

Profil Pigmen Polar dan Non Polar Mikroalga Laut *Spirulina* sp. dan Potensinya sebagai Pewarna Alami

Sri Sedjati*, Ervia Yudiati, Suryono

Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro.

Jl. Raya Undip, Marine Station Teluk Awur, Jepara.

Email : sedjati69@gmail.com

Abstrak

Penelitian pigmen *Spirulina* sp. dilakukan untuk menentukan kandungan pigmen polar dan non polar dari *Spirulina* sp. dengan metode Spektroskopi UV-Vis. Pigmen polar diekstraksi dengan menggunakan larutan buffer fosfat ($\text{NaOH-KH}_2\text{PO}_4$) pH 7, sedangkan pigmen non polar diekstraksi dengan menggunakan aseton murni. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pigmen polar berwarna biru dan kadarnya adalah sebesar $42,272 \pm 0,05$ mg/g (berat kering), pigmen ini terdiri dari fikosianin ($29,159 \pm 0,29$ mg/g), allofikosianin ($9,363 \pm 0,20$ mg/g), dan fikoeritrin ($3,750 \pm 0,09$ mg/g). Warna pigmen non polar adalah hijau terang dan kadarnya sebesar $4,498 \pm 0,06$ mg/g (berat kering), pigmen ini terdiri dari klorofil a ($3,349 \pm 0,03$ mg/g) dan karotenoids ($1,158 \pm 0,03$ mg/g). Ekstrak pigmen polar *Spirulina* sp kadarnya lebih tinggi dibanding pigmen non polarnya. Pigmen fikosianin berpotensi dikembangkan sebagai bahan aditif pewarna biru alami, karena: kadarnya paling tinggi, menghasilkan warna biru cerah dan cemerlang, bersifat nutrisi fungsional dan tidak beracun.

Kata kunci: *Spirulina* sp., polar, non polar, pigmen, alami

Abstract

Profile of Polar and Non-Polar Pigment from Marine Microalgae *Spirulina* sp. and Their Potential as Natural Coloring

Research on pigments from *Spirulina* sp. powder has been done in order to determine polar and non polar pigments content by UV-Vis Spectroscopy method. Polar pigments were extracted using phosphate buffer ($\text{NaOH-KH}_2\text{PO}_4$) pH 7, while non polar pigments were extracted using pure aseton. The result showed that colour of polar pigment was dark blue and its content was $42,272 \pm 0,05$ mg/g (dry weight), these pigments consist of phycocyanin ($29,159 \pm 0,29$ mg/g), allophycocyanin ($9,363 \pm 0,20$ mg/g), and phycoerythrin ($3,750 \pm 0,09$ mg/g). The colour of non polar pigment was light green and its content was $4,498 \pm 0,06$ mg/g (dry weight), these pigments consist of chlorophyll a ($3,349 \pm 0,03$ mg/g) and carotenoids ($1,158 \pm 0,03$ mg/g). Due to the high content of pigments from *Spirulina* sp, showing a bright blue colour, having functional nutrition, and non toxic, the polar pigment phycocyanin have been found suitable for use as additif natural blue colorant.

Key word: *Spirulina* sp., polar, non polar, pigment, natural

Pendahuluan

Spirulina sp. merupakan organisme planktonik yang bersifat autotrof, tidak memiliki inti sel sejati (prokariotik), uniselular dan berbentuk filamen menyerupai spiral berwarna biru-hijau. Mikroalga ini tergolong dalam *Cyanobacteria* (Ciferri, 1983). *Spirulina* sp. termasuk salah satu jenis mikroalga yang banyak dikultur dan dijual secara komersial dalam bentuk kering sebagai makanan suplemen. Mikroalga ini mempunyai kandungan nutrisi yang tinggi, yaitu: kadar protein 55-

