kanker (IC ₅₀ (µg/mL))	
1	<i>Spirulina platensis</i>	0,34	-	98,76 ± 0.065 %	4,5 – HepG2 5,3 – MCF-7 4,9 – HCT-116	(Soliman <i>et al.</i> , 2024)
2	<i>Spirulina platensis</i>	Food grade	158.3 – DPPH 152.7 – FRAP 88.67- Fenton rection 110.9 - phosphomolybdate assay	-	-	(Agrawal <i>et al.</i> , 2021)
3	<i>Spirulina platensis</i>	Ekstrak kasar	-	-	1650 – T47D	(Dimarti <i>et al.</i> , 2020)
4	<i>Oscillatoria tenuis</i>	Ekstrak kasar	1750 – DPPH	-	-	(Sulistiawati <i>et al.</i> , 2023)
5	<i>Spirulina sp.</i>	Ekstrak kasar	1485 – DPPH	-	-	(Sulistiawati <i>et al.</i> , 2023)
6	<i>Spirulina platensis</i>	Ekstrak kasar	-	-	855 – WiDr	(Putri <i>et al.</i> , 2020)
7	<i>Spirulina sp.</i>	5.02	78.13 - Total Antioxidant Capacity 71.34 - Reducing power 66.86 - Hydrogen peroxide activity 59.99 – DPPH 61.47 – ABTS	-	29.78 – HeLa	(Shunmugiah Mahendran <i>et al.</i> , 2022)
8	<i>Spirulina platensis</i>	0,193	62,7 (ABTS)	-	59,1 x 10 ⁶ - MCF-7 48,6 x 10 ⁶ - HCT-116 44,7 x 10 ⁶ - HEpG-2	(El-Feky <i>et al.</i> , 2022)
10	<i>Arthrospira platensis</i> BUUC1503	2.616	172.98 – DPPH 14.33 – ABTS	-	-	2023(Settham ongkol <i>et al.</i> , 2023)
11	<i>Spirulina platensis</i>	0,2646 - MAE 0,5107 – UAE	-	8,0164 - MAE 8,5745 – UAE (HRBC)	756,279 – MCF-7 (MAE) 1583,17 - MCF-7 (UAE)	(Hermaningsih <i>et al.</i> , 2023)

2.3 Metode Ekstraksi Pigmen Fikosianin

Terdapat beberapa metode untuk mengekstraksi fikosianin dari mikroalga, mulai dari ekstraksi, isolasi sampai tahap purifikasi (pemurnian). Ekstraksi adalah suatu proses penarikan senyawa atau komponen zat aktif dari sampel menggunakan pelarut tertentu. Beberapa metode ekstraksi yaitu ekstraksi kimia (menggunakan pelarut organik dan anorganik), fisika (*freezing and thawing*, maserasi, sonikasi, *microwave*, homogenisasi, *supercritical fluid*, *pressurized liquid*, *ultrasound-assisted*, *pulsed electric field*), dan enzimatik (lisozim) (Khandual *et al.*, 2021). Pemilihan metode ekstraksi disesuaikan dengan sifat dari senyawa atau komponen yang akan diekstrak.

Maserasi adalah suatu metode ekstraksi kimia dengan cara merendam sampel menggunakan satu atau lebih pelarut selama periode waktu. Maserasi merupakan metode (Harborne, 1987) ekstraksi fikosianin yang umum digunakan (Rahmawati *et al.*, 2017). Prinsip dari maserasi adalah pelarut akan menembus dinding sel, kemudian senyawa atau komponen zat aktif akan terlarut karena adanya perbedaan konsentrasi antara di dalam sel dan di luar sel, sehingga larutan dengan konsentrasi tinggi akan terdesak ke luar sel (Salamah *et al.*, 2017). Pemilihan jenis pelarut dalam maserasi didasarkan kepada kemampuannya dalam melarutkan senyawa atau komponen zat aktif dalam jumlah maksimum dan seminimum mungkin terhadap unsur yang tidak diinginkan. Keuntungan dari maserasi ini adalah peralatannya sederhana, pelaksanaannya mudah tanpa perlakuan khusus, dan tidak memerlukan suhu yang dapat memengaruhi kestabilan ekstrak (Mir *et al.*, 2022).

