

1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Rumput laut memiliki spesies melimpah yang dimanfaatkan untuk bahan pangan dan bahan olahan pangan (alginat, karagenan, agar, pigmen), kesehatan (memiliki aktivitas antivirus, antioksidan, anti-inflamasi), pertanian, bahan kertas, kosmetik, dan juga bahan bakar (De Jesus Raposo *et al.*, 2015; Zemke-White & Ohno, 1999; McHugh, 2003). Masyarakat di berbagai negara seperti China, Jepang, Korea, Amerika, Afrika Selatan, Irlandia, Perancis, dan Kanada serta negara-negara lain banyak mengonsumsi rumput laut (McHugh, 2003). Rumput laut mudah ditemukan pada pesisir pantai hingga kedalaman 150 m dan biasa terkena sinar ultraviolet (UV) (Pangestuti *et al.*, 2018).

Rumput laut dibedakan menjadi tiga menurut pigmentasinya yaitu rumput laut coklat, rumput laut merah dan rumput laut hijau. Rumput laut coklat kaya akan karotenoid dan fukosantin, rumput laut hijau didominasi oleh klorofil a dan b dan rumput laut merah mengandung banyak fikobiliprotein (Dumay & Morançais, 2016). Perbedaan pigmen ini merupakan bentuk adaptasi terhadap cahaya yang digunakan untuk fotosintesis dengan klorofil, karotenoid, dan fikobiliprotein sebagai pigmen-pigmen utama dalam rumput laut (Dumay & Morançais, 2016). Selain pigmentasinya, kandungan nutrisi seperti polisakarida dan protein yang terkandung juga beragam (De Jesus Raposo *et al.*, 2015; Robic *et al.*, 2009, Peng *et al.*, 2015, Fleurence *et al.*, 2018).

Pigmen dapat dimanfaatkan menjadi pewarna makanan alami, bahan tambahan pangan dan memiliki efek kesehatan (Cao *et al.*, 2016; Mysliwa-Kurdziel & Solymosi, 2016). Salah satu pigmen utama dalam rumput laut berupa fikobiliprotein. Fikobiliprotein mampu digunakan sebagai pewarna makanan dan kosmetik (Sonani *et al.*, 2016) serta memiliki aktivitas antioksidan, anti-inflamasi, mengurangi *osteoarthritis*, antikanker, mengurangi kerusakan hati, melindungi ginjal dan manfaat lain (Mysliwa-Kurdziel & Solymosi, 2016).

Fikobiliprotein dapat diekstrak dengan menggunakan air atau pelarut non-organik karena sifatnya yang larut air (Dumay & Morançais, 2016). Penelitian *review* yang membahas mengenai pigmentasi pada rumput laut merah, yaitu fikobiliprotein, masih relatif terbatas dibandingkan pigmen rumput laut coklat dan rumput laut hijau. Beberapa *review* sudah dilakukan oleh Li *et al.*, (2019), Kannaujiya *et al.*, (2017), Sekar & Chandramohan (2008), dan Estela *et al.*, (2017) tetapi masih belum berfokus pada rumput laut merah serta belum

mendalam dalam hal ekstraksi dan purifikasi. Oleh karenanya, penelitian ini melakukan *review* mengenai ekstraksi dan purifikasi fikobiliprotein pada rumput laut merah serta parameter yang mempengaruhi *yield* dan indeks purifikasinya serta potensinya sebagai bahan pangan.

1.2. Tinjauan Pustaka

1.2.1. Rumput Laut

Alga diklasifikasikan menjadi *Cyanophyta*, *Prochlorophyta*, *Phaeophyta*, *Chlorophyta*, *Charophyta*, *Euglenophyta*, *Chrysophyta*, *Pyrophyta*, *Cryptophyta*, dan *Rhodophyta* (Sahoo & Seckbach, 2015). Alga juga dibagi menjadi makro dan mikro, berdasarkan ukuran fisiknya. Rumput laut termasuk ke dalam golongan makroalga karena ukurannya yang cukup besar.

Rumput laut dibedakan menjadi tiga menurut pigmentasinya yaitu rumput laut coklat, rumput laut merah dan rumput laut hijau. Rumput laut coklat (*Phaeophyta*) kaya akan karotenoid dan fukosantin, memiliki ukuran besar mencapai 20 meter & tebal, ukuran sedang berkisar 2-4 meter & berbentuk seperti kulit (*leather-like*), dan berukuran kecil sekitar 30-60 cm (Dumay & Moranças, 2016; Qin, 2018). Rumput laut merah (*Rhodophyta*) mengandung banyak fikobiliprotein yang terdiri dari fikoeritrin, fikosianin, dan alofikosianin, tidak selalu berwarna merah (terkadang berwarna merah kecoklatan dan ungu) dan memiliki panjang beberapa cm hingga satu meter (Dumay & Moranças, 2016; Qin, 2018). Rumput laut hijau (*Chlorophyta*) didominasi oleh klorofil a dan b, memiliki ukuran yang lebih kecil dari rumput laut merah. Selain pigmentasinya dan ukurannya, terdapat perbedaan pada cadangan makanan, struktur penyusun dinding sel, asal usulnya, dan hal-hal lain (Sahoo & Seckbach, 2015).

Rumput laut bisa didapatkan dari alam secara natural/liar maupun budidaya (Qin, 2018). Pemanenan rumput laut dilakukan secara tradisional dengan tangan di pesisir pantai, sedangkan budidaya biasa dilakukan di negara-negara maju seperti negara di benua Eropa (Kadam *et al.*, 2015). Beberapa spesies rumput laut yang sering dimanfaatkan adalah *Laminaria saccharina*, *Sargassum*, *Macrocystis angustifolia*, *Kappaphycus alvarezii*, *Euclima denticulatum*, *Gelidium amansii*, *Ulva conglobata*, *Monostroma latissimum*, dan lain-lain (Qin, 2018).

