

Produksi, isolasi dan karakterisasi superoksida dismutase dari *Spirulina platensis* yang dibiakkan dalam serum lateks

*Production, isolation, and characterization of superoxyde dismutase from *Spirulina platensis* cultured on latex serum*

TRI-PANJI¹⁾, SUHARYANTO¹⁾ & Marini WIJAYANTI²⁾

¹⁾ Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor 16151, Indonesia

²⁾ Program Studi Biokimia, Fakultas Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor, Indonesia

Summary

Spirulina platensis is a blue-green microalga which is frequently used for food and feed supplements and cosmetic active agent. This microalga also produces a strong antioxidant namely superoxide dismutase (SOD) used as cosmetic active agent for anti aging and anti free radicals. SOD was isolated from *S. platensis* cell biomass from local isolate grown on latex serum on semipilot (3.5 m³) and pilot scale (40 m³) then dried with spray drying or sun drying and characterized. SOD was purified with sequential two-stage sedimentation using ammonium sulphate and fractionated in chromatographic column containing Sephadex G 200. The fractions were analysed to determine the activity, cofactor metal and amino acid composition of the antioxidant. The results showed that sedimentation of SOD extract with 80% ammonium sulphate produced SOD with higher activity compared to that of SOD from commercial *S. platensis* biomass. This SOD was successfully isolated and purified. Metaloenzyme SOD was composed of subunits with molecular weight of 77.78; 71.74; and 19.2 kDa, which contained nine types of amino acids with tyrosine and lysine as the major amino acid components. Zn was the most predominant metal on SOD, then followed by Fe and Mn. The main subunit cofactors consisted of Zn 72%, Fe 25%, Mn 2%, and Cu 1%, which were different from the small subunit that contained of Zn 55%, Mn 31%, Fe

14%, and Cu 4%. The stability of SOD was achieved on pH 7.5 and temperature below 25°C.

[Key words: Latex serum, metallo enzyme, superoxide dismutase, blue-green microalga, antioxidant]

Ringkasan

Spirulina platensis adalah mikroalga hijau biru yang banyak digunakan sebagai suplemen pangan, pakan, dan bahan aktif kosmetika. Mikroalga ini juga menghasilkan antioksidan kuat yaitu superoksida dismutase (SOD), yang merupakan bahan aktif kosmetika anti penuaan dini dan pencegah efek radikal bebas. SOD diisolasi dari biomassa sel *S. platensis* isolat lokal yang dibiakkan dalam serum lateks skala semipilot (3,5 m³) dan pilot (40 m³) serta dikeringkan dengan cara pengeringan kabut (*spray drying*) atau penjemuran untuk kemudian dikarakterisasi. SOD dimurnikan dengan pengendapan bertingkat menggunakan ammonium sulfat dan dipisahkan dengan kolom kromatografi berisi Sephadex G 200. Hasil pemisahan kemudian dianalisis untuk menentukan aktivitas, logam kofaktor serta komposisi asam amino anti oksidan tersebut. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengendapan ekstrak SOD dengan ammonium sulfat 80% menghasilkan aktivitas SOD lebih tinggi dari SOD asal biomassa *S. platensis* komersial. SOD tersebut telah berhasil diisolasi dan dimurnikan. Metaloenzim SOD tersusun

atas subunit dengan BM 77,78; 71,74; dan 19,2 kDa, yang mengandung sembilan jenis asam amino dengan tirosin dan lisin sebagai komponen asam amino utama. Logam yang dominan pada SOD adalah Zn, disusul kemudian Fe dan Mn. Kofaktor sub unit besar terdiri dari Zn 72%, Fe 25%, Mn 2%, dan Cu 1%, berbeda dengan sub unit kecil yang mengandung Zn 55%, Mn 31%, Fe 14%, dan Cu 4%. Stabilitas SOD *S. platensis* dicapai pada pH 7,5 dan suhu di bawah 25°C.

Pendahuluan

Spirulina platensis atau lebih populer disebut sebagai *Spirulina* adalah sianobakteri atau mikroalga hijau biru. Mikroalga ini mampu tumbuh pada berbagai tingkat salinitas (Richmond, dalam Borowitzka & Borowitzka, 1987), pH sangat basa (pH 8-11) dengan kandungan senyawa karbonat dan bikarbonat yang tinggi (Aiba & Ogawa, 1977), dan dengan pasokan unsur nitrogen (Mateles & Tanennbaum, 1968). Mikroalga yang dijuluki *magic food* dan *wonderful food* ini banyak digunakan sebagai makanan fungsional dan penghasil berbagai bahan aktif penting bagi dunia kesehatan (Arad, 1988), antara lain asam gamma linolenat (GLA) (Cohen *et al.*, 1987). Beberapa bahan aktif lain juga diproduksi secara intraseluler seperti senyawa karotenoid (termasuk beta karotena/ provitamin A), asam nikotinat, riboflavin (vitamin B₂), thiamin (vitamin B₁), sianokobalamin (vitamin B₁₂), pigmen fikosianin, klorofil, dan lain-lainnya (Ciferi, 1983; Richmond dalam Borowitzka & Borowitzka, 1987).