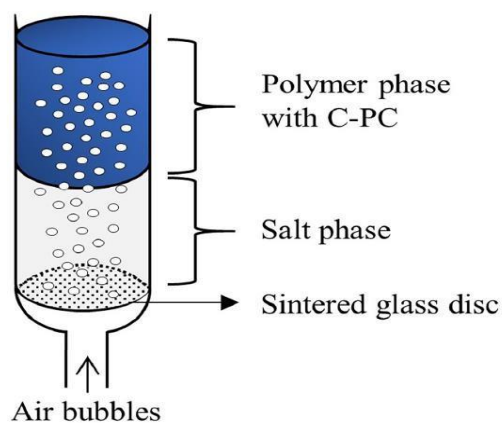
Metode *freeze* (pembekuan) dan *thaw* (penghancuran) merupakan metode yang sering direkomendasikan karena simpel dan lebih efisien digunakan dalam pengekstraksian fikosianin dari *Spirulina platensis* (Chittapun *et al.*, 2020). Metode ini merupakan metode pembekuan cairan intraseluler dan ekstraksi dengan larutan buffer yang dapat memberikan *stressing* pada dinding sel, meningkatkan kerusakan dinding sel, serta memfasilitasi larutnya komponen intraseluler ke dalam larutan buffer (Mittal *et al.*, 2017). Ekstraksi dengan metode *freezing* pada suhu rendah (-20°C) dapat menyebabkan protein yang terikat pada fikosianin tidak terdenaturasi, sehingga dapat mempertahankan warna dan meminimalisir kerusakan akibat panas

untuk nutrisi yang sensitif terhadap suhu tinggi. Antelo *et al.* (2010) menjelaskan bahwa ekstrak fikosianin akan stabil apabila diekstraksi pada suhu rendah karena kromoprotein (polipeptida α dan β) sensitif terhadap suhu, sehingga pada saat hancurnya sel tidak diikuti dengan proses denaturasi. Metode *freeze-thawing* memiliki banyak keunggulan seperti menghasilkan kemurnian yang lebih tinggi, menghasilkan rendemen yang lebih banyak, dan cepat serta dapat mempertahankan kestabilan dari ekstrak fikosianin.

2.4 Teknik Pemurnian Pigmen Fikosianin

Setelah tahapan ekstraksi, dilakukan tahapan purifikasi atau pemurnian. Tahapan purifikasi ini merupakan metode lanjutan karena pada ekstrak kasar masih terkandung fikosianin yang belum spesifik sehingga dibutuhkan metode purifikasi untuk memurnikan fikosianin ini. Beberapa metode yang dapat dilakukan seperti *salting-in*, *salting-out*, HPLC, kromatografi (*gel filtration*, *ion exchange*, *hydroxyapatite*, *anion exchange*), *laser induced fluorescence*, dan *Liquid biphasic flotation* (LBF) (Cui Wanjing Hou Hongfang, 2019).

Liquid biphasic flotation (LBF) adalah metode pemurnian molekul dengan gabungan sistem cair dua fasa (LBS) dan flotasi gelembung. Prinsip utama metode LBF adalah memisahkan biomolekul dari bahan baku mentah dengan adsorpsi senyawa aktif yang terbawa oleh permukaan gelembung gas yang dialirkan. Gelembung tersebut akan berpindah dari fasa pelarut organik (fasa bawah) ke fasa polimer (fasa atas). Fasa atas dan fasa bawah pada LBF tidak bercampur (Gambar 2.4) dikarenakan perbedaan indeks kepolaran yang dibuat dengan menggunakan polimer / garam, alkohol / garam atau kombinasi lainnya (Chew *et al.*, 2019).



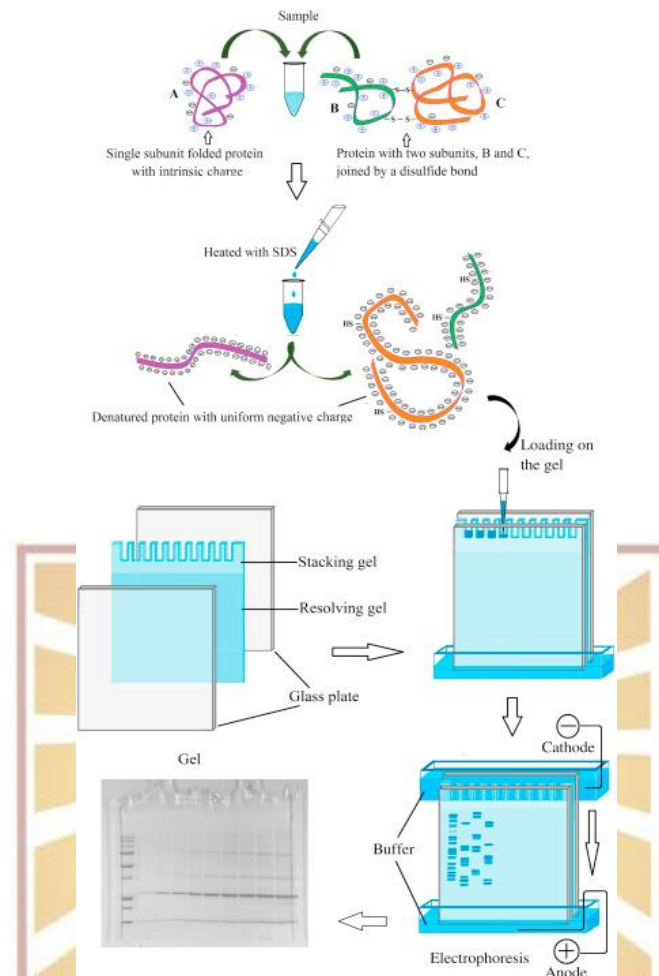
Gambar 2. 4 Skema *Liquid Biphasic Flotation* (LBF)

