

OPTIMASI PROSES EKSTRAKSI KAROTEN DAN KLOORIFIL DARI *SPIRULINA PLATENSIS* DENGAN TEKNOLOGI KARBON DIOKSIDA (CO₂) SUPERKRITIS MENGGUNAKAN METODE PERMUKAAN TANGGAP

Siti Agustina, Novi Nur Aidha, Eva Oktarina, dan Jiwo Hutomo Haruminda

Badan Penelitian dan Pengembangan Industri, Kementerian Perindustrian RI
Jl. Balai Kimia I Pekayon, Pasar Rebo, Jakarta Timur

E-mail: tinaratujaya@yahoo.com

Received : 16 September 2019; revised : 17 September 2019 ; accepted : 22 Oktober 2019

ABSTRAK

OPTIMASI PROSES EKSTRAKSI KAROTEN DAN KLOORIFIL DARI *Spirulina platensis* DENGAN TEKNOLOGI KARBON DIOKSIDA (CO₂) SUPERKRITIS MENGGUNAKAN METODE PERMUKAAN TANGGAP. *Spirulina platensis* merupakan jenis mikroalga yang banyak dibudidayakan di dunia, karena memiliki kandungan bahan aktif antara lain karoten, klorofil, dan fikosianin. Karoten dan klorofil selain berfungsi sebagai pewarna alami juga memiliki kandungan antioksidan yang tinggi. Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi karoten dan klorofil dari *Spirulina platensis* menggunakan metode ekstraksi superkritis CO₂ dengan etanol sebagai *co-solvent*. Rancangan penelitian menggunakan software Design Expert[®] 7.0 dengan variabel suhu, tekanan, dan waktu, serta respon yang diamati yaitu kadar karoten dan klorofil. Tujuan dari penelitian ini untuk mendapatkan kondisi optimum proses ekstraksi *Spirulina platensis* dengan superkritis CO₂, menggunakan metode *Central Composite Design (CCD)* yang merupakan salah satu metode permukaan tanggap untuk mendapatkan karoten dan klorofil yang maksimal. Hasil optimasi kondisi proses ekstraksi superkritis CO₂ yang didapatkan adalah kondisi proses suhu optimal 38,57 °C; tekanan optimal pada 23,43 MPa; dan waktu proses selama 227,55 menit. Kadar karoten maksimal yang diperoleh pada kondisi optimal tersebut adalah 512,403 µg/ml dan kadar klorofil sebesar 105,701 µg/ml.

Kata kunci : *Spirulina*, Karoten, Klorofil, Superkritis CO₂

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF CAROTENE AND CHLOROPHYLL EXTRACTION PROCESS FROM *Spirulina platensis* BY SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE (CO₂) TECHNOLOGY USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY. *Spirulina platensis* is a type of microalgae that widely cultivated in the world, because its active ingredients such as carotene and chlorophyll, in addition to phycocyanin. Carotene and chlorophyll, in addition to functioning as natural dyes, also have high antioxidant content. In this research, extraction of carotene and chlorophyll from *Spirulina platensis* was done by supercritical CO₂ extraction method with ethanol as a *co-solvent*. The research was design by software Design Expert[®] 7.0 with variables were temperatures, pressure, and time; for the response in the form of carotene and chlorophyll content. The purpose of this research is to obtain the optimum extraction process conditions by using the *Central Composite Design (CCD)* method, which is one of the response surface methods to obtain maximum carotene and chlorophyll. The results of the optimization of the supercritical CO₂ extraction process conditions obtained were the optimal temperature process conditions of 38.57 °C; optimal pressure at 23.43 MPa; and processing time for 227.55 minutes. The results of the maximum carotene levels obtained at these optimal conditions are 512.403 µg/ml and chlorophyll content of 105.701 µg/ml.

Key words : *Spirulina*, Caroten, Chlorophyll, Supercritical CO₂

PENDAHULUAN

Salah satu jenis mikroalga yang paling banyak dibudidayakan di dunia adalah jenis *Spirulina* (Al-Dhabi dan Arasu 2016), karena mengandung protein sekitar 60% sampai 70% dengan berbagai kandungan bahan aktif seperti

fikosianin, karoten, dan klorofil (Wells *et al.* 2017; Agustini *et al.* 2017). Bahan aktif tersebut banyak digunakan sebagai antioksidan, antikanker, dan bahan pewarna alami untuk industri kosmetik dan farmasi (Ambati dan

Gokare 2018; Firdiyani, Agustini, dan Ma'ruf 2015; Vidyalakshmi dan Kumaravel 2014; Al-Dhabi dan Arasu 2016). Karoten digunakan sebagai prekursor vitamin A dan antioksidan yang dapat menghilangkan radikal bebas serta meningkatkan kekebalan tubuh (Park *et al.* 2018; Bogacz-radomska dan Harasym 2018; Meiping dan Caixian 2015). Karoten banyak dimanfaatkan sebagai pewarna dan antioksidan alami makanan, kosmetik, dan farmasi (Mala, Karthik, dan Sakthiselvan 2010). Sedangkan klorofil berfungsi dalam regenerasi sel yang membantu proses penutupan jaringan luka dan pencegah kanker karena memiliki kandungan antioksidan yang tinggi (Hosikian *et al.* 2010; Pirenantyo dan Limantara 2008).

Karoten dan klorofil sebagai antioksidan memiliki kelemahan mudah terdegradasi oleh cahaya dan suhu tinggi (Park *et al.* 2018). Oleh karena itu, diperlukan metode ekstraksi yang sesuai untuk mendapatkan bahan aktif karoten dan klorofil pada *Spirulina*.

