

4. METODE PURIFIKASI DAN PENGARUHNYA TERHADAP *YIELD* SERTA INDEKS PURIFIKASI FIKOBILIPROTEIN

Tahapan purifikasi pada proses produksi fikoeritrin dan fikosianin diperlukan untuk mendapatkan produk dengan kemurnian yang lebih tinggi. Metode purifikasi yang dapat digunakan beragam, seperti presipitasi dengan amonium sulfat, dengan kromatografi penukar ion, filtrasi gel, elektroforesis, ultrafiltrasi, kromatografi adsorpsi pada hidroksiapatit (bentuk kalsium fosfat $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) dan tidak jarang dalam kombinasi (Galland-Irmouli *et al.*, 2000; Rossano *et al.*, 2003; Munier *et al.*, 2015). Moraes & Kalil (2009) juga menyatakan bahwa metode purifikasi terdiri dari tiga langkah berupa ekstraksi protein, presipitasi protein dan purifikasi dengan kromatografi. Tahap ekstraksi fikoeritrin dan fikosianin sudah dijelaskan pada Tabel 4, Tabel 5, Tabel 6 dan Tabel 7.

Indeks purifikasi mengindikasikan kandungan yang berada pada sampel setelah langkah pemurnian atau purifikasi secara keseluruhan dan dapat dihitung menggunakan spektrofotometer. Indeks purifikasi fikoeritrin (R-PE) dapat dihitung dari rasio A_{567}/A_{280} (Wang *et al.*, 2015). Sedangkan, indeks purifikasi (IP) fikosianin (R-PC) dihitung dari rasio A_{617}/A_{280} (Wang *et al.*, 2015). Kedua perhitungan tersebut dianggap baik untuk memperkirakan kemurnian. Proses purifikasi fikobiliprotein mendapatkan komponen yang lebih dominan berupa fikoeritrin dibandingkan fikosianin dan alofikosianin, seperti yang dinyatakan oleh Senthilkumar *et al.*, (2013) pada penelitian purifikasi dari *P. hornemannii*. Hal itu dapat dilihat juga pada Tabel 8 dan Tabel 9 yang menunjukkan jumlah dari kandungan yang dipurifikasi dari berbagai penelitian berbeda.

4.1. Fikoeritrin

Presipitasi dengan penggunaan amonium sulfat dapat digunakan sebagai metode pendahuluan purifikasi atau sebagai metode utama. Pada penelitian yang dilakukan Nguyen *et al.*, (2018) dilakukan metode presipitasi saja dan metode *anion exchange*. Pada metode purifikasi dengan presipitasi (0,25) menghasilkan indeks purifikasi lebih rendah dibandingkan dengan metode *anion exchange* (1,91) pada sampel *Mastocarpus stellatus*. Kedua metode tersebut tergolong berhasil meningkatkan indeks purifikasi dari ekstrak kasar tetapi belum bisa melampaui 3,2 yang dianggap sebagai kemurnian standar normal (Nguyen *et al.*, 2018). Indeks purifikasi dari ekstrak *Grateloupia turuturu* yang dihasilkan menggunakan kombinasi metode presipitasi dan *anion exchange* lebih tinggi (2,89) (Munier *et al.*, 2015). Munier *et al.*, (2015) juga

menyebutkan bahwa presipitasi dengan amonium sulfat mampu meningkatkan indeks purifikasi, tetapi juga menurunkan 30% dari kandungan fikoeritrin, tentunya hal ini akan berbeda pada spesies yang berbeda.

Amonium sulfat dengan konsentrasi 25-85% biasa digunakan tergantung spesies yang digunakan (Munier et al., 2015). Lee et al., (2017) juga menjelaskan bahwa penambahan amonium sulfat 75% pada ekstrak kasar yang diikuti sentrifugasi 15.000 g selama 15 menit mampu menghilangkan MAA dan polisakarida (Lee et al., 2017). Hal ini dibuktikan adanya puncak dari absorbansi gelombang pada ekstrak kasar yang menunjukkan keberadaan MAA tidak ditemukan kembali pada sampel yang sudah dipurifikasi (Lee et al., 2017). Sebagai tambahan pH dari larutan yang sudah dipurifikasi meningkat dari 6.5 menjadi 11 dan warnanya berubah menjadi hijau, serta puncak absorpsi fikobiliprotein tidak lagi terlihat, hal ini mengindikasikan bahwa fikobiliprotein dan klorofil a mampu diekstrak secara bersamaan oleh larutan (*water-extraction*) dari *dulse* (Lee et al., 2017).