Biomassa *S. platensis* juga merupakan penghasil enzim superoksida dismutase (SOD) dengan aktivitas sebesar 1.500.000 unit per kg (Belay dalam Vonshak, 1997). Menurut produsennya,

Cyanotech Corp., Hawaiian Spirulina mengandung SOD hingga 2.376.000 unit per kg. SOD merupakan antioksidan dan bahan aktif kosmetika untuk menghambat penuaan (*anti aging*), menghambat toksisitas yang diinduksi obat (drug-induced toxicities) dan kerusakan saraf akibat cekaman oksidatif (Vila *et al.*, 2004). Harga SOD asal *S. platensis* (500 unit/mg protein) dalam bentuk murni dalam katalog Sigma (2005) berkisar US\$ 55,20. Peluang komersialisasi produk bioaktif dari *S. platensis* tersebut untuk kesehatan dan kosmetika cukup prospektif karena terjaminnya ketersediaan bahan baku dan kualitas produk serta tingginya daya kompetitif terhadap produk impor.

Produksi lateks pekat relatif kecil, sekitar 5% dari total produksi karet Indonesia. Namun, produksi lateks pekat menghasilkan limbah yang memiliki kadar polutan organik yang tinggi antara lain ditandai dengan nilai COD di atas 25.000 ppm dan N total (Kjeldahl) sekitar 4.000 ppm (Tri-Panji *et al.*, 1994). Dari suatu pabrik pengolahan karet jenis ini dengan kapasitas medium dapat dihasilkan limbah cair sekitar 250 m³ per hari. Survei yang dilakukan di suatu PTP Nusantara menunjukkan bahwa untuk mengolah limbah sebanyak ini diperlukan biaya cukup tinggi, lebih dari Rp 775 juta per tahun, namun limbah olahan masih berbau busuk. Di sisi lain limbah pekatnya dalam bentuk serum lateks dapat dimanfaatkan sebagai media tumbuh *S. platensis* (Tri-Panji & Suharyanto, 2000).

Hasil penelitian Tri-Panji *et al.* (1996) menunjukkan bahwa medium serum lateks pekat yang baik untuk pertumbuhan *S. platensis* mengandung N-NH₄⁺ sekitar 250 mg/L dan memiliki COD sekitar 2.000 ppm. Selanjutnya, Tri-Panji *et al.* (2005) berhasil mengoptimalkan medium

tumbuh *S. platensis*, peningkatan aktivitas dan isolasi SOD dari biomassa mikroalga tersebut. Senyawa $N-NH_4^+$ dimanfaatkan sebagai sumber nitrogen untuk menghasilkan protein. Selain membutuhkan nitrogen untuk pertumbuhannya, *S. platensis* juga membutuhkan sumber karbon. Kemampuan *S. platensis* dalam menggunakan bahan organik sebagaimana senyawa karbon anorganik dalam medium yang mengandung serum lateks pekat menunjukkan bahwa mikroalga ini mampu tumbuh dalam kondisi mikсотropik dan tumbuh lebih baik dalam medium yang mengandung hidrolisat protein (Chen & Zhang, 1997; Marquez *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 1995). Serum lateks pekat yang banyak mengandung protein dan karbohidrat merupakan sumber C organik yang murah. Sejak tahun 2003 *S. platensis* telah dibudidayakan secara komersial di Indonesia baik dalam medium sintetik maupun dalam serum lateks dengan dukungan Program *Start Up Capital* dari Kementerian Riset dan Teknologi melalui Pemodal Nasional Madani Techno Venture bekerjasama dengan Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia dan PT Protamin Nutrilina. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh teknik produksi, isolasi, serta uji aktivitas dan karakteristik SOD dari *S. platensis* yang dibiakkan dalam serum lateks dengan beberapa cara pengeringan biomassa.

Bahan dan Metode

Pembiakan S. platensis

Spirulina platensis yang digunakan merupakan mikroalga isolat lokal koleksi BPBPI. Mikroalga ditumbuhkan dalam medium dengan komposisi serum lateks

5%, natrium karbonat 1.25% dan dengan tambahan garam-garam mineral lain sebagai suplemen sesuai dengan yang digunakan oleh Aiba & Ogawa (1977). Biomassa *S. platensis* diperoleh dari hasil pembiakan dalam kolam skala semipilot (3,5 m³) dan pilot (40 m³) dengan pemberian iluminasi sinar matahari langsung dan aerasi dengan pompa aerator secara kontinu selama 3-4 minggu. Biomassa mikroalga dipanen dengan cara penyaringan dengan kain belacu, kemudian dicuci dengan air suling, ditiriskan dan dikeringkan. Pengeringan dilakukan dengan dua macam cara yaitu penjemuran secara langsung selama ± 7 hari atau dengan *spray drying* selama delapan jam sampai diperoleh kisaran kadar air 3-5%, kemudian ditumbuk dengan mortar porselin sampai menjadi serbuk halus berukuran sekitar 100 mesh.

Pemisahan SOD dari biomassa sel

Pemisahan enzim dari biomassa dilakukan dengan metode Kim *et al.* (1998) dengan sedikit modifikasi sebagai berikut. Serbuk biomassa kering *S. platensis* (1 g) digerus halus dalam nitrogen cair menggunakan mortar, dibagi ke dalam dua tabung, masing-masing 0,5 g, kemudian ditambahkan bufer fosfat pH 7.8 sebanyak empat kali volume (2 mL). Larutan EDTA 0.1 mM ditambahkan ke dalam salah satu tabung, (1 mL) selanjutnya kedua tabung tersebut disentrifugasi pada 10 000 x g selama 30 menit. Supernatan hasil sentrifus digunakan sebagai ekstrak enzim kasar. Pemurnian SOD dilakukan dengan pengendapan bertingkat menggunakan amonium sulfat dengan berbagai konsentrasi. Pengendapan pertama menggunakan amonium sulfat 40% jenuh dan

