

PURIFIKASI FIKOSIANIN DARI *Spirulina platensis* HASIL INTERVENSI KEMANGI (*Ocimum basilicum*) PADA KONSENTRASI AMONIUM SULFAT BERBEDA

Yuliani*¹, Tri Winarni Agustini², Eko Nurcahya Dewi², Diana Nur Afifah³

¹Program Doktor, Departemen Manajemen Sumber Daya Perairan, Fakultas Perikanan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro, Jalan Prof. Jacub Rais, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia 50275

²Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro, Jalan Prof. Soedarto, SH Tembalang, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia 50275

³Ilmu Gizi, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Jalan Prof. Mr. Sunario, Tembalang, Semarang, Jawa Tengah, Indonesia 50275

Diterima: 9 Maret 2023/Disetujui: 21 Desember 2023

*Korespondensi: yuliyani234@gmail.com

Cara sitasi (APA Style 7th): Yuliani, Agustini, T. W., Dewi, E. N., & Afifah, D. N. (2023). Purifikasi fikosianin dari *Spirulina platensis* hasil intervensi kemangi (*Ocimum basilicum*) pada konsentrasi amonium sulfat berbeda. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 26(3), 448-459. <http://dx.doi.org/10.17844/jphpi.v26i3.46208>

Abstrak

Spirulina platensis merupakan kelompok ganggang hijau biru berserabut yang mengandung senyawa fikobiliprotein. Fikosianin merupakan kompleks pigmen-protein paling tinggi pada fikobiliprotein. Fikosianin memiliki nilai komersial yang paling dominan pada industri makanan, kosmetik maupun obat-obatan. Purifikasi fikosianin merupakan suatu proses peningkatan kemurnian dan salah satu cara untuk meningkatkan aktivitas spesifik fikosianin. *Ocimum basilicum* atau kemangi adalah tumbuhan yang mengandung azulena yang merupakan senyawa hidrokarbon aromatik berwarna biru. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan pengaruh intervensi kemangi dan tingkat saturasi pengendapan amonium sulfat pada proses purifikasi fikosianin *S. platensis* terhadap indeks kemurnian, kandungan fikosianin, *recovery*, dan total protein. Metode purifikasi fikosianin yang digunakan adalah metode *multistep* yang terdiri dari ekstraksi *S. platensis* tanpa intervensi dan intervensi kemangi, pengendapan dengan amonium sulfat pada tingkat saturasi (0-20%), (20-50%), (50-70%), (70-90%), dan ultrafiltrasi (DF/UF). Hasil penelitian menunjukkan tingkat saturasi terbaik pada tahap purifikasi dengan pengendapan amonium sulfat untuk sampel tanpa intervensi sebesar 50% dan intervensi sebesar 70%. Fikosianin hasil intervensi kemangi memiliki nilai kemurnian dan kandungan fikosianin yang lebih tinggi dibandingkan sampel tanpa intervensi pada setiap tahapan purifikasi. Nilai kemurnian pada tahap purifikasi akhir sebesar 2,54 AU untuk sampel tanpa intervensi dan 2,57 AU untuk sampel intervensi kemangi. Perlakuan intervensi maupun tanpa intervensi daun kemangi pada *S. platensis* dapat menurunkan nilai *recovery* dan total protein pada setiap tahap purifikasi.

Kata kunci: biomarker, ekstraksi, *recovery*, saturasi, ultrafiltrasi

Purification of Phycocyanin from *Spirulina platensis* with Basil (*Ocimum basilicum*) Intervention on Different Ammonium Sulphate Concentration

Abstract

Spirulina platensis is a filamentous cyanobacterium that contains phycobiliprotein compounds. Phycocyanin is the most prevalent phycobiliprotein pigment-protein complex and possesses the greatest commercial value in the food, cosmetic, and pharmaceutical sectors. The specific activity of phycocyanin can be enhanced through purification, which aims to increase its level of purity. Basil, scientifically known as *Ocimum basilicum*, is a plant that possesses azulene, a blue aromatic hydrocarbon. The purpose of this study was to investigate the impact of basil intervention and saturation level of ammonium sulfate deposition on the purity index, phycocyanin content, *recovery*, and total protein in the *S. platensis* phycocyanin purification

process. The purification method utilized for phycocyanin involves a multistep process, which includes the extraction of *S. platensis* without any intervention or basil intervention, followed by precipitation with ammonium sulfate at different saturation levels ranging from 0-20%, 20-50%, 50-70%, and 70-90%, and ultrafiltration using DF/UF. The findings indicated that the optimal saturation level for samples without intervention at the purification stage involving ammonium sulfate precipitation was 50%, whereas for samples with intervention, the optimal level was 70%. The findings revealed that the phycocyanin obtained through basil intervention exhibited superior purity and phycocyanin content compared to the samples that did not undergo intervention at every stage of purification. The purity value at the final stage of purification was 2.54 AU for the samples that did not receive any intervention, and 2.57 AU for the basil intervention samples. Basil intervention treatment has been shown to significantly decreased the recovery value by 47.39% and the total phycocyanin protein by 12.5% in samples without intervention. Additionally, the intervention or non-intervention treatment of basil leaves on *S. platensis* reduced the recovery value and total protein content at each purification stage.

Keywords: biomarker, extraction, recovery, saturation, ultrafiltration

PENDAHULUAN

Spirulina platensis merupakan mikroalga spesies cyanobacteria berserabut yang mengandung senyawa fikobiliprotein. Fikobiliprotein adalah pigmen berwarna biru yang berikatan silang dengan protein (Mysliwa-Kurdziel & Solymosi, 2017; Park *et al.*, 2018). Senyawa bioaktif dari *S. platensis* yang termasuk dalam fikobiliprotein dan berperan sebagai antioksidan alami salah satunya, yaitu fikosianin (Anvar & Nowruji, 2021; Bortolini *et al.*, 2022).

