

## Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Pigmen Karotenoid yang Diisolasi dari Makroalga Hijau *Halimeda discoidea*

Nelli Agusti<sup>1\*</sup>, Ahyar Ahmad<sup>1</sup>, Seniwati Dali<sup>2</sup>

Laboratorium Biokimia  
Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Hasanuddin  
Jln. Perintis Kemerdekaan Km.10, Makassar 90245  
Alamat Korespondensi: agustikimnelli@yahoo.com

### Abstract

The test about antioxidant activity and toxicity of carotenoid pigment isolated from *Halimeda discoidea* green macroalgae has been done. Carotenoid pigment was isolated by maceration technique using n-hexane solvent. Saponification of chlorophyll and precipitated using methanol absolute. The test antioxidant activity using DPPH method and toxicity using BSLT method. Identify the functional groups of compounds with FTIR spectroscopy and UV-Vis spectroscopy. The maximum wavelength of carotenoid compounds obtained by the 446.5 nm showed similarities with the maximum wavelength literature. The result showed that the carotenoid pigment of n-hexane fraction has strong antioxidant activity with  $IC_{50}$  is 99.65 ppm but is not active against *Artemia salina* with  $LC_{50} > 1000$  ppm. The research result indicated that the *Halimeda discoidea* role as immunostimulant for marine organism so that not toxic effect on *Artemia salina*.

Key words: Green macroalgae, *Halimeda discoidea*, carotenoid, antioxidant, toxicity

### Abstrak

Uji aktivitas antioksidan dan toksisitas pigmen karotenoid yang diisolasi dari makroalga hijau *Halimeda discoidea* telah dilakukan. Pigmen karotenoid diisolasi dengan teknik maserasi menggunakan pelarut n-heksana p.a. dan saponifikasi klorofil serta diendapkan dengan menggunakan metanol *absolute*. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, uji toksisitas dengan metode BSLT, identifikasi gugus fungsi senyawa dengan spektroskopi FTIR dan spektroskopi UV-Vis. Panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{maks}$ ) senyawa karotenoid yang diperoleh yaitu 446,5 nm menunjukkan kemiripan dengan  $\lambda_{maks}$  literatur. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pigmen karotenoid fraksi n-heksana memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai  $IC_{50}$  99,65 ppm, namun tidak bersifat aktif terhadap *Artemia salina* Leach (tidak toksik) dengan nilai  $LC_{50} > 1000$  ppm. Hasil penelusuran menunjukkan bahwa *Halimeda discoidea* berperan sebagai immunostimulan bagi organisme laut, sehingga tidak memberikan efek toksik terhadap *Artemia salina*.

Kata kunci: Makroalga hijau, *Halimeda discoidea*, karotenoid, antioksidan, toksisitas.

## PENDAHULUAN

Makroalga merupakan salah satu organisme laut yang berperan dalam siklus rantai makanan sebagai produser primer. Makroalga laut memproduksi berbagai senyawa yang terdiri dari senyawa primer yang bersifat esensial bagi proses metabolisme sel seperti fikokoloid, vitamin, asam lemak tak jenuh (UFA) dan karbohidrat. Senyawa sekunder (metabolit sekunder) adalah senyawa metabolit yang tidak esensial bagi pertumbuhan organisme dan ditemukan dalam bentuk yang unik atau berbeda-beda antara spesies yang satu dan lainnya. Setiap organisme biasanya menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang berbeda-beda seperti terpenoid, steroid, kumarin, flavonoid, dan alkaloid, fungsi metabolit sekunder adalah untuk mempertahankan diri dari kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan (Deval dkk., 2001).

Berbagai jenis rumput laut yang terdapat di seluruh dunia yang berkhasiat sebagai obat, ternyata beberapa marga di antaranya merupakan marga yang terdapat umum tumbuh dan tersebar luas di perairan laut Indonesia. Marga-marga tersebut antara lain adalah *Acanthophora*, *Gracilaria*, *Gelidium*, *Hypnea*, *Sargassum*, *Codium*, *Halimeda* dan *Ulva* (Atmadja, 1992).

