

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Mikroalga merupakan tumbuhan air berukuran mikroskopis yang dapat hidup di seluruh wilayah perairan baik di air tawar maupun air laut, serta memiliki berbagai potensi sebagai pangan, *nutraceutical*, farmasi, akuakultur, kosmetik hingga biodiesel (Begum *et al.*, 2016). Berdasarkan pigmentasinya mikroalga diklasifikasikan menjadi *Chlorophyceae* (mikroalga hijau) dengan dominan pigmen klorofil, *rhodophyceae* (mikroalga merah) kaya akan *astaxanthin*, *cyanophyceae* (mikroalga biru-hijau) dengan dominan pigmen fikosianin, dan *pheophyceae* (mikroalga coklat) (Begum *et al.*, 2016). Mikroalga memiliki pigmen primer dan pigmen sekunder, pigmen primernya yaitu klorofil dan pigmen sekundernya yaitu karotenoid dan fikobiliprotein.

Lutein termasuk dalam kelompok karotenoid dan memiliki pigmen berwarna kuning yang dapat ditemukan di mikroalga hijau. Sumber produksi *lutein* terbesar saat ini berasal dari bunga *marigold* namun produksinya sangat bergantung pada musim, iklim, luas area tanam dan biaya tenaga kerja yang tinggi. Permintaan produk komersial *lutein* diekspektasikan mencapai US\$ 406 juta pada tahun 2026 (Fábryová *et al.*, 2019). Dibanding dengan bunga *marigold*, mikroalga memiliki kelebihan dalam produksi karena lebih murah, memiliki laju pertumbuhan 5-10 kali lebih tinggi, dapat dibudidayakan di air laut dan tidak membutuhkan lahan yang besar, dapat dipanen terus menerus karena tidak bergantung pada iklim dan cuaca (Lin *et al.*, 2015). Selain itu kandungan *lutein* dalam mikroalga diestimasikan sebesar 5g/kg, sebagian besar dalam struktur *lutein* bebas. Produksi mikroalga setiap tahunnya sebesar 70-150 ton/hektar dimana 11,5-25 kali lebih tinggi dari produksi bunga *marigold* hanya sebesar 6 ton (Lin *et al.*, 2015).

Melihat potensi *lutein* dari mikroalga yang sangat besar, namun belum ada penelitian *review* yang membahas ekstraksi dan purifikasi pigmen karotenoid khususnya *lutein* dari berbagai mikroalga hijau (*chlorophyceae*) beberapa *review* yang dilakukan oleh (Lefebvre *et al.*, 2021; Saini & Keum, 2018), mengulas metode ekstraksi namun belum berfokus pada mikroalga dan karotenoid, sedangkan oleh (Gong & Bassi, 2016; Kim *et al.*, 2016; Rammuni *et al.*, 2019) hanya sedikit mikroalga hijau yang diulas dan belum

berfokus pada pigmen *lutein*. Kemudian pada *review* yang dilakukan oleh (Lin *et al.*, 2015) mengulas mengenai potensi mikroalga sebagai penghasil *lutein* dibandingkan dengan *marigold flower*. Oleh karena itu, penelitian ini melakukan *review* mengenai ekstraksi dan purifikasi *lutein* pada mikroalga hijau serta parameter yang mempengaruhi *yield*.

1.2 Tinjau Pustaka

1.2.1. Mikroalga

Alga termasuk dalam *kingdom plantae*, ukurannya berkisar seukuran fitoplankton hingga sebesar rumput laut. Apabila diklasifikasikan berdasarkan divisinya, alga dibagi menjadi sebelas bagian yaitu *cyanophyta*, *chlorophyta*, *rhodophyta*, *glaucochyta*, *euglenophyta*, *chlorarachniophyta*, *charophyta*, *cryptophyta*, *haptophyta*, *heterokontophyta* dan *dinophyta* (Barkia *et al.*, 2019). Mikroalga merupakan golongan alga yang berukuran mikro, diklasifikasikan sebagai tumbuhan karena memiliki beberapa sifat khas tumbuhan tingkat tinggi yaitu dapat melakukan fotosintesis serta atribut bioteknologi oleh mikroorganisme seperti pertumbuhan yang cepat, kemampuan untuk mengakumulasi dan mensekresi metabolite primer dan sekunder (Guedes *et al.*, 2011).