disentrifugasi pada 11.000 x g selama 30 menit untuk pengendapan molekul besar. Supernatan diambil, ditambahkan amonium sulfat padatan hingga 80% jenuh dan disentrifugasi kembali pada kondisi yang sama. Endapan hasil sentrifus kedua yang diharapkan mengandung SOD dilarutkan kembali dalam bufer fosfat pH 7,8 dan dibagi ke dalam tiga tabung dengan volume yang sama untuk setiap perlakuan dengan EDTA atau tanpa EDTA. Masing-masing larutan enzim tersebut kemudian didialisis dengan selopan dalam bufer fosfat pH 7,8 selama 24 jam dalam suhu 4°C. Hasil dialisis disentrifugasi kembali dan diambil endapannya dan dilarutkan dengan 0,5 mL buffer fosfat pH 7,8. Di dalam fraksi tersebut, SOD yang lebih murni akan diperoleh. SOD dari biomassa *Spirulina* impor yang tersedia di pasar diekstraksi dengan cara yang sama untuk diperiksa aktivitas enzim SOD-nya sebagai pemurnian. Pemurnian SOD lebih lanjut dilakukan dengan kromatografi kolom menggunakan eluen bufer fosfat pH 7,8 dengan menggunakan Sephadex G-200 dengan kolom 1 x 10 cm (Kim *et al.*, 1998).

Aktivitas SOD penentuan jenis isoform

Aktivitas SOD ditentukan menurut metode Bergmeyer *et al.* (1987) dengan sedikit modifikasi yaitu menggunakan campuran larutan bufer fosfat pH 7,8, akuades, larutan hidroksilamin klorida 0,5 mM, antraquinon sulfonat 0,2 mM dan enzim diaporase 750 U/L. Campuran pereaksi kemudian ditambah dengan larutan sampel hasil dialisis dan larutan NADH 10 mM sambil dikocok. Reaksi

pewarnaan dilakukan dengan menambahkan larutan sulfanilamida 1 % b/v, bufer fosfat yang sama, dan larutan naptiletien diamin 0,02 % b/v, dikocok dan dibiarkan selama 20 menit pada suhu ruang (28-30°C). Warna larutan hasil reaksi dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 560 nm. Aktivitas relatif SOD ditentukan sebagai perbandingan antara aktivitas SOD satu sampel dengan sampel yang mempunyai aktivitas SOD tertinggi pada serangkaian pengujian. Rumus yang digunakan adalah:

$$\text{Aktivitas SOD relatif} = \frac{A \text{ maks.} - A \text{ sampel}}{A \text{ maks.} - A \text{ terendah}} \times 100\%$$

A: Absorbansi

Jenis isoform SOD ditentukan berdasarkan kepekaan aktivitasnya terhadap sianida dan kandungan logam kofaktor SOD. Campuran pereaksi enzim yang digunakan dalam penentuan aktivitas SOD ditambahkan KCN 1,5 mM. Enzim SOD sensitif sianida adalah Cu, Zn SOD, sedangkan yang insensitif sianida adalah Fe, Mn SOD (Glick & Pasternak 1994). Aktivitas SOD optimum diuji pada suhu 35-70°C selama 20 menit dan pH 3,0-10.

Karakterisasi SOD

Karakterisasi SOD meliputi penentuan bobot molekul total dan subunitnya, komposisi asam amino dan kofaktor logam. Bobot molekul total dan subunitnya dilakukan dengan kromatografi permeasi gel/GPC dan SDS-PAGE dengan konsentrasi gel pemisah 10% dan stacking gel 4% akrilamida. Pita bobot molekul SOD dapat diketahui dari plot Ferguson Rf pita-pita protein terhadap log bobot

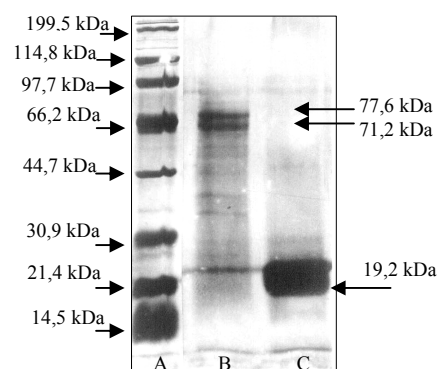
molekul protein standar. Komposisi asam amino ditentukan dengan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC). Serbuk SOD sebanyak 0,2 g dihidrolisis dalam 5 mL HCl 6 N pada suhu 100°C selama 16 jam. Hasil hidrolisis dikeringkan dengan pompa vakum bertekanan 50 torr (dilakukan dua kali), kemudian dilarutkan kembali dalam bufer dabsilasi (larutan NaHCO₃ baru) dan larutan dabsil klorida (4- dimetilaminoazobenzena-4'-sulfonil klorida). Analisis asam amino dilakukan menggunakan HPLC dengan kondisi suhu kolom 38 °C, kolom pico tag (3,9 x 150 mm), kecepatan alir eluen (asetonitril 60 % dan bufer natrium asetat pH 5,75) 1mL/menit (program linier), batas maksimum tekanan 3000 psi, program gradient, serta detektor UV-Vis, panjang gelombang 436 nm (Tri-Panji & Suharyanto, 1993). Kofaktor logam dengan menganalisis kandungan logam Zn, Cu, Fe dan Mn dengan metode destruksi basah HNO₃-HClO₄ dan *Atomic Absorption Spectrophotometry* (AOAC, 1984).

