

Fraksinasi Flavonoid *Spirulina platensis* dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan Aktivitas Inhibisi Enzim α -Glukosidase

Hartoyo Notonegoro^{1*}, Heder Djameludin², Iriani Setyaningsih³, Kustiariyah Tarman³

¹Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan, Fakultas Pertanian, Perikanan dan Biologi,
Universitas Bangka Belitung

Desa Balunijuk, Merawang, Bangka Belitung, Indonesia

²Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Universitas Brawijaya

Jl. Veteran No. 1, Kota Malang, Indonesia

³Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Institut Pertanian Bogor

Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor, Indonesia

Email: hartoyonotonegoro@ubb.ac.id

Abstract

Fractionation of *Spirulina platensis* Flavonoids by Thin Layer Chromatography Method and α -Glucosidase Enzyme Inhibition Activity

Spirulina platensis is a type of Cyanobacterium microalgae that forms multicellular helical filaments. *Spirulina platensis* contains primary and secondary metabolites. The type and amount of the active compound *Spirulina platensis* depends on the method of extraction, fractionation, and isolation. So far, there are not much research data related to the active compound of *Spirulina platensis* extract cultured on Walne. The purpose of this study was to use of thin layer chromatography (TLC) method to separate flavonoids from *Spirulina platensis* biomass extract cultured on Walne media and the activity of α -glucosidase enzyme inhibition using biomass, crude extract, active fraction of flavonoids and phycocyanins from *Spirulina platensis*. This research method is descriptive experimental, which the *Spirulina platensis* is cultured on 80 g/L NaNO₃ modified Walne media, extracted by maceration, fractionated by TLC and isolated the active compound by Preparative TLC (PTLC). The analysis included fraction and isolation of flavonoids from *Spirulina platensis*. The results showed that the TLC could be used to identify the active compound of *Spirulina platensis* extract cultured on Walne. Fractionation of *Spirulina platensis* extract using stationary phase silica gel Si 60 GF₂₅₄ and the best mobile phase with a combination of chloroform:ethyl acetate (6:4) and an R_f value of 0.58; R_f 0.71; and R_f 0.83, as well as yellow-orange spots. Isolation of the active compound of *Spirulina platensis* extract using PLTC stationary phase silica gel Si 60 PF₂₅₄ and the best mobile phase combination eluent chloroform:ethyl acetate (9:1). RF value of R_f 0.57; R_f 0.86; and R_f 0.93 with dark yellow-brown spots. The color of the spots from the PLTC results shows that the active compounds of *Spirulina platensis* extract are flavonoid compounds. Biomass, crude extract, phycocyanine extract and flavonoids from *Spirulina* do not have inhibitory activity against α -glucosidase enzyme.

Keywords: Walne, PTLC, *Spirulina platensis*, Inhibition, α -Glucosidase, Flavonoid, Extraction

Abstrak

Spirulina platensis merupakan jenis mikroalga Cyanobacterium yang membentuk filamen helical multiseluler. *Spirulina platensis* mengandung senyawa metabolit primer dan sekunder. Jenis dan jumlah senyawa aktif *Spirulina platensis* tergantung pada metode ekstraksi, fraksinasi dan isolasi. Sejauh ini belum banyak data hasil penelitian terkait senyawa aktif ekstrak biomassa *Spirulina platensis* yang dikultur pada media Walne. Tujuan penelitian ini yaitu penggunaan metode kromatografi lapis tipis (KLT) untuk memisahkan flavonoid ekstrak biomassa *Spirulina platensis* yang dikultur pada media Walne serta aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase menggunakan biomassa, ekstrak kasar, fraksi aktif flavonoid dan fikosianin dari *Spirulina platensis*. Metode penelitian ini adalah eksperimental deskriptif dimana mikroalga *Spirulina platensis* dikultur pada media Walne modifikasi 80 g/L NaNO₃, diekstraksi dengan maserasi, difraksinasi dengan KLT dan diisolasi senyawa aktif dengan KLT Preparatif (KLTP). Analisis yang dilakukan meliputi analisis fraksi dan isolasi flavonoid dari *Spirulina platensis*. Hasil penelitian menunjukkan metode KLT dapat digunakan untuk mengidentifikasi senyawa aktif ekstrak *Spirulina platensis* yang dikultur pada media Walne. Fraksinasi ekstrak *Spirulina platensis* menggunakan fase diam silika gel Si 60 GF₂₅₄ dan fase gerak kombinasi eluen terbaik kloroform:etil asetat (6:4) dan nilai R_f 0,58; R_f 0,71; dan R_f 0,83, serta bercak berwarna kuning-oranye. Isolasi senyawa aktif ekstrak *Spirulina platensis* menggunakan KLTP fase diam silika gel Si 60 PF₂₅₄ dan fase gerak kombinasi eluen terbaik kloroform:etil asetat (9:1). Nilai R_f 0,57; R_f 0,86; dan R_f 0,93 dengan bercak berwarna kuning-cokelat gelap. Warna bercak hasil KLTP menunjukkan komponen senyawa aktif ekstrak *Spirulina platensis* berupa senyawa golongan flavonoid. Biomassa, ekstrak kasar, ekstrak fikosianin dan flavonoid dari *Spirulina* tidak memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase.