70%, karbohidrat 15-25%, asam lemak esensial 18%, dan sisanya adalah vitamin, mineral serta pigmen, yaitu: klorofil, karoten, xantofil dan fikosianin (Sanchez *et al.*, 2003; Prasanna *et al.*, 2010). Beberapa peneliti menyebutkan bahwa *Spirulina* sp. merupakan bahan *nutraceutical* yang memiliki sifat: anti malnutrisi, anti anemia, anti oksidatif, anti viral dan anti tumor/kanker (Estrada *et al.*, 2001; Belay, 2002; Sanchez *et al.*, 2003). Organisme autotrof memiliki satu pigmen utama yaitu pigmen klorofil dan dua pigmen asesoris yaitu karotenoid dan fikobiliprotein/fikobilin. Karotenoid terbagi lagi

menjadi dua: kelompok pigmen karoten dan xantofil, sedangkan fikobilin terbagi menjadi empat: fikoeritrobin, fikosianobilin, fikoeritrosianin, dan fikourobilin (Nobel, 2009). Berdasarkan kepolaran dan kelarutannya, pigmen-pigmen ini dikelompokkan ke dalam golongan pigmen polar (hidrofilik) dan non polar (lipofilik). Klorofil dan karotenoid termasuk pigmen non polar dan harus diekstrak dengan pelarut organik (metanol, etanol, aseton) dengan kepolaran tertentu (indeks kepolaran d'' 5,2). Pigmen fikobilin merupakan pigmen yang berasosiasi dengan protein dan bersifat polar serta larut air, dapat diekstrak dengan menggunakan pelarut air atau buffer (Masojidek *et al.*, 2004).

Beberapa jenis pigmen yang tergolong dalam kelompok klorofil, karotenoid, fikobilin dapat mamancarkan beberapa warna yang menarik meliputi : hijau, kuning, oranye, merah dan biru (Prasanna *et al.*, 2007). Pemberitaan informasi tentang bahaya/efek negatif pewarna sintetis meningkatkan kesadaran masyarakat untuk kembali menggunakan produk pewarna alami. Saat ini pewarna alami pada umumnya berbahan dasar tumbuhan tingkat tinggi seperti daun pandan, daun suji, kunyit dan hanya dimanfaatkan secara tradisional. Secara komersial, keberadaan pewarna alami kalah bersaing dengan pewarna sintetis yang banyak dijual di pasaran. Fenomena ini mendorong kalangan ilmiah untuk mengeksplorasi dan mengeksploitasi pigmen mikroalga *Spirulina* sp. sebagai bahan pewarna alami yang aman dan sehat.

Penjualan pewarna alami dan turunannya di pasar global meningkat dari tahun ke tahun dan diprediksi akan mengalami peningkatan 5-10% per tahun. Prediksi ini melampaui peningkatan permintaan pewarna sintetis yang hanya 3-5% per tahun. Pewarna biru sintetis tidak banyak jumlahnya, di antaranya adalah: *Brilliant Blue* dan *Indigo Carmine*. *Brilliant Blue* memiliki ketahanan terhadap cahaya dan keasaman, sedangkan *Indigo Carmine* tidak tahan cahaya, panas dan juga keasaman. Kedua pewarna biru sintetis ini semuanya tidak tahan terhadap oksidasi (Downham dan Collin, 2000). Kelebihan fikosianin dibanding pewarna biru sintetis yaitu terletak pada sifatnya yang tahan oksidasi (bersifat anti oksidatif), sehingga dari sudut pandang kesehatan, fikosianin lebih aman sekaligus dapat berfungsi sebagai penetralisir radikal bebas (Estrada *et al.*, 2001; Belay, 2002; Eriksen, 2008).

Secara umum, pigmen yang terdapat dalam alga Cyanobacteria terdiri dari : klorofil (hanya klorofil a), karoten (α -karoten, β -karoten, γ -karoten, likopen), xantofil (*astaxanthin*, *canthaxanthin*, *cryptoxanthin*, *echinenone*, *myxanthophyll*, *oscillaxanthin*) dan fikobilin (fikosianin, fikoeritrin, allokiosianin) (Prasanna *et al.*,

2010). Penelitian ini adalah menganalisis kadar pigmen polar dan non polar yang terkandung dalam *Spirulina* sp. dan melihat potensi pigmen-pigmen tersebut sebagai alternatif bahan aditif pewarna alami.

