

KANDUNGAN SENYAWA AKTIF *Spirulina platensis* YANG DITUMBUHKAN PADA MEDIA WALNE DENGAN KONSENTRASI NaNO_3 BERBEDA

The Active Compounds of Spirulina platensis Grown on Walne Media with Different NaNO_3 Concentrations

Hartoyo Notonegoro*, Iriani Setyaningsih, dan Kustiariyah Tarman

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas perikanan dan ilmu kelautan, Institut Pertanian Bogor, Jalan Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor, Indonesia

*Korespondensi Penulis: hartoyonotonegoro@gmail.com

Diterima: 14 Agustus 2018; Direvisi: 7 November 2018; Disetujui: 27 November 2018

ABSTRAK

Spirulina platensis merupakan sumber makanan organik yang mengandung protein tinggi dengan asam amino yang seimbang. *Spirulina* juga memiliki kandungan senyawa aktif yaitu fikosianin dan flavonoid. Senyawa aktif tersebut pada umumnya memiliki aktivitas yang potensial sebagai suplemen dan sediaan bahan aktif pada pangan fungsional. Salah satu faktor yang mempengaruhi kandungan fikosianin dan flavonoid dari mikroalga adalah nutrisi yang digunakan dalam media pertumbuhan sehingga perlu dilakukan kajian mengenai pengaruh komposisi media terhadap kandungan fikosianin dan flavonoid. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh variasi kandungan NaNO_3 pada media pertumbuhan terhadap kandungan fikosianin dan flavonoid *S. platensis*; serta menentukan konsentrasi NaNO_3 terbaik pada media Walne untuk menghasilkan biomassa *S. platensis* dengan kandungan fikosianin dan flavonoid tertinggi. Penelitian ini terdiri dari 2 tahapan yaitu kultivasi *S. platensis*; dan ekstraksi fikosianin, flavonoid, dan komponen aktif lainnya. Kultur *S. platensis* menggunakan media Walne dengan variasi kandungan NaNO_3 yaitu masing-masing sebesar 80, 100 dan 120 g selama 11 hari. Total protein dan nitrogen tertinggi diperoleh pada perlakuan 100 g NaNO_3 masing-masing sebesar 44,30% dan 7,09%. Biomassa *S. platensis* setiap perlakuan NaNO_3 mengandung flavonoid, steroid, fenol dan saponin. Konsentrasi dan rendemen fikosianin terbaik diperoleh pada perlakuan 80 g NaNO_3 sebesar 1,32 mg/ml dan 32,93%. Total flavonoid ekstrak *S. platensis* tertinggi diperoleh pada perlakuan 80 g NaNO_3 sebesar 16,56%. *S. platensis* terpilih adalah perlakuan NaNO_3 80 g karena menghasilkan kandungan senyawa aktif flavonoid dan fikosianin tertinggi.

KATA KUNCI: fikosianin, flavonoid, NaNO_3 , *Spirulina platensis*, Walne

ABSTRACT

Spirulina platensis is a source of organic foods that contain high protein with balanced amino acids. *Spirulina* also contains active compounds of phycocyanin and flavonoids. The active compound commonly to have potential activities as supplement and functional food. One of the factors that affects the content of phycocyanin and flavonoids from microalgae is the nutrients used in growth media. So that it is necessary to study the effect of media composition on the content of phycocyanin and flavonoids. This study aimed to determine the effect of various concentrations of NaNO_3 on growth media on the content of flavonoids and phycocyanin and determine the best NaNO_3 concentration in Walne media that produce *S. platensis* biomass with the highest phycocyanin and flavonoid contents. This study was run in two steps that were cultivation of *S. platensis* and extraction of phycocyanin, flavonoid, and other active components. *S. platensis* were cultured in Walne media with various NaNO_3 concentrations that were 80, 100 and 120 g for 11 days. The highest total protein and nitrogen were obtained from 100 g NaNO_3 treatment which were 44.30% and 7.09% respectively. The biomass of *S. platensis* for each of NaNO_3 treatment contains flavonoids, steroids, phenols and saponins. The best concentration and yield of phycocyanin were obtained from the treatment of 80 g NaNO_3 of 1.32 mg/ml and 32.93% respectively. The highest total flavonoids of *S. platensis* extract were obtained at 80 g NaNO_3 treatment of 16.56%. The best treatment to grow *S. platensis* which produced highest active content of phycocyanin and flavonoid was gained from 80 g NaNO_3 medium.

KEYWORDS: phycocyanin, flavonoid, NaNO_3 , *Spirulina platensis*, Walne

PENDAHULUAN

Spirulina platensis adalah salah satu mikroalga yang paling banyak dibudidayakan di dunia terutama karena nilai nutrisinya yang memberikan potensi sebagai suplemen kesehatan dan sediaan bahan aktif dalam pangan fungsional yang bernilai tambah tinggi seperti protein, pigmen fikosianin dan flavonoid (Deamici, Santos & Costa, 2018). Penambahan *S. platensis* dalam pangan fungsional sudah banyak dilakukan karena mudah diproduksi serta kaya akan nutrisi dan sumber senyawa bioaktif yang menjanjikan untuk meningkatkan karakteristik produk fungsional. Wells et al. (2017) melaporkan bahwa produksi dalam skala besar pada *Spirulina* telah terjadi di seluruh dunia dan ditambahkan ke banyak makanan untuk meningkatkan protein dan kandungan senyawa aktif seperti salad, minuman, makanan atau dijual sebagai suplemen kesehatan.

Flavonoid adalah senyawa organik alami yang ada pada tumbuhan secara umum. Hasil penelitian El-baky, El Baz, dan El-Baroty (2009) menunjukkan bahwa penggunaan media Zarrouk pada *Spirulina maxima* dengan perlakuan perbedaan konsentrasi NaNO_3 2,5; 3,13 dan 3,78 g/L sebagai sumber nitrogen menghasilkan flavonoid tertinggi pada konsentrasi 3,78 g/L sebesar $1,93 \pm 0,05$ mg/g. Penelitian Gouda, Kavitha, dan Sarada (2015) melaporkan bahwa penggunaan media Zarrouk dan ekstraksi larutan butanol pada *S. platensis* menghasilkan kandungan flavonoid sebesar $27,4 \pm 1,2$ mg/100 g biomassa yang dapat menghambat α -glukosidase dengan nilai IC_{50} $23,0 \pm 0,4$ $\mu\text{g/mL}$. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa flavonoid berfungsi sebagai antioksidan (Firdiyani, Agustini, & Ma'ruf, 2015) dan antihiperlipidemik (Febrinda, 2014).

Fikosianin adalah pigmen biru alami yang termasuk kelas dari *phycobiliproteins* dan juga dianggap sebagai salah satu pigmen utama *Spirulina* (Kuddus, Singh, Thomas, & Al Hazimi, 2013). Penelitian mengenai peningkatan fikosianin dalam perlakuan nutrisi saat ini terus dikembangkan. Manirafasha et al. (2017) melaporkan bahwa mengkondisikan *S. platensis* dalam keadaan stres dengan cara menambahkan natrium glutamat 5 mM dan asam suksinat 7,5 mM sebagai sumber nitrat pada media Zarrouk ke dalam kultur dapat meningkatkan kandungan fikosianin masing-masing sebesar $0,34 \pm 0,001$ dan $0,311 \pm 0,001$ mg/mL. Anggreni dan Wrasati (2014) juga melaporkan penggunaan media Walne (ml/L) dengan standar 100 g NaNO_3 menghasilkan kandungan fikosianin lebih besar dibandingkan media kultur lain sebesar 7,49 mg/mL. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa fikosianin memiliki aktivitas sebagai antioksidan (Gdara, Belgacem, Khemiri, Mannai, & Bitri, 2018),

antitumor (Liu et al. 2018) dan antimalaria (Wulandari, Setyaningsih, Syafrudin, & Asih, 2016).