LBF sebagai metode pemisahan molekul sudah banyak digunakan. LBF digunakan dalam pemisahan *lipase* dari *Burkholderia cepacia*, pemisahan protein dari mikroalga, pemisahan *betacyanin* dari *Hylocereus polyrhizus*. Jika dibandingkan dengan pemurnian konvensional seperti kromatografi kolom, metode kristalisasi, pemisahan menggunakan membran, ultrafiltrasi dan presipitasi yang memiliki proses awal yang cukup panjang, biaya yang tinggi, waktu operasi yang lama dan sulit untuk dikombinasikan dengan pelarut yang sesuai. *Liquid biphasic flotation* (LBF) adalah proses pemurnian yang dapat mengatasi keterbatasan metode pemurnian konvensional tersebut. LBF merupakan metode pemurnian yang efisiensi pemisahannya tinggi, ekonomis, memiliki kemudahan operasi dengan tingkat kehilangan produk sangat kecil serta ramah lingkungan, ini menunjukkan bahwa LBF memiliki prospek yang tinggi untuk pemurnian biomolekul dari mikroalga (Elise *et al.*, 2021).

2.5 SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel*

Electrophoresis

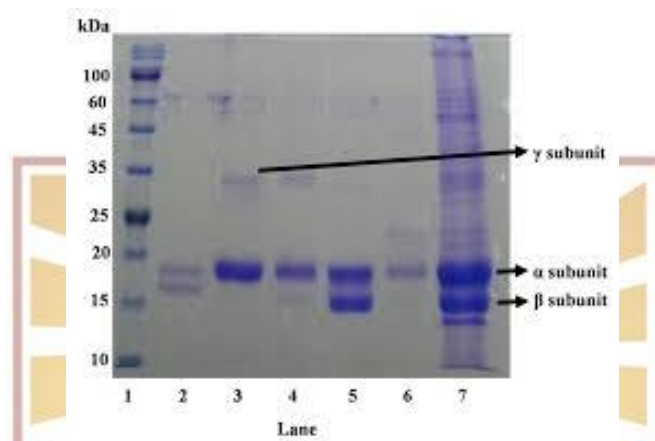
Elektroforesis merupakan proses Bergeraknya molekul bermuatan pada suatu medan listrik. Kecepatan Bergeraknya molekul tergantung pada muatan, bentuk, dan ukuran. Gel poliakrilamida merupakan matriks penyangga yang banyak dipakai untuk pemisahan protein sedangkan agarosa digunakan untuk pemisahan asam nukleat. Berdasarkan preparasi sampel, elektroforesis dibagi dua, yaitu *nondenaturing* atau *native PAGE* dan *denaturing* atau *Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) (Bintang, 2010)



Gambar 2. 5 Skema kerja SDS-PAGE (creativeprotomic.com)

Native PAGE digunakan untuk memisahkan protein dalam *buffer* pada pH tertentu. Protein tetap berada dalam struktur tiga dimensi saat bergerak di dalam gel. SDS-PAGE menggunakan detergen ionik SDS untuk mendenaturasi protein yang akan dielektroforesis. SDS akan mengikat bagian hidrofobik dan residu asam amino, sehingga menyebabkan perubahan struktur tiga dimensi protein. Selain itu, SDS juga menyebabkan seluruh rantai peptida bermuatan negatif (Gambar 2.5). Protein merupakan molekul amfoter karena memiliki gugus amino (+) dan gugus karboksil (-), sehingga dapat mengion pada pH asam maupun basa. Nilai diantara kedua pH tersebut adalah titik isoelektrik (*isoelectric point* atau *pI*) yaitu nilai pH saat protein menjadi tidak bermuatan dan tidak dapat bergerak pada medan listrik. Sebagian besar protein memiliki pH kurang dari 8,0, sehingga pH *buffer* elektroforesis yang berkisar 8,0 – 9,0 akan menyebabkan protein bermuatan negatif. Saat elektroforesis berlangsung, protein akan bergerak dari elektroda negatif

menuju elektroda positif sampai jarak tertentu pada gel akrilamida. Semakin rendah berat molekul protein, maka semakin jauh protein bergerak. Sebaliknya, protein dengan berat molekul lebih besar akan bergerak pada jarak yang lebih pendek. Berat molekul protein yang telah dipisahkan dapat ditentukan Sebelum SDS Muatan R-grup Area Hidrofobik Sesudah SDS dengan mengukur jarak pergerakan pita protein dari tempat awal dibandingkan dengan jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal (Fatchiyah *et al.*, 2011)



Gambar 2. 6 Hasil SDS-PAGE fikosianin (C.-H. Huang *et al.*, 2021)

Hasil SDS-PAGE fikobiliprotein menunjukkan terbentuknya dua pita, menandakan protein yang berikatan silang dengan pigmen terdiri dari subunit α dan β (Gambar 2.6). Fikosianin terdiri dari subunit α dengan bobot 17 kDa dan subunit β 19 kDa. Fikoeritrin terdiri dari subunit α dengan bobot 19 kDa dan subunit β 21 kDa. Allofikosianin terdiri dari subunit α dengan bobot 16 kDa dan subunit β 18 kDa (Seo *et al.*, 2013; Sonani *et al.*, 2015).

