

Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Metanol dan Pigmen Kasar *Spirulina* sp.

Ervia Yudiati*, Sri Sedjati, Sunarsih dan Rani Agustian

Marine Station Laboratory, Teluk Awur Jepara, Jurusan Ilmu Kelautan, FPIK
Universitas Diponegoro, Semarang.
Telp 0291 599194, Hp.081326228096, email:eyudiati@gmail.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengukur aktivitas antioksidan dan menguji toksisitas ketiga ekstrak. Penelitian dilakukan secara laboratoris. Ekstrak Kasar *Spirulina* sp didapatkan melalui proses maserasi dengan pelarut methanol. Ekstrak pigmen kasar diperoleh melalui partisi dengan pelarut methanol/aseton serta eter. Aktivitas antioksidan dilakukan dengan mengukur IC_{50} dengan metode spektrofotometri dengan DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) sedangkan kadar toksisitas dilakukan dengan menghitung LC_{50} dengan uji BSLT (Brine Shrimp Lethality Test). Kromatografi Kolom Terbuka dilakukan untuk mengisolasi pigmen sedangkan identifikasi pigmen dilakukan dengan teknik Kromatografi Lapis Tipis dan metode spektroskopi. Data dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar metanol, ekstrak pigmen kasar methanol/aseton dan eter mempunyai nilai IC_{50} 323,7; 51 dan 34,85 ppm. Nilai LC_{50} dari ekstrak methanol r, ekstrak kasar pigmen methanol/aseton dan eter berturut-turut adalah 113,20; 65,22 ppm dan 34,11 ppm. Hasil isolasi pigmen dan identifikasi pigmen menunjukkan bahwa pigmen mengandung β -karoten dan klorofil α . Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ketiga ekstrak positif mengandung senyawa golongan flavonoid dan sterol. Ekstrak pigmen kasar *Spirulina* sp. selain mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi juga mempunyai toksisitas yang tinggi terhadap nauplii *Artemia* sp.

Kata kunci: *Spirulina* sp, ekstrak metanol, ekstrak kasar pigmen, IC_{50} , LC_{50} .

Abstract

The aims of this research were to determine the antioxidant activities and level of toxicity of those three extracts. *Spirulina* sp crude extract has obtained by maseration technique with methanol solution while crude pigment extract has collected by partition technique with methanol/acetone and ether solution. The laboratory experiments of antioxidant activities (IC_{50}) was determine by DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and spectrophotometrical methods while the level of toxicity was done by BSLT (Brine Shrimp Lethality Test). The pigment was isolated using the Couloumb Chromatography Methods while pigment identification was done by Thin Layer Chromatography Methods and confirmed spectrophotometrically. The data was analized descriptively. The results showed that IC_{50} of methanol extract, crude pigment methanol/acetone and ether were 323.7; 51 and 34.85 ppm, respectively. Furthermore, the toxicity level LC_{50} of methanol extract, crude pigment methanol/acetone and ether were 113.20; 65.22 and 34.11 ppm respectively. β -carotene and chlorophyll α was identified and isolated. Those three extract contains flavonoid and sterol. It is concluded that crude pigment extract of *Spirulina* sp. has a high antioxidant activity as well as toxicity to the nauplii of *Artemia* sp.

Key words: *Spirulina* sp., methanol extract, crude pigment extract, IC_{50} , LC_{50} .

Pendahuluan

Spirulina sp. adalah mikroalga bersel tunggal termasuk golongan cyanobacterium mikroskopik berfilamen. *Spirulina* sp. memiliki lebar spiral antara 26-36 μ m dan panjang spiralnya antara 43-57 μ m. Terdapat sejarah yang panjang dalam penggunaan

sebagai makanan bahkan dilaporkan sejak zaman Aztec. *Spirulina* merupakan biomassa yang dikeringkan dari *Arthrospira platensis*, suatu bakteri yang dapat berfotosintesis dan ditemukan di seluruh dunia baik pada air tawar maupun air laut. *Spirulina* dapat berkoloni pada lingkungan yang ekstrim yang tidak cocok untuk organisme lain.