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Oktober 2015 di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu

### Ekstraksi Komponen Pigmen dan Saponifikasi Klorofil

Simplisia sebanyak 400 gram dipotong-potong dan diblender kemudian dimaserasi

Berdasarkan beberapa hasil penelitian, makroalga merupakan salah satu penghasil karotenoid terbesar. Makroalga hijau secara umum mengandung senyawa klorofil *a* dan *b* serta senyawa karoten yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. Umumnya, senyawa kimia yang dihasilkan oleh jenis makroalga hijau adalah senyawa terpenoid dan senyawa aromatik yang memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi, antimikroba, antivirus, antimutagen dan insektisida (Tamat dkk., 2007).

Karotenoid menunjukkan aktivitas biologis sebagai antioksidan, mempengaruhi regulasi pertumbuhan sel dan memodulasi ekspresi gen dan respon kekebalan tubuh. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat mencegah proses oksidasi radikal bebas. Pada manusia, reaksi oksidasi didorong oleh spesies oksigen reaktif yang jika tidak dinonaktifkan oleh karotenoid maka akan menyebabkan kerusakan protein dan mutasi DNA dan pada akhirnya dapat menyebabkan penyakit kardiovaskular, beberapa jenis kanker, penyakit degeneratif dan penuaan dini (Rao dan Rao, 2007). Komposisi pigmen yang terdapat pada *Halimeda discoidea* berasal dari golongan karotenoid yaitu -karoten, di samping adanya pigmen fotosintesis seperti klorofil (Supardy dkk., 2011).

Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, sedangkan pengambilan sampel dilakukan di perairan Punaga, Takalar, Sulawesi selatan

(sampai seluruh jaringan terendam) dengan pelarut n-heksana kualitas p.a. Maserat disaring dengan menggunakan kertas saring, kemudian pelarut diuapkan kembali dengan

menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh fraksi ekstrak kasar pigmen. Ekstrak kasar n-heksana ditambahkan 20 % KOH dalam metanol perbandingan 1:1. Kemudian diaduk perlahan dengan menggunakan *shaker* pada kecepatan 120 rpm. Setelah *dishaker* kemudian didiamkan selama 24 jam. Setelah

### **Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan pada 5 x 7,5 cm pelat silika gel, 5 µL ekstrak spesies Makroalga hijau ditotolkan pada pelat KLT 1 cm di atas plat dasar dan dielusi dengan pelarut campuran n-heksana/aseton (75 : 25 v/v).

### **Analisis Panjang gelombang Maksimum dengan Metode Spektroskopi UV-Vis**

Ekstrak yang diperoleh dari hasil isolasi kemudian diidentifikasi panjang gelombang maksimumnya ( $\lambda_{maks}$ ) dengan menggunakan Spektroskopi UV-Visible. Kromatogram yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan kromatogram senyawa karotenoid standar murni.

### **Identifikasi Gugus Fungsi Menggunakan Spektroskopi FTIR**

Ekstrak yang diperoleh kemudian diidentifikasi gugus fungsinya dengan menggunakan spektroskopi FTIR, kemudian dibandingkan dengan gugus fungsi yang diperoleh dari hasil analisis spektroskopi FTIR senyawa karotenoid standar murni.