Materi dan Metode

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari – Februari 2012, di Laboratorium Bioteknologi Kelautan (Marine Station Teluk Awur, Jepara), Universitas Diponegoro. Bahan yang dipakai dalam penelitian ini adalah mikroalga *Spirulina* sp. komersial produksi PT. Spirulindo dalam bentuk kering (bubuk).

Proses ekstraksi pigmen polar *Spirulina* sp. menggunakan pelarut buffer fosfat pH 7 ($\text{NaOH-KH}_2\text{PO}_4$ dengan 3 ulangan. *Spirulina* sp. kering seberat 0,5 gram dihaluskan dengan menggunakan mortar dan setelah halus tambahkan pelarut 10 ml. Kemudian sampel dimasukkan ke tabung sentrifuse untuk diinkubasi selama 14 – 16 jam dalam refrigenerator. Larutan sampel disaring menggunakan kertas saring Whatman no. 42, filtrat yang diperoleh disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit untuk memisahkan residu. Supernatan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada kisaran panjang gelombang 450 – 750 nm (penentuan spektra absorbansi) dan secara spesifik pada 562 nm, 620 nm dan 652 nm. Perhitungan kadar fikosianin, allokiosianin dan fikoeritrin diadaptasi dari metode Bennett dan Bogorad (1973).

Ekstraksi pigmen non polar *Spirulina* sp. dilakukan menggunakan pelarut aseton murni dengan 3 ulangan. *Spirulina* sp. kering seberat 0,1 gram digerus dalam mortar hingga halus, dimasukkan dalam tabung sentrifugasi, diberi pelarut sebanyak 10 ml dan diperlakukan sama seperti ekstraksi pigmen polar hingga diperoleh supernatan yang jernih. Supernatan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada kisaran panjang gelombang 470 - 750 nm (penentuan spektra absorbansi) dan secara spesifik pada 663 nm dan 470 nm. Perhitungan kadar klorofil a dan karotenoid diadaptasi dari metode Lichtenthaler dan Buschmann (2001).

Hasil dan Pembahasan

Ekstraksi pigmen polar menggunakan pelarut buffer $\text{NaOH-KH}_2\text{PO}_4$ (pH 7) menghasilkan ekstrak berwarna biru, sedangkan ekstraksi non polar (menggunakan aseton murni) menghasilkan ekstrak berwarna hijau terang. Menurut Prasanna *et al.* (2010),

pigmen polar dan non polar dalam keadaan murni dan tunggal memiliki warna yang berbeda-beda. Pigmen klorofil a memiliki warna hijau kebiruan, karotenoid berwarna oranye, fikosianin berwarna biru, allofikosianin berwarna biru kehijauan dan fikoeritrin berwarna merah.