Penelusuran bahan hayati dan potensinya sebagai obat saat ini merupakan upaya yang terus menerus dilakukan. Sampai saat ini telah dilakukan skrining terhadap sekitar 15.000 produk bahan hayati laut untuk aktivitas biologis dan 45 diantaranya telah dilakukan potensinya sebagai bahan obat bahkan telah dilakukan uji preklinis maupun klinis (Milledge, 2007). Hanya dua macam yang berhasil terdaftar sebagai obat. Salah satunya adalah yang berasal dari jenis siput laut (Milledge, 2011) dan tidak ada satupun yang berasal dari mikroalga (Wijffels, 2007). Sampai tahun 1980an, hampir semua kegiatan laboratoris difokuskan pada makroalga (Borowitzka, 1995). *Spirulina* sp. dapat menghasilkan berbagai senyawa bioaktif yang bernilai tinggi. Species mikroalga ini kaya akan protein, asam lemak esensial seperti γ Linoleic Acid, vitamin, mineral serta pigmen baik β -karoten dan khlorofil α maupun fikosianin (Spolaore et al., 2006; Henrikson, 2009).

Arlyza (2005) dan Mohammad (2007) melaporkan keberhasilannya dalam ekstraksi pigmen Phycocyanin, salah satu pigmen dari *Spirulina platensis* yang merupakan pewarna alami dan mempunyai aktivitas antioksidan tinggi. Mikroalga *Porphyridium* dan *Rhodella* juga kaya akan phycobiliprotein (Becker, 1994; Singh et al., 2006; Raja et al., 2008). Phycobiliprotein sudah banyak digunakan pada penelitian-penelitian imunologi karena kaya akan bahan fluoresens (Spolaore et al., 2006; Raja et al., 2008). Ekstrak pigmen karotenoid lutein dari mikroalga *Chlorella pyrenoidosa* dilaporkan mempunyai aktivitas antioksidan serupa (Kusmiati et al., 2010) dan berkaitan dengan peristiwa katarak pada mata. Informasi tentang aktivitas antioksidan β karoten dan khlorofil α pada makroalga *Euचेuma cottonii* telah dilaporkan oleh Merdekawati & Susanto (2010). Penelitian terkait peningkatan produksi β karoten pada mikroalga *Dunaliella* dan astaxanthin dari *Haematococcus* dengan sistem outdoor (Del Campo et al., 2007) telah pula dilaporkan. Informasi tentang kandungan β karoten dan khlorofil α serta aktivitasnya pada *Spirulina* sp. khususnya belum banyak ditemukan sehingga penelitian ini perlu dilakukan.

Materi dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Budidaya Laut (*Marine Culture Laboratory*), Marine Station Teluk Awur, Jepara. Materi yang digunakan adalah *Spirulina* sp powder produksi PT. Trans Pangan Spirulindo. Nauplii *Artemia* sp didapatkan dengan cara menetasakan kista *Artemia*. Kista *Artemia* sp yang dipakai diproduksi oleh Globe Brand Inve (Thailand) LTD Packed for PT. Pangan Lestari. Penelitian dilaksanakan pada bulan September sampai November 2011.

Ekstraksi dilakukan secara maserasi dengan menggunakan pelarut methanol PA kemudian dikeringkan dengan rotary evaporator. Sebagian ekstrak methanol dilakukan partisi dengan menggunakan pelarut methanol:aseton PA dengan perbandingan 7: 3 (v/v). Ekstrak eter didapatkan dengan melakukan partisi ekstrak methanol/aseton dengan pelarut dietil eter PA, kemudian dikeringkan. Setelah terpisah, dilakukan isolasi ekstrak dengan metode Kromatografi Kolom Terbuka. Fase diam yang digunakan adalah silica gel sedangkan fase geraknya menggunakan pelarut n-heksana: dietil eter: aseton dengan perbandingan 6:3:2 (v/v/v). Saat elusi berlangsung, pita warna kuning (β -karoten) dan hijau kebiruan (khlorofil α) yang muncul ditampung dalam vial.