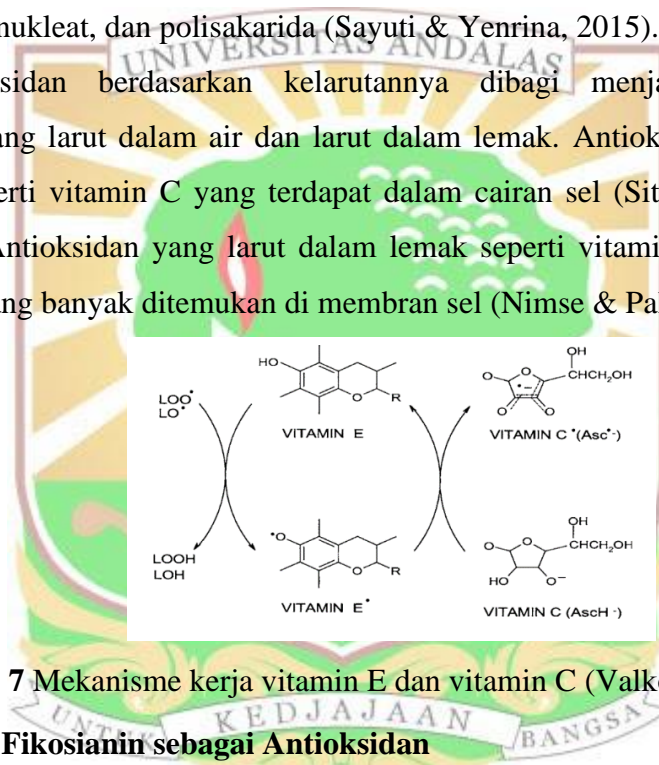
2.6 Aktivitas Antioksidan

Antioksidan memiliki kemampuan untuk menetralkan radikal bebas dengan cara memberikan elektron sehingga mencegah kerusakan sel yang disebabkan oleh stres oksidatif akibat radikal bebas (Olszowy & Dawidowicz, 2018). Antioksidan adalah senyawa yang berfungsi sebagai penyerap atau penetralisir radikal bebas sehingga dapat menghambat terjadinya penyakit-penyakit degeneratif seperti kardiovaskular, karsinogenesis, dan penyakit lainnya (Parwata, 2016). Mekanisme kerja antioksidan adalah dengan cara mendonorkan elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut bisa dihambat. Antioksidan diperlukan oleh tubuh untuk mekanisme perlindungan dari serangan

radikal bebas. Dengan adanya senyawa antioksidan ini dapat menghambat atau memperlambat kerusakan akibat proses oksidasi (Sayuti & Yennina, 2015).

Aktivitas suatu senyawa antioksidan tergantung kepada banyak faktor seperti kandungan lipid, konsentrasi antioksidan, suhu, dan tekanan oksigen. Mekanisme kerja antioksidan dalam menghambat radikal bebas berbeda-beda tergantung dari struktur kimia dan variasi mekanisme (Gambar 2.7). Antioksidan mampu menghambat reaksi oksidasi dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif sehingga dapat mencegah terjadinya kerusakan sel. Reaksi oksidasi dengan radikal bebas dalam sel sering terjadi pada molekul lipid, protein, asam nukleat, dan polisakarida (Sayuti & Yennina, 2015).

Antioksidan berdasarkan kelarutannya dibagi menjadi dua, yaitu antioksidan yang larut dalam air dan larut dalam lemak. Antioksidan yang larut dalam air seperti vitamin C yang terdapat dalam cairan sel (Sitosol dan matriks sitoplasma). Antioksidan yang larut dalam lemak seperti vitamin E, karotenoid, asam lipoik yang banyak ditemukan di membran sel (Nimse & Pal, 2015).



Gambar 2. 7 Mekanisme kerja vitamin E dan vitamin C (Valko *et al.*, 2004)

2.6.1 Pigmen Fikosianin sebagai Antioksidan

Salah satu sumber antioksidan alami adalah fikosianin dari *Spirulina platensis* yang memiliki kemampuan untuk mencegah kerusakan oksidatif yang terjadi dalam sel. Fikosianin merupakan salah satu metabolit primer yang tersusun atas proteindan fikosianobilin (Romay *et al.*, 1998) yang memiliki kemampuan sebagai hepatoprotektif, antiinflamasi, dan antioksidan. Kandungan fikosianin dalam *Spirulina platensis* dapat menghambat peroksidasi lipid sebesar 65% dibandingkan dengan antioksidan lain yang terdapat dalam *Spirulina platensis* seperti α -tokoferol (35%), butil hidroksi toluen (45%) dan β -karoten (48%) (Burhan *et al.*, 2021).