Hasil dan Pembahasan

Isolasi superoksida dismutase (SOD)

Hasil pemisahan SOD dari biomassa *S. platensis* yang dibiakkan dalam kolam pembiakan skala 3,5 m³ dan 40 m³ dengan SDS-PAGE menunjukkan tampilan dua pita tipis berdekatan dengan bobot molekul 77,61 dan 71,20 kDa dan satu pita tebal tunggal dengan bobot molekul 19,20 kDa (Gambar 1). Hasil pita protein SOD berbeda sesuai dengan perlakuan pascapanen terutama proses pengeringan. Penjemuran biomassa diduga dapat mendenaturasi protein SOD karena radiasi ultra violet dan panas dari sinar matahari

langsung dalam waktu lama sehingga BM protein menjadi lebih kecil dari protein enzim total dan membentuk sub unit-sub unit. Berbeda halnya dengan hasil pengeringan secara *spray drying*, enzim SOD tidak mengalami denaturasi karena pemanasan yang relatif singkat. Bobot molekul SOD pertama dan kedua merupakan bobot molekul sub unit SOD hasil pemecahan SOD total akibat pemakaian SDS dan merkaptotanol pada proses elektroforesis. Kedua sub unit ini jika bergabung akan menjadi bobot



Keterangan/explanation :

A : Protein standar BioRad/Standard protein BioRad

B : SOD hasil pengeringan biomassa dengan *spray dryer*/SOD from dried biomass with *spray dryer*

C : SOD hasil pengeringan biomassa dengan *sun drying* /SOD from dried biomass with *sun drying*

Gambar 1. Profil protein SOD: Plot Ferguson BM protein standar (A) dan enzim SOD (B), serta hasil SDS PAGE enzim SOD dari dua jenis biomassa yang dihasilkan dengan cara pengeringan yang berbeda (C)

Figure 1. Profile of SOD protein: Ferguson plot of MW of standard protein (A) and SOD enzyme (B), and SDS PAGE of SOD enzyme from two kinds of biomass resulted from different drying method (C)

molekul total SOD sekitar 148,81 kDa. Bobot molekul ketiga sangat kecil (19,2 kDa) yang mungkin berasal dari pemecahan satu subunit SOD menjadi empat sub-subunit akibat pengeringan yang terlalu lama pada proses penjemuran.

Karakterisasi SOD

Untuk mengetahui kemampuan biakan dalam memproduksi SOD, biomassa kering *S. platensis* ditentukan aktivitas dan sensitivitas SOD-nya terhadap sianida, serta dibandingkan dengan SOD dari biomassa sejenis asal impor yang diperoleh di pasaran. Aktivitas SOD diukur berdasarkan peningkatan atau penurunan absorbansi nitrit pada panjang gelombang 560 nm. Semakin tinggi absorbansi nitrit maka semakin rendah aktivitas SOD dalam sampel.

Aktivitas SOD dalam ekstrak kasar biomassa *S. platensis* yang diperoleh dengan medium serum lateks tidak berbeda secara nyata dengan aktivitas SOD dalam biomassa komersial. Aktivitas SOD pada ekstrak kasar lebih tinggi dibandingkan dengan yang berasal dari fraksinasi amonium sulfat 40% dan 80%, baik untuk SOD dari biomassa kultur dalam medium serum lateks maupun biomassa impor. Aktivitas SOD dalam sampel ekstrak kasar lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas SOD dalam sampel yang dimurnikan dengan amonium sulfat. Hal ini mungkin disebabkan protein dalam ekstrak kasar enzim SOD masih dalam keadaan utuh sehingga aktivitas katalitiknya tidak terganggu. Hal ini berarti bahwa teknik pemisahan protein menggunakan fraksinasi amonium sulfat tidak dapat memisahkan seluruh enzim

SOD dalam biomassa sel *S. platensis*. Aktivitas SOD dalam fraksi amonium sulfat 40% yang diperoleh dengan medium serum lateks lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas SOD dalam biomassa yang diperoleh dari pasaran. Sebaliknya, aktivitas SOD dalam biomassa *S. platensis* asal medium serum lateks pada fraksinasi dengan amonium sulfat 80% lebih tinggi dibandingkan dengan yang berasal dari produk pasaran (Tabel 1). SOD dari kedua jenis biomassa *S. platensis* relatif sensitif terhadap sianida. Pada fraksi ekstrak kasar, SOD *S. platensis* komersial sedikit lebih sensitif dibandingkan dengan SOD *S. platensis* asal medium lateks. Hal sebaliknya diperoleh pada fraksi amonium sulfat 80%.

SOD mempunyai banyak isoform yang diklasifikasikan oleh kofaktor logam yang mempengaruhi aktivitasnya, yaitu Cu, Zn-SOD, dan Fe, Mn-SOD (Kaminaka *et al.*, 1999). Perbandingan persentase logam dalam ekstrak murni dapat menunjukkan jenis logam kofaktor yang dominan dalam SOD *S. platensis*. Ekstrak murni SOD dalam biomassa *S. platensis* mengandung 5,33 g atom per mol enzim atau 54,5% Zn dari total logam kofaktor yang dianalisis. Logam lain yang terdapat dalam jumlah cukup besar adalah Mn dan Fe masing-masing 29% dan 14,5%, sedangkan Cu hanya 2% dari total logam kofaktor yang dianalisis. Hasil ini berbeda dengan yang diperoleh Lumsden *et al.* (1976) yang mengelompokkan SOD *S. platensis* sebagai Fe, Mn-SOD.

Berdasarkan sensitivitasnya terhadap sianida, SOD sensitif sianida adalah Cu, Zn-SOD, sedangkan yang tidak sensitif sianida adalah Fe, Mn-SOD. Enzim SOD yang dapat bekerja optimal dalam sel tubuh manusia adalah Cu, Zn-SOD, dan

Produksi, isolasi dan karakterisasi superoksida dismutase dari *Spirulina platensis*....