1.2.1.1. Rumput Laut Merah

Rumput laut merah (*Rhodophyta*) memiliki variasi spesies yang luas dan memiliki fungsi sebagai bahan makanan (*edible-seaweed*) seperti *Porphyra* (*nori* atau *laver*), *Palmaria palmata* (*dulse* atau *dillisk*), *Chondrus crispus*, *Gigartina* dan *Euclima*, *Gelidium* dan *Gracilaria* yang

merupakan bahan pembuat gel (O'Connor, 2017). *Rhodophyta* berwarna merah karena didominasi dengan pigmen R-fikoeritrin (R-PE) dan R-fikosianin (R-PC) yang mampu menutupi pigmen klorofil (Sahoo & Seckbach, 2015).



Gambar 1. *Palmaria palmata* (Mouritsen, 2013)



Gambar 2. *Gracilaria* sp. (Mouritsen, 2013)

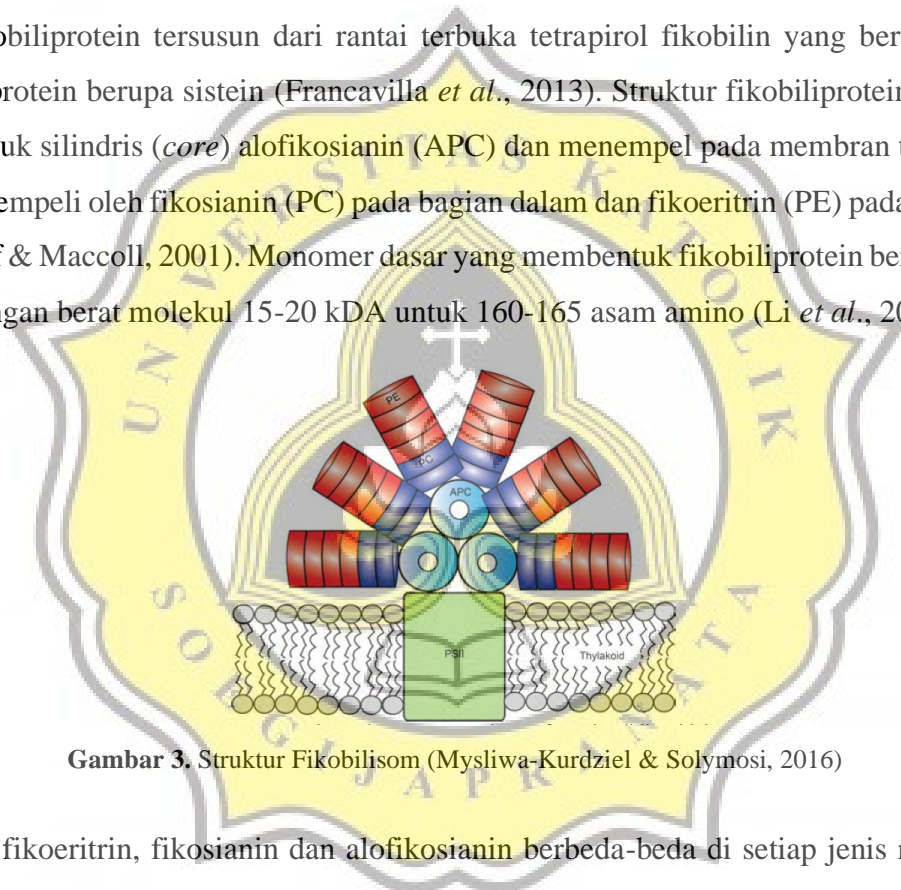
Ekstrak polisakarida pada rumput laut merah berupa agar dan karagenan sering dimanfaatkan untuk pengolahan pangan dan protein yang terkandung lebih tinggi dibandingkan rumput laut hijau dan rumput laut coklat dengan kandungan 10-47% dari berat keringnya (Peng *et al.*, 2015, Fleurence *et al.*, 2018, Pangestuti & Kim, 2015). Kandungan protein ini terdiri kelompok protein berpendar (*fluorescent*) seperti fikobiliprotein dan protein tidak berpendar seperti *ribulose biphosphate carboxylase*, *ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase*, dan lain-lain (Vicente *et al.*, 2019). Dinding sel rumput laut merah disusun oleh selulosa, xilan atau fibril mannan, pektin, dan polisulfat ester (Mittal & Raghavarao, 2018; Gómez-Ordóñez *et al.*, 2010; Sahoo & Seckbach, 2015) dan memiliki cadangan polisakarida berupa pati floridean, florisida, manogliserat, dan galaktan seperti karagenan dan agar (Sahoo & Seckbach, 2015).

Dalam pertumbuhannya, rumput laut merah lebih mudah ditemukan karena mampu hidup dan berkembang biak di air tawar dan air laut serta mampu berada di berbagai kondisi perairan, baik perairan dingin di Kanada, hangat di Maroko & Portugal, dan tropis di Indonesia & Filipina tetapi rumput laut merah lebih dominan hidup di perairan hangat dan tropis (McHugh, 2003; Sahoo & Seckbach, 2015; Fleurence & Levine, 2016). Rumput laut merah juga mampu hidup di kedalaman yang beragam karena memiliki pigmen seperti klorofil a dan fikobiliprotein yang membantu beradaptasi (Fleurence & Levine, 2016). Fikobiliprotein merupakan antena dalam melakukan fotosintesis yang tersusun menjadi fikobilisom yang

memiliki rentang penyerapan cahaya nyata (*visible range*) 400-700 nm (Sahoo & Seckbach, 2015; Green, 2019).