Struktur senyawa fikosianin mirip dengan struktur bilirubin. Bilirubin

adalah antioksidan endogen yang dapat mengikat radikal peroksidan lipid dengan cara mendonorkan atom hidrogen yang terikat pada atom C-10 pada molekul tetrapireol (Romay *et al.*, 1998). Karena strukturnya yang mirip, mekanisme fikosianin dalam menangkal radikalpun sama dengan bilirubin, dimana atom H pada C-10 pada molekul tetrapireolfikosianin didonorkan kepada radikal. Fikosianin adalah fikobiliprotein yang paling banyak terdapat dalam *Spirulina platensis* yang mana mengandung banyak asam amino seperti asam glutamat (GLU), asam aspartat (ASP), alanin (ALA), leusin (LEU), arginin (ARG), isoleusin (ILE), serin (SER), glisin (GLY), dan treonin (THR) dimana semua asam amino ini berperan sebagai antioksidan.

Ekstrak fikosianin yang masih dalam bentuk fikobiliprotein memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai *Inhibition concentration* 50% (IC₅₀) antara 300 – 1000 µg/mL (Margiati *et al.*, 2019). Pigmen fikosianin hasil pemurnian mampu menangkal radikal 2,2-difenil-1- pikrilhidrazil (DPPH) dengan IC₅₀ 49,59 µg/mL (Praharyawan *et al.*, 2019). Mekanisme fikosianin melawan stres oksidatif dalam tubuh adalah dengan cara meningkatkan kadar GSH, CAT, dan glukosa-6-fosfatdehidrogenase (G6PD). Fikosianin mampu mencegah penurunan kadar antioksidan enzimatik dalam tubuh yang terpapar stres oksidatif. Selain itu, fikosianin juga dapat menghambat terjadinya peroksidasi lipid akibat radikal bebas dan mengembalikan fungsi antioksidan yang mengalami penurunan akibat radikal bebas. Kemampuan fikosianin dalam menghambat peroksidasi lipid adalah dengan cara mengikat radikal hidroksil sehingga dapat menekan peroksidasi lipid (Burhan *et al.*, 2021).

2.6.2 Uji Aktivitas antioksidan

Beberapa metode uji aktivitas antioksidan secara *in vitro* adalah *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH Radical Scavenging), dan *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC) atau disebut juga *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)* (ABTS) (Zhou *et al.*, 2014). Metode DPPH merupakan metode pengujian *in-vitro* antioksidan yang mudah, cepat dan tidak banyak menggunakan reagen (Sembiring *et al.*, 2018). DPPH merupakan radikal bebas reaktif yang berperan sebagai akseptor elektron dan menyebabkan oksidasi zat lainnya.

Sedangkan antioksidan berperan sebagai donor elektron yang menetralkan DPPH (Tanha, 2017).

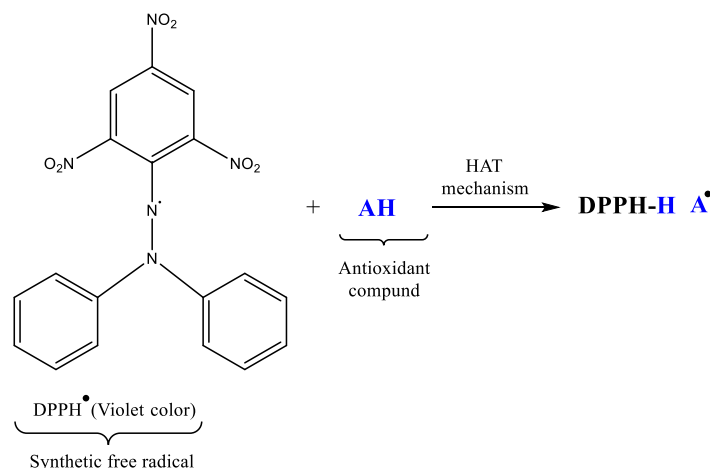
DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar, berwarna ungu yang digunakan secara luas untuk pengujian kemampuan penangkapan radikal bebas dari beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam. Metode DPPH berfungsi untuk mengukur elektron tunggal seperti transfer hidrogen sekaligus juga untuk mengukur aktivitas penghambatan radikal bebas (Fu *et al.*, 2014). Metode DPPH didasarkan pada reduksi larutan DPPH dengan larutan uji. Uji peredaman radikal DPPH merupakan uji dekolorisasi untuk mengukur kemampuan antioksidan senyawa yang secara langsung bereaksi meredam radikal DPPH (Gambar 2.8). Radikal DPPH merupakan radikal bebas dengan pusat nitrogen organik yang stabil, saat tereduksi oleh senyawa antioksidan, DPPH akan menjadi bentuk non-radikal yang tidak berwarna (Antolovich *et al.*, 2002). Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang. Perubahan warna ini akan teramati dalam bentuk penurunan absorbansi DPPH (Murwanto & Santosa, 2012). Keuntungan menggunakan metode DPPH adalah metode analisisnya sederhana, cepat, mudah dan sensitif terhadap sampel walaupun dengan konsentrasi kecil, tetapi sukar larut dengan air sehingga DPPH hanya dapat dilarutkan dengan pelarut organik (sulit untuk dianalisis terhadap senyawa yang bersifat hidrofilik).