Berdasarkan pigmentasinya mikroalga diklasifikasikan menjadi *Chlorophyceae* (mikroalga hijau) dengan dominan pigmen klorofil, *rhodophyceae* (mikroalga merah) kaya akan *astaxanthin*, *cyanophyceae* (mikroalga biru-hijau) dengan dominan pigmen fikosianin, dan *pheophyceae* (mikroalga coklat) (Begum *et al.*, 2016). Pembudidayaan mikroalga tergolong cepat yaitu dapat menggandakan diri dalam waktu 24 jam bahkan beberapa spesies dapat menggandakan diri selama 5-8 jam (Martínez Andrade *et al.*, 2018). selain itu dapat dikultivasi dan dipanen secara kontinu hanya membutuhkan keberadaan matahari, karbon dioksida dan air (Cuellar-Bermudez *et al.*, 2015; Morais Junior *et al.*, 2020)

1.2.1.1 Mikroalga Hijau (Chlorophyceae)

Chlorophyceae merupakan kelas bagi kumpulan mikroalga hijau yang banyak mengandung pigmen klorofil dan karotenoid. Pada kelas *chlorophyceae* jenis mikroalga

seperti *Dunaliella salina*, *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum bibrainum*, *Chlorococcum*, *Scenedesmus* sp, *Haematococcus pluvialis*, *Chlamydomonas planctogloea*, *Eutetramorus fottii*, *Chlorella zofingiensis*, *Desmodesmus*, *Coelastrum sphaericum* dan lain-lainnya memiliki karakteristik yang berbeda-beda.

Beberapa contoh, *Dunaliella salina* merupakan mikroalga hijau kelas *chlorophyceae* ordo *volvocales* yang memiliki ciri uniseluler, tidak memiliki dinding sel, dan memiliki sepasang flagella (Macías-Sánchez *et al.*, 2009). Pada saat kondisi stress *Dunaliella salina* mulai memproduksi karotenoid, sel yang mulanya berwarna hijau karena didominasi oleh kloroplas berubah menjadi oranye. Membran kloroplas mulai mengecil dan karotenoid dalam globula lipid mulai terbentuk (Kleinegris *et al.*, 2010). Beberapa mikroalga lain seperti *Haematococcus* juga memiliki 2 fase, yaitu fase hijau dan fase merah, dimana fase merah menandakan dalam kondisi stress karena kurangnya sumber nutrisi, intensitas cahaya dan konsentrasi garam yang terlalu tinggi (Jaime *et al.*, 2010).

Berbeda dari *Dunaliella salina*, mikroalga *Chlorella* sp. Dan *Haematococcus pluvialis* memiliki dinding sel yang tebal dan keras, selain itu pada *Haematococcus pluvialis* memiliki sepasang flagella sedangkan *Chlorella* tidak memiliki flagella (Kim *et al.*, 2016). Peran dari keberadaan flagella pada mikroalga yaitu sebagai alat gerak selain itu dapat mengontrol kuantitas cahaya yang diterima sel dengan cara bergerak mendekat atau menjauhi sumber cahaya, yang juga berperan penting bagi fisiologi selulernya (Gateau *et al.*, 2021). Dinding sel juga memiliki peran untuk melindungi dari pengaruh lingkungan (Al-Zuhair *et al.*, 2016). keberadaan dari dinding sel ini akan mempersulit pengambilan senyawa bioaktif karena akan menghambat kontak dengan pelarut organik. Pada literatur oleh Alhattab *et al.*, (2019) sudah dibahas mengenai ukuran sel, struktur dinding sel, komposisi penyusun dinding sel pada berbagai jenis mikroalga.

1.2.1.2. Karotenoid

Karotenoid merupakan pigmen organik golongan *isoprenoid* dengan struktur 40 rantai karbon ($C_{40}H_{56}$) (Gong & Bassi, 2016; Mussagy *et al.*, 2019). Sifat fisik dari karotenoid yaitu memiliki stabilitas yang rendah karena pengaruh pemanasan sehingga intensitas warnanya dapat menurun, serta keberadaan cahaya dan oksigen (Gong & Bassi, 2016). Karotenoid tergolong sangat hidrofobik dan memiliki kelarutan yang sangat rendah

dalam air namun mudah larut dalam lemak (Britton, 1995). Sebagian besar karotenoid memiliki rentang penyerapan cahaya kisaran 350 hingga 550 nm, karotenoid tersimpan dalam globula lipid di dalam kloroplas (Kleinegris *et al.*, 2010).

