

A NATURAL COMBINATION EXTRACT OF MANGOSTEEN PERICARP AND PHYCOCIANIN OF *SPIRULLINA PLATENSIS* DECREASES PLASMA MALONALDIALDEHYDE LEVEL IN ACUTE EXERCISE-INDUCED OXIDATIVE STRESS

Mulyani, Laida Neti^{1*}, Veny Larasati², Herlina³, Anggia Permahani⁴

^{1,3,4}*Department of Pharmacy, University of Sriwijaya, Palembang, Indonesia*

⁴*Department of Histology, Faculty of medicine, University of Sriwijaya, Palembang, Indonesia*

**Corresponding author : laidanetimulyani@yahoo.com*

Abstract

Extract of Mangosteen pericarp (p-mangosteen) and Phycocianin (C-Pc) are sources of natural antioxidant that given protective effect from oxidative stress. Acute exercise can induced oxidative stress while accumulation Malonaldehyde (MDA) level widely used as an indication for oxidative stress. The purpose of this study was to determine the protective effect of combination extract on acute exercise-induced oxidative stress by determination the decrease of plasma MDA Level. Thirty male wistar rats were divided into five group which consisted two group control (aquadest and Vitamin C) and three treatment group : I (7.6 C-Pc mg/Kg BW), II (9.17 Mangosteen + 3.8 C-Pc m/kg BB), III (9.17 mangosteen + 7.6 C-Pc mg/Kg BW) and IV (9.17mangosteen + 15.2C-Pc mg/Kg BW). After seven days treatment all group was conducted with acute swimming exercise to induce the accumulation of MDA. Plasma MDA levels were measured as Thiobarbituric Acid Reactive Substance using spectrophotometric approach. The results of plasma MDA level in control group was found to be 2.764 ± 0.284 and $0,839 \pm 0.156$ (aquadest and Vitamin C respectively) whereas it was 1.585 ± 0.186 , 1.324 ± 0.559 , 1.149 ± 0.145 , 0.910 ± 0.115 in group I,II,III, IV respectively. There was statistically significant decrease in treatment group compared with control. These result explained that combination extract of C-Pc and p-mangosteen have protective effect against acute exercise-induced stress oxidative and may be useful in the prevention of cancer and degenerative disease.

Keywords: Oxidative stress, Plasma Malonaldehyde, p-mangosteen, Phycocianin

1. PENDAHULUAN

Berbagai penyakit degeneratif berkembang pesat seiring dengan perkembangan zaman dan umumnya disebabkan oleh radikal bebas. Radikal bebas adalah molekul yang kehilangan elektron, sehingga molekul tersebut menjadi tidak stabil dan selalu berusaha mengambil elektron dari molekul atau sel lain. Radikal bebas yang beredar dalam tubuh berusaha untuk menarik elektron atom lain dari DNA dan sel, yang pada gilirannya mengubah atom yang lain menjadi radikal bebas sekunder, sehingga membuat reaksi berantai yang dapat

menyebabkan perubahan struktur pada sel dan DNA (Agustini, 2002).

Tanpa disadari, dalam tubuh kita terbentuk radikal bebas secara terus-menerus, baik berupa proses metabolisme sel normal, peradangan, kekurangan gizi, dan akibat respon terhadap pengaruh dari luar tubuh, seperti polusi lingkungan, ultraviolet (UV), asap rokok, dan lain-lain (Winarsi, 2007). Radikal bebas yang terbentuk dalam tubuh dapat dinetralisir oleh antioksidan endogen bila jumlahnya tidak berlebihan. Namun tubuh membutuhkan asupan antioksidan eksogen atau

yang berasal dari luar tubuh bila radikal bebas yang terbentuk berlebihan.

Konsumsi antioksidan dalam jumlah memadai dilaporkan dapat menurunkan kejadian penyakit degeneratif, seperti kardiovaskular, kanker, aterosklerosis, osteoporosis, dan lain-lain (Winarsi, 2007). Penggunaan antioksidan sintetik telah dibatasi pada produk-produk makanan karena dianggap memiliki efek karsinogenik (Andrawulan dkk., 1996). Hal ini yang mendorong berbagai penelitian untuk menemukan sumber antioksidan baru yang berasal dari alam yang diharapkan dapat mengganti antioksidan sintetik.

Usaha untuk eksplorasi senyawa antioksidan yang berasal dari bahan alam dilakukan baik dari daratan maupun lautan. Laut Indonesia memiliki peluang yang sangat besar untuk eksplorasi biota laut yang berpotensi sebagai sumber senyawa antioksidan. Salah satu mikroorganisme yang berpotensi sebagai sumber antioksidan alami adalah *Spirulina platensis*. Menurut Sedjati dkk. (2012) mikroalga golongan spirulina mengandung pigmen non polar yang terdiri dari klorofil a dan karotenoid dan pigmen polar yang terdiri dari fikosianin, allofikosianin dan fikoeertrin. Tanaman yang berasal dari darat yang dapat dieksplorasi sebagai sumber antioksidan alami, salah satunya adalah manggis (*Garcinia mangostana* L.). Kulit buah manggis merupakan antioksidan yang sangat tinggi, selain mengandung flavonoid, polifenol, dan saponin kulit manggis juga mengandung senyawa *xanthone* dan antrakuinon (Putra, 2010).

Fikosianin dari *S. platensis* dan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Berdasarkan penelitian Agustini, (2002) *S. platensis* kering mengandung pigmen fikosianin yang memiliki aktivitas antioksidan dengan IC_{50} sebesar 96,57 $\mu\text{g/mL}$ dan ekstrak air kulit manggis memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan IC_{50} sebesar 40,890 $\mu\text{g/mL}$ (Miryanti dkk., 2011). Menurut Rachman dkk. (2008) kombinasi ekstrak dapat bersifat sinergis (meningkatkan aktivitas antioksidan) dan dapat bersifat antagonis (menurunkan aktivitas antioksidan) dari masing-masing ekstrak. Kombinasi ekstrak diharapkan dapat menurunkan kadar malondialdehid pada tikus. Hingga saat ini penelitian tentang pengujian

aktivitas antioksidan dari kombinasi ekstrak tersebut belum dilakukan baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.

Berdasarkan uraian tersebut, pada penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas antioksidan dari kombinasi fikosianin *S. platensis* dan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) secara *in vitro* dengan metode peredaman radikal bebas DPPH (*1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl*), karena menurut Shivaprasad (2005) secara teknis cara kerjanya mudah dan cepat dengan pengukuran aktivitas yang baik untuk berbagai senyawa terutama senyawa fenol dan evaluasi antioksidan secara *in vivo* dengan mengukur kadar malondialdehid (MDA) yang terbentuk karena proses peroksidasi lipid. Penelitian tentang uji aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak secara *in vitro* dan *in vivo* diharapkan dapat memperoleh aktivitas antioksidan yang sinergis.

2. METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan sejak bulan Februari sampai dengan Juli 2016. Bertempat di Laboratorium Biologi Farmasi, Laboratorium Farmakologi Program Studi Farmasi, dan Laboratorium Pengujian Terpadu Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sriwijaya.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan adalah: *shaker* (Wiggen Houser[®]), *chiller* (Sharp[®]), *freezer* (Sharp[®]), *freeze dryer* (Labogene[®]), sentrifugator (PupickMed[®]), inkubator, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu Uvmini-1240[®]), alat-alat gelas (Pyrex[®]), spuit suntik (Onemed[®]), sonde oral, tabung penyimpan darah, wadah perenangan, pipa kapiler hematokrit (Nesco[®]), timbangan analitik (Ohaus[®]), dan penangas air.

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah: biomassa *S. platensis*, ekstrak air kulit manggis (Javaplant[®]), aluminium foil, buffer fosfat pH 7, vitamin C (Brataco[®]), *aquadest* (Dirasonita[®]), *aquabidest* (Dirasonita[®]), reagen Folin Ciocalteu (Sigma Aldrich[®]), reagen Dragendorff, Wagner, Mayer, HCl (Paison[®]), HNO₃ (Merck[®]), NaOH (Paison[®]),

H₂SO₄ (Mallinckrodt[®]), FeCl₃ (Merck[®]), kloroform (Merck[®]), Magnesium (Merck[®]), Na₂CO₃, asam galat (Sigma Aldrich[®]), etanol P.A, serbuk DPPH (Sigma Aldrich[®]), trikloroasetat (Merck[®]), *thiobarbituric acid* (Merck[®]), tetraetoksipropan (Sigma Aldrich[®]), dan Na₂EDTA.