Fikosianin memiliki nilai komersial yang sangat besar sebagai pewarna alami pada industri pangan, kosmetik, nutrasetikal, dan *pharmaceutical* (Kuddus *et al.*, 2013). Kelemahan fikosianin, yaitu stabilitas yang rendah, sensitif terhadap pH, suhu, dan oksigen (Mauliasari *et al.*, 2019). Inovasi dalam peningkatan kandungan fikosianin dan karakteristik yang sesuai saat proses pemurnian sangat diperlukan. Yuliani *et al.* (2021) menyatakan intervensi *O. basilicum* pada *S. platensis* dapat mengurangi senyawa volatil, yaitu geosmin dan 2-methylisoborneol serta meningkatkan kandungan fikosianin. Kemangi (*O. basilicum*) mengandung senyawa azulene yang memiliki efek sinergis terhadap kandungan fikosianin pada *S. platensis* (Hadiani *et al.*, 2019; Agustini *et al.*, 2019; Yuliani *et al.*, 2021).

Purifikasi fikosianin merupakan salah satu cara untuk meningkatkan aktivitas spesifik protein fikosianin. Metode purifikasi fikosianin dapat dilakukan secara *single step* (Amarante *et al.*, 2020) maupun *multiple step*

(Kumar *et al.*, 2014; Figueira *et al.*, 2018). *Single step* merupakan pemurnian dengan satu tahap dan *multiple step* merupakan pemurnian dengan beberapa tahap. Metode purifikasi dapat dilakukan melalui beberapa cara, yaitu ekstraksi, pengendapan dengan amonium sulfat, ultrafiltrasi, dan kromatografi.

Metode purifikasi *multiple step* memiliki kelebihan, yaitu nilai industri dan komersial yang tinggi (Figueira *et al.*, 2018). Purifikasi fikosianin saat ini banyak dilakukan dari mikroalga *S. platensis*, namun belum pernah ada yang melaporkan purifikasi fikosianin *S. platensis* dengan intervensi kemangi serta tingkat saturasi yang optimal pada proses pengendapan dengan amonium sulfat. Metode pengendapan menggunakan amonium sulfat merupakan teknik pemurnian yang dapat mempertahankan kestabilan protein fikosianin (Wingfield, 2001). Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan pengaruh intervensi kemangi dan tingkat saturasi pengendapan amonium sulfat pada proses purifikasi fikosianin *S. platensis* terhadap indeks kemurnian, kandungan fikosianin, *recovery*, dan total protein.

BAHAN DAN METODE

Preparasi Sampel

Serbuk *S. platensis* diperoleh dari Balai Besar Perikanan Budi Daya Air Payau (BBPAP), Jepara, Jawa Tengah. Daun kemangi diperoleh di sentra penanaman kemangi daerah Ciareteun Ilir, Bogor. Preparasi sampel memodifikasi penelitian yang dilakukan oleh Agustini *et al.* (2019), yaitu serbuk *S. platensis* dicampurkan dengan ekstrak kemangi (1:4,

b/v) yang bertujuan untuk meningkatkan kandungan fikosianin. Ekstrak kemangi diperoleh melalui proses ekstraksi dengan cara menumbuk simplisia yang ditambahkan dengan pelarut akuades (10:1, b/v), kemudian disaring menggunakan kain blacu. Serbuk *S. platensis* dan ekstrak kemangi yang telah dicampur selanjutnya dilakukan pengeringan menggunakan *freeze drying* (Buchi Lyavapor L-200, Switzerland) pada suhu *collector* -50°C, volume 500 mL, dan tekanan vakum 0,5 bar selama 48 jam.

Ekstraksi Fikosianin

Ekstraksi fikosianin dilakukan dengan memodifikasi penelitian yang dilakukan oleh Silviera *et al.* (2007). Serbuk *S. platensis* tanpa intervensi dan dengan intervensi *O. basilicum* dilakukan maserasi dingin selama 24 jam pada suhu 4°C menggunakan *buffer* fosfat 10 mM pH 7 dengan perbandingan 1:20 (b/v). Larutan dilakukan sonikasi untuk memecah dinding sel *S. platensis* selama 20 menit pada suhu 25°C, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh selanjutnya dipurifikasi secara bertahap.

Purifikasi Fikosianin Pengendapan dengan amonium sulfat

Fikosianin hasil ekstraksi ditambahkan amonium sulfat dengan tingkat saturasi (0-20%), (20-50%), (50-70%), dan (70-90%) di atas pengaduk magnet (RETSCH GmbH, Germany) selama 30 menit pada suhu 4°C lalu disentrifugasi (Universal 320R, Hettich) dengan kecepatan 6.000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh dilakukan pengendapan pada tingkat saturasi (20-50%), yang dilanjutkan dengan tingkat saturasi (50-70%), dan (70-90%), kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Endapan yang diperoleh selanjutnya dilarutkan dalam bufer fosfat 10 mM pH 7,0 (Silva *et al.*, 2009).

Ultrafiltrasi (diafiltrasi/ultrafiltrasi)

Proses ultrafiltrasi memodifikasi metode yang dilakukan oleh Figueira *et al.* (2018). Hasil pengendapan amonium

sulfat dilakukan ultrafiltrasi menggunakan membran hidrofilik polietersulfon 50 kDa. Proses ini dilakukan pada suhu 4°C dan tekanan gas 1,0 kgf/cm². Proses dilakukan dengan mode diafiltrasi/ultrafiltrasi melalui 6 siklus diafiltrasi sebelum konsentrasi ekstrak dalam mode ultrafiltrasi dengan waktu 40 menit untuk setiap siklusnya. Diafiltrasi dilakukan dengan menambahkan larutan hasil filtrasi ke dalam volume retentat dengan laju alir permeat yang sama sehingga volume retentat tetap konstan. Fluks permeat ditentukan dengan mengukur volume permeat yang dikumpulkan dalam waktu tertentu (Nisticò *et al.*, 2022).