Kandungan senyawa aktif pada bahan dipengaruhi perbedaan komponen dan jumlah nutrisi. NaNO_3 merupakan salah satu unsur nutrisi media yang dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroalga namun penelitian tentang pengaruh komposisi NaNO_3 pada media Walne terhadap kandungan flavonoid dan fikosianin masih sangat terbatas. Penelitian terdahulu yang menggunakan media Zarrouk mengkonversi nilai pengurangan dan penambahan NaNO_3 sebesar 20% dari standar NaNO_3 . Penggunaan NaNO_3 pada media Walne umumnya menggunakan konsentrasi sebesar 100 g sehingga perlakuan pada penelitian ini dilakukan dengan pengurangan dan penambahan NaNO_3 sebanyak 80 dan 120 g. Berdasarkan hal tersebut, perlu dikaji pengaruh komposisi NaNO_3 yang berbeda yaitu dengan mengurangi NaNO_3 menjadi 80 g dan menambahkan NaNO_3 sebesar 120 g terhadap kandungan flavonoid dan fikosianin. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan pengaruh perbedaan kandungan NaNO_3 media pertumbuhan terhadap kandungan flavonoid dan fikosianin *S. platensis* dan menentukan konsentrasi NaNO_3 terbaik pada media Walne untuk menghasilkan biomassa *S. platensis* dengan kandungan fikosianin dan flavonoid tertinggi.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah mikroalga *Spirulina platensis* segar yang diperoleh dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara, media Walne dengan 3 konsentrasi (80, 100, dan 120 g pada NaNO_3), air tawar dari sumur bor dan air laut dari Jakarta. Bahan lain yang digunakan meliputi etanol p.a 96%, akuades, bufer fosfat, BSA, *Folin-ciocalteu-fenol*, HCL 2N, amonium sulfat. Alat utama yang digunakan dalam penelitian ini meliputi toples kaca 10 L, nylon mesh ukuran 20 μm , selang, lampu neon putih 40 watt, *Refraktometer*, timbangan digital, *Rotary evaporator*, vortex, sentrifuse, oven, UV-vis, pipet mikro dan alat gelas.

Metode

Prosedur penelitian

Kultivasi, pemanenan dan pengeringan S. platensis

Kultivasi *S. platensis* dilakukan di dalam toples kapasitas 10 l menggunakan media Walne (Tabel 1) dengan kandungan nitrogen yang berbeda yaitu 80 g, 100 g dan 120 g NaNO_3 pada suhu 25 °C dengan intensitas cahaya 3250 lux (40 W) dan lama pencahayaan 24 jam terang, salinitas air laut 15 ppt

Tabel 1. Komposisi media Walne (Walne, 1970)
 Table 1. Walne composition media (Walne, 1970)

| Sediaan/Stock | Per 100 ml |
|---|----------------------------|
| Larutan jejak logam/ <i>Trace metal solution (TMS)</i> | |
| ZnCl ₂ | 2.1 g |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 2.0 g |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O | 0.9 g |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 2.0 g |
| Dibuat larutan sampel sampai 100 ml dengan air suling. Larutan ini biasanya berembun. Larutan sampel diasamkan dengan beberapa tetes HCl. HCl memberikan larutan yang jelas/ <i>Sample solution was made up to 100 ml with distilled water. This solution is normally cloudy. The sample solution was acidified with a few drops of conc. HCl to give a clear solution.</i> | |
| Larutan vitamin/<i>Vitamin solution</i> | |
| Vitamin B ₁₂ (Cyanocobalamin) | 10.0 mg |
| Vitamin B ₂ (Thiamine.HCl) | 10.0 mg |
| Vitamin H (Biotin) | 200.0 µg |
| Dibuat larutan vitamin sampai 100 ml dengan air suling/ <i>Vitamine solution was made up to 100 ml with distilled water</i> | |
| Larutan nutrisi/<i>Nutrient solution</i> | |
| | Per liter/Per litre |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O | 1.3 g |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0.36 g |
| H ₃ BO ₃ | 33.6 g |
| EDTA (Disodium salt) | 45.0 g |
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 20.0 g |
| NaNO ₃ | 100.0 g |
| TMS (1 above) | 1.0 ml |
| Dibuat larutan nutrisi sampai 1 liter dengan air suling/ <i>Nutrient solution was made up to 1 litre with distilled water</i> | |

dan bibit yang digunakan 20% dari volume kultur. *Spirulina platensis* dipanen hari ke 11 dengan OD ≥ 0,5. Pemanenan spirulina dilakukan dengan cara penyaringan menggunakan *nylon mesh* ukuran 20 µm untuk memisahkan biomassa dan filtratnya. Biomassa dikeringkan menggunakan oven suhu 40 °C selama 24 jam untuk mendapatkan biomassa kering *S. platensis*.

Ekstraksi komponen aktif (Syahril et al. 2011)

Biomassa *S. platensis* hasil kultur ditimbang sebanyak 10 g dan dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer yang berisi pelarut etanol sebanyak 100 ml (sampel: pelarut 1:20 b/v). Sampel diekstraksi menggunakan metode maserasi selama 3x24 jam dan setiap 24 jam dilakukan penyaringan. Filtrat hasil penyaringan disimpan dalam kulkas pada suhu 4 °C, residu yang dihasilkan ditambah pelarut etanol untuk dilakukan ekstraksi kembali. Filtrat yang dihasilkan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40-48 °C selama 2 jam, disimpan dalam botol vial pada kulkas pada suhu 4 °C untuk analisis total flavonoid.

Ekstraksi fikosianin (Moraes, Burkert, & Kalil, 2008)

Ekstraksi fikosianin menggunakan bufer fosfat yang mengacu pada penelitian Moraes et al. (2008). Biomassa kering *S. platensis* diekstrak menggunakan bufer sodium fosfat 10 mM (pH 7,0) dengan perbandingan sampel:pelarut sebesar 1:25 (b/v).

Biomassa kering yang sudah ditimbang kemudian dicampurkan dengan bufer fosfat dalam tabung reaksi, lalu dihomogenkan menggunakan vorteks selama 1 menit. Campuran keduanya diekstraksi dengan gelombang ultrasonik pada frekuensi 42 kHz selama 20 menit. Hasil ekstraksi selanjutnya disimpan selama 1 hari pada suhu 4 °C.

Supernatan hasil ekstraksi kemudian dipisahkan menggunakan sentrifuse pada suhu 4 °C dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Ekstrak fikosianin kemudian dilakukan *scanning* untuk mengkonfirmasi keberadaan fikosianin pada rentang panjang gelombang 620-660 nm menggunakan spektrofotometer. Fikosianin yang diperoleh kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40 °C

selama 12 jam. Hasil pengeringan fikosianin ditimbang dan dilakukan analisis *C-phycoyanin*, rendemen fikosianin dan total protein fikosianin.

Analisis data (Walpole & Ronald, 1995)

Evaluasi data rendemen, protein, nitrogen, flavonoid dan fikosianin melibatkan perbedaan jenis media sebagai perlakuan. Data yang diperoleh diuji normalitas dan homogenitasnya sebelum dilakukan analisis ANOVA. Analisis data dilakukan dengan *Analysis of Variant (ANOVA)* pada selang kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Perlakuan yang berpengaruh terhadap respon, selanjutnya diuji lanjut Duncan. Percobaan dilakukan 3 kali ulangan.

Prosedur analisis

Analisis kadar protein kasar (AOAC, 1980)

Analisis kadar protein kasar biomassa *S. platensis* secara kuantitatif mengacu pada AOAC (1980) yang dilakukan melalui proses destruksi, destilasi dan titrasi.

Analisis total flavonoid (Chang, Yang, Wen, & Chern, 2002)

Larutan induk dibuat dengan cara 200 mg ekstrak biomassa, dimasukkan ke dalam labu alas bulat, ditambah heksametilentetramina, aseton, dan larutan HCl, kemudian dihidrolisis dengan caran direfluks selama 30 menit. Campuran hasil hidrolisis disaring, filtrat dimasukkan ke dalam labu tentukur. Residu direfluks kembali dengan di ditambah aseton, dididihkan, disaring dan filtrat dicampur ke dalam labu tentukur. Campuran filtrat dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan akuades lalu dipartisi dengan etilasetat. Fraksi etil asetat dikumpulkan ke dalam labu takar kemudian ditepatkan dengan etilasetat.

