

AKTIVITAS DAN STABILITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK PIGMEN ALGA *Oscillatoria* sp.

Antioxidant Activity and Stability of Pigment Extracted from Algae *Oscillatoria* sp.

Karseno, Isti Handayani, Retno Setyawati

Jurusan Teknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Jenderal Soedirman,
Jl. Dr. Soeparno Karangwangkal, Purwokerto 53122
Email: karseno_m71@yahoo.com

ABSTRAK

Oscillatoria adalah salah satu jenis alga yang banyak tumbuh di perairan tawar maupun laut. Isolasi pigmen dari ekstrak alga ini diperoleh pigmen berwarna ungu yang memiliki sifat fisikokimia mirip dengan pigmen fikocianin yang ada pada alga merah. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas dan stabilitas antioksidan ekstrak pigmen *Oscillatoria* terhadap suhu dan pH yang berbeda. Stabilitas antioksidan pigmen diuji dengan memperlakukan ekstrak pigmen pada pelarut buffer fosfat 20 mM dengan variasi pH 6, 7, dan 8 serta suhu pemanasan 28, 40, 70, dan 100°C. Aktivitas antioksidan pigmen diukur menggunakan metode FTC dan TBA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan pigmen *Oscillatoria* stabil pada pH 7 dan suhu 28°C, namun aktivitasnya cenderung menurun saat pH buffer medium berubah menjadi asam maupun basa dan suhu yang semakin meningkat.

Kata kunci: Alga, *Oscillatoria* sp., pigmen alami, fikocianin, antioksidan

ABSTRACT

The pink pigment has been isolated from *Oscillatoria* algae cell. The pigment showed physicochemical properties similar to phycoerythrin produced by red algae. The aims of this study were to evaluate antioxidant activity and stability of the pigment at various pH and temperature. The pigment was diluted using 20 mM phosphate buffer at different pH of 6, 7, and 8 and incubated at various temperature of 28, 40, 70, and 100°C. Antioxidant activity and stability of the pigment were determined using ferric thiocyanate method and thiobarbituric acid test. The result showed that antioxidant activity of the pigment was stable at pH 7 and temperature 28°C, and the antioxidant stability tend to decrease when the pH buffer solution change to acid or alkali and increasing of temperature.

Keywords: Algae, *Oscillatoria* sp., natural pigment, phycobiliproteins, antioxidant

PENDAHULUAN

Indonesia adalah negara tropis dengan hampir dua pertiga wilayahnya adalah lautan dengan garis pantai terpanjang di dunia yakni 81.000 km. Potensi sumber daya alam kelautannya sangat melimpah dan memiliki keragaman hayati yang sangat besar. Salah satu sumber hayati yang potensial dan belum banyak dieksplorasi adalah alga. Alga yang meliputi mikroalga, makroalga (rumput laut) dan *cyanobacteria* (ganggang hijau biru) dikenal memiliki potensi sebagai produsen bahan-bahan bermanfaat (*valuable chemicals*) seperti polisakarida, hormon, vitamin, mineral dan senyawa bioaktif. Jumlah dan variasi senyawa bioaktif alga sangat banyak dan beragam (Sing

dkk., 2005). Penyelidikan senyawa bioaktif yang bersumber dari mikroorganisme seperti bakteri dan jamur sudah banyak dilakukan. Beragam senyawa bioaktif dari bakteri dan jamur ini sudah ditemukan dan bahkan diaplikasikan khususnya pada bidang farmasi dan pangan selama beberapa dekade. Dewasa ini laju penyelidikan dan ketersediaan senyawa bioaktif dari sumber tersebut menurun dan sekarang para peneliti mulai beralih untuk menggali senyawa bioaktif dari alga dan sekaligus kajian potensi aplikasinya.