Metode ekstraksi karoten dan klorofil yang telah dilakukan antara lain menggunakan pelarut organik (Mala, Karthik, dan Sakthiselvan 2010; Meiping and Caixian 2015), menggunakan gelombang elektro (Poojary *et al.* 2016), ultrasonikasi (Hadiyanto, Marsya, dan Fatkhiyatul 2015) dan CO₂ superkritis (Cardoso *et al.* 2012). Salah satu pelarut yang sering digunakan dalam proses ekstraksi superkritis adalah karbon dioksida (CO₂). CO₂ memiliki kondisi kritis pada suhu 31,1 °C; tekanan 72 bar (7,2 MPa) serta merupakan pelarut yang murah, ramah lingkungan (dibandingkan pelarut organik), dan dikategorikan sebagai senyawa yang aman oleh *Food and Drug Administration (FDA)* dan *The European Food Safety Authority (EFSA)* (Sapkale *et al.* 2010). Teknologi superkritis CO₂ relatif cepat, efisien, dan selektivitas ekstraksi dapat dikontrol dengan densitas pelarut, biaya rendah, dan memberikan hasil ekstraksi yang lebih baik (Machmudah, Kanda, dan Goto 2018; Chan 2012; Sapkale *et al.* 2010). Penggunaan metode ekstraksi menggunakan CO₂ superkritis diharapkan dapat mengatasi sifat mudah terdegradasi yang dimiliki oleh karoten dan klorofil.

Wang *et al.* (2007) telah melakukan ekstraksi *Spirulina platensis* menggunakan CO₂ superkritis menggunakan metode permukaan tanggap dengan rancangan percobaan *Box-Behnken* pada kondisi suhu 32 °C hingga 48 °C; tekanan 20 Mpa sampai 40 MPa; dan waktu 2 jam sampai 4 jam. Hasil penelitian tersebut menunjukkan kondisi optimal pada suhu 48 °C, tekanan 20 MPa, dan waktu 4 jam menghasilkan beta-karoten 77,8 g/kg. Careri *et al.* (2001) telah melakukan ekstraksi *Spirulina platensis* strain *Pacifica* menggunakan CO₂ superkritis dengan rancangan percobaan faktorial pada kondisi suhu 40 °C sampai 80 °C; tekanan 15 MPa

hingga 35 MPa; dan suhu 40 menit sampai 100 menit. Hasil penelitian tersebut menunjukkan kondisi optimal pada suhu 60 °C, tekanan 35 MPa dan waktu 100 menit menghasilkan beta-karoten 118 mg/100 g. Penelitian tersebut juga menyimpulkan bahwa kondisi tekanan berpengaruh signifikan terhadap kadar karoten. Kenaikan tekanan menghasilkan kenaikan kadar karoten. Kenaikan tekanan menyebabkan kenaikan densitas cairan, yang dapat menaikkan kelarutan cairan (Careri *et al.* 2001). Pada saat suhu meningkat, maka densitas cairan menurun dan meningkatkan kelarutan cairan (Thana *et al.* 2008). Pada saat suhu meningkat, maka kemampuan difusi cairan terhadap sampel padat akan meningkat (Jaime *et al.* 2005).

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi karoten dan klorofil dari *Spirulina platensis* menggunakan CO₂ superkritis dan etanol sebagai *co-solvent*. Etanol dipilih karena merupakan pelarut yang *Generally Recognize as Safe (GRAS)*. Etanol merupakan pelarut yang memiliki sifat lebih aman dibandingkan pelarut lainnya seperti aseton, petroleum eter, hexane, dan metanol (Choi dan Lee 2018), sehingga karoten dan klorofil yang dihasilkan aman digunakan untuk makanan dan farmasi. Laju alir etanol sebagai *co-solvent* yang digunakan adalah tetap yaitu 5 ml/menit, sesuai dengan tingkat penggunaan yang umum untuk efektivitas ekstraksi berkisar antara 5,0% dan 16,0% (Srinivas *et al.* 2017). Penelitian oleh Mallikarjun *et al.* (2015) menyatakan bahwa ekstraksi *Spirulina* spp. dengan fluida superkritis menghasilkan ekstrak yang memiliki sifat antioksidan. Uji aktivitas antioksidan pada hasil ekstrak dari *Spirulina* spp. yang menggunakan etanol sebagai *co-solvent* memiliki rendemen lebih tinggi dibandingkan tanpa menggunakan etanol.

Metode yang digunakan untuk mendapatkan optimasi adalah metode permukaan tanggap/ *Response Surface Methodology (RSM)*. Metode permukaan tanggap adalah suatu metode statistika dan matematika digunakan dalam pemodelan dan analisis, yang bertujuan untuk mengembangkan, meningkatkan, dan mengoptimalkan proses. Selain itu untuk melihat pengaruh terhadap beberapa variabel kuantitatif dan untuk mendapatkan variabel respon yang optimal (Jaswir *et al.* 2019). Optimasi dengan metode *permukaan tanggap* dapat mengetahui kondisi proses yang optimal (Jaswir *et al.* 2019), mengetahui pengaruh suhu, tekanan dan waktu dari proses dari setiap proses (Choi dan Lee 2018).

Pada penelitian ini dilakukan optimasi proses ekstraksi karoten dan klorofil dari *Spirulina platensis* menggunakan teknologi superkritis CO₂ dan etanol sebagai *co-solvent* dengan metode *permukaan tanggap*. Adapun variabel

kuantitatif yang digunakan adalah suhu, waktu, dan tekanan ekstraksi (Thana *et al.* 2008), variabel respon berupa kadar karoten dan klorofil. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengoptimalkan proses ekstraksi teknologi CO₂ superkritis dalam menghasilkan ekstrak karoten dan klorofil yang maksimal.