Kata Kunci : Walne, KLTP, *Spirulina platensis*, Inhibisi, α -Glukosidase, Flavonoid, Ekstraksi

PENDAHULUAN

Spirulina platensis merupakan jenis mikroalga biru-hijau (Cyanobacterium) yang membentuk filamen helicoidal (spiral) multiseluler dengan panjang 200-300 μm dan lebar 5-10 μm (Benelhadj *et al.*, 2016). Biomassa dari *Spirulina platensis* mengandung berbagai komponen senyawa metabolit primer dan sekunder. Djamaludin dan Chamidah (2021a) melaporkan bahwa ekstrak minyak *Spirulina sp.* memiliki kandungan asam lemak tertinggi yaitu asam palmitat sebagai *Saturated Fatty Acid* (53,30-56,57%), asam oleat sebagai *Mono-Unsaturated Fatty Acid* (4,34-4,50%), dan asam linoleat sebagai *Poly-Unsaturated Fatty Acid* (18,39-18,88%). *Spirulina platensis* berdasar hasil skrining fitokimia menunjukkan adanya kandungan senyawa metabolit sekunder berupa golongan flavonoid, steroid, fenol, dan saponin (Notonegoro *et al.*, 2018). Ekstrak mikroalga *Spirulina sp.* juga mengandung vitamin di antaranya asam nikotinat, riboflavin, thiamin, sianokobalamin, mineral, asam amino dan senyawa aktif lainnya seperti karotenoid, pigmen klorofil (Suharyanto *et al.*, 2014) dan juga fikosianin yang berpotensi sebagai senyawa antioksidan alami (Ridlo *et al.*, 2016), serta berpotensi sebagai bahan pewarna alami (Sedjati *et al.*, 2016).

Jenis dan jumlah komposisi komponen senyawa aktif yang terkandung pada ekstrak mikroalga *Spirulina sp.* tergantung pada metode ekstraksi yang digunakan. Djamaludin dan Chamidah (2021a) melaporkan metode *Ultrasonic-Assisted Extraction* (UAE) menghasilkan jumlah komponen asam lemak pada ekstrak *Spirulina sp.* lebih tinggi daripada metode *Microwave-Assisted Extraction* (MAE). Djamaludin dan Chamidah (2021b) juga melaporkan bahwa hasil dari metode UAE memiliki rendemen ekstrak *Spirulina sp.* yang lebih tinggi daripada metode MAE. Hal penting lain yang juga memengaruhi jenis dan jumlah komponen aktif *Spirulina sp.* selain metode ekstraksi yakni metode pemisahan dan pemurnian senyawa aktif.

Salah satu metode praktis yang dapat digunakan untuk pemisahan dan pemurnian senyawa aktif yakni kromatografi lapis tipis (KLT)/*thin layer chromatography* (TLC). Cai (2018) menyatakan bahwa KLT merupakan sebuah teknik cepat, sensitif, dan murah yang digunakan untuk menentukan jumlah komponen dalam campuran, memverifikasi identitas dan kemurnian senyawa, memantau kemajuan reaksi, menentukan komposisi pelarut untuk pemisahan preparatif dan menganalisis fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom. Kartini *et al.* (2021) juga menambahkan bahwa kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu teknik analisis yang telah umum digunakan baik untuk analisis secara kualitatif maupun kuantitatif, bahkan untuk pengujian aktivitas biologis bila dikombinasikan dengan bioautografi.

Berbagai upaya telah dilakukan sebagai bentuk optimasi metode ekstraksi, pemisahan dan pemurnian komponen senyawa aktif *Spirulina platensis* untuk memperoleh rendemen dan mengetahui aktivitas farmakologis dari komponen senyawa aktif. Sejauh ini belum banyak data hasil penelitian terkait analisis dengan metode KLT terhadap komponen senyawa aktif ekstrak biomassa *Spirulina platensis* yang dikultur dengan media Walne. Berdasarkan uraian tersebut, maka tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan kombinasi eluen terbaik dalam pemisahan komponen senyawa aktif golongan flavonoid dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis/*thin layer chromatography* dan lebih lanjut analisis aktivitas farmakologis yakni inhibisi terhadap enzim α -glukosidase.

MATERI DAN METODE

Kultivasi dan Pemanenan

Kultivasi *Spirulina platensis* dilakukan di dalam toples kapasitas 10 L menggunakan media Walne modifikasi 80 g/L NaNO_3 yang mengacu pada Dinata *et al.* (2017), pada suhu 25°C, intensitas cahaya 3250 lux (40 W) dengan lama pencahayaan 24 jam terang, salinitas air laut 15 ppt dan bibit yang digunakan 20% dari volume kultur. Menurut Dinata *et al.* (2017) natrium nitrat (NaNO_3) merupakan sumber nitrogen yang diketahui sebagai parameter yang sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan kandungan senyawa pada mikroalga. *Spirulina platensis* dipanen

pada hari ke 11 dengan OD \geq 0,5. Pemanenan *Spirulina platensis* dilakukan dengan cara penyaringan menggunakan nylonmesh ukuran 20 μ m untuk memisahkan biomassa dan filtratnya. Biomassa dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 40°C selama 24 jam.

Ekstraksi Komponen Aktif Biomassa *Spirulina platensis*

Biomassa *Spirulina platensis* hasil kultur ditimbang sebanyak 10 g dan dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer yang berisi pelarut etanol (C₂H₅OH) sebanyak 200 mL dengan rasio sampel:pelarut 1:20 (b/v). Sampel diekstraksi menggunakan metode ekstraksi cara dingin yakni maserasi selama 3x24 jam dan setiap 24 jam dilakukan penyaringan. Selanjutnya filtrat diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 48°C.

Fraksinasi Komponen Senyawa Aktif *Spirulina platensis* Metode KLT

Fraksinasi atau pemisahan komponen aktif dari ekstrak kasar *Spirulina platensis* dilakukan dengan teknik mencari rasio eluen terbaik menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT)/Thin-Layer Chromatography (TLC) dan diamati dengan sinar UV pada panjang gelombang (λ) 254 dan 366 nm. Kombinasi eluen yang digunakan pada fraksinasi ekstrak *Spirulina platensis* yaitu: A) etil asetat:metanol:air (10:1.35:1), B) kloroform:metanol:air (7:3:0.4), C) Etil asetat:metanol:air:asam asetat (6.5:1.5:1.5:1), dan D) kloroform:etil asetat (9:1).