### **Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH**

Larutan stok dari ekstrak kasar pigmen fraksi n-heksana dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan stok dibuat

didiamkan ekstrak yang diperoleh kemudian difraksinasi dengan eter dan akuades dalam corong pisah. Lapisan eter dicuci dengan akuades kemudian dikeringkan dengan natrium sulfat anhidrat. Pelarut yang tersisa diuapkan kembali dengan menggunakan *evaporator*. Selanjutnya akan diperoleh ekstrak kasar pigmen karotenoid.

seri konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50 ppm dengan memipet larutan stok berturut-turut 50, 100, 150, 200, dan 250 µL. Larutan DPPH ditambahkan sebanyak 1000 µL, dan dicukupkan volumenya hingga 5 mL dengan metanol *absolute*, dan sebagai pembanding digunakan vitamin C dengan seri konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm. Campuran tersebut dikocok dan dibiarkan selama 30 menit pada suhu kamar dan pada ruangan yang terlindung dari cahaya matahari. Absorban (A) diukur pada panjang gelombang 500 nm dengan Spektrofotometer UV-Visible. Selanjutnya, dihitung persentase inhibisi (hambatan) dan nilai  $IC_{50}$  (50 % *Inhibition Concentration*). Perhitungan kuantitatif dilakukan dengan menentukan persen inhibisi radikal bebas dari masing-masing sampel. Data nilai % inhibisi digunakan untuk menghitung nilai  $IC_{50}$  (ppm) dengan menggunakan analisis probit dengan selang kepercayaan 95 % (Tamat dkk., 2007).

### **Uji Toksisitas Menggunakan Metode BSLT**

Ekstrak kasar pigmen fraksi n-heksana dibuat larutan stok dengan konsentrasi 5000 ppm. Selanjutnya, dibuat seri konsentrasi sampel uji sebesar 10, 20, 40, 80, 100 dan 200 ppm dari larutan stok tersebut dengan pengenceran menggunakan air laut. Sebagai kontrol, digunakan DMSO dalam air laut.

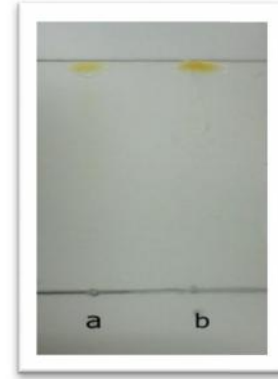
Sepuluh ekor larva *Artemia salina* Leach dimasukkan ke dalam tabung yang berisi sampel uji dan kontrol. Volume tabung dicukupkan hingga 5 mL dengan air laut. Masing-masing perlakuan sampel uji dan

kontrol dilakukan tiga kali ulangan. Selanjutnya, semua tabung diinkubasikan di bawah sinar lampu selama 24 jam. Setelah diinkubasi, jumlah larva *Artemia salina* Leach yang mati pada tiap tabung dilihat dengan bantuan kaca pembesar dan dihitung untuk menentukan persentase kematiannya. Nilai *Lethal Concentration* ( $LC_{50}$ ) dihitung menggunakan analisis probit dengan selang kepercayaan 95%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Kristal karotenoid yang diperoleh pada proses isolasi yakni sebesar 0,0582 gram dengan persen kandungan pigmen sebesar 0,017 %. Hasil yang sangat kecil ini, diduga karena karoten yang ada dalam sampel telah teroksidasi menjadi senyawa-senyawa hasil degradasi karoten yang teroksidasi.