Kebaruan penelitian ini dibandingkan dengan penelitian sebelumnya adalah bahan baku yang digunakan merupakan mikroalga *Spirulina platensis* yang dibudidayakan pada air tawar, yang diekstraksi dengan menggunakan metode superkritis CO₂ untuk mendapatkan karoten dan klorofil. Optimasi proses ekstraksi karoten dan klorofil dari *Spirulina platensis* akan menggunakan rancangan percobaan *Central Composite Designs (CCD)* dengan variabel suhu, waktu dan tekanan, sehingga diharapkan dapat memprediksi pengaruh variabel terhadap kondisi proses ekstraksi serta mengevaluasi hasil ekstrak yang dihasilkan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan penelitian ini antara lain mikroalga *Spirulina platensis*, aquades, dan etanol (Merck).

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah CO₂ superkritis dan Spektrofotometer *Uv-Vis* (Shimadzu UV-1280).

Metode

a. Proses ekstraksi

Persiapan alat ekstraksi CO₂ superkritis dilakukan dengan pengaliran gas CO₂, penyetingan *chiller* pada suhu 2° C hingga suhu -3° C, dan setting suhu ekstraktor *chamber* ke suhu yang diinginkan. Selanjutnya, penimbangan bahan baku *Spirulina platensis* dan memasukkan ke tabung ekstraktor dan mengencangkannya agar tidak terjadi kebocoran. Penambahan etanol sebagai *co-solvent*. Jika tidak terjadi kebocoran CO₂, maka dilanjutkan dengan penyetingan tekanan dan penyetingan *flow* etanol. Selanjutnya dilakukan pemasangan tabung penampung produk ekstrak. Proses ekstraksi dapat dimulai jika kondisi yang diinginkan tercapai, produk ekstrak akan mengalir ke dalam tabung penampung dan dilanjutkan dengan analisa karoten dan klorofil.

Variabel bebas yaitu suhu, tekanan dan waktu dapat dilihat pada Tabel 1. Percobaan optimasi dirancang dengan *CCD* yang merupakan salah satu metode permukaan tanggap. Rancangan percobaan dapat dilihat pada Tabel 2.

b. Analisis Kadar Karoten

Analisis kadar karoten dilakukan menggunakan Spektrofotometer *UV-Vis*. Konsentrasi karoten dihitung sesuai dengan standard PORIM p.2.6, 1995 (Lin, Sue, and Ai 1995). Absorbansi diukur pada panjang gelombang 446 nm dan konsentrasi karoten dihitung dengan persamaan:

$$Karoten = \frac{25 \times 383 \times (As - Ab)}{100 \times W} \quad (1)$$

W menyatakan bobot sampel yang diekstrak (gram), As menyatakan absorbansi sampel, dan Ab menyatakan absorbansi blanko.

Tabel 1. Variabel kondisi (suhu, waktu dan tekanan) pada proses ekstraksi

Variabel	Satuan	Nilai bawah	Nilai atas
Suhu	Celcius	33,8	60
Tekanan	MPa	23,32	26,68
Waktu	Menit	43,18	240

Tabel 2. Rancangan percobaan optimasi proses

Proses	Suhu (°C)	Tekanan (MPa)	Waktu (menit)
1	50	25	43.18
2	50	25	60
3	50	25	77.27
4	60	24	50
5	60	24	70
6	40	24	50
7	40	24	70
8	40	26	50
9	40	26	70
10	50	23.32	60
11	50	26.68	60
12	33.8	25	70
13	60	26	50
14	60	25	45
15	50	25	120
16	50	25	180
17	50	25	240
18	60	25	60
19	60	25	120
20	60	25	180
21	60	25	240

c. Analisis kandungan klorofil

Sampel sebanyak 0,1 gram dan dilarutkan dalam 2 mL pelarut dimasukkan ke dalam ke dalam gelas ukur. Ekstrak tersebut ditera hingga mencapai volume 8 mL. Lalu ekstrak tersebut dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 2.500 rpm. Supernatan yang diperoleh diencerkan menjadi 1 mL ekstrak dilarutkan ke dalam 4 mL metanol dan dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 665 nm dan 652 nm. Absorbansi yang telah dibaca pada panjang 665 nm dan 652 nm dimasukkan ke dalam rumus sebagai berikut:

$$[\text{Ch a}] = 16,29 A_{665} - 8,54 A_{652} \quad (2)$$

$$[\text{Ch b}] = 30,66 A_{652} - 13,58 A_{665} \quad (3)$$

$$\text{Kadar total klorofil} = [\text{Ch a}] + [\text{Ch b}] \quad (4)$$

Keterangan :

[Ch a] = konsentrasi klorofil a

[Ch b] = konsentrasi klorofil b

d. Rancangan Percobaan Optimasi Proses

Optimasi proses metode permukaan tanggap menggunakan *Design Expert 7.0*. Metode optimasi ini juga memiliki kelebihan dibandingkan metode optimasi klasik. Metode klasik umumnya menggunakan pendekatan *one-factor-at-a-time* dimana hanya satu faktor divariasikan pada satu waktu sedangkan variabel yang lain konstan, metode klasik ini, mahal dan membutuhkan waktu yang lama. Dengan menggunakan rancangan percobaan berdasarkan metode permukaan tanggap, percobaan kombinasi dapat dibuat dengan jumlah minim tanpa mencoba seluruh kombinasi (Nuraeni, Pratiwi, dan Ariani 2018; Hunter, Hunter, dan George 1978).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses ekstraksi menggunakan superkritis CO₂

Hasil ekstraksi *Spirulina platensis* menggunakan metode CO₂ superkritis menghasilkan dua jenis senyawa yaitu klorofil dan karoten. Kedua senyawa tersebut dapat berfungsi sebagai antioksidan. Hasil ekstraksi dapat dilihat pada Gambar 1.