Analisis kadar fikosianin, kemurnian, dan recovery

Pengujian kadar fikosianin dan kemurnian menggunakan metode yang dilakukan oleh Abalde *et al.* (1998) dan Silveira *et al.* (2007) dengan mengukur absorbansi sampel sebanyak 4 mL menggunakan spektrofotometer UV-Vis (SHIMADZU UVmini 1240) pada panjang gelombang 620, 652, dan 280 nm. Kemurnian fikosianin dapat ditentukan dari rasio kemurnian dengan mengukur nilai absorbansi fikosianin pada 620 nm dan nilai absorbansi protein pada 280 nm. *Recovery* setiap tahap dihitung dengan membagi kadar fikosianin dan volume pada tahap tersebut dengan kadar fikosianin dan volume pada tahap awal. Perhitungan kadar fikosianin, kemurnian, dan *recovery* dilakukan sebagai berikut:

$$\text{Konsentrasi fikosianin (mg/mL)} = \frac{(\text{Absorbansi } 620 - 0,474(\text{Absorbansi } 652))}{5,34}$$

$$\text{Kemurnian ekstrak} = \frac{\text{Absorbansi } 620}{\text{Absorbansi } 280}$$

$$\text{Recovery (\%)} =$$

$$\frac{\text{Konsentrasi fikosianin (mg/mL)} \times \text{volume akhir (mL)}}{\text{Konsentrasi fikosianin ekstrak awal (mg/mL)} \times \text{volume awal (mL)}}$$

Analisis Total Protein

Pengujian kadar protein menggunakan metode Bradford (1976). Larutan yang perlu disiapkan, yaitu larutan standar bovin serum albumin (BSA) dan larutan sampel. Larutan stok standar konsentrasi 1.000 ppm dibuat

dengan melarutkan 0,01 g BSA menggunakan 10 mL aseton 10%, kemudian dibuat seri larutan standar menjadi deret konsentrasi 100, 80, 60, 40, dan 20 ppm. Larutan standar dimasukkan ke dalam *microtube* sebanyak 20 µL dan ditambah dengan dengan 1.000 µL reagen Bradford. Larutan dihomogenkan menggunakan vortex dan diinkubasi selama 10 menit, selanjutnya dibaca pada panjang gelombang 595 nm menggunakan spektrofotometer. Pengujian total protein sampel dilakukan terhadap serbuk *S. platensis* dan *S. platensis* hasil intervensi dengan kemangi. Larutan sampel 0,1 mL ditambah 1 mL aseton 10% dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Kadar protein ditentukan menggunakan rumus linier yang diperoleh dari kurva standar.

Analisis Data

Rancangan percobaan menggunakan rancangan acak kelompok lengkap (RAKL) dengan 2 faktor dan tiga kali ulangan. Data yang diperoleh diuji kesamaan ragamnya dengan uji Bartlett dan keaditifitasnya dengan uji Tukey. Analisis sidik ragam digunakan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perlakuan. Apabila nilai $p < 0,05$ maka dilakukan uji lanjut menggunakan uji Duncan *Multiple Range Test* pada taraf 5%. Data diolah dengan perangkat lunak SPSS 22.

HASIL DAN PEMBAHASAN
Kemurnian Fikosianin pada Proses Pengendapan dengan Amonium Sulfat

Fikosianin yang dihasilkan dari tahap ekstraksi merupakan pigmen yang

masih berikatan dengan berbagai macam protein lainnya, sehingga dilakukan optimasi pengendapan menggunakan amonium sulfat untuk mendapatkan fikosianin yang lebih murni. Hasil kemurnian fikosianin pada proses pengendapan dengan amonium sulfat dapat dilihat pada *Table 1*. Tingkat saturasi berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap nilai kemurnian sampel tanpa intervensi dan dengan intervensi kemangi dalam mengendapkan fikosianin.

Indeks kemurnian fikosianin yang tinggi menunjukkan pengendapan fikosianin yang optimal (Song *et al.*, 2013). Hasil penelitian menunjukkan sampel intervensi mengendap pada tingkat saturasi 50-70%, sedangkan sampel tanpa intervensi mengendap pada tingkat saturasi 20-50%. Perbedaan tingkat saturasi kedua sampel dipengaruhi oleh kadar asam amino yang berbeda antar sampel. Perbedaan kadar asam amino ini dapat mengendap pada tingkat kekuatan ion yang berbeda. Semakin besar amonium sulfat yang diperlukan untuk mengendapkan protein berarti kandungan asam amino semakin banyak yang bersifat hidrofilik (Karso *et al.*, 2014). Asam amino hidrofilik pada *S. platensis* dengan intervensi kemangi antara lain serin 29.809,61 ppm, treonin 31.698,10 ppm, dan tirosin 30.689,23 ppm (Agustini *et al.*, 2019). Berdasarkan aplikasinya, kemurnian fikosianin digolongkan menjadi 4 tingkatan, yaitu *food grade* (> 7,0), *cosmetic grade* (1,5-2,5), *biomarker* (2,5-3,5), dan *analytical grade* (> 4,0) (Sala *et al.*, 2018; Figueira *et al.*, 2018).

Beberapa penelitian menggunakan metode pengendapan amonium sulfat sebagai langkah awal purifikasi fikosianin untuk mendapatkan kemurnian yang lebih

Table 1 Purity of *S. platensis* phycocyanin without and with basil intervention at different saturation levels

Tabel 1 Kemurnian fikosianin *S. platensis* tanpa dan dengan intervensi kemangi pada tingkat saturasi berbeda

Saturation level of amonium sulphate (%)	Without basil intervention	With basil intervention
0-20	0.77±0.01 ^a	0.98±0.01 ^a
20-50	1.89±0.01 ^b	1.87±0.03 ^b
50-70	0.41±0.05 ^a	2.07±0.02 ^b
70-90	0.09±0.05 ^a	0.13±0.02 ^a

Different lowercase letters indicate significant differences ($p < 0,05$)

tinggi (Kumar *et al.*, 2014; Figueira *et al.*, 2018). Prinsip dari pengendapan amonium sulfat, yaitu pengawagasan salinitas (*salting out*). Penambahan amonium sulfat dengan konsentrasi tinggi mendorong agregasi yang akan menyebabkan molekul air tertarik ke ion-ion garam sehingga mengurangi interaksi dengan protein. Hal ini mengakibatkan terjadinya interaksi hidrofobik antar sesama molekul protein sehingga dapat mengendapkan protein (Duong-Ly & Gabelli, 2014). Kemampuan garam untuk menstabilkan protein dalam larutan dikenal sebagai deret hofmeister. Amonium sulfat berdasarkan deret hofmeister dapat menstabilkan struktur asli protein, sehingga menyebabkan protein mengendap (Kang *et al.*, 2020). Deret hofmeister juga memiliki arah terbalik dengan mengubah sifat gugus permukaan fungsional dari hidrofobik menjadi hidrofilik melalui peningkatan konsentrasi garam, sehingga menstabilkan struktur protein (Schwierz *et al.*, 2016).