Fraksinasi ekstrak *Spirulina platensis* dilakukan dengan menggunakan lempeng lapis tipis silika gel Si 60 GF₂₅₄ dengan ukuran panjang 10 cm dan lebar 1 cm diberi tanda garis dengan pensil pada jarak 1 cm dari salah satu ujung lempeng. Ekstrak aktif terpilih dilarutkan dalam pelarut asalnya. Eluen yang digunakan dimasukkan ke dalam tabung kemudian ditutup rapat agar jenuh. Larutan ekstrak sampel diteteskan menggunakan pipa kapiler pada lempeng silika gel. Ujung lempeng yang terdekat pada tempat penetesan dicelupkan ke dalam tabung kromatografi yang telah jenuh dengan eluen. Tabung ditutup rapat dan didiamkan hingga pelarut elusi sampai batas yang ditentukan yaitu 1 cm dari batas atas. Setelah elusi pada batas tertentu, lempeng diangkat selanjutnya dikeringkan pada suhu ruang selama beberapa menit, kemudian diamati dengan UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, kemudian dihitung nilai R_f menggunakan rumus:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{Jarak total yang ditempuh oleh eluen}}$$

Isolasi komponen aktif pada ekstrak *Spirulina platensis* dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) dengan pelat kaca berukuran 20x20 cm² dengan fase diam silika gel Si 60 PF₂₅₄ yang telah diaktifkan dengan cara pemanasan pelat kaca selama satu jam pada suhu 110°C. Ekstrak aktif 20 mg ditotolkan sepanjang garis pita pada pelat kaca dan dielusi dengan perbandingan eluen terpilih dari hasil KLT. Pelat kaca kemudian dikeringkan dan diamati dengan UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm berdasarkan nilai R_f-nya. Pengambilan senyawa hasil KLTP dilakukan dengan cara dikerik dan hasilnya dilarutkan dengan pelarut awal ekstrak yaitu etanol, kemudian dikeringkan menggunakan vacuum dryer.

Uji Aktivitas Inhibisi Enzim α -Glukosidase

Preparasi sampel biomassa, ekstrak kasar, fikosianin, fraksi terpilih dan senyawa isolasi flavonoid dari *Spirulina* dibuat pada konsentrasi 100, 250, 500, 750 dan 1000 μ g/mL, kemudian dipipet sebanyak 0,1 mL dan dicampurkan dengan 50 μ L buffer fosfat 0,1 M (pH 7,0), 25 μ L p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (p-NPG) 10 mM, kemudian campuran diaduk hingga homogen. Setelah campuran homogen, sebanyak 25 μ L larutan enzim α -glukosidase ditambahkan dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Reaksi tersebut dihentikan dengan menambahkan 100 μ L Na₂CO₃ 200 mM. Selanjutnya absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 403 nm sebagai absorbansi sampel (A_s).

Larutan blanko sampel dibuat dengan cara mencampurkan 0,1 mL dan dicampurkan dengan

50 μ L buffer fosfat 0,1 M (pH 7,0), 25 μ L p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (p-NPG) 10 mM, kemudian campuran diaduk hingga homogen. Setelah campuran homogen, sebanyak 25 μ L larutan enzim α -glukosidase ditambahkan dan diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 37°C. Reaksi tersebut dihentikan dengan menambahkan 100 μ L Na₂CO₃ 200 mM. Selanjutnya absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 403 nm sebagai absorbansi blanko (Ab1).

Kontrol negatif dibuat dengan cara mencampurkan sebanyak 0,1 mL dan dicampurkan dengan 50 μ L buffer fosfat 0,1 M (pH 7,0), 25 μ L p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (p-NPG) 10 mM, kemudian campuran diaduk hingga homogen. Setelah campuran homogen, sebanyak 25 μ L larutan enzim α -glukosidase ditambahkan dan diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 37°C. Reaksi tersebut dihentikan dengan menambahkan 100 μ L Na₂CO₃ 200 mM. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 403 nm sebagai absorbansi kontrol (Ac).

Larutan blanko kontrol positif dibuat dengan cara mencampurkan sebanyak 0,1 mL dan dicampurkan dengan 50 μ L buffer fosfat 0,1 M (pH 7,0), 25 μ L p-nitrofenil- α -D-glukopiranosida (p-NPG) 10 mM, kemudian campuran diaduk hingga homogen. Setelah campuran homogen, sebanyak 25 μ L larutan enzim α -glukosidase ditambahkan dan diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 37°C. Reaksi tersebut dihentikan dengan menambahkan 100 μ L Na₂CO₃ 200 mM. Absorbansi larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 403 nm sebagai absorbansi blanko (Ab2). Larutan akar bosa digunakan sebagai kontrol positif dengan sistem reaksi sama seperti sampel. Aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase ditentukan dengan rumus:

$$\text{Inhibisi} = \frac{(Ac - Ab2) - (As - Ab1)}{(Ac - Ab2)} \times 100\%$$

Keterangan: Ac = Absorbansi kontrol negatif; Ab1 = Absorbansi blanko kontrol positif; As = Absorbansi sampel; Ab2 = Absorbansi blanko sampel