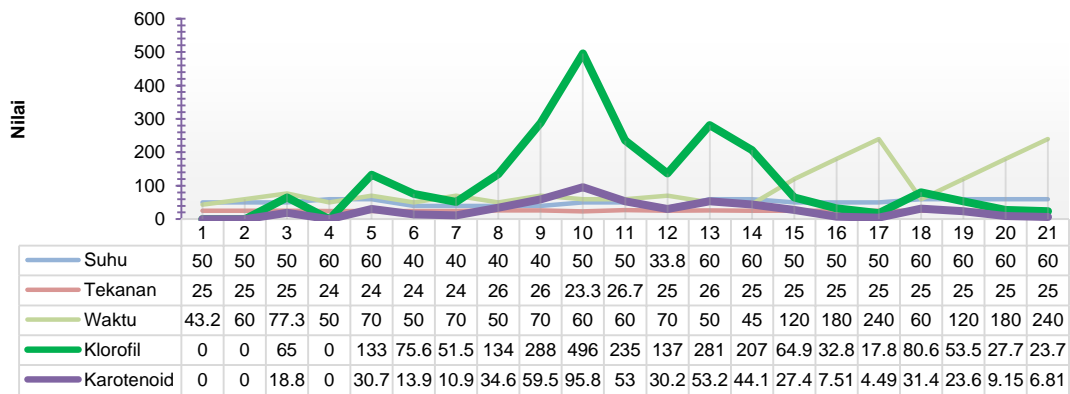
Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar karoten dan klorofil maksimum diperoleh pada kondisi proses suhu 50 °C, tekanan 23,32 MPa dan durasi waktu 60 menit, yaitu menghasilkan kadar karoten sebesar 95,84 µg/ml dan klorofil sebesar 495,6 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa tekanan, waktu dan suhu

sangat mempengaruhi ekstrak yang dihasilkan, selain dari kelarutan CO₂. Hal tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya oleh Cardoso, Serrano, dan Rodríguez (2012), Wang *et al.* (2007), Mendiola *et al.* (2007), Canela *et al.* (2002), dan Careri *et al.* (2001).

Proses ekstraksi *Spirulina platensis* untuk mendapatkan senyawa aktif dengan metode superkritis CO₂. Selain menggunakan pelarut CO₂, juga digunakan etanol sebagai *co-solvent*. Pelarut CO₂ mempunyai karakteristik sifat polaritas yang rendah, sedangkan hasil yang diharapkan berupa karoten dan klorofil mempunyai karakteristik bersifat polaritas tinggi, sehingga membutuhkan pelarut yang mempunyai karakteristik polaritas yang tinggi. Salah satu pelarut yang mempunyai karakteristik polaritas tinggi adalah etanol (Nursa 2015). Pada penelitian sebelumnya, ekstraksi *Spirulina platensis* dilakukan dengan metode ultrasonikasi menggunakan pelarut air selama 45 menit menghasilkan kadar karoten sebesar 22,67 mg/kg dan klorofil 4,3 µg/mL. Ekstraksi *Spirulina platensis* dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol, tidak terdeteksi adanya kadar klorofil (Agustina, Aidha, dan Oktarina 2018). Penelitian ini menunjukkan ekstraksi menggunakan pelarut CO₂ dan etanol menghasilkan kadar karoten dan klorofil yang lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut air.

Evaluasi tingkat signifikansi dari masing-masing faktor (suhu, tekanan dan waktu) terhadap respon (kadar karoten dan klorofil), dilakukan dengan analisis statistik ANOVA. Hasil ANOVA menunjukkan bahwa model kuadratik polinomial adalah model yang cocok untuk mewakili data percobaan. Data ANOVA untuk setiap variabel respon dan signifikansinya pada tingkat kepercayaan 95% dan koefisien korelasinya ditunjukkan pada Tabel 3. Faktor tekanan sangat berpengaruh signifikan terhadap kadar klorofil.

Analisa ANOVA pada penelitian ekstraksi *Spirulina platensis strain Pacifica* dengan superkritis CO₂ untuk mendapatkan karoten signifikan pada faktor tekanan (Careri *et al.* 2001). Kenaikan tekanan akan menyebabkan kenaikan densitas cairan dan dapat meningkatkan kekuatan kelarutan dari CO₂ yang akan menyebabkan *recovery* kuantitatif dan menurunkan interaksi antara cairan dan matriks sampel sebagai akibat dari penurunan koefisien difusi pada densitas cairan yang meningkat. Namun pada penelitian ini, berdasarkan analisa ANOVA, tidak terdapat adanya signifikansi antara faktor suhu dengan tekanan; suhu dengan waktu; dan tekanan dengan waktu.



Gambar 1. Hasil respon karoten dan klorofil berdasarkan faktor suhu, tekanan dan waktu proses ekstraksi

Kadar Karoten

Karoten merupakan tetraterpenoid yaitu terpenoid pigmen yang memiliki 40 atom karbon yang larut pada etanol (Macías-Sánchez *et al.* 2007). Hasil penelitian ini menunjukkan hubungan antara suhu, tekanan, dan waktu dengan kadar karoten yang dihasilkan dari ekstraksi *Spirulina platensis* menggunakan superkritik CO₂. Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk respon permukaan 3 dimensi dapat dilihat pada Gambar 2. Pada Gambar 2a menunjukkan bahwa bertambah tingginya suhu ekstraksi dan tekanan ekstraksi tidak dapat meningkatkan kadar karoten yang dihasilkan. Pada waktu 240 menit, tekanan ekstraksi kurang dari 24,16 MPa, dan suhu ekstraksi yang beragam menunjukkan bahwa diperoleh kadar karoten yang tinggi yaitu mencapai 102,5 µg/ml. Akan tetapi, pada suhu ekstraksi yang lebih rendah (33,60 °C hingga 60 °C) dan tekanan dibawah 24,16 MPa, kadar karoten yang dihasilkan kurang dari 65 µg/ml. Namun, pada suhu dan tekanan ekstraksi yang lebih tinggi, dengan waktu 240 menit, menunjukkan perolehan kadar karoten yang dihasilkan menurun.