Salah satu senyawa bioaktif penting yang dihasilkan alga adalah pigmen. Secara umum pigmen alga terdiri dari klorofil, karotenoid dan fikobiliprotein (*phycobiliproteins*). Eksplorasi dan kajian terhadap fikobiliprotein relatif masih

sedikit bila dibandingkan dengan klorofil dan karotenoid. Penelitian berbasis fikobiliprotein baru mulai berkembang setelah diketahui potensi pigmen ini dalam aplikasinya sebagai *fluorescence probe* untuk *bio-labeling* yang banyak digunakan dalam *bio-assay* dan *cytometry*. Selain itu fikobiliprotein juga berperan sebagai antioksidan dan pewarna alami yang besar potensi aplikasinya dalam bidang pangan. Bahkan akhir-akhir ini fikobiliprotein juga menunjukkan potensinya sebagai fotosensitizer (*photosensitizer*) yang prospektif penerapannya untuk kepentingan terapi seperti *photodynamic therapy* dalam pengobatan kanker.

Banyak penelitian telah menunjukkan bahwa alga memiliki kandungan bioaktif. Alga merah *Porphyridium* sp. mampu menghambat pembentukan malonaldehid (MDA) sebanyak 45-87% pada konsentrasi yang berbeda (Tannin dkk., 2005). Alga hijau-biru *Aphanizomenon flos-aquae* memiliki pigmen *phycocyanin* yang setelah diekstrak memiliki aktivitas antioksidan (Benedetti dkk., 2004).

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan isolasi pigmen berwarna ungu dari alga *Oscillatoria* sp. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa pigmen ungu ini memiliki karakteristik fisikokimia mirip dengan fikoeitrin yang diisolasi dari jenis alga merah, sehingga pigmen ini disebut sebagai *phycoerythrin-like pigment* (Karseno dkk., 2009). Hasil pengujian aktivitas antimikrobiana menunjukkan bahwa pigmen ini mampu menghambat pertumbuhan grup alga hijau seperti *Chlorella fusca* dan *Chlamydomonas reinhardtii*, tetapi tidak menunjukkan penghambatan yang berarti terhadap grup *Cyanobacteria* (*Synctonema* dan *Oscillatoria*) dan bakteri (*Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*). Sementara itu penelitian pigmen ungu tersebut terkait aktivitas dan stabilitas antioksidannya belum dilaksanakan. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan pigmen *Oscillatoria* sp. dan mengevaluasi stabilitasnya terhadap perlakuan suhu dan pH yang berbeda.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan utama dalam penelitian ini adalah bubuk ekstrak pigmen *Oscillatoria* sp. Bahan kimia yang digunakan meliputi aquades, air bebas ion, Na₂CO₃, FeCl₂ HCl, ammonium thiosianat, TCA, TBA, asam asetat, NaH₂PO₄H₂O dan Na₂HPO₄.7H₂O, dan asam linoleat (Sigma). Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 1240), inkubator 37°C (Memmert), neraca analitik, vorteks, shaker dan peralatan gelas untuk analisis.

Ekstraksi Pigmen Alga

Alga umur 8 hari yang dikulturkan dalam medium C dipanen dan dipisahkan antara biomasa dengan mediumnya menggunakan kertas saring Whatman No 2. Ekstraksi pigmen alga mengacu pada penelitian Irmouli dkk. (2000) dengan beberapa modifikasi. Alga dalam larutan 50 mM posfat bufer dibekukan pada suhu -20°C. Alga dikeluarkan pada suhu ruang sampai larutan buffer menjadi cair, selanjutnya dibekukan kembali dan perlakuan yang sama diulang-ulang (*freeze-thaw cycles*) sampai diperoleh ekstrak sel alga. Ekstrak sel kemudian disentrifus (10.000 g) selama 10 menit pada 4°C. Supernatan berwarna ungu yang dihasilkan dikeringbekukan dan disimpan dalam refrigerator sebagai stok.

