



Identifikasi Dan Uji Penangkapan Radikal 2,2 Difenil-1-Pkrihidrazil (DPPH) Dari Ekstrak Kasar Pigmen Bakteri Simbion Rumput Laut

Identification and Arrest Test of 2,2 Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) Radical From Crude Extract Pigment of Seaweed Symbion Bacteria

Tien Nova B. Yenusi,¹ Popy Ida L. Ayer², Iriani Ira Bukorpioper³, Jotje.A. Ingratubun¹, Albida Rante Tasak¹

¹Program Studi Manajemen Sumberdaya Perairan Fakultas Pertanian Kehutanan Kelautan Universitas Ottow Geissler Papua.

²Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Ottow Geisler Papua.

³Jurusan Ilmu Kelautan dan Perikanan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Cenderawasih.

Correspondence :

*jeremylucki212@gmail.com

Keywords :

Antioxidants
Macro Algae
Symbion Bacteria
Papua

Article Information :

Received : Maret, 2023

Accepted : April, 2023

Published : April, 2023

DOI: [10.35308/jlik.v5i1.7441](https://doi.org/10.35308/jlik.v5i1.7441)

Abstract

Seaweed belongs to the group of natural antioxidants, in which these antioxidants are able to counteract free radicals. Secondary metabolites that are antioxidants include alkaloids, flavonoids, phenolic compounds, steroids, and terpenoids and carotenoids. This study aimed to identify and test the radical scavenging of 2,2 diphenyl-1-pkrylhydrazyl (DPPH) from the crude extract of macroalgae symbiont pigment *Turbinaria conoides* originating from the coastal waters of Hamadi Jayapura, Papua. The method used was an experimental method by identifying pigments using Thin Chromatography (TLC), and for Antioxidant testing using the DPPH Method. By employing TLC plate Spot 1 on the yellow TLC plate, with a Retardation frequency (Rf) value of $5/8 = 0.62$, carotenoid was identified. The pigment extract of the TC.11 symbiont bacterial pigment extract also had antioxidant potential which was tested by the DPPH method. The IC₅₀ value of TC.11 bacteria of 24315 ppm compared to the β -carotene marker of 4103 ppm.

PENDAHULUAN

Rumput laut atau makro alga adalah sumberdaya hayati laut yang sangat melimpah dan beranekaragam di wilayah pesisir atau perairan. (Diachanty, *at al* 2017). Dengan kata perairan

Indonesia memiliki total biodiversitas makro alga di dunia (Sanger *et al*, 2018) sehingga memiliki peluang untuk menggali potensi senyawa bioaktif sebagai penangkal radikal bebas seperti Pigmen rumput laut selain berfungsi sebagai pewarna, juga mempunyai

banyak manfaat bagi kesehatan. Komposisi senyawa bioaktif, teristimewa pigmen rumput laut yang sangat bervariasi memberikan keunikan tersendiri yang hingga saat ini belum banyak terungkap (Basir *et al.*, 2017) seperti pigmen Karotenoid.

Karotenoid adalah golongan pigmen yang memiliki potensi dibidang kesehatan yang banyak ditemukan dari rumput laut. Pigmen beta karoten atau karotenoid merupakan pigmen yang berwarna orange dan memiliki banyak manfaat dan banyak bagi masyarakat umum yang memanfaatkan pigmen tersebut untuk berbagai kebutuhan (Bauernfeind (1981). Contohnya Kekhawatiran terhadap efek samping antioksidan sintetik yaitu bersifat karsinogenik, berdasarkan uji toksikologi dapat memicu berkembangnya sel-sel kanker (Kumar *et al.* 2008), maka antioksidan alami menjadi alternatif terpilih. Antioksidan alami mampu melindungi tubuh terhadap kerusakan yang disebabkan spesies oksigen reaktif tanpa efek samping, mampu menghambat penyakit degeneratif serta mampu menghambat peroksidasi lipid (Ganesan *et al.*, 2008). Antioksidan dari rumput laut telah banyak dilaporkan di antaranya sumber nutrasetika seperti rumput laut jenis *Sargassum aquifolium* (Firdaus, 2013), ekstrak rumput laut juga memiliki potensi antioksidan (Yanuarti *et al.*, 2017).