Berdasarkan Tabel 8, hasil yang diperoleh dari metode *anion exchange* memiliki indeks purifikasi yang lebih tinggi pada tingkatan ionik dari larutan *buffer* yang digunakan (NaCl) sebesar 200 mM atau bisa disebut AE-200 (Nguyen et al., 2018). Hal itu didasarkan pada puncak yang muncul pada hasil spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 250-700 nm (Nguyen et al., 2018). Pada fraksi AE-150 tidak terlihat puncak maksimum pada 565 nm dan absorbansi pada 280 nm yang jauh lebih tinggi daripada pada 565 nm (Nguyen et al., 2018). Hal ini menunjukkan adanya sejumlah besar protein yang terkontaminasi (Nguyen et al., 2018). Sedangkan, pada fraksi AE-200 terdapat tiga absorbansi pada panjang gelombang 498 nm, 540 nm dan 565 nm serta absorbansi pada 280 nm dari fraksi ini lebih rendah daripada fraksi AE-150 dan AE-1000 (Nguyen et al., 2018). Sehingga, fraksi AE-200 mampu menghasilkan indeks purifikasi lebih baik dibandingkan AE-1000 (Nguyen et al., 2018; Munier et al., 2015).

Bukan hanya indeks purifikasi saja yang dapat diketahui dari absorbansi gelombang spektrofotometri, adanya kontaminasi fikosianin dan alofikosianin juga dapat dideteksi, masing-masing secara berturut-turut dengan mengukur rasio A_{620}/A_{565} dan A_{650}/A_{565} . Pada penelitian Munier et al., (2015) masih terdapat kontaminasi fikosianin dan alofikosianin yang ditunjukkan adanya hasil 0,04 (R-PC) dan 0,01 (APC). Fikoeritrin dinyatakan bebas dari kontaminan apabila rasio tersebut <0.001 (Liu et al., 2005). Gu et al., (2018) menjelaskan bahwa ekstrak pada puncak 1 dengan absorbansi pada panjang gelombang 280 nm lebih tinggi

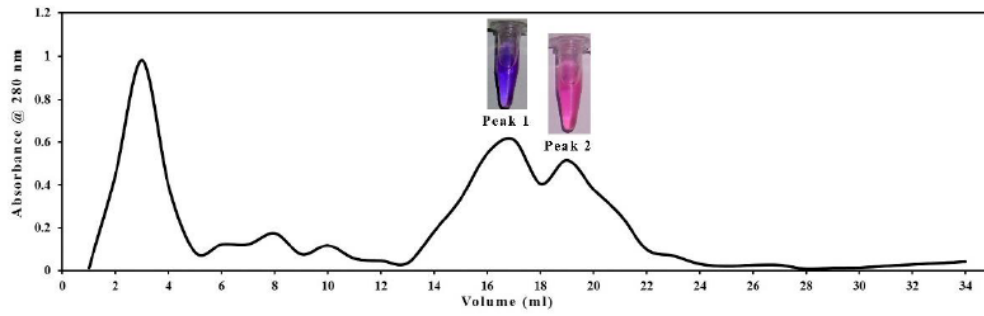
dibandingkan dengan absorbansi pada 565 nm dan 615 nm berwarna ungu muda, hal ini menunjukkan bahwa terkandung beberapa kotoran dan pigmen. Pada puncak 2 dan 3 larutan dengan absorbansi pada panjang gelombang 280 nm dan 565 nm serupa, walaupun panjang gelombang 615 masih terlihat, hal ini menunjukkan bahwa larutan berwarna ungu masih mengandung beberapa kontaminasi R-PC (Gu *et al.*, 2018). Lalu pada puncak 4, larutan dengan absorbansi pada 565 nm lebih tinggi dari pada 280 nm dan pada 615 nm tidak menunjukkan adanya penyerapan, hal ini menunjukkan bahwa larutan yang berwarna merah mengandung R-PE murni (Gu *et al.*, 2018).