1.2.1.2. Fikobiliprotein

Fikobiliprotein merupakan protein yang mampu berpendar (*fluorescent*) (Vicente *et al.*, 2019) yang berperan sebagai pigmen utama dalam rumput laut merah. Kombinasi pigmen dan protein membentuk molekul makro yang efektif dalam menyerap dan memindahkan cahaya (Green, 2019). Fikobiliprotein efektif disaat penyerapan cahaya pada klorofil cukup rendah, sehingga mekanisme ini memungkinkan rumput laut merah hidup di kedalaman (Samsonoff & Maccoll, 2001). Fikobiliprotein tersusun dari rantai terbuka tetrapirrol fikobilin yang bersatu dengan residu apoprotein berupa sistein (Francavilla *et al.*, 2013). Struktur fikobiliprotein terdiri dari inti berbentuk silindris (*core*) alofikosianin (APC) dan menempel pada membran tilakoid. Inti tersebut ditempeli oleh fikosianin (PC) pada bagian dalam dan fikoeritrin (PE) pada bagian luar (Samsonoff & Maccoll, 2001). Monomer dasar yang membentuk fikobiliprotein berupa subunit α dan β dengan berat molekul 15-20 kDA untuk 160-165 asam amino (Li *et al.*, 2019).



Gambar 3. Struktur Fikobilisom (Mysliwa-Kurdziel & Solymosi, 2016)

Komposisi fikoeritrin, fikosianin dan alofikosianin berbeda-beda di setiap jenis rumput laut. Rata-rata C-fikosianin dan R-fikosianin selalu ada di cyanobacteria sedangkan di alga merah masih dipelajari hingga saat ini (Glazer, 1977). Sedangkan, fikoeritrin baik R-fikoeritrin atau B-fikoeritrin memiliki komposisi lebih besar dari pada dengan fikosianin (PC) dan alofikosianin (APC) (Nguyen *et al.*, 2016; Glazer, 1977). Ini juga terlihat dari struktur fikobilisom. Fikoeritrin tersusun dari tiga sub-unit yang berbeda dengan struktur yang paling umum berupa $(\alpha\beta)6\gamma$ (Nguyen *et al.*, 2016). Alofikosianin merupakan komponen yang paling efisien dalam menyerap cahaya sehingga konsentrasinya cukup rendah (Lemasson *et al.*, 1973).

1.2.2. Metode Ekstraksi

Ekstraksi fikobiliprotein dilakukan dengan dua tahap utama yaitu tahap pemisahan fikobiliprotein dari sel dan tahap isolasi. Pemisahan fikobiliprotein dilakukan dengan penghancuran sel dan menghasilkan ekstrak kasar, dilanjutkan dengan tahap isolasi atau purifikasi untuk memisahkan komponen fikobiliprotein sehingga memiliki indeks kemurnian yang lebih tinggi (Kannaujiya et al., 2017; Mysliwa-Kurdziel & Solymosi, 2016). Metode yang digunakan harus sesuai dengan bahan baku dan senyawa yang akan diekstrak. Kondisi pelarut, suhu, tekanan dan pH juga harus diatur untuk mendapatkan hasil yang optimal dengan *yield* dan indeks purifikasi yang baik (Michalak & Chojnacka, 2014). Kombinasi dari berbagai metode baik fisik maupun kimia dapat meningkatkan efisiensi ekstraksi (Kannaujiya et al., 2017; Li et al., 2019).

1.2.2.1. Perlakuan Pendahuluan (*Pre-treatment*)

Tahap pendahuluan (*pre-treatment*) merupakan tahap persiapan ekstraksi, terdiri dari tahap pembersihan dan tahap penghancuran sel (Michalak & Chojnacka, 2014). Tahap pembersihan dilakukan dengan pencucian untuk menghilangkan kotoran dan garam (Kadam et al., 2015). Tahap pengeringan dan penghancuran sel rumput laut dilakukan untuk mendapat sampel yang lebih homogen dan memperluas permukaan sampel (Kadam, Tiwari, & O'Donnell, 2013). Terdapat dua cara pengeringan yaitu *lyophilization/freeze-drying* dan pengeringan suhu rendah untuk menghindari kerusakan akan senyawa yang tidak tahan panas (Kadam et al., 2015).

Penghancuran sel dapat dilakukan secara mekanis atau non-mekanis, seperti penumbukan manual atau *blender* hingga menjadi bubuk kemudian diayak agar mendapatkan ukuran partikel yang seragam, presipitasi, penumbukan dengan nitrogen cair, homogenisasi bertekanan tinggi, ultrasonik, gelombang mikro, *freeze-thawing* berulang, penggunaan enzim, *osmotic shock*, *autoclaving* (Mysliwa-Kurdziel & Solymosi, 2016; Sekar & Chandramohan, 2008; Juin et al., 2015; Kadam et al., 2013). Semakin banyak sel yang rusak semakin tinggi *yield* dari fikobiliprotein yang diekstrak (Yu et al., 2017; Li et al., 2019). Apabila tidak dilakukan secara tepat juga dapat merusak struktur fikobiliprotein (Yu et al., 2017; Li et al., 2019).

Freezing-thawing dilakukan berulang untuk meningkatkan kerusakan sel sehingga hasil lebih maksimal (Sekar & Chandramohan, 2008). Sampel dibekukan di suhu -20°C selama beberapa jam dan *thawing* di suhu 4°C atau suhu ruang (Li et al., 2019) dengan demikian dinding

permeabel sel akan rusak dan komponen yang ada di dalamnya dapat keluar (Calcott & Macleod, 1975). Metode *freezing-thawing* memiliki banyak keunggulan dalam menghasilkan kemurnian yang lebih tinggi, menghasilkan lebih banyak, dan cepat (Kannaujiya *et al.*, 2017).