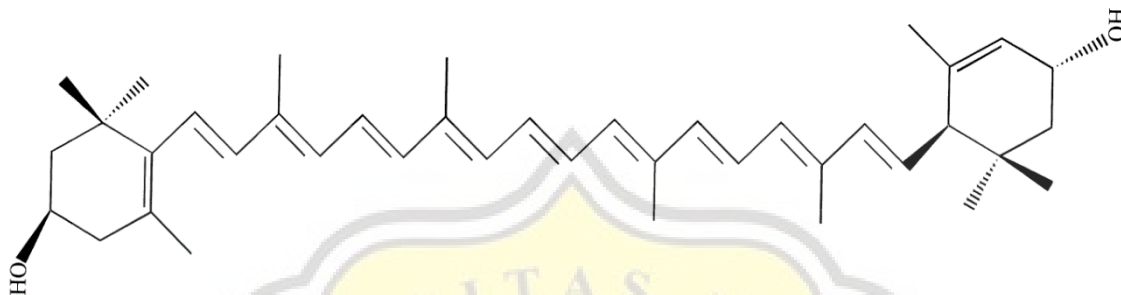
Pengaruh lingkungan seperti suhu, radiasi, *photoperiod*, pH, *nutrient*, *nitrogen*, tingkat salinitas dapat mempengaruhi produksi dari pigmen mikroalga (Begum *et al.*, 2016). Keberadaan karotenoid dalam fotosintesis tanaman sangat penting dan mencegah terjadinya fotooksidasi, karotenoid membantu klorofil dalam pemanenan cahaya dengan menyerap gelombang cahaya biru (Ahmed *et al.*, 2015; Ben-Amotz *et al.*, 1988; Demmig-Adams *et al.*, 1996; Raja *et al.*, 2007). Sifat fotoprotektif karotenoid dapat mengubah warna mikroalga yang berwarna hijau berubah menjadi merah karena efek salinitas dan intensitas cahaya pada lingkungan (Barkia *et al.*, 2019; Lou *et al.*, 2020).

Karotenoid terbagi menjadi karoten dan xantofil, karoten tidak memiliki atom oksigen pada strukturnya sedangkan xantofil memiliki atom oksigen pada strukturnya (Ambati *et al.*, 2019; Pour Hosseini *et al.*, 2017). Yang termasuk karoten adalah *lycopene*, β -*caroten*, sedangkan yang termasuk xantofil adalah *lutein*, *neoxanthin*, *zeaxanthin*, *violaxanthin*, *cryptoxanthin*. Perbedaan struktur juga mempengaruhi tingkat kepolaran karotenoid, likopen dan beta karoten merupakan karotenoid non-polar karena struktur hidrokarbon terkonjugasinya tidak memiliki gugus fungsi polar. Berbeda dengan karotenoid yang memiliki gugus fungsi polar seperti *epoxy* (*violaxanthin* dan *neoxanthin*), *hydroxyl* (*lutein* dan *zeaxanthin*) yang meningkatkan polaritas dari karotenoid (Britton, 1995; Saini & Keum, 2018). Kandungan karotenoid juga berbeda pada setiap spesies mikroalga menurut (Le Goff *et al.*, 2019) pada penelitiannya, kandungan total karotenoid berkisar dari 0,02 mg/g berat kering dari *Scenedesmus obliquus* hingga 291 mg/g berat kering dari spesies *Dunaliella salina*.

1.2.1.2.1 Lutein

Lutein (C₄₀H₅₆O₂) adalah pigmen berwarna kuning yang tergolong dalam karotenoid golongan xantofil, memiliki peran sebagai pigmen aksesori dengan menyerap energi cahaya biru, terlibat dalam fotoproteksi yang mengeliminasi kerusakan fotooksidatif (Lin *et al.*, 2015). Pasar *lutein* terbagi menjadi farmasi, *dietary supplement*, pangan dan

pakan. *Lutein* yang digunakan dalam industri pangan terbatas karena ketidakstabilannya dan dapat mengalami perubahan struktur kimia yang disebabkan oleh berbagai proses (Ochoa Becerra *et al.*, 2020). Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi struktur *lutein* adalah suhu tinggi, keberadaan oksigen, cahaya dan pH ekstrim (Ochoa Becerra *et al.*, 2020).



Gambar 1. Struktur Kimia *Lutein* (Li *et al.*, 2001)

1.2.2. Metode Ekstraksi

Ekstraksi karotenoid yang dilakukan dengan melakukan pemanenan sel mikroalga dan penghancuran sel merupakan tahap pendahuluan sedangkan ekstraksi dan purifikasi merupakan tahap isolasi sel (Ambati *et al.*, 2019). Metode ekstraksi, pemilihan pelarut serta parameter-parameter lain seperti suhu, tekanan, harus dipilih supaya mendapatkan *yield* karotenoid yang optimal.

1.2.2.1. Tahap Pendahuluan (*Pre-Treatment*)

Pada tahap ini mikroalga dipanen supaya terpisah dari medium cairnya, beberapa metode yang digunakan untuk memanen mikroalga yaitu sentrifugasi, flokulasi, filtrasi, sedimentasi, dan *electrophoresis* (C. Y. Chen *et al.*, 2011). Namun metode yang sering digunakan pada skala laboratorium adalah sentrifugasi karena cepat dan efisien apabila dibandingkan dengan filtrasi yang bergantung pada ukuran partikel serta membutuhkan energi dan waktu yang lama (Gong & Bassi, 2016). Sentrifugasi yang dilakukan pada kecepatan 500-1000 x g selama 2-5 menit dapat memperoleh 80-90% sel mikroalga (C. Y. Chen *et al.*, 2011). Namun sentrifugasi tidak direkomendasikan untuk produksi skala besar (Kim *et al.*, 2016)

Setelah dipanen maka tahap selanjutnya adalah pengeringan biomasa, metode *freeze-drying* dan *spray drying* merupakan metode yang sering digunakan. Menurut C. L. Chen

et al., (2015); Stramarkou *et al.*, (2017) metode pengeringan bertujuan untuk mendehidrasi sehingga mengurangi pertumbuhan mikroba, menghindari reaksi oksidatif, meningkatkan ekstraksi senyawa bioaktif. Namun metode pengeringan juga dapat memberikan dampak terhadap stabilitas dari senyawa bioaktif.