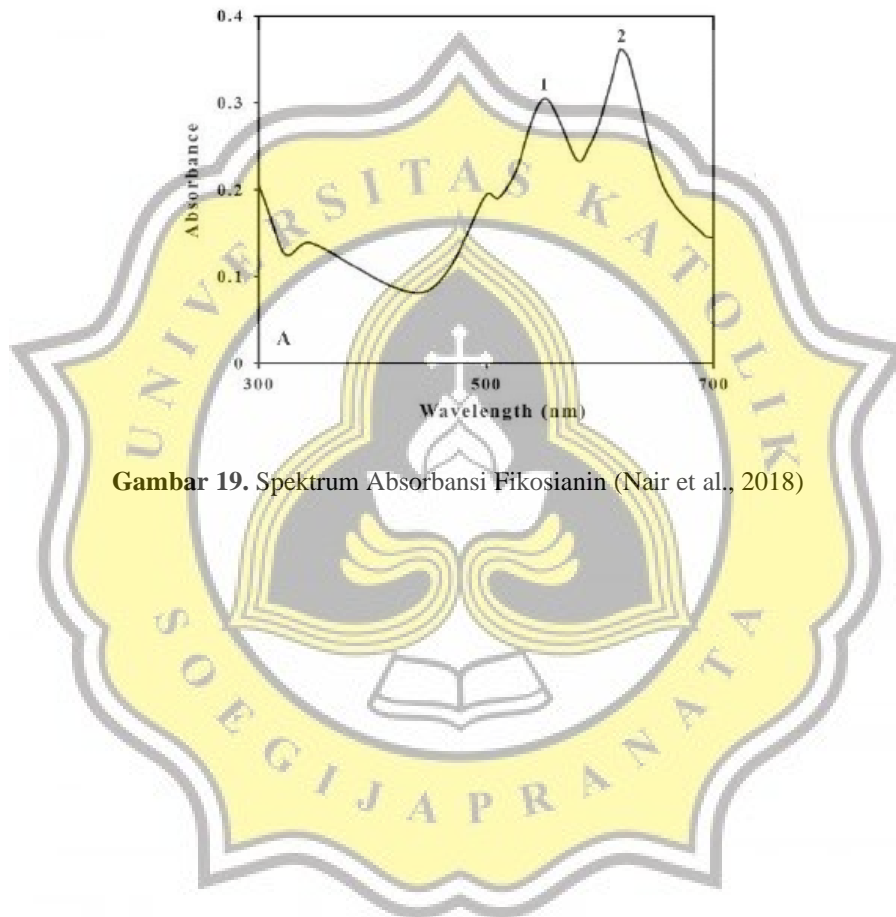
Gambar 17. Spektrum Absorbansi Fikoeritrin (Nair *et al.*, 2018)

4.2. Fikosianin

Fikosianin merupakan bagian dari fikobiliprotein yang memiliki warna kebiruan, hal ini didapatkan dengan metode *ion exchange* dengan pelarut 0,4 M NaCl yang dimasukkan ke dalam 50 mM larutan *buffer* Na-fosfat dan diukur dengan metode kromatografi seperti pada Gambar 18 (Nair *et al.*, 2018). Pada Gambar 19, ditunjukkan adanya fikosianin (R-PC) pada panjang gelombang 551 dan 617 nm (Nair *et al.*, 2018). Indeks purifikasi yang didapatkan pada penelitian ini mencapai 5,01, hal ini membuktikan bahwa fikosianin melebihi standar purifikasi fikobiliprotein pada umumnya (3,2) dan standar indeks purifikasi dapat digunakan untuk keuntungan farmasi (lebih dari 4,5) (Nguyen *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2015).