Larutan blanko dibuat dengan cara mengambil 10 mL larutan induk, ditambah dengan asam asetat glasial. Larutan sampel dibuat dengan cara mengambil 10 ml larutan induk, ditambah dengan larutan $AlCl_3$ dan asam asetat glasial. Pengukuran dilakukan 30 menit menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 425 nm dengan pembanding kuersetin. Kadar total flavonoid dihitung dengan rumus:

$$\text{Total Flavonoid (\%)} = \frac{CP (As-Abs) \times 1,25 \times 100}{(Ap-Abp) \text{ Berat sampel}}$$

Keterangan:

- Cp = Konsentrasi pembanding
- As = Absorpsi sampel
- Abs = Absorpsi blanko sampel
- Ap = Absorpsi pembanding
- Abp = Absorpsi blanko pembanding

Analisis C-phycoyanin (C-PC) dan rendemen Fikosianin (Bennet & Bogoard, 1973)

Fikosianin yang diperoleh masing-masing diencerkan sesuai dengan perlakuan yang digunakan kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 615 nm dan 652 nm. Konsentrasi C-PC dan rendemen fikosianin dihitung dengan persamaan Bennet dan Bogoard (1973) yaitu:

$$C-PC \text{ (mg/mL)} = \frac{(OD 615) - 0,474 (OD 652)}{5,34}$$

$$\text{Rendemen} = \frac{PC \times V}{DB}$$

Keterangan:

- C-PC = Konsentrasi C - fikosianin (mg/mL)
- V = Volume pelarut (mL)
- DB = Biomassa kering (g)

Analisis total protein fikosianin (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951)

Analisis total protein fikosianin pada pigmen fikosianin secara kuantitatif mengacu pada Lowry et al. (1951) yang dilakukan melalui proses pengikatan Cu atau tembaga dengan ikatan peptide oleh tirosin dan triptofan yang membentuk reduksi fosfomolibdat dan fosfowlframat pada suasana alkali. Reaksi ini menghasilkan warna kebiruan yang dapat dibaca pada panjang gelombang 660 nm.

Analisis komponen aktif (Harborne, 1987)

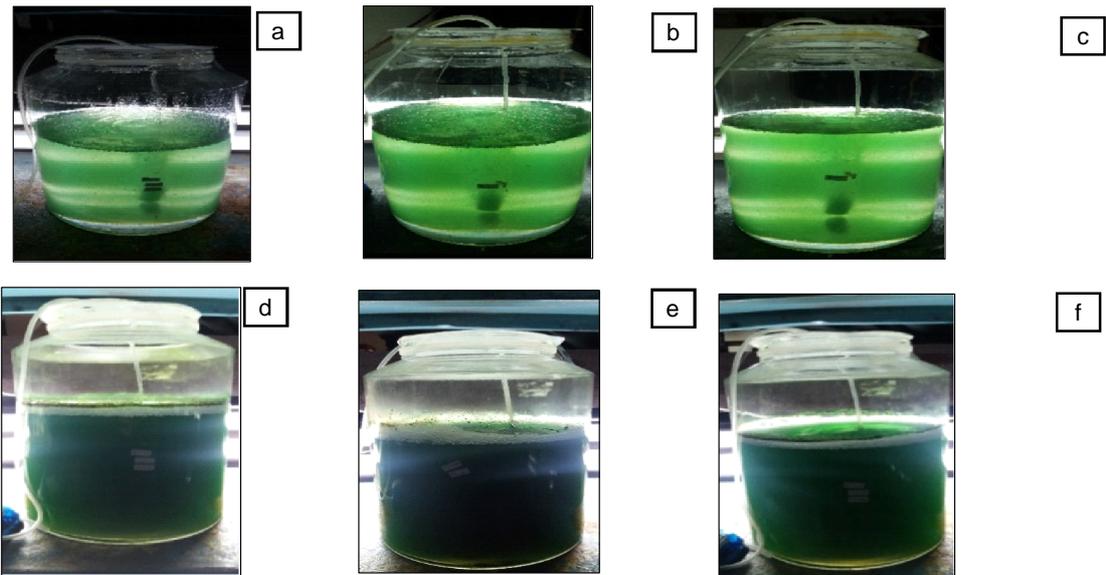
Analisis komponen aktif biomassa *S. platensis* secara kualitatif dilakukan melalui pengujian fitokimia terhadap senyawa alkaloid, steroid, saponin, flavonoid, dan fenol hidrokuinon dengan mengacu pada Harborne (1987).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultur dan Biomassa *S. platensis*

Spirulina platensis dikultivasi menggunakan media Walne dengan modifikasi jumlah kandungan $NaNO_3$. $NaNO_3$ merupakan bentuk utama nitrogen di perairan yang diketahui merupakan nutrisi utama terhadap pertumbuhan mikroalga (Dinata, Anggreni, & Antara, 2017). Pertumbuhan *S. platensis* pada penelitian ini ditandai dengan semakin banyaknya sel yang ditunjukkan dengan perubahan warna dari hijau cerah menjadi hijau pekat pada media kultivasi (Gambar 1).

Pertumbuhan pada *Spirulina* dipengaruhi berbagai faktor di antaranya adalah ketersediaan nutrisi,



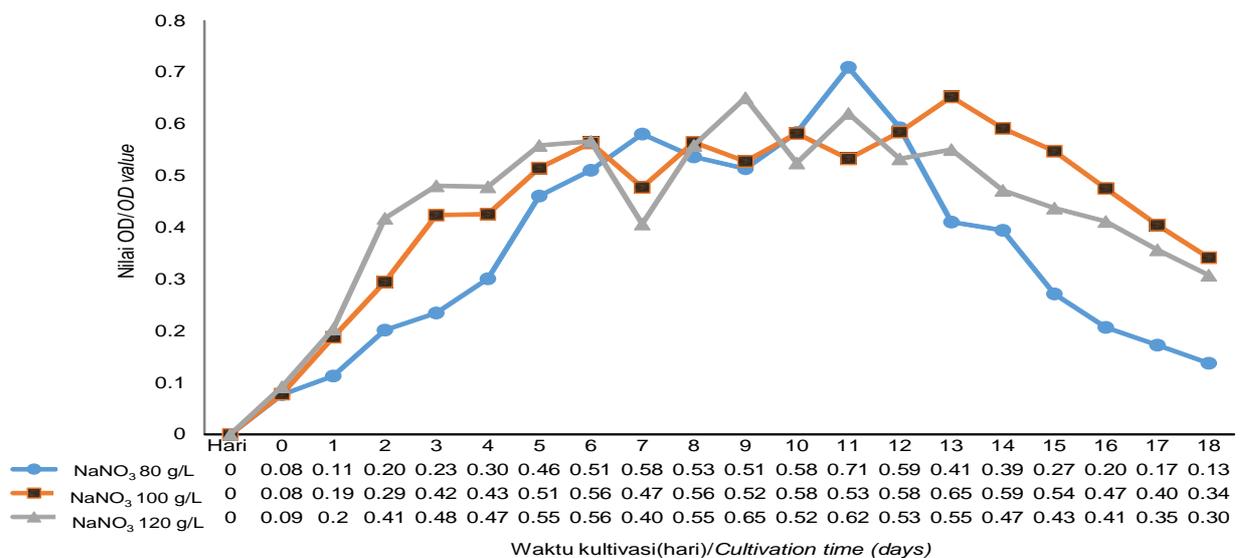
Gambar 1. Kultivasi *S. platensis* (a) 80 g NaNO₃ hari ke-0, (b) 100 g NaNO₃ hari ke-0, (c) 120 g NaNO₃ hari ke-0, (d) 80 g NaNO₃ hari ke-11, (e) 100 g NaNO₃ hari ke-11, (f) 120 g NaNO₃ hari ke-11

Figure 1. Cultivation of *S. platensis* (a) 80 g NaNO₃ day 0, (b) 100 g NaNO₃ day 0, (c) 120 g NaNO₃ day 0, (d) 80 g NaNO₃ day 11, (e) 100 g NaNO₃ day 11, (f) 120 g NaNO₃ day 11.

salinitas, pH, suhu dan media (Astiani, Dewiyanti, & Mellisa, 2018). Menurut Costa et al. (2018), nitrogen (N) merupakan unsur penting untuk pertumbuhan mikroalga yang menyusun komponen biokimia jaringannya (protein dan lemak).