Pengukuran Aktivitas Penghambatan Peroksida Ekstrak Pigmen

Pengukuran aktivitas penghambatan peroksida pada ekstrak pigmen mengacu pada Chen dkk. (1996). Sebanyak 2 ml buffer fosfat 0,1 M pH 7; 2 ml asam linoleat 50 mM dalam etanol 99,8% dan 1 ml air bebas ion dicampur dengan 1 ml 2000 ppm ekstrak antioksidan, dimasukkan ke dalam vial gelap dengan tutup sekrup. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C. Pengukuran absorbansi peroksida dilakukan dua hari sebelum peroksida kontrol asam linoleat mencapai maksimum. Sebanyak 50 µl campuran sampel yang telah diinkubasi ditambah 2,35 mL etanol 75% dan 50 µl ammonium tiosianat 30%, kemudian ditambah 50 µl 0,02 M FeCl₂ dalam 3,5% larutan HCl selama 3 menit, dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm. Persen penghambatan peroksida dihitung dengan cara sebagai berikut:

$$\text{Persen Penghambatan} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100 \% \dots (1)$$

Pengukuran Aktivitas Penghambatan Malonaldehid Ekstrak Pigmen

Metode mengacu pada Kikuzaki dan Nakatani (1993). Sebanyak 1 ml larutan sampel yang mengandung ekstrak antioksidan yang telah diinkubasi pada suhu 37°C ditambah 2 ml asam triklorasetat (TCA) 20% dan 2 ml asam tiobarbiturat (TBA) 1% dalam pelarut asam asetat 50%. Campuran ini ditempatkan dalam penangas air mendidih selama 10 menit. Setelah dingin disentrifugasi pada 3000 rpm selama 20 menit. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 532 nm.

$$\text{Persen penghambatan} = 100 - \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi blanko}} \times 100 \% \dots (2)$$

Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis dengan uji sidik ragam (uji F). Apabila menunjukkan pengaruh

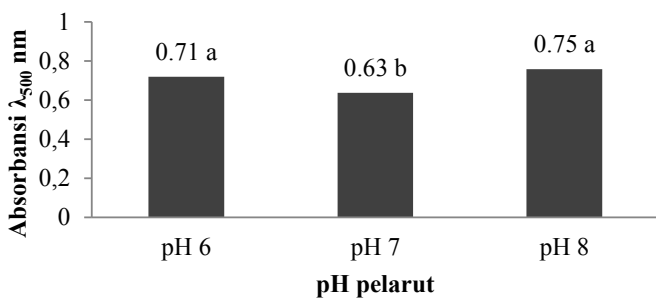
yang nyata maka data dianalisis lebih lanjut dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf $\alpha=5\%$ (Steel dan Torrie, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Penghambatan Peroksida

Pengukuran aktivitas antioksidan pigmen dilakukan dengan menggunakan metode feritiosianat yang didasarkan pada terbentuknya peroksida sebagai hasil oksidasi asam linoleat. Peroksida ini akan mengoksidasi ion ferro menjadi feri, dan kemudian membentuk feritiosianat yang dapat diukur secara kuantitatif dengan mengukur absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm (Lestario dkk., 2005).

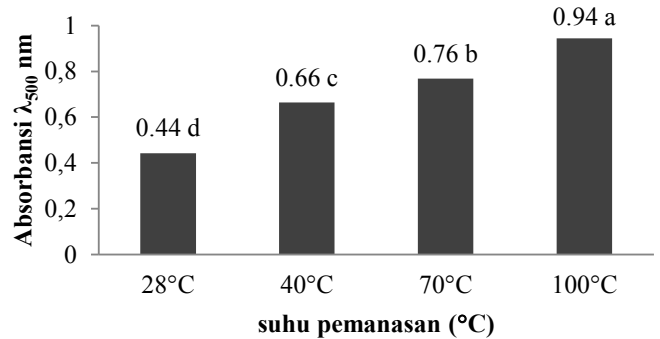
Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa pH dan suhu *waterbath* memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap absorbansi peroksida, dan interaksi keduanya memberikan pengaruh yang nyata terhadap absorbansi peroksida. Pengaruh pH terhadap absorbansi peroksida disajikan dalam Gambar 1.