Selanjutnya dilakukan penghancuran sel mikroalga, beberapa mikroalga memiliki dinding sel yang tebal dan keras oleh karena itu penghancuran sel dapat meningkatkan kandungan pigmen yang terekstrak secara signifikan (Alhattab *et al.*, 2019; Choi *et al.*, 2019). Tanpa penghancuran sel hasil ekstraksi yang diperoleh tidak akan maksimal (Chan *et al.*, 2013; Gille *et al.*, 2016; Gong & Bassi, 2016). Beberapa metode yang dapat digunakan untuk penghancuran dinding sel adalah *mortar and pestle*, *milling*, *ultrasonication*, *homogenisation*, *microwave*, *thawing*, dan *freezing* (Ambati *et al.*, 2019). Pada penelitian oleh (Cerón-García *et al.*, 2018) ekstraksi karotenoid akan 10 kali lebih efisien apabila dilakukan penghancuran sel.

1.2.2.2. Maserasi

Dalam metode ini perlakuan *pre-treatment* sangat dibutuhkan untuk melakukan perusakan dinding sel sehingga mempermudah pelarut untuk masuk ke dalam sel dan mengikat karotenoid (Rammuni *et al.*, 2019). Maserasi sering digunakan dalam skala industri karena murah dan mudah untuk disesuaikan dengan skala besar (Gong & Bassi, 2016). Namun juga memiliki kekurangan yaitu membutuhkan waktu proses yang lama, perlu proses evaporasi untuk memurnikan ekstrak, kebutuhan pelarut dengan jumlah besar, toksisitas larutan akibat rendemen tidak bebas dari pelarut organik dan dampak bagi lingkungan (Eghbali Babadi *et al.*, 2020; Gong & Bassi, 2016; Pour Hosseini *et al.*, 2017).

Pemilihan pelarut yang digunakan berdasarkan sifat senyawa yang ingin diperoleh, berdasarkan teori "*like dissolves like*" tingkat kepolaran larutan sangat penting untuk pengambilan senyawa target (Gong & Bassi, 2016). Beberapa pelarut yang sering digunakan untuk mengekstraksi pigmen karotenoid adalah *acetone*, *hexane*, *diethyl ether*, *ethanol*, *methanol* (Cerón-García *et al.*, 2018). Penggunaan pelarut *dichloromethane* sudah dilarang karena sifatnya yang karsinogenik dan korosif.

Beberapa alternatif pelarut lain yang biasa disebut *green solvent* digunakan karena ramah lingkungan contohnya adalah *vegetable oil* dan *ionic liquids* (Saini & Keum, 2018). Penelitian dilakukan oleh Kang & Sim, (2008), pada penelitian tersebut *soybean oil*, *corn oil*, *grapeseed oil* dan *olive oil* digunakan untuk mengekstraksi *astaxanthin* dari mikroalga *Haematococcus pluvialis*, hasil menunjukkan *yield astaxanthin* yang diperoleh lebih dari 87,5%. Namun belum banyak ditemukan pengaplikasiannya pada ekstraksi *lutein* dan belum terdapat studi yang mengulas mengenai sisi ekonomi serta biaya dari penggunaan pelarut *vegetable oil* untuk skala industri sehingga penerapannya belum diketahui.

Beberapa ulasan lain yang ditulis Cerón-García *et al.*, (2018), pencampuran pelarut dengan polaritas yang berbeda dapat mengoptimalkan pengambilan karotenoid karena dapat menjangkau karotenoid yang lebih polar dan apolar. Dalam penelitiannya Cerón-García *et al.*, (2018) mengekstraksi beberapa mikroalga dengan 12 pelarut yang berbeda diantaranya *Hexane-ethanol* (70-30), *hexane-ethanol* (50-50), *ethanol-hexane-water*, *acetone-water* diperoleh penggunaan trikomponen larutan (*ethanol-hexane-water*) menunjukkan hasil yang baik bagi sampel yang mengandung karoten dan xantofil. Berikut beberapa pelarut yang dianggap perlu digantikan