Ultrafiltrasi

Tahap ultrafiltrasi dilakukan setelah tahap pengendapan dengan amonium sulfat yang bertujuan untuk menghilangkan sisa garam amonium sulfat. Sampel tanpa intervensi kemangi dilakukan ultrafiltrasi setelah pengendapan dengan tingkat saturasi

50%. Sampel dengan intervensi kemangi dilakukan ultrafiltrasi setelah pengendapan dengan tingkat saturasi 70%. Nilai fluks permeat pada filtrasi sampel intervensi lebih tinggi dibandingkan nilai fluks permeat tanpa intervensi. Hal ini dapat dipengaruhi karena senyawa aktif pada kemangi memiliki berat molekul di bawah 50 kDa, sehingga laju permeat berlangsung lebih cepat. Penurunan fluks permeat terjadi seiring bertambahnya waktu dan cenderung stabil pada siklus 4 diafiltrasi hingga siklus terakhir. Hasil ultrafiltrasi melalui pengamatan fluks permeat dapat dilihat pada *Figure 1*.

Nilai fluks menentukan jumlah permeat yang dapat dilewatkan oleh membran tiap satuan luas per satuan waktu. Hasil proses ultrafiltrasi oleh membran UF dan 6 langkah siklus diafiltrasi (DF) dapat meningkatkan kemurnian yang dapat diaplikasikan sebagai *biomarker*. Figueira *et al.* (2018) melaporkan bahwa hasil proses ultrafiltrasi (DF/UF) yang dilakukan setelah proses pengendapan dengan amonium sulfat dapat diaplikasikan sebagai pewarna kosmetik. Brião *et al.* (2020) juga melaporkan bahwa purifikasi fikosianin menggunakan membran ultrafiltrasi dilakukan untuk menyederhanakan langkah purifikasi. Proses ini menggunakan bufer fosfat sebagai pelarut untuk ekstraksi yang diikuti oleh membran DF/UF. Hasil kemurnian fikosianin

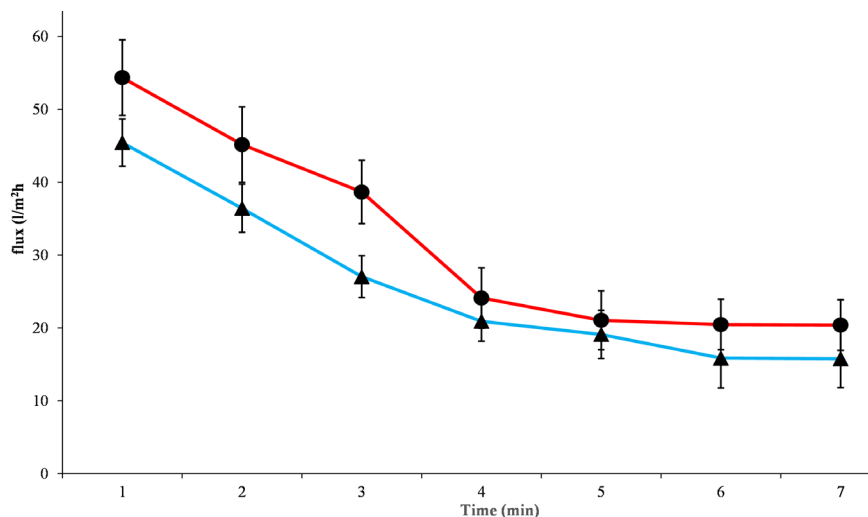


Figure 1 The permeate flux of (DF/UF) ultrafiltration on phycocyanin without intervention and with basil intervention (●: with intervention, ▲: without intervention)

Gambar 1 Fluks permeat ultrafiltrasi (DF/UF) fikosianin tanpa intervensi dan intervensi kemangi (●: dengan intervensi, ▲: tanpa intervensi)

yang diperoleh dari proses DF/UF dapat diaplikasikan pada produk pangan. Balti *et al.* (2021) melaporkan bahwa pemurnian melalui membran UF 20 kDa yang dikombinasikan dengan DF dapat meningkatkan kemurnian fikosianin dari *A. platensis*.

Ketampakan

S. platensis tanpa intervensi kemangi memiliki warna dominan hijau, disebabkan adanya kandungan pigmen klorofil pada *S. platensis*. *S. platensis* hasil intervensi dengan kemangi berwarna hijau gelap. Hal ini karena ekstrak kemangi cenderung berwarna hijau pekat. Fikosianin hasil purifikasi *S. platensis* tanpa dan dengan intervensi kemangi memiliki warna biru terang yang cenderung

sama. Hal ini diperkuat pada hasil pengujian kadar fikosianin tanpa dan dengan intervensi kemangi tidak berbeda nyata secara statistik. Ketampakan serbuk *S. platensis* hasil intervensi kemangi dan fikosianin hasil pemurnian dapat dilihat pada *Figure 2*.

Profil Kemurnian, Kadar Fikosianin, Recovery, dan Total Protein

Perlakuan tanpa intervensi dan intervensi kemangi pada *S. platensis* tidak berpengaruh nyata ($p > 0,05$) terhadap nilai kemurnian fikosianin pada tahap ekstraksi, pengendapan dengan amonium sulfat, dan ultrafiltrasi DF/UF. Hasil analisis kemurnian pada setiap tahap purifikasi dapat dilihat pada *Table 2*.