1.2.2.2. Metode Ekstraksi Konvensional

Fikobiliprotein diekstraksi dengan cara yang mudah dan sederhana, yaitu perendaman di dalam air (Nguyen *et al.*, 2016). Metode konvensional biasa dijadikan metode ekstraksi senyawa bioaktif karena tidak membutuhkan biaya yang berlebih. Terdapat beberapa kekurangan metode konvensional, yaitu waktu proses yang lebih lama, dilakukan secara manual, penggunaan solven yang cukup banyak dan terjadi degradasi sehingga menghasilkan *yield* yang cukup rendah dengan indeks purifikasi yang rendah pula (Dumay & Morançais, 2016; Michalak & Chojnacka, 2014).

Metode ini dilakukan dengan maserasi dengan larutan *buffer* atau *aqueous extraction* (Kadam *et al.*, 2013). Pada ekstraksi protein, ukuran sampel lebih baik dibuat kecil agar mempermudah kontak antara protein dengan solven. Selain itu, dibutuhkan waktu perendaman selama beberapa menit (20 menit) hingga berhari-hari pada suhu rendah (4°C), kondisi gelap dan kondisi atmosfer terkontrol serta menggunakan larutan *buffer* (fosfat, asam sitrat, Tris-HCl) guna mengurangi kerusakan fikobiliprotein (Dumay & Morançais, 2016).

Menurut ulasan yang ditulis oleh Dumay & Morançais (2016), *sodium phosphate* (5–100 mM, pH 6.5–7.4) dan *acetate buffer* (0.1 M, pH 5.5) merupakan larutan *buffer* yang biasa digunakan untuk ekstraksi. Larutan alkali (*alkali extraction*) bisa digunakan, tetapi hasil yang didapat tidak lebih dari 20% dari total protein (Dumay & Morançais, 2016). Namun, beberapa peneliti juga menggunakan air biasa (*tap water*), air laut dan air distilasi dikarenakan karakteristik fikobiliprotein yang larut air.

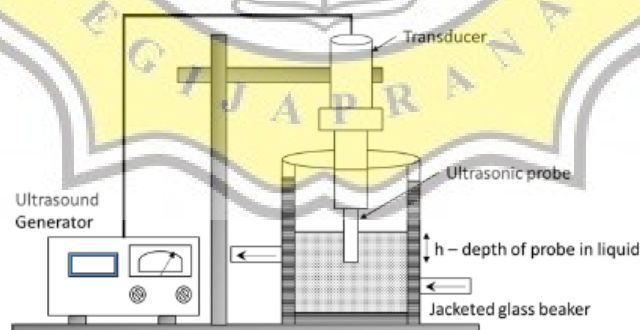
Dalam penggunaannya, larutan *buffer* tidak dapat meningkatkan hasil ekstraksi tetapi mampu melindungi komponen dari variasi pH (Dumay & Morançais, 2016). Ada faktor-faktor lain seperti rasio pelarut dan waktu maserasi yang menghasilkan *yield* yang berbeda. Barbarino & Lourenço, (2005) menyebutkan bahwa dengan penggunaan pelarut terbanyak serta waktu perendaman terlama akan menghasilkan protein lebih banyak.

1.2.2.3. Metode Ekstraksi Non-Konvensional

Metode ini memiliki biaya yang rendah, tetapi tetap memiliki efisiensi yang tinggi, waktu yang lebih singkat dan ramah lingkungan. Michalak & Chojnacka (2014) menyatakan beberapa metode ekstraksi senyawa bioaktif seperti *Supercritical Fluid Extraction* (SFE), *Microwave Assisted Extraction* (MAE), *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE), *Enzyme Assisted Extraction* (EAE), *Pressurized Liquid Extraction* (PLE), *Enhanced Solvent Extraction* (ESE), dan *High-Pressure Solvent Extraction* (HPSE). Pada ekstraksi fikobiliprotein, hanya *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) dan *Enzyme Assisted Extraction* (EAE) saja yang banyak digunakan.

1.2.2.3.1. *Ultrasound-assisted Extraction* (UAE)

Ultrasonik merupakan metode ekstraksi dengan prinsip pemberian tekanan lebih pada fluida sel. Mekanismenya berupa perpindahan gelombang suara berubah menjadi gelombang mekanik yang mampu merusak sel dan dinding sel (Chemat *et al.*, 2016). Gelombang mekanik ini berfrekuensi di atas 20-50 kHz dan bermigrasi pada berbagai medium (padat, cair dan gas) dengan waktu yang menyesuaikan kompleksitas dinding sel (Kadam *et al.*, 2013; Kannaujiya *et al.*, 2017). Metode ini memiliki keunggulan berupa biaya yang rendah, sederhana, waktu yang lebih cepat, *yield* yang lebih tinggi, aman untuk senyawa yang tidak tahan panas dan lebih efektif dibandingkan dengan ekstraksi secara konvensional. Selain itu bisa digunakan dalam skala laboratorium maupun skala besar (Kadam *et al.*, 2013; Kannaujiya *et al.*, 2017).



Gambar 4. Skema *Ultrasound-assisted Extraction* (Kadam *et al.*, 2013)

1.2.2.3.2. *Enzyme-assisted Extraction* (EAE)

Metode ekstraksi dengan penggunaan enzim mampu memecah dinding sel yang memiliki keragaman struktur dan komponen kimia yang cukup tinggi. Wijesinghe & Jeon (2013) menyebutkan bahwa penghilangan atau degradasi polisakarida pada dinding sel merupakan

langkah dasar untuk mempermudah ekstraksi senyawa bioaktif. Beberapa enzim yang biasa digunakan pada industri pangan antara lain selulase, hemiselulase, pektinase dan enzim-enzim hidrolitik yang berguna untuk menghidrolisis ikatan interaktif pada dinding sel yang membantu dekomposisi struktural dinding sel (Wijesinghe & Jeon, 2013).