Gambar 1. Pengaruh pH pelarut terhadap absorbansi peroksida pigmen *Oscillatoria*. Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($p>0,05$)

Gambar 1 menunjukkan perlakuan pH 6, pH 7 dan pH 8 sebagai pelarut menghasilkan absorbansi secara berurutan 0,71; 0,63; dan 0,75. Absorbansi tertinggi dihasilkan dari pelarut buffer fosfat pH 8 dan terendah dihasilkan oleh pH 7. Menurut Lestario dkk. (2005) absorbansi yang semakin tinggi menunjukkan makin tingginya peroksida, yang berarti jumlah oksidasi asam linoleat makin tinggi. Nilai absorbansi paling rendah dihasilkan dari pelarut buffer fosfat pH 7 yang menunjukkan bahwa pH 7 menghambat oksidasi asam linoleat tertinggi. Hal ini diduga karena pada pH 7 tersebut merupakan kondisi yang paling sesuai digunakan untuk melarutkan pigmen dari *Oscillatoria*. Kondisi ini sejalan dengan penelitian Karseno dkk. (2009) yang menggunakan buffer fosfat pH netral antara 7 hingga 7,4 untuk mengisolasi pigmen dari *Oscillatoria*. *Oscillatoria* merupakan golongan *Cyanobacteria* yang memiliki habitat hidup pada pH netral sampai basa (Prihantini dkk., 2008).

Selain perlakuan pH, pengujian aktivitas dan stabilitas pigmen *Oscillatoria* juga dibedakan dengan perlakuan suhu. Perlakuan suhu berpengaruh sangat nyata terhadap absorbansi peroksida seperti disajikan pada Gambar 2.

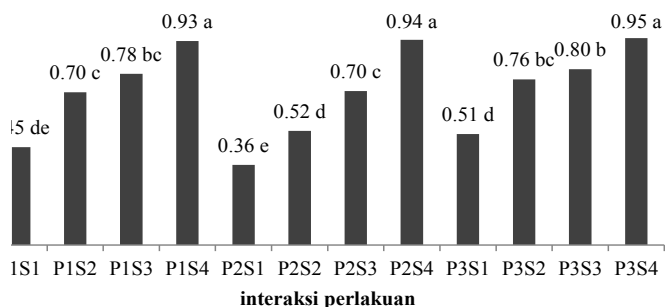


Gambar 2. Pengaruh suhu pemanasan terhadap absorbansi peroksida pigmen *Oscillatoria*. Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($p>0,05$)

Gambar 2 menunjukkan absorbansi peroksida pada suhu 28, 40, 70, dan 100°C dengan nilai absorbansi secara berturut-turut adalah 0,44; 0,66; 0,76; 0,94. Terlihat bahwa semakin naik suhu, semakin naik pula nilai absorbansi peroksidanya. Nilai absorbansi yang semakin tinggi menunjukkan semakin banyak peroksida yang terbentuk. Peroksida ini tidak dapat dihambat pembentukannya oleh pigmen *Oscillatoria*. Hal tersebut dapat disebabkan karena pemanasan merusak pigmen *Oscillatoria*. Pigmen yang dimiliki *Oscillatoria* adalah fikobiliprotein. Fikobiliprotein adalah kelompok kecil dari kromoprotein yang diteliti. Kelas fikobiliprotein yang paling dikenal adalah allokosianin, fikosianin, dan fikoeritrin. Ketiganya terbentuk dari dan sub unit protein (Romay dkk., 2003). Penelitian Karseno dkk. (2009) menyatakan bahwa pigmen yang dikandung *Oscillatoria* adalah fikoeritrin.

Suhu yang tinggi merusak protein yang terdapat pada pigmen *Oscillatoria* sehingga aktivitas penghambatan pembentukan peroksida pun menurun. Protein dapat mengalami suatu proses yang dikenal sebagai denaturasi. Denaturasi dapat merubah sifat protein menjadi sukar larut dan makin kental (koagulasi). Koagulasi dapat terjadi karena adanya pemanasan (Gaman dan Sherington, 1992). Othman dkk. (2007) menyebutkan bahwa faktor-faktor lain yang mempengaruhi aktivitas antioksidan adalah konsentrasi antioksidan, medium ekstraksi, suhu, pH medium, struktur kimia, dan posisi dalam molekul.