Keanekaragaman pigmen Rumput Laut yang memiliki banyak Potensi sebagai senyawa bioaktif juga mempunyai peluang dalam suatu ekosistem laut, yang memegang peran biologis dan ekologis yang penting karena organisme ini menyediakan nutrisi, sangat beragam disebabkan tempat reproduksi dan lingkungan hidup bagi organisme lain. Peranan tersebut menjadikan rumput laut sebagai organisme penting dalam menjaga kestabilan ekosistem laut. Salah satunya adalah mampu memberikan habitat yang nyaman bagi mikroorganisme seperti bakteri yang berasosiasi dengan rumput laut atau sebut Bakteri Symbion.

Bakteri Symbion adalah bakteri yang hidup bersimbiosis dengan suatu inang seperti rumput laut, bakteri symbion diduga dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang mirip dengan inangnya. Produksi senyawa bioaktif dari mikroba symbion diperkirakan lebih efisien dan ekonomis

dibandingkan bila menggunakan organisme inangnya diperkirakan minimal 25 mikroba yang dapat kultur atau isolasi dari rumput laut atau makroalga sudah mampu meberikan metabolit sekunder yang memiliki potensi dibidang farmasi atau obat – obatan (Proksch *et al.*, 2002; Burgess, *et al.*, 2003). Oleh karena itu dalam penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi bakteri Symbion yang hidup berasosiasi dengan Rumput Laut *Turbinaria conoides* yang berasal dari pantai Hamadi Jayapura Papua dengan mengeksplor Potensi antioksidan dari rumput laut tersebut dengan menggunakan metode DPPH.

Menurut Hanani *et al.*, 2005 bahwa metode peredaman radikal bebas DPPH (1,1- difenil-2- pikrilhidrazil) merupakan metode pengujian antioksidan yang memerlukan sedikit sampel, sederhana, mudah, cepat dan peka mengeksplorasi potensi dan aktifitas antioksidan dari senyawa bahan alam atau sumber biopigmen Bakteri symbion yang berasosiasi dengan rumput laut sebagai penangkal radikal Bebas atau sebagai Potensi Antioksidan.

METODE

Metoda Sampling

Metoda yang digunakan dalam peneltian ini adalah metode purposif, artinya rumput laut diambil tidak semua jenis tetapi jenis rumput laut coklat yang berjenis *Turbinaria conoides* dan sampel rumput laut diambil dari lokasi pantai Hamadi Jayapura Papua.

Isolasi Bakteri yang Berasosiasi dengan Rumput Laut

Proses isolasi bakteri dari rumput laut di lakukan menggunakan metode sebaran (Radjasa *et al.*, 2007). Sampel rumput laut 10 gram dimasukan kedalam wadah cawan petri yang berisi air laut steril, dan selanjutnya di potong secara halus tetapi tidak semua bagian *tallus* dari rumput digunakan namun jaringan yang secara visual diduga dapat memberikan habitat yang baik untuk penempelan mikroorganisme symbion, Isolasi bakteri symbion dengan menggunakan prosedur pengenceran oleh kerja

oleh Radjasa *et al.*, 2007). 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 rumput laut.

Ekstraksi Pigmen

Pellet bakteri simbion yang sudah diperoleh dari metode strek sebanyak ± 5 mL diekstraksi dengan menggunakan metanol 100% dan diekstraksi dengan menggunakan pelarut aseton:metanol 7:3 didalam wadah botol Vial selama ± 30 menit Ekstraksi dilakukan secepat mungkin untuk menghindari terjadinya oksidasi dan degradasi enzimatik. Selanjutnya ekstrak disaring dengan kertas saring, residu diekstraksi kembali dengan pelarut yang baru sampai seluruh pigmen terangkat.