Gambar 18. Purifikasi Fikobiliprotein (Nair *et al.*, 2018)



Gambar 19. Spektrum Absorbansi Fikosianin (Nair *et al.*, 2018)

Tabel 8. Yield dan Indeks Purifikasi Fikoeritrin pada Alga Merah dengan Berbagai Metode Purifikasi

No	Spesies	Ekstrak kasar	IP	Metode 1	Keterangan	Yield	IP	Metode 2	Keterangan	Yield	IP	Referensi
1	<i>Mastocarpus stellatus</i>	-	0,13	Presipitasi	Amonium sulfat 85%; 120 menit; pH 7,1; 4°C	-	0,25	-	-	-	-	(Nguyen <i>et al.</i> , 2018)
2	<i>Gracilaria lemaneiformis</i>	-	0,5	Presipitasi	Amonium sulfat 65%; 4°C	-	-	Centrifugal Presipitation Chromatography	Amonium sulfat 50%	0,5 mg/100 mg EK	6,5	(Gu <i>et al.</i> , 2018)
3	<i>Centroceras clavulatum</i>	0,202 mg/g	1,01	Presipitasi	Amonium sulfat 40%; pH 7,5	0,023 mg/g dw	1,62	Ion Exchange	0,7 M NaCl di dalam 50 mM larutan <i>buffer</i> Na-fosfat; pH 7,5	0,013 mg/g dw	6,34	(Nair <i>et al.</i> , 2018)
4	<i>Gracilaria crassa</i>	-	0,18	Presipitasi	Amonium sulfat 65%	-	0,91	Ion Exchange	DEAE-Cellulose 52 + 300 mM NaCl + 0.1M larutan <i>buffer</i> fosfat	-	3,79	(Sudhakar <i>et al.</i> , 2015)
5	<i>Portieria hornemannii</i>	1,232 mg/g fw	0,69	Presipitasi	Amonium sulfat 35%(sentrifugasi);55% (presipitasi)	1,03 mg/g fw	2,38	Anion Exchange	-	0,798 mg/g fw	5,21	(Senthilumar <i>et al.</i> , 2013)
6	<i>Grateloupia turuturu</i>	5,28 mg/g dw	0,41	Presipitasi	Amonium sulfat 85%	3,696 mg/g dw (EK-30%)	1,22	Anion Exchange	Buffer A: 20 mM fosfat; buffer B: 20 mM fosfat, 1 M NaCl; AE-150	0,35 mg/g dw	0,66	(Munier <i>et al.</i> , 2015)
7	<i>Grateloupia turuturu</i>	5,28 mg/g dw	0,41	Presipitasi	Amonium sulfat 85%	3,696 mg/g dw (EK-30%)	1,22	Anion Exchange	Buffer A: 20 mM fosfat; buffer B: 20 mM fosfat, 1 M NaCl; AE-200	1,41 mg/g dw	2,89	(Munier <i>et al.</i> , 2015)

8	<i>Grateloupia turuturu</i>	5,28 mg/g dw	0,41	Presipitasi	Amonium sulfat 85%	3,696 mg/g dw (EK-30%)	1,22	Anion Exchange	Buffer A: 20 mM fosfat; buffer B: 20 mM fosfat, 1 M NaCl; AE-1000	0,52 mg/g dw	0,33	(Munier <i>et al.</i> , 2015)
9	<i>Pyropia haitanensis</i>			Presipitasi	50 mM Amonium sulfat; 4°C; 1 malam	0,74 mg/g dw	3,15	Expanded bed column (EBC) & Ion Exchange	EBC: Pheny-Sepharose 6 FF; Ion Exchange: DEAE Sepharose	0,24 mg/g dw	4,01	(Zhao <i>et al.</i> , 2019)
10	<i>Polysiphonia urceolata</i>			Presipitasi & Expanded-bed column (EBC)	Presipitasi: 50 mM Amonium sulfat; EBC: Pheny-Sepharose 6 FF	0,68 mg/g fw	+2,15 (rata-rata)	Ion Exchange	Amonium sulfat, air destilasi dan Q-Sepharose	0,40 mg/g fw	3,26	(Niu <i>et al.</i> , 2006)
11	<i>Polysiphonia urceolata</i>			Presipitasi & Expanded-bed column (EBC)	Presipitasi: 50 mM Amonium sulfat; EBC: Pheny-Sepharose 6 FF	0,68 mg/g fw	+2,15 (rata-rata)	Hydroxy-apatite column	Amonium sulfat, air destilasi; Buffer fosfat dan NaCl	0,34 mg/g fw	3,90	(Niu <i>et al.</i> , 2006)
12	<i>Corallina elongata</i>			Hydroxy-apatite column				Gel Filtration		±0,6 mg/g dw	6,67	(Rossano <i>et al.</i> , 2003)
13	<i>Mastocarpus Stellatus</i>	0,27 mg/g dw	0,14	Anion Exchange	Buffer A: 20 mM fosfat; buffer B: 20 mM fosfat, 1 M NaCl; AE-150	0,07 mg/g dw	0,09	-	-	-	-	(Nguyen <i>et al.</i> , 2018)
14	<i>Mastocarpus Stellatus</i>	0,27 mg/g dw	0,14	Anion Exchange	buffer A: 20 mM fosfat; buffer B: 20 mM fosfat, 1 M NaCl; AE-200	0,11 mg/g dw	1,91	-	-	-	-	(Nguyen <i>et al.</i> , 2018)