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Penyiapan Sampel

Sampel yang digunakan adalah biomassa *S. platensis* 500 g yang diperoleh dari Balai Penelitian dan Budidaya Air Payau (BBPAP) Jepara, Jawa Timur dan serbuk ekstrak air kulit manggis 300 g yang diperoleh dari *Javaplant Extract Centre*, Jakarta.

2.3.2 Ekstraksi Sampel

2.3.2.1 Ekstraksi Fikosianin dari *Spirulina platensis*

Proses ekstraksi fikosinin dari *S. platensis* menggunakan *buffer* fosfat pH 7 (Na₂HPO₄-NH₂PO₄). Biomassa *S. platensis* sebanyak 50 g digerus dan ditambahkan dengan 1000 mL 0,01 M *buffer* fosfat (1:20). Larutan dihomogenkan menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100-120 rpm pada suhu ruang selama 24 jam, lalu dipindahkan ke *chiller* selama 2 jam, bungkus dengan aluminium *foil* beri label, kemudian dimasukkan ke *freezer* selama 24 jam. Endapan dan supernatan setelah itu dipisahkan dengan menggunakan teknik sentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm dengan suhu 4°C selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh kemudian dikeringkan secara *freeze drying* untuk mendapatkan serbuk pigmen fikosianin (Barus, 2013).

2.3.3 Penentuan Kandungan Senyawa

2.3.3.1 Kemurnian dan Rendemen Pigmen Fikosianin

Perhitungan kadar pigmen fikosianin dilakukan dengan mengukur serapan serbuk fikosianin menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 610-620 nm dan 280 nm. Pengukuran pada panjang gelombang 610-620 nm yang merupakan nilai absorbansi fikosianin dan 280 nm yang merupakan nilai absorbansi protein total. Kemurnian lalu diukur berdasarkan rasio, sesuai dengan Persamaan 1:

$$\text{Kemurnian} = \frac{\lambda_{610} - 620}{\lambda_{280}} \dots\dots\dots(1)$$

Selanjutnya dilakukan perhitungan rendemen ekstrak hasil ekstraksi dengan menggunakan rumus berikut (Sunanto, 2003):

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat sampel hasil ekstraksi}}{\text{Berat sampel sebelum diekstrak}} \times 100 \%$$

2.3.3.2 Skrining Fitokimia Ekstrak Kulit Manggis

a. Uji Alkaloid

Identifikasi alkaloid dilakukan dengan cara sampel ditambah sedikit kloroform dan 5 ml amonia dalam kloroform. Campuran diaduk selama 1 menit lalu disaring ke dalam tabung reaksi, selanjutnya ke dalam filtrat ditambahkan H₂SO₄ dan dikocok teratur hingga terbentuk dua lapisan. Reagen Wagner, Mayer, dan Dragendorff ditambahkan masing-masing 2 tetes ke lapisan atas. Jika tidak terbentuk endapan maka sampel tidak mengandung alkaloid.

b. Uji Terpenoid dan Steroid

Identifikasi terpenoid dan steroid dilakukan dengan cara sampel ditambah ammonia dalam kloroform lalu diaduk selama 1 menit, kemudian disaring ke dalam tabung reaksi. Filtrat yang didapat ditambahkan 1 mL H₂SO₄ 2N dan dikocok teratur selama 1 menit hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan bawah diteteskan pada plat tetes hingga kering, kemudian ditambah 3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes H₂SO₄ pekat. Sampel positif mengandung terpenoid ditandai dengan timbulnya warna merah jingga hingga ungu. Sampel positif mengandung steroid bila terbentuk warna hijau hingga biru.

c. Uji Tanin

Identifikasi tannin dilakukan dengan menggunakan reagen FeCl₃ 1%. Sampel diteteskan pada plat tetes kemudian ditambah dengan reagen. Sampel positif mengandung tanin ditandai dengan perubahan warna menjadi hitam kehijauan.

d. Uji Flavonoid

Identifikasi flavonoid secara kualitatif dikerjakan dengan pereaksi Shinoda (logam Mg + HCl). Sampel ditambahkan beberapa tetes HCl

pekat kemudian ditambahkan kurang lebih 0,20 mg logam magnesium. Indikator adanya flavonoid dalam sampel ditunjukkan dengan warna merah. Uji flavonoid yang kedua menggunakan NaOH 10%. Sampel diteteskan pada plat tetes kemudian ditambah NaOH 10%. Sampel positif mengandung flavonoid ditandai dengan perubahan warna kuning-*orange*-merah.

2.3.3.3 Penentuan Kandungan Total Fenolik Ekstrak Kulit Manggis

a. Pembuatan Larutan Asam Galat Sebagai Standar

Larutan induk asam galat dibuat dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan induk lalu diencerkan dengan metanol:air (1:1) sehingga dihasilkan konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm asam galat. Masing-masing konsentrasi di atas dipipet 100 μ L ditambah 3,95 mL *aquadest* ditambah 0,25 mL reagen Folin Ciocalteu lalu dikocok, diamkan selama 8 menit tambah 0,75 mL larutan Na_2CO_3 20% kocok homogen. Inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Panjang gelombang maksimum asam galat di tentukan dengan cara *scanning* panjang gelombang salah satu konsentrasi pada 400-800 nm. Serapan semua konsentrasi diukur pada panjang gelombang serapan maksimum yang telah didapatkan (Waterhouse, 1999).

b. Penentuan Kandungan Fenolik Total Sampel

Larutan induk ekstrak kulit manggis 250 ppm dilarutkan dengan metanol:air (1:1). Larutan tersebut dipipet 100 μ L ditambah 3,95 mL *aquadest* ditambah 0,25 mL Reagen Folin Ciocalteu lalu dikocok, diamkan selama 8 menit tambah 0,75 mL larutan Na_2CO_3 20% kocok homogen. Inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Serapannya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang serapan maksimum yang telah didapatkan yang ditandai dengan terbentuknya kompleks biru. Kadar fenol yang diperoleh dihitung sebagai mg ekuivalen asam galat/g sampel segar (Orak, 2006).

2.3.4 Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak *In vitro* dengan Metode DPPH

2.3.4.1 Pengujian Ekstrak Tunggal

a. Pembuatan Larutan dan Optimasi Panjang Gelombang DPPH

Larutan DPPH 0,1 mM dibuat dengan melarutkan DPPH 3,95 mg dalam etanol PA 100 ml kemudian dikocok sampai homogen. Larutan DPPH disimpan dalam wadah yang gelap agar terlindungi dari. Larutan ditentukan serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 hingga 800 nm serta ditentukan panjang gelombang optimumnya (Febriani, 2012).

b. Pengukuran Larutan Vitamin C sebagai Pembeding

Pembuatan larutan induk Vitamin C konsentrasi 100 ppm lalu diencerkan menjadi konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm. Masing-masing konsentrasi dipipet 1 mL lalu ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,1 mM lalu dikocok hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Serapan dari larutan tersebut diukur pada panjang gelombang yang telah didapatkan dari penentuan panjang gelombang optimum DPPH (Febriani, 2012).

c. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Fikosianin dan Ekstrak Kulit Manggis

Larutan induk masing-masing ekstrak dibuat dengan konsentrasi 5000 ppm lalu dilakukan pengenceran hingga didapatkan konsentrasi fikosianin 250, 500, 750, 1000, dan 1250 ppm dan konsentrasi ekstrak kulit manggis 250, 500, 750, 1000, dan 1250 ppm (Bendira, 2012).

Masing-masing konsentrasi dipipet 1 mL lalu ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,1 mM lalu dikocok hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Serapan dari larutan tersebut diukur pada panjang gelombang yang telah didapatkan dari penentuan panjang gelombang optimum DPPH (Bendira, 2012).

d. Perhitungan *Inhibition Concentration* 50 % (IC_{50})

Persentase aktivitas penghambatan DPPH pada masing-masing ekstrak dan kuersetin dinyatakan dengan % inhibisi

$$= \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Persen inhibisi yang diperoleh kemudian dibuat kurva antara persen inhibisi terhadap konsentrasi larutan uji. Persamaan regresi linier $y=a+bx$ dengan nilai x menunjukkan konsentrasi (ppm) dan y menunjukkan persentase inhibisi (%), sehingga dapat ditentukan nilai IC_{50} (Dungir dkk.,2012).

2.3.4.2 Penentuan Aktivitas Antioksidan dari Kombinasi Fikosianin dan Ekstrak Kulit Manggis

Pigmen fikosianin dan ekstrak kulit manggis masing-masing dibuat larutan induk 5000 ppm dengan cara melarutkan ekstrak dengan *aquadest* sehingga didapatkan konsentrasi yang diinginkan. Prosedur pengujian aktivitas antioksidan dari kombinasi ekstrak fikosianin dan ekstrak kulit manggis serta perhitungan persen inhibisi sama dengan yang dilakukan pada pengujian masing-masing ekstrak tunggal.