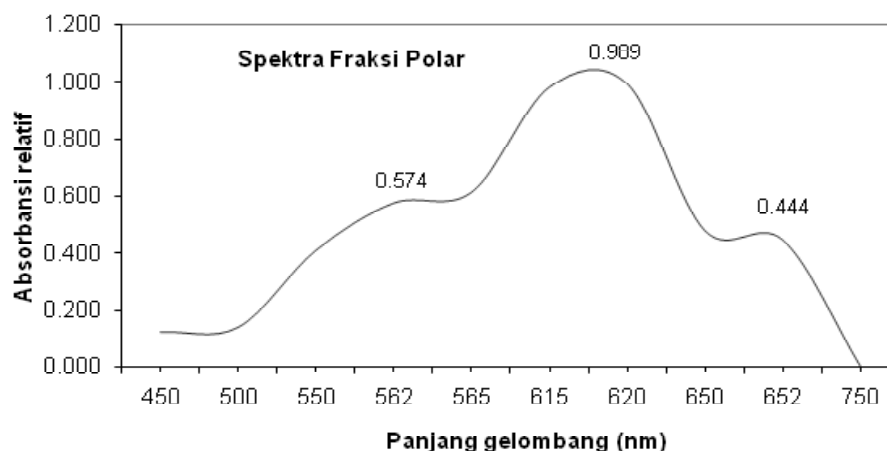
Ekstraksi dengan pelarut polar akan mengekstrak senyawa-senyawa polar yang ada dalam sel *Spirulina* sp. kering. Senyawa polar yang bisa terambil oleh pelarut air/buffer terdiri dari golongan fikobiliprotein/fikobilin dan protein-protein yang sifatnya larut air. Zat-zat tersebut akan merespon/menyerap cahaya dengan kisaran panjang gelombang 500-730 nm (Arlyza, 2005). Ekstraksi dengan aseton murni akan mengekstrak pigmen yang bersifat non polar, yaitu : klorofil dan karotenoid, termasuk juga senyawa lipid. Pengukuran serapan/absorbansi pada kisaran panjang gelombang tertentu pada masing-masing ekstrak menghasilkan spektra yang khas dan proses identifikasi lebih detil terhadap pigmen yang terkandung dalam *Spirulina* sp. dapat dilihat dari puncak absorbansinya (Gambar 1 dan 2).

Komponen utama pigmen polar (fikobilin) Cyanobacteria terdiri dari 3 senyawa, yaitu : (1) fikosianin, (2) allofikosianin dan (3) fikoeritrin. Masing-masing senyawa tersebut memiliki sifat spektroskopik yang unik, yaitu mempunyai serapan maksimum pada panjang gelombang tertentu. Serapan maksimum fikosianin terletak pada panjang gelombang 610 – 620 nm, serapan maksimum allofikosianin pada 650 – 652 nm dan serapan maksimum fikoeritrin 540 – 570 nm (Prasanna *et al.*, 2010; Saleh *et al.*, 2011). Gambar 1 merupakan spektra absorbansi pigmen polar *Spirulina* sp dan terlihat 3 puncak serapan pada cahaya dengan panjang gelombang tertentu. Puncak pertama

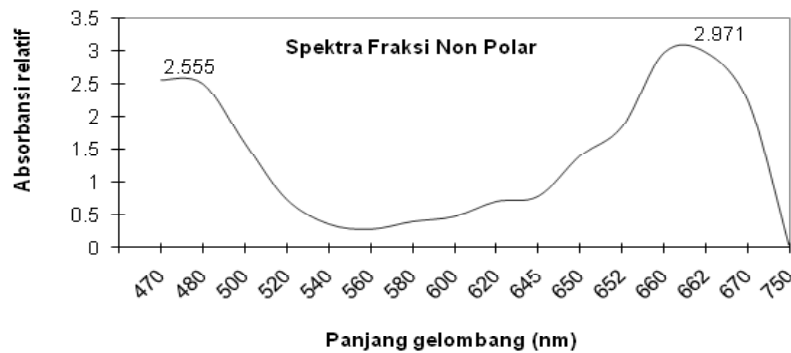
merupakan pigmen fikoeritrin (l maks. = 562 nm), puncak kedua adalah fikosianin (l maks. = 620 nm) dan puncak ketiga adalah allofikosianin (l maks. = 652 nm). Puncak tertinggi terjadi pada serapan dengan panjang gelombang 620 nm, yang berarti bahwa pigmen polar didominasi oleh fikosianin, sehingga tampak berwarna biru.

Analisis spektra absorbansi pigmen non polar *Spirulina* sp. dalam pelarut aseton murni menghasilkan adanya dua puncak yang muncul pada panjang gelombang 470 nm dan 662 nm (Gambar 2). Menurut Lichtenthaler dan Buschmann (2001), serapan maksimum pada cahaya dengan panjang gelombang 470nm mencirikan adanya senyawa karotenoid, sedangkan pada panjang gelombang 662 nm mencirikan adanya senyawa klorofil a. Beberapa penelitian (Christina *et al.*, 2008; Harun *et al.*, 2010; Prasanna *et al.*, 2010) menjelaskan pula bahwa *Spirulina* sp. memang hanya mengandung klorofil a.