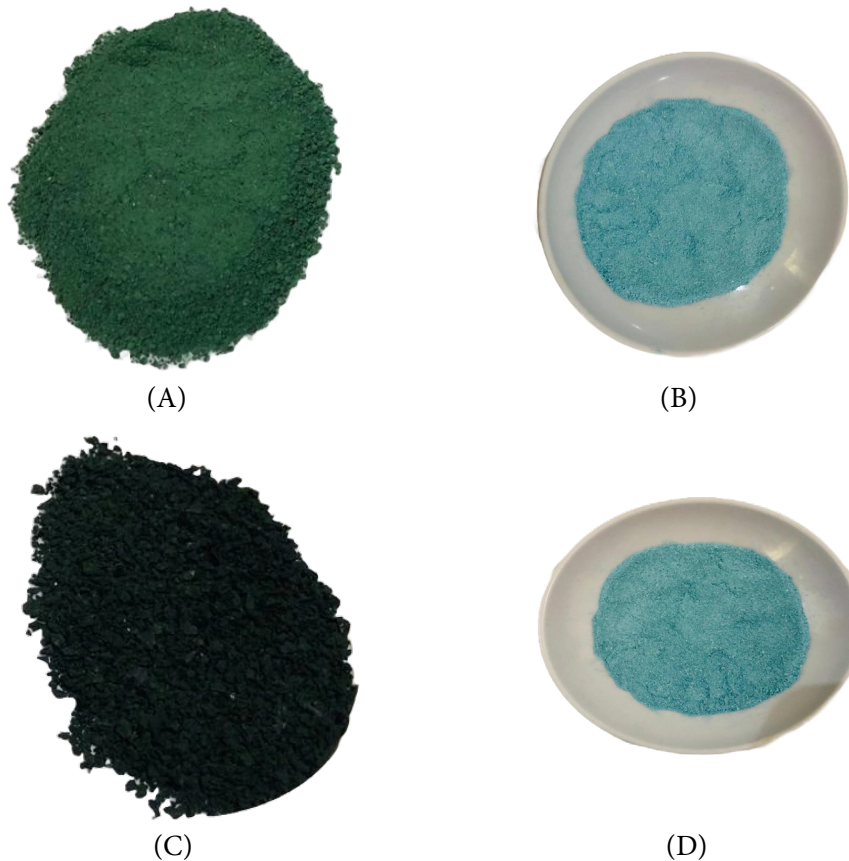


Figure 2 (A) Visualization of *S. platensis* powder without intervention; (B) phycocyanin powder resulting from purification of *S. platensis* without intervention; (C) *S. platensis* powder with basil intervention; (D) phycocyanin powder resulting from purification of *S. platensis* with basil intervention

Gambar 2 (A) Visualisasi serbuk *S. platensis* tanpa intervensi; (B) serbuk fikosianin hasil pemurnian *S. platensis* tanpa intervensi; (C) serbuk *S. platensis* dengan intervensi kemangi; (D) serbuk fikosianin hasil pemurnian *S. platensis* dengan intervensi kemangi

Table 2 Purity, phycocyanin content, recovery, and total protein of *S. platensis* without and with basil interventionTabel 2 Kemurnian, kandungan fikosianin, *recovery*, dan total protein fikosianin *S. platensis* tanpa dan dengan intervensi kemangi

Response	Treatment	Purity (A620/A280) (AU)	Phycocyanin content (mg/mL)	Recovery (%)	Total protein (mg/mL)
Extraction	Without intervention	0.64±0.01 ^a	0.25±0.01 ^a	100.00±0.00 ^a	380.7±2.31 ^b
	With intervention	0.96±0.01 ^a	0.42±0.01 ^b	100.00±0.00 ^a	248.0±2.00 ^a
Amonium sulphate precipitation	Without intervention	1.90±0.02 ^a	0.24±0.00 ^a	94.99±4.37 ^a	255.3±3.06 ^b
	With intervention	2.02±0.03 ^a	0.26±0.01 ^a	62.05±2.60 ^a	231.3±1.20 ^a
Ultrafiltration (DF/UF)	Without intervention	2.54±0.02 ^a	0.18±0.00 ^a	71.94±4.46 ^b	223.3±3.06 ^b
	With intervention	2.57±0.04 ^a	0.22±0.01 ^a	52.61±1.50 ^a	217.0±1.20 ^a

Different lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$)

Fikosianin dapat dimanfaatkan dalam berbagai industri tergantung tingkat kemurnian. Nilai kemurnian pada tahap ekstraksi pada penelitian ini dapat digunakan sebagai pewarna makanan. Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Rito-Palomares *et al.* (2001), kemurnian fikosianin yang lebih rendah dari 0,7 AU dapat diaplikasikan sebagai pewarna makanan. Fikosianin sebagai pewarna makanan biru alami telah diterapkan pada berbagai produk susu (Nefasa *et al.*, 2020), yogurt (Arslan & Aksay, 2021), permen jeli (Dewi *et al.*, 2018), es krim (Rodrigues *et al.*, 2019; Amarante *et al.*, 2020), dan minuman García *et al.*, 2021). Fikosianin bersifat kurang stabil pada kondisi panas, asam, dan cahaya, sehingga penggunaannya terbatas pada produk pangan (Pandey *et al.*, 2013; Newsome *et al.*, 2014; Kannaujiya *et al.*, 2019). Mikroenkapsulasi menjadi salah satu solusi dari ketidakstabilan fikosianin. Mikroenkapsulasi dilakukan untuk melindungi senyawa yang sensitif. Teknologi ini banyak digunakan sebagai cara untuk pengembangan pangan fungsional (Choudhury *et al.*, 2021).

Pengendapan dengan amonium sulfat digunakan untuk proses awal purifikasi pada

fikosianin yang bertujuan untuk meningkatkan kemurnian. Hasil kemurnian fikosianin pada tahap pengendapan dengan amonium sulfat menunjukkan bahwa sampel tanpa intervensi dan intervensi dapat digunakan sebagai pewarna kosmetik. Kemurnian fikosianin dengan nilai lebih dari 1,5 AU dapat digunakan sebagai pewarna kosmetik (Sala *et al.*, 2018; Lauceri *et al.*, 2019). Ekstrak fikosianin, fikoeritrin, dan allofikosianin ganggang hijau biru dapat digunakan untuk perawatan kulit. Senyawa aktif tersebut memiliki kandungan antioksidan yang dapat melindungi kulit dari kerusakan akibat degradasi komponen matriks dermis sehingga berpotensi sebagai anti penuaan (Morone *et al.*, 2022).