Tabel 1. Variasi konsentrasi kombinasi

Variasi Konsentrasi Kombinasi		Keterangan
Fikosianin	Ekstrak Kulit Manggis	
2 X	Y	High
X	Y	Medium
$\frac{1}{2}$ X	Y	Low

Konsentrasi larutan uji pigmen fikosianin dan ekstrak kulit manggis sesuai dengan IC_{50} yang dihasilkan dari pengujian ekstrak tunggal yang telah dilakukan sebelumnya, misal IC_{50} ekstrak pigmen fikosianin adalah X $\mu\text{g/mL}$ dan IC_{50} ekstrak kulit manggis adalah Y $\mu\text{g/mL}$, maka dilakukan variasi kombinasi konsentrasi yang dicampurkan dengan perbandingan 1:1. Variasi konsentrasi kombinasi dapat dilihat pada Tabel 1 (Saraswati dkk., 2013).

2.3.5 Uji Aktivitas Antioksidan *In vivo*

2.3.5.1 Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji diaklimatisasi selama 7 hari. Besar jumlah sampel yang digunakan diperoleh berdasarkan rumus Federer, yaitu:

$$(n-1) (t-1) \geq 15 \dots \dots \dots (3)$$

Berdasarkan keterangan di atas (t) adalah kelompok perlakuan, dan (n) adalah jumlah sampel perkelompok perlakuan. Pada penelitian ini, tikus dibagi menjadi 2 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan, dan jumlah tikus per kelompok 4 ekor, sehingga didapat jumlah 24 ekor tikus.

2.3.5.2 Persiapan Sediaan

Larutan induk dari masing-masing sampel dibuat dengan cara melarutkan 50 mg ekstrak fikosianin dan 50 mg ekstrak kulit manggis ke dalam 10 mL akuabides sehingga diperoleh konsentrasi 5000 ppm. Larutan lalu diencerkan menjadi beberapa sediaan sesuai dengan Tabel 2.

2.3.5.3 Pengukuran Malondialdehid (MDA)

Sampel darah diambil dari seluruh subyek penelitian, yaitu tikus putih jantan galur Wistar sebelum diberi perlakuan dari *medial canthus sinus orbitalis* \pm sebanyak 2 mL. Darah disentrifuga untuk mendapatkan plasma dan dilakukan pengukuran kadar MDA pada plasma.

Selama 7 hari tikus diberikan sediaan sampel sehari 1 kali secara per oral sesuai pada Tabel 2. Hari ke-8, semua tikus direnangkan sampai hampir tenggelam. Setelah perlakuan renang tersebut dilakukan pengambilan darah terhadap masing-masing hewan uji *melalui* pembuluh darah vena pada *mata* (Jawi dkk., 2012).

Darah diambil lalu disimpan dalam tabung penyimpanan darah 1-2 mL dan diberi antikoagulan Na_2EDTA . Darah disentrifuga selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm sehingga terpisah antara plasma dan sel darah tikus. Lapisan atas berupa plasma yang berwarna bening kekuningan diambil untuk pengukuran MDA. Berikut pembagian kelompok percobaan:

Tabel 2. Kelompok dan perlakuan hewan uji

Kelompok Hewan Uji	Perlakuan Hewan Uji	
	Sampel dan Dosis	Perlakuan Stres Oksidatif
Kontrol Negatif	<i>Aquadest</i>	perenangan
Kontrol Positif	Vitamin C 0,91 mg/200 g BB	perenangan
Perlakuan I	Fikosianin (X)	perenangan
Perlakuan II	Fikosianin dan ekstrak kulit manggis ($\frac{1}{2}X + Y$)	perenangan
Perlakuan III	Fikosianin dan ekstrak kulit manggis (X + Y)	perenangan
Perlakuan IV	Fikosianin dan ekstrak kulit manggis (2X + Y)	perenangan

a. Pembuatan Larutan Standar Tetraetoksipropan (TEP)

Larutan stok standar tetraetoksipropan (TEP) dibuat dengan cara 2 μ L larutan standar TEP murni dilarutkan dalam 160 mL *aquadest*. Larutan standar dibuat dengan 6 konsentrasi yaitu: 0,3125; 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; dan 10,0 nmol/mL dengan cara larutan stok standar TEP dipipet 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; dan 100 μ L dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan *aquadest* hingga 1000 μ L. Campuran larutan selanjutnya ditambahkan 1,5 mL larutan TBA 0,67%. Tabung diinkubasikan pada penangas air suhu 95-100°C selama 10 menit. Setelah itu tabung reaksi dikeluarkan dari penangas air dan didinginkan dalam bejana yang berisi air es. Hasil reaksi diambil kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang yang telah ditentukan sebelumnya.

b. Prosedur Pengukuran Kadar MDA Plasma

Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan mencampurkan 0,5 mL plasma darah dengan larutan 2,5 mL larutan trikloroasetat (TCA) 20% lalu dipanaskan pada penangas air selama 10 menit, setelah itu didinginkan dengan cepat menggunakan air es. Sampel disentrifuga pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk

diambil 1,5 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi lain dan ditambahkan 1,5 mL larutan *thiobarbituric acid* (TBA) 0,67%. Larutan selanjutnya dipanaskan selama 10 menit pada suhu 95-100°C, lalu didinginkan dalam bejana berisi air es, hasil filtrat diukur pada panjang gelombang 531 nm dengan spektrofotometer. Kadar MDA diukur dengan persamaan regresi kurva baku TEP.

2.4.5.4 Analisis Data

Analisis statistik menggunakan program SPSS 23.0TM. Pada penelitian ini data yang diperoleh dari uji kombinasi secara *in vitro* dan *in vivo* diuji normalitasnya dengan Shapiro-Wilk. Setelah data terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji ANOVA (*One-way*) dan uji LSD (*Least Significant Difference*) untuk melihat perbedaan antar kelompok.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Ekstraksi Fikosianin dari *S. platensis*

Biomassa *S. platensis* yang diekstraksi menggunakan *buffer* fosfat pH 7 0,01 M. Larutan dimasukkan ke dalam *freezer* selama 24 jam lalu dikeluarkan dan dicairkan di suhu ruang. Proses tersebut merupakan teknik *freeze-thawing*. Larutan yang berada di dalam *freezer* akan mengalami pembengkakan dan kerusakan sel yang disebabkan oleh terbentuknya kristal es selanjutnya pencairan pada suhu ruang akan menyebabkan kontraksi seluler sehingga sel akan mengalami kerusakan dan mengeluarkan pigmen sel (Salama, 2015).

Supernatan yang dihasilkan yang mengandung fikosianin dikeringkan menggunakan teknik *freeze drying* dengan tujuan untuk mempertahankan stabilitas pigmen fikobiliprotein, dengan cara menguapkan air yang terdapat di dalam larutan sehingga menghasilkan serbuk fikosianin yang berwarna biru gelap. Warna ekstrak yang dihasilkan jika dibandingkan dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Capriandes (2015), memiliki perbedaan warna biru yang signifikan. Hal ini diduga telah terjadi kerusakan pigmen ekstrak fikosianin yang disebabkan karena suhu dan panas yang tinggi selama pengiriman sampel yang menyebabkan degradasi ekstrak.

3.2 Penentuan Rendemen dan Kemurnian Pigmen Fikosianin

Hasil ekstraksi fikosianin setelah dikeringkan menghasilkan 21,065 g sehingga rendemen yang diperoleh sebesar 42,123%). Capriandes, (2015) melakukan ekstraksi fikosianin menggunakan prosedur dan biomassa yang sama menghasilkan rendemen sebesar 63,74% namun memiliki nilai kemurnian yang lebih rendah yakni sebesar 1,19. Ekstrak yang diperoleh oleh Capriandes diduga masih mengandung protein pengotor yang lebih banyak jika dibandingkan dengan ekstrak fikosianinnya sehingga diperoleh nilai kemurnian yang lebih rendah jika dibandingkan dengan hasil penelitian.