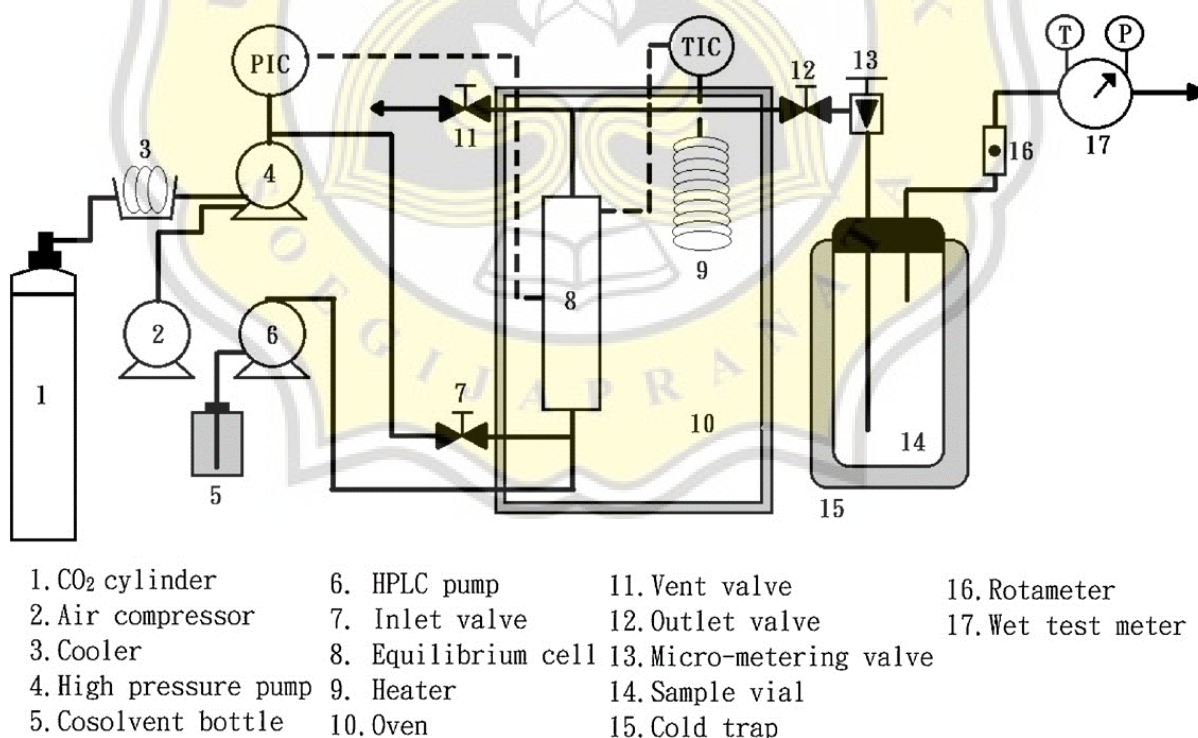
Tabel 1. Kategori “Red solvent”

No	Pelarut	Alasan
1	<i>Pentane</i>	Mudah terbakar
2	<i>Hexane</i>	Lebih <i>toxic</i> dari <i>heptane</i>
3	<i>Di-isopropyl ether</i>	Mudah terbakar
4	<i>Diethyl ether</i>	Mudah terbakar
5	<i>Dichloroethane</i>	<i>Carcinogen</i>
6	<i>Chloroform</i>	<i>Carcinogen</i>
7	<i>Dimethylformamide</i>	<i>Toxic</i>
8	<i>N-methyl-2-pyrrolidinone</i>	<i>Toxic</i>
9	<i>Pyridine</i>	<i>Carcinogen, toxic</i>
10	<i>Dimethylacetamid</i>	<i>Toxic</i>
11	<i>Benzene</i>	<i>Carcinogen, toxic to environment and human</i>

(Calvo-Flores *et al.*, 2018)

1.2.2.3. Supercritical Fluid Extraction (SFE)

Metode ini menggunakan cairan CO₂ superkritik dengan karakteristik viskositas yang rendah namun difusivitas yang relatif tinggi (Saini & Keum, 2018). Kelebihan dari metode ini adalah waktu ekstraksi singkat, tidak mahal, tidak mudah terbakar, pelarut yang digunakan sedikit, *yield* yang diperoleh tinggi (Ambati *et al.*, 2019; Pour Hosseini *et al.*, 2017). Pelarut CO₂ sering digunakan dalam metode ini, CO₂ cair memiliki suhu kritis 31,3° C, dan tekanan 72,9 atm. Metode ini sering digunakan untuk mengekstraksi komponen yang tidak stabil terhadap suhu seperti karotenoid, selain itu karena pelarut CO₂ merupakan pelarut non-polar sehingga akan sangat sesuai dengan sifat karotenoid (Saini & Keum, 2018). Metode ini juga dapat menggunakan pelarut tambahan (*cosolvent*), pelarut yang biasanya digunakan sebagai *cosolvent* memiliki kepolaran yang lebih tinggi dibanding CO₂ sehingga dapat menjangkau pengambilan senyawa-senyawa yang lebih polar. Beberapa contohnya adalah *ethanol*, *olive oil* dan lain sebagainya. Selain itu pemisahan pelarut menggunakan depresurisasi menyebabkan ekstrak lebih murni, serta pelarut CO₂ cair yang dapat didaur ulang sehingga sangat ramah lingkungan (Cuellar-Bermudez *et al.*, 2015; Saini & Keum, 2018).