Ketiga ekstrak selanjutnya diidentifikasi dengan metode Kromatografi Lapis Tipis dengan silica gel sebagai fase diam. Fase gerak yg digunakan adalah n-hexan:dietil eter;aseton dengan perbandingan 3:2:1 (v/v/v). Ekstrak pigmen kering ditotolkan pada pelat KLT menggunakan pipa kapiler dan dihitung nilai Rfnya. Selain nilai Rf, spektrofotometer digunakan untuk melihat hasil serapan maksimal yang dihasilkan pada panjang gelombang tertentu.

IC₅₀ adalah parameter yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan. Metode yang digunakan adalah spektrofotometri dengan reagen DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (Banerjee et al., 2005) yang mempunyai kemampuan sebagai penangkal radikal bebas atau pendonor hydrogen (Panovska, 2005). Pengujian dilakukan dengan mengambil sejumlah sampel sesuai dengan deret konsentrasi yang diinginkan kemudian ditambah dengan reagen DPPH 0,1 mM. Inkubasi pada sampel tersebut dilakukan pada suhu ruang selama 30 menit. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis dengan melihat nilai serapannya pada panjang gelombang 517 nm. Kurva IC₅₀ dibuat dengan nilai % penghambatan sebagai sumbu Y dan seri konsentrasi sebagai sumbu X.

Uji toksisitas dilakukan dengan uji BSLT (Ghisalberti, 1993). Pengujian dilakukan dengan menentukan deret konsentrasi terlebih dahulu. Setelah itu, sepuluh ekor nauplii *Artemia* sp dimasukkan pada masing-masing sampel di setiap serial konsentrasi dan dipaparkan pada suhu ruang selama 24 jam. Persentase kematian didapatkan dengan cara menghitung mortalitas nauplii *Artemia* sp yang terjadi setelah dilakukan pemaparan pada ketiga ekstrak. Kurva LC₅₀ dibuat dengan nilai % penghambatan sebagai sumbu Y dan seri konsentrasi sebagai sumbu X. *Brine Shrimp Lethality Test* merupakan suatu pengujian dan suatu preskrining awal untuk menentukan apakah suatu senyawa

Tabel 1. Nilai IC₅₀ dan LC₅₀ ekstrak metanol, ekstrak kasar pigmen methanol/aseton dan ekstrak kasar eter pada mikroalga *Spirulina* sp.

Jenis Ekstrak	Nilai IC50(ppm)	Nilai LC 50(ppm)
Ekstrak methanol	323.70	113.20
Ekstrak kasar pigmen methanol/aseton	51.0	65.22
Ekstrak kasar pigmen eter	34.85	34.11

mempunyai kandungan bioaktif. Nauplii *Artemia* sp yang baru menetas identik dengan sel kanker.

Uji fitokimia dilakukan sesuai metode dari Arifin *et al.* (2006) dan Nobakht *et al.* (2010) Adapun golongan senyawa yang diujikan adalah alkaloid, flavonoid, steroid dan terpenoid. Uji alkaloid dilakukan dengan mereaksikan ekstrak methanol dengan reagen Mayer dan Wagner. Senyawa positif apabila terbentuk endapan berwarna segera setelah diteteskan kedua macam reagen. Uji flavonoid dilakukan dengan cara penambahan pita Magnesium pada ekstrak metanol. Reaksi positif apabila terbentuk warna kemerahan. Uji steroid dilakukan dengan pemberian chloroform 1 ml dan 1 ml H₂SO₄ pekat pada masing-masing ekstrak. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya filtrat berwarna hijau kekuningan yang berpendar. Penambahan dengan 2 ml asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat dilakukan untuk menguji ada tidaknya kandungan senyawa golongan terpenoid. Apabila positif, maka akan terbentuk cincin berwarna hijau biru. Semua data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif.