HASIL DAN PEMBAHASAN

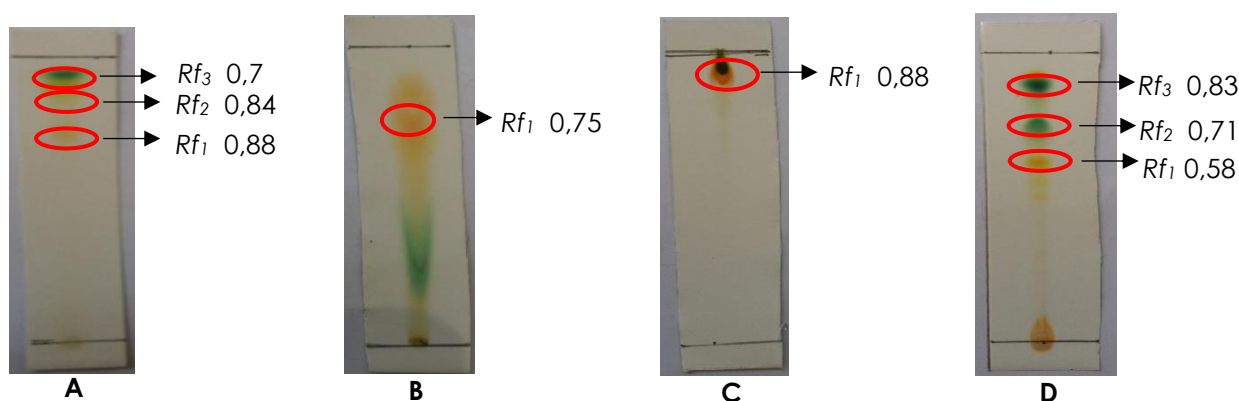
Fraksinasi komponen senyawa aktif *Spirulina platensis* dilakukan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT)/thin layer chromatography (TLC). Kromatografi lapis tipis merupakan metode pemisahan komponen senyawa aktif berdasarkan kecepatan migrasi atau rasio distribusi dari komponen campuran fase diam/stationary phase dan fase gerak/mobile phase (Hancu et al., 2011). Kromatografi lapis tipis merupakan metode yang relatif sederhana, cepat dan umum digunakan untuk mengidentifikasi komponen senyawa aktif. Pada penelitian ini menggunakan empat jenis rasio eluen/pelarut sebagai fase gerak yaitu: A) etil asetat:metanol:aquades (10:1.35:1); B) kloroform:metanol:aquades (7:3:0.4); C) etil asetat:metanol:aquades:asam asetat (6.5:1.5:1.5:1); dan D) kloroform:etil asetat (6:4). Tujuan penggunaan kombinasi campuran eluen/pelarut yakni untuk menentukan kombinasi pelarut terbaik dalam memisahkan komponen senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak biomassa *Spirulina platensis*. Berdasarkan perbedaan jenis eluen tersebut diperoleh sejumlah fraksi yang ditandai adanya bercak/noda dengan nilai retardation factor (Rf) yang bervariasi. Untuk masing-masing hasil pemisahan dengan KLT dapat dilihat pada Gambar 1.

Pemilihan kombinasi eluen tersebut dilakukan berdasarkan Stahl (2013). Gambar 1 merupakan kombinasi eluen C yakni pelarut etil asetat:metanol:aquades:asam asetat (6.5:1.5:1.5:1) menunjukkan bahwa komponen aktif yang dapat ditarik oleh eluen cenderung lebih sedikit dibandingkan dengan fraksi lain karena fase gerak (eluen/pelarut) tidak dapat memisahkan senyawa yang terkandung di dalam ekstrak sehingga tertahan di bagian atas dekat garis start. Kombinasi pelarut B dan A menunjukkan pemisahan komponen aktif yang kurang sempurna. Pemisahan senyawa terbaik terdapat pada kombinasi pelarut D yaitu kloroform:etil asetat (6:4). Fraksi dengan rasio eluen tersebut dapat melarutkan cukup baik dengan menghasilkan 3 noda

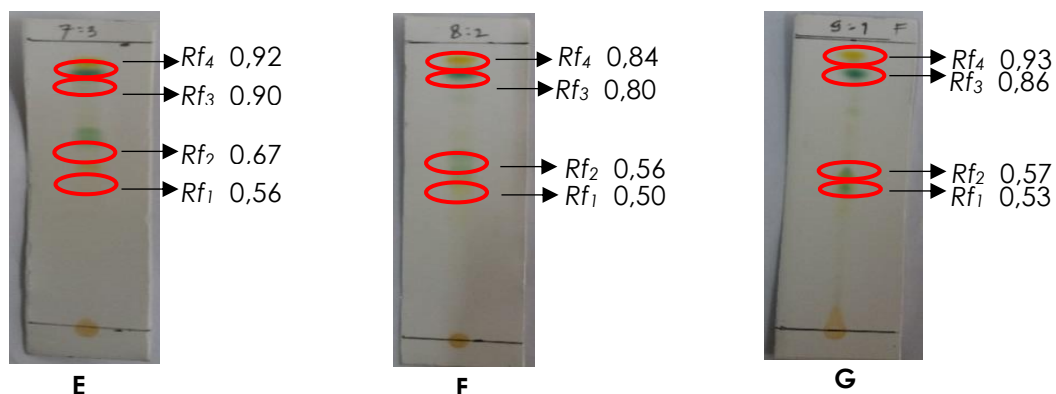
komponen senyawa aktif yang terpisah dengan baik. Kombinasi eluen kloroform:etil asetat merupakan kombinasi eluen yang bersifat non polar dan semi-polar. Adanya kombinasi eluen/fase gerak berdasarkan perbedaan polaritas (polar:semi-polar:nonpolar) dapat memisahkan dengan baik masing-masing komponen senyawa aktif (Lade *et al.*, 2014). Hal ini juga sesuai dengan penelitian oleh Dermawan *et al.* (2019) yang melaporkan bahwa kombinasi eluen/fase gerak nonpolar:semi-polar yakni kloroform:aseton mampu memisahkan dengan baik noda/bercak komponen senyawa aktif dengan metode KLT dari ekstrak *Pycnoclavella diminuta*.

