

**Isolasi Pigmen dari Alga *Indigenous* dan Pengujian Aktivitas
Antimikrobiana (*Isolation of Pigment from Indigenous Algae and Evaluation
of Their Antimicrobial Activity*)**

Oleh:

Karseno dan Isti Handayani
Jurusan Teknologi Pertanian Fakultas Pertanian UNSOED
Email: karseno_m71@yahoo.com

ABSTRAK

Alga mengandung berbagai komponen penting yang dapat dimanfaatkan bagi kehidupan manusia diantaranya komponen pigmen. Pigmen utama dari alga adalah fikobiliprotein. Pigmen ini secara fisiologis berperan sebagai penangkap cahaya dalam proses fotosintesis mikroalga. Potensi pigmen fikobiliprotein sebagai komponen bioaktif belum banyak dieksplorasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi pigmen fikobiliprotein dari mikroalga *indigenus* dan menguji aktivitas antimikrobiana. Hasil penelitian menunjukkan alga *Oscillatoria* sp. adalah jenis alga *indigenous* yang potensial sebagai produsen pigmen. Pigmen yang dihasilkan memiliki aktivitas sebagai antimikrobia dan efektif menghambat pertumbuhan jenis alga hijau *Chlorella fusca* dan *Chlamydomonas reinhardtii*, namun tidak menunjukkan penghambatan yang berarti terhadap bakteri dan sianobakteri.

Kata kunci: Mikroalga, *Oscillatoria* sp., senyawa bioaktif, pigmen fikobiliprotein, antimikrobia.

ABSTRACT

Algae are well known as important resource of useful compound for human being. Phycobiliproteins is a major pigment of algae which function as light harvesting antenna and then it transfer the light energy to photosynthetic reaction center. The potency of phycobiliproteins as bioactive compounds are not well investigated. In this study the pigment isolated from selective algae Oscillatoria sp. was evaluated for their antimicrobial activity. Oscillatoria is one of candidate for pigment production. The pigment isolated from Oscillatoria show antimicrobial activity with strong inhibit to green algae Chlorella fusca and Clamydomonas reinhardtii but no significant inhibition to cyanobacteria and bacteria.

Keyword: algae, Oscillatoria sp., bioactive metabolites, phycobiliproteins, antimicrobia

PENDAHULUAN

Alga yang meliputi mikroalga, makroalga (rumput laut) dan cyanobacteria (ganggang hijau biru) dikenal memiliki potensi sebagai produsen bahan-bahan bermanfaat (*valuable chemicals*) seperti polisakarida, hormon, vitamin, mineral dan senyawa bioaktif. Jumlah dan variasi senyawa bioaktif alga sangat banyak dan beragam (Sing *et al.*, 2005). Penyelidikan senyawa bioaktif yang bersumber dari mikroorganisme seperti bakteri dan jamur sudah banyak dilakukan. Beragam senyawa bioaktif sudah ditemukan dan bahkan diaplikasikan khususnya pada bidang farmasi dan pangan selama beberapa dekade. Dewasa ini laju penyelidikan dan ketersediaan senyawa bioaktif dari sumber tersebut menurun dan kini para peneliti mulai beralih untuk menggali senyawa bioaktif dari alga dan sekaligus kajian potensi aplikasinya.

Satu dari metabolit penting pada alga adalah pigmen fikobiliprotein. Fikobiliprotein merupakan antena pigmen alga yang berfungsi untuk menangkap cahaya tampak yang tidak atau sedikit sekali terserap oleh pigmen klorofil dan melalui proses transfer energi, membawa energi tersebut ke klorofil sebagai pusat reaksi fotosintesis (Hildicth *et al.*, 1991). Selain itu fikobiliprotein berfungsi

dalam proses adaptasi terhadap kondisi lingkungan seperti respon terhadap perubahan kualitas cahaya (*complementary chromatic adaptation*), respon terhadap variasi nutrisi dan temperatur (Kehoe and Gutu, 2006).

Fikobiliprotein dibagi kedalam tiga kelompok utama berdasarkan pada sifat warna dan spektra absorpsinya yaitu fikoeitritin (PE) berwarna pink (540-560 nm), fikosianin (PC) dengan warna biru-violet (610-620 nm), dan alofikosianin (APC) berwarna hijau kebiruan (650-655 nm) (Glazer 1994; Mihova *et al.*, 1996; Coyley *et al.*, 2005). Fikobiliprotein bersifat larut dalam air dan stabil pada temperatur ruang serta pH netral pada konsentrasi lebih dari 0.1 mg/ml. Di dalam sel, fikobiliprotein terikat dalam struktur organisasi sel yang disebut fikobilisom dan terletak pada membran tilakoid di dalam kloroplas dengan ukuran sekitar 7×10^6 to 15×10^6 dalton (Glazer, 1994) dan berat molekul berkisar 100 sampai 208 kilo Dalton (Tandeau de Marsac, 2003). Warna fikobiliprotein muncul akibat adanya grup prosthetic bilin, karena strukturnya berhubungan erat dengan warna pigmen empedu pada manusia yakni biliverdin dan bilirubin (Grossman *et al.*, 1993).