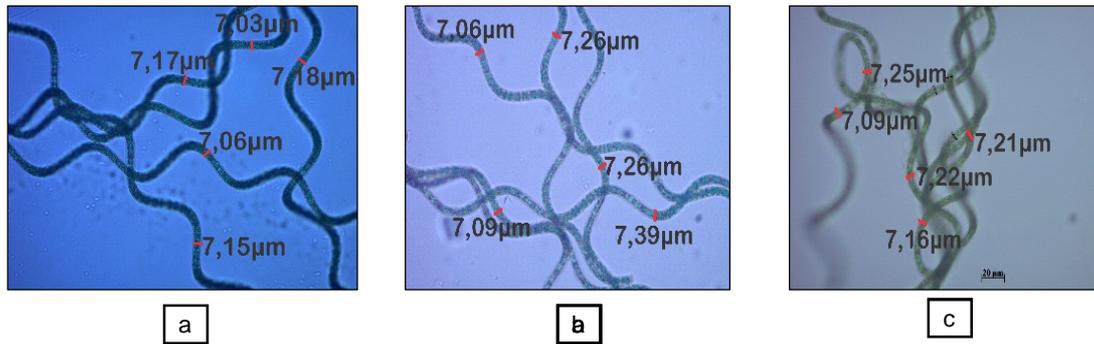
Waktu pemanenan *S. platensis* dilakukan hingga umur mikroalga mencapai fase stasioner yaitu hari ke-11 yang dilihat berdasarkan kurva pertumbuhan. Kurva pertumbuhan *Spirulina* yang dihasilkan dapat

dilihat pada Gambar 2. Waktu panen dilakukan saat mencapai fase stasioner akhir. Hal ini dilakukan karena pada fase ini laju reproduksi mikroalga sama dengan laju kematiannya sehingga mikroalga mengalami pertumbuhan yang seimbang dan membuat kandungan nutrisi pada sel mikroalga yang dipanen akan menjadi lebih baik dari fase-fase sebelumnya (Healey, 1973). Hal ini diperkuat oleh Rafaelina et al.(2016) yang menyatakan bahwa pemanenan



Gambar 2. Kurva pertumbuhan *Spirulina platensis*

Figure 2. *Spirulina platensis* growth curve



Gambar 3. Ukuran sel *S. platensis* pada hari ke 11 dengan perbesaran 40 x 10 (a) 80 g NaNO₃, (b) 100 g NaNO₃, (c) 120 g NaNO₃
 Figure 3. Cell size of *S. platensis* on day 11th at magnification of 40 x 10 (a) 80 g NaNO₃, (b) 100 g NaNO₃, (c) 120 g NaNO₃

biomassa mikroalga dilakukan pada fase stasioner dikarenakan pada fase ini terjadi peningkatan metabolisme sekunder. Metabolisme sekunder terjadi pada fase stasioner yang merupakan keseluruhan proses sintesis dan perombakan produk metabolit primer (Herbert, 1995).

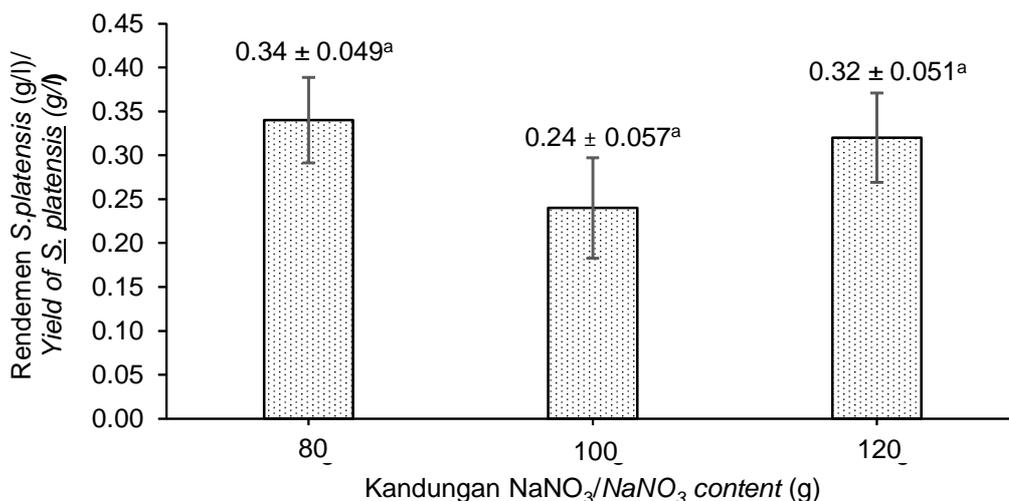
Spirulina platensis yang dikultivasi dalam media Walne dengan perbedaan jumlah NaNO₃ 80, 100 dan 120 g masing-masing memiliki OD 0,71; 0,53 dan 0,62 dengan rata-rata diameter 7,12 μm/sel, 7,21 μm/sel, 7,19 μm/sel dan filamen berbentuk spiral (Gambar 3).

Hasil ini menunjukkan bahwa perbedaan jumlah NaNO₃ tidak menghasilkan perbedaan dalam ukuran sel. Secara umum ukuran panjang tubuh *Spirulina* berkisar 200-300 μm dan lebar 6-8 μm. Jain dan Singh

(2012) menyatakan bahwa *S. platensis* yang dipanen dengan nilai OD berkisar 0,5-1,0 memiliki ketersediaan unsur nitrogen dalam medium yang cukup besar sehingga biosintesis dan metabolisme sel cepat terjadi. Peningkatan tersebut berkorelasi dengan meningkatnya metabolit sekunder dan komponen bioaktif yang dihasilkan.

Rendemen Biomassa

Biomassa basah hasil panen dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 40 °C selama 24 jam. Pengeringan biomassa mikroalga yang efisien merupakan faktor yang mendasar dari segi kelayakan ekonomi pada sistem produksi mikroalga (Hadiyanto & Azim, 2012). Rendemen biomassa kering *S. platensis* yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 4.



Keterangan/Note : Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata terkecil pada taraf nyata 0,05 (p<0,05)/The different letter shows the smallest significant difference at the 0.05 level (p<0.05)

Gambar 4. Rendemen *S. platensis* yang dikultivasi dengan kandungan NaNO₃ berbeda
 Figure 4. The yield of *S. platensis* cultivated in various NaNO₃ content

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan jumlah NaNO_3 tidak berpengaruh nyata ($p>0,05$) terhadap rendemen *S. platensis*. Hal ini menunjukkan bahwa dengan perbedaan perlakuan NaNO_3 sebesar 80, 100 dan 120 g tidak memberikan perbedaan pada rendemen biomassa *S. platensis*. Hal ini diduga karena masing-masing konsentrasi NaNO_3 masih mencukupi untuk memenuhi pertumbuhan dari *S. platensis* sehingga belum memberikan perbedaan yang signifikan satu sama lainnya. Menurut Raoof, Kaushik, dan Prasanna (2008) nitrogen merupakan unsur penting bagi sel *S. platensis* yang mendukung aktivitas metabolisme sel sehingga pembelahan sel dapat terus berlangsung. Richmond (1988) mengaitkan kemampuan terus tumbuh dengan adanya kumpulan pigmen fikosianin yang berfungsi sebagai cadangan nitrogen pada sel *S. platensis*.