Tabel 1. Perbandingan aktivitas enzim SOD dalam biomassa *Spirulina* yang ditumbuhkan dalam medium serum lateks dan *Spirulina* impor yang tersedia di pasar. Aktivitas enzim SOD diukur berdasarkan A_{560} dari reaksi penghambatan reduksi nitrit dan konversi kadar nitritnya.*)

Table 1. The comparison of SOD enzyme activity between *Spirulina* biomass grown on medium of latex serum with imported *Spirulina* available on market. The SOD enzyme activity was measured based on A_{560} from inhibition reaction of nitrite reduction and the conversion of nitrite content.*)

Sampel biomassa <i>Spirulina</i> Sample of <i>Spirulina</i> biomass	Tahap ekstraksi Extraction phase	Tanpa KCN Without KCN		Dengan KCN With KCN	
		Aktivitas SOD (A_{560}) SOD activity (A_{560})	Kadar nitrit per 100 mg biomassa Nitrite content per 100 mg biomass (μM)	Aktivitas SOD (A_{560}) (penurunan atau peningkatan aktivitas, %) SOD activity (A_{560}) (Activity increase or decrease, %)	Kadar nitrit per 100 mg biomassa Nitrite content per 100 mg biomass (μM)
Medium lateks Latex medium	Ekstrak kasar Crude extract	0,015	0,0113	0,017 (turun 11,8%) (decrease 11.8%)	0,0207
	Hasil pengendapan dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40 % Sedimentation results with 40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,039	0,0264	Tak terdeteksi Undetected	Tak terdeteksi Undetected
	Hasil pengendapan dengan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80 % Sedimentation results with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 80%	0,021	0,1972	0,077 (turun 72,7%) (decrease 72.7%)	1,5117
Pasaran Commercial	Ekstrak kasar Crude extract	0,015	0,0113	0,019 (turun 21,05%) (decrease 21.05%)	0,0300
	Hasil pengendapan dengan amonium sulfat 40 % Sedimentation results with ammonium sulphate 40%	0,031	0,0184	Tak terdeteksi Undetected	Tak terdeteksi Undetected
	Hasil pengendapan dengan amonium sulfat 80 % Sedimentation results with ammonium sulphate 80%	0,026	0,3146	0,016 (naik 38,4%) (increase 38.4%)	0,0798

*) Konversi hasil absorbansi A_{560} menjadi konsentrasi nitrit dibuat berdasarkan persamaan pada grafik standar nitrit yaitu y (absorbans A_{560}) = $0,0284 x$ (kadar nitrit, μM) + $0,0126$; $R^2 = 0,9970$

*) Conversion of absorbans A_{560} result changed into nitrite concentration based on equation on curve of standard nitrite which is y (absorbance A_{560}) = $0.0284 x$ (nitrite content, μM) + $0,0126$; $R^2 = 0.9970$

Mn-SOD (Glick & Pasternak 1994). Berdasarkan sifatnya yang sensitif terhadap sianida, SOD dalam biomassa *S. platensis* kemungkinan adalah jenis Cu, Zn-SOD. Namun, SOD dalam biomassa tersebut kemungkinan juga dapat mengandung Fe, Mn-SOD dalam jumlah yang lebih kecil mengingat penghambatan aktivitas SOD yang terjadi relatif tidak terlalu tinggi khususnya pada ekstrak kasar, yaitu 11,8% .

Pada umumnya, SOD mengandung Cu, Zn dengan perbandingan yang seimbang per mol enzim. Kim *et al.* (1998) melaporkan bahwa kadar Cu dan Zn dalam molekul enzim SOD *Scapharca broughtonii* yaitu 1,89 g dan 1,23 g atom per mol enzim, sedangkan kandungan Fe dan Mn sangat rendah, yaitu masing-masing 0,12 dan 0,02 g atom per mol enzim, sehingga enzimnya dikategorikan sebagai Cu, Zn-SOD. Hasil analisis logam kofaktor dalam SOD *S. platensis* masih belum dapat memastikan jenis isoform SOD, tetapi jika penetapan jenis kofaktor SOD berdasarkan logam tertinggi maka SOD *S. platensis* hasil kultur medium serum lateks termasuk Zn-SOD, sedangkan jika dilihat dari keseimbangan konsentrasi logamnya, mungkin termasuk dalam kelompok Fe, Mn-SOD. Madhavi *et al.* (1996) melaporkan bahwa Cu, Zn-SOD biasanya terdapat dalam sel eukariot sedangkan sel prokariot seperti bakteri, sianobakteri atau mikroalga tidak biasa mengandung Cu, Zn, tetapi mengandung Fe-SOD.