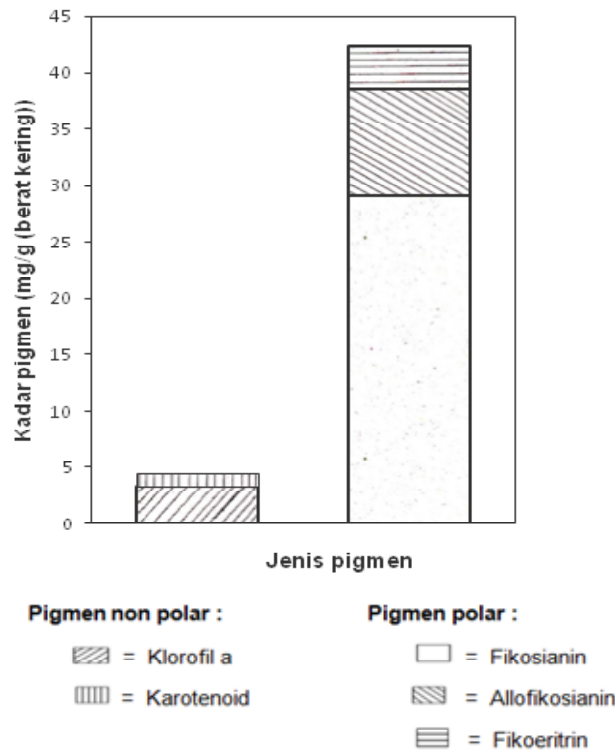
Analisis kadar pigmen *Spirulina* sp. (berat kering) hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar pigmen tertinggi adalah fikosianin ($29,159 \pm 0,29$ mg/g), berikutnya diikuti oleh allofikosianin ($9,363 \pm 0,20$ mg/g), fikoeritrin ($3,750 \pm 0,09$ mg/g), klorofil a ($3,340 \pm 0,03$ mg/g) dan terendah adalah karotenoid ($1,158 \pm 0,03$ mg/g) (Gambar 3). Perhitungan kadar pigmen ini sesuai dengan hasil penelitian yang sudah ada, yang mengemukakan bahwa senyawa fikobilin yang terdapat pada *Spirulina* sp., adalah fikosianin, allofikosianin, fikoeritrin dan yang tertinggi adalah fikosianin (Saleh *et al.*, 2011). Kadar klorofil relatif rendah dibanding pigmen lainnya, tetapi masih lebih tinggi jika dibandingkan dengan klorofil tumbuhan alfalfa (*Medicago sativa*) yang memiliki kadar klorofil sebesar



Gambar 1. Spektra ekstrak pigmen polar (dalam buffer NaOH-KH₂PO₄ (pH 7) dari *Spirulina* sp. kering (pengenceran 10x)



Gambar 2. Spektra ekstrak pigmen non polar (dalam aseton murni) dari *Spirulina* sp.kering



Gambar 3. Profil pigmen polar dan non polar *Spirulina* sp.

1,492- 1,969 mg/g (berat kering). Alfalfa adalah tanaman sub tropis penghasil ekstrak klorofil yang sudah dijual secara komersial (Ibrahim dan Bafeel, 2008; Parman dan Harnina, 2008). Demikian pula untuk pigmen karotenoid, meskipun kadarnya paling rendah dalam *Spirulina* sp, tetapi masih lebih tinggi jika dibandingkan dengan karotenoid wortel.yang berkisar dari 0,004-0,265 mg/g (berat kering), tergantung dari warna wortel (putih, ungu, kuning, oranye, oranye gelap) dan ukuran wortel (kecil, sedang, besar) (Muller, 1997; Nicole *et al.*, 2004)