Ekstraksi dengan enzim dilakukan dengan menginkubasi rumput laut pada larutan *buffer* atau air yang terdeionisasi kemudian dilakukan penambahan enzim serta pengadukan terus menerus di dalam ruang gelap dan suhu terkontrol (Dumay & Morançais, 2016) sehingga enzim hidrolitik mampu memecah dinding sel serta komponen penyimpanan bagian dalam sel yang kompleks (contohnya laminarin) untuk dapat melepaskan komponen di dalamnya (Wijesinghe & Jeon, 2013). Dalam prosesnya, suhu dan pH penting untuk dikendalikan karena dapat mempengaruhi stabilitas protein dan sensitivitas enzim (Dumay & Morançais, 2016). Beberapa enzim menjadi tidak sensitif bahkan dapat merusak komponen volatil yang diekstrak bila kondisi tidak dikendalikan (Dumay & Morançais, 2016). Parameter lain seperti perbandingan enzim dengan sampel, waktu inkubasi, dan ukuran partikel dapat diteliti secara eksperimental untuk menghasilkan hasil yang optimal karena perbedaan karakteristik bahan (Wijesinghe & Jeon, 2013). Ekstraksi ini memiliki keunggulan mampu menghasilkan komponen sesuai dengan yang diharapkan, aman, ramah lingkungan, tidak beracun, menghasilkan *yield* yang tinggi dengan kemurnian yang baik, dan dapat dilakukan dalam skala besar, tetapi membutuhkan biaya yang besar untuk membeli enzim (Michalak & Chojnacka, 2014).

1.2.2.4. Metode Kuantifikasi

Metode kuantifikasi diperlukan untuk menghitung banyak fikobiliprotein yang didapatkan. Beberapa persamaan yang biasa digunakan dari Bennet & Borogad (1973), Kursar *et al.* (1983), Beer & Eshel (1985) dan Sampath-Wiley & Neefus (2007) yang diulas oleh Dumay & Morançais (2016). Persamaan tersebut diaplikasikan sesuai dengan nilai absorbansi yang didapat dari spektrofotometri UV-Vis. Absorbansi fikobiliprotein didapat pada kisaran panjang gelombang 250 nm hingga 700 nm dengan satu atau dua batasan maksimal, tergantung pada komponennya (Gu *et al.*, 2018). Fikoeritrin (PE) memiliki absorbansi pada rentang panjang gelombang antara 498 dan 565 nm, sedangkan PC dan APC memiliki absorbansi pada rentang panjang gelombang antara 555 dan 670 nm (Dumay & Morançais, 2016). Komponen ini juga dapat terabsorpsi dengan emisi *fluorescence* dalam rentang 575 nm (PE) dan 640 nm (PC, APC, PEC) (Dumay & Morançais, 2016). Absorbansi yang didapatkan dari spektrofotometer mampu menunjukkan jumlah dari pigmen yang terkandung.

Persamaan-persamaan yang biasa digunakan:

- Persamaan Bennet dan Borogad (Bennett & Bogobad, 1973) akan menyatakan hasil dengan satuan mg/mL. Berikut adalah persamaan perhitungannya:

$$APC = (OD_{652} - 0,208 (OD_{615}))/5,09$$

$$R-PC = (OD_{615} - 0,474 (OD_{652}))/5,34$$

$$R-PE = (ODA_{562} - 2.41(PC) - 0.849(APC))/9,62$$

- Persamaan yang dijelaskan oleh Kursar *et al.* (1983) dengan satuan hasil $\mu\text{g/mL}$.

Persamaan perhitungannya:

$$APC = 181.3 A_{651} - 22.3 A_{614}$$

$$PC = 151.1 A_{614} - 99.1 A_{651}$$

$$PE = 155.8 A_{498.5} - 40 A_{614} - 10.5 A_{651}$$

- Persamaan Beer dan Eshel (Beer & Eshel, 1985) lebih sering digunakan oleh peneliti lain dalam penelitian rumput laut merah. Hasil yang dinyatakan melalui persamaan dengan satuan mg/ml (J Dumay & Morançais, 2016). Namun persamaan ini hanya digunakan pada fikoeritrin (PE) dan fikosianin (PC), berikut persamaannya:

$$PE = [(A_{564} - A_{592}) - (A_{455} - A_{592}) 0.20] \cdot 0.12$$

$$PC = [(A_{618} - A_{645}) - (A_{592} - A_{645}) 0.51] \cdot 0.15$$

- Persamaan dari Sampath-Wiley (Sampath-Wiley & Neefus, 2007) tergolong persamaan yang baru digunakan. Hasil yang dihasilkan berupa mg/mL dan hanya menghitung fikoeritrin (R-PE) dan fikosianin (R-PC) pada rumput laut merah secara spesifik (J Dumay & Morançais, 2016). Berikut persamaannya:

$$R-PC = 0.154 (A_{618} - A_{730})$$

$$R-PE = 0.1247 (A_{564} - A_{730}) - 0.4583 (A_{618} - A_{730})$$

Selain *yield*, ada parameter lain berupa indeks purifikasi. Indeks purifikasi menunjukkan tingkat kemurnian produk, semakin tinggi angka kemurnian semakin sedikit kontaminasi dari senyawa lain (Nguyen *et al.*, 2019; Gu *et al.*, 2018). Identifikasi indeks purifikasi juga dilakukan dengan spektrofotometri (UV-Vis). A_{565}/A_{280} merupakan absorbansi pada panjang gelombang 565 nm dan 280 nm yang rasionya dianggap sebagai indeks kemurnian fikoeritrin (Liu *et al.*, 2005). Sementara, A_{620}/A_{280} untuk fikosianin dan A_{650}/A_{280} untuk alofikosianin (Senthilkumar *et al.*, 2013).