Pengukuran aktivitas antioksidan yang dihasilkan oleh senyawa antioksidan yaitu dengan perhitungan nilai IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$ diperlukan untuk menghambat pembentukan radikal DPPH sebesar 50%) dan persen inhibisi (Mustarichie *et al.*, 2017).

Perhitungan persen inhibisi dapat dilakukan dengan menggunakan rumus berikut :

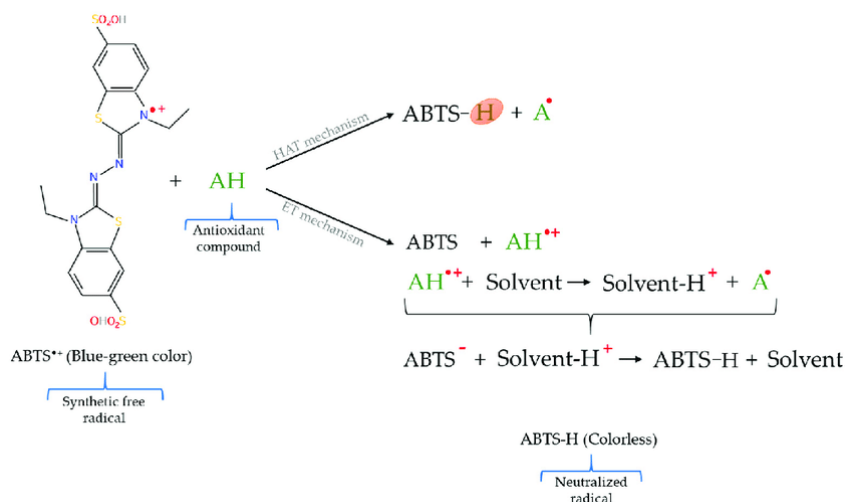
$$\text{inhibition (\%)} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{blank}}} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan berdasarkan kekuatannya dibedakan menjadi 3 yaitu sangat kuat bila $IC_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$, kuat bila nilai $IC_{50} = 50-100 \mu\text{g/ml}$, sedang pada $IC_{50} = 101-250 \mu\text{g/mL}$, dan lemah bila $IC_{50} = 250-500 \mu\text{g/mL}$, dan tergolong tidak aktif bila $IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ (Mustarichie *et al.*, 2017).



Gambar 2. 8 Mekanisme reaksi DPPH dengan senyawa antioksidan (AH : senyawa antioksidan, A : senyawa antioksidan radikal) (Echegaray *et al.*, 2021)

Metode ABTS (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*) merupakan prinsip pengujian aktivitas antioksidan dengan menghilangkan warna kation $ABTS^{\bullet+}$ untuk mengukur kapasitas antioksidan yang secara langsung bereaksi atau meredam radikal kation ABTS yang dihasilkan dari reaksi kimia (Gambar 2.9). ABTS direaksikan dengan oksidator kuat seperti $K_2S_2O_8$ (kalium persulfat) dan diinkubasi agar terbentuk radikal $ABTS^{\bullet+}$ yang berwarna biru kehijauan (Shalaby & Shanab, 2013). ABTS adalah suatu radikal dengan pusat nitrogen dengan karakteristik berwarna biru-kehijauan yang ketika tereduksi oleh senyawa antioksidan menjadi bentuk non-radikal yang tidak berwarna. Metode ABTS sangat sensitif terhadap cahaya, sehingga dalam pembentukan ABTS radikal memerlukan waktu inkubasi selama 12-16 jam dalam kondisi gelap. $ABTS^{\bullet+}$ memiliki nilai absorbansi maksimum pada panjang gelombang 734 nm (Antolovich *et al.*, 2002) dengan (absorbansi akhirnya $0,70 \pm 0,02$ (Sadeer *et al.*, 2020)). Metode ABTS memiliki keuntungan dibandingkan uji DPPH, ABTS dapat digunakan pada pH yang berbeda, bisa menguji senyawa antioksidan yang bersifat lipofilik atau hidrofilik (Shalaby & Shanab, 2013). Secara umum, senyawa antioksidan dengan kadar pigmen yang tinggi dan bersifat hidrofilik lebih bagus diuji menggunakan ABTS dibandingkan uji DPPH (Floegel *et al.*, 2011).



Gambar 2. 9 Mekanisme reaksi ABTS dengan senyawa antioksidan (Echegaray *et al.*, 2021)

Aktivitas antioksidan dinyatakan secara kuantitatif dengan IC_{50} (*Inhibitory Concentration* 50%). IC_{50} adalah konsentrasi larutan uji yang memberikan peredaman terhadap senyawa radikal sebesar 50% (Molyneux, 2004). Tingkatan aktivitas senyawa antioksidan dikatakan sangat kuat apabila $IC_{50} < 50$ mg/L; kuat, 50-100 mg/L; sedang, 100-250 mg/L; lemah, 250-500 mg/L; tidak aktif > 500 mg/L. Aktivitas antioksidan paling baik adalah dibawah 50 mg/L (Molyneux, 2004).