Pada Gambar 2b menerangkan pengaruh waktu dan suhu terhadap kadar karoten pada tekanan 23,32 MPa. Diperoleh bahwa semakin lama durasi waktu dan suhu yang tidak terlalu tinggi dapat menaikkan kadar karoten yang dihasilkan. Pada tekanan 23,32 MPa dan suhu ekstraksi yang beragam, menunjukkan bahwa waktu ekstraksi lebih dari 92,58 menit akan diperoleh kadar karoten sebesar 90,5 µg/ml. Akan tetapi pada lama waktu ekstraksi (42,18-240 menit) dan suhu lebih rendah dari 60 °C, kadar karoten yang dihasilkan kurang dari 49 µg/ml. Hal tersebut disebabkan sifat dari karoten yang mudah terdegradasi oleh adanya suhu tinggi (Park *et al.* 2018).

Pada Gambar 2c diketahui bahwa semakin bertambahnya waktu dan tekanan ekstraksi dapat meningkatkan kadar karoten. Pada suhu 33,80 °C menit dan waktu beragam menunjukkan tekanan ekstraksi kurang dari 23,32 MPa, kadar karoten yang dihasilkan kurang dari 75 µg/ml, namun pada waktu suhu 33,80 °C kadar karoten yang dihasilkan menurun. Hal ini terjadi, karena suhu ekstraksi, tekanan ekstraksi serta waktu ekstraksi mempengaruhi perolehan kadar karoten. Hasil ini sesuai dengan hasil dari berbagai waktu ekstraksi pada 200 bar (20 MPa) dan 50 °C meningkatkan efisiensi ekstraksi secara signifikan hingga 6 jam dan kemudian tetap tidak berubah hingga 8 jam karena sistem mencapai kondisi keseimbangan (Srinivas *et al.* 2017). Karoten dari *Spirulina* ini dapat digunakan sebagai bahan untuk sediaan kosmetik dan farmasi.

Kadar Klorofil

Klorofil mengandung bagian dua bagian, yang hidrofil (*macrocycle*) dan hidrofobik (*phytyl chain*). Bagian hidrofil-*macrocycle* adalah *cyclopentanone ring* dan grup propionik ester (Queiroz *et al.* 2017). Klorofil merupakan hasil fotosintesis atau perpaduan antara warna merah dan warna biru terdapat pada mikroalga *Spirulina*, yang banyak digunakan untuk kesehatan. Kadar klorofil dipengaruhi suhu, tekanan, dan waktu.

Hasil penelitian ini menunjukkan hubungan antara suhu, tekanan dan waktu dengan kadar klorofil yang dihasilkan dari ekstraksi *Spirulina platensis* disajikan dalam bentuk respon permukaan 3 dimensi dapat dilihat pada Gambar 3. Pada Gambar 3a menjelaskan tentang hubungan antara antara suhu dan tekanan dengan durasi waktu maksimal yaitu 240 menit. Pada waktu 240

menit, dengan suhu rendah dan tekanan maksimal yaitu 26,68 MPa akan didapatkan klorofil sebesar 326,208 µg/ml. Pada suhu rendah dan tekanan rendah akan didapatkan kadar klorofil yaitu 548,469 µg/ml. Kadar klorofil yang tinggi ditunjukkan dengan warna merah pada gambar, sedangkan warna biru menunjukkan tidak adanya klorofil.

Hubungan antara suhu dan waktu dimana kondisi tekanan minimum yaitu 23,32 MPa dapat dilihat pada Gambar 3b. Pada kondisi suhu rendah dan durasi waktu 240 menit akan didapatkan kadar klorofil yang yaitu 597,176 µg/ml. Hubungan tekanan dan waktu dengan kondisi suhu minimal (33,80 °C) dapat dilihat pada Gambar 3c, kadar klorofil yang tinggi didapatkan pada tekanan minimal dan durasi maksimum. Kadar klorofil dapat mencapai 561,846 µg/ml.

Pada proses ekstraksi dengan CO₂ superkritis, semakin lama waktu ekstraksi (sesuai rentang ekstraksi yaitu 240 menit) maka kadar karoten dan klorofil akan semakin meningkat. Hasil serupa ditunjukkan pada penelitian ekstraksi *Spirulina platensis* dengan CO₂ superkritis oleh Wang *et al.* (2007) dengan rentang ekstraksi hingga 4 jam dan Careri *et al.* (2001) yang mengekstraksi karoten selama 100 menit. Klorofil hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai pewarna pada sediaan farmasi dan kosmetik.

Pada suhu yang makin meningkat (dengan rentang 33,8 °C hingga 60 °C), kadar karoten dan klorofil cenderung menurun. Hal tersebut diakibatkan karena suhu yang tinggi dapat merusak dan mendegradasi klorofil (Choi dan Lee 2018). Penelitian oleh Canela *et al.* (2002) mengenai ekstraksi *Spirulina maxima* dengan CO₂ superkritis dengan hasil karoten pada rentang suhu 20 °C sampai 70 °C menunjukkan kadar karoten akan mencapai puncak pada suhu 60 °C dan akan mengalami penurunan setelahnya.

Optimasi proses ekstraksi menggunakan metode superkritis CO₂

Optimasi merupakan metode untuk mendapatkan kondisi yang optimum dari suatu proses. Apabila kondisi optimum sudah diperoleh, maka akan dapat menghemat biaya, waktu dan energi dalam pengoperasian proses tersebut. Penelitian ini menggunakan proses ekstraksi CO₂ superkritis pada mikroalga *Spirulina platensis*. Dalam melakukan proses ekstraksi CO₂ superkritis sebagai indikator yang penting adalah kelarutan CO₂ dalam kondisi kritis, sehingga pada penelitian ini *flow rate* CO₂ dalam kondisi tetap. Variabel yang digunakan adalah tekanan, waktu dan suhu.