Fikosianin yang terkandung di dalam ekstrak dapat diketahui dengan cara *scanning* panjang gelombang maksimum pada 400-800 nm dan didapatkan panjang gelombang maksimum pada 616 nm. Menurut Prasanna *et al.* (2007), serapan maksimum fikosianin pada panjang gelombang 610-620 nm. Kemurnian fikosianin dapat diketahui dari rasio kemurnian fikosianin pada A_{616}/A_{280} . A_{616} adalah nilai absorbansi fikosianin pada panjang gelombang 616 nm dan A_{280} adalah nilai absorbansi protein-protein lain yang terikat pada fikosianin. Kemurnian yang diperoleh adalah 2,7. Nilai tersebut telah memenuhi kriteria untuk pangan (*food grade*) yaitu sebesar 0,7 (Madjoub *et al.*, 2009), sehingga fikosianin yang diperoleh dapat dikembangkan menjadi suatu sediaan yang bisa dikonsumsi, namun nilai tersebut belum memenuhi kriteria *reactive grade* (kosmetik) yang bernilai 3,9 dan *analytical grade* (standar baku dan *clinical drug*) lebih dari 4,0.

4.3 Penentuan Kandungan Total Fenolik Ekstrak Kulit Manggis

Penentuan kandungan total fenolik ekstrak kulit manggis menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Pengujian total fenol bertujuan untuk menentukan total senyawa fenolik yang terkandung di dalam ekstrak. Prinsip kerja metode Folin-Ciocalteu ini adalah reaksi antara senyawa fenol dengan reagen Folin-Ciocalteu. Reaksi ini melibatkan oksidasi gugus fenolik (ROH) dengan campuran asam fosfotungstat dan asam molibdat dalam reagen, menjadi bentuk quinoid (R=O) yang

berwarna biru. Intensitas perubahan warna tersebut diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Penentuan kadar fenol total ekstrak kulit manggis diperoleh dari persamaan regresi linier absorbansi terhadap konsentrasi asam galat. Penggunaan asam galat sebagai standar pengukuran dikarenakan asam galat merupakan turunan dari asam hidroksibenzoat yang tergolong asam fenol sederhana, sehingga efektif untuk membentuk senyawa kompleks dengan reagen folin. Pemilihan asam galat sebagai standar dikarenakan bentuknya yang stabil dan murni (Nur dan Astawan, 2011). Asam galat yang telah *discanning* menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 757 nm. Panjang gelombang maksimum yang didapatkan masuk ke dalam rentang, yakni antara 750-765 nm (Gulcin, 2012).

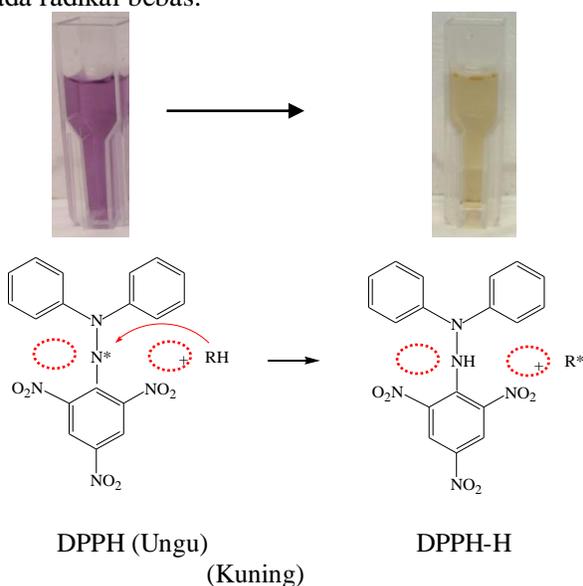
Kadar fenol total dapat diketahui dari pembuatan kurva baku standar asam galat sehingga diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,001x + 0,103$ dengan koefisien korelasi 0,997. Kadar fenol total ekstrak kulit manggis berdasarkan persamaan tersebut adalah 236 mg GAE/g berat sampel ekstrak kulit manggis, artinya dalam setiap gram ekstrak setara dengan 236 mg asam galat. Hal ini diduga karena adanya senyawa fenolik yang terkandung di dalam ekstrak kulit manggis. Senyawa fenolik pada kulit manggis sebagian besar bersifat polar sehingga dapat dengan mudah terekstrak pada pelarut air. Penelitian yang dilakukan oleh Makaryati (2014), memperoleh kandungan total fenol ekstrak kulit manggis sebesar 274,52 mg GAE/g ekstrak. Kadar total fenol tersebut jika dibandingkan dengan hasil penelitian memiliki nilai yang lebih besar karena memiliki senyawa *xanthone* yang terkandung di dalam ekstraknya.

4.4 Uji Aktivitas Antioksidan Fikosianin dan Ekstrak Kulit Manggis

Uji aktivitas antioksidan fikosianin dan ekstrak kulit manggis menggunakan metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*), yaitu berdasarkan transfer atom H dari fikosianin dan ekstrak kulit manggis untuk menetralkan radikal DPPH. Metode DPPH merupakan metode yang sederhana, mudah untuk penapisan aktivitas penangkapan radikal beberapa senyawa, serta efektif dan praktis (Molyneux, 2004). Aktivitas diukur dengan

menghitung jumlah pengurangan intensitas cahaya ungu DPPH yang sebanding dengan pengurangan konsentrasi DPPH. Peredaman tersebut dihasilkan oleh reaksi molekul DPPH dengan atom hidrogen yang dilepaskan oleh molekul komponen sampel sehingga terbentuk senyawa DPPH-H dan menyebabkan terjadinya perubahan warna DPPH dari ungu menjadi kuning (Zuhra *et al.*, 2008).

Pengujian aktivitas antioksidan dari fikosianin dan ekstrak kulit manggis dibandingkan terhadap vitamin C. Pemilihan vitamin C sebagai pembanding karena merupakan suatu senyawa yang mampu larut di dalam pelarut polar (Depkes RI, 1995), sama halnya dengan dengan sampel yang diuji yang larut didalam pelarut polar. Selain daripada itu vitamin C merupakan suatu antioksidan kuat (Shandiutami *et al.*, 2014) yang sudah banyak beredar di pasaran, sehingga diduga mekanisme peredaman radikal bebasnya sama dengan sampel yang diuji yakni dengan mendonorkan atom H kepada radikal bebas.

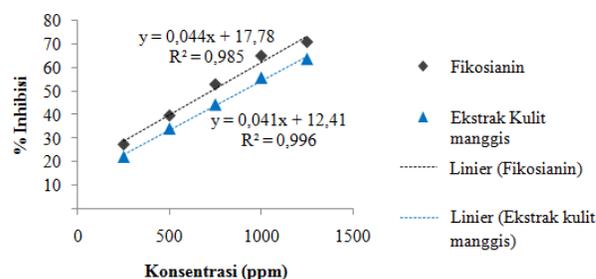


Gambar 1. Reaksi peredaman radikal bebas oleh larutan uji

Sampel yang sudah divariasikan dicampur dengan larutan DPPH. Campuran ini kemudian divortex dan diinkubasi pada tempat gelap dan suhu ruang selama 30 menit agar DPPH dapat bereaksi secara sempurna dengan sampel. Selama proses inkubasi terjadi reaksi antara senyawa antioksidan dengan radikal DPPH yang ditandai dengan perubahan warna larutan ungu pada DPPH menjadi

warna kuning hingga bening (Gambar 1). Perubahan ini terjadi ketika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan, maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang dan absorbansi pada panjang gelombang 516 nm akan berkurang.

Pengurangan intensitas warna ungu larutan DPPH secara kuantitatif dapat dihitung dari berkurangnya absorbansi larutan tersebut pada panjang gelombang yang diperoleh dari *scanning* panjang gelombang DPPH pada daerah *visible*. Semakin besar konsentrasi larutan uji, maka absorbansi yang dihasilkan akan semakin kecil yang menunjukkan bahwa aktivitas larutan uji dalam meredam radikal DPPH semakin besar. Hal tersebut dikarenakan absorbansi yang terukur adalah absorbansi dari sisa DPPH yang tidak bereaksi dengan larutan uji.