Uji Aktifitas Antioksidan

Ekstrak dilarutkan dalam aseton 10 mL dan dibuat berbagai seri konsentrasi. Blanko berupa campuran 4 ml metanol 95% kemudian di tambahkan 1 ml ekstrak larutan sampel sebanyak dari 4 ml DPPH kemudian ditambah 1 ml ekstrak.

Blanko maupun sampel disimpan selama 30 menit di ruang gelap, lalu diukur pola absorbansinya atau penyerapannya menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 517 nm 1240 (Yanuarti, *et al.*, 2017) dan Aktivitas penghambatan radikal bebas 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

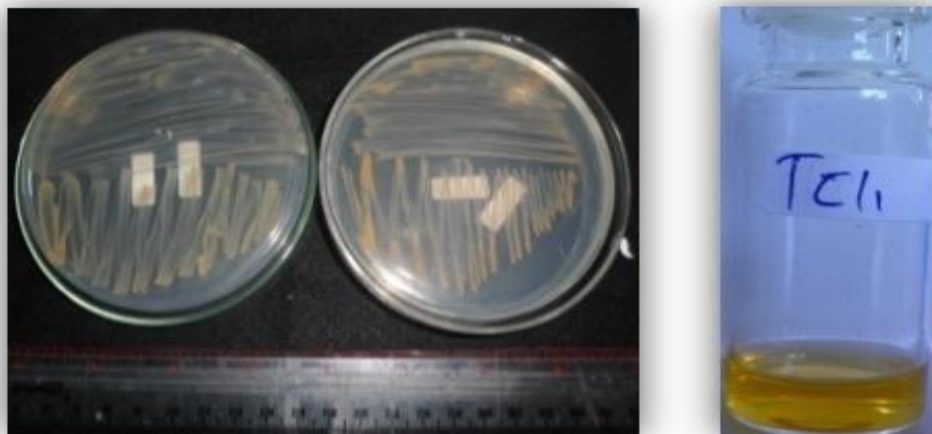
Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri fotosintetik yang hidup bersimbiosis dengan rumput laut *T. Conoides*. Berdasarkan identifikasi diperoleh 4 koloni bakteri yang sudah diberi kode untuk masing-masing koloni. Setelah dibiakan hanya 1 jenis bakteri yang memberikan warna orange tua. Dipilih yang berwarna orange tua karena warna tersebut mengindikasikan adanya pigmen karotenoid yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. Bakteri tersebut diisolasi dari *T.conoides* yang diambil dari perairan Pantai Hamadi Papua. Berikut ini foto dari *T. conoides* yang berhasil diambil saat sampling :



Gambar 1. *Turbinaria conoides*

Bakteri yang diisolasi adalah bakteri yang memberikan orange tua, kuning, sampai merah yang menunjukkan adanya pigmen fotosintetik

didalamnya. Bakteri yang berhasil diisolasi memberikan warna kuning yang ditunjukkan pada gambar di bawah :



Gambar 2. (a) Pigmen bakteri TC.1₁ yang bersimbion dengan (*T.conoides*) Pada media padat dan (b). Ekstrak kasar pigmen bakteri dalam metanol