Eksplorasi dan kajian terhadap fikobiliprotein relatif masih sedikit bila dibandingkan dengan klorofil dan karotenoid terutama dari jenis alga *indigenous*. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi pigmen dari alga *indigenous* dan menguji aktivitasnya sebagai antimikrobia.

METODE PENELITIAN

Bahan dan alat

Alga yang digunakan adalah *Oscillatoria* sp. hasil isolasi di perairan wilayah Banyumas. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya amonium sulfat, bufer posfat, pigmen standar fikoeritrin, medium C, medium Nutrient Broth, Nutrient Agar, Pepton, Potato Dextros Agar dan *paper disc*. Peralatan utama yang digunakan meliputi peralatan isolasi pigmen (blender, spektrofotometri UV-Vis, spektrofotometri fluorescence), peralatan seterilisasi, dan peralatan uji aktivitas antimikrobia (petridish, inkubator dan *laminar air flow*).

Pelaksanaan Penelitian

a. Kultivasi alga

Alga *Oscillatoria* sp. disubkulturkan dalam media modified C volume 50 ml pada pH 7.5 menggunakan tabung reaksi (3 cm i.d. x 20 cm) dengan komposisi medium sebagai berikut: (per liter) 5 g KNO₃, 0.1 g KH₂PO₄, 0.05 g MgSO₄.7H₂O, 0.005 g FeCl₂, 2.86 mg H₃BO₃, 1.81 mg MnCl₂.4H₂O, 0.22 mg ZnSO₄.7H₂O, 0.018 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, and 0.075 mg CuSO₄.5H₂O. Sel diaerasi dengan udara pada suhu 28°C dan penyinaran 50 µmol photons m⁻² s⁻¹ menggunakan lampu fluorescence.

b. Ekstraksi dan isolasi pigmen fikobiliprotein

Ekstraksi pigmen fikobiliprotein dilakukan mengacu pada penelitian Imouli (2000) dan Rosano *et al* (2003) dengan beberapa modifikasi. Alga dalam larutan 50 mM posfat bufer dibekukan pada suhu -20 °C. Alga dikeluarkan sampai larutan buffer kembali menjadi cair, selanjutnya dibekukan kembali dan perlakuan yang sama diulang-ulang (*freeze-thaw cycles*) sampai diperoleh ekstrak alga (*slurry*). Penghancuran dengan menggunakan waring blender dapat pula dilakukan bila diperlukan dan dilakukan dalam kondisi dingin. Ekstrak sel kemudian disentrifus (10.000xg) selama 10 menit pada 4°C. Supernatant berwarna ungu yang dihasilkan digunakan untuk tahap pemurnian selanjutnya atau dikering bekukan (*lyophilized*) dan disimpan dalam refrigerator sebagai stok.

c. Uji antimikrobia pigmen fikobiliprotein pada bakteri dan jamur

Uji antimikrobia dilakukan dengan menggunakan bakteri dan jamur patogen dan perusak pangan sebagai target. Metode pengujian antimikrobia yang digunakan adalah menggunakan teknik difusi agar menggunakan *paper disc*. Ekstrak pigmen fikobiliprotein dalam berbagai konsentrasi ditambahkan ke dalam *paper disc* dan selanjutnya ditempatkan pada media yang sudah mengandung kultur bakteri dan jamur. Kultur bakteri dan jamur diinkubasikan pada kondisi yang optimum untuk masing-masing mikrobia dan aktivitas penghambatannya diamati. Penghambatan terhadap mikrobia dilihat dari adanya zona jernih (*clear zone*) dan besarnya penghambatan diukur dari lebarnya zona jernih yang terbentuk. Pengujian antimikrobia juga dilakukan dengan menggunakan medium cari (Nutrient Broth) untuk mengukur nilai *minimum inhibition concentration* (MIC) dan *minimum bactericidal concentration* (MBC). Aktivitas akhir penghambatan pigmen terhadap mikrobia dinyatakan dengan konsentrasi penghambatan 50% (IC₅₀).