Gambar 2. Kurva regresi linier inhibisi DPPH oleh fikosianin dan ekstrak kulit manggis

Tabel 3. Persen penangkapan radikal DPPH oleh vitamin C, fikosianin, dan ekstrak kulit manggis pada berbagai konsentrasi

Sampel	Konsentrasi (ppm)	% inhibisi	IC ₅₀ (µg/mL)
Vitamin C	5	44,384	4,885
	10	65,398	
	15	81,703	
	20	87,017	
	25	94,324	
	250	27,648	
Fikosianin	500	39,819	760,697
	750	52,967	
	1000	64,988	
	1250	70,848	
	250	21,965	
	500	33,984	
Ekstrak kulit manggis	750	44,227	916,829
	1000	55,595	
	1250	63,587	

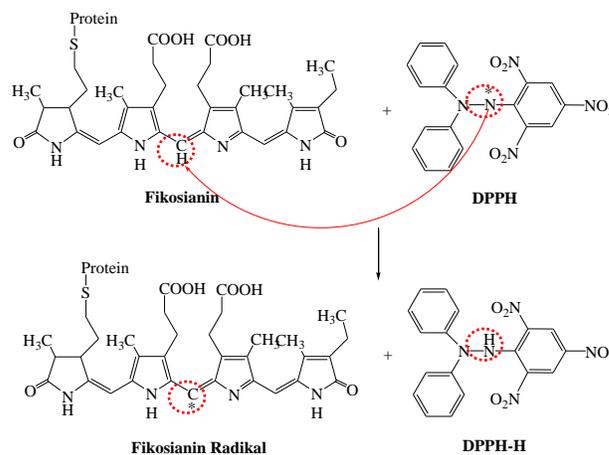
Nilai IC_{50} dipengaruhi oleh konsentrasi sampel. Semakin besar konsentrasi sampel maka semakin banyak elektron yang didonorkan untuk meredam radikal bebas DPPH, sehingga absorbansinya yang diberikan pun semakin menurun. Nilai IC_{50} berbanding terbalik dengan aktivitas antioksidan. Semakin rendah nilai IC_{50} maka semakin kuat aktivitas antioksidannya. Nilai IC_{50} ditentukan berdasarkan persamaan regresi linear antara konsentrasi sampel terhadap persen inhibisi.

Fikosianin dari *S. platensis* memiliki nilai IC_{50} sebesar 760,697 ppm, artinya bahwa konsentrasi 760,697 ppm ekstrak fikosianin dapat menghambat 50% aktivitas radikal bebas DPPH. Nilai IC_{50} dari ekstrak kulit manggis sebesar 916,829 ppm, berarti bahwa konsentrasi 916,829 ppm ekstrak kulit manggis dapat menghambat 50% aktivitas radikal bebas DPPH. Nilai IC_{50} yang telah diperoleh diketahui bahwa konsentrasi vitamin C yang mampu menurunkan sebesar 50% konsentrasi DPPH adalah 4,885 $\mu\text{g/mL}$. IC_{50} yang dihasilkan menunjukkan bahwa vitamin C termasuk ke dalam golongan antioksidan kuat. Nilai IC_{50} tersebut tidak berbeda jauh dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Shandiutami *et al.* (2014) dengan nilai IC_{50} 5,89 $\mu\text{g/mL}$.

Berdasarkan nilai IC_{50} vitamin C lebih tinggi dibanding dengan IC_{50} fikosianin dan ekstrak kulit manggis karena merupakan senyawa yang murni (Juniawati, 2013), sedangkan kedua ekstrak tersebut masih dalam bentuk campuran dari beberapa senyawa. Berbagai senyawa yang terdapat di dalam ekstrak tersebut ada yang memiliki aktivitas antioksidan tetapi ada pula yang tidak, namun hal ini tidak menjamin senyawa murni yang terkandung di dalam ekstrak memiliki aktivitas antioksidan yang jauh lebih baik dari vitamin C. Perbandingan IC_{50} vitamin C, fikosianin, dan ekstrak kulit manggis adalah 1:156:188. Hal ini menunjukkan bahwa untuk kebutuhan orang dewasa vitamin C dengan dosis 500 mg sehari (DepkesRI, 1995) agar memberikan efek yang sama dibutuhkan fikosianin sebesar 78.000 mg dan ekstrak kulit manggis sebesar 94.000 mg.

Berdasarkan Gambar 3 fikosianin mengandung rantai tetrapirrol terbuka yang diduga mempunyai kemampuan menangkap radikal

oksigen. Struktur fikosianin mirip dengan struktur bilirubin. Romay *et al.* (1998) menyatakan bahwa bilirubin adalah antioksidan yang mampu mengikat radikal peroksida lipid dengan cara mendonorkan atom hidrogen yang terikat pada atom C ke 10 pada molekul tetrapirrol. Atom C ke 10 ketika telah melepaskan atom H akan mendelokalisasi ikatan rangkap sehingga menjadi lebih stabil dan terbentuk antioksidan yang tidak reaktif.



Gambar 3. Mekanisme peredaman radikal bebas DPPH oleh fikosianin (Romay *et al.*, 1998)

Fikosianin yang diekstraksi memiliki nilai IC_{50} sebesar 760,697 ppm. Penelitian yang dilakukan Capriandes (2015), IC_{50} fikosianin sebesar 80,50 ppm, jika dibandingkan dengan penelitian ini ekstrak fikosianin yang diperoleh memiliki potensi antioksidan yang sangat lemah karena mempunyai nilai IC_{50} di atas 200 ppm. Molyneux (2004), menyatakan bahwa suatu senyawa digolongkan sebagai antioksidan sangat kuat apabila nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat apabila nilai IC_{50} antara 50-100 ppm, sedang apabila nilai IC_{50} berkisar 100-150 ppm, dan lemah apabila nilai IC_{50} berkisar 150-200 ppm.

Perbedaan potensi antioksidan ini diduga karena adanya senyawa kelompok lain di luar fikosianin yang ikut terekstrak dan juga memiliki kemampuan mereduksi radikal bebas DPPH. Selain itu *S. platensis* yang diekstraksi berupa serbuk kering. Proses pengeringan sangat berpengaruh atau merusak struktur senyawa antioksidan jika menggunakan suhu di atas 60°C. Penggunaan suhu

di atas 60°C dapat menyebabkan degradasi (kerusakan) struktur akibat meningkatnya energi kinetik pada struktur sehingga menurunkan aktivitas antioksidannya. Sampel segar akan mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih baik daripada sampel kering (Damar *et al.*, 2014).

Aktivitas antioksidan dari ekstrak kulit manggis memberikan IC₅₀ sebesar 916,829 ppm. Aktivitas antioksidan tidak sama dengan penelitian Miryanti dkk. (2011), yang mendapatkan hasil bahwa ekstrak air kulit manggis memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan IC₅₀ sebesar 40,890 ppm. Nilai IC₅₀ jika dibandingkan dari penelitian ini diperoleh aktivitas antioksidan ekstrak kulit manggis yang lemah, karena ekstrak yang digunakan hanya mengandung senyawa tanin sedangkan pada penelitian Miryanti dkk. (2011), ekstrak yang digunakan mengandung senyawa golongan *xanthone*.

Tabel 4. Hasil skrining fitokimia ekstrak kulit manggis

Metabolit Sekunder	Hasil
Tanin	+
Flavonoid	-
Terpenoid	-
Steroid	-
Alkaloid	-

Turunnya aktivitas penangkap radikal dari ekstrak kulit manggis diduga karena sedikitnya senyawa golongan *xanthone* yang terekstraksi. *Xanthone* merupakan golongan senyawa yang memberikan aktivitas antioksidan tertinggi di kulit manggis (Iswari, 2011). Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak kulit manggis positif mengandung tanin (Tabel 4). Penelitian yang telah dilakukan oleh Phebriyanti (2010) air yang digunakan sebagai pelarut dalam mengekstraksi kulit manggis mampu mengekstraksi golongan tanin. Tanin merupakan golongan senyawa fenol yang bersifat polar. Kepolaran senyawa tersebut dikarenakan tanin merupakan senyawa polihidroksi (memiliki lebih dari satu gugus hidroksil) (Harborne, 1987). Semakin banyak gugus hidroksil yang dimiliki maka senyawa tersebut bersifat semakin polar, sehingga akan mudah larut dalam pelarut polar pula.

4.5 Uji Aktivitas Antioksidan dari Kombinasi Fikosianin dan Ekstrak Kulit Manggis

Uji kombinasi yang dilakukan pada penelitian ini dibagi menjadi tiga konsentrasi, yaitu 2X+Y (tinggi), X+Y (sedang), dan ½X+Y (rendah). Ketiga konsentrasi tersebut didapatkan dari IC₅₀ ekstrak tunggal yang telah diuji sebelumnya, X sebagai IC₅₀ dari fikosianin dan Y sebagai IC₅₀ dari ekstrak kulit manggis (Saraswati dkk., 2013). Prosedur yang dilakukan sama seperti yang telah dikerjakan pada pengujian aktivitas antioksidan tunggal sehingga diperoleh absorbansi serta perhitungan persen inhibisi yang disajikan pada Tabel 5.