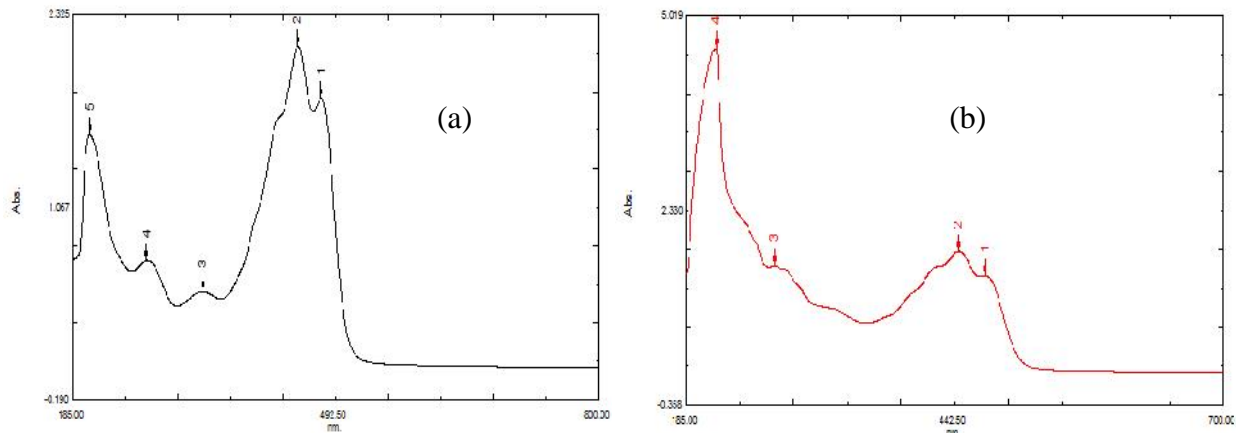
Berdasarkan gambar 1. spot KLT pigmen hasil isolasi dengan dua jenis eluen yang berbeda kepolaran menunjukkan bahwa pigmen yang diperoleh tidak lagi mengandung pengotor. Hal ini ditandai dengan tidak adanya spot pengotor terpisah dan hanya menunjukkan spot tunggal. Selain itu, spot pigmen hasil isolasi menunjukkan nilai  $R_f$  yang besar dan mirip dengan nilai  $R_f$  pigmen  $\beta$ -karoten murni (pembanding) dikarenakan pigmen hasil isolasi cenderung mengikuti eluen yang sifat kepolarannya sama.



Gambar 1. Hasil Uji Kemurnian KLT (a) pigmen yang diduga karotenoid dan (b)  $\beta$ -karoten (pembanding)

Secara struktur, serapan pigmen-pigmen baik klorofil, karoten maupun xantofil yang berada pada rentang daerah sinar tampak didasarkan pada keberadaan sistem ikatan rangkap terkonjugasi yang cukup panjang.

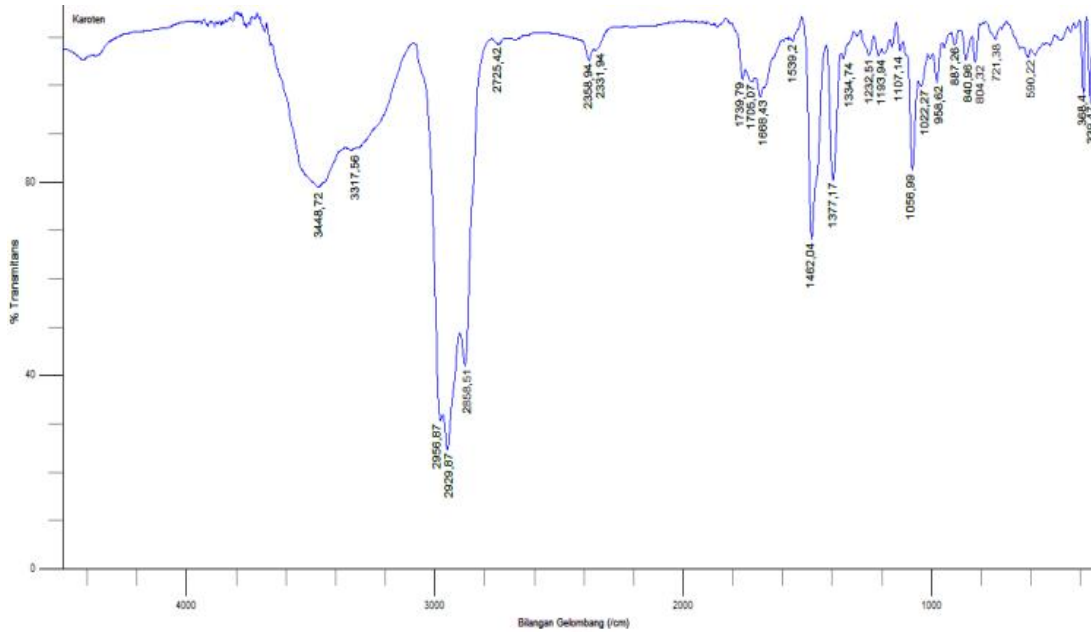
Spektrum UV-Vis senyawa karotenoid hasil isolasi yang diperoleh terlihat seperti pada gambar 2. Pada data tersebut menunjukkan bahwa dari segi puncak yang terbentuk, karoten yang diperoleh telah memberikan spektrum yang sangat mirip dengan spektrum  $\beta$ -karoten (pembanding). Nilai panjang gelombang maksimum yang diperoleh yaitu 446,5 nm.