Interaksi antara pH dan suhu berpengaruh nyata terhadap absorbansi peroksida, seperti disajikan pada Gambar 3.



Keterangan :
 P1S1 = pH 6 + tidak dipanaskan P2S1 = pH 7 + tidak dipanaskan P3S1 = pH 8 + tidak dipanaskan
 P1S2 = pH 6 + dipanaskan 40°C P2S2 = pH 7 + dipanaskan 40°C P3S2 = pH 8 + dipanaskan 40°C
 P1S3 = pH 6 + dipanaskan 70°C P2S3 = pH 7 + dipanaskan 70°C P3S3 = pH 8 + dipanaskan 70°C
 P1S4 = pH 6 + dipanaskan 100°C P2S4 = pH 7 + dipanaskan 100°C P3S4 = pH 8 + dipanaskan 100°C

Gambar 3. Pengaruh interaksi perlakuan pH dan suhu terhadap absorbansi peroksida pigmen *Oscillatoria*. Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($p>0,05$)

Gambar 3 menunjukkan bahwa masing-masing interaksi perlakuan mengalami kenaikan absorbansi seiring dengan kenaikan suhu. Absorbansi terendah dihasilkan dari interaksi P2S1 yaitu menggunakan pelarut buffer fosfat pH 7 tanpa adanya pemanasan. Sedangkan interaksi P3S4 yaitu ekstrak pigmen pada pelarut buffer fosfat pH 8 dan dipanaskan 100°C menghasilkan absorbansi tertinggi yang menandakan rendahnya aktivitas penghambatan peroksida. Hal ini diduga karena pH 7 merupakan pH optimal untuk melarutkan pigmen *Oscillatoria* dan tanpa adanya pemanasan maka protein yang terkandung dalam pigmen tidak mengalami kerusakan.

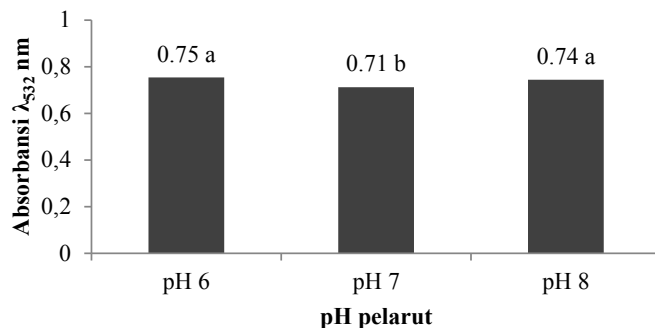
Berdasarkan hasil interaksi perlakuan, ketiga jenis pH pelarut memiliki kemampuan menghambat pembentukan peroksida, namun aktivitasnya menurun seiring dengan kenaikan dan penurunan pH dari pH netral. Semakin naik pH maka absorbansi peroksida juga meningkat yang menandakan turunnya aktivitas antioksidan dalam menghambat peroksida.

Aktivitas Penghambatan Malonaldehid

Malonaldehid (MDA) adalah salah satu senyawa aldehid yang dihasilkan dari reaksi oksidasi lemak. Nilai malonaldehid diperoleh dengan melakukan pengujian menggunakan *Thiobarbituric Acid* (TBA) untuk mengetahui kemampuan antioksidan dalam menghambat laju reaksi terminasi pada proses oksidasi lipid. Malonaldehid memiliki rumus kimia $CH_2(CHO)_2$ (Zakaria, 1996). Menurut Nawar (1996) mekanisme pembentukan malonaldehid yaitu pada saat reaksi inisiasi atom H pada gugus metilen asam lemak yang teroksidasi akan lepas. Kemudian radikal lipid akan terkonjugasi dan akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksil, serta bereaksi dengan asam lemak yang lain dan akhirnya akan terjadi pemutusan pada gugus terkonjugasi disertai terbentuknya radikal lipid yang lain. Nilai absorbansi