Gambar 2. Skema *Supercritical Fluid Extraction* (Yen *et al.*, 2012)

1.2.2.4. *Ultrasound Assisted Extraction (UAE)*

Metode ini menggunakan gelombang akustik dengan energi yang sangat tinggi serta menghasilkan gelembung kavitasi. Hal tersebut menyebabkan dinding sel menjadi rusak supaya pelarut dapat masuk ke dalam bahan dan meningkatkan kontak antara pelarut dengan senyawa yang akan diekstraksi (Deshmukh *et al.*, 2019; Saini & Keum, 2018). Tiga parameter utama yang mempengaruhi gelombang ultrasonik adalah frekuensi (Hz), amplitudo (Mpa), dan daya (W). Metode ini sering digunakan karena *yield* yang diperoleh tinggi, waktu ekstraksi singkat, suhu yang digunakan rendah dan volume pelarut yang digunakan sedikit (Gong & Bassi, 2016). Frekuensi pada metode ini biasanya lebih dari 20 kHz (Kim *et al.*, 2016). Apabila frekuensi yang digunakan terlalu tinggi dapat menyebabkan kerusakan pada pigmen sehingga *yield* berkurang (Saini & Keum, 2018). Seperti yang diulas oleh Ochoa Becerra *et al.*, (2020) pada frekuensi ultrasonik 80 kHz menyebabkan kehilangan *yield lutein* sebesar 12%. Daya ultrasonik, intensitas, suhu dan massa jenis (*sample : solvent*) merupakan beberapa faktor untuk meningkatkan efisiensi ekstraksi ini.

1.2.2.5. *Pressurized Liquid Extraction (PLE)*

Metode ini menggunakan tekanan tinggi agar membran sel mengalami permeabilitas sehingga terjadi interaksi antarmolekul dan pelarut dapat masuk ke dalam membran sel (Saini & Keum, 2018). Pemberian tekanan bertujuan untuk memanaskan pelarut di atas titik didihnya, peningkatan suhu ini akan mengurangi viskositas dari pelarut dimana akan mempermudah pelarut untuk berdifusi masuk ke dalam membran sel (Lefebvre *et al.*, 2021; Saini & Keum, 2018). Kelebihan metode *Pressurized liquid extraction* yaitu mudah, waktu proses singkat serta hanya menggunakan sedikit pelarut sehingga akan meminimalisir perubahan senyawa yang *volatile* seperti karotenoid (Denery *et al.*, 2004; Saini & Keum, 2018). Selain itu metode ini memiliki penyimpanan sampel yang terhindar dari pengaruh oksigen dan cahaya berbeda dengan metode pelarut konvensional (Jaime *et al.*, 2010). Menurut Denery *et al.*, (2004) metode ini mampu mengekstrak kandungan *astaxanthin*, karoten, *lutein* dan total pigmen yang lebih tinggi pada percobaan mikroalga *H.pluvialis* dan *D.salina* apabila dibandingkan dengan metode konvensional.

1.2.2.6. Pulsed Electric Field (PEF)

Pulsed electric field ini merupakan metode non-termal, menggunakan medan listrik sehingga mengakibatkan membran sel mengalami permeabilitas membran sel (elektroporasi) dengan durasi yang singkat dalam waktu *milliseconds* (ms) dan *microseconds* (μ s) sehingga terjadi difusi senyawa didalam sel (Luengo *et al.*, 2015; Martínez *et al.*, 2019; Saini & Keum, 2018). Beberapa faktor yang mempengaruhi metode ini adalah kekuatan medan listrik dan waktu proses. Dengan metode ini permeabilitas membran sel dapat bersifat sementara (*reversible electroporation*) atau permanen (*irreversible electroporation*) tergantung dari intensitas atau energi pada medan listrik yang digunakan. Dalam range waktu *milliseconds* (ms) kekuatan medan listrik yang digunakan untuk *reversible electroporation* berkisar 0,5-1,5 kV/cm, sedangkan untuk *irreversible electroporation* kekuatannya diatas 10-20 kV/cm (Corrêa *et al.*, 2021). Dalam range waktu *microseconds* kekuatan medan listrik yang digunakan sebesar 15 kV/cm (Saini & Keum, 2018). Sedangkan dalam range waktu *nanoseconds* kekuatan medan listrik yang digunakan sekitar 100 kV/cm (Luengo *et al.*, 2015). Metode *pulsed electric field* tetap membutuhkan bantuan pelarut seperti *ethanol*, *methanol* dan *acetone* untuk mengekstraksi sampel supaya diperoleh hasil yang maksimal (Martínez *et al.*, 2019). Kelebihan metode ini adalah tidak menggunakan pengaruh suhu sehingga tidak akan mempengaruhi struktur senyawa yang diekstraksi, efisien, dan energi yang dibutuhkan tidak besar (Saini & Keum, 2018).

