

**EKSTRAKSI PROTEIN DARI SPIRULINA SP DALAM PELARUT ETANOL
TERBANTUKAN GELOMBANG ULTRASONIK**
**ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION OF SPIRULINA SP PROTEIN
IN ETHANOL**

**Boy Arief Fachri^{1,2}, Bektı Palupi^{1,2}, Istiqomah Rahmawaty^{1,2}, Meta Fitri Rizkiana^{1,2},
Helda Wika Amini^{1,2}**

¹ Program Studi Teknik Kimia Universitas Jember

² Research Center for Biobased Chemical Product

*Corresponding author's email: fachri.teknik@unej.ac.id

ABSTRACT

Protein is a nutritional component needed by humans for body health. One of the abundant sources of protein in Indonesia is the algae Spirulina Sp. Extraction of algae proteins, difficult to carry out. This is because proteins are stored in algae cells that have very hard walls. The conventional method that has been carried out were time-energy consuming process. To overcome that, an alternative method proposed in this study, is the ultrasonic-assisted extraction method. The purpose of this study was to define the optimum condition of protein extraction from Spirulina Sp and determine the effect of extraction parameters on yield. The dried and mashed Spirulina Sp is fed into an extractor containing ethanol. Ultrasonic waves, then flowed into the extractor via a probe. Once, the extraction time is achieved, the extract and residue are separated by centrifugation at a speed of 10000 rpm at room temperature. Furthermore, the yield of extract proteins is calculated by Lowry-Bradford analysis. The influence of process parameters such as raw material-solvent ratio (0:1-0.5) g/mL, raw material particle size (600-800) mesh and extraction time of 15-45 minutes) on yield will be observed in this study. Based on the results of the study, it can be concluded that the highest yield of 80.87% is obtained under the condition of the raw material-solvent ratio 0.2 g /mL, the particle size of the raw material 700 mesh and the extraction time of 30 minutes. Meanwhile, the particle size is the most significant parameter.

Keywords: *Ultrasound-assisted extraction, protein, Spirulina Sp*

ABSTRAK

Protein merupakan komponen nutrisi yang dibutuhkan oleh manusia untuk kesehatan tubuh. Salah satu sumber protein yang melimpah di Indonesia adalah alga Spirulina Sp. Ekstraksi protein alga, sulit dilakukan. Hal ini dikarenakan, protein tersimpan dalam sel-sel alga yang memiliki dinding yang sangat keras. Metode konvensional yang selama ini dilakukan membutuhkan waktu yang sangat lama, dan energi yang besar. Untuk mengatasi hal itu, sebuah metode alternatif yang diajukan dalam penelitian ini, adalah metode ekstraksi ultrasonik. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan kondisi optimum ekstraksi protein dari Spirulina Sp dan mengetahui pengaruh parameter ekstraksi terhadap yield. Spirulina Sp yang telah dikeringkan dan dihaluskan diumpungkan ke dalam ekstraktor yang berisi etanol. Gelombang ultrasonik, kemudian dialirkan ke dalam ekstraktor melalui probe. Setelah, waktu ekstraksi tercapai, ekstrak dan residu dipisahkan dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm pada suhu kamar. Selanjutnya, yield protein ekstrak dihitung dengan analisa Lowry-Bradford. Pengaruh parameter proses seperti rasio bahan baku-pelarut (0:1-0.5) g/mL, ukuran partikel bahan baku (600-800) mesh dan waktu ekstraksi 15-45 menit) terhadap yield akan diamati dalam penelitian ini. Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa yield tertinggi sebesar 80,87 % diperoleh pada kondisi rasio bahan baku-pelarut 0.2 g/mL, ukuran partikel bahan baku 700 mesh dan waktu ekstraksi 30 menit. Sementara itu, ukuran partikel merupakan parameter yang paling signifikan.

Keywords: *Ekstraksi ultrasonik, Protein, Spirulina Sp*

PENDAHULUAN

Alga merupakan salah satu sumber nutrisi yang sangat bermanfaat bagi kesehatan manusia [1–5]. Beberapa alga disebutkan memiliki kandungan protein yang lebih besar jumlahnya dibandingkan protein yang berasal dari sumber tradisional seperti daging, telur, susu, tanaman jenis polong-polongan. Jenis alga seperti *Spirulina Sp.* memiliki kandungan protein yang sangat besar yaitu 60–70%w/w sementara itu kandungan protein dari sumber tradisional sebesar (10–30 %w/w) [6–8]. Pada umumnya, protein dalam alga terdiri dari beberapa asam amino seperti leusin, isoleusin, valin, lisin, penilalanin, tirosin, metionin, alanin, arginin, aspargin dan glutamat. Protein *Spirulina Sp* sebagian besar tersusun dari asam amino aspargin, glutamat, leusin dan valin. Protein dan asam-asam amino tersebut memiliki manfaat yang besar bagi kesehatan manusia [7,9–12].