1.2.3. Metode Purifikasi

Tahapan purifikasi dibutuhkan sebagai metode lanjutan karena pada ekstrak kasar kandungan fikobiliprotein belum cukup spesifik sehingga dibutuhkan metode purifikasi untuk memurnikan pigmen. Beberapa metode purifikasi yang dapat dilakukan seperti penggunaan amonium sulfat dan kromatografi (*gel filtration, ion exchange, expanded bed adsorption, hydroxyapatite, hydrophobic interaction, anion exchange* dan lainnya) (Sonani *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2019).

1.2.3.1. Presipitasi

Presipitasi merupakan metode pemisahan protein dengan komponen lain dengan cara menambahkan garam, solven organik/organik polimer atau dengan mengubah pH/suhu dari larutan (Janson, 2011). Beberapa pelarut yang biasa digunakan menurut Janson (2011) ada pada Tabel 1.

Tabel 1. Bahan Mengendapkan Protein (Janson, 2011)

Bahan	Tipe	Sifat
Ammonium Sulfate	Garam	Mudah larut, stabil
Sodium Sulfate	Garam	
Etanol	Solven	Mudah terbakar, berisiko terdenaturasi
Aseton	Solven	Mudah terbakar, berisiko terdenaturasi
Polietilen Glikol (PEG)	Polimer	Tidak bermuatan, tidak mudah terbakar

Menurut Burgess (2009) dan Li *et al.* (2019), amonium sulfat merupakan bahan yang paling sering digunakan. Pada proses purifikasi, dibutuhkan proses yang cepat, tidak merusak, mudah diukur dan tidak memerlukan biaya yang tinggi serta mampu melindungi dari denaturasi protein akibat enzim protease (Burgess, 2009). Amonium sulfat memiliki karakteristik mudah terlarut, tidak mahal, mudah didapatkan, serta memiliki massa jenis dari larutan jenuh (4.1M) pada suhu 25°C ($r \frac{1}{4} 1.235\text{g/cm}^3$), dan tidak setinggi bahan lain seperti potasium fosfat (3M, $r \frac{1}{4} 1.33\text{g/cm}^3$) (Burgess, 2009).

Li *et al.* (2019) juga menyatakan amonium sulfat sering dipakai pada purifikasi dengan cara presipitasi dan sentrifugasi. Metode ini mampu melepaskan sebagian besar kotoran. Hal ini dikarenakan amonium sulfat dapat merusak stabilitas struktur koloid dari permukaan protein

(Burgess, 2009). Langkah pertama pada metode ini adalah presipitasi dengan penambahan amonium sulfat 20-30% (w/v) untuk menghilangkan kotoran dilanjutkan dengan sentrifugasi (Li *et al.*, 2019). Sentrifugasi secara rutin untuk memulihkan komponen yang sudah terpresipitasi dan memisahkan dua fase larutan (Janson, 2011). Kemudian presipitasi dilakukan lagi dengan penambahan amonium sulfat 60-70% (w/v) untuk mengendapkan fikobiliprotein dari supernatan hasil sentrifugasi (Li *et al.*, 2019).

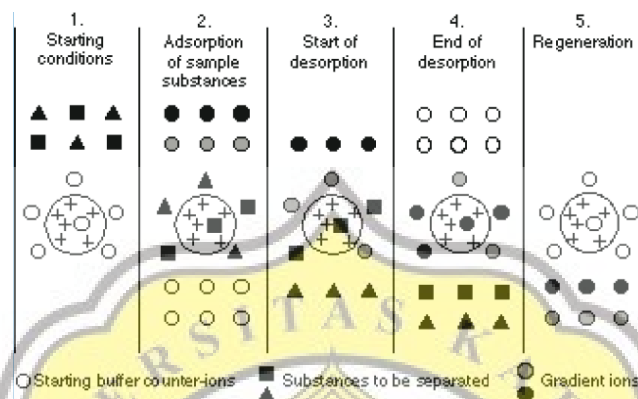
Beberapa faktor yang mempengaruhi jalannya proses presipitasi yaitu pH, suhu, konsentrasi solven dan protein serta beberapa hal yang lain (Janson, 2011). Perubahan pH mampu mempengaruhi kelarutan protein karena protein memiliki tingkat kelarutan terendah pada titik isoelektriknya (Janson, 2011). Sedangkan pengaruh suhu terhadap purifikasi adalah mampu menyebabkan denaturasi protein, oleh sebab itu dibutuhkan suhu yang rendah dalam prosesnya (Janson, 2011).

1.2.3.2. Ion-exchange Chromatography

Menurut Yu *et al.*, (2017), kromatografi merupakan metode purifikasi yang sangat efektif dan mudah diperbesar ke skala industri. *Ion-exchange chromatography* merupakan metode yang paling sering digunakan dengan prinsip dasar separasi larutan berdasarkan perbedaan interaksi gaya elektrostatis dari muatan larutan dengan solven yang digunakan atau gradien dari kekuatan ionik (Yu *et al.*, 2017). Pemisahan dengan *ion exchange chromatography* tergantung pada adsorpsi dua arah dari molekul terlarut yang bermuatan untuk menghentikan perubahan ion dari muatan yang berlawanan (Upssala Pharmacia Biotech, 1982). Setiap protein dapat dimurnikan dengan elusi yang berbeda, tergantung pada titik isoelektriknya. Titik isoelektrik berperan sebagai pengubah pH elusi. Pada saat pH berada dekat pada titik isoelektrik, interaksi dari protein dan gel akan menurun dan dapat terlarut dengan elutan (Liu *et al.*, 2005).