1.2.3. Metode Purifikasi

Tahapan purifikasi dilakukan sebagai metode lanjutan untuk memurnikan *yield* karotenoid dengan mengeliminasi komponen-komponen yang tidak diinginkan seperti lemak dan klorofil. Beberapa metode purifikasi yang digunakan yaitu saponifikasi dan kromatografi (*Thin Layer chromatography*, *High Performance Liquid Chromatography*, *High Performance Countercurrent Chromatography*)

1.2.3.1. Saponifikasi

Saponifikasi merupakan metode untuk memisahkan komponen klorofil dan lemak dalam ekstrak karotenoid akibat terjadinya hidrolisis alkali dengan cara penambahan pelarut alkali dan pelarut organik (Gong & Bassi, 2016; Neil & Schwartz, 1992; Taylor

& Francis, 2008)). Beberapa larutan biasa digunakan dalam proses saponifikasi adalah NaOH, KOH, *hexane*, *methanol* (Choi *et al.*, 2019; Martínez Andrade *et al.*, 2018). Saponifikasi dilakukan untuk mempermudah separasi, identifikasi, dan kuantifikasi oleh kromatografi (Giuffrida *et al.*, 2020; Taylor & Francis, 2008)

Langkah pertama untuk melakukan saponifikasi adalah dengan penambahan pelarut organik *petroleum* eter/dietil eter 1:1 (v/v) dan *methanolic* KOH 10% pada suhu ruang selama 16 jam (Fernandes *et al.*, 2020). Tujuan penambahan pelarut organik adalah untuk mengikat senyawa *non water soluble* dari ekstrak, sedangkan larutan alkali digunakan untuk menyebabkan terjadinya hidrolisis alkali pada klorofil dan lemak sehingga mengubah strukturnya menjadi garam dan larut pada air (Gong & Bassi, 2016). Pada penelitian yang dilakukan oleh Cerón-García *et al.*, (2018) digunakan campuran 3 pelarut organik yaitu *ethanol:hexane:water* dengan proporsi 77:17:6 (v/v/v), sebagaimana diulas oleh Gong & Bassi, (2016) penggunaan campuran larutan organik dapat meningkatkan efisiensi serta meningkatkan *recovery* karotenoid yang lebih polar.

Langkah selanjutnya, ekstrak dicuci dengan air distiliasi untuk menghilangkan larutan alkali, dibilas dengan N₂ dan disimpan pada suhu -37 derajat *celcius* dalam keadaan gelap hingga akan dilakukan analisis kromatografi (Fernandes *et al.*, 2020). Pada penelitian yang dilakukan Chan *et al.*, (2013), disebutkan bahwa beberapa faktor saponifikasi seperti waktu, suhu, konsentrasi alkali, dapat mempengaruhi *yield* ekstrak yang diperoleh. Menurut Saini & Keum, (2018), mengulas suhu dan waktu saponifikasi, disebutkan *hot saponification* (56° *celcius*, 20 min) dengan suhu tinggi dan waktu singkat mengakibatkan isomerisasi dan degradasi pada karotenoid, *sedangkan cold saponification* (25 *celcius*, 16 jam) memakan waktu yang sangat lama. Selain itu pada mikroalga *Scenedesmus Obliquus* yang dilakukan saponifikasi dengan peningkatan konsentrasi KOH (larutan alkali) dari 2,5% ke 80%, tidak memberikan perubahan signifikan terhadap kandungan karotenoid.

Tahapan selanjutnya adalah dilakukan analisis kromatografi, dalam buku (Taylor & Francis, 2008), ada beberapa poin untuk tindak pencegahan degradasi atau perubahan struktur pada karotenoid yaitu

1. Semua operasi dilakukan pada keadaan *diffuse light*, peralatan dan gelas harus ditutup dengan kain hitam atau *aluminium foil*
2. Atmosfer harus *inert*, udara harus diganti dengan kondisi vakum atau *inert* seperti gas nitrogen (N₂)
3. Suhu tinggi harus dihindari; penguapan pelarut dalam jumlah besar menggunakan *rotary evaporator* disarankan menggunakan suhu dibawah 35° celcius
4. Hindari keadaan asam di udara sekitar karotenoid dianalisis
5. Sampel harus disimpan pada suhu yang sangat rendah dalam keadaan tekanan dibawah atmosfer
6. Analisis harus dilakukan dalam waktu sesingkat mungkin