Hasil dan Pembahasan

Aktivitas antioksidan yang diekspresikan dengan nilai IC₅₀ menunjukkan bahwa ekstrak metanol mempunyai nilai yang jauh lebih besar apabila dibandingkan dengan ekstrak kasar pigmen. Nilai IC₅₀ ekstrak pigmen methanol/aseton lebih rendah dan ekstrak pigmen eter mempunyai nilai terendah (Tabel 1). Semakin kecil nilai IC₅₀ semakin besar aktivitas antioksidannya (Atoui *et al.*, 2005). IC₅₀ ekstrak kasar tertinggi karena methanol yang digunakan sebagai pelarut merupakan pelarut universal dan akan mengambil semua senyawa baik polar, non polar maupun semi polar (Harbone, 1994 dalam Fathiyawati, 2008). Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi pigmen mampu memecah ikatan kompleks protein-klorofil, ikatan non kovalen dan mengekstraksi pigmen secara kuantitatif (Gross, 1991).

Hasil isolasi melalui Kromatografi Kolom menunjukkan bahwa pigmen *Spirulina* sp mengandung β-karoten dan klorofil α sesuai dengan laporan Henrikson (2009). Pada fraksinasi terlihat bahwa β-karoten membentuk lapis tunggal berwarna

merah kekuningan sedangkan klorofil α membentuk lapis tunggal berwarna hijau kebiruan (Merdekawati & Susanto, 2011). Analisa spektroskopi juga mengkonfirmasi hal tersebut. Serapan terbesar β-karoten dihasilkan pada panjang gelombang 453,3 nm sedangkan serapan klorofil α dihasilkan pada panjang gelombang 663 nm. Hal ini sesuai penelitian yang dilakukan oleh Jeffrey (1977).

Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis juga menguatkan adanya total tunggal dari kedua senyawa pigmen tersebut. Gross (1991) melaporkan bahwa pigmen betakaroten berwarna kuning merah, sehingga dapat diasumsikan bahwa total 1 merupakan betakaroten. Penelitian Britton *et al.* (1995) dengan fase gerak non polar diperoleh nilai Rf 0,8 – 1,0 sesuai dengan penelitian ini (Rf=0,84). Warna hijau kebiruan pada spot B diduga merupakan klorofil α. Hasil penelitian yang dilakukan Wang *et al.* (1995) dengan fase gerak yang sama menunjukkan klorofil α mempunyai kisaran nilai Rf 0,40. Nilai tersebut tidak jauh berbeda dengan penelitian ini yaitu 0,41.

β-karoten dan klorofil α merupakan antioksidan. Antioksidan adalah senyawa yang dapat meredam dampak negatif dari oksidan yang berupa kerusakan asam lemak, DNA dan protein. β-karoten dapat memodulasi sistem imun dengan meningkatkan limfosit B dalam peredaran darah sehingga meningkatkan aktifitas sel NK dan TNF-α (Ravi, 2010). Selain itu, β-karoten juga bekerja sinergis dengan vitamin C dan vitamin E. Sifat-sifat tersebut membuat β-karoten dapat melindungi tubuh dan dapat mencegah berbagai penyakit, menghambat pertumbuhan sel kanker, mencegah serangan jantung, katarak, mengobati penyakit kulit, meningkatkan fungsi kekebalan tubuh dan lain-lain (Silalahi, 2006). Menurut penelitian dari Karkos *et al.*, 2008 efek antioksidan dari *Spirulina* mampu menghambat peroksidasi lemak lebih signifikan (65%) dibandingkan dengan antioksidan kimia seperti tofkoferol (35%) dan BHA (45%).