Gambar 2. Spektrum UV-Vis senyawa  $\beta$ -karoten (a) dan pigmen hasil isolasi (b)

Berdasarkan data Spektroskopi FTIR yang diperoleh pada gambar 3. menunjukkan bahwa pada pigmen karotenoid yang diperoleh dari hasil isolasi terdapat gugus -OH yang ditunjukkan oleh serapan pada bilangan gelombang 3448,72  $\text{cm}^{-1}$ . Pada bilangan gelombang 3317,56  $\text{cm}^{-1}$  terdapat gugus C=C. Gugus -CH alifatik ditunjukkan pada bilangan

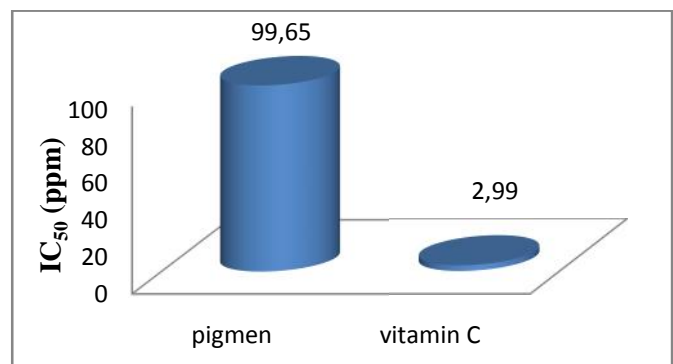
gelombang 2929,87  $\text{cm}^{-1}$  yang didukung adanya serapan pada bilangan gelombang 1462,04  $\text{cm}^{-1}$  yang merupakan tekukan -CH<sub>2</sub>. Pada bilangan gelombang 1668,43  $\text{cm}^{-1}$  terdapat gugus C=O. Gugus CH<sub>3</sub> dan C-O berturut-turut ditunjukkan pada bilangan gelombang 1377,17  $\text{cm}^{-1}$  dan 1056,99  $\text{cm}^{-1}$ .



Gambar 3. Spektrum FTIR pigmen karotenoid hasil isolasi

### Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan untuk mengetahui potensi aktivitas antioksidan senyawa dalam ekstrak berdasarkan prinsip adanya reaksi penangkapan hidrogen dari antioksidan oleh radikal bebas difenil pikril hidrazil (DPPH). Penangkap radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang kemudian menyebabkan penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Sunarni dan Wikanta, 2005).



Gambar 4. Diagram nilai IC<sub>50</sub> Pigmen *Halimeda discoidea* dari fraksi n-heksana dan Vitamin C (Kontrol positif)

Diagram pada gambar 4 menandakan bahwa pigmen karotenoid fraksi n-heksana memiliki kemampuan penghambatan radikal bebas yang kuat. Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah vitamin C. Vitamin C merupakan antioksidan yang larut dalam air. Penggunaan kontrol positif pada pengujian aktivitas antioksidan ini adalah untuk mengetahui seberapa kuat potensi antioksidan yang ada pada pigmen karotenoid jika dibandingkan dengan vitamin C. Apabila nilai  $IC_{50}$  sampel sama atau mendekati nilai  $IC_{50}$  kontrol positif maka dapat dikatakan bahwa sampel berpotensi sebagai salah satu alternatif antioksidan yang sangat kuat.