Hasil penelitian diperoleh persen inhibisi yang menunjukkan seberapa besar kemampuan sampel untuk mereduksi radikal DPPH. Data tersebut menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi maka semakin besar persen inhibisinya, dan semakin besar aktivitas antioksidannya. Konsentrasi 2X+Y mempunyai kandungan fikosianin dua kali lebih besar daripada X, sehingga senyawa yang mampu menghambat aktivitas radikal bebas juga semakin banyak. Hal ini menyebabkan persen inhibisi yang dihasilkan juga semakin besar. Konsentrasi ½X+Y mempunyai kandungan fikosianin setengah lebih kecil daripada X, sehingga senyawa yang mampu menghambat aktivitas radikal bebas juga semakin sedikit. Hal ini menyebabkan persen inhibisi yang dihasilkan juga semakin kecil.

Tabel 5. Persen penangkapan radikal bebas DPPH oleh kombinasi fikosianin dan ekstrak kulit manggis

Konse ntrasi (ppm)	Abs Blan ko	Rata- rata Abs. Blan ko	Abs. samp el	Rata- rata Abs. Samp el	% inhibis i
2X+Y (tinggi)	0,458		0,127 0,129 0,130 0,143	0,128	72,028
X+Y (sedang)	0,462	0,460	0,154 0,135 0,220	0,144	68,695
½X+Y (rendah)	0,460		0,186 0,192	0,199	56,667

Berdasarkan uji normalitas yang dilakukan, didapatkan hasil bahwa data terdistribusi secara normal dengan nilai signifikansi ($p > 0,005$) namun tidak homogen dengan nilai signifikansi 0,048 ($p < 0,005$). Data lalu ditransformasikan sampai menjadi homogen sehingga didapatkan data homogen ($\text{sig} = 0,117$) dalam bentuk *cubic*. Analisis data dilanjutkan menggunakan metode *Oneway Anova*. Hasil analisis *Oneway Anova* menunjukkan nilai signifikansi ($p = 0,000$), yang berarti bahwa varian dari dua atau lebih kelompok populasi data berbeda signifikan.

3.6 Uji *In vivo* Kombinasi Fikosianin dan Ekstrak Kulit Manggis

Uji *in vivo* kombinasi fikosianin dan ekstrak kulit manggis menggunakan metode TBARS (*Thio Barbituric Acid Reactive Substance*). Darah yang diambil dari *vena chantus orbitalis* mata tikus diberi antikoagulan EDTA untuk mencegah koagulasi darah. Darah disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan antara plasma yang terdapat pada bagian atas dengan sel-sel darah pada bagian bawah. Plasma yang diperoleh digunakan untuk mengukur kadar MDA.

Plasma yang diperoleh ditambahkan dengan TCA 20% yang bertujuan agar protein yang terkandung di dalam plasma darah mengendap sehingga tidak mengganggu saat pengukuran. Adapun mekanisme kerja dari TCA yaitu sebagai agen presipitasi, ion negatif dari TCA akan bergabung dengan protein yang sedang berada pada kondisi kation hingga membentuk garam protein. Beberapa garam yang dihasilkan tidak larut sehingga dapat terpisah dari larutan (Momuat dkk, 2013). Setelah ditambah TCA disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan antara protein yang mengendap dengan larutan yang telah bebas dari protein.

Supernatan yang diperoleh dari sentrifugasi ditambahkan TBA 0,67% lalu dipanaskan pada suhu 100°C. Tujuan pemanasan adalah untuk mempercepat reaksi pembentukan kompleks TBA-MDA yang ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi merah muda. Pembentukan kompleks tersebut diukur menggunakan spektrofotometer yang telah *discanning* pada panjang gelombang 531 nm.

Nilai absorbansi yang diperoleh digantikan dengan y pada persamaan regresi linear yang diperoleh dari pembuatan kurva kalibrasi TEP sehingga dapat diketahui kadar MDA tikus. TEP digunakan sebagai standar dalam mengukur kadar MDA. TEP dalam keadaan asam dapat terhidrolisis menghasilkan hemiasetal dan metanol, hemiasetal yang terbentuk kemudian akan terdekomposisi menjadi metanol dan aldehyd yang dapat bereaksi dengan TBA (Wresdiyati *et al.*, 2002 dan Prasetyawati *et al.*, 2003).

Tabel 6. Perbandingan rata-rata kadar MDA awal dan akhir tiap kelompok

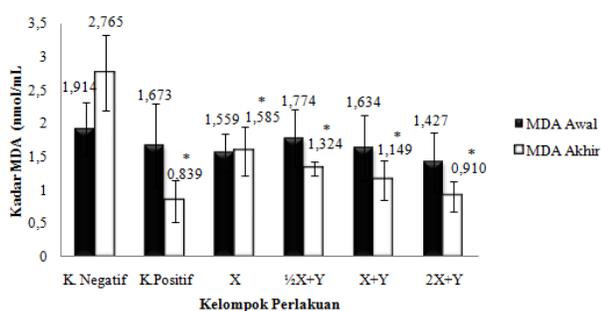
Kelompok	MDA	MDA
	Awal (nmol/ml) ±SD	Akhir (nmol/ml) ±SD
Kontrol negatif	1,914±0,201	2,764±0,284
Kontrol positif	1,673±0,312	0,839±0,156
2X+Y	1,427±0,222	0,910±0,115
X+Y	1,634±0,243	1,149±0,145
½X+Y	1,777±0,219	1,324±0,559
X	1,559±0,144	1,585±0,186

Sebelum perlakuan dimulai terlebih dahulu darah tikus diambil untuk pengujian MDA awal. Tujuan pengukuran MDA di awal agar peneliti dapat mengetahui apakah tikus tersebut memang dari awal sudah mengalami kenaikan kadar MDA ataukah penurunan dipengaruhi oleh pemberian ekstrak. Data yang dihasilkan menunjukkan bahwa kadar MDA awal tikus dalam rentang normal

Menurut Karatas (2005) kadar MDA normal pada tikus adalah 1,84±0,37. Namun hasil pengukuran MDA awal terdapat beberapa tikus yang memiliki kadar MDA di atas rentang normal, hal ini disebabkan karena faktor internal (hormon yang memicu stres) maupun eksternal masing-masing tikus, bisa disebabkan karena tikus tersebut sudah stres, dipengaruhi oleh makanan ataupun dipengaruhi oleh lingkungan.

Berdasarkan Tabel 6, pengukuran kadar MDA akhir masing-masing kelompok menunjukkan

adanya peningkatan rata-rata kadar MDA plasma pada kelompok kontrol negatif dibandingkan dengan kontrol positif dan kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan terjadi peningkatan radikal bebas akibat aktivitas fisik berat menggunakan cara perenangan selama 55 menit. Peningkatan kadar MDA juga menandakan meningkatnya peroksidasi lipid yang membuktikan bahwa terjadi stres oksidatif. Stres oksidatif ini disebabkan adanya keadaan yang tidak seimbang antara produksi radikal bebas dengan produksi antioksidan (Kurkchu *et al.*, 2010).



Ket : * : Berbeda signifikan terhadap kelompok kontrol negatif

Gambar 4. Perbedaan kadar MDA awal dan MDA akhir setelah perlakuan

Sandhiutami (2014), mengatakan bahwa perenangan selama 55 menit mampu meningkatkan stres oksidatif sehingga akan meningkatkan kadar MDA tikus. Perenangan termasuk ke dalam aktivitas fisik maksimal. Selama aktivitas fisik tersebut, terbentuk radikal bebas bersamaan dengan reaksi oksidasi fosforilasi untuk membentuk energi (ATP) dalam mitokondria. Reaksi tersebut membutuhkan oksigen yang akan bereaksi dengan hidrogen untuk membentuk air, tetapi sejumlah oksigen dapat berubah menjadi radikal bebas. Semakin berat aktivitas fisik maka dibutuhkan semakin banyak ATP, juga semakin banyak radikal bebas yang dihasilkan sebagai produk samping, salah satunya adalah MDA (Arsana, 2014).

Kadar MDA akhir bila dibandingkan dengan MDA awal sebelum pemberian ekstrak (Gambar 4) terjadi penurunan pada kelompok dosis dan kelompok kontrol positif, dan terjadi peningkatan kadar MDA pada kelompok kontrol negatif dan dosis X. Penurunan persentase kadar MDA pada

kelompok kontrol positif, kelompok 2X+Y, kelompok X+Y dan kelompok ½X+Y secara berturut-turut sebesar 49,85; 36,20; 29,68, dan 25,33%. Terjadi kenaikan persentase kadar MDA pada kelompok X dan kelompok kontrol negatif berturut-turut sebesar 1,67% dan 44,46%. Jadi, dapat disimpulkan bahwa kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan yang diberikan kombinasi ekstrak fikosianin dan ekstrak kulit manggis dengan 3 variasi dosis terjadi penurunan kadar MDA dibandingkan kelompok kontrol negatif dan dosis X.