Total kadar pigmen non polar *Spirulina* sp. adalah kadar klorofil a ditambah dengan total karotenoid, yatu sebesar $4,498 \pm 0,06$ mg/g (berat kering), sedangkan total pigmen polar adalah jumlah dari kadar fikosanin, allofikosanin dan fikoeritrin, yaitu

sebesar $42,272 \pm 0,05$ mg/g (berat kering) Beberapa penelitian menunjukkan bahwa selain warna yang menarik, pigmen-pigmen tersebut juga memiliki bioaktivitas yang penting. Klorofil mempunyai bioaktivitas yang mampu memperbaiki dan mempercepat pertumbuhan sel tubuh dan meningkatkan jumlah haemoglobin darah (Harun *et al.*, 2010) serta memiliki aktifitas sebagai antioksidan (Christina *et al.*, 2008). Senyawa kelompok karotenoid memiliki bioaktivitas sebagai pro-vitamin A, menurunkan resiko katarak, mencegah degenerasi sel, menghambat pertumbuhan sel kanker, meningkatkan kekebalan tubuh dan juga sebagai antioksidan (Sharma *et al.*, 2010). Penelitian mengenai bioaktivitas pigmen polar baru terfokus pada fikosanin saja, karena pigmen ini memang kadarnya tertinggi. Aktifitas antioksidan fikosanin lebih kuat dibanding α -tokoferol maupun *zeaxanthin* dan tidak

menurun kekuatannya meskipun alga *Spirulina* sp. mengalami proses pengeringan (Belay, 2002; Romay *et al.*, 2003; Prasanna *et al.*, 2007). Beberapa kelebihan yang dimiliki pigmen-pigmen tersebut tentunya akan diminati banyak konsumen dan berpotensi untuk diaplikasikan dalam industri pangan, kosmetik dan farmasi.

Kandungan pigmen tertinggi dalam *Spirulina* sp. adalah fikosianin, kadarnya bisa mencapai 1-10% berat kering (Burtin, 2003). Pigmen ini bisa dikembangkan sebagai pewarna biru alami dengan berbagai pertimbangan. Menurut Kastanek (2011), kebutuhan fikosianin diprediksi dapat melampaui pertumbuhan pewarna biru sintetis, dikarenakan : pewarna biru alamiah sangat jarang tetapi permintaan pasar tinggi, non toksik, non karsinogenik, bisa digunakan sebagai pewarna kosmetik dan makanan (produk susu, es krim, permen, minuman ringan, minuman beralkohol, dekorasi kue).

Pigmen biru *Spirulina* sp. harus melalui berbagai tahapan agar memenuhi syarat sebagai pewarna alami, yaitu: pengendapan dan pemurnian (dialisis atau kromatografi) (Hemlata *et al.*, 2011; Prabuthas *et al.*, 2011). Kemurnian ini diukur berdasar rasio A_{620}/A_{280} , pengukuran A_{620} adalah nilai absorbansi fikosianin ($\lambda = 620$ nm) dan A_{280} adalah nilai absorbansi protein ($\lambda = 280$ nm). Kriteria kemurnian fikosianin untuk pangan (*food grade*) mengharuskan nilai rasio A_{620}/A_{280} minimal sama dengan 0,7. Beberapa hasil penelitian menyebutkan bahwa kemurnian 0,7 bisa dicapai tanpa proses pemurnian. Fikosianin dapat diperoleh dalam bentuk bubuk (*powder*) setelah dilakukan proses pengendapan dan pengeringan, pada tahap ini tingkat kemurnian bisa lebih dari 2,0. Proses pemurnian secara kromatografi dilakukan untuk memperoleh fikosianin murni dengan tingkat kemurnian di atas 4,0 (*analytical grade*) (Rito-Palomares *et al.*, 2001; Hemlata *et al.*, 2011; Prabuthas *et al.*, 2011).

