EFEKTIVITAS KAROTENOID *SPIRULINA PLATENSIS* YANG DIKULTUR DARI AMPAS KECAP SEBAGAI ANTIOKSIDAN

Luthfiana A. Sari^{a,*}, Endang D. Masithah^b, Mochammad Amin Alamsjah^b

^a Department of Management Fish Health and Aquaculture, Faculty of Fisheries and Marine, Airlangga University, Surabaya, Indonesia

^b Department of Marine, Faculty of Fisheries and Marine, Airlangga University, Surabaya, Indonesia

*Corresponding author: luthfianaas@fpk.unair.ac.id

Abstrak

S. platensis adalah salah satu suplemen yang bermanfaat sebagai antioksidan bersumber dari karotenoid *S. platensis*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian limbah ampas kecap sebagai pupuk organik terhadap karotenoid *S. platensis* dan untuk mengetahui aktivitas antioksidan (karotenoid) *S. platensis* hasil kultur dengan limbah ampas kecap yang dibandingkan dengan *S. platensis* komersil. Penelitian terdiri dari dua tahap yaitu pengaruh pemberian limbah ampas kecap pada produksi karotenoid *S. platensis* dan sebagai antioksidan (karotenoid) *S. platensis* dengan metode Difenil Pikril Hidrasil (DPPH). Hasil penelitian menunjukkan bahwa produksi *S. platensis* dapat dilakukan pada media kultur limbah ampas kecap (1,8 mL/L) yang menghasilkan kadar karotenoid (1,5566 µg/mL) dan aktivitas antioksidan (nilai hambat *S. platensis* terhadap DPPH 18,30%).

Kata kunci: *blue green algae*, difenil pikril hidrasil, pupuk organik

Abstract

S. platensis is a health supplement as an antioxidant, sourced from carotenoid of *S. platensis*. Carotenoids can serve as singlet oxygen absorber and deactivate free radicals. The purpose of this study was to determine the effects of ketchup waste as organic fertilizer for the carotenoid of *S. platensis*. Also, to determine antioxidant activity (carotenoid) of *S. platensis* which is produced in culture media from ketchup waste compared to *S. platensis* commercial. The study consisted of two phases examination exploration of production time in order to obtain the highest value of carotenoid of *S. platensis* and the effect of ketchup waste as an antioxidant (carotenoid) of *S. platensis* by Difenil Pikril Hidrasil (DPPH). The results showed that carotenoid as an antioxidant *S. platensis* can produces carotenoid (1,5566 µg/mL) and antioxidant activity (DPPH 18,30%).

Keywords: *blue green algae*, difenil pikril hidrasil, organic fertilizer

PENDAHULUAN

S. platensis merupakan alga yang sering dimanfaatkan sebagai suplemen untuk mencukupi kebutuhan protein manusia. *S. platensis* memiliki kandungan protein berkisar antara 70 – 78 % [1]. Pola hidup manusia juga menciptakan suatu manipulasi lingkungan sehingga muncul berbagai pencemaran yang berakibat pada tingginya radikal bebas yang masuk pada tubuh manusia.

S. platensis juga mengandung 17 % *B-carotene* [2]. Karotenoid bermanfaat sebagai antioksidan [3]. Menurut mekanisme kerja

antioksidan, karotenoid merupakan antioksidan sekunder [4]. Senyawa ini dapat berfungsi sebagai penyerap oksigen singlet dan pendeaktifasi radikal bebas [5].

Kestabilan produksi karotenoid *S. platensis* dapat ditunjang dengan kelimpahan nutrien. Salah satu alternatif media kultur *S. platensis* adalah dengan memanfaatkan limbah ampas kecap sebagai pupuk. Limbah ampas kecap mengandung karbon yang merupakan pembentuk karotenoid. Berdasarkan hal inilah perlu diketahui kadar karotenoid *Spirulina platensis* pada media kultur limbah ampas kecap sebagai antioksidan.