Data penelitian pada Gambar 1. selanjutnya diproses dengan menggunakan metode permukaan tanggap. Kemudian diperoleh model matematika yang mewakili hubungan antara faktor (suhu, tekanan dan waktu) terhadap respon (kadar karoten dan klorofil). Dengan menganalisa respon permukaan dan secara matematis menghitung nilai tertinggi dari variabel pada range penelitian (eksperimen), maka akan didapatkan kondisi ekstraksi terbaik (teroptimum) pada range penelitian (eksperimen). Hasil akhir dari model untuk total klorofil dan karoten adalah:

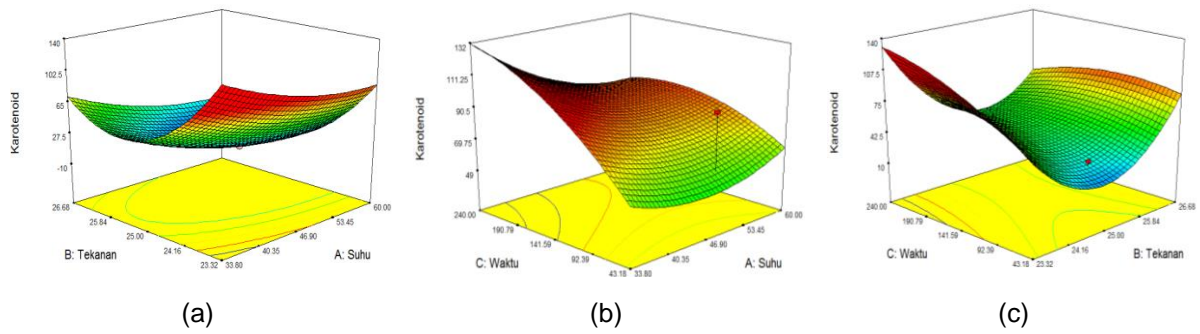
$$\text{Klorofil : } 57.75 - 62.44A - 24.92B + 24.04C + 7.01AB - 67.75AC - 57.13BC + 64.48A^2 + 303.88B^2 - 19.80C^2 \quad (5)$$

$$\text{Karoten : } 19.30 - 10.30A - 9.05B + 2.66C - 0.21AB - 12.38 AC - 20.83BC + 12.79A^2 + 56.30B^2 - 11.81C^2 \quad (6)$$

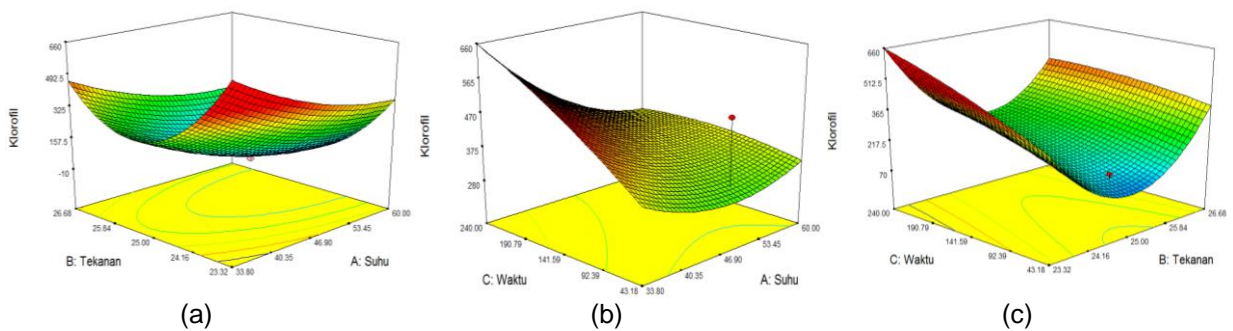
Berdasarkan model tersebut, proses ekstraksi CO₂ superkritis yang optimal didapatkan pada kondisi proses (faktor) suhu optimal 38,57 °C; tekanan optimal 23,43 MPa dan waktu proses selama 227,55 menit. Hasil kadar karoten dan klorofil (respon) maksimal yang diperoleh pada kondisi optimal tersebut adalah 512,403 µg/ml dan 105,701 µg/ml.

Tabel 3. Tingkat Signifikan ANOVA Model *Response Surface Quadratic*

P>F	Klorofil (µg/ml)	Karoten (µg/ml)	
Model	0.2138	0.2500	
A-Suhu	0.5079	0.5804	
B-Tekanan	0.9677	0.9408	
C-Waktu	0.7628	0.8660	
AB	0.8618	0.9914	
AC	0.5149	0.5479	
BC	0.9379	0.8862	
A ²	0.4044	0.4043	
B ²	0.0073	0.0107	Signifikan
C ²	0.8115	0.4778	



Gambar 2. Respon permukaan 3 dimensi kadar karoten berdasar faktor suhu, tekanan dan waktu :
 (a) faktor suhu dan tekanan, dengan faktor waktu maksimal 240 menit; (b) faktor suhu dan waktu dengan tekanan minimal 23,32 MPa; (c) faktor tekanan dan waktu dengan suhu minimal 33,80 °C



Gambar 3. Respon permukaan 3 dimensi kadar klorofil berdasar faktor suhu, tekanan dan waktu :
 (a) faktor suhu dan tekanan, dengan faktor waktu maksimal 240 menit; (b) faktor suhu dan waktu dengan tekanan minimal 23,32 MPa; (c) faktor tekanan dan waktu dengan suhu minimal 33,80 °C

Tabel 4. Data hasil analisis proses ekstraksi superkritis CO₂ menggunakan CCD

Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
Suhu	is in range	33.8	60	1	1	3
Tekanan	is in range	23.32	26.68	1	1	3
Waktu	is in range	43.18	240	1	1	3
Klorofil	maximize	0	495.57	1	1	3
Karotenoid	maximize	0	95.54	1	1	3