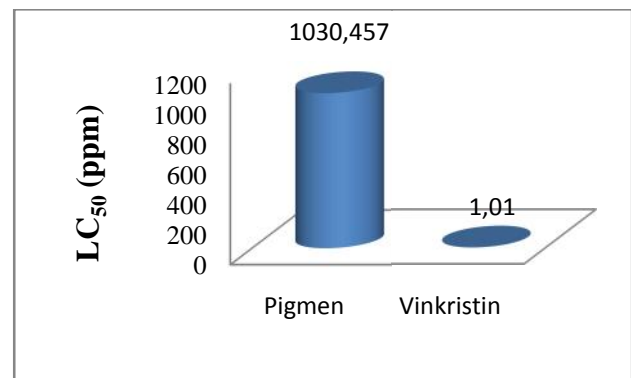
Semakin tinggi konsentrasi suatu ekstrak maka semakin rendah pula absorbannya. Adanya penurunan absorbansi menunjukkan peningkatan kemampuan peredaman radikal bebas DPPH. Sehingga, berdasarkan hubungan tersebut dapat dinyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi pula kemampuan penghambatan radikal bebas.

### Uji Toksisitas

Uji toksisitas merupakan tahap awal untuk memprediksi suatu senyawa yang bersifat toksik pada sel. Metode ini menggunakan hewan uji larva *Artemia salina* leach. Uji toksisitas dengan metode BSLT ini merupakan uji toksisitas akut dimana efek toksik dari suatu senyawa ditentukan dalam waktu singkat, yaitu rentang waktu selama 24 jam setelah pemberian dosis uji (Sukardiman dkk., 2006).

Hasil uji toksisitas dengan metode BSLT dapat diketahui dari jumlah kematian larva udang *Artemia salina* Leach karena

pengaruh ekstrak atau senyawa bahan alam tertentu dari dosis yang telah ditentukan. Tingkat toksisitas dari ekstrak tumbuhan dapat ditentukan dengan melihat nilai  $LC_{50}$ . Suatu ekstrak bahan alam dikatakan toksik berdasarkan metode BSLT jika harga  $LC_{50} < 1000$  ppm (Wikanta dkk., 2005).



Gambar 5. Diagram nilai  $LC_{50}$  pigmen karotenoid *Halimeda discoidea* dari fraksi n-heksana dan Vinkristin (kontrol positif)

Hasil yang diperoleh seperti yang terlihat pada gambar 5 menunjukkan bahwa pigmen karotenoid *Halimeda discoidea* tidak bersifat toksik terhadap hewan uji *Artemia salina* Leach ( $LC_{50} > 1000$  ppm). *Halimeda discoidea* dikenal kaya akan mineral berupa Fe (45,37 ppm), Mn (6,94 ppm), Zn (10,88 ppm) dan Cu (3,01 ppm) yang merupakan mineral esensial untuk aktivitas superoksida dismutase (Bendich, 1993 dalam Subagiyo, 2009). Berdasarkan fakta tersebut dapat diketahui bahwa pigmen karotenoid *Halimeda discoidea* tidak bersifat aktif (toksik) terhadap hewan uji *Artemia salina* Leach, bahkan sebaliknya sangat berperan penting terhadap organisme laut karena selain sebagai sumber nutrisi yang didukung oleh kandungan mineral yang tinggi, juga berperan dalam sistem pertahanan (immunostimulan).

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Persen kandungan pigmen karotenoid yang dihasilkan yaitu sebesar 0,017 %.
2. Hasil identifikasi senyawa menggunakan spektroskopi FTIR dan UV-Vis menunjukkan bahwa isolat merupakan ekstrak pigmen karotenoid.