Masing-masing jenis eluen menunjukkan noda/bercak dengan nilai R_f yang berbeda-beda. Selanjutnya dilakukan pemisahan dengan melakukan modifikasi perbandingan eluen terbaik kloroform:etil asetat (6:4) yaitu menggunakan tiga jenis rasio eluen sebagai fase gerak yakni kombinasi E) kloroform:etil asetat (7:3), kombinasi F) kloroform:etil asetat (8:2), dan kombinasi G) kloroform:etil asetat (7:3). Hasil rasio eluen ini dapat dilihat pada Gambar 2. Berdasarkan Gambar 2 maka diperoleh kombinasi eluen/pelarut terbaik yaitu kombinasi G kloroform:etil asetat (9:1) yang menghasilkan pemisahan sempurna antarnoda/bercak warna. Terjadinya perbedaan pemisahan komponen senyawa aktif disebabkan oleh prinsip *like-dissolve-like*. Senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut yang polar, senyawa yang bersifat nonpolar akan larut dalam sistem pelarut yang nonpolar dan sebagian besar senyawa yang bersifat polar dan nonpolar memiliki kemampuan untuk larut dalam pelarut yang bersifat semi-polar seperti etil asetat (Pandey *et al.*, 2013).

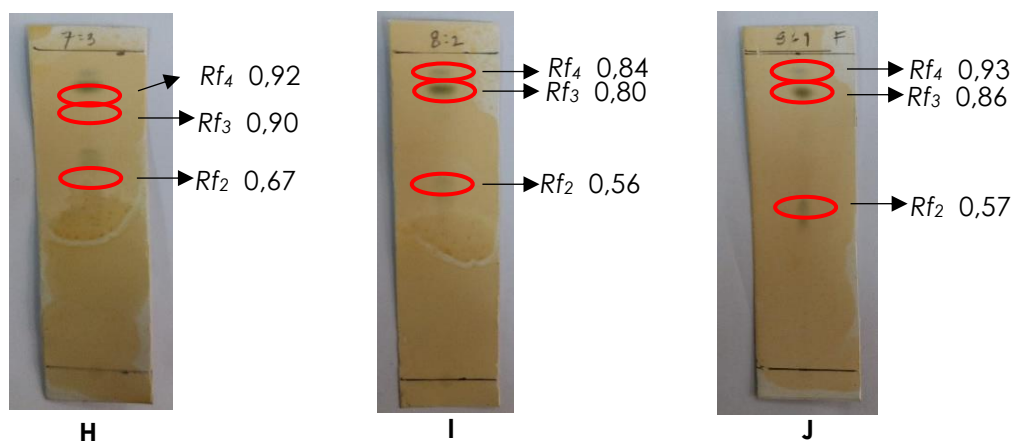
Nilai R_f pada hasil KLT dari fraksi G yaitu kombinasi eluen kloroform:etil asetat (9:1) memiliki pemisahan komponen aktif yang cukup baik bila dibandingkan dengan kombinasi eluen lainnya. Nilai R_f diperoleh dari perbandingan jarak tempuh antara senyawa dengan jarak tempuh fase gerak (eluen). Kombinasi eluen kloroform:etil asetat (9:1) menghasilkan 4 fraksi dengan nilai R_f yang berbeda yaitu R_{f1} (0,53), R_{f2} (0,57), R_{f3} (0,86) dan R_{f4} (0,93). Hasil KLT dari fraksi G dengan nilai R_f 0,53; 0,57; 0,86; dan 0,93 diduga senyawa flavonoid yang ditunjukkan warna kuning-oranye. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Mathew dan Lakshmanan (2012) bahwa senyawa flavonoid yang terkandung pada ekstrak Mangrove *Rhizophora apiculata* dan *Acanthus illicifolius* memiliki warna noda/bercak kuning-oranye. Fraksi dideteksi menggunakan UV kemudian divisualisasi menggunakan reagen $FeCl_3$ untuk mendeteksi keberadaan komponen senyawa aktif flavonoid. Hal ini sesuai dengan laporan oleh Cai (2018) bahwa metode visualisasi hasil KLT untuk senyawa golongan flavonoid dan fenol dapat menggunakan metode *Ferric Chloride Spray*. Reagen $FeCl_3$ digunakan untuk mendeteksi senyawa flavonoid yang ditandai dengan adanya spot/noda berwarna kuning-cokelat. Hasil visualisasi eluen tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 1. Hasil KLT ekstrak biomassa *Spirulina platensis*: (A) etil asetat:metanol:aquades (10:1.35:1), (B) kloroform:metanol:aquades (7:3:0.4), (C) etil asetat:metanol:aquades:asam asetat (6.5:1.5:1.5:1), dan (D) kloroform:etil asetat (6:4)



Gambar 1. Hasil KLT dengan rasio eluen terbaik ekstrak biomassa *Spirulina platensis*: (E) kloroform:etil asetat (7:3), (F) kloroform:etil asetat (8:2), dan (G) kloroform:etil asetat (9:1)



Gambar 2. Hasil KLT ekstrak biomassa *Spirulina platensis* visualisasi dengan reagen $FeCl_3$: (H) kloroform:etil asetat (7:3), (I) kloroform:etil asetat (8:2), dan (J) kloroform:etil asetat (9:1)

Gambar 3 menunjukkan bahwa setiap plat KLT yang disemprotkan dengan reagen $FeCl_3$ menghasilkan 3 hasil visualisasi yang berbeda yaitu Rf_2 (0,57), Rf_3 (0,86) dan Rf_4 (0,93). Hal ini diduga karena adanya perbedaan jenis senyawa golongan flavonoid yang terkandung, sehingga menghasilkan nilai Rf yang berbeda-beda. Pemilihan fraksi dengan pemisahan noda/bercak warna terbaik yaitu kloroform:etil asetat (9:1) fraksi 03 dengan Rf 0,86 yang diduga merupakan senyawa flavonoid dengan ditandai warna bercak/noda kuning-cokelat gelap. Hal ini sesuai dengan El-Baky *et al.* (2008) yang melaporkan bahwa noda/bercak yang menunjukkan senyawa flavonoid dari ekstrak *Spirulina maxima* hasil visualisasi dengan reagen $FeCl_3$ berwarna dark-brown.