Kadar Total Protein dan Nitrogen

Mikroalga *S. platensis* merupakan makanan fungsional yang mengandung protein tinggi. Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga sebagai faktor tumbuh (*growth factors*) dan sintesis protein pada *S. platensis* salah satunya adalah unsur nitrogen. Kandungan total protein dan nitrogen pada *S. platensis* dapat dilihat pada Gambar 5.

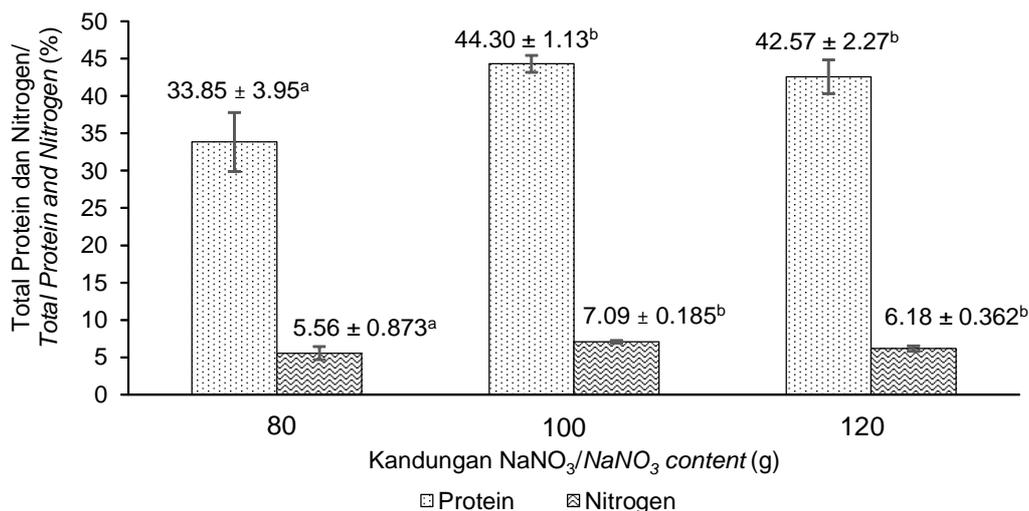
Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan kandungan NaNO_3 berpengaruh nyata

($p<0,05$) terhadap kandungan total protein dan nitrogen *S. platensis*. Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan kandungan total protein dan nitrogen dalam biomassa *S. platensis* pada perlakuan 80 g NaNO_3 berbeda nyata dengan 100 g NaNO_3 dan 120 g NaNO_3 . Kandungan total protein dan nitrogen pada perlakuan 80 g NaNO_3 lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan lainnya karena perlakuan 80 g NaNO_3 memiliki kandungan NaNO_3 lebih sedikit dibandingkan yang lainnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa dengan rendahnya unsur NaNO_3 dapat berakibat buruk pada senyawa primer protein mikroalga tetapi tidak pada senyawa sekunder yang dihasilkan.

NaNO_3 atau amonium nitrat merupakan sumber nitrogen. Nitrogen merupakan senyawa esensial yang digunakan oleh mikroalga dalam sintesis protein dan pembentukan jaringan sel (Dinata et al., 2017). Pada perlakuan 100 g NaNO_3 dan 120 g NaNO_3 yang tidak berpengaruh nyata, diduga karena adanya faktor pembatas pada mikroalga. Menurut Sari, Suryajaya, dan Hadiyanto (2012) media yang memiliki unsur hara atau nutrien yang terlalu tinggi akan mempengaruhi pertumbuhan maupun jumlah kandungan senyawa organik karena mikroalga tersebut memerlukan waktu yang lebih lama untuk beradaptasi.

Senyawa Aktif *S. platensis*

Identifikasi senyawa aktif pada biomassa kering dari *S. platensis* dilakukan dengan cara uji fitokimia. Fitokimia biasanya digunakan untuk merujuk



Keterangan/Note : Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata terkecil pada taraf nyata 0,05 ($p<0,05$)/The different letter shows the smallest significant difference at the 0.05 level ($p<0.05$)

Gambar 5. Kandungan total protein dan nitrogen *S. platensis* yang dikultivasi dengan kandungan NaNO_3 yang berbeda

Figure 5. Total protein and nitrogen content of *S. platensis* cultivated various NaNO_3 content

pada senyawa yang ditemukan pada tumbuhan yang tidak dibutuhkan untuk fungsi normal tubuh. *S. platensis* yang dikultivasi dengan media yang mengandung 80, 100 dan 120 g NaNO₃ mempunyai senyawa aktif flavonoid, steroid, fenol hidrokuinon dan saponin (Tabel 2).

Identifikasi senyawa aktif menunjukkan bahwa perbedaan perlakuan jumlah NaNO₃ pada penelitian ini tidak mempengaruhi jenis senyawa aktif. Hal ini diduga karena unsur NaNO₃ masih mencukupi untuk melakukan sintesis senyawa aktif tersebut. Liao et al. (2018) menyatakan bahwa mikroalga memiliki durasi waktu pertumbuhan yang cepat sehingga perlu adanya nutrisi yang sesuai dalam pertumbuhannya sehingga sintesis senyawa aktif dapat terjadi secara optimal. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Agustini, Suzery, Sutrisnanto, Ma'ruf, dan Hadiyanto (2015) yaitu biomassa kering *S. platensis* hasil kultur mengandung senyawa flavonoid, steroid, fenol hidrokuinon dan saponin sedangkan alkaloid tidak terdeteksi. Hal ini diduga karena *S. platensis* merupakan tumbuhan tingkat rendah. Firdiyani et al. (2015) menyatakan bahwa alkaloid tidak ditemukan di semua jenis tanaman dan kebanyakan ditemukan pada tanaman tingkat tinggi Angiospermae terutama pada tanaman dikotil.

S. platensis pada penelitian ini mengandung senyawa saponin. Saponin banyak ditemukan terutama dalam tumbuh-tumbuhan. Hasil penelitian Agustini et al. (2015) menunjukkan hasil positif saponin dari sampel *S. platensis* yang dikeringkan saja karena keberadaan saponin dalam sampel segar/basah sangat kecil sehingga tidak bisa terdeteksi secara kualitatif. Menurut Kannan, Pushparaj, Dheeba, Nageshwari, dan Kannan (2014) ekstrak kasar

metanol *S. platensis* positif terhadap kandungan saponin.

Biomassa *S. platensis* mengandung senyawa steroid. Steroid merupakan produk metabolit sekunder yang dihasilkan dari proses glikolisis yang diubah menjadi Malonyl CoA dan isoprene (Mukharromah & Suyatno, 2014). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Agustini et al. (2015) yang menyatakan bahwa *S. platensis* mengandung senyawa steroid/triterpenoid.

Fenol hidrokuinon pada penelitian ini positif yang ditandai dengan terbentuknya warna hijau. Menurut Fahleny, Trilaksani, dan Setyaningsih (2014) serbuk *S. platensis* mengandung senyawa fenol hidrokuinon. Senyawa fenol biasanya terdapat dalam berbagai jenis sayuran, buah-buahan dan tanaman. Senyawa fenol diproduksi oleh tanaman melalui jalur sikimat dan metabolisme fenil propanoid (Rashid, Park & Selvaratnam, 2018).