Purifikasi dengan ultrafiltrasi (DF/UF) dilakukan setelah pengendapan dengan amonium sulfat. Fikosianin hasil ultrafiltrasi (DF/UF) dapat digunakan sebagai *biomarker*. Nilai kemurnian fikosianin yang diperoleh setelah proses ultrafiltrasi diklasifikasikan sebagai *grade biomarker* dengan rentang 2,5-3,5 AU (Antecka *et al.* 2022). Kemurnian fikosianin pada tahap ultrafiltrasi dapat dipengaruhi oleh membran yang digunakan. Membran PESU dapat meningkatkan kemurnian fikosianin lebih dari 3,0 AU

sehingga dapat digunakan sebagai *biomarker* dalam tes biomedis (Figueira *et al.*, 2018; Amarante *et al.*, 2020). *S. platensis* mengandung senyawa fikobiliprotein yang berperan sebagai agen fluoresen. Sifat fluoresen pada fikosianin dapat diaplikasikan dalam *biomarker* stres oksidatif (Garcia-Pliego *et al.*, 2021).

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa perlakuan tanpa intervensi dan intervensi kemangi pada *S. platensis* berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap kandungan fikosianin pada tahap ekstraksi, namun tidak berpengaruh nyata pada tahap pengendapan amonium sulfat dan ultrafiltrasi (DF/UF) sesuai pada *Table 2*. Kandungan fikosianin intervensi dengan kemangi lebih tinggi dibandingkan fikosianin tanpa intervensi. Ekstrak kemangi memiliki kandungan senyawa azulene yang dapat meningkatkan kandungan fikosianin pada sampel intervensi. Yamaguchi *et al.* (2016) menjelaskan bahwa azulene merupakan senyawa hidrokarbon biru yang memiliki momen dipol kuat. Kadar fikosianin setelah dilakukan purifikasi pada tahap pengendapan dengan amonium sulfat maupun ultrafiltrasi (DF/UF) mengalami penurunan yang signifikan dibandingkan hasil tahap ekstraksi. Penurunan ini dapat disebabkan karena banyaknya senyawa kontaminan yang berasal dari kemangi yang menyerupai fikosianin sehingga setelah dilakukan purifikasi lebih lanjut senyawa tersebut tereliminasi. Nasution *et al.* (2018) menjelaskan bahwa purifikasi sangat penting dilakukan karena adanya beberapa senyawa kontaminan yang dapat memengaruhi aktivitas enzim. Enzim yang bersifat kontaminan memiliki kemampuan yang mirip dengan enzim target namun menghasilkan produk yang berbeda atau tidak diinginkan.

Song *et al.* (2013) melaporkan bahwa purifikasi dapat menurunkan kadar fikosianin, tetapi juga dapat meningkatkan kemurnian dari fikosianin. Sampel *S. platensis* dengan intervensi kemangi memiliki kadar fikosianin lebih tinggi dibandingkan sampel tanpa intervensi untuk semua tahapan purifikasi. Hal ini menandakan intervensi kemangi dapat meningkatkan kadar fikosianin karena adanya kandungan azulene. Senyawa aromatik azulene yang terkandung pada

kemangi sebesar (1,6%) (El-Soud *et al.*, 2015). Senyawa ini dapat bereaksi dengan substitusi elektrofilik serta menyumbangkan elektron ke akseptor (Razus, 2023).

Total protein berdasarkan hasil uji statistik menunjukkan bahwa perlakuan tanpa intervensi dan intervensi kemangi berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap total protein fikosianin sesuai pada *Table 2*. Total protein fikosianin mengalami penurunan pada setiap tahap pemurnian. Total protein sampel tanpa intervensi (32,9%) dan intervensi (6,81%) pada tahap pengendapan dengan amonium sulfat mengalami penurunan dari tahap ekstraksi. Total protein pada tahap pengendapan amonium sulfat ke tahap ultrafiltrasi mengalami penurunan masing-masing 12,53% dan 6,18%. Total protein fikosianin dari sampel tanpa intervensi lebih tinggi dibandingkan sampel dengan intervensi untuk semua tahap purifikasi. Penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa intervensi kemangi yang dikeringkan maupun dilakukan mikroenkapsulasi dapat menurunkan kandungan total protein 19,87% dan 74% (Yuliani *et al.*, 2019). Hal ini disebabkan senyawa aromatik yang terdapat pada kemangi, yaitu linalool dapat mendenaturasi protein serta memiliki aktivitas antimikroba alami (Camargo & Vanconcelos, 2014; Su *et al.*, 2022), sehingga dapat menurunkan kadar protein pada sampel dengan intervensi.

Recovery atau pemulihan fikosianin untuk mengetahui titik kehilangan fikosianin terbesar dari setiap tahap purifikasi. Persentase *recovery* berdasarkan hasil uji statistik menunjukkan bahwa perlakuan intervensi kemangi tidak berpengaruh nyata ($p > 0,05$) terhadap *recovery* fikosianin pada tahap ekstraksi dan pengendapan dengan amonium sulfat, namun berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap hasil *recovery* fikosianin pada tahap ultrafiltrasi (DF/UF) sesuai pada *Table 2*. Nilai *recovery* mengalami penurunan pada setiap tahap purifikasi. *Recovery* sampel tanpa intervensi dan dengan intervensi kemangi pada tahap pengendapan dengan amonium sulfat mengalami penurunan sebesar 5,01% dan 37,95% dari tahap ekstraksi, sedangkan tahap pengendapan amonium sulfat ke tahap

ultrafiltrasi mengalami penurunan 24,26% dan 5,24%. Penurunan pemulihan fikosianin diikuti dengan peningkatan indeks kemurnian fikosianin. Semakin besar penurunan *recovery* fikosianin suatu tahap purifikasi maka semakin besar peningkatan kemurnian fikosianin. Penurunan *recovery* fikosianin dari 95% menjadi 56% dapat meningkatkan penggunaan dari pewarna kosmetik menjadi kelas analitik (Figueira *et al.*, 2018).