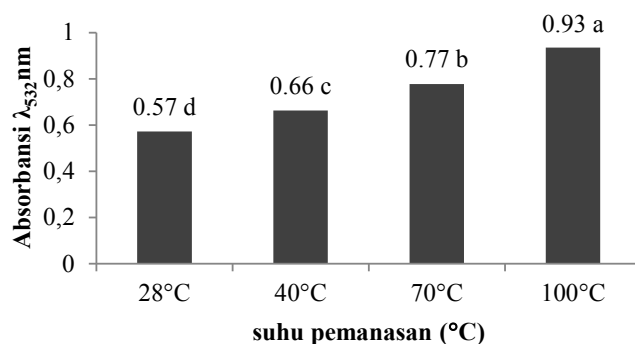
malonaldehid berbanding terbalik terhadap aktivitas antioksidan. Semakin tinggi nilai absorbansi berarti aktivitas antioksidannya semakin rendah.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa pH pelarut buffer fosfat, suhu pemanasan, dan interaksi keduanya memberikan pengaruh yang nyata terhadap penghambatan MDA. Gambar 4 menunjukkan pengaruh pH terhadap absorbansi MDA.



Gambar 4. Pengaruh pH pelarut terhadap absorbansi MDA pigmen *Oscillatoria*. Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($p>0,05$)

Nilai absorbansi malonaldehid pigmen *Oscillatoria* pada pelarut pH 6, pH 7, dan pH 8 berturut-turut 0,71; 0,74; 0,75. Pada analisis penghambatan MDA ini, terlihat bahwa pigmen *Oscillatoria* kurang stabil terhadap perubahan pH buffer fosfat sebagai pelarutnya. Pigmen ini menghambat pembentukan MDA terbaik dengan menggunakan pH netral, dan berkurang aktivitas penghambatannya ketika pH pelarut menjadi asam maupun basa. Sedangkan pengaruh suhu pemanasan terhadap absorbansi MDA dapat dilihat pada Gambar 5.

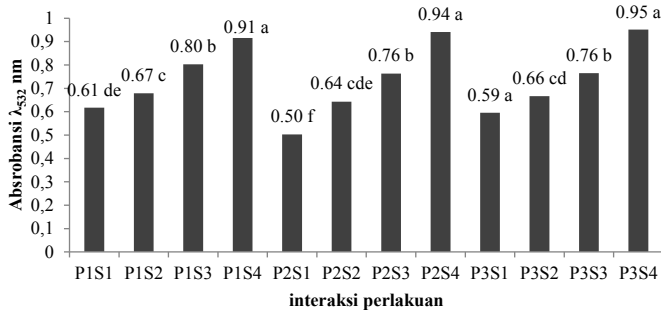


Gambar 5. Pengaruh suhu pemanasan terhadap absorbansi peroksida pigmen *Oscillatoria*. Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($p>0,05$)

Pigmen *Oscillatoria* tanpa pemanasan (suhu 28°C) memberikan aktivitas penghambatan yang lebih baik dibandingkan dengan pigmen yang mengalami pemanasan.

Seiring dengan meningkatnya suhu, maka aktivitas penghambatan MDA semakin menurun. Penurunan aktivitas tersebut dapat dilihat dengan semakin naiknya absorbansi MDA. Hasil ini menunjukkan bahwa pigmen *Oscillatoria* tidak stabil pada suhu tinggi.

Interaksi perlakuan pH dan suhu menunjukkan hasil yang sangat nyata terhadap absorbansi MDA. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 6. Interaksi perlakuan yang mampu menghambat pembentukan malonaldehid dengan nilai absorbansi terkecil dihasilkan oleh pH 7 tanpa pemanasan (28°C) yaitu P1S1. Hasil analisis pengaruh pH, suhu, dan interaksi keduanya terhadap absorbansi MDA cenderung hampir sama dengan hasil nilai absorbansi peroksida. Hal ini disebabkan karena MDA merupakan salah satu produk oksidasi sekunder hasil dekomposisi hidropoksida sebagai salah satu produk oksidasi primer (Shahidi dan Wanasundara, 1997).