Biasanya penggunaan *ion exchange* dilakukan dengan lima tahapan. Tahap pertama adalah tahap kesetimbangan, saat alat (*ion exchanger*) siap memulai dengan pH dan kekuatan ionik yang ditentukan serta mampu mengikat molekul terlarut yang diinginkan. Komponen penukar yang digunakan sebagai ion yang berlawanan (*counter ion*) biasanya berupa anion atau kation sederhana seperti sodium dan klorit (Upssala Pharmacia Biotech, 1982). Tahapan ini dilanjutkan dengan aplikasi dan adsorpsi bahan. Pada tahap ini, molekul terlarut membawa muatan yang mampu menggantikan *counter ion* dan saling mengikat dengan gel. Bahan yang tidak dapat mengikat akan dibilas keluar dengan menggunakan *buffer* (Upssala Pharmacia

Biotech, 1982). Kemudian, bahan yang terikat pada gel akan dikeluarkan dari kolom dengan cara mengubah kondisinya menjadi kondisi yang tidak sesuai untuk molekul terlarut, biasanya dengan menggunakan *buffer* untuk meningkatkan kekuatan ionik dan pH (Upssala Pharmacia Biotech, 1982). Selanjutnya, senyawa yang tidak terlarut dalam eksperimen akan dilepaskan dan dilanjutkan untuk memulai fase kesetimbangan yang baru agar alat dapat digunakan dalam purifikasi selanjutnya (Upssala Pharmacia Biotech, 1982).

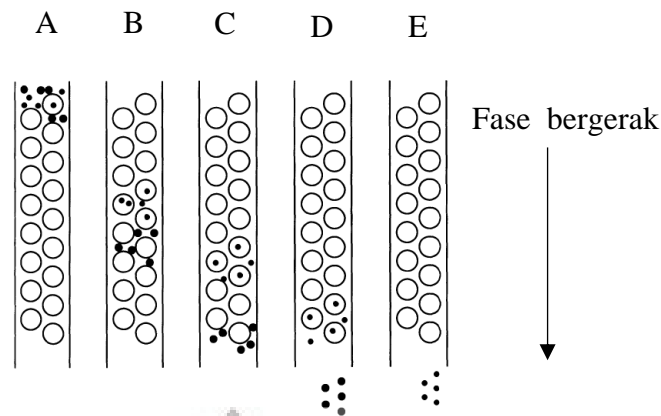


Gambar 5. Mekanisme Proses *Ion-exchange* (Upssala Pharmacia Biotech, 1982).

Dalam bukunya, Upssala Pharmacia Biotech (1982). menjelaskan bahwa pemisahan ini terjadi karena adanya perbedaan derajat interaksi oleh senyawa-senyawa terhadap *ion exchanger* dari perbedaan muatannya, densitas serta distribusi muatan pada permukaannya. Interaksi-interaksi tersebut dapat dikontrol dengan menjaga kekuatan ionik dan pH (Upssala Pharmacia Biotech, 1982). *Ion exchange chromatography* mampu memilih salah satu komponen dari komponen yang diinginkan dan membuang kontaminan atau sebaliknya (Upssala Pharmacia Biotech, 1982). Metode ini bisa juga dikombinasikan dengan metode lain seperti *size exclusion chromatography* (Yu et al., 2017).

1.2.3.3. *Size Exclusion Chromatography* (SEC)

Size exclusion chromatography atau kromatografi filtrasi gel merupakan metode yang membedakan komponen berdasarkan ukuran molekul atau volume hidrodinamik molekul (Yu et al., 2017; Mori & Barth, 1999). Prinsip dasar dari SEC (Gambar 6) adalah bahan akan dilarutkan oleh solven dan dimasukkan ke dalam kolom yang memiliki pori-pori dengan ukuran yang sudah ditentukan (Mori & Barth, 1999). Awalnya fase bergerak akan dimasukkan ke dalam kolom. Kemudian ketika bahan dilarutkan ke dalam kolom (A), molekul yang terlalu besar untuk memasuki pori-pori akan terlarut (B dan C), sedangkan molekul yang lebih kecil akan masuk ke dalam pori-pori tersebut (D) dan akan terlarut di waktu yang berbeda (E) (Mori & Barth, 1999).

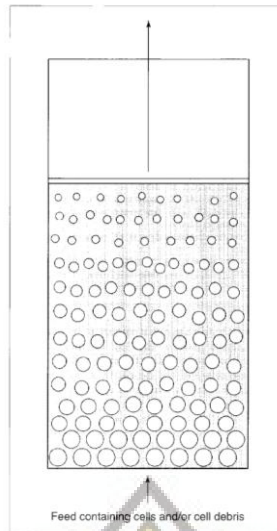


Gambar 6. Skema Size-Exclusion Chromatography (Mori & Barth, 1999)

SEC ini mampu memisahkan bahan yang memiliki ukuran antara 10^2 hingga 10^6 g/mol, sesuai dengan ukuran pori dari pembungkus (*packing*). Meskipun ukuran yang lebih besar dari 10^6 g/mol dapat dianalisis tetapi harus dilakukan dengan hati-hati demi menghindari eksklusi non-ukuran seperti polimer yang terpankaskan karena efek degradasi (*shear degradation*) atau efek konsentrasi (Mori & Barth, 1999). Pada dasarnya semua tipe sampel mampu dianalisis oleh SEC dengan syarat bahan tersebut mampu dilarutkan dan tidak ada interaksi entalpi antara sampel dengan bahan pembungkus (Mori & Barth, 1999). Namun, karena SEC merupakan metode yang relatif dan bukan absolut, kolom harus dikalibrasi terlebih dahulu dengan berat molekul bahan yang standar atau *online light scattering detector* (Mori & Barth, 1999).