2.7 Aktivitas Anti Inflamasi

Inflamasi merupakan respon kompleks biologi dari jaringan pembuluh darah terhadap stimulus berbahaya seperti patogen, sel-sel tubuh yang rusak, atau iritan. Ditinjau secara molekuler, inflamasi adalah respons biologis yang melibatkan aktivasi jalur sinyal dan mediator molekuler untuk melawan ancaman terhadap homeostasis tubuh. Proses ini dimulai ketika sel-sel imun seperti makrofag, neutrofil, dan sel dendritik mengenali molekul asing atau kerusakan jaringan melalui reseptor.

Pengaktifan melalui reseptor ini memicu pelepasan mediator inflamasi seperti sitokin (misalnya, interleukin- 1β , TNF- α), kemokin, dan eikosanoid (prostaglandin dan leukotrien). Mediator ini memodulasi ekspresi molekul adhesi di dinding pembuluh darah, meningkatkan permeabilitas vaskular, dan merekrut sel imun lainnya ke lokasi inflamasi. Inflamasi ditandai dengan peningkatan umum dalam kadar plasma dan kemampuan sel untuk menghasilkan sitokin pro-inflamasi. TNF adalah mediator utama inflamasi, dengan respon yang diarahkan pada

kerusakan dan pemulihan jaringan. Saat menginduksi kematian sel yang sakit di tempat peradangan, TNF dapat menghancurkan pembuluh darah.

Studi *in vitro* uji anti inflamasi membantu mempelajari respons seluler dalam sistem tertutup di mana kondisi eksperimental dipertahankan. Terdapat berbagai metode untuk uji antiinflamasi *invitro*, diantaranya uji penghambatan siklooksigenase dan 5-lipooksigenase, uji stabilisasi membran, serta uji penghambatan denaturasi protein (Sarveswaran *et al.*, 2017). Sel darah merah manusia (eritrosit) telah digunakan sebagai suatu model untuk mempelajari interaksi antara senyawa kandidat obat dan membran. Ketika sel darah merah mengalami stress hipotonik, pelepasan hemoglobin (Hb) dari sel darah merah dapat dicegah oleh agen anti inflamasi (N. S. Kumar, 2011). Uji stabilisasi membran didasarkan pada penghambatan hipotonisitas dan lisis membran sel darah merah. Membran sel darah merah memiliki struktur yang mirip dengan membran sel lainnya, salah satunya adalah membran lisosom yang terlibat sangat penting dalam proses inflamasi. Dalam kondisi yang tidak stabil, lisosom melepaskan berbagai komponen seperti protease, radikal bebas, dan enzim yang dapat merusak membran sel, yang mengarah pada kondisi inflamasi sel. Oleh karena itu, stabilisasi membran lisosom penting untuk mengontrol respon inflamasi (Sarveswaran *et al.*, 2017). Stabilisasi membran lisosomal dapat menghambat pelepasan konstituen lisosomal dari aktivasi neutrofil seperti enzim bakterisidal dan protease yang dapat menyebabkan peradangan pada jaringan dan kerusakan selama *extra celluler release* (S. Kumar & Kumar R, 2011)

2.8 Aktivitas Anti Kanker

2.8.1 Kanker Payudara

Kanker merupakan penyakit yang disebabkan oleh pertumbuhan sel yang tidak normal didalam tubuh. Pertumbuhan sel abnormal dan proliferasi yang tidak terkendali dapat merusak jaringan didekatnya dan kadang bermetastasis ke jaringan lainnya. Jika proliferasi ini dibiarkan berlanjut akan memberikandampak yang fatal. Kanker melibatkan perubahan dan mutasi genom sel, perubahan (mutasi DNA) ini akan menghasilkan suatu protein yang mengganggu keseimbangan antara pembelahan dan pertahanan sel, sehingga menghasilkan sel yang terus membelah untuk membentuk kanker. Pada sel abnormal proliferasi pada sel diikutioleh mutasi kedua

hingga ke tahap yang lebih lanjut, putaran mutasi yang berurutan dan ekspansi ini mengakibatkan sel-sel menghasilkan pembentukan massa tumor. Putaran dan ekspansi berikutnya akan menyebabkan pertumbuhan dan perkembangan tumor yang akhirnya menembus penghalang membran besar disekitar jaringan dan menyebar kebagian tubuh lainnya (Hejmadi, 2010).

Kanker payudara merupakan kanker metastasis dan dapat menyebar ke organ lain seperti tulang, paru-paru, hati, dan otak (Sun *et al.*, 2017). Di Indonesia 80% kejadian kanker payudara ditemukan pada stadium lanjut, dimana pada stadium ini upaya pengobatan sulit dilakukan (Kemenkesri, 2015).