Keterangan.
 P1S1 = pH 6 + tidak dipanaskan P2S1 = pH 7 + tidak dipanaskan P3S1 = pH 8 + tidak dipanaskan
 P1S2 = pH 6 + dipanaskan 40°C P2S2 = pH 7 + dipanaskan 40°C P3S2 = pH 8 + dipanaskan 40°C
 P1S3 = pH 6 + dipanaskan 70°C P2S3 = pH 7 + dipanaskan 70°C P3S3 = pH 8 + dipanaskan 70°C
 P1S4 = pH 6 + dipanaskan 100°C P2S4 = pH 7 + dipanaskan 100°C P3S4 = pH 8 + dipanaskan 100°C

Gambar 6. Pengaruh interaksi perlakuan pH dan suhu terhadap absorbansi MDA pigmen *Oscillatoria*. Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($p > 0,05$)

Suatu senyawa dikatakan memiliki sifat antioksidan bila senyawa tersebut mampu mendonasikan satu atau lebih elektron kepada senyawa prooksidan, kemudian mengubah senyawa oksidan menjadi senyawa yang lebih stabil. Antioksidan mampu menunda, memperlambat atau menghambat reaksi oksidasi pada makanan atau obat yang dapat mengakibatkan ketengikan (*rancidity*) pada makanan maupun kerusakan (degradasi) pada obat (Pokorni dkk., 2001). Dalam sistem linoleat-tiosianat ini, sebagai sumber radikal adalah asam linoleat yang merupakan asam lemak tak jenuh.

Penelitian beberapa ahli mendapatkan bahwa jenis *Cyanobacteria* atau alga hijau biru memiliki kandungan pigmen fikobiliprotein yang mampu berfungsi sebagai antioksidan. Romay dkk. (2006) menyatakann pigmen *C-phycoyanin* dari alga hijau biru memiliki kandungan

antioksidan dan anti inflamasi. Kemampuan menghambat radikal hidroksi dihasilkan dari pigmen *Spirulina platensis*.

Pengukuran aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan menghitung absorbansi peroksida dan malonaldehid hasil oksidasi lipid (Fennema, 1996). Fardiaz dkk. (1986) mengatakan bahwa oksigen dapat mengoksidasi asam linoleat membentuk malonaldehid yang merupakan indikasi adanya oksidasi lemak. Di samping itu, asam linoleat yang mengalami kerusakan akan menghasilkan senyawa-senyawa peroksida yang sangat reaktif dan bersifat sebagai radikal bebas. Penambahan antioksidan dalam emulsi dapat menyebabkan oksidasi asam linoleat terhenti pada tahap terminasi.

KESIMPULAN

Pigmen *Oscillatoria* memiliki aktivitas antioksidan yang ditunjukkan dengan kemampuannya menghambat pembentukan peroksida dan malonaldehid. Aktivitas antioksidan pigmen *Oscillatoria* stabil pada pH netral (pH 7) dan suhu ruang (28°C), tetapi aktivitas antioksidannya cenderung berkurang saat pH larutan berubah menjadi asam maupun basa dan suhu yang semakin meningkat dari suhu ruang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti berterima kasih kepada DP2M DIKTI yang telah membiayai penelitian ini melalui program hibah Penelitian Fundamental Tahun Anggaran 2011.

DAFTAR PUSTAKA

Benedetti, S., Franscesca, B., Silvia, P., Sonia, F., Stefano dan Franco, C. (2004). Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green algae *Aphanizomenon flos-aquae*. *Journal of Life Sciences* **75**: 2353-2362.

Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F. dan Nokihara, K. (1996). Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptides isolated from digests of a soybean protein. *Journal of Agriculture Food Chemistry* **44**: 2619.

Fardiaz, D., Apriyantono, A., Yasni, S., Budiyanto, S. dan Puspitasari, N.L. (1986). *Penuntun Praktikum Analisa Pangan*. Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Fennema, O.R. (1996). *Food Chemistry*. Springer-Verlag, Berlin.