Aktivitas antioksidan pada klorofil dapat disebabkan beberapa hal. Klorofil mampu menangkap oksigen singlet dan melakukan resonansi maupun vibrasi untuk membuang energi yang berlebihan ke lingkungan (Yanishlieva, 2003). Mekanisme ini didukung oleh struktur utama klorofil,

yaitu tetrapireol yang merupakan struktur-ena terkonjugasi. Struktur ini menyebabkan energi menjadi stabil, terutama melalui resonansi dalam struktur orbital pi yang overlap (Lee et al., 2002). Klorofil juga dimungkinkan mampu menangkap radikal bebas karena klorofil termasuk senyawa yang lipofilik (Burrati et al., 2001)

Uji fitokimia menunjukkan bahwa ketiga ekstrak positif mengandung senyawa flavonoid dan sterol. Flavonoid merupakan senyawa antioksidan tersier dan umum terdapat dalam pigmen tumbuhan (Poeloengan et al., 2006). Senyawa golongan flavonoid bersifat multifungsional karena dapat bereaksi sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengkelat logam dan peredam terbentuknya singlet oksigen (Trilaksani, 2003). Studi oleh Cos et al. (2001) dan Gulcin et al. (2004) mendukung dan memperkuat pernyataan yang sama. Aktivitas penghambatan radikal bebas pada mikroalga ini hampir sama dengan ekstrak batang tumbuhan rempah *Kneuma laurina* yaitu 39,72 ppm (Praptiwi et al., 2006). Terbukti bahwa senyawa pigmen pada *Spirulina sp.* mampu berfungsi sebagai reduktor pada proses oksidasi

Uji toksisitas BSLT yang diekspresikan dengan nilai LC_{50} menunjukkan bahwa ekstrak metanol mempunyai nilai yang lebih besar apabila dibandingkan dengan ekstrak kasar pigmen. Nilai LC_{50} ekstrak methanol tertinggi diikuti dengan ekstrak kasar pigmen methanol/aseton dan eter mempunyai nilai terendah (Tabel 1). Meyer et al., (1982) menyatakan bahwa tingkat toksisitas dari suatu ekstrak dapat ditentukan dengan melihat harga LC_{50} nya. Metode BSLT dipilih karena metode ini mudah dikerjakan, murah, cepat dan cukup akurat serta mampu memprediksi aktivitas *cytotoxicity* dan *pesticidal* (Ghisalberti, 1993). Suatu ekstrak dianggap toksik bila memiliki nilai $LC_{50} < 1000$ ppm, dan senyawa dianggap toksik bila memiliki nilai $LC_{50} \leq 30$ ppm. Tingkat toksisitas tersebut akan memberi makna terhadap potensi aktivitasnya sebagai antitumor. Semakin kecil harga LC_{50} semakin toksik suatu senyawa. Belay (2002) dan Ravi (2010) menyatakan bahwa *Spirulina sp.* merupakan suplemen makanan manusia yang bermutu dan mempunyai efek terapi. Hasil menunjukkan bahwa pigmen eter memberikan makna terhadap potensi aktivitasnya sebagai antitumor.

Kesimpulan

Aktivitas antioksidan dan toksisitas ekstrak kasar *Spirulina sp.* memperoleh nilai yang tertinggi diikuti dengan ekstrak methanol/aseton dan ekstrak eter memberikan nilai terendah.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dapat terlaksana dengan bantuan dana Hibah Penelitian Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan dengan no kontrak 1966Y/UN7.3.10/AK/2011 untuk itu penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Ir. Suryono, M.Sc., Drs. Heryoso Setiyono, M.Si. Kurnarso ST, M.Si. dan Aziz Rifai, ST, M.Si atas dukungannya serta Ir. Yulina Sri Wulandari, M.Si. atas sumbangan informasinya Terima kasih kami ucapkan pula kepada segenap Teknisi, Karyawan dan Satpam Marine Station Teluk Awur, Jepara yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu.