KESIMPULAN

Intervensi daun kemangi pada bubuk *S. platensis* berpengaruh terhadap kandungan fikosianin pada tahap ekstraksi, *recovery* pada tahap ultrafiltrasi (DF/UF) dan total protein pada setiap tahap purifikasi. Perlakuan intervensi maupun tanpa intervensi daun kemangi pada *S. platensis* dapat menurunkan nilai *recovery* dan total protein pada setiap tahap purifikasi. Fikosianin yang dihasilkan dapat digunakan sebagai *biomarker*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jendral, Pendidikan Tinggi, Riset Dan Teknologi atas pendanaan penelitian pada program Pendidikan Magister Menuju Doktor Sarjana Unggul (PMDSU) pada tahun 2019.

DAFTAR PUSTAKA

- Abalde, J., Betancourt, L., Torres, E., Cid, A., & Barwell, C. (1998). Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. *Plant Science*, 136(1), 109–120. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00113-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00113-7)
- Agustini, T. W., Dewi, E. N., Amalia, U., & Kurniasih, R.A. (2019). Application of basil leaf extracts to decrease *Spirulina platensis* off-odour in increasing food consumption. *International Food Research Journal*, 26(6), 1789-1794.
- Amarante, M. C. A., Braga, A. R. C., Sala, L., & Kalil, S. J. (2020). Colour stability and antioxidant activity of C-phycocyanin-added ice creams after in vitro digestion. *Food Research International*, 137, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109602>
- Antecka, A., Klepacz-Smółka, A., Szela, R., Pietrzyk, D., & Ledakowicz, S. (2022). Comparison of three methods for thermostable C-phycocyanin separation and purification. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 171, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2021.108563>
- Anvar, A. A., & Nowruzi, B. (2021). Bioactive properties of *Spirulina*: A review. *Microbial Bioactives*, 4, 134-142. <http://dx.doi.org/10.25163/microbbioacts.412117B0719110521>
- Arslan, R., & Aksay, S. (2021). Investigation of sensorial and physicochemical properties of yoghurt colored with phycocyanin of *Spirulina platensis*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(6), 1-5. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15941>
- Balti, R., Zayoud, N., Hubert, F., Beaulieu, L., & Massé, A. (2021). Fractionation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) water soluble proteins by membrane diafiltration. *Separation and Purification Technology*, 256, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117756>
- Brião, V. B., Sbeghen, A. L., Colla, L. M., Castoldi, V., Seguenka, B., Schimidt, G.D., & Costa, J.A.V. (2020). Is downstream ultrafiltration enough for production of food-grade phycocyanin from *Arthrospira platensis*? *Journal of Applied Phycology*, 32, 1129–1140. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-02006-1>
- Bortolini, D. G., Maciel, G. M., Fernandes, I. D. A. A., Pedro, A. C., Rubio, F. T. V., Brancod, I. G., & Haminiuk, C. W. I. (2022). Functional properties of bioactive compounds from *Spirulina* spp.: Current status and future trends. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 5, 1-12. <https://doi.org/10.1016%2Fj.fochms.2022.100134>
- Bradford, N. A. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- Camargo, S. B., & Vasconcelos, D. F. S. A. D. (2014). Atividades biológicas de Linalol: conceitos atuais e possibilidades futuras deste monoterpeno. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 13(3), 381-387. <http://dx.doi.org/10.9771/cmbio.v13i3.12949>
- Choudhury, N., Meghwal, M., & Das, K. (2021). Microencapsulation: An overview on concepts, methods, properties and applications in foods. *Food Frontiers*, 2(4), 426-442.
- Dewi, E. N., Kurniasih, R. A., & Purnamayati, L. (2018, Oktober 2-4). The application of microencapsulated phycocyanin as a blue natural colorant to the quality of jelly candy. [Conference session]. 3rd International Conference on Tropical and Coastal Region Eco development 2017 2-4 October, Yogyakarta Indonesia. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. <http://doi.org/10.1088/1755-1315/116/1/012047>
- Duong-Ly K. C., & Gabelli S. B. (2014). Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods Enzymol*, 541, 85-94. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4>
- El-Soud, N. H. A., Deabes, M., El-Kassem, L.A., & Khalil, M. (2015). Chemical composition and antifungal activity of *Ocimum basilicum* L. essential oil. *Journal of Medical Science*, 3(3), 374-379. <https://doi.org/10.3889%2Ffoamjms.2015.082>
- Figueira, F. S., Moraes, C. C., & Kalil, S. J. (2018). C-phycocyanin purification: multiple processes for different applications. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 35(3), 1117-1128. <http://dx.doi.org/10.1590/0104-6632.20180353s20170160>
- García, A. B., Longo, E., & Bermejo, R. (2021). The application of a phycocyanin extract obtained from *Arthrospira platensis* as a blue natural colorant in beverages. *Journal of Applied Phycology*, 33(5), 3059-3070. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02522-z>
- García-Pliego, E., Franco-Colin, M., Rojas-Franco, P., Blas-Valdivia, V., Serrano-Contreras, J. I., Pentón-Rol, G., & Cano-Europa, E. (2021). Phycocyanobilin is the molecule responsible for the nephroprotective action of phycocyanin in acute kidney injury caused by mercury. *Food & Function*, 12(7), 2985-2994. <https://doi.org/10.1039/d0fo03294h>
- Hadiani, E. T., Amalia, U., & Agustini, T.W. (2019, September 17-18). The effect of basil (*Ocimum basilicum* i.) leaf extract in immersion stage against profile of volatile compound on *Spirulina platensis* powder. [Conference Session]. The 4th International Conference on Tropical and Coastal Region Eco Development, Semarang, Indonesia. IOP Conference series: Earth and Environmental Science. <http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/246/1/012057>
- Kang, B., Tang, H., Zhao, Z., & Song, S. (2020). Hofmeister series: insights of ion specificity from amphiphilic assembly and interface property. *ACS omega*, 5(12), 6229-6239.
- Kannaujiya, V. K., Kumar, D., Pathak, J., & Sinha, R. P. (2019). Phycobiliproteins and their commercial significance. In *Cyanobacteria* (pp. 207-216). Academic Press.
- Karso, Wuryanti, & Sriatun. (2014). Isolasi dan karakterisasi kitinase isolate jamur akuatik kitinolitik KC3 dari kecoa (*Orthoptera*). *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 17(2), 51-57.
- Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., & Al-Hazimi, A. (2013). Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycocyanin. *BioMed Research International*, 2013, 742-859. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.678477>
- Kumar, D., Dhar, D. W., Pabbi, S., Kumar, N., & Walia, S. (2014). Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (CCC540). *Indian Journal of Plant Physiology*, 19(2), 184-188. <https://doi.org/10.1007/s40502-014-0094-7>
- Lauceri, R., Zittelli, G. C., & Torzillo, G. (2019). A simple method for rapid purification of phycobiliproteins from *Arthrospira*