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Materi penelitian yang digunakan terdiri atas bahan dan alat penelitian. Bahan penelitian yang digunakan adalah *S. platensis* (BBPAP Jepara), limbah ampas kecap (PT. Lombok Gandaria Karanganyar), pupuk Walne (BBPAP Jepara), air laut (situbondo dan pasar ikan Gunung sari Surabaya), aquades (Brataco), khlorin (Brataco), Na Thiosulfat (Brataco), alkohol (Brataco), metanol absolut (Cat), etanol (1.06009.2500 dietil eter), n-heksan (Lab. Kimia, LPPMHP Surabaya), metanol KOH (Cat) dan HCl (Sigma). Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah sterofom, toples kaca volume 80 ml, aerator set, selang aerator, gabus, gelas ukur, erlenmeyer, pipet tetes, pipet volume, mikroskop, homogenezer, handtally counter, autoclave American 25X, haemocytometer, spectrophotometer 788B, sentrifuge Hettich EBA-20, stirer hot plate, refraktometer, pH paper, termometer, timbangan digital Ohaus PA 2102, timbangan digital OHAUS Analytical Balance PA413, lampu TL 40 watt, kapas, corong air, kasa, aluminium foil, waterbath dan kertas saring.

Prosedur Kerja

Sterilisasi Peralatan dan Media Kultur

Sterilisasi peralatan dan media kultur dengan proses sterilisasi menggunakan metode *Strilization and steril technique Kawachi* [6]. Air laut yang akan digunakan untuk kultur dengan salinitas 32 ppt disterilisasi menggunakan larutan khlorin. Peralatan kultur yang tahan panas disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Peralatan yang tidak tahan panas disterilkan dengan larutan klorin 150 ppm.

Persiapan Limbah Ampas Kecap

Limbah ampas kecap yang akan digunakan sebagai pupuk dalam penelitian diperoleh dari PT. Kecap Gandaria, jalan Raya Jaten Km. 7, Karanganyar, Surakarta, Jawa Tengah. Proses pembuatan larutan

dimulai dengan pengeringan limbah ampas kecap menggunakan oven dengan suhu berkisar antara 60 - 70°C selama 24 jam kemudian digiling menjadi serbuk [7]. Serbuk limbah ampas kecap kemudian ditimbang sebanyak 10 g lalu dilarutkan dalam 100 ml aquades. Larutan limbah ampas kecap kemudian disterilkan menggunakan *autoclave*.

Kultur

Kultur menggunakan metode yang diawali dengan menghitung kepadatan stok bibit *S. platensis* yang dimiliki [8]. Setelah diketahui, dilakukan penghitungan jumlah bibit (pengenceran) yang diinginkan, sehingga didapatkan jumlah air laut yang dibutuhkan. Air laut yang dibutuhkan dimasukkan dalam toples kaca kemudian ditambahkan larutan pupuk limbah ampas kecap sesuai dengan konsentrasi yang ditentukan. Selanjutnya, media kultur diletakkan di rak kultur lalu diberi aerasi dan siap dimasukkan bibit *S. platensis* dengan kepadatan yang diinginkan. Rak kultur ditutup dengan plastik hitam, upaya suhu ruang stabil, menghindari kontaminan dan mengatur *photoperiode*. Lingkungan kultur dapat mempengaruhi pertumbuhan *S. platensis*, oleh karena itu lingkungan dikondisikan sama untuk setiap perlakuan. Lingkungan kultur *S. platensis* yang diharapkan dalam penelitian adalah suhu 28 - 32°C, salinitas 32 ppt, pH 8 - 9, intensitas cahaya 1800 - 1900 lux dan *photoperiod* 12 jam keadaan terang dan 12 jam keadaan gelap.

Pengukuran kadar karotenoid

Pengukuran kadar karotenoid diawali dengan sebanyak 10 ml hasil kultur *S. platensis* disentrifuge pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit [9]. Hasil supernatan *sentrifuge* dibuang dan pellet *S. platensis* yang berada didasar tube diekstraksi dengan 5 ml ethanol dan 5 dietil eter. Pencampuran metanol dan dietil eter dilakukan dengan menambahkan larutan NaCl. Gabungan fraksi eter disaponifikasi dengan 2 ml ethanol-KOH (konsentrasi akhir basa 5%), diinkubasi selama 12 sampai 16 jam pada suhu ruang.

Kelebihan basa pada filtrat dihilangkan dengan menambahkan air. Fase dietil eter kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 452 nm.