Penurunan kadar MDA kelompok vitamin C karena aktivitas antioksidan vitamin C yang kuat sebesar 4,885 ppm. Aktivitas tersebut disebabkan oleh kemampuan vitamin C mendonorkan proton terhadap radikal bebas yang ada. Vitamin C mudah mengalami oksidasi oleh radikal bebas karena mempunyai ikatan rangkap dan dengan adanya 2 gugus-OH yang terikat pada ikatan rangkap tersebut. Radikal bebas akan menarik atom hidrogen dan menyebabkan muatan negatif pada atom oksigen yang selanjutnya akan didelokalisasi melalui resonansi, sehingga menghasilkan radikal bebas yang stabil dan tidak membahayakan (Cholisosh dan Utami, 2008).

Penurunan kadar MDA pada kelompok 2X+Y karena aktivitas antioksidan dari fikosianin dan ekstrak kulit manggis yang mampu meredam radikal bebas, sehingga reaksi berantai pembentukan MDA terputus. Penurunan kadar MDA pada kelompok 2X+Y lebih besar dibandingkan dengan kelompok X+Y dan ½X+Y karena mengandung fikosianin dua kali lebih besar dibandingkan kelompok X+Y dan mengandung fikosianin empat kali lebih besar dibandingkan kelompok ½X+Y. Hal ini dapat diartikan bahwa pemberian vitamin C dan kombinasi ekstrak fikosianin dan ekstrak kulit manggis dapat menghambat rantai peroksidasi lipid pada tahap inisiasi dan propagasi sehingga pembentukan MDA sebagai produk hasil peroksidasi lipid akan terhambat.

Peningkatan kadar MDA pada kelompok kontrol negatif terjadi karena kelompok ini tidak diberi perlakuan apapun, selain diberi *aquadest* dan *pellet* standar. *Aquadest* tidak mampu menghentikan rantai pembentukan MDA, sehingga

kadar MDA kelompok ini meningkat. Pada kelompok X terjadi peningkatan kadar MDA dari $1,559 \pm 0,144$ menjadi $1,585 \pm 0,186$. Persentase peningkatan tersebut sebesar 1,67% jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yang mengalami peningkatan sebesar 44,46%. Kelompok X diduga mampu menghambat reaksi berantai pembentukan MDA, namun tidak sebesar kelompok vitamin C, $2X+Y$, $X+Y$ dan $\frac{1}{2}X+Y$. Hal ini disebabkan oleh kelompok X hanya mengandung fikosianin, jadi belum mampu menurunkan kadar MDA plasma yang sama seperti kelompok dosis lainnya jika tidak dikombinasikan dengan ekstrak kulit manggis.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa setelah diberikan kombinasi fikosianin dan ekstrak kulit manggis selama 7 hari mampu menurunkan kadar MDA tikus jantan. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh senyawa yang terkandung di dalam fikosianin dan ekstrak kulit manggis yang bertindak sebagai antioksidan. Hal ini juga didukung oleh data *in vitro*, fikosianin dan ekstrak kulit manggis mampu menghambat aktivitas radikal bebas DPPH dengan mendonorkan elektronnya. Dengan demikian hasil penelitian ini menegaskan bahwa kombinasi fikosianin dan ekstrak kulit manggis mampu meredam terjadinya stres oksidatif yang terbentuk selama aktivitas fisik maksimal.

Fikosianin dan ekstrak kulit manggis yang merupakan antioksidan mampu mencegah terjadinya peroksidasi lipid pada tahap inisiasi dan propagasi. Pada tahap inisiasi, radikal menyerang asam lemak tak jenuh (memiliki ikatan rangkap lebih dari satu) sehingga terbentuk lipid radikal yang dapat distabilisasi dengan penyusunan kembali molekul membentuk diena konjugasi yang dapat berkombinasi dengan oksigen membentuk radikal peroksi. Senyawa antioksidan dalam hal ini fikosianin dan ekstrak kulit manggis selanjutnya akan menangkap radikal peroksi. Pada tahap propagasi, radikal peroksi menangkap hidrogen dari molekul lipid yang lain sehingga memutus reaksi rantai peroksidasi lipid dan menyebabkan terbentuknya radikal yang baru. Produk yang dihasilkan adalah hidroperoksida yang tidak stabil (karena mempunyai kemampuan untuk mendonorkan atom H-nya kembali) sehingga dapat membentuk beberapa produk sekunder termasuk

MDA yang bersifat toksik (Winarsi, 2007). Jadi ketika terdapat antioksidan seperti fikosianin dan ekstrak kulit manggis reaksi berantai tersebut akan dihentikan, sehingga tidak terbentuk produk MDA.

Dari hasil uji normalitas menunjukkan bahwa kadar MDA awal terdistribusi secara normal, yakni nilai signifikansi ($p > 0,05$) dan data homogen dengan nilai signifikansi ($p > 0,05$). Analisis statistik dapat dilanjutkan menggunakan *oneway anova* dengan hasil signifikansi ($p > 0,05$) yang menggambarkan bahwa kadar MDA awal tidak berbeda secara bermakna antar kelompok. Hal ini menunjukkan bahwa setiap hewan uji memiliki kadar MDA yang tidak berbeda sebelum diberi perlakuan, yang artinya bahwa belum ada efek yang dihasilkan jika tikus belum diberi ekstrak dan diinduksi dengan perenangan.

Hasil kadar MDA akhir yang telah diuji normalitas menunjukkan sebaran data yang normal dengan nilai signifikansi ($p > 0,05$) dan data homogen dengan nilai signifikansi ($p > 0,05$). Analisis statistik dapat dilanjutkan menggunakan *oneway anova* dengan hasil signifikansi ($p < 0,05$) yang berarti bahwa kadar MDA berbeda secara bermakna. Hal ini disebabkan karena setelah perlakuan dan pemberian sampel menyebabkan perbedaan kadar MDA antar kelompok tikus. Hasil pengujian statistik dengan menggunakan *oneway anova* kemudian dilanjutkan dengan uji LSD. Pada hasil uji LSD pada masing-masing kelompok terlihat bahwa kelompok positif memiliki kadar MDA yang tidak berbeda secara bermakna terhadap kelompok $2X+Y$ dengan nilai signifikansi ($p = 0,774$). Artinya efek yang diberikan oleh vitamin C dalam menurunkan kadar MDA tikus sama dengan dosis $2X+Y$. Hasil analisis statistik juga menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif memiliki perbedaan yang bermakna secara signifikan dengan kelompok kontrol positif, $2X+Y$, $X+Y$, $\frac{1}{2}X+Y$, dan X yang artinya bahwa metode perenangan selama 55 menit mampu menginduksi pembentukan radikal bebas dan meningkatkan kadar MDA tikus.

4 KESIMPULAN DAN SARAN

4.1 Kesimpulan

Kombinasi fikosianin *S. platensis* dan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana L.*) memiliki

aktivitas antioksidan secara *in vitro* yang ditunjukkan oleh nilai persen inhibisi. Konsentrasi 2X+Y, X+Y dan $\frac{1}{2}$ X+Y memperoleh nilai persen inhibisi secara berturut-turut yakni 72,028%, 68,695% dan 56,667%. Semakin besar konsentrasi kombinasi ekstrak maka semakin besar pula aktivitas antioksidannya.

Aktivitas antioksidan kombinasi fikosianin *S. platensis* dan ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana L.*) secara *in vivo* dapat menurunkan kadar MDA tikus pada kelompok $\frac{1}{2}$ X+Y dari 1,777 \pm 0,219 menjadi 1,324 \pm 0,055, kelompok X+Y dari 1,634 \pm 0,243 menjadi 1,149 \pm 0,145 dan kelompok 2X+Y dari 1,427 \pm 0,222 menjadi 0,910 \pm 0,115. Semakin besar dosis kombinasi yang diberikan maka semakin besar pula penurunan kadar MDA tikus.