d. Uji antimikrobia pigmen fikobiliprotein pada alga hijau dan sianobakteri

Pigmen fikobiliprotein dilarutkan dalam buffer fosfat 50mM dalam berbagai konsentrasi (0,1; 0,5; 1; 5; dan 10 mg/ml). Larutan pigmen tersebut ditambahkan ke dalam kultur alga hijau *Chlorella fusca* dan *Chlamydomonas reinhardtii* dan sianobakteria *Scytonema* sp. dan *Nostoc spongiaforme*. Sel selanjutnya diinkubasikan pada temperatur ruang dan disinari menggunakan lampu neon pada intensitas cahaya 3mol photons m⁻² s⁻¹. Besarnya penghambatan pigmen terhadap pertumbuhan alga diamati setelah umur 4 hari untuk alga hijau dan 8 hari untuk sianobakteria.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Oscillatoria sp. adalah jenis alga yang terseleksi sebagai produsen pigmen dalam penelitian ini. Kultur ini diperoleh dengan melakukan isolasi dan skrining dari beberapa sumber air tawar di wilayah Purwokerto dan sekitarnya. Isolasi dilakukan dengan menggunakan plankton net dan pemurniannya menggunakan metode pipet kapiler. Kultur tunggal yang diperoleh dilihat di bawah mikroskop dan hasilnya dibandingkan dengan referensi.

Oscillatoria sp. yang hasil isolasi selanjutnya ditumbuhkan di dalam botol berisi medium C termodifikasi dengan pemberian aerasi dari udara serta penyinaran menggunakan lampu neon. Pertumbuhan dari *Oscillatoria* diamati tiap 2 hari sekali untuk melihat kurva pertumbuhannya sebagai dasar dalam menentukan pemanenan dan produksi pigmen fikobiliprotein.

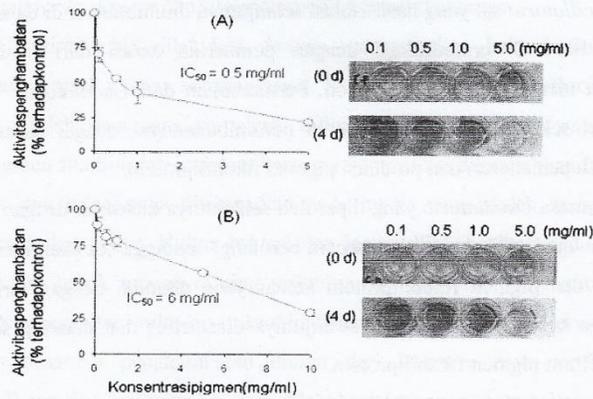
Biomasa *Oscillatoria* yang diperoleh selanjutnya diekstrak dengan metode *freeze thaw cycles* (dibeku-cairkan secara berulang) sehingga sel akan mengalami denaturasi dan pigmen fikobiliprotein keluar yang ditandai dengan terlihatnya warna ungu kebiruan. Ekstrak sel selanjutnya disentrifus dan disaring sehingga diperoleh filtrat pigmen fikobiliprotein.

Pengujian aktivitas antimikrobia pigmen *Oscillatoria* dilakukan terhadap beberapa jenis mikrobia yaitu alga hijau, sianobakteria dan bakteri. Data hasil pengujian penghambatan pigmen terhadap beberapa mikrobia disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas penghambatan pigmen *Oscillatoria* terhadap berbagai mikroorganisme

Mikroorganisme	IC ₅₀ (mg ml ⁻¹)
<i>Chlorella fusca</i>	0.5
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	6
<i>Oscillatoria</i> sp.	> 10
<i>Scytonema</i> sp.	> 10
<i>Eschericia coli</i>	> 10
<i>Bacillus subtilis</i>	> 10

Dari Tabel 1 terlihat bahwa pigmen *Oscillatoria* menghambat kuat *Chlorella fusca* dan *Chlamydomonas reinhardtii* (alga hijau) tetapi tidak menunjukkan penghambatan yang signifikan terhadap grup sianobacteria dan bakteri. Aktivitas penghambatan pigmen *Oscillatoria* terhadap pertumbuhan green algae *C. fusca* dan *C. reinhardtii* disajikan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Aktivitas penghambatan pigmen terhadap pertumbuhan alga hijau *C. fusca*(A) dan *C. reinhardtii* (B)

Berdasarkan data tersebut, pigmen *Oscillatoria* cenderung berperan sebagai antialga bukan anti bakteri. Beberapa fitoplankton termasuk grup sianobakteria sudah dikenal mampu memproduksi metabolit sekunder dengan jenis yang bervariasi (Ray and Bagchi, 2001). Lebih dari itu, beberapa metabolit sekunder dihasilkan secara ekstrasel yang mengindikasikan fungsinya sebagai senyawa alelopati (*allelopathic compound*) (Volk., 2006). Senyawa alelopati ini dihasilkan alga untuk mengurangi atau menghambat pertumbuhan fitoplankton lain yang berperan sebagai kompetitor di lingkungannya. Baik kompetitor dalam pengambilan nutrisi atau sinar matahari sebagai sumber energi (Berry *et al.*, 2008; Volk, 2006). Ketahanan sianobakteria dan bakteri terhadap pigmen *Oscillatoria* dimungkinkan karena keduanya memiliki system pertahanan yang hampir sama seperti yang dimiliki oleh *Oscillatoria* dalam menghadapi sifat toksik dari pigmen yang dihasilkannya sendiri.