Number	Suhu	Tekanan	Waktu	Klorofil	Karotenoid	Desirability
1	38.57	23.43	227.55	512.403	105.701	1.000 Selected
2	34.60	23.35	141.78	507.092	103.377	1.000
3	39.36	23.38	212.11	504.158	105.49	1.000
4	35.50	23.32	163.58	533.906	110.005	1.000
5	36.24	23.41	176.21	503.808	104.793	1.000
6	36.46	23.37	176.43	516.925	107.42	1.000
7	34.56	23.49	183.13	509.499	105.284	1.000
8	34.11	23.40	174.70	543.195	111.613	1.000
9	41.46	23.34	217.78	495.966	104.635	1.000
10	38.72	23.47	232.50	500.141	102.868	1.000
11	40.11	23.32	213.02	518.499	108.696	1.000
12	34.89	23.58	216.21	511.728	104.514	1.000

KESIMPULAN

Ekstraksi karoten dan klorofil dari *Spirulina platensis* dengan teknologi superkritis CO₂ dan menggunakan etanol sebagai *co-solvent* menunjukkan bahwa variabel suhu, tekanan dan waktu berpengaruh terhadap hasil ekstrak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan suhu dan tekanan akan menurunkan kadar karoten dan klorofil, sedangkan peningkatan lama waktu akan menaikkan kadar karoten dan klorofil. Kondisi optimum ekstraksi superkritis CO₂ pada mikroalga *Spirulina platensis* yang didapat dengan menggunakan metode permukaan tanggap CCD adalah suhu 38,57 °C; tekanan 23,43 MPa dan waktu proses selama 227,55 menit. Kadar karoten maksimal yang diperoleh pada kondisi optimum tersebut adalah 512,403 µg/ml dan kadar klorofil sebesar 105,701 µg/ml.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Ibu Dr. Siti Machmudah dan semua pihak yang telah membantu terlaksananya seluruh rangkaian kegiatan penelitian ini serta PT. Neoalga Indonesia Makmur sebagai industri penyedia mikroalga *Spirulina*.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, S., N.N. Aidha, dan E. Oktarina. 2018. "Ekstraksi *Spirulina* Sp. Dengan Menggunakan Metode Ultrasonikasi." *Jurnal Kimia Dan Kemasan* 40 (2): 105–16.
- Agustini, T.W., W.F Ma'ruf, Widayat, Wibowo, dan Hadiyanto. 2017. "Study on the Effect of Different Concentration of *Spirulina Platensis* Paste Added into Dried Noodle to Its Quality Characteristics." In *IOP Conf. Series: Earth and Environmental*, 1–9. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/755/1/011001>.
- Al-Dhabi, Naif Abdullah, dan Mariadhas Valan Arasu. 2016. "Quantification of Phytochemicals from Commercial *Spirulina* Products and Their Antioxidant Activities." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7631864>.
- Ambati, R.R., dan R. Gokare. 2018. "Algae as Source of Functional Ingredients for Health Benefits." *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal* 14 (2). <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2018.14.555911>.
- Bogacz-radomska, L., dan J. Harasym. 2018. "β-Carotene — Properties and Production Methods." *Food Quality and Safety* 2 (April): 69–74. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy004>.
- Canela, A. Paula R.F., Paulo T.V. Rosa, Marcia O.M. Marques, dan M. Angela A. Meireles. 2002. "Supercritical Fluid Extraction of Fatty Acids and Carotenoids from the Microalgae *Spirulina Maxima*." *Industrial and Engineering Chemistry Research* 41 (12): 3012–18.
- Cardoso, L.C., C.M. Serrano, M.R. Rodríguez, Enrique J. M. de la Ossa, dan L.M. Lubián. 2012. "Extraction of Carotenoids and Fatty Acids from Microalgae Using Supercritical Technology." *American Journal of Analytical Chemistry* 03 (12): 877–83. <https://doi.org/10.4236/ajac.2012.312a116>.
- Careri, M., L. Furlattini, A. Mangia, M. Musci, E. Anklam, A. Theobald, dan C. Von Holst. 2001. "Supercritical Fluid Extraction for Liquid Chromatographic Determination of Carotenoids in *Spirulina Pacifica* Algae: A Chemometric Approach." *Journal of Chromatography A* 912 (1): 61–71. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00545-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00545-3).
- Chan, J. 2012. "Extracting Lipid and Carotenoids from Microalgae with Lecithin- Linker Microemulsions." University of Toronto.
- Choi, Woon-Yong, dan Hyeon-Yong Lee. 2018. "Enhancement of Chlorophyll a Production from Marine *Spirulina Maxima* by an Optimized Ultrasonic Extraction Process." *Applied Sciences* 8 (26): 1–10. <https://doi.org/10.3390/app8010026>.
- Firdiyani, F, T.W Agustini, dan W.F Ma'ruf. 2015. "Ekstraksi Senyawa Bioaktif Sebagai Antioksidan Alami *Spirulina Platensis* Segar Dengan Pelarut Yang Berbeda Extraction Of Bioactive Compounds As Natural Antioxidants From Fresh *Spirulina Platensis* Using Different Solvents." *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 18 (1): 28–37. <https://doi.org/10.17844/jphpi.2015.18.1.28>.
- Hadiyanto, H., M.A. Marsya, dan P. Fatkhiyatul. 2015. "Improved Yield of β-Carotene From Microalgae *Spirulina Plantensis* Using Ultrasound Assisted Extraction." *Jurnal Teknologi* 77 (1): 219–22. <https://doi.org/10.11113/jt.v77.4482>.
- Hosikian, Aris, Su Lim, Ronald Halim, dan Michael K Danquah. 2010. "Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects" 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/391632>.
- Hunter, W.G., J.S. Hunter, dan E. George. 1978. *Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. Wiley New York.
- Jaime, L., J.A. Mendiola, M. Herrero, C. Soler-Rivas, S. Santoyo, F.J. Señorans, A. Cifuentes, dan E. Ibáñez. 2005. "Separation and Characterization of Antioxidants from *Spirulina Platensis*