Untuk mendapatkan protein dari alga, diperlukan metode ekstraksi yang efektif, dan tidak merusak protein dan asam aminonya. Selama ini metode yang umum digunakan adalah ekstraksi fisik dan ekstraksi kimia. Ekstraksi fisik dilakukan dengan cara memecah dinding sel alga dengan menggunakan *grinder* atau *ball-mill*. Metode ini membutuhkan waktu yang sangat lama dan energi (*power*) yang besar untuk memecah dinding sel. Sementara itu metode kimia, menggunakan senyawa alkali dan asam serta membutuhkan suhu yang tinggi untuk memecah dinding sel. Suhu yang tinggi dan senyawa kimia dapat merusak protein. Sementara itu, jenis pelarut juga dapat mempengaruhi kualitas, bahkan dapat merusak protein. Beberapa pelarut yang direkomendasikan oleh otoritas pangan EFSA di USA, Australia, Selandia Baru dan EFS di Eropa untuk kebutuhan pangan adalah etanol. Etanol dipilih karena memiliki titik didih yang rendah dan mudah dipisahkan dari produk dan dapat melarutkan protein [8,12–18].

Metode ekstraksi yang terbantuan gelombang ultrasonik (*ultrasound-assisted extraction/UAE*) merupakan metode ekstraksi yang menerapkan teknologi ultrasonik [8,14,18–20]. Metode ini tidak kalah bersaing dengan teknologi ekstraksi maju lainnya seperti *microwave assisted extraction* [19,21–23] dan *supercritical CO₂ extraction* [19,21,24]. Cara ekstraksi ini lebih cepat dan lebih efisien karena proses ekstraksi dibantu oleh gelombang ultrasonik yang menghasilkan energi besar yang dapat menumbuk dinding sel. Tumbukan menyebabkan terbukanya sel sehingga memudahkan dan mempercepat proses difusi [14,18,25–31].

Beberapa penelitian yang telah dilakukan tentang ekstraksi protein dari beberapa jenis alga termasuk *Spirulina Sp* dapat dilihat dalam tabel 1. Berdasarkan penelusuran pustaka, ekstraksi protein dari *Spirulina Sp* dengan metode UAE belum pernah dilakukan.

Tabel 1. Beberapa penelitian tentang ekstraksi protein dari alga

| No | Metode Ekstraksi | Jenis Alga | Yield | Ref. |
|----|---|-------------------------|--------------------------------------|------|
| 1 | <i>Solvent extraction</i> | <i>Chlorella sp</i> | Lutein 5,4 mg/g | [1] |
| 2 | <i>Enzimatis</i> | <i>Palmaria sp</i> | 11,57 % | [8] |
| 3 | <i>Pulsed electric field</i> | <i>Chlorella sp</i> | 13 % w/w <i>released protein</i> | [32] |
| 4 | <i>Pressurized liquid</i> | <i>Chlorella sp</i> | 52 %w/w protein | [33] |
| 5 | <i>Soaking-Ultrasonication-Enzymatic</i> | <i>Chlorella sp</i> | 72,4 % w/w protein | [12] |
| 6 | <i>Liquid biphasic flotation</i> | <i>Haematococcus Sp</i> | 95,11 % w/w astasantin (antioksidan) | [34] |
| 7 | <i>Solvent extraction</i> | <i>Haematococcus Sp</i> | 6% w/w astasantin dari berat kering | [35] |
| 8 | <i>Microwave-assisted liquid-solid extraction</i> | <i>Haematococcus Sp</i> | 33 % astasantin | [41] |
| 9 | <i>Supercritical extraction</i> | <i>Haematococcus Sp</i> | 95 5 % w/w astasantin | [40] |
| 10 | <i>Solvent extraction</i> | <i>Spirulina Sp</i> | 52,82 % w/w protein | [36] |

| | | | | |
|----|---|--------------|-----------------------------------|------|
| 11 | <i>Deep eutectic solvent extraction</i> | Spirulina Sp | 85 ug/mL pikosianin (antioksidan) | [37] |
| 12 | <i>Pulsed electric field</i> | Spirulina Sp | 90 % w/w Pikosianin (antioksidan) | [39] |
| 13 | <i>Enzyme-assisted extraction</i> | Spirulina Sp | n/a protein dan essential oil | [38] |

