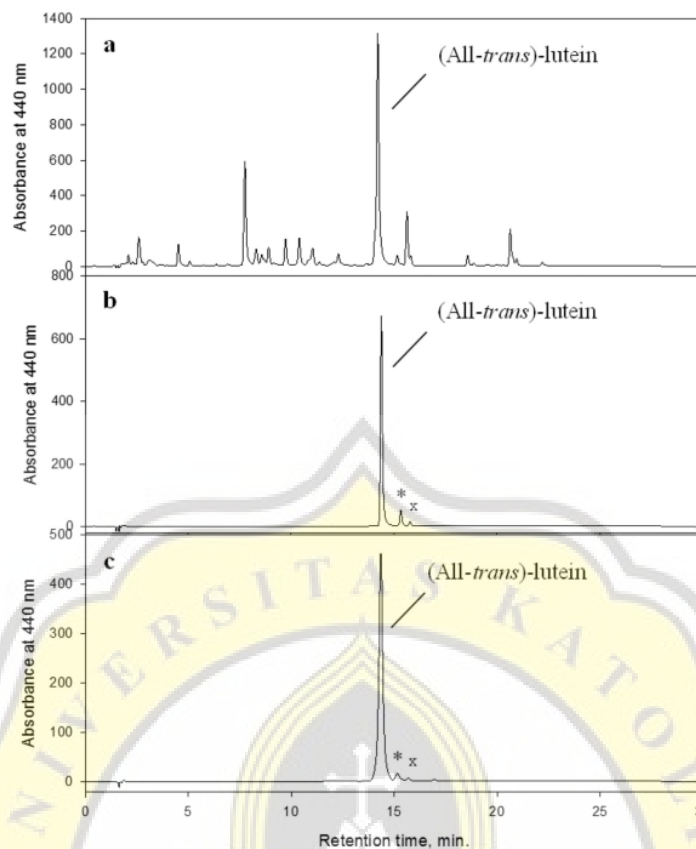


## **5. PENGARUH METODE PURIFIKASI TERHADAP KEMURNIAN YIELD LUTEIN**

Tahapan purifikasi dilakukan pada proses produksi *lutein* supaya mendapatkan produk dengan kemurnian yang lebih tinggi. Beberapa metode purifikasi yang digunakan, seperti saponifikasi dengan larutan KOH, presipitasi dengan *ethanol*, pemisahan *High performance counter current chromatography* (HPCCC), *gel permeation chromatography* (GPC), *High performance liquid chromatography* (HPLC) dan sering dikombinasikan (Chan *et al.*, 2013; D'Este *et al.*, 2017; Fábryová *et al.*, 2019). Kemurnian *lutein* ditentukan dengan membandingkan area puncak (*peak*) *lutein* dengan luas area puncak lainnya pada kromatogram (D'Este *et al.*, 2017). Sedangkan persentase *yield lutein* diperoleh dengan menghitung jumlah *lutein* yang dimurnikan dalam produk dibagi dengan *lutein* yang terdapat dalam mikroalga (Li *et al.*, 2001).

### **5.1. Lutein**

Pada Tabel 5., dapat dilihat penelitian yang dilakukan oleh Fábryová *et al.*, (2019) dengan metode HPCCC dan GPC. Pada metode purifikasi dengan metode HPCCC digunakan *n-heptane-ethanol-water* (5:4:1,5 v/v/v) sebagai *solvent system*. Fase bawah akan menjadi fase *mobile* dan fase atas akan menjadi fase stasioner. Kemudian kecepatan rotasi yang digunakan dalam metode HPCCC sebesar 1200 rpm. 2 g ekstrak *Chlorella vulgaris* dipurifikasi menggunakan metode ini dan 60 mg *lutein* diperoleh dengan kemurnian sebesar 92%, kemudian dimurnikan dengan metode GPC diperoleh *lutein* 50 mg dengan kemurnian 97%.



**Gambar 5.** Kromatogram ekstrak *Chlorella vulgaris* (a), fraksi *lutein* setelah separasi dengan HPCC (b), kromatogram *Lutein* standar (c) (Fábryová *et al.*, 2019)

Pada Gambar 5., dapat dilihat kromatogram pigmen *lutein* mikroalga *Chlorella vulgaris* sebelum purifikasi (a), sesudah purifikasi dengan metode HPCCC (b) dan kromatogram *lutein* standar (c). Pada Gambar bagian (a) terdapat beberapa *peak* yang menunjukkan keberadaan pigmen lain pada ekstrak *Chlorella vulgaris* menandakan kemurnian pada ekstrak yang rendah, sedangkan pada Gambar (b) merupakan ekstrak *Chlorella vulgaris* setelah dilakukan purifikasi dengan metode HPCCC menunjukkan hanya terdapat satu *peak* pigmen *lutein* yang dominan menunjukkan kemurnian yang tinggi tanpa adanya pigmen lain. Pada Gambar bagian (c) merupakan *lutein* yang digunakan sebagai standar untuk membandingkan kemurnian larutan.