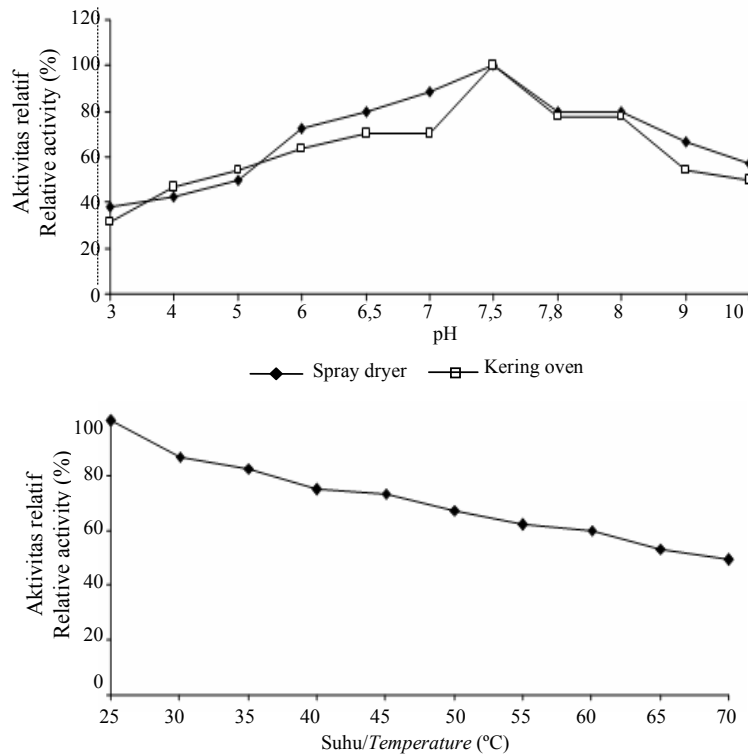
Lumsden *et al.* (1976) menemukan bahwa SOD dalam *S. platensis* termasuk manganodismutase dan feridismutase (Mn, Fe-SOD). *S. platensis* hasil kultur dalam medium serum lateks tersebut mempunyai kofaktor SOD yang khas dengan kandungan Zn yang relatif tinggi

dan kandungan Mn, Fe, dan Cu yang relatif lebih rendah dalam enzim SOD murninya sehingga cenderung termasuk Zn-SOD. Perbedaan hasil yang diperoleh dalam pengelompokan isoform SOD *S. platensis* dalam penelitian ini dengan yang diperoleh Lumsden *et al.* (1976) belum diketahui dengan pasti penyebabnya. Namun, kemungkinan dapat disebabkan oleh perbedaan komposisi medium, kondisi pertumbuhan dan galur *S. platensis* yang digunakan. Uji aktivitas SOD *S. platensis* dengan penambahan kofaktor logam divalen seperti Cu, Zn, Mn, dan Fe perlu dilakukan untuk memastikan kelompok isoform SOD tersebut.

Pengaruh jenis kofaktor SOD *S. platensis* dalam pemanfaatannya untuk makanan fungsional tidak berpengaruh besar di dalam sel tubuh manusia. Hal tersebut disebabkan dalam saluran pencernaan manusia terdapat enzim-enzim yang akan memotong SOD dalam makanan, dan ketika hasil pemecahan ini sampai di dalam sel akan disusun kembali dengan kofaktor yang sesuai dengan kebutuhan sel tubuh manusia, biasanya Cu, Zn-SOD dan Mn-SOD (Beyer *et al.*, 1987). Dengan demikian, mineral logam yang perlu dikonsumsi adalah yang diperlukan oleh sel tubuh manusia untuk memacu aktivitas SOD dalam sel, yaitu Cu, Zn, dan Mn (Hasim, komunikasi pribadi).

Stabilitas SOD terhadap pH dan suhu

Perlakuan suhu terhadap ekstrak kasar SOD menunjukkan bahwa semakin tinggi suhu, semakin turun aktivitas SOD (Gambar 2). SOD merupakan suatu protein mempunyai situs aktif pengkatalisis oksigen radikal toksik. Situs



Gambar 2. Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas relatif SOD yang diisolasi dari biomassa *S.platensis* pada dua jenis pengeringan, a) *Spray dryer* (atas) dan oven (bawah)

Figure 2. Effect of pH and temperature on SOD relative activity isolated from *S. platensis* biomass on two kind of drying method, a) *Spray dryer* (above) and oven (below).

ini berfungsi jika yang konformasi protein SOD tidak berubah akibat denaturasi. Perubahan konformasi ini menyebabkan penurunan aktivitas SOD. Stabilitas SOD yang rendah pada suhu ruangan (25°C) menyebabkan kerja SOD *S. platensis* harus pada suhu yang rendah. Preparasi uji aktivitas SOD biasanya dilakukan pada suhu maksimal 4°C, kecuali saat menunggu perubahan warna setelah pencampuran pereaksi warna selesai dilakukan (Elstner

et. al. dalam Bergmeyer & Mariannegrabl, 1987). Penurunan aktivitas enzim SOD lebih dari 47% terjadi pada suhu di atas 50°C. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak enzim SOD hanya dapat dipergunakan pada suhu dingin untuk menjaga stabilitas SOD yang terkandung di dalamnya. Enzim SOD paling stabil pada pH 7,5. Krutika & Subramanian (2007) melaporkan bahwa SOD dari *S. platensis* stabil pada pH 6,5-10. Perubahan pH mem-

pengaruhi stabilitas SOD, semakin jauh pH dari pH stabil, semakin turun aktivitas SOD (Gambar 2). Stabilitas SOD dari ekstrak biomassa hasil *spray drying* relatif tidak berbeda dalam uji secara kualitatif dengan ekstrak biomassa hasil oven 45°C (selama 24 jam). Perubahan keasaman dan suhu pada lingkungan enzim dapat mengubah konformasi protein karena berubahnya susunan asam-asam amino pembentuknya.

Kofaktor logam SOD

Penetapan kofaktor logam enzim SOD *S. platensis* digunakan untuk pencirian sensitivitasnya. Perbedaan kofaktor logam pada enzim ini menyebabkan perbedaan aktivitas, meskipun sama-sama mampu mengkatalisis pemangsaan radikal bebas pada oksigen toksik. Perbedaan aktivitas ini dapat berupa sensitivitas terhadap KCN (Fe, Mn tidak sensitif, sementara Cu, Zn sensitif KCN), atau dapat pula menjadi faktor bekerja atau tidaknya enzim ini bila menggantikan fungsi SOD yang secara alami mempunyai kofaktor logam yang berbeda.