4.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian untuk mempertahankan kestabilan pigmen fikosianin seperti kopigmentasi, uji aktivitas antioksidan dari kombinasi fikosianin dari *S. platensis* dan ekstrak kulit manggis secara *in vitro* menggunakan metode ABTS, penelitian secara *in vivo* dengan menggunakan metode lain seperti diinduksi dengan obat atau paparan radiasi untuk meningkatkan radikal bebas tikus, sehingga dapat diketahui apakah kombinasi dari fikosianin dan ekstrak air kulit manggis benar-benar mampu menurunkan kadar MDA tikus serta pembuatan sediaan dari kombinasi fikosianin dan ekstrak kulit sebagai antioksidan, seperti kapsul dan tablet.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustini, N.W.S. 2002, *Aktivitas Antioksidan dan Uji Toksisitas Hayati Pigmen Fikobiliprotein dari Ekstrak Spirulina platensis*, Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI, Bogor, Indonesia.
- Andrawulan, N., Wijaya, N. & Cahyono. 1996. Aktivitas Antioksidan Dari Daun Sirih (*Piper betle L.*), *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, **7(1)**: 29-30.
- Arsana, I.N. 2014, 'Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L.*) dan Pelatihan Fisik Menurunkan Stres Oksidatif pada Tikus Wistar (*Rattus Novergicus*) selama Aktivitas Fisik Maksimal' *Disertasi*, D.r, Universitas Udayana, Denpasar.
- Barus, A. 2013, *Kandungan Fikosianin dan Antioksidan Spirulina platensis Yang Ditumbuhkan Dalam Media Dan Umur Kultivasi Berbeda*. Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia.
- Bendira, A. 2012, 'Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun *Premna oblongata Miq.* Dengan Metode DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Teraktif', *Skripsi*, S.Farm, Program Studi Ekstensi Farmasi, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok.
- Capriandes, A.R. 2015, 'Pengembangan Pigmen Fikosianin dari Ekstrak Mikroalga *Spirulina platensis* dalam Formulasi Losio Sebagai Antioksidan' *Skripsi*, S.Farm, Sekolah Tinggi Farmasi Bandung, Bandung.
- Cholisoh, Z. & Utami, W. 2008, Aktivitas Penangkap Radikal Ekstrak Ethanol 70% Biji Jengkol (*Archidendron jiringa*), *Pharmacon*, **9**:33-40.
- Damar, A.R., Runtuwene, M.R.J. & Silvia, D. 2014, Kandungan Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Total Ekstrak Etanol Daun Kayu Kapur (*Melanolepsis multiglandulosa Reinch*), *Jurnal Ilmiah Farmasi FMIPA UNSRAT*, **3(4)**: 11-2
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995, *Farmakope Indonesia*, Edisi IV, Departemen Kesehatan RI, Jakarta, Indonesia.
- Dungir, S.G., Dewa, G.K. & Vanda S.K. 2012, Aktivitas antioksidan Ekstrak Fenolik dari Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L*), *Jurnal MIPA UNSRAT online*, **1(1)**: 11-15.
- Febriani, K. 2012, 'Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Daun Gambir *Cocculus orbiculatus (L.) DC.* Dengan Metode DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi yang Aktif', *Skripsi*, S.Farm., Farmasi, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok.
- Gulcin, L. 2012, Antioxidant activity of food constituents: an overview, *Arch. Toxicol*, **86**:345-391.

- Harborne, J.B. 1987, *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, diterjemahkan dari Bahasa Inggris oleh Padmawinata, K. & Soediro, I., Penerbit ITB, Bandung, Indonesia.
- Iswari, K. 2011, *Kulit Manggis Berkhasiat Tinggi*, Madya Centradifa, Jakarta, Indonesia.
- Jawi, I.M., Suprpta, D.N., Arcana, I.N., Indrayani, A.W. & Subawa, A.A.N. 2012, Efek Antioksidan Ekstrak Air Umbi Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas L*) Terhadap Darah dan Berbagai Organ pada Mencit yang diberikan Beban Aktivitas Fisik Maksimal, *Tradisional medicine Journal*, **17**.
- Juniawati, I.P., Fauziyah. & Elfita, 2012, Aktivitas Antioksidan Daun dan Biji Buah Nipah (*Nypa fruticans*) Asal Pesisir Banyuasin Sumatera Selatan Dengan Metode DPPH, *Maspri Journal*, **5 (1)**, 16-21.
- Karatas, F., Kara, H., Servi, S., Tug., Erulas, F.A. & Koca M. 2005, Investigation of Antioxidant Vitamins (A, E, C) and Lipid Peroxidation Levels in Rats Injected N-(1,3-Benzothiazol-2-yl)- N-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl) amine, *Molecules*, **10**, 922-928.
- Kurkcu, R., Tekin, A., Ozda, S. & Akcakoyun, F. 2010, The Effects of Regular Exercise on Oxidative and Antioxidative Parameters in Young Wrestlers. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **4(5)**: 244-51.
- Majdoub, H., Ben, M.M., Chaubet, F., Roudesli, M.S. & Maaroufi, R.M. 2009, Anticoagulant Activity of A Sulfated Oligosaccharide from The Green Alga *Arthrospira plantensis*. *Biochim Biophys Acta*, 1790: 1377- 1381.
- Miryanti, A., Sapei, L., Budiono, K.. & Indra, S. 2011, *Ekstraksi Antioksidan dari Kulit Manggis*, diakses pada 22 Oktober 2015, <<http://journal.unpar.ac.id>>.
- Molyneux, P. 2004, The Use of Stable Free Radical *Diphenylpicrylhydrazyl* (DPPH) for Stimating Antioxidant Activity, *J Sci Technol*, **26**: 211-219.
- Momuat, L.I., Meiske, S.S & Purwati, N.P. 2011, Pengaruh VCO Mengandung Ekstrak Wortel terhadap Peroksida Lipid Plasma, *Jurnal Ilmiah Sains*, **11(2)**: 296-301.
- Nur, A.M. & Astawan, M. 2011, 'Kapasitas Antioksidan Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia*) Dalam Bentuk Segar, Simplisia dan Keripik, Pada Pelarut Nonpolar, Semipolar dan Polar', *Skripsi*, S.P, Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Institut Pertanian Bogor.
- Orak, H.H. 2006, Total Antioxidant Activities, Phenolics, Anthocyanins, Polyphenoloxidase Activities In Red Grape Varieties, *Electronic, Sci Horti-England*, **111**: 235-241.
- Prasanna, R., Kumar, R., Sood, A., Prasanna, B.M. & Singh, P.K. 2006, Morphological, Physiochemical and Molecular Characterization of Anabaena Strains, *Microbiological Research*, **161**: 187-202.
- Putra, I.N.K. 2010, Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L.*) serta Kandungan Senyawa Aktifnya, *Jurnal Teknologi dan Industri pangan*, **XXI(1)**:1.
- Rachman, F., Logawa, E.D., Hegartika, H. & Simanjuntak, P. 2008, 'Aktivitas antioksidan ekstrak tunggal dan kombinasinya dari tanaman *Curcuma spp*'. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, **6(2)**:69-74.
- Romay, C., Armesto, J., Ramirez, D., Gonzales, R., Ledon, N. & Garcia, I. 1998, Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae. *Inflamm Res.* **(47)**: 36– 41.
- Salama, A., Abdel, G.A., Osman, A. & Sitohy, M. 2015, Maximising Phycocyanin Extraction from A Newly Identified Egyptian Cyanobacteria Strain, *Anabaena oryzae* SOS13, *International Food Research Journal* **22(2)**: 517-525.
- Saraswati, V., Risdian, C., Budiawati, T.A. & Tjandrawati, M. 2013, Aktivitas Antioksidan dari Kombinasi Ekstrak Etanol Kulit Manggis, Daun Sirsak, dan Daun Sirih Merah, Pusat Penelitian Kimia LIPI, Bandung.

- Sedjati, S., Yudiati, E. & Suryono. 2012, Profil Pigmen Polar dan Non Polar Mikroalga Laut *Spirulina sp.* dan Potensinya sebagai Pewarna Alami, *Jurnal Ilmu Kelautan*, **17(3)**: 176-181.
- Sandhiutami, N.M.D. & Rahayu, L. 2014, Uji Toksisitas Akut, Aktivitas Antioksidan *In Vitro* dan Efek Rebusan Bunga Kemboja Merah (*Plumeria rubra L.*) terhadap Kadar Malondialdehid, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 43-49.
- Sunanto, H. 2003. *Budi Daya dan Penyulingan Kayu Putih*, Kanisius, Yogyakarta, Indonesia.
- Waterhouse, A. 1999, Folin Ciocalteau Micro Method for Total Phenol in Wine, *Amj Enol Viticult*, **28**: 1-3.
- Winarsi, H. 2007, *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*, Kanisius, Yogyakarta, Indonesia.
- Wresdiyati, M.A., Dini, I.K.M., Savitri, N. & Aryani, S. 2002, Pengaruh A -Tokoferol Terhadap Profil Superoksida Dismutase Dan Malondialdehida Pada Jaringan Hati ikus Di Bawah Kondisi Stres, *Jurnal Veteriner* **13**:111.
- Zuhra, C.F., Tarigan, J.B. & Sihotang, H. 2008, Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Daun Katuk (*Sauropus androgunus (L) Merr.*), *Journal Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sumatera Utara*, Sumatera Utara (3).