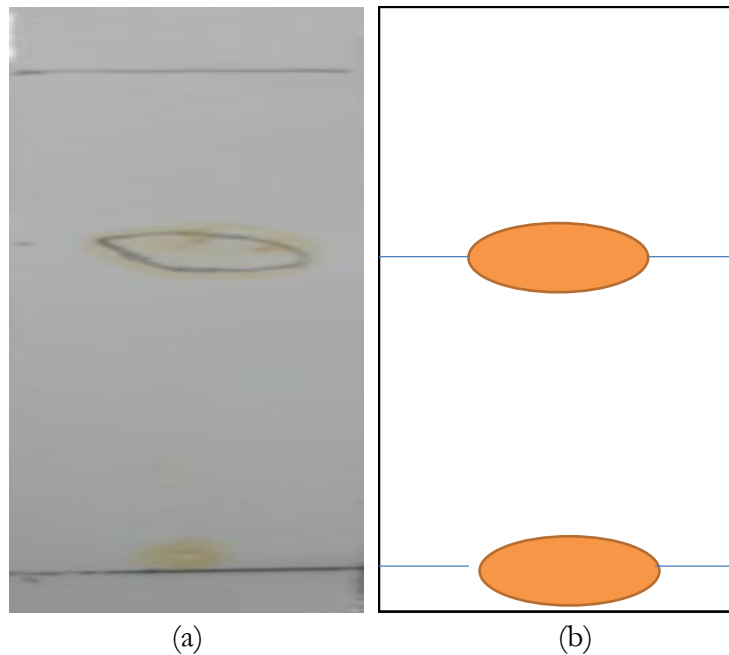
Kenampakan warna secara visual merupakan identifikasi awal adanya pigmen di dalam bakteri. Untuk langkah selanjutnya perlu diekstraksi untuk mengetahui jenis pigmen yang ada pada bakteri tersebut. Pigmen klorofil dan karotenoid adalah pigmen yang bersifat *liposoluble pigment* sehingga digunakan pelarut yang dapat bercampur dengan air seperti aseton dan metanol. Aseton umumnya digunakan untuk

menarik pigmen yang bersifat cenderung non polar 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.

Identifikasi KLT

Hasil identifikasi senyawa turunan pada pigmen bakteri asosiasi dengan menggunakan

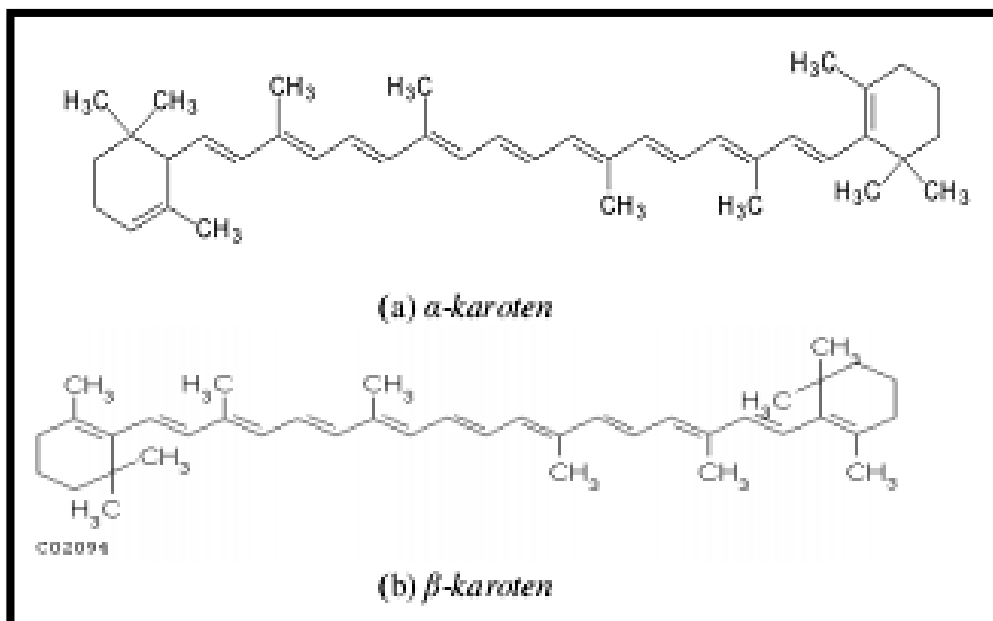
metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) berhasil diketahui 1 jenis senyawa turunan, yaitu karotenoid.