Ekstrak SOD *S. platensis* murni hasil kromatografi kolom menunjukkan bahwa 55% kofaktor logamnya berupa Zn, 30% Mn, dan 15% Fe, sedangkan Cu tidak terdeteksi (Tabel 2). Jenis enzim SOD *S. platensis* termasuk yang kurang sensitif KCN (Elstner *et al.*, 1987), karena Cu tidak ada atau sedikit sekali, meskipun Zn mendominasi. Perbandingan Mn dan Fe dalam kofaktor logam enzim SOD cukup besar meskipun kalah dengan Zn, sehingga sifat kurang sensitifnya lebih mendominasi. Tahapan berikutnya adalah penggunaan SDS-PAGE untuk pemisahan pita protein BM tinggi dan yang lebih rendah, sehingga kemudian dapat

dianalisis logam kofaktor dan dapat diketahui perbedaan kofaktor pada sub-sub unit SOD.

Pada sub unit SOD dengan bobot molekul 77,78 kDa mengandung Zn sampai 72 % dari total logam yang ada, Fe 25%, sedangkan Mn dan Cu masing-masing hanya 2% dan 1%. Sub unit SOD yang berbobot molekul 71,738 kDa mengandung Zn 55%, Mn 31%, Fe 14%, sedangkan Cu hanya 4%. Kofaktor Cu pada SDS-PAGE muncul sampai 4%, sementara dalam ekstrak SOD dari kromatografi kolom tidak terdeteksi. Hal ini dapat disebabkan oleh tingginya konsentrasi SOD yang ada pada SDS-PAGE, setelah dibebaskan dari pelarut buffer fosfat dan air. Komposisi yang berbeda antara masing-masing sub unit dan bobot molekul yang tidak sama antar subunit, dapat diperkirakan bahwa SOD *S. platensis* merupakan SOD gabungan dua subunit dengan bobot molekul total sekitar 149,52 kDa.

Komposisi asam amino SOD S. platensis

Enzim SOD murni dalam fase kromatografi kolom mempunyai sembilan macam asam amino esensial yang dapat ditentukan komposisinya menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (HPLC) (Tabel 3). Fraksi yang murni mempunyai kadar tirosin dan lisin yang tinggi (163 µmol/ml atau 14,64% dari total asam amino yang terdeteksi). Asam amino serin, glisin, alanin, prolin, metionin, sistein, isoleusin dan fenilalanin tidak terdeteksi. Komposisi asam amino ini dapat berbeda dengan perbedaan sumber SOD maupun asupan yang diterima oleh sumber, karena asam amino yang terbentuk di dalam sel hidup sesuai dengan nutrien yang terdapat pada sel tersebut.

Tabel 2. Konsentrasi logam pada subunit SOD dan total enzim.

Table 2. Metal concentration on SOD subunits and total enzyme.

BM subunit Subunit MW	Logam Metal	Kadar (ppm) Content (ppm)	% Kofaktor logam % Metal cofactor
77,780 kDa	Mn	0,05	1,5
	Cu	0,03	0,9
	Fe	0,84	25,3
	Zn	2,40	72,2
71,738 kDa	Mn	2,00	31,4
	Cu	0,26	4,1
	Fe	0,92	14,4
	Zn	3,20	50,2
Total ekstrak enzim murni	Mn	3,40	29,0
	Cu	0,18	2,0
	Fe	1,66	14,5
	Zn	5,33	54,5

Tabel 3. Komposisi asam amino SOD *S. platensis*

Table 3. Amino acid composition of *S. platensis* SOD

Asam amino (Amino acid)	Kadar (Content), $\mu\text{mol/mL}$	
	Fraksi (fraction) 7	Fraksi (fraction) 6
Asam aspartat (Aspartic acid)	0,124	0,107
Asam glutamat (Glutamic acid)	0,102	0,079
Serin (Serine)	-	-
Glisin (Glycine)	-	-
Histidin (Histidine)	0,079	0,063
Arginin (Arginine)	0,096	0,038
Threonin (Threonine)	0,076	0,042
Alanin (Alanine)	-	-
Prolin (Proline)	-	-
Tirosin (Tyrosine)	0,140	0,069
Valin (Valine)	0,117	0,111
Metionin (Methionine)	-	-
Sistein (Cysteine)	-	-
Isoleusin (Isoleucine)	0,083	0,073
Leusin (Leucine)	-	-
Fenilalanin (Phenylalanine)	-	-
Lisin (Lysine)	0,140	0,114

Kesimpulan

Biomassa *S. platensis* hasil pembiakan dalam serum lateks merupakan penghasil potensial enzim SOD. SOD dapat diisolasi dengan cara ekstraksi menggunakan bufer fosfat pH 7,8, pengendapan bertingkat dengan ammonium sulfat 40-80%, diikuti dengan dialisis dan pemurnian dengan kromatografi kolom Sephadex G-200. Kemurnian SOD hasil isolasi dapat diketahui dengan uji aktivitas dan elektroforesis SDS-PAGE. SOD *S. platensis* tersusun atas sembilan jenis asam amino dengan komponen utama tirosin dan lisin. SOD memiliki bobot molekul total 149,52 kDa, dengan subunit 77,78 dan 71,7 kDa. Logam yang dominan pada SOD adalah Zn, disusul kemudian Fe dan Mn. Kofaktor subunit besar terdiri dari Zn 72%, Fe 25%, Mn 2%, dan Cu 1%, berbeda dengan subunit kecil yang mengandung Zn 55%, Mn 31%, Fe 14%, dan Cu 4%. Stabilitas SOD *S. platensis* dicapai pada pH 7,5 dan suhu di bawah 25°C. Radiasi matahari berlebih dapat menyebabkan denaturasi SOD sehingga bobot molekul subunit-nya dapat mencapai 19,2 kDa.