Karotenoid ($\mu\text{g/mL}$) = $3,68 A_{452}$ dengan: A = Serapan sampel

Tabel 1. Data karotenoid *S. platensis* setelah yang dikultur pada media limbah ampas kecap hari pertama hingga hari keenam

Perlakuan	Rata-rata Karotenoid <i>S. platensis</i> ($\mu\text{g/mL}$) $\pm$ SD
Hari ke 1	$0,6624 \pm 0,0681^c$
Hari ke 2	$0,7826 \pm 0,0250^d$
Hari ke 3	$1,0524 \pm 0,0573^c$
Hari ke 4	$1,3014 \pm 0,0747^b$
Hari ke 5	$1,5566 \pm 0,0681^a$
Hari ke 6	$1,2646 \pm 0,0129^b$

Keterangan:

abcde : Signifikan

Pembuatan Larutan Difenil Pikril Hidrasil (DPPH)

Pembuatan larutan Difenil Pikril Hidrasil (DPPH) adalah sebagai berikut: Kristal DPPH ditimbang sebanyak 0,004 gram kemudian dilarutkan dalam metanol sebanyak 100 mL sehingga kadarnya 0,004 % [10]. Larutan Difenil Pikril Hidrasil (DPPH) disimpan pada botol kaca yang dibungkus dengan *aluminium foil* dan ditutup rapat menggunakan tutup botol plastik.

Ekstraksi *S. platensis* Komersil dan *S. platensis* Hasil Kultur dengan Limbah Ampas Kecap

Ekstraksi *S. platensis* komersil dan *S. platensis* hasil kultur dengan limbah ampas kecap menggunakan metode yang diawali dengan sebanyak 10 mL hasil kultur *S. platensis* dari limbah ampas kecap *disentrifuge* pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit [11]. Hasil supernatan *sentrifuge* dibuang dan pellet *S. platensis* yang berada didasar tube dikeringkan pada suhu ruang. *S.*

platensis komersil berupa tablet, digerus menggunakan mortal. Sampel *S. platensis* komersil dan *S. platensis* hasil dari kultur limbah ampas kecap kering 5 gram ditaruh dalam *erlenmeyer* lalu ditambahkan 20 mL n-heksan kemudian didistrupsi dengan *homogenezer*.

Pengukuran Aktivitas Antiradikal Bebas metode Difenil Pikril Hidrasil (DPPH)

Pengukuran aktivitas antiradikal bebas metode Difenil Pikril Hidrasil (DPPH) menggunakan metode yang diawali dengan sampel ekstraksi *S. platensis* komersil dan *S. platensis* hasil kultur dari limbah ampas kecap masing-masing 1 mL dimasukkan kedalam kuvet lalu ditambahkan ke dalamnya 2 mL larutan DPPH 0,004 % [10]. Campuran tersebut kemudian diaduk rata. Setelah itu dilakukan pencatatan absorbansi pada panjang gelombang 517 nm. Nilai yang diperoleh adalah nilai hambatan antioksidan terhadap radikal bebas DPPH.

Persen aktivitas penghambatan dihitung dengan rumus [4]:

$$\text{Persen penghambatan} = \frac{(\text{DPPH})^0 - (\text{DPPH})^1}{(\text{DPPH})^0}$$

DPPH⁰ = Konsentrasi DPPH awal

DPPH¹ = Konsentrasi DPPH akhir yang tersisa

Pengukuran Kualitas Air

Pengukuran kualitas air pada kultur *S. platensis* dilakukan setiap hari meliputi suhu menggunakan termometer, pH menggunakan pH meter dan salinitas air menggunakan refraktometer. Rak kultur ditutupi dengan plastik hitam, agar suhu ruang stabil dan untuk menghindari kontaminan.

Analisis Data

Data penelitian pengukuran kadar karotenoid diuji secara statistik menggunakan ANOVA dan metode DPPH dianalisis menggunakan Uji T Independent dengan program SPSS 16.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Hasil pengamatan penelitian berupa kadar karotenoid dan daya hambat *S. platensis* terhadap DPPH. Hasil tersebut digunakan untuk mengetahui pengaruh pemberian limbah ampas kecap sebagai pupuk untuk memperoleh kadar karotenoid *S. platensis* tertinggi dan pengaruh pemberian limbah ampas kecap sebagai antioksidan (karotenoid) *S. platensis*.

Karotenoid *S. platensis*

Hasil pengamatan penelitian berupa eksplorasi waktu produksi karotenoid *S. platensis* dari hari pertama sampai hari keenam pada dosis pupuk limbah ampas kecap 1,8 mL/L (perlakuan terbaik hasil analisis uji Duncan). Data eksplorasi waktu produksi karotenoid *S. platensis* dilihat pada Tabel 1.