1.2.3.4. Expanded Bed Adsorption Chromatography (EBAC)

Expanded bed adsorption chromatography merupakan jenis kromatografi yang sangat penting untuk menjernihkan larutan, mengkonsentrasi dan memurnikan produk yang diinginkan (terutama protein) baik dari skala laboratorium, skala pilot dan skala produksi (Hjorth, 1997). Cara kerja EBAC ini membiarkan bagian partikulat adsorben naik dari tempat awalnya dengan memberikan aliran dari bawah ke atas (*upward*) dengan demikian jarak antara partikel adsorben akan naik, sel dan pecahan sel melewati tanpa menghalangi alas (*bed*) (Hjorth, 1997). Bahan baku diaplikasikan dan dicuci pada *bed* dengan kecepatan operasi yang konstan 3000 cm/jam yang kadang bisa lebih rendah bila kekentalan produk cukup tinggi, guna mencegah ekspansi yang berlebihan (Hjorth, 1997). Dibutuhkan densitas antara 1,1-1,3 g/ml untuk mengoperasikan *expanded bed* dalam kecepatan yang pelan namun tingkat produktivitas yang tinggi.



Gambar 7. Prinsip *Expanded Bed Absorption Chromatography* (Hjorth, 1997)

Adsorben yang digunakan biasanya memiliki rentang ukuran partikel dari 50 hingga 400 μm . Rentang ukuran partikel ini memberikan desain *expanded bed* yang bertingkat sehingga semakin besar ukuran partikel adsorben akan berada pada posisi bawah, semakin kecil ukuran partikel adsorben akan berada pada posisi atas. Partikel yang lebih kecil dapat menghasilkan ekspansi berlebih (*overexpansion*) pada kecepatan aliran yang rendah dan partikel yang lebih besar membutuhkan kecepatan yang tinggi untuk memperluas alas (*bed*) secukupnya (Hjorth, 1997). Keunggulan *expanded bed* bila dibandingkan dengan *conventional fluidized bed* adalah lebih sedikitnya pencampuran kembali (*backmixing*) karena desain yang lebih baik pada kolom adsorben. Namun, diperlukan beberapa kali perlakuan untuk meminimalisir pencampuran kembali sehingga meningkatkan efisiensi proses adsorpsi (Hjorth, 1997).

1.2.4. Publikasi *Review* Sebelumnya

Beberapa peneliti sudah mengulas mengenai rumput laut, pigmen dan metode produksinya. Pada Tabel 2, dapat dilihat ada beberapa ulasan dari metode ekstraksi baik konvensional dan non-konvensional, metode purifikasi dan perlakuan pendahuluan pada senyawa bioaktif rumput laut (Michalak & Chojnacka, 2014; Kadam *et al.*, 2013) juga *review* metode ekstraksi lainnya seperti metode enzimatis dan ultrasonik (Wijesinghe & Jeon, 2013; Esclapez *et al.*, 2011). Tetapi pembahasan pada ulasan tersebut tidak spesifik pada rumput laut merah dan komponen fikobiliprotein.

Pigmentasi serta protein sudah diulas oleh Dumay & Morançais (2016). Namun ulasan tersebut tidak spesifik mengarah ke pigmen fikobiliprotein. Fikobiliprotein diulas secara rinci oleh Li

et al. (2019), Mysliwa-Kurdziel & Solymosi (2016), Sonani *et al.* (2016) dan Sekar & Chandramohan (2008), mengenai struktur, metode produksi (pendahuluan, ekstraksi dan purifikasi), manfaat dan aplikasinya serta prospek ke depan, tetapi pembahasan tersebut tidak membahas fikobiliprotein pada rumput laut merah. Sementara, *review* yang lain berfokus pada mikro alga atau *cyanophyta*.

Tabel 2. Publikasi *Review* Sebelumnya

No	Topik <i>Review</i>	Referensi
1	Metode pendahuluan, metode ekstraksi senyawa bioaktif pada alga	(Michalak & Chojnacka, 2014)
2	Metode pendahuluan, metode ekstraksi senyawa bioaktif pada alga	(Kadam <i>et al.</i> , 2013)
3	Metode ekstraksi enzimatis pada senyawa bioaktif pada alga	(Wijesinghe & Jeon, 2013)
4	Metode ekstraksi ultrasonik pada produk alami	(Esclapez <i>et al.</i> , 2011)
5	Protein dan pigmen pada rumput laut	(Dumay & Moranças, 2016)
6	Struktur, metode ekstraksi dan purifikasi, aplikasi dan prospek dari fikobiliprotein	(Li <i>et al.</i> , 2019)
7	Manfaat, metode produksi, paten dan prospek dari fikobiliprotein	(Sekar & Chandramohan, 2008)
8	Manfaat dari fikobilin dan fikobiliprotein pada industri dan kesehatan	(Mysliwa-Kurdziel & Solymosi, 2016)
9	Metode produksi, purifikasi dan aplikasi dari fikobiliprotein	(Sonani <i>et al.</i> , 2016)
10	Fikosianin dan metode purifikasi fikosianin	(Yu <i>et al.</i> , 2017)
11	Produksi dan aplikasi bioteknologi dari <i>C-Phycocyanin</i>	(Kuddus <i>et al.</i> , 2013)
12	Ekstraksi dan purifikasi dari metabolit mikro alga (lemak, <i>astaxanthin</i> dan fikobiliprotein)	(Cuellar-bermudez <i>et al.</i> , 2015)
13	Nutrisi dan efek kesehatan dari <i>Porphyra species</i>	(Cao <i>et al.</i> , 2016)

14	Komponen fotoprotektif rumput laut	(Pangestuti <i>et al.</i> , 2018)
15	Mekanisme C-Fikosianin pada rumput laut hijau sebagai Obat Anti-kanker	(Estela et al., 2017)

1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah mengulas berbagai metode ekstraksi dan purifikasi serta faktor-faktor yang mempengaruhi *yield* fikobiliprotein pada rumput laut merah dan menganalisis parameter optimal dalam proses ekstraksi dan purifikasi agar didapatkan fikobiliprotein yang maksimal serta potensi fikobiliprotein sebagai bahan pangan.