Daftar Pustaka

- Arlyza, I.S., 2005. Ekstraksi Pigmen Biru Phycocyanin dari Mikroalga *Spirulina platensis*. *Oceanologi dan Limnologi Indonesia*, 38: 79-92
- Arifin, H., N. Anggraini, D. Handayani, & R. Roslinda. 2006. Standarisasi Ekstrak Etanol Daun *Eugenia cumini* Merr. *J. Sains Tek. Far.*, 11(2): 88-93
- Becker, E.W. 1994. *Microalgae. Biotechnology and Microbiology*: Cambridge University Press., ISBN 978-0-521-06113
- Britton, G., S. Liaaen-Jensen, & H. Pfander. 1995. *Carotenoids: Isolation and Analysis*. Birkhauser Verlag, Basel, Boston. Berlin, 328 pp.
- Belay, A. 2002. The Potential Application of *Spirulina* (Arthrospira) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management. *JANA*, 5(2): 27-48
- Banerjee, A., N. Dasgupta, & B. De. 2005. In Vitro Study of Antioxidant Activity of *Syzygium cumini* Fruit. *J. Food Chemistry*, 90: 727-733.
- Borowitzka, M.A. 1995. Microalgae as Sources of Pharmaceuticals and other Biologically Active Compounds. *J. Appl. Phycol.*, 7:3-15
- Burrati, S., N. Pellegrini, O.V. Brenna, & S. Mannino. 2001. Rapid electrochemical method for the evaluation of the antioxidant power of some lipophilic food extract. *J. Agriculture and Food Chemistry*, 49: 5136-5141
- Cos, P., M. Calomme, J.B. Sindambiwe, T.D. Bruyne, K. Cimanga, L. Pieters, A.J. Vlietink, & D.V. Berghe, 2001. Cytotoxicity and Lipid Peroxidation-Inhibiting Activity of flavonoids. *Planta Med.*, 67:1072-1076