Hasil uji jarak berganda Duncan menunjukkan bahwa pengukuran karotenoid *S. platensis* berbeda nyata tiap hari. Pengukuran karotenoid *S. platensis* tertinggi

didapatkan pada hari ke lima yang berbeda nyata dengan hari lainnya. Hari ke empat tidak berbeda nyata dengan hari ke enam.

Metode Difenil Pikril Hidrasil (Dpph)

Hasil pengamatan penelitian berupa nilai hambatan karotenoid *S. platensis* terhadap (DPPH). Karotenoid *S. platensis* yang digunakan berasal dari produksi *S. platensis* yang dikultur dengan limbah ampas kecap pada dosis 1,8 mL/L dan dipanen pada hari ke lima. Penelitian metode DPPH diawali dengan menguji dosis karotenoid *S. platensis* hasil kultur limbah ampas kecap yang memiliki nilai hambat tertinggi terhadap DPPH.

Hasil yang diperoleh diketahui bahwa pada 5 mg karotenoid *S. platensis* diperoleh nilai hambat sebesar 18,3 %. Nilai hambatan 5 mg karotenoid *S. platensis* tidak berbeda jauh pada perlakuan 6 mg karotenoid *S. platensis* yaitu sebesar 18,9 % sehingga 5 mg karotenoid *S. platensis* digunakan sebagai dosis untuk analisis uji T metode difenil pikril hidrasil (DPPH). Data nilai hambatan karotenoid *S. platensis* sebanyak 5 mg terhadap difenil pikril hidrasil (DPPH) dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Data nilai hambat karotenoid *S. platensis* hasil kultur dari pupuk limbah ampas kecap dan *S. platensis* komersil terhadap difenil pikril hidrasil (DPPH)

Ulangan	Karotenoid <i>S. platensis</i> komersil (%)	Karotenoid <i>S. platensis</i> hasil kultur dari pupuk limbah ampas kecap (%)
1	18,9	17,8
2	18,9	17,8
3	18,7	18,7
4	18,9	18,9
5	18,9	18,6
6	18,7	18,2
7	18,7	18,2
8	18,9	18,4
9	18,7	18,1
10	19,1	18,9
11	19,1	17,7
SD	± 0,15	± 0,43
Rata-Rata	18,86	18,30

Hasil analisis statistik terhadap nilai hambat karotenoid *S. platensis* hasil kultur dari pupuk limbah ampas kecap dan *S. platensis* komersil terhadap difenil pikril hidrasil (DPPH) dengan uji T independen menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan dengan $p = 0,002$ ($p < 0,05$) di antara dua perlakuan. Nilai rata-rata menunjukkan bahwa nilai hambat karotenoid *S. platensis* komersil (18,86%) lebih besar dibandingkan nilai hambat karotenoid *S. platensis* hasil kultur dari pupuk limbah ampas kecap (18,30 %). Sebagai patokan digunakan standart nilai hambat vitamin C terhadap difenil pikril hidrasil (DPPH).

Kualitas Air

Hasil pengukuran suhu air selama penelitian berkisar antara 28,6 – 30,5 °C, suhu ruangan berkisar antara 28 – 32 °C, salinitas berkisar antara 32-34 ppt dan pH 8 - 9.

Pembahasan

Hasil ANOVAdata kepadatan *S. platensis* hari pertama hingga hari ke delapan menunjukkan bahwa pupuk limbah ampas kecap dengan dosis yang berbeda dalam media kultur menghasilkan kepadatan *S. platensis* yang berbeda nyata pada masing-masing perlakuan ($p < 0,05$). Hasil penelitian didapatkan kadar karotenoid *S. platensis* tertinggi 1,5566 µg/mL dengan menggunakan pupuk limbah ampas kecap. Hal tersebut diduga disebabkan adanya pengaruh dari nutrisi yang terkandung di dalam limbah ampas kecap. Karbon yang terkandung di dalam limbah ampas kecap sebesar 38%. Karbon adalah unsur utama yang dimanfaatkan oleh tumbuhan dan alga untuk berfotosintesis.

Hasil analisis karotenoid *S. platensis* hasil kultur dengan limbah ampas kecap dan komersil terhadap (DPPH) yang berbeda nyata namun rata-rata nilai hambatan karotenoid ke dua produk tersebut tidak jauh berbeda. Karotenoid *S. platensis* hasil kultur dengan limbah ampas kecap memiliki nilai hambat 18,3% dan karotenoid *S. platensis* komersil 18,8%. Hasil tersebut diduga karena

karotenoid *S. platensis* memiliki kemampuan sebagai bahan antioksidan.