- Gaman, P.M. dan Sherington, K.B. (1992). *Ilmu Pangan: Pengantar Ilmu Pangan, Nutrisi, dan Mikrobiologi*. Gardjito, M. (Penerjemah) dan Kasmidjo, R.B. (Penyunting). Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Glazer, A.N. (1994). Phycobiliproteins a family of valuable, widely used for fluorophores. *Journal of Applied Phycology* **6**: 105-112.
- Irmouli, A.V.G., Pons, L., Lucon, M., Villaume, C., Mrabet, N.T., Gueant, J.L. dan Fleurence, J. (2000). One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmate* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal Chromatography B* **739**: 117-123.
- Karseno, Kazuo, H., Takeshi, B., Susilaningsih, D., Aparat, M., Tomoaki, Y. dan Kazuma, H. (2009). Extracellular phycoerythrin-like protein released by freshwater cyanobacteria *Oscillatoria* and *Scytonema* sp. *Biotechnol Letter* **31**: 999-1003.
- Kikuzaki, H. dan Nakatani (1993). Antioxidant effect of some ginger constituent. *Journal of Food Science* **58**: 1407-1410.
- Kochhar, S.P. dan Rossel, J.B. (1990). Detection, estimation and evaluation of antioxidant in food systems. *Dalam: Hudson, B.J.F. (ed). Food Antioxidant*, hal 19-64. Elsevier Applied Science, London and New York.
- Lestario, L.N., Hastuti, P., Raharjo, S. dan Tranggono (2005). Sifat antioksidatif ekstrak buah duwet (*Syzygium cumini*). *Agritech* **25**(1): 24-31.
- Li-Chen, Wu. (2005). Antioxidant and antiproliferative activities of *Spirulina* and *Chlorella* water extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 4207-4212.
- Mulyaningsih, T.I. (2010). *Kajian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Enzimatis Rumput Laut Coklat Sargassum duplicatum*. Skripsi. Fakultas Pertanian. Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto. (Tidak Dipublikasikan).
- Nawar, W. (1996). Lipids. *Dalam: Fennema, O.R., Karel, M., Sanderson, G.W., Tannenbaum, S.R., Walstra, P. dan Whitaker, J.R. (ed). Food Chemistry*, hal 279-288. Marcel Dekker Inc., New York.
- Othman, A., Ismail, A., Ghani, N.A. dan Adenan, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry* **100**: 1523-1530.
- Pokorny, J. dan Korczak, J. (2001). Preparation of natural antioxidant. *Dalam: Gordon, M. (ed.). Antioxidant in Food*. CRC Press. New York, Washington DC.
- Prihantini, N.B., Wisnu W., Dian H., Arya W., Yuni A. dan Ronny, R. (2008). Biodiversitas Cyanobacteria dari beberapa situ/danau di kawasan Jakarta-Depok-Bogor Indonesia. *Jurnal Makara Sains* **12**(1): 44-54.
- Romay, Ch., Armesto, J., Ramirez, D., Gonzalez, R., Ledon, N. dan Garcia, I. (2006). Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae. *Journal of Pharmacology Department* **47**(1) : 36-41.
- Romay, Ch., Gonzalez, R., Ledon, N., Ramirez, D. dan Rimbau, V. (2003). C-Phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Journal Current Protein and People Science* **4**: 207-216.
- Shahidi, F. dan Wanasundara, U.N. (1997). Measurement of lipid oxidation and evaluation of antioxidant activity. *Dalam: Shahidi, F. (ed), Natural Antioxidant: Chemistry, Health and Application*. AOCS Press Champaign, Illionis.
- Singh, S., Kate, B.N. dan Banerjee, U.C. (2005). Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Critical Review Biotechnology* **25**: 73-95.
- Steel, R.G.D. dan Torrie, J.H. (1995). *Principle and Procedure of Statistic. A Biometrical Approach*. 2nd edition. McGraw Hill Book Co., New York.
- Tannin, T. (2005). Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga *Porphyridium* sp. *Journal Applied Phycology* **17**: 215-222.
- Zakaria, F.R. (1996). Sintesis senyawa radikal dan elektrofil dalam dan oleh komponen pangan. *Prosiding Seminar Senyawa Radikal dan Sistem Pangan: Reaksi Biomolekuler, Dampak terhadap Kesehatan dan Penangkalannya*, 4 April, Jakarta.