Beberapa pewarna biru alami yang ada di antaranya adalah *Gardenia Blue* (berasal dari tumbuhan *Gardenia* sp.) dan *Indigo* (berasal dari tumbuhan *Indigofera* sp.) (Jespersen *et al.*, 2005; Kurosawa, 2010). Pigmen *Gardenia Blue* stabil pada kisaran suhu sampai 80°C dan kisaran pH 3-7, sedangkan *Indigo* masih stabil pada kisaran suhu sampai 90°C. Kestabilan fikosianin berbeda dengan kedua pigmen tersebut, fikosianin cenderung tidak tahan panas dan cahaya, serta tidak tahan asam. Fikosianin akan pudar warnanya (terdenaturasi) pada suhu di atas 45°C atau pada pH di bawah 4 (stabil pada pH 4-9). Meskipun stabilitas pigmennya relatif lebih rendah, namun memiliki keunggulan, yaitu: fikosianin menghasilkan warna biru yang paling cerah dan cemerlang (Sarada *et al.*, 1999; Jespersen *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2011)).

Kesimpulan

Spirulina sp. kering komersial yang digunakan dalam penelitian ini mengandung pigmen non polar sebanyak $4,498 \pm 0,06$ mg/g (berat kering), terdiri dari klorofil a ($3,340 \pm 0,03$ mg/g) dan karotenoid ($1,158 \pm 0,03$ mg/g), dan pigmen polar sebanyak $42,272 \pm 0,05$ mg/g (berat kering), terdiri dari fikosianin ($29,159 \pm 0,29$ mg/g), allofikosianin ($9,363 \pm 0,20$ mg/g) dan fikoeritrin ($3,750 \pm 0,09$ mg/g). Pigmen fikosianin berpotensi dikembangkan sebagai bahan aditif pewarna biru alami, karena: kadarnya paling tinggi, menghasilkan warna biru cerah dan cemerlang.

Daftar Pustaka

- Arlyza, I.S. 2005. Isolasi pigmen biru phycocyanin dari mikroalga *Spirulina platensis*. *Oceanol. Limnol. Indonesia* 38: 79-92.
- Belay, A. 2002. *Spirulina* (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *T. J. Amer. Nutr. Association* 5(2): 27-48.
- Bennett, A. & L. Bogorad. 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J. Cell. Biol.* 58: 419-435.
- Burtin, P. 2003. Nutritional value of seaweeds. *EJEAFChe.* 2 : 498–503
- Christina, R., H. Kristopo & L. Limantara. 2008. Photodegradation and antioxidant activity of chlorophyll a from *Spirulina* (*Spirulina* sp.) powder. *Ind. J. Chem.* 8 (2): 236-241.
- Ciferri, O. 1983. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiol. Rev.* 47: 551-578.
- Downham, A. & P. Collin. 2000. Coloring of our foods in the last and next millennium. *Intl. J. Food Sci. Technol.* 35: 5-12.
- Eriksen, N.T. 2008. Production of phycocyanin-a pigment with application in biology, biotechnology, food and medicine (abstract). *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80 (1): 1-14.
- Estrada, J.E.P., P.B. Bescos, & A.M. V. Fresno. 2001. Anti oxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco* 56: 497-500.
- Harun, R., M. Singh., G.M. Forde, & M.K. Danquah. 2010. Bioprocess engineering of microalgal to produce a variety of consumer product. *Renewable and Sustainable Energy Rev.* 14: 1037-1047.