Komponen senyawa aktif ekstrak *Spirulina sp.* memiliki berbagai aktivitas farmakologis seperti antioksidan (Firdiyani *et al.*, 2015). Ekstrak dari bahan alam yang memiliki aktivitas antioksidan juga dapat memiliki potensi aktivitas farmakologis lain (Djamaludin *et al.*, 2019). Telah dilaporkan oleh Abdel-Moneim *et al.* (2022) bahwa ekstrak *Spirulina sp.* memiliki aktivitas farmakologis lain yaitu antifungi. Alshuniaber *et al.* (2021) melaporkan bahwa *Spirulina platensis* yang diekstrak dengan kombinasi pelarut *methanol-water-acetic acid* (30:69:1 v/v/v) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen penyebab *food-borne diseases*. Sirait *et al.* (2019) juga melaporkan bahwa ekstrak *Spirulina* memiliki aktivitas sebagai antikanker payudara dengan kemampuan menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7. Hidayati *et al.* (2020) menyatakan ekstrak aquades dari *Spirulina platensis* mampu menghambat $46,12 \pm 2,03\%$ radikal bebas, dengan kandungan total fenolik

sebesar $26,64 \pm 0,16$ mg GAE/g sampel dan didominasi oleh pigmen fikosianin $0,301 \pm 0,09$ mg/g. Ekstrak *Spirulina* sp. juga menunjukkan adanya aktivitas inhibisi terhadap enzim α -amilase ($0,07$ %/(min. μ g) (Scaglioni *et al.*, 2018), sehingga dapat dikembangkan dalam penelitian terkait pengembangan anti-diabetes mellitus.

Uji aktivitas inhibisi terhadap enzim α -glukosidase dilakukan untuk mengetahui kemampuan ekstrak *Spirulina platensis* berpotensi untuk dikembangkan sebagai anti-hiperglikemik. Pengujian dilakukan dengan menggunakan biomassa, ekstrak biomassa, fikosianin dan fraksi 03 yang diduga merupakan senyawa golongan flavonoid mengacu pada penelitian Notonegoro *et al.* (2018) dan konsentrasi pengujian masing-masing sebesar 100, 250, 500, 750 dan 1000 ppm. Pengujian juga dilakukan menggunakan acarbose sebagai kontrol positif. Nilai aktivitas inhibisi terhadap enzim α -glukosidase oleh biomassa, ekstrak biomassa, fikosianin dan senyawa flavonoid dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil pengujian inhibisi enzim α -glukosidase menunjukkan bahwa biomassa, ekstrak biomassa, fikosianin diduga memiliki aktivitas yang lemah/rendah dalam penghambatan terhadap enzim α -glukosidase pada konsentrasi 100, 250, 500, 750 dan 1000 ppm. Nilai inhibisi yang dihasilkan menunjukkan angka negatif pada setiap konsentrasinya. Lemahnya aktivitas penghambatan terhadap enzim α -glukosidase pada penelitian ini diduga karena bahan yang digunakan masih dalam bentuk ekstrak kasar/*crude extract*. Hal ini sesuai dengan Daou *et al.* (2022) yang melaporkan bahwa aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase oleh komponen ekstrak kasar *Tamarix nilotica* lebih lemah dari aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase oleh komponen hasil fraksinasi, di mana nilai IC_{50} komponen ekstrak kasar $24,8 \mu\text{g/mL}$, sedangkan nilai IC_{50} komponen fraksi mencapai $5,21 \mu\text{g/mL}$. Silva *et al.* (2020) juga melaporkan bahwa komponen fraksinasi dari *Mouriri elliptica* Martius memiliki aktivitas penghambatan (IC_{50}) enzim *acetylcholinesterase* dan α -amilase yang jauh lebih tinggi daripada aktivitas penghambatan oleh komponen ekstrak kasarnya. Sehingga perlu dilakukan fraksinasi, pemisahan dan pemurnian senyawa dari ekstrak biomassa *Spirulina platensis* untuk mengetahui lebih jauh kemampuan penghambatan terhadap enzim α -glukosidase. Hal ini karena semakin murni komponen suatu senyawa, maka semakin tinggi aktivitas penghambatan atau nilai IC_{50} (Bawazeer *et al.*, 2019).

Hasil penelitian AbouZid *et al.* (2014) menyatakan bahwa ekstrak biomassa *Spirulina versicolor* menggunakan etanol dengan dosis 50 mg/kg dapat menurunkan kadar glukosa dalam darah tikus sebesar $228,00 \pm 30,86$ menjadi $49,94 \pm 7,70$ pada konsentrasi glukosa puasa dan $274,02 \pm 27,90$ menjadi $184,97 \pm 22,01$ pada konsentrasi glukosa 2 jam. Setyaningsih (2015) juga menyatakan bahwa biomassa dan fikosianin yang terkandung dalam *Spirulina fusiformis* sebesar $0,30 \text{ mg/g}^{-1}$ dapat menurunkan kadar glukosa dalam darah pada tikus sebesar $86,00 \pm 1,000$ dan $84,8 \pm 1,000$ pada konsentrasi glukosa 2 jam.