1.2.3.2. High Performance Liquid Chromatography

High Performance Liquid Chromatography merupakan metode kromatografi yang paling sering digunakan saat ini untuk pemisahan karotenoid, dengan berbagai keuntungan seperti kecepatan, sensitivitas, presisi (Taylor & Francis, 2008). Berdasarkan relativitas kepolarannya, HPLC memiliki 2 mode yaitu *Normal phase* (NP) dan *Reversed phase* (RP). *Normal phase* digunakan untuk menganalisis dan memisahkan struktur sederhana dari xantofil, sedangkan *reversed phase* banyak digunakan untuk analisis karotenoid secara umum termasuk struktur isomernya dan pemisahan lemak (Giuffrida *et al.*, 2020). Kemudian, diulas penggunaan kolom C30 (*triacontyl*) dibandingkan dengan kolom C18 (*Octadecylsilane*) dimana kolom C30 memiliki sifat hidrofobik lebih besar dibanding dengan kolom C18 sehingga memiliki interaksi yang lebih baik dengan karotenoid, namun penggunaan kolom C30 membutuhkan waktu analisis yang lebih lama. Beberapa campuran pelarut yang digunakan adalah *methanol*, *methyl-tert-butyl ether* (MBTE) dan air sebagai *mobile phase/fase gerak* (Giuffrida *et al.*, 2020)

Metode ini menggunakan tekanan tinggi sehingga pelarut bergerak melewati kolom, dan memperoleh separasi yang maksimal. Semakin kecil ukuran partikel pada fase diam, maka semakin besar efisiensi separasi namun tekanan tinggi juga diperlukan. Sistem HPLC terdiri dari *reservoir*/penampung fase gerak, pemompa fase gerak, injeksi sampel, kolom kromatografi dan deteksi, serta sistem pencatatan data (Corrêa *et al.*, 2021)

1.2.3.3. High Performance Countercurrent Chromatography (HPCCC)

Metode *High performance countercurrent chromatography* merupakan metode separasi yang tidak membutuhkan fase diam *solid*. Pemisahan metode ini bergantung pada dua fase cair dari sistem pelarut yang tidak dapat bercampur, salah satu dari dua fase cair (fase diam) akan ditahan dikolom oleh gaya sentrifugal, sedangkan fase cair lainnya (fase gerak) dipompa melalui kolom. Perkembangan dari teknologi ini sangat efisien untuk pemisahan berbagai senyawa alami dan sedang dikembangkan dalam skala industri (Fábryová *et al.*, 2020; Sutherland, 2007). Berbagai campuran pelarut seperti *n-heptane*, *acetonitrile*, *ethanol* dan *acetone* digunakan untuk meningkatkan kemampuan dalam pemisahan karotenoid.

Tahapan melakukan metode ini yang pertama, beberapa larutan yang akan digunakan sebagai *solvent system* dikocok hingga terbentuk dua fase larutan yang tidak bercampur. Selanjutnya, setelah terpisah akan menjadi fase atas dan fase bawah. Fase bawah berguna sebagai *mobile phase* dan fase atas sebagai *stationary phase*. Kemudian sampel ekstrak dilarutkan kedalam fase atas dari *solvent system* lalu dimasukkan kedalam kolom HPCCC. Setelah itu, kolom HPCCC diberi gaya sentrifugal dan *mobile phase* dipompa dengan laju aliran pada suhu tertentu (Fábryová *et al.*, 2019). Apabila kesetimbangan fase dalam kolom sudah tercapai ditandai dengan tidak adanya fase stasioner yang terelusi dari kolom, maka sampel akan ditambahkan kedalam HPCCC.

1.2.3.4. Gel Permeation Chromatography

Metode ini digunakan untuk pemisahan senyawa makromolekul berdasarkan perbedaan ukurannya. Pada teknik ini, fase diam hidrofobik terdiri dari partikel inert dengan ukuran kecil. Kemudian sampel diinjeksikan secara kontinu kedalam kolom

chromatography, dibawah oleh fase gerak yang merupakan pelarut organik. Semakin kecil ukuran molekulnya maka akan mempengaruhi waktu retensi, sehingga semakin kecil molekul akan menembus pori-pori pada fase diam dan memperlama waktu retensi. Sedangkan molekul berukuran besar akan lebih cepat melewati kolom sehingga waktu retensi menjadi lebih cepat (Corrêa *et al.*, 2021)

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah mengkaji dan menganalisis berbagai metode ekstraksi dan purifikasi serta parameter-parameter yang dapat mempengaruhi *yield lutein* pada mikroalga hijau sehingga diperoleh *lutein* yang optimal.