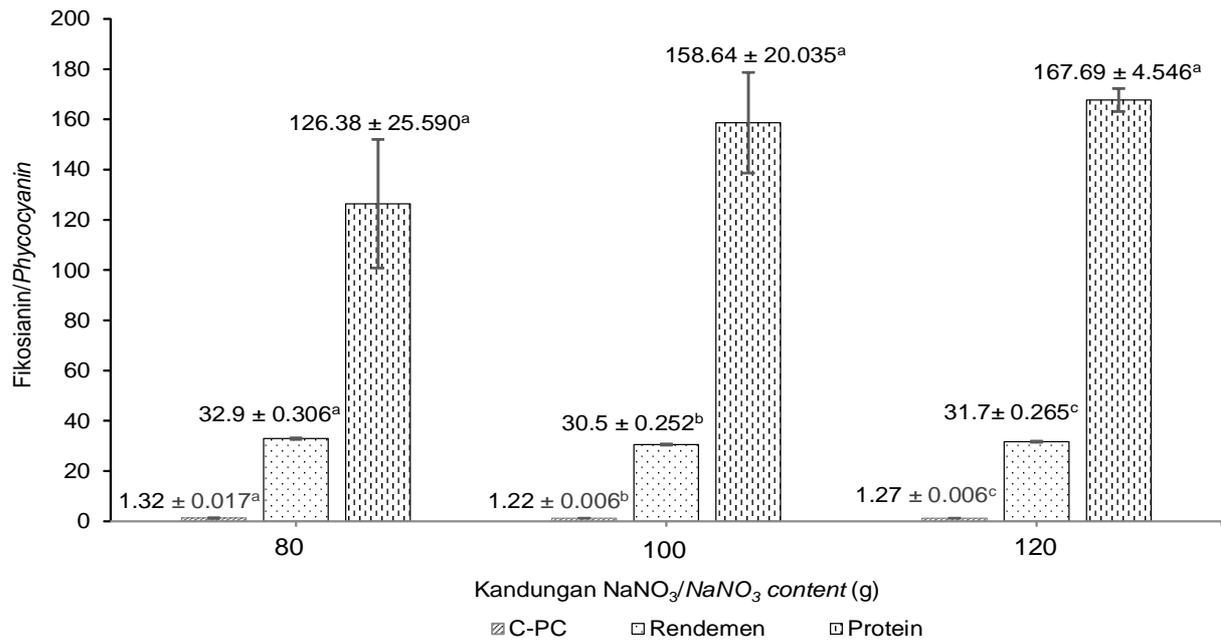
Biomassa kering *S. platensis* menunjukkan positif terhadap senyawa flavonoid. Flavonoid banyak ditemukan pada tumbuhan. Hasil ini sesuai dengan penelitian Czerwonka et al. (2018) yang menyatakan *S. platensis* mengandung senyawa flavonoid. Hasil yang sama juga ditunjukkan pada penelitian El-Baky et al. (2009) yang melaporkan bahwa *S. maxima* mempunyai kadar flavonoid 5.12 mg/g.

Fikosianin

Salah satu pigmen utama dalam *S. platensis* adalah fikosianin. Fikosianin dapat diekstrak menggunakan pelarut air atau buffer karena merupakan pigmen yang berasosiasi dengan protein dan bersifat polar serta larut air (Wulandari et al. 2016). Hasil analisis fikosianin yang meliputi konsentrasi C-phycocyanin (C-PC), rendemen, dan total protein dari

Tabel 2. Senyawa aktif *S. platensis* yang dikultivasi menggunakan kandungan NaNO₃ berbeda
 Table 2. The active compounds of *S. platensis* cultivated in different NaNO₃ contents

| Komponen aktif/ Active component | 80 g NaNO ₃ | 100 g NaNO ₃ | 120 g NaNO ₃ | Standar warna/ Colour standard |
|-------------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---|
| Alkaloid | | | | |
| Dragendorff | - | - | - | Endapan merah atau jingga/Red or orange sediment |
| Meyer | - | - | - | Endapan putih/White sediment |
| Wagner | - | - | - | Endapan coklat/Brown sediment |
| Flavonoid | + | + | + | Lapisan amil alkohol/Amil alcohol layer |
| Steroid | + | + | + | Perubahan warna merah menjadi biru/hijau/Change red to blue/green |
| Fenol hidrokuinon | + | + | + | Warna jingga, hijau hingga hijau kebiruan/Orange, green to bluish green |
| Saponin | + | + | + | Terbentuknya busa/Foam formation |



Keterangan/Note : Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata terkecil pada taraf nyata 0,05 ($p < 0,05$)/The different letter shows the smallest significant difference at the 0.05 level ($p < 0.05$)

Gambar 6. Konsentrasi *C-phycoerythrin* (mg/mL), rendemen (%) dan total protein fikosianin (%) *S. platensis* yang dikultivasi dengan kandungan NaNO₃ berbeda

Figure 6. *C-phycoerythrin* concentration (mg/mL), yield (%) and (%) protein total phycocyanin of *S. platensis* cultivated in various NaNO₃ contents

mikroalga yang dikultivasi menggunakan NaNO₃ dengan jumlah berbeda dapat dilihat pada Gambar 6.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan jumlah NaNO₃ berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap konsentrasi *C-phycoerythrin* pada *S. platensis*. Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan konsentrasi *C-phycoerythrin* pada ketiga perlakuan NaNO₃ saling berbeda nyata satu sama lain. Tingginya nilai konsentrasi fikosianin pada perlakuan 80 g NaNO₃ diduga sebagai upaya *S. platensis* untuk meningkatkan senyawa sekunder pada kondisi tertekan (stres). Hal tersebut menunjukkan apabila kandungan NaNO₃ rendah maka senyawa primer yang dihasilkan rendah tetapi senyawa sekundernya meningkat. Apabila kandungan NaNO₃ tinggi maka senyawa primer yang dihasilkan tinggi dan senyawa sekundernya meningkat. Namun tetap ada faktor limit mikroalga sehingga tidak dapat termanfaatkan dengan optimal.

Sujatha dan Nagarajan (2013) menyatakan faktor lain yang juga mempengaruhi pigmen adalah komposisi media. Media pertumbuhan yang mengandung jumlah nitrogen sedikit cenderung mempengaruhi mikroalga dalam membentuk pigmen fikosianin yang berfungsi dalam detoksifikasi tubuh manusia dari racun. Antonio del Rio-Chanon, Zhang,

Xie, Manirafasha, dan Jing (2015) melaporkan bahwa penambahan kandungan nitrat dan pemberian stres dengan mengurangi pencahayaan pada lampu pada kultur *S. platensis* menunjukkan hasil yang baik dengan meningkatkan sebanyak 27% kandungan fikosianin yaitu sebesar 137 mg/ml.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan jumlah NaNO₃ berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap rendemen fikosianin pada *S. platensis*. Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan rendemen fikosianin pada ketiga perlakuan NaNO₃ saling berbeda nyata satu sama lain. Tingginya nilai rendemen fikosianin pada perlakuan 80 g NaNO₃ diduga karena produksi kandungan fikosianin yang tinggi akibat adanya pemberian perlakuan stres dengan cara mengurangi nutrisi sehingga kadar rendemen fikosianin menjadi tinggi. Perbedaan nilai hasil rendemen fikosianin yang diekstrak menggunakan gelombang ultraonik dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya adalah karena adanya perbedaan komposisi NaNO₃ pada media yang digunakan. Nitrogen merupakan elemen esensial yang dibutuhkan untuk sintesis pigmen aksesoris dan klorofil. Terjadinya defisiensi nitrogen akan mengakibatkan senyawa nitrogen yang disimpan digunakan untuk proses sintesis komponen-komponen tersebut.