- Microalga Combining Pressurized Liquid Extraction, TLC, and HPLC-DAD." *Journal of Separation Science* 28 (16): 2111–19. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500185>.
- Jaswir, I., D. Noviendri, M. Taher, F. Mohamed, F. Octavianti, W. Lestari, A.G. Mukti, S. Nirwandar, dan B.B.H. Almansori. 2019. "Optimization and Formulation of Fucoxanthin-Loaded Microsphere (F-LM) Using Response Surface Methodology (RSM) and Analysis of Its Fucoxanthin Release Profile." *Molecules* 24 (947): 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24050947>.
- Jaswir, I., D. Noviendri, M. Taher, F. Mohamed, F. Octavianti, W. Lestari, A.G. Mukti, S. Nirwandar, dan B.B.H. Almansori. 2019. "Optimization and Formulation of Fucoxanthin-Loaded Microsphere (F-LM) Using Response Surface Methodology (RSM) and Analysis of Its Fucoxanthin Release Profile." *Molecules* 24 (947): 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24050947>.
- Lin, S.W., T. Sue, dan T.Y. Ai. 1995. "PORIM Test Methods." *Palm Oil Research Institute of Malaysia*. Bandar Baru Bangi, Malaysia.
- Machmudah, S., H. Kanda, dan M. Goto. 2018. "Supercritical Fluids Extraction of Valuable Compounds from Algae: Future Perspectives and Challenges." *Engineering Journal* 22 (5): 14–30. <https://doi.org/10.4186/ej.2018.22.5.13>.
- Macías-Sánchez, M. D., C. Mantell, M. Rodríguez, E. Martínez de la Ossa, L. M. Lubián, dan O. Montero. 2007. "Supercritical Fluid Extraction of Carotenoids and Chlorophyll a from *Synechococcus* Sp." *Journal of Supercritical Fluids* 39 (3): 323–29. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.03.008>.
- Mala, R., V. Karthik, dan S. Sakthiselvan. 2010. "Milking of *Spirulina Platensis* for The Production of Carotenoids By Aqueous Two Phase Bioreactor Systems" 8 (5): 84–91.
- Mallikarjun, G.K.G., S.K. Udaya, Sarada. R., dan G.A. Ravishankar. 2015. "Supercritical CO₂ Extraction of Functional Compounds from *Spirulina* and Their Biological Activity." *Journal of Food Science and Technology* 52 (6): 3627–33. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1426-3>.
- Meiping, Z., dan J. Caixian. 2015. "Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences Study on the Methods of β - Carotene Extraction of *Spirulina Platensis*," 38–44.
- Mendiola, J. A., L. Jaime, S. Santoyo, G. Reglero, A. Cifuentes, E. Ibañez, dan F. J. Señoráns. 2007. "Screening of Functional Compounds in Supercritical Fluid Extracts from *Spirulina Platensis*." *Food Chemistry* 102 (4): 1357–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.068>.
- Nuraeni, C., E. Pratiwi, dan A. Ariani. 2018. "Optimasi Kondisi Ekstraksi Karotenoid Serat Perasan Sawit Menggunakan Metode Permukaan Tanggap." *PORTAL Kimia Dan Kemasan* 5 (1).
- Nursa, R.S. 2015. "Ekstraksi Superkritik Pada Industri Bioproses," no. December.
- Park, Woo Sung, Hye Jin Kim, Min Li, Dong Hoon Lim, Jungmin Kim, Sang Soo Kwak, Chang Min Kang, Mario G. Ferruzzi, dan Mi Jeong Ahn. 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>.
- Pirenantyo, P., dan L. Limantara. 2008. "Pigmen *Spirulina* Sebagai Anti Kanker." *Indonesian Journal Of Cancer* 4: 155–63.
- Poojary, M.M., F.J. Barba, B. Aliakbarian, F. Donsi, G. Pataro, D.A. Dias, dan P. Juliano. 2016. "Innovative Alternative Technologies to Extract Carotenoids from Microalgae and Seaweeds," no. i: 1–34. <https://doi.org/10.3390/md14110214>.
- Queiroz, M. I, A. S Fernandes, M. C Deprá, E Jacob-lobes, dan L. Q Zepka. 2017. *Introductory Chapter: Chlorophyll Molecules and Their Technological Relevance*. Intech. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/67953>.
- Sapkale, G.N., S.M. Patil, U.S. Surwase, dan P.K. Bhatbhage. 2010. "Supercritical Fluid Extraction" 8 (2): 729–43.
- Srinivas, D., N. Harish, K.A. Kumar, dan S. Kumar. 2017. "Process Parameters Affecting The Supercritical Fluid Extraction-A Review." *International Journal of Agricultural Science and Research* 7 (4): 617–24.
- Thana, P., S. Machmudah, M. Goto, M. Sasaki, P. Pavasant, dan A. Shotipruk. 2008. "Response Surface Methodology to Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Astaxanthin from *Haematococcus Pluvialis*." *Bioresource Technology* 99 (8): 3110–15. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.062>.
- Vidyalakshmi, R., dan S. Kumaravel. 2014. "Optimization of Digestion Methods for Mineral in *Spirulina* by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry

(ICP-OES)" 4 (4): 417–21.

Wang, Lin, Bishu Pan, Jianchun Sheng, Juan Xu, dan Qiuhui Hu. 2007. "Antioxidant Activity of Spirulina Platensis Extracts by Supercritical Carbon Dioxide Extraction." *Food Chemistry* 105 (1): 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.054>.

Wells, M.L., P. Potin, J.S. Craigie, J.A. Raven, S.S. Merchant, K.E. Helliwell, A.G. Smith, M.E. Camire, dan S.H. Brawley. 2017. "Algae as Nutritional and Functional Food Sources : Revisiting Our Understanding," 949–82. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0974-5>.