Berdasarkan tanda gennya kanker payudara dibagi menjadi beberapa subtype (Makki, 2015):

1. Luminal A. Sebanyak 50% kanker payudara invasif termasuk dalam tipe ini, dimana jenis tipe ini memiliki ER (reseptor estrogen) /PR (reseptor progesteron) atau HER2 negatif.
2. Luminal B. Terdiri dari 20% kanker payudara invasif yang memiliki ER/PR positif, sedangkan HER/neu nya mengekspresikan variabel (positif/negative).
3. Ekspresi yang berlebihan HER2. Kelompok ini menyumbangkan 15% dari semua sel kanker payudara invasif. Biasanya ER/PR negatif sedangkan menurut defenisi HER/neu sangat positif. Ekspresi Ki-67 tinggi dan TP53 umum terjadi.
4. Like basal. Kelas ini memiliki pola ekspresi yang mirip dengan sel epitel basal dan sel mioepitel normal mammae. Biasanya CK5/6 dan / atau EGFR positif, ER/PR negatif, dan HER2 negatif (triple negatif) dengan indeks Ki-67 dan mutasi TP53 tinggi, biasanya terdiri sekitar 15% dari semua kanker payudara invasif (Makki, 2015).

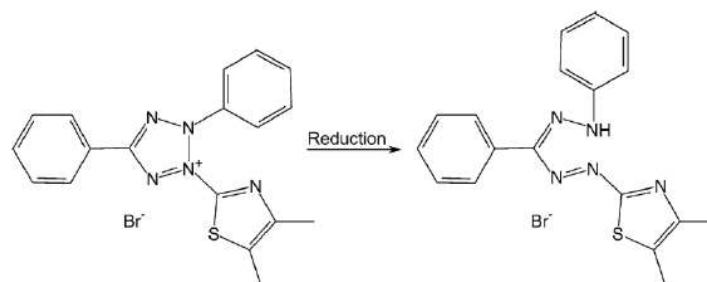
2.8.2 Sel Kanker Payudara T47D

T47D merupakan *cell line* kanker payudara yang diperoleh dari jaringan duktal wanita yang berusia 54 tahun. *Cell line* merupakan populasi sel yang diturunkan dari satu jenis sel dalam organisme hidup, biasanya dihidupkan dalam waktu cukup lama secara in-vitro. Pada penelitian kanker payudara digunakan sel yang karakteristik fenotif dan molekuler yang berbeda misalnya MCF-7, T47D dan

SUM18, ketiga sel ini termasuk ke dalam subtipe sel luminal A, sedangkan untuk kanker payudara BTB74 dan ZR-75 termasuk ke dalam *cell line* tipe luminal B. *Cell line* MCF-7 dan T47D mempertahankan karakteristik utama yaitu khusus pada epitel mammae, *cell line* ini sensitif terhadap hormon estrogen melalui reseptor alfa estrogen (ER α) di dalam membran sitosol sehingga disebut ER α luminal A positif (Yu *et al.*, 2017)

Cell line MCF-7 dan T47D memiliki karakteristik fenotip dan molekuler yang serupa, namun *cell line* ini memiliki perbedaan pada pengakspresikan 164 proteinnya melalui eksperimen dua elektroferesis gel dua dimensi dan spektrometri massa. Secara khusus *cell line* T47D ini sangat rentan terhadap progesteron, sedangkan garis MCF-7 tidak merespon progesteron dengan adanya estrogen (Makki, 2015).

Uji sitotoksitas suatu senyawa dapat dilakukan dengan metode MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide), yaitu sebuah metoda yang digunakan untuk memeriksa viabilitas *cell line*. Metode ini dilakukan dengan uji kalorimetri untuk menilai sitotoksik suatu sampel. MTT merupakan garam tetrazolium yang direduksi menjadi kristal formazan yang berwarna ungu. Enzim mereduksi yang berada dalam sel yang aktif secara metabolik, enzim yang terlibat dalam proses ini adalah enzim suksinat dehidrogenase didalam mitokondria dapat dilihat pada (Gambar 2.10). Proses kimia yang mendasari uji MTT adalah reaksi reduksi oleh enzim suksinat dehidrogenase yang terdapat didalam mitokondria pada sel hidup. Saat tereduksi, MTT yang berwarna kuning akan membentuk formazan yang berwarna ungu absorbansinya dapat dibaca menggunakan *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) reader pada panjang gelombang antara 570 nm. Absorbansi yang semakin besar menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup. Reaksi reduksi MTT dapat dilihat pada Gambar 2.10 (Stoddart, 2011).



Gambar 2. 10 Reaksi reduksi MTT

Uji aktivitas sitotoksik digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} digunakan untuk menunjukkan kadar konsentrasi yang menghasilkan penghambatan proliferasi 50% dan menunjukkan potensi suatu senyawa dalam menghambat pertumbuhan suatu sel, semakin besar nilai IC_{50} maka senyawa tersebut semakin tidak toksik (Ismaryani *et al.*, 2018).