15	<i>Mastocarpus Stellatus</i>	0,27 mg/g dw	0,14	Anion Exchange	Buffer A: 20 mM fosfat; buffer B: 20 mM fosfat, 1 M NaCl; AE-1000 50 mM NaC dan 4% Triton X-1001 di dalam 50 mM Na-Fosfat (Siklus 1) + Amonium sulfat 65%/ ultrafiltrasi 30/50 kD (Siklus 2)	0,06 mg/g dw	0,06	-	-	-	(Nguyen et al., 2018)	
16	<i>Polysiphonia urceolata</i>		0,4	Gel Filtration – 2 siklus			0,9	Ion Exchange	DEAE-Sepharose FF + 25 mM larutan buffer Na-fosfat	5,26	(Wang et al., 2015)	
17	<i>Gracilaria gracilis</i>	1,26 mg/g dw	0,29	Gel Filtration	20 mM larutan buffer fosfat			Anion Exchange	Buffer A: 20 mM fosfat; buffer B: 20 mM fosfat, 1 M NaCl; AE-200	0,24 mg/g dw	3,25	(Nguyen et al., 2019)
18	<i>Gracilaria gracilis</i>	1,26 mg/g dw	0,29	Gel Filtration	20 mM larutan buffer fosfat			Anion Exchange	Buffer A: 20 mM fosfat; buffer B: 20 mM fosfat, 1 M NaCl; AE-250	0,68 mg/g dw	2,33	(Nguyen et al., 2019)
19	<i>Gracilaria gracilis</i>	1,26 mg/g dw	0,29	Gel Filtration	20 mM larutan buffer fosfat			Anion Exchange	Buffer A: 20 mM fosfat; buffer B: 20 mM fosfat, 1 M NaCl; AE-300	0,55 mg/g dw	1,9	(Nguyen et al., 2019)
20	<i>Palmaria palmata</i>			Electrophoresis		2,22 mg/g dw (12,2% dari total protein*)	3,2				(Galland-Irmouli et al., 2000)	

Keterangan:

- IP : Indeks Purifikasi
 EK : Ekstrak Kasar
 dw : Dry weight
 fw : Fresh weight
 * : Total protein 18,5 mg/g dw

Tabel 9. *Yield* dan Indeks Purifikasi Fikosianin pada Alga Merah dengan Berbagai Metode Purifikasi

No	Spesies	Ekstrak kasar	IP	Metode 1	Keterangan	Yield	IP	Metode 2	Keterangan	Yield	IP	Referensi
1	<i>Centroceras clavulatum</i>	0,077 mg/g	0,337	Presipitasi	Amonium sulfat 40%; pH 7,5	0,030 mg/g dw	0,960	<i>Ion Exchange</i>	0,7 M NaCl di dalam 50 mM larutan <i>buffer</i> Na-fosfat; pH 7,5	0,010 mg/g dw	5,01	(Nair <i>et al.</i> , 2018)

Keterangan:

- IP : Indeks Purifikasi
- EK : Ekstrak Kasar
- dw : *Dry weight*
- fw : *Fresh weight*
- * : Total protein 18,5 mg/g dw