Strategi pertahanan karotenoid dimulai pada spesies oksigen berupa molekul singlet oksigen (1O_2) dan peroksida radikal. Interaksi dari karotenoid dengan 1O_2 tergantung kekuatan penyerapan dalam proses fisika, dimana terlibat langsung energi transfer diantara kedua molekul. Energi dari molekul singlet oksigen berpindah ke molekul karotenoid, selanjutnya diperoleh *ground state* (keadaan dasar) oksigen dan ketriplet exitasi karotenoid [12]. Kelebihan energi dari molekul yang tereksitasi akan ditransfer melalui mekanisme pelepasan energi. Mekanisme karotenoid sebagai pemadam oksigen singlet adalah: Energi akan dilepas melalui interaksi rotasi dan vibrasi antara karotenoid triplet dengan pelarut untuk mengembalikan karotenoid ke keadaan semula [12]. Fungsi karotenoid sebagai pendeaktivasi radikal bebas terjadi melalui proses transfer elektron. Reaksi karotenoid sebagai pendeaktivasi radikal bebas adalah:

KESIMPULAN

Kesimpulan pada penelitian ini adalah pemberian limbah ampas kecap sebagai pupuk organik memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap kepadatan dan karotenoid *S. platensis*. Pemberian limbah ampas kecap sebesar 1,8 mL/L dapat menghasilkan menghasilkan kadar karotenoid (1,5566 µg/mL) dan aktivitas antioksidan (nilai hambat *S. platensis* terhadap DPPH 18,30%).

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Bhowmik D., D. Jaishree, and M. Sandeep, 2009. Probiotic efficiency of *Spirulina platensis* - stimulating growth of lactic acid bacteria. Journal of Dairy and Food Sciences, 4 (2): 160-163.
- [2] Promya, J. Traichaiyaporn dan S.R. Deming. 2008. Phytoremediation of

- Kitchen Wastewater by *Spirulina platensis* (Nordstedt). Geiteler: Pigment content, Production Variable Cost and Nutritional Value. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 2 (2): 159 - 171.
- [3] Jomovaa, K. dan M. Valkob. 2013. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *European journal of medicinal chemistry*, 70: 102–110.
- [4] Kurniawati, P. T., H. Soetjilpto dan L. Limantara. 2007. Aktivitas antioksidan dan antibakteri pigmen bixin selaput biji kesumba (*Bixa orellana* L.). *Indonesian Journal of Chemistry*, 7 (1): 88-92.
- [5] Kurniawati, P. T., H. Soetjilpto dan L. Limantara. 2007. Aktivitas antioksidan dan antibakteri pigmen bixin selaput biji kesumba (*Bixa orellana* L.). *Indonesian Journal of Chemistry*, 7 (1):88-92.
- [6] Kawachi, M dan M. H. Noël. 2005. Strilization and steril technique. Alga Culturing Technique. National Institute Enveronmental Studies. Academic press. America. pp. 65-82.
- [7] Rosales, M. 1982. Preparation of Various Culture Media and Stok Solutions. SEAFDEC Aquaculture Department. In: R. D. Guerrero and C. T. Villegas (Eds). Report of the Training Course on Growing Food Organism for Fish Hatcheries. Tigbauan, Iloilo, Philippines.
- [8] Richmond, A. 1986. CRC Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press, Inc. Florida. pp. 199-244.
- [9] Achmadi, S., S. Jayadi, dan T. Panji. 2002. Produksi pigmen oleh *Spirulina platensis* yang ditumbuhkan pada media limbah lateks pekat. *Hayati*, 9 (3): 80-84.
- [10] Gunawan, I.W.G., I.G.A.G. Bawa, dan N. L. Sutrisnayanti. 2008. Isolasi dan identifikasi senyawa terpenoid yang aktif antibakteri pada herba meniran (*Phyllanthus niruri* Linn). *Jurnal Kimia* 2 (1): 31-39
- [11] Yanuhar, U. 2009. Pengaruh Pemberian Bahan Aktif Ekstrak *Nannochloropsis oculata* Terhadap radikal Bebas pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) yang Terinfeksi Bakteri *Vibrio alginolyticus*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 1 (2):185-191.
- [12] Stahl, W. dan H. Sies. 2003. Antioxidant Activity of Carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*. 24: 345-351.