- Del Campo J.A., M. Garzia-Gonzales, & M.G. Guorrero. 2007. Outdoor Cultivation of Microalgae for Carotenoid Production : Current State and Perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74 : 1163-1174
- Fathiyawati, 2008. Uji Toksisitas Ekstrak daun *Ficus racemosa* L. terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. Fakultas Farmasi UMS. Surakarta. Tesis, (tidak dipublikasikan).
- Gross, J. 1991. Pigment in Vegetables. Van Nastrand Reinhold, New York, 351pp.
- Gulcin, I., M.T. Uguz, M. Oktay, S. Beydemir, & O.I. Kruevioglu. 2004. Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial activities of Clary Sage (*Salvia sclarea* L.), *Turk. J. Agric. For.*, 28:25-33
- Ghisalberti, E.L., 1993. "Detection and Isolation of Bioactive Natural Products", Bioactive Natural Products; Detection, Isolation, and Structural Determination, Ed. Steven M. Collegate and Russell J. Molyneux, CRC Press Inc, London. 605 pp.
- Karkos, P.D., S.C. Leong, C.D. Karkos, N. Sivaji, & D.A. Assimakopoulos. 2008. Spirulina in Clinical Practise: Evidence-Based Huan Applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 4:20-11
- Kusmiati, N.W.S. Agustini, S.R. Tamat, & I. Mellia. 2010. Ekstraksi dan Purifikasi Senyawa Luthein dari Mikroalga *Chlorella pyreniodosa* Galur Lokal Ink. *J. Kimia Indonesia*, 5(1): 30-34
- Lee, M., L. Lee, S. Lee, K. Park, & E. Choe. 2002. Spinach (*Spinacea olecea*) powder as a natural food-grade antioxidant in deep fat dried products. *J. Agriculture and Food Chemistry*, 50: 5664-5669
- Mohammad, J. 2007. Produksi dan Karakterisasi Biopigmen Fikosianin dari Spirulina fusiformis serta Aplikasinya Sebagai Pewarna Minuman. Program Studi Teknologi Hasil Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Thesis (tidak dipublikasikan)
- Merdekawati, W. & A. Susanto. 2011. Pigmen rumput Laut: Kajian dan Pemanfaatannya. Dalam: Susanto, AB. (Ed.). Prosiding Seminar Nasional Aplikasi Pemanfaatan Rumput Laut dan Bahan Hayati Laut dalam Bidang Pangan dan Energi. Semarang 29 Januari 2011. Yayasan Rumput laut Indonesia Semarang, Indonesia. Hal.122-132
- Meyer, B. N., N.R. Ferrigni, J.E. Putman, L.B. Jacobsen, D.E. Nicols, & J.L. McLaughlin. 1982. Brine Shrimp : A Convenient general Bioassay For Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45:31-34
- Milledge, J.J., 2011. Commercial Application of Microalgae other than as biofuels : A Brief Review. *Re. Environ. Sci. Biotechnol.*, 10 : 31-41
- Nobakht, G.M., M.A. Kadir, & J. Stanslas. 2010. Analysis of preliminary phytochemical screening of Typhonium flagelliforme. *African .J. Biotechnology*, 9:1655-1657.
- Ravi, M., S.L. De, S. Azharuddin , S.F.D. Paul. 2010. The beneficial effects of *Spirulina* focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. *Nutrition and Dietary Supplements*, 2:73-83.
- Poeloengan, M., Chairul, I. Komala, S. Salmah, & M.N. Susan. 2010. Aktivitas antibakteri dan fitokimia dari beberapa jenis tanaman obat. Dalam: Sani, Y., L. Natalia, B. Brahmantyo, W. Puastuti, T. Sartika, Nurhayati, A. Anggraini, R.H. Matondang, E. Martindah, S.E. Estuningsih. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 13-14 Agustus 2009. Hal 300-305.
- Praptiwi, P. Dewi, M. Harapini. 2006. Nilai peroksida dan anti radikal bebas diphenyl pycryl hidrazil hidrate DPPH ekstrak methanol *Knema laurina*. *Majalah Farmasi Indonesia*, (17)1: 32-36.
- Raja, R., S. Hemaiswarya, K.N. Ashok, S. Shridar, & R. Rengasamy. 2008. A Perspective on Biotechnological Potential of Microalgae. *Crit. Rev. Microbiol.*, 34:34-77
- Silalahi, J. 2006. Makanan Fungsional. Kanisius, Yogyakarta. 175 hal.
- Singh, S., K.N. Bhushan, & U.C. Banerjee. 2005. Bioactive Compounds from Cyanobacteria and Microalgae: An Overview. *Critical Review Biotechnology*, 24(3): 73-95
- Spolaore P., C. Joannis-Cassan, E. Duran, A. Isambet. 2006. Commercial Application of Microalgae. *J. Biosci. Bioeng.*, 101(2):87-96
- Suryaningrum, D.T., T. Wikanta, & H. Kristiana. 2006. Uji Aktivitas antioksidan dari senyawa rumput laut *Halymenia harveyana* dan *Euचेuma cottonii*. *J. Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 1: 51-63

Wang, B., Z. Yu, & L.S. Hwang. 1995. Quantitative Analysis of Chlorophylls and their derivatives by thin layer chromatography. *J. Chinese Agricultural Chemical Society*, 33(5): 550-560

Wijffels, R.H., 2007. Potential of Sponges and Microalgae for Marine Biotechnology. *Trends Biotechnol*, 26(1): 26-31

Yanishlieva, N.V. 2003. Inhibiting Antioxidant. *In: Pokorny, J., N. Yanishlieva., & M. Gordon (Eds.) Antioxidant in Food*. Woodhead Publishing Limited, North America, pp. 22-27.