3. Pigmen hasil isolasi memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 99,65 ppm. Namun, tidak memberikan efek toksisitas terhadap *Artemia salina* dengan nilai  $LC_{50} > 1000$  ppm.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anggadiredja, J. T., A. Zalnika, H. Purwoto dan S. Istini. 2006. *Rumput Laut*. Cetakan I. Swadaya, Jakarta.
- Atmadja, W.S., 1992, Rumput Laut Sebagai Obat, *Jurnal Oseana*, **17**(1): 1-8.
- Deval, A.G., G. Platas, A. Basilio, A.Cabello, J. Gorrochategui, I.Suay, F. Vicente, E. Portillo, M.J. del Rio, G.G. Reina, F.Peláez, 2001, Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *Int. Microbiologi*, **4**: 35-40.
- El-Baky, A., El-Baz, dan El-Baroty, 2007, Production of Carotenoids From Marine Microalgae and Its Evaluation as Safe Food Colorant and Lowering Cholesterol Agent, *Am Euras J Agric and Environ*, **2**: 792-800.
- Kumar, V., Ramzi S., dan Stanley L., 2003, *Robbins Basic Pathology* 7<sup>th</sup> ed, Elsevier Inc., New York.
- Meyer, B. N., N.R. Ferrigni, J.E. Putman, L.B. Jacobsen, D.E. Nicols dan J.L.
- McLaughlin, 1982, Brine Shrimp : A Convenient general Bioassay For Active Plant Constituents. *Planta Medica*, **45**:31-34.
- Molyneux, P., 2004, The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *Songklanakarian J Sci Technol*, **26**(2): 211-219.
- Nawaly, H., Susanto, A.B., dan Uktolseja, J.L.A., 2014, Aplikasi Antioksidan dari Rumput Laut, Universitas Diponegoro.
- Rao, AV., dan Rao, L.G., 2007, Carotenoids and Human Health, *Pharmaco Res*, **55**: 207-216.
- Ridho, E. A., 2013, Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Buah Lakum (*Cayratia Trifolia*) Dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil), Skripsi, Universitas Tanjungpura, Pontianak.

- Romimohtarto, K dan Sri Juwana, 1999, *Biologi Laut, Ilmu Pengetahuan Tentang Biota Laut*, Penerbit Djambatan, Jakarta.
- Subagiyo, 2009, Uji Pemanfaatan Rumput Laut *Halimeda* sp. Sebagai Sumber Makanan Fungsional untuk Memodulasi Sistem Pertahanan Non Spesifik pada Udang Putih (*Litopenaeus vannamei*), *Jurnal ilmu kelautan*, **14**(3): 142-149.
- Supardy, N.A., Ibrahim, D., Sulaiman, S.F., and Zakaria, N.A., 2011, Free Radical Scavenging Activity, Total Phenolic Content and Toxicity Level of *Halimeda discoidea* Extracts (Malaysia's Green Macroalgae), *International Journal of Pharmacy and Pharmacheutical Sciences*, **3** (5): 2-8.
- Suparmi, Sahri, A., Mengenal Potensi Rumput Laut, *Jurnal Manajemen Sumber Daya*, **44**(118): 95-116.
- Susanto, A.B., 1995, Ekologi *Halimeda* sp. di Perairan Jepara, FIKP, Universitas Diponegoro.
- Tamat, S.R., Wikanta, T., dan Maulina, L.S., 2007, Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Rumput Laut Hijau *Ulva reticulate* Forsskal, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, **5** (1):31-36.
- Wikanta, T., Januar, H.I., dan Nursid, M., 2005. Uji Aktivitas Antioksidan, Toksisitas dan Sitotoksisitas Ekstrak Alga Merah (*Rhodomenia palmate*). *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia*, **11**(4): 41-49.
- Winarsi, 2007, Antioksidan Alami dan Radikal Bebas: Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan, *Kanisius*, **20**: 77-111.