Gambar 3: Identifikasi Pigmen menggunakan Plat KLT

Totolan atau bercak 1 pada pelat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) berwarna kuning, memiliki nilai frekuensi Retardasi (R_f) sebesar $5/8 = 0,62$ dan diidentifikasi sebagai karotenoid. Nilai R_f (faktor retardasi) merupakan

batasan atau jarak yang ditempuh oleh pigmen, dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut (Harbone, 1991). Secara umum struktur kimia pigmen karotenoid sebagai berikut :

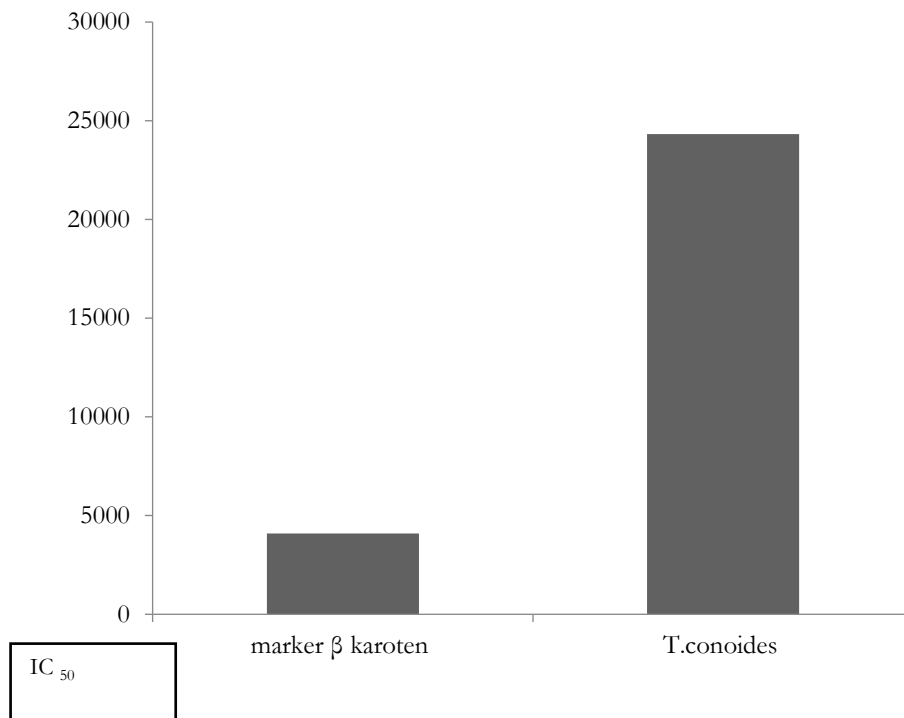


Gambar 4. Struktur kimia karatenoid

Uji Potensi Antioksidan

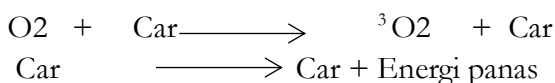
Pengujian dari antioksidan dari masing-masing fraksi dapat dibandingkan dengan marker beta karoten, dengan memiliki Nilai IC_{50} di hitung menggunakan regresi Linier dan hasil uji potensi antioksidan yang telah disajikan pada gambar (50) Ekstrak Kasar Pigmen bakteri

asosiasi TC.1₁ menggunakan DPPH. Dengan konsentrasi penghambatan radikal bebas 50%. (IC_{50}), dibandingkan dengan marker β -karoten yang merupakan antioksidan alami jadi nilai IC_{50} Ekstrak Kasar Pigmen bakteri TC.1₁ sebesar : 24315 ppm lebih tinggi dari marker β -karoten yang memiliki nilai IC_{50} sebesar 4103 ppm.