Pada metode HPCCC pemilihan *solvent system* merupakan langkah terpenting karena sebagian besar proses bergantung pada kerja *solvent system* sebagai *mobile phase* dan *stationary phase*, disisi lain karena metode HPCCC tidak menggunakan fase diam *solid* (Ito, 2005). Beberapa faktor lain yang mempengaruhi optimasi metode HPCCC adalah

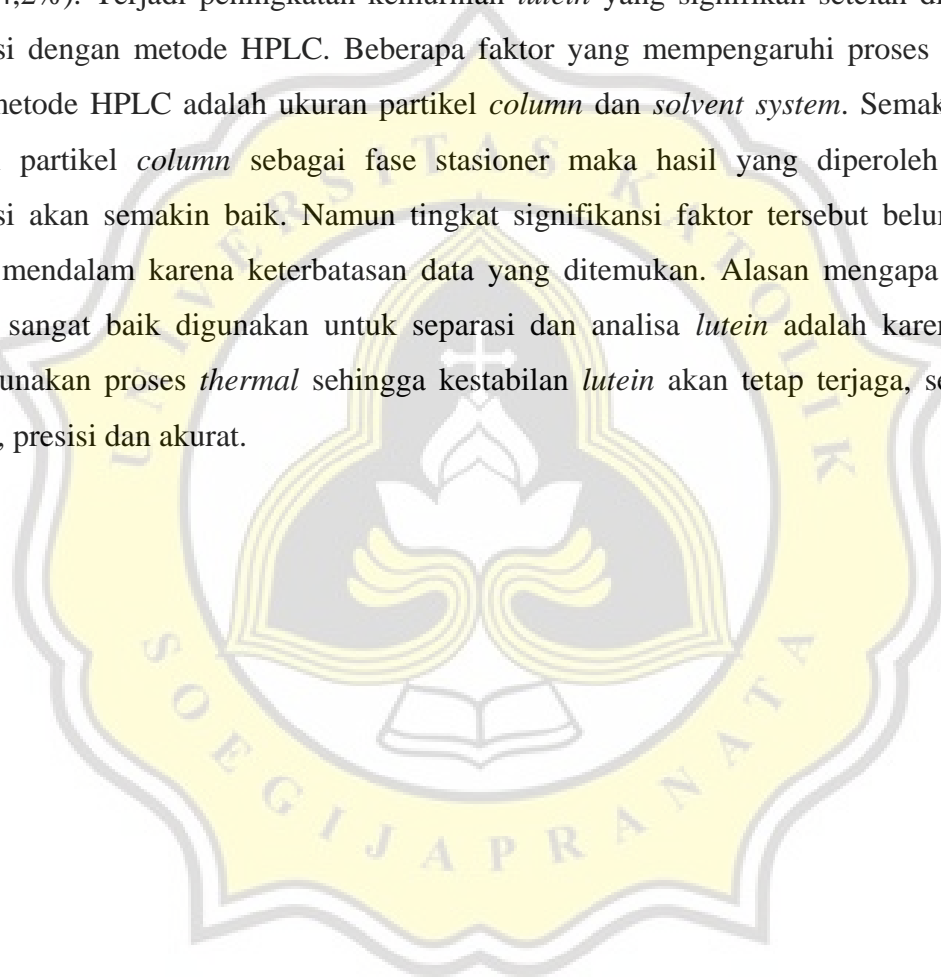
*sample loading* dan kecepatan rotasi namun belum dapat diulas tingkat signifikansi nya terhadap proses purifikasi. Kelebihan dari metode purifikasi HPCCC adalah cepat dan kebutuhan *solvent* sedikit, namun kekurangannya hanya tersedia skala kecil.

Selanjutnya pada penelitian yang dilakukan oleh D'Este *et al.*, (2017) purifikasi dengan kombinasi metode saponifikasi menggunakan larutan alkali dan pelarut organik, pada Tabel 5., dapat dilihat spesies *Chlorella Vulgaris* pada *protocol A* disaponifikasi dengan larutan alkali 10 M KOH *absorbic acid* 2,5% diperoleh kemurnian *lutein* sebesar (70,3%), kemudian disaponifikasi kembali 8,5% *aqueous ethanol* sehingga diperoleh kemurnian (73,6%). Pada *protocol B* saponifikasi dilakukan dengan larutan *ethanolic* KOH 2M diperoleh kemurnian (70,1%) kemudian disaponifikasi dalam 85% *aqueous ethanol* sehingga diperoleh kemurnian (93,7%). Pada *protocol C* saponifikasi menggunakan larutan yang sama dengan *protocol B*, saponifikasi memperoleh kemurnian 71,4% kemudian dilakukan saponifikasi kembali sehingga diperoleh kemurnian 87,4%. Kemurnian tertinggi pada tahap saponifikasi larutan alkali diperoleh pada *protocol C* (71,4%) meskipun perbedaan kemurnian tidak terlalu signifikan dibanding *protocol A* dan *B*. Selanjutnya pada saponifikasi menggunakan pelarut organik *protocol A* dengan 8,5% *aqueous ethanol* memiliki kemurnian terendah (73,6%) dibanding *protocol B* dan *C* (93,7% dan 87,4%) dengan larutan 85% *aqueous ethanol*. Menurut D'Este *et al.*, (2017) memilih rasio *ethanol*-air digunakan untuk memaksimalkan sifat fisikokimia *lutein* pada saat pemisahan dengan senyawa lain. *Lutein* menjadi tidak terlarut dalam air, dan memaksimalkan *ethanol* untuk mengikat *lutein* dalam jumlah yang lebih tinggi.