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan baku utama berupa alga Spirulina Sp dan Chlorella Sp yang diperoleh dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara. Etanol (*food grade* dengan kemurnian > 95%), etanol absolut (kemurnian 99,9 %) sebagai pelarut untuk ekstraksi. Reagen Folin-Ciocalteu untuk inkubasi protein. CaCO₃ sebagai agen penetral. Na₂HPO₄ untuk pembuatan larutan buffer. HCl untuk analisis protein dan maserasi alga. NaOH untuk maserasi alga. H₃BO₄, K₂SO₄, CuSO₄·5H₂O, H₂SO₄ untuk analisis kadar protein. Bovine serum albumin untuk pembuatan kurva kalibrasi analisis. Leusin, isoleusin, valin, lisin, penilalanin, tirosin, metionin, alanin, arginin, aspargin dan glutamat (PA) untuk analisis dan identifikasi asam amino.

Proses ekstraksi

Spirulina Sp yang telah dikeringkan dan dihaluskan pada ukuran tertentu, diumpankan ke dalam kolom ekstraktor yang berisi etanol p.a. Selanjutnya, gelombang ultrasonik dialirkan ke dalam kolom ekstraktor melalui probe. Setelah, waktu ekstraksi tercapai, ekstrak dan residu dipisahkan dengan cara sentrifugasi. Ekstrak yang diperoleh, dianalisa untuk mengetahui kadar proteinnya.

Variabel proses

Variabel proses yang diamati dalam penelitian ini adalah rasio bahan baku-pelarut (0:1-0.5) g/mL, ukuran partikel bahan baku (600-800) mesh dan waktu ekstraksi 15-45 menit.

Jenis variabel dan kisarannya akan digunakan baik untuk bahan baku Spirulina Sp dan Chlorella Sp.

Analisis protein

Analisis protein akan dilakukan dengan menggunakan metode Lowry dan Bradford. Kurva kalibrasi disiapkan dengan menggunakan larutan *bovine standard albumin* pada kisaran konsentrasi 0- 1500 µg/mL. Setelah itu, sampel ditambahkan 100 µL reagen Folin-Ciocalteu lalu dinkubasi selama 30 menit. Proses kuantifikasi akan dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

Analisis statistik

Analisis statistik dilakukan dengan bantuan software Design Expert 10. Metode yang digunakan adalah *response surface method* dengan *box-behnken design* untuk tiga variabel proses yaitu ukuran partikel, rasio bahan baku-pelarut, dan waktu ekstraksi. Sebanyak 17 eksperimen akan dilakukan untuk analisis. Yield protein (Y_p) sebagai fungsi variabel proses dapat dinyatakan sebagai berikut.

$$Y_p = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i x_i + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 b_{ij} x_i x_j$$

Variabel proses (ukuran partikel, rasio bahan baku-pelarut, dan waktu ekstraksi) diwakili oleh indeks 1-3. Koefisien regresi diperoleh dengan analisis statistik dari data. Signifikansi faktor ditentukan oleh *p-value* menggunakan ANOVA. Suatu faktor dianggap signifikan jika *p-value* di bawah 0,05. Faktor yang tidak signifikan dihilangkan menggunakan eliminasi mundur (*backward elimination*), selanjutnya faktor signifikan digunakan untuk memodelkan data.

Analisis varian akan dilakukan untuk mengetahui efek variable terhadap yield protein

HASIL DAN PEMAHASAN

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi yang terbantuan gelombang ultrasonic (*Ultrasound-Assisted Extraction/UAE*). Variabel proses seperti rasio bahan baku-

pelarut (0:1-0.5) g/mL, ukuran partikel bahan baku (600-800) mesh dan waktu ekstraksi 15-45 menit. akan diamati untuk diketahui pengaruhnya terhadap *yield*. Yield protein dihitung dengan metode Lowry dan Bradford. Metode respon surface dengan *box-behnken design* digunakan untuk analisis statistic.