Gambar 5. Nilai IC_{50} (ppm) Ekstrak Kasar bakteri simbion dan Marker β -karoten sebagai Pembanding

Semakin tinggi nilai IC_{50} maka kemampuan untuk menangkap radikal bebas semakin kecil. Dan jika nilai IC_{50} yang rendah menghasilkan potensi sebagai penghambat Radikal bebas tinggi. Konsentrasi ekstrak dari pigmen bakteri TC.1₁ dalam meskipun dalam jumlah yang minimal tetap dapat menjadi potensi senyawa penangkal radikal bebas walaupun tidak semaksimal β -karoten. Proses kerja pigmen karotenoid dari ekstrak kasar pigmen bakteri TC.1₁ diduga sama seperti mekanisme kerja Karotenoid secara umum yaitu sebagai berikut:



Pigmen beta karoten dapat berfungsi sebagai *quencher* singlet oksigen, (Yanislieva-Maslarova, 2001; Trilaksana, 2003). Dan menjadi triplet oksiden, Pigmen Beta Karoten juga mampu melepaskan panas dan kemudian dapat kembali menjadi pigmen karotenoid., yang diungkapkan oleh Gordon (1990) bahwa antioksidan sekunder dengan siklus kerjanya yaitu mampu mengubah bentuk triplet oksigen sebagai bentuk antioksidan teriser yang memiliki potensi untuk memperbaiki sel – sel yang rusak diakibatkan oleh kerjanya potensi radikal bebas (Krinsky, 1979, 1989).

KESIMPULAN

Telah teridentifikasi Pigmen bakteri simbion TC.1₁ diduga sebagai senyawa karotenoid dengan faktor retardasi Rf : 0,67. Ekstrak pigmen ekstrak pigment bakteri simbion TC.1₁ juga memiliki potensi antioksidan yang di uji dengan metode DPPH di lihat Nilai IC₅₀ dari bakteri TC.1₁ sebesar 24315 ppm dibandingkan dengan marker β – karoten sebesar 4103 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

- Basir A, Tarman K, Desniar D. 2017. Aktifitas antioksidan dan antibakteri alga hijau *Halimeda gracilis* dari Kepulauan Seribu. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20 (2): 211-118.
- Bauernfeind, J.C. 1981. *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*. Academic Press, New York
- Burgess J.G., K.G. Boyd, E. Armstrong, 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., eds (1995) *Carotenoids: Isolation and Analysis*, Vol. IA, Birkhauser, Basel.
- Diachanty Seftyliya, Nurjanah, Asadatun Abdullah (2017) Aktifitas Atioksidan Berbagai Jenis Rumput Laut Coklat Dari Parairan Kepulauan Seribu. *JPHPI* 2017, Volume 20 Nomor 2.
- Firdaus M. 2013. Indeks aktivitas antioksidan ekstrak rumput laut cokelat (*Sargassum aquifolium*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 16(10): 42-47.
- Ganesan P, Chandini S, Kumar N, Bhaskar. 2008. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresour Technol*. 99: 2717-2723.
- Gross, J. 1991. *Pigments in vegetables*. Van Nostrand Reinhold, New York, 351 pp
- Krinsky, N. I. 1979. Carotenoids protection against oxidation. *Pure appl. Chem*. 51: 649–660.
- Kumar SR, Hosokawa M, Miyashita K. 2013. Fucoxanthin: A marine carotenoid exerting anti-cancer effects by affecting multiple mechanisms. *Marine Drugs*. 11:225-231.
- Maeda, H., Masashi, H., Tokutake, S., Funayama, K., dan Miyashita, K. 2005. Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332:392-397.
- 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. *zooepidemicus*. *Int J. Pharmacol*. 3 (2):170-174.
- Sanger G, Kaseger BE, Rarung LK, Damongilala L. 2018. Potensi beberapa jenis rumput laut sebagai bahan pangan fungsional, sumber pigmen dan antioksidan alami. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 21(2): 208-217
- Vinayak RC, Sabu AS, Chatterji A. 2010. Bioprospecting of a few brown seaweeds for their cytotoxic and antioxidant activity. *Complementary and Alternative Medicine*. 2011:1-9
- Yanuarti R, Nurjanah N, Anwar E, Hidayat T. 2017. Profil fenolik dan aktivitas antioksidan dari ekstrak rumput laut *Turbinaria conoides* dan *Euclima cottonii*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(2): 230-237