Efek penghambatan pigmen terhadap pertumbuhan *C. fusca* dan *C. reinhardtii* terlihat meningkat searah dengan meningkatnya konsentrasi pigmen. Nilai aktivitas penghambatan pertumbuhan 50 % (IC_{50}) dari pigmen terhadap *C. fusca* dan *C. reinhardtii* adalah 0,5 mg/ml dan 5 mg/ml. Sebaliknya pigmen tidak menunjukkan penghambatan terhadap pertumbuhan sianobakteria *Scytonema* sp.

dan *Nostoc spongiaforme* bahkan sampai konsentrasi lebih dari 10 mg/ml (Tabel 1).

Beberapa fitoplankton termasuk grup sianobakteria sudah dikenal mampu memproduksi metabolit sekunder dengan jenis yang bervariasi (Ray and Bagchi, 2001). Lebih dari itu, beberapa metabolit sekunder dihasilkan secara ekstrasel yang mengindikasikan fungsinya sebagai senyawa alelopati (*allelopathic compound*) (Volk., 2006). Senyawa alelopati ini dihasilkan alga untuk mengurangi atau menghambat pertumbuhan fitoplankton lain yang berperan sebagai kompetitor di lingkungannya. Baik kompetitor dalam pengambilan nutrisi atau sinar matahari sebagai sumber energi (Berry et al., 2008; Volk, 2006).

KESIMPULAN

Oscillatoria adalah jenis alga *indigenous* yang potensial sebagai produsen pigmen. Pigmen yang diisolasi dari *Oscillatoria* menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan jenis alga hijau, namun tidak menunjukkan penghambatan yang berarti terhadap sianobakteri dan bakteri.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti menyampaikan banyak terima kasih kepada DP2M Dikti yang telah membantu pembiayaan penelitian ini melalui Hibah Fundamental.

DAFTAR PUSTAKA

- Berry, J.P., Gantar, M., Perez, M.H., Berry, G., and Noriega, F.G. 2008. Cyanobacterial Toxins as Allelochemicals with Potential Applications as Algaecides, Herbicides and Insecticides. *Mar Drugs.*, 6, 117-146, DOI: 10.3390/md20080007
- Colyer C.L., C. S.Kinkade, P.J.Viskari, J.P.Landers. 2005. Analysis of cyanobacterial pigments and proteins by electrophoretic and chromatographic methods. *Anal Bioanal Chem.*, 382, 559-569.
- Glazer A.N. 1994. phycobiliproteins-a family of valuable, widely used fluorophores. *J. App. Phycol*, 6, 105-112.

- Grossman A. R., M.R. Schaefer, G. G. Chiang, J. L. Collier. 1993. Environmental Effects on the Light-Harvesting Complex of Cynaobacteria. *J. Bacteriol.* Feb, 575-582.
- Hilditch C.M., P. Balding, R. Jenkins, A.J. Smith, L.J. Rogers. 1991. R-Phycocerythrin from macroalga *Corallina officinalis* (Rhodophyceae) and application of derived phycofuor probe for detecting sugar-binding sites on cell membranes. *J. Appl. Phycol*, 3, 345-354.
- Irmouli, A.V.G., Pons, L., Lucon, M., Villaume, C., Mrabet, N.T., Gueant, J.L., and Fleurence, J. 2000. One-step purification of R-phycocerythrin from the red macroalga *Palmaria palmate* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Chromatogr. B*, 739, 117-123.
- Kehoe D.M. and A. Gutu. 2006. Responding the color: The regulation of complementary chromatic adaptation. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 57, 127-150.
- Singh S., Kate, B.N., and Banerjee, U.C. 2005. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An Overview *Critical Rev. Biotechnol.*, 25, 73-95.
- Tandeau de Marsac, N. 2003. Phycobiliproteins and phycobilisomes: the early observations. *Photosynthesis Research*, 76, 197-205.
- Ray, S., and Bagchi, S.N. 2001. Nutrient and pH regulate algicide accumulation in cultures of the cyanobacterium *Oscillatoria laetevirens*. *New Phytol.*, 149, 455-460
- Volk, R.B., and Furkert, F.H. 2006. Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. *Microbiol. Res.*, 161, 180-186