Senyawa yang terkandung pada *Spirulina platensis* yang diduga berperan dalam penghambatan terhadap aktivitas enzim α -glukosidase adalah senyawa golongan flavonoid. Senyawa golongan ini terkandung pada biomassa dan ekstrak kasar *Spirulina*. Hasil pengujian inhibisi terhadap enzim α -glukosidase menunjukkan bahwa fraksi 03 yang diduga merupakan senyawa golongan flavonoid memiliki kemampuan yang rendah untuk menghambat aktivitas enzim α -glukosidase dilihat berdasarkan persen nilai inhibisinya. Hal ini diduga karena senyawa golongan flavonoid yang diuji merupakan senyawa golongan flavonoid yang masih berbentuk umum yaitu masih terikat dengan gugus gula. Struktur flavonoid, posisi dan jumlah gugus OH merupakan faktor penentu untuk efek yang diinginkan seperti aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase (Proença *et al.* 2017)

Proença *et al.* (2017) melaporkan bahwa flavonoid yang paling aktif adalah jenis quercetin dan menunjukkan IC_{50} jauh lebih rendah dibandingkan penghambatan α -glukosidase menggunakan acarbose. Hal ini sejalan dengan penelitian Mataputun (2013) yang menunjukkan

Tabel 1. Nilai % Inhibisi Enzim α -Glukosidase oleh Biomassa, Ekstrak Biomassa, Fikosianin dan Flavonoid

Konsentrasi (ppm)	Biomassa	Ekstrak Biomassa	Flavonoid	Fikosianin
	% Inhibisi			
100	-0.483	-7.235	1.082	-2.664
250	-8.978	-6.546	-0.654	-10.752
500	-5.619	-6.213	0.424	-8.541
750	-4.360	-7.443	0.160	-7.989
1000	-6.747	-9.339	-1.819	-8.456

bahwa ekstrak kulit batang mataoa yang mengandung senyawa golongan flavonoid berupa flavonol memiliki persen inhibisi terhadap enzim α -glukosidase sebesar 24,79%. Hasil uji IC_{50} akarbose sebagai standar (kontrol positif) menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 0,246 ppm. Akarbose digunakan sebagai standar (kontrol positif) karena termasuk obat golongan penghambat aktivitas enzim α -glukosidase.

KESIMPULAN

Hasil eluen terbaik untuk memisahkan senyawa komponen flavonoid pada *Spirulina platensis* menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT)/thin layer chromatography (TLC) adalah dengan kombinasi kloroform:etil asetat perbandingan 9:1 yang memiliki nilai Rf_2 0,57; Rf_3 0,86; dan Rf_4 0,93 dengan bercak berwarna kuning-cokelat gelap. Biomassa *Spirulina*, ekstrak biomassa, ekstrak fikosianin dan flavonoid tidak dapat menghambat aktivitas inhibisi enzim α -glukosidase. Perlu dilakukan fraksinasi, pemisahan dan purifikasi untuk memperoleh isolat senyawa murni dari golongan flavonoid pada biomassa dan ekstrak *Spirulina platensis* untuk menguji lebih lanjut aktivitas inhibisi terhadap enzim α -glukosidase.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Moneim, A.M.E., El-Saadony, M.T., Shehata, A.M., Saad, A.M., Aldhumri, S.A., Ouda, S.M., & Mesalam, N.M. (2022). Antioxidant and antimicrobial activities of *Spirulina platensis* extracts and biogenic selenium nanoparticles against selected pathogenic bacteria and fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(164), 1197–1209. doi: 10.1016/j.sjbs.2021.09.046.
- AbouZid, S.F., Ahmed, O.M., Ahmed, R.R., Mahmoud, A., Abdella, E., & Ashour, M.B. (2014). Antihyperglycemic effect of crude extracts of some Egyptian plants and algae. *Journal of Medicinal Food*, 17(3), 400-406. doi: 10.1089/jmf.2013.0068
- Alshuniaber, M.A., Krishnamoorthy, R., & AlQhtani, W.H. (2021). Antimicrobial activity of polyphenolic compounds from *Spirulina* against food-borne bacterial pathogens. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 28(1), 459-464.
- Bawazeer, S., Rauf, A., Shah, S.U.A., Ullah, N., Uddin, G., Khan, H., & Hadda, T.B. (2019). Antioxidant and enzyme inhibitory activities of extracts and phytochemicals isolated from *Pistacia integerrima*. *Journal of Medicinal and Spice Plants*. 23 (2), 55-58.
- Benelhadj, S., Gharsallaoui, A., Degraeve, P., Attia, H., & Ghorbel, D. (2016). Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate. *Food Chem*. 194, 1056-1063. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.08.133.
- Cai, L. (2018). Thin layer chromatography. *Curr. Protoc. Essent. Lab. Tech*. 8, 6.3.1-6.3.18. doi: 10.1002/9780470089941.et0603s08.
- Daou, M., Elnaker N.A., Ochsenkühn, M.A., Amin, S.A., Yousef, A.F., & Yousef, L.F. (2022). *In vitro* α -glucosidase inhibitory activity of *Tamarix nilotica* shoot extracts and fractions. *PLoS ONE*. 17(3), e0264969. doi: 10.1371/journal.pone.0264969
- Dermawan, A. M., Julianti, E., Putra, M.Y., & Karim, F. (2019). Identification and evaluation of antibacterial compounds from the *Vibrio* sp. associated with the ascidian *Pycnoclavella diminuta*. *Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(3), 142-148.