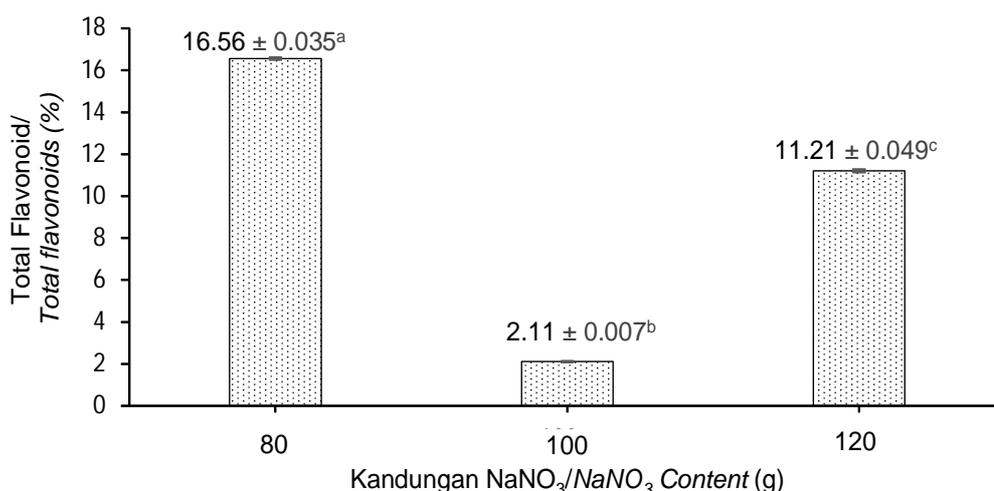
Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan jumlah NaNO_3 tidak berpengaruh nyata ($p > 0,05$) terhadap total protein fikosianin pada *S. platensis*. Hal ini menunjukkan bahwa dengan perbedaan jumlah NaNO_3 sebesar 80, 100 dan 120 g tidak memberikan perbedaan pada total protein fikosianin *S. platensis*. Hal tersebut diduga apabila NaNO_3 berkurang maka protein yang merupakan senyawa primer dalam fikosianin akan menjadi berkurang tetapi fikosianin yang merupakan senyawa sekunder akan meningkat sehingga konsentrasi pigmen fikosianin meningkat tetapi protein yang telah terikat pada fikosianin tersebut berkurang. Fikosianin termasuk kelompok pigmen yang terikat pada protein. Sel-sel pada mikroalga dapat mengalami penurunan kandungan protein yang mengakibatkan degradasi berbagai komponen sel yang berkaitan dengan sintesa protein termasuk protein yang terdapat dalam fikosianin, hal ini dapat terjadi apabila kekurangan unsur nitrogen karena nitrogen merupakan prekursor penyusun senyawa protein dalam sel (Richardson, Orcutt, Schwertner, Martinez & Wickline, 1969).

Total Flavonoid *S. platensis*

Senyawa fenol yang terbesar ditemukan di alam salah satunya adalah flavonoid. Senyawa-senyawa ini dapat ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan dengan zat warna merah, ungu, dan biru, dan sebagian zat warna kuning (Gafur, Isa, & Bialangi, 2014). Kandungan total flavonoid ditetapkan menggunakan reagen AlCl_3 berdasarkan metode Chang et al. (2002). AlCl_3 akan bereaksi dengan gugus keto pada C4 dan

gugus OH pada C3 atau C5 pada senyawa flavon atau flavonol membentuk senyawa kompleks yang stabil berwarna kuning. Hasil analisis total flavonoid pada ekstrak *S. platensis* dapat dilihat pada Gambar 7.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan jumlah NaNO_3 berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap total flavonoid pada *S. platensis*. Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan total flavonoid pada ketiga perlakuan NaNO_3 saling berbeda nyata satu sama lain. Total flavonoid tertinggi terdapat pada perlakuan 80 g NaNO_3 . Tingginya total flavonoid pada *S. platensis* pada perlakuan 80 g NaNO_3 dikarenakan rendahnya unsur NaNO_3 yang digunakan. Hal ini diperkuat oleh Awad dan Jager (2002) yang menyatakan bahwa peningkatan flavonoid di bawah pemupukan kandungan nitrogen yang rendah meningkatkan ketersediaan fenilalanin karena pembatasan sintesis protein di bawah defisiensi nitrogen. Fenilalanin yang ditingkatkan secara substansial akan meningkatkan produksi flavonoid karena fenilalanin juga merupakan prekursor untuk pembentukan flavonoid. Hasil ini didukung oleh penelitian Ibrahim, Jaafar, Rahmat, dan Rahman (2012) yang menunjukkan bahwa tanaman kacang fatimah (*Labisia pumila* Blume) memiliki kandungan flavonoid tertinggi pada daun, batang dan akar yang diberi pemupukan dengan konsentrasi 0 kg N/ha dibandingkan perlakuan 90, 180 dan 270 kg N/ha dengan nilai berturut-turut pada daun, batang dan akar yaitu 0,90 mg/g, 0,77mg/g, 0,55 mg/g. Perlakuan konsentrasi 0 kg N/ha menghasilkan peningkatan kandungan total flavonoid sebesar 3%, 13% dan 32% pada perlakuan 90, 180 dan 270 kg N/ha.



Keterangan/Note : Huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata terkecil pada taraf nyata 0,05 ($p < 0,05$)/The different letter shows the smallest significant difference at the 0.05 level ($p < 0.05$)

Gambar 7. Total flavonoid pada ekstrak *S. platensis* yang dikultivasi menggunakan kandungan NaNO_3 berbeda
 Figure 7. Total flavonoids in *S. platensis* cultivated in various NaNO_3 contents