- platensis* and *Porphyridium cruentum* biomass. *Algal Research*, 44, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101685>
- Liu, Y., Liu, X., Cui, Y., & Yuan, W. (2022). Ultrasound for microalgal cell disruption and product extraction: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 87, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.ultronch.2022.106054>
- Mauliasari, E. S., Agustini, T. W., & Amalia, U. (2019.) Stabilisasi fikosianin *Spirulina platensis* dengan perlakuan mikroenkapsulasi dan pH. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 22(3), 526-534.
- Morone, J., Alfeus, A., Vasconcelos, V., & Martins, R. (2019). Revealing the potential of cyanobacteria in cosmetics and cosmeceuticals—A new bioactive approach. *Algal Research*, 41, 1-41 <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101541>
- Mysliwa-Kurdziel, B., & Solymosi, K. (2017). Phycobilins and phycobiliproteins used in food industry and medicine. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 17(13), 1173-1193.
- Nasution, U. J., Wijaya, S. M., Wibisana, A., & Suyanto, S. (2016). Pemurnian enzim sefalosporin-C asilase dan optimasi proses kromatografi penukar ion. *Bioteknologi dan Biosains Indonesia*, 5(2), 119-126.
- Nefasa, A. N., Wulandari, E. C., Christwardana, M., & Hadiyanto, H. (2020). Quality of macronutrient of cow's milk with addition of soybean oil and phycocyanin extract as functional food. *Food Science Technology*, 3(2), 1-17. <http://dx.doi.org/10.25139/fst.v3i2.3139>
- Newsome, A. G., Culver, C. A., & Van Breemen, R. B. (2014). Nature's palette: the search for natural blue colorants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6498-6511. <http://dx.doi.org/10.1021/jf501419q>
- Nisticò, D. M., Piro, A., Oliva, D., Osso, V., Mazzuca, S., Fagà, F. A., Morelli, R., Conidi, C., Figoli, A., & Cassano, A. (2022). A combination of aqueous extraction and ultrafiltration for the purification of phycocyanin from *Arthrospira maxima*. *Microorganisms*, 10(308), 1-14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020308>
- Pandey, V. D., Pandey, A., & Sharma, V. (2013). Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(9), 89-97.
- Park, W. S., Kim, H. J., Li, M., Lim, D. H., Kim, J., Kwak, S. S., Kang, C.-M., Ferruzzi, M. G., & Ahn, M. J. (2018). Two classes of pigments, carotenoids and c-phycocyanin, in *Spirulina* powder and their antioxidant activities. *Molecules*, 23(8), 1-11. <https://doi.org/10.3390/molecules23082065>
- Razus, A. C. (2023). Azulene, reactivity, and scientific interest inversely proportional to ring size; part 1: the five-membered ring. *Symmetry*, 15(2), 1-40. <https://doi.org/10.3390/sym15020310>
- Rito-Palomares, M., Nunez, L., & Amador, D. (2001). Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 76(12), 1273-1280. <https://doi.org/10.1002/jctb.507>
- Rodrigues, E. F., Vendruscolo, L. P., Bonfante, K., Reinehr, C. O., Colla, E., & Colla, L. M. (2019). Phycocyanin as substitute for texture ingredients in ice creams. *British Food Journal*, 122(2), 693-707. <https://doi.org/10.1108/BFJ-07-2019-0553>
- Sala, L., Moraes, C. C., & Kalil, S. J. (2018). Cell pretreatment with ethylenediaminetetraacetic acid for selective extraction of C-phycocyanin with food grade purity. *Biotechnology Progress*, 34(5), 1261-1268. <https://doi.org/10.1002/btpr.2713>
- Schwierz, N., Horinek, D., Sivan, U., & Netz, R. R. (2016). Reversed hofmeister series—the rule rather than the exception. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 23, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.04.003>
- Silva, L. A., Kuhn, K. R., Moraes, C. C., Burkert, C. A., & Kalil, S. J. (2009). Experimental

- design as a tool for optimization of C-phycoerythrin purification by precipitation from *Spirulina platensis*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(1), 5-12. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532009000100003>
- Silveira, S. T. J. F. M., Burkert, J. A. V., Costa, C. A. V., Burkert, S. J. Kalil. (2007). Optimization of phycoerythrin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology*, 98(8), 1629-1634. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.050>
- Song, W., Zhao, C., & Wang, S. (2013). A large-scale preparation method of high purity C-phycoerythrin. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 3(4), 293-297. <https://doi.org/10.7763/IJBBB.2013.V3.216>
- Su, R., Guo, P., Zhang, Z., Wang, J., Guo, X., Guo, D., Wang, Y., Liu, Q., & Shi, C. (2022). Antibacterial activity and mechanism of linalool against shigella sonnei and its application in lettuce. *Foods*, 11(20), 1-14. <https://doi.org/10.3390/foods11203160>
- Wingfield P. (2001). Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current Protocols in Protein Science, Appendix 3*, Appendix-3F. <https://doi.org/10.1002/0471140864.psa03fs13>.
- Yamaguchi, Y. M., Takubo, K., Ogawa, K., Nakayama, T., Koganezawa, & Katagiri, H. (2016). Tatrazenone isomers: polarity change of orbitals through molecular orbital distribution contrast. *Journal of The American Chemical Society*, 138(35), 11335-11343. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b06877>
- Yuliani, Y., Riyadi, P.H., Dewi, E.N., Jaswir, I., & Agustini TW. (2021).