- Dinata Widnyana, B.K.D., Anggreni Dewi, A.A.M., & Antara, N.S. 2017. Pengaruh konsentrasi natrium nitrat dan natrium dehidrogen fosfat pada media Walne terhadap konsentrasi biomassa dan protein *Nannochloropsis oculata*. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, 5(1), 40-49.
- Djamaludin, H., & Chamidah, A. (2021a). Analisis komposisi asam lemak ekstrak minyak mikroalga *Spirulina* sp. dengan metode ekstraksi yang berbeda. *Journal of Fisheries and Marine Research*. 5(2), 254-261. doi: 10.21776/ub.jfmr.2021.005.02.10
- Djamaludin, H., & Chamidah, A. (2021b). Kualitas ekstrak minyak mikroalga *Spirulina* sp. dengan metode ekstraksi yang berbeda. *Prosiding Simposium Nasional VIII Kelautan dan Perikanan*. 8, 215-224.
- Djamaludin, H., Bintang, M., & Priosoeryanto, B. P. (2019). Cytotoxicity and antiproliferative effects of ethyl acetate fraction of *Padina australis* against MCM-B2 and K562 cell lines. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 07(02), 25-29. doi: 10.7324/JABB.2019.70205.
- El-Baky, H.H.A., El-Baz, F.K. & El-Baroty, G.S. (2008). Characterization of nutraceutical compounds in blue green alga *Spirulina maxima*. *The Journal of Medicinal Plants Researc*. 2(10), 292-300.
- Firdiyani, F., Agustini, T.W., & Ma'ruf, W.F. (2015). Ekstraksi senyawa bioaktif sebagai antioksidan alami *Spirulina platensis* segar dengan pelarut yang berbeda. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 18(1), 28-37. doi: 10.17844/jphpi.2015.18.1.28.
- Hancu, G., Fulop, E., Rusu, A., Mircia, E., & Gyeresi, A. (2011). Thin layer chromatographic separation of benzodizepine derivates. *Ars. Docendi Publishing House*. 20(02), 181-188.
- Hidayati, J.R., Yudiati, E., Pringgenies, D., Oktaviyanti, D.T., & Kusuma, A.P. (2020). Comparative study on antioxidant activities, total phenolic compound and pigment contents of tropical *Spirulina platensis*, *Gracilaria arcuata* and *Ulva lactuca* extracted in different solvents polarity. *E3S Web of Conferences*. 147(03012), 1-9. doi: 10.1051/e3sconf/202014703012.
- Kartini, K., Wulandari, W.A., Jayani, N.I.E., & Setiawan, F. (2021). TLC-Based fingerprinting for *Phyllanthus niruri* from diverse geographical origins in East and Central Java Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 948, 1-8. doi: 10.1088/1755-1315/948/1/012003.
- Lade, B.D., Patil, A.S., Paikrao, H.M., Kale, A.S. & Hire, K.K. (2014). A comprehensive working, principles and applications of thin layer chromatography, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(4), 486-503.
- Mataputun, S.P., Rorong, J.A., & Pontoh, J. (2013). Aktivitas inhibitor α -glukosidase ekstrak kulit batang mataoa (*Pometia pinnata* spp.) sebagai agen antihiperlipidemik. *Jurnal MIPA*, 2(2), 119-123.
- Mathew, A.K.K.S., & Lakshmanan, P.T. (2012). Flavonoids and phenolic compounds in two mangrove species and their antioxidant property. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 41(3), 259-264.
- Notonegoro, H., Setyaningsih, I., & Tarman, K. (2018). Kandungan senyawa aktif *Spirulina platensis* yang ditumbuhkan pada media walne dengan konsentrasi NaNO_3 berbeda. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 13(2), 111-122.
- Pandey, R., Shukla, S. S., Saraf, S., & Saraf, S. (2013). Standardization and validated high-performance thin-layer chromatographic fingerprint method for quantitative determination of plumbagin in a traditional Indian formulation. *Journal of Planar Chromatography*, 26(5), 440-444. doi: 10.1556/JPC.26.2013.5.9.
- Proença C, Freitas M, Ribeiro D, Oliveira E.F.T, Sousa J.L.C, Tomé S.M, Ramos M.J, Silva A.M.S, Fernandes P.A., & Fernandes E. (2017). α -Glucosidase inhibition by flavonoids: an *in vitro* and *in silico* structure-activity relationship study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 1216-1228. doi: 10.1080/14756366.2017.1368503
- Ridlo, A., Sedjati, S., & Supriyantini, E. (2016). Aktivitas anti oksidan fikosianin dari *Spirulina* sp. menggunakan metode transfer elektron dengan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). *Jurnal Kelautan Tropis*. 18(2), 58-63. doi: 10.14710/jkt.v18i2.515.
- Scaglioni, P.T., Quadros, L., de Paula, M., Furlong, V.B., Abreu, P.C., & Badiale-Furlong, E. (2018). Inhibition of enzymatic and oxidative processes by phenolic extracts from *Spirulina* sp. and *Nannochloropsis* sp. *Food Technology and Biotechnology*, 56(3), 344-353. doi: 10.17113/ftb.56.03.18.5495
- Sedjati, S., Ridlo, A., & Supriyantini, E. (2016). Efek penambahan gula terhadap kestabilan warna ekstrak fikosianin *Spirulina* sp. *Jurnal Kelautan Tropis*. 18(1), 01-06. doi: 10.14710/jkt.v18i1.505.

- Setyaningsih, I., Bintang, M., & Madina, N. (2015). Potentially antihyperglycemic from biomass and phycocyanin of *Spirulina fusiformis* voronikhin by in vivo test. *Procedia Chemistry*, 14, 211-215. doi: 10.1016/j.proche.2015.03.030.
- Silva, L.S., Porfiro, C A., Silva, F.G., Rodrigues, A.R.S., & Pereira, P.S. (2020). Acetylcholinesterase and α -amylase inhibitors from *Mouriri elliptica* Martius leaf extract. *Bioscience Journal*, 36(2), 578-590. doi: 10.14393/BJ-v36n2a2020-42714
- Sirait, P. S., Setyaningsih, I., & Tarman, K. (2019). Aktivitas antikanker ekstrak *Spirulina* yang dikultur pada media walne dan media organik. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 22(1), 50-59.
- Stahl, S. M. (2013). *Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications (4th Edition)*. Cambridge University Press.
- Suharyanto, Tri-Panji, Permatasari, S., & Syamsu, K. (2014). Produksi *Spirulina platensis* dalam fotobioreaktor kontinyu menggunakan media limbah cair pabrik kelapa sawit. *Menara Perkebunan*, 82(1), 1-9. doi: 10.22302/iribb.jur.mp.v82i1.25.