KESIMPULAN

Total protein dan nitrogen terbaik diperoleh pada perlakuan 100 g NaNO₃ masing-masing 44,30% dan 7,09%. Biomassa *S. platensis* mengandung flavonoid, steroid, fenol dan saponin. Konsentrasi dan rendemen fikosianin terbaik diperoleh pada perlakuan 80 g NaNO₃ sebesar 1,32 mg/ml dan 32,93%. Total flavonoid ekstrak *S. platensis* terbaik diperoleh pada perlakuan 80 g NaNO₃ sebesar 16.56%.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustini, T. W., Suzery, M., Sutrisnanto, D., Ma'ruf, W. F., & Hadiyanto. (2015). Comparative study of bioactive substances extracted from fresh and dried *Spirulina* sp. *Procedia Environ Sci*, 23, 282-289.
- Anggreni, A. A. M. D., & Wrasiasi, L. H. (2014). Pengaruh jenis media terhadap pertumbuhan dan kadar protein mikroalga *Tetraselmis chuii*. [Laporan Penelitian Dosen Muda]. Bali (ID): Udayana. Retrieved from <https://simdos.unud.ac.id>
- Antonio del Rio-Chanona, E., Zhang, D., Xie, Y., Manirafasha, E., & Jing, K. (2015). Dynamic simulation and optimization for *Arthrospira platensis* growth and METODEc phycocyanin production. *Ind Eng Chem Res*, 54, 43.
- Association of Official Analytical Chemst. (AOAC). (1980). Official method of analysis. Association of official analytical chemist. (12th ed). Washington, DC.
- Astiani, F., Dewiyanti, I., & Mellisa, S. (2016). Pengaruh media kultur yang berbeda terhadap laju pertumbuhan dan biomassa *Spirulina* sp. *JIM*, 1(3), 441-448.
- Awad., & de Jager, M. A. (2002). A relationship between fruit nutrients and concentrations of flavonoids and chlorogenic acid in 'Elstar' apple skin. *Sci Hort*, 92, 265-276.
- Bennet, A., & Bogoard, I. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J. Cell. Biol.*, 58, 419-435.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.*, 10(3), 178-182.
- Costa, S. S., Miranda, L. A., Andrade, B. B., Assis, D. J., Souza, C. O., Morais, M. G., Costa, J. A. V., & Druzian, J. I. (2018). Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. *Int. J. Biol. Macromol.*, 116, 552-562.
- Czerwonka, A., Kalawaj, K., Slawinska, A., Lemieszek, M. K., Bartnik, M., Wojtanowski, K. K., Zdzisinska, B., & Rzeski, W. (2018). Anticancer effect of the water extract of a commercial *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) product on the human lung cancer A549 cell line. *Bio Phar.*, 106, 292-302.
- Deamici, K. M., Santos, L. O., & Costa, J. A. V. (2018). Magnetic field action on outdoor and indoor cultures of *Spirulina*: Evaluation of growth, medium consumption and protein profile. *Bioresource Technol.*, 249, 168-174.
- Dinata W. B. K. D., Anggreni D. A. A. M., Antara, N. S. (2017). Pengaruh konsentrasi natrium nitrat dan natrium dehidrogen fosfat pada media Walne terhadap konsentrasi biomassa dan protein *Nannochloropsis oculata*, *JKMA.*, 5(1), 40-49.
- El-Baky, H.H., El Baz, F.K., & El-Baroty, G.S. (2009). Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effects *in vitro* toward hepatotoxicity model. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 3(4), 133-139.
- Fahleny, R., Trilaksana, W., & Setyaningsih I. (2014). Aktivitas antioksidan pada formula terpilih tablet hisap *S. platensis* berdasarkan karakteristik fisik. *J Trop. Mar. Sci. Tech.*, 6(2), 427-444.
- Febrinda, A. E. (2014). Potensi antioksidan dan antidiabetik ekstrak air dan etanol umbi bawang dayak (*Eleutherine Palmifolia*) secara *in vitro* dan *in vivo*. Tesis. Bogor (ID): IPB. Retrieved from <http://www.repository.ipb.ac.id>
- Firdiyani, F., Agustini, T. W., & Ma'ruf, W. F. (2015). Ekstraksi senyawa bioaktif sebagai antioksidan alami *Spirulina platensis* segar dengan pelarut yang berbeda. *JPHPI*, 18(1), 28-37.
- Gafur, M. A., Isa, I., & Bialangi N. (2014). Isolasi dan identifikasi flavonoid dari daun jambang (*Syzygium cumini*). *Skripsi*. Gorontalo (ID): UNG. Retrieved from <http://www.repository.ung.ac.id>
- Gdara, N. B., Belgacem, A., Khemiri, I., Mannai, S., & Bitri, L. (2018). Protective effects of phycocyanin on ischemia/reperfusion liver injuries. *J. Biomed. Pharmacother.*, 102, 196-202.
- Gouda, K. G. M., Kavitha, M. D., & Sarada, R. (2015). Antihyperglycemic, antioxidant and antimicrobial activities of the butanol extract from *Spirulina platensis*. *J. Food Biochem.*, 39, 594-602.
- Hadiyanto, & Azim, M. (2012). *Mikroalga: sumber pangan dan energi masa depan*. Semarang: UPT Undip press.
- Harborne, J. B. (1987). *Metode fitokimia: penuntun cara modern menganalisa tumbuhan*. Diterjemahkan oleh Padmawinata K. Bandung: Penerbit ITB.
- Healey, F. P. (1973). Inorganic nutrient uptake and deficiency in algae. *CRC Microbiol.*, 1, 69-113.
- Herbert, R.B. (1995). *Biosintesis metabolit sekunder*. Diterjemahkan oleh Bambang Srigandono. Semarang: IKIP Semarang Pr. Terjemahan dari: The Biosynthesis of Secondary Metabolites.
- Ibrahim, M. H., Jaafar, H. Z. E., Rahmat, A., & Rahman, Z. A. (2012). Involvement of nitrogen on flavonoids, glutathione, anthocyanin, ascorbic acid and antioxidant activities of malaysian medicinal plant *Labisia pumila* Blume (Kacip Fatimah). *Int. J. Mol. Sci.*, 13, 393-408.
- Jain, S., & Singh, S. G. (2012). Optimization of biomass yield of *Spirulina platensis* grown in petha (*Benincasa hispida* Thunb.) waste in different culture conditions. *Indian J. Biotechnol.*, 11, 498-501.

- Kannan, M., Pushparaj, A., Dheeba, B., Nageshwari, K., & Kannan, K. (2014). Phytochemical screening and antioxidant activity of marine algae *Gracilaria corticata* and *Spirulina platensis*. *J. Chem. Pharm. Res.*, 6(11), 312-318.
- Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., & Al Hazimi, A. (2013). Recent developments in production and biotechnological applications of C phycocyanin. *Biomed. Res. Int.*, 1, 1-9.
- Liao, Q., Chang, H., Fu, Q., Huang, Y., Xia, A., Zhu, X., Zhong, N. 2018. Physiological-phased kinetic characteristics of microalgae *Chlorella vulgaris* growth and lipid synthesis considering synergistic effects of light, carbon and nutrients. *Bioresource Technol.*, 250, 583-590.
- Liu, Z., Fu, X., Huang, W., Li, C., Wang, X., & Huang, B. (2018). Photodynamic effect and mechanism study of selenium-enriched phycocyanin from *Spirulina platensis* against liver tumours. *J. Photochem Photobiol.*, 180, 89-97.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193(1), 265-275.
- Manirafasha, E., Murwanashyaka, T., Ndikubwimana, T., Rashid Ahmed, N., Liu, J., Lu, Y., Zeng, X., Ling, X., & Jing, K. (2017). Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira (Spirulina) platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch. *Bioresource Technology*, 255, 293-301.
- Moraes, C. C., Burkert, J. F., & Kalil, S.J. (2008). C-phyocyanin extratcion process for largescale use. *J Food Biochem*, 34, 133-148.
- Mukharromah, R. R. & Suyatno. (2014). Senyawa metabolit sekunder dari ekstrak diklorometana kulit batang bakau merah (*Rhizophora stylosa*). *J. Chemis.*, 3, 3.
- Rafaelina, M., Rustam, Y., Amini, S. (2016). Pertumbuhan dan aktivitas antioksidan dari mikroalga *Porphyridium cruentum* dan *Chlorella* sp. *Bioma*, 12, 1.
- Raof, B., Kaushik, B.D., & Prasanna, R. (2008). *Formulation of a low-cost medium production of Spirulina divison of microbiology*. Indian Agricultural formass Research Institute, New Delhi, India.
- Rashid, N., Park, W., & Selvaratnam, T. (2018). Binary culture of microalgae as an integrated approach for enhanced biomass and metabolites productivity, wastewater treatment, and bioflocculation. *Chemosphere*, 194, 67-75.
- Richardson, B., Orcutt, D. M., Schwertner, H. A., Martinez, C. L., & Wickline, H. E. (1969). Effects of nitrogen limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuous culture. *Appl Microbiol*, 18, 245-250.
- Richmond, A. . (1988). *Spirulina in M. A. Borowitzka, Microalgal Biotechnology* (eds) . 85-121. Cambridge, Cambridge University Press.
- Sari, F. Y. A., Suryajaya I. M. A., & Hadiyanto. (2012). Kultivasi mikroalga *Spirulina platensis* dalam media pome dengan variasi konsentrasi pome dan komposisi jumlah nutrien. *JKTI*, 1(1), 487-494.
- Sujatha, K., & Nagarajan, P. (2013). Optimization of growth conditions for carotenoid production from *Spirulina platensis* (Geitler). *Int. J. Current Microbiol. App. Sci.*, 2(10), 325-328.
- Syahril, M., Roshani, O., Hasyimah, N., Hafiz, M., Sharida, M. D., & Ahmed, H. Y. (2011). Screening of anticancer activities of crude extracts of unicellular green algae (*Chlorella vulgaris*) filamentous blue green algae (*S. platensis*) on selected cancer cell lines. *Iop Conf Ser-Mat. Sci. Math. Hum.*, 82-82.
- Walpole., & Ronald, E. (1995), *Pengantar statistik edisi 3 alih bahasa: bambang sumantri*. Jakarta, Gramedia Pustaka Utama.
- Walne P. R. (1970) Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera, *Crassostrea*, *Mercenaria*, and *Mytilis*. *Fish. Invest.*, 26,1-62.
- Wells, M.L., Potin, P., Craigie, J.S., Raven, J.A., Merchant, S.S., Helliwell, K.E., Brawley, S.H. (2017). Algae as nutritional and functional food sources: Revisiting our understanding. *J. Appl. Phycol.*, 29(2), 949-982.
- Wulandari, D. A., Setyaningsih, I., Syafrudin, D., & Asih, P. B. S. (2016). Ekstraksi fikosianin dari *Spirulina platensis* dan aktivitas antimalaria secara invitro. *JPHPI*, 19(1), 17.