Saponifikasi dengan larutan alkali belum memberikan hasil yang maksimal, kemurnian tertinggi diperoleh pada *protocol C* sebesar 71,4%. Perbedaan konsentrasi pada larutan alkali juga tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kemurnian *yield lutein*. Kemurnian *lutein* meningkat tinggi setelah dilakukan saponifikasi menggunakan larutan *aqueous ethanol* dengan kemurnian tertinggi diperoleh *protocol B* sebesar 93,7%, perbedaan konsentrasi pada larutan *aqueous ethanol* juga memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kemurnian *lutein* dimana perbandingan larutan *aqueous ethanol* 8,5% dan 85% memperoleh kemurnian berturut-turut sebesar 73,6% dan 93,7%.

Menunjukkan bahwa saponifikasi dengan larutan organik memberikan pengaruh yang lebih baik terhadap kemurnian *lutein* dibanding dengan penggunaan larutan alkali.

Pada Tabel 5.,dapat dilihat penelitian yang dilakukan oleh Chan *et al.*, (2013) metode saponifikasi dikombinasikan dengan *high performance liquid chromatography* (HPLC). Pada penelitian tersebut saponifikasi dilakukan dengan larutan KOH 60% diperoleh kemurnian ( $35,0 \pm 3,4\%$ ) dan dilanjutkan dengan HPLC sehingga diperoleh kemurnian ( $95,0 \pm 4,2\%$ ). Terjadi peningkatan kemurnian *lutein* yang signifikan setelah dilakukan separasi dengan metode HPLC. Beberapa faktor yang mempengaruhi proses separasi pada metode HPLC adalah ukuran partikel *column* dan *solvent system*. Semakin kecil ukuran partikel *column* sebagai fase stasioner maka hasil yang diperoleh selama separasi akan semakin baik. Namun tingkat signifikansi faktor tersebut belum dapat diulas mendalam karena keterbatasan data yang ditemukan. Alasan mengapa metode HPLC sangat baik digunakan untuk separasi dan analisa *lutein* adalah karena tidak menggunakan proses *thermal* sehingga kestabilan *lutein* akan tetap terjaga, selain itu simpel, presisi dan akurat.



**Tabel 5.** *Yield dan Purity Lutein* pada Mikroalga Hijau dengan Berbagai Metode Purifikasi

No	Spesies	Metode 1	Keterangan	Yield	Purity	Metode 2	Keterangan	Yield	Purity	Referensi
1	<i>Chlorella vulgaris</i>	High performance counter-current chromatography (HPCCC)	(n-heptane–ethanol–water, 5:4:1.5, v/v/v), 1200 rpm at 28 °C	60 mg	92%	Gel Permeation chromatography	Sephadex LH-20 gel (stationary phase), acetone (mobile phase) 0.5 mL/min	50 mg	97%	(Fábryová et al., 2019)
2	<i>Chlorella vulgaris</i>	Saponifikasi (protocol A)	2.5 ml of 10 M KOH containing 2.5% (w/v) ascorbic acid	0,31 ± 0,06	70,3%	Saponifikasi	8,5% aqueous ethanol (v/v).	0.20 ± 0.00	73.6%	(D’Este et al., 2017)
3	<i>Chlorella vulgaris</i>	Saponifikasi (protocol B)	2.5 mL of ethanolic KOH 2M (2x)	1,00 ± 0,15	70,1%	Saponifikasi	85% aqueous ethanol	0.69 ± 0.08	93.7%	(D’Este et al., 2017)
4	<i>Chlorella vulgaris</i>	Saponifikasi (protocol C)	2.5 mL of ethanolic KOH 2M (2x)	0,5 ± 0,04	71,4%	Saponifikasi	85% aqueous ethanol	0.41 ± 0.00	87.4%	(D’Este et al., 2017)
5	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Saponifikasi	KOH 60%		35.0 ± 3.4%	High-Performance Liquid Chromatography	Column (4.6 mm × 250 mm), ddH <sub>2</sub> O in methanol 0.05 M ammonium acetate flow rate of 1 ml min		95,0±4,2%	(Chan et al., 2013)