- Hemlata, G. Pandey, F. Bano. & T. Fatma. 2011. Studies of *Anabaena* sp. NCCU-9 with special reference to phycocyanin. *J. Algae Biomass Utiln.* 2(1): 30-51.
- Ibrahim, M.M., & S.O. Bafeel. 2008. Photosynthetic efficiency and pigment content in Alfalfa *Medicago sativa* seedling subjected to dark and chilling conditions. *Int. J. Agri. Biol.* 10 (3): 306-310.
- Jespersen, L., L.D. Stremdahl, K. Olsen, & L.H. Skibsted. 2005. Heat and light stability of three natural blue colorant for use in confectionery and beverages. *Europ. Food Res. Technol.* 220 (3-4): 261-266.
- Kastanek, P. 2011. Blue natural colorant from *Spirulina platensis* algae. EcoFuel Laboratories (www.ecofuel.cz/files/EcoFuel%20Phycocyanin; akses 1-3-2012).
- Kurosawa, S. 2010. Stable blue colorant for food (www.ninesigma.com; akses 25-2-2012).
- Laurenz, E., E.J. Fedewa, & T.L. Ricardson. 2011. Extraction protocols for quantification of phycobilins in aqueous phytoplankton extracts. *J. Appl. Phycol.* 23: 865-871.
- Lichtenthaler, H.K., & C. Buschmann. 2001. Chlorophyll and carotenoids: Measurement and characterization by UV-Vis spectroscopy in: R.E. Wrolstad (Ed). *Current Protocol in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York. p.431-438.
- Masojidek, J., M. Koblizek, & G. Torzillo. 2004. Photosynthesis in microalgae in: A. Richmond (Ed). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd., Iowa. p.20-39.
- Muller, H. 1997. Determination of carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiodearray detection. *Z. Lebeusm Unter Forsch A.* 204: 88-94.
- Nicole, C., G. Simon, E. Rock, P. Amouroux, & C. Remesy. 2004. Genetic variability influences carotenoid, vitamin, phenolic and mineral content in white, yellow, purple, orange, and dark-orange carrot cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129 (4): 523-529.
- Nobel, P.S. 2009. *Physicochemical and Enviromental Plant Physiology*. Academic Press, Canada. 582p.
- Parman, S., & S. Harnina. 2008. Pertumbuhan, kandungan klorofil dan serat kasar pada defoliiasi pertama Alfalfa (*Medicago sativa* L) akibat pemupukan mikorisa. *Bull. Anatomi dan Fisiologi XVI* (2): 1-8.
- Prabuthas, P., Majumdar S., Srivastav P.P., & Mishra H.N. 2011. Standarization of rapid and economical method for nutraceuticals extraction from algae. *J. Stored Products and Post Harvest Res.* 2(25): 93-96.
- Prasanna, R., A. Sood, A. Suresh, S. Nayak, & B.D. Kaushik. 2007. Potential and aplications of algal pigment in biology. *Acta Botan. Hungaria* 49 (1-2): 131-156.
- Prasanna, R., A. Sood, P. Jaiswal, S. Nayak, V. Gupta, V. Chaudhary, M. Joshi, & C. Natarjan. 2010. Rediscovering cyanobacteria as valuable sources of bioactive compounds. *Appl. Biochem. Microbiol.* '46 (2): 119-134.
- Rito-Palomares, M., Nunez L., & Amador D. 2001. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of prototype process for C-phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*. *J. Chem. Techn. Biotechnol.* 76: 1273-1280.
- Romay, C., R. Gonzalez, N. Ledon, & D. Ramirez, Rimbau. 2003. C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti - inflammatory and neuroprotective effects. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4(3): 207-216.
- Saleh, A.M., D.W. Dhar & P.K. Singh. 2011. Comparative pigment profiles of different *Spirulina strains*. *Res. Biotechnol.* 2(2): 67-74.
- Sanchez, M., B.J. Caltillo, C. Roza, & I. Rodriquez. 2003. *Spirulina* (Arthrospira): an edible microorganism. *A rev. Universitas Scentiarum* 8(1): 1-16.
- Sarada, R., M.G. Pillai, & G.A. Ravishankar. 1999. Phycocyanin from *Spirulina* sp. : influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficiency of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *J. Proc. Biochem.* 34:795-801.
- Sharma, K.D., Swati K., Narayan S.T., & Surekha A. 2010. Chemical composition, functional properties and processing of carrot-a review. *J. Food Sci. Technol.* 49 (1): 22-32.
- Yan, S., Zhu LP, Su HN, Zhang XY, Chen XL, Zhou BC, Zhang YZ. 2011. Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phycocyanin and allophycocyanin with high purity and recovery from *Spirulina* (Arthrospira) platensis. *J. Appl. Phycol.* 23: 1-6.