Daftar Pustaka

- AOAC (Association of Official Analytical Chemist) (1984). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists 14th ed.* Arlington, VA 22209 USA
- Aiba, S. & T. Ogawa (1977). Assesment of growth yield of a blue green algae *Spirulina platensis* in axenic and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.*, **102**, 179-182.
- Arad, S (1988). Production of biochemicals from red microalgae. In *Proceedings of Aquaculture International Congress and Exposition*. September 6-9, 1988. Vancouver, British Columbia Pavilion Coporation.
- Belay, A (1997). Mass culture of *Spirulina* out doors. The earthrise farms experience In Vonshak, A. (Ed.). *Spirulina platensis (Arthrospira), Physiology, Cell-biology and Biotechnology*. London, Taylor & Francis Ltd., 131-158.
- Bergmeyer, H.U., J. Bergmeyer & M. Gral. (Eds.) (1988). *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. III, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (Fed. Rep. Germany), p 293-302.
- Beyer, W. F., Fridovich, I. Mullenbach G. & Hallewell. R.A (1987). Examination of the role of arginine-143 in the human copper and zinc superoxide dismutase by site-specific mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **262**, 1182-11187.
- Chen, F & Y. Zhang (1997). High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucosa for phycocyanin production using a fed-bacth system. *J. Enzyme & Microbol. Technol.*, **20**, 221-224.
- Ciferi, O (1983). *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiol. Rev.*, **47**, 551-578.
- Cohen, Z., A. Vonshak & A. Richmond (1987). Fatty acid composition of *Spirulina* strain grown under various environmental conditions. *Phytochem.* **26**, 255-2258.
- Elstner, E. F., R. J. Youngman, W. Oswald (1987). *Superoxide dismutase*. In; Bergmeyer, J & Mariannegrabl. *Methods of Enzimatic Analysis. Vol. 3 Enzyme Oxydoreductases, Transferases*. Weinheim, Federal Republic of Germany: VCH.

- Glick, B.K. & J. Pasternak (1994). *Molecular Biotechnology*. Washington D.C., ASM Press.
- Kaminaka, H., S. Morita, M. Tokumoto, H. Yokoyama, T. Masumora & K. Tanaka (1999). Molecular cloning and characterization of a cDNA for an iron-superoxide dismutase in rice (*Oryza sativa* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63** (2), 302-308.
- Kim, Y.T, S.J. Park & S.K. Kim (1998). Purification and characterization of Cu, Zn superoxide dismutase from ark shell *Scapharca broughtonii*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62** (11), 2211-2216.
- Krutika, D & S. Subramanian (2007). Purification and biochemical characterization of a superoxide dismutase from the soluble fraction of the cyonobacterium, *Spirulina platensis*. *World J Microbiol. Biotechnol.*, **23** (12), 1661-1666.
- Lumsden, J., R. Cammack & O.H David (1976). Purification and physicochemical properties of superoxide dismutase from two photosynthetic microorganisms. *Biochem. Biophys. Acta*, **438**, 380-392.
- Madhavi DL, S.S. Desphandee & D.K. Salunkhe (1996). *Food Antioxidant*. New York, Marcell Dekker.
- Marquez, F.J., K. Sasaki, T. Kakizono, N. Nishio & S. Nagai (1993). Growth characteristic of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic condition. *J. Ferment. Bioeng.*, **76**(5), 408-410.
- Mateles, R.I. & S.R. Tanenbaum (1968). *Single Cell Proteins*. Massachusetts, MIT Press.
- Richmond, A. (1987). *Spirulina*. In; Borowitzka, M.A. & L.J. Borowitzka. 1988. (Ed). *Microalgae Biotechnology*. England, Cambridge University Press, p. 85-122.
- Singh, G., R.M. Kotharri, R.K. Sharma & V. Ramamurthy (1995). Enhancement of *Spirulina platensis* productivity by a protein hidrolysate. *Appl. Biochem. Biotech.*, **50**, 285-290.
- Sigma Chemical Company (2005). *Sigma Catalog*. Sigma, USA
- Tri-Panji & Suharyanto (1993). Ganggang mikro *Spirulina platensis* untuk pengolahan limbah lateks pekat. *Warta Pusat Penelitian Bioteknologi Perkebunan*, 1, 28-29.
- Tri-Panji, Suharyanto & Y. Away (1994). Produksi protein sel tunggal menggunakan limbah lateks pekat. *Menara Perkebunan*, **62** (2), 36-40.
- Tri-Panji, S. Achmadi & E. Tjahjardarmawan (1996). Produksi asam gammalinolenat dari ganggang mikro *Spirulina platensis* menggunakan limbah lateks pekat. *Menara Perkebunan*, **64** (1), 34-44.
- Tri-Panji & Suharyanto (2000). Optimization media from low-cost nutrient sources for growing *Spirulina platensis* and carotenoid production. *Menara Perkebunan*, **68** (1), 64-44.
- Tri-Panji, M. Wijayanti, Suharyanto & M. Bintang (2005). Optimasi media tumbuh untuk peningkatan aktivitas dan isolasi enzim superoksida dismutase dari biomassa *Spirulina platensis*. *J. Mikrob. Ind.*, **10** (1), 37-41.
- Vila, J., C. Gemma, A. Bachstetter, Y. Wang, I. Stromberg & P.C. Bickford (2004). *Spirulina*, aging, and neurobiology. *Neurobiology of Aging*, **25**(3), 313-324.