Ekstraksi protein dari Spirulina Sp

Proses ekstraksi dilakukan menggunakan sonikator dengan kondisi operasi sesuai dengan data pada Tabel 1. Spirulina Sp yang melalui *pre-treatment* berupa pengecilan ukuran partikel menggunakan blender dimasukkan dalam kolom ekstraktor yang telah berisi etanol. Kemudian gelombang ultrasonik dialirkan ke dalam kolom. Setelah waktu ekstraksi tercapai, ekstrak dipisahkan dari residu dengan sentrifugasi. Protein dihitung yieldnya dengan metode Lowry dan Bradford. Tabel1 menunjukkan data aktual *yield* yang diperoleh dari ekstraksi setiap sampel dimulai dari Sampel 1 hingga 17.

Tabel 1. Yield protein dari Spirulina Sp pada berbagai kondisi proses ekstraksi

| Run | Waktu, menit | Ukuran partikel, mesh | Rasio Bahan Baku, g/mL | Yield protein, wt% |
|-----|-----------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------|
| 1 | 45 | 700 | 0.1 | 77.0570 |
| 2 | 30 | 700 | 0.2 | 80.6290 |
| 3 | 30 | 800 | 0.1 | 74.1121 |
| 4 | 30 | 600 | 0.1 | 77.4998 |
| 5 | 15 | 700 | 0.3 | 77.4313 |
| 6 | 30 | 700 | 0.2 | 80.5960 |
| 7 | 30 | 600 | 0.3 | 75.7638 |
| 8 | 30 | 700 | 0.2 | 80.5268 |
| 9 | 15 | 700 | 0.1 | 76.8260 |
| 10 | 45 | 700 | 0.3 | 77.7830 |
| 11 | 45 | 600 | 0.2 | 76.7948 |
| 12 | 30 | 700 | 0.2 | 80.8666 |
| 13 | 15 | 800 | 0.2 | 75.5584 |
| 14 | 30 | 800 | 0.3 | 76.7632 |
| 15 | 45 | 800 | 0.2 | 75.9637 |
| 16 | 15 | 600 | 0.2 | 75.8729 |
| 17 | 30 | 700 | 0.2 | 80.5275 |

Pada Tabel 1, dapat diketahui bahwa yield protein tertinggi yaitu 80,87 % yang dicapai pada kondisi diperoleh pada kondisi rasio bahan baku-pelarut 0.2 g/mL, ukuran partikel bahan baku 700 mesh dan waktu ekstraksi 30 menit. Hasil ini lebih tinggi dari yang diperoleh oleh beberapa penelitian sebelumnya seperti dalam Tabel 2.

| No | Metode Ekstraksi | Jenis Alga | Yield | Ref. |
|----|---|--------------|--------------------------------------|------|
| 1 | <i>Solvent extraction</i> | Spirulina Sp | 52,82 % w/w protein | [59] |
| 2 | <i>Deep eutectic solvent extraction</i> | Spirulina Sp | 85 ug/mL pikosianin (antioksidan) | [60] |
| 3 | <i>Pulsed electric field</i> | Spirulina Sp | 90 % w/w Pikosianin (antioksidan) | [62] |
| 4 | <i>Enzyme-assisted extraction</i> | Spirulina Sp | n/a protein dan <i>essential oil</i> | [61] |

| | | | | |
|---|---------------------------------------|--------------|---------|----------------|
| 5 | <i>Ultrasound-assisted extraction</i> | Spirulina Sp | 80,87 % | Penelitian ini |
|---|---------------------------------------|--------------|---------|----------------|

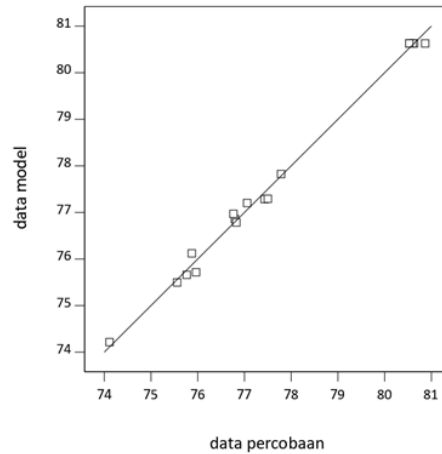
Analisis Varian

Untuk mengetahui pengaruh variabel ekstraksi maka data penelitian diuji dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) menggunakan *Design Expert 11*. Tabel 3 menunjukkan hasil analisis varian.

Tabel 3. Analisis varian ekstraksi protein dari Spirulina Sp

| | <i>Sum of Squares</i> | <i>df</i> | <i>Mean Square</i> | <i>F-value</i> | <i>p-value</i> | |
|--------------------|-----------------------|-----------|--------------------|----------------|----------------|------------------|
| Model | 73.17 | 9 | 8.13 | 157.08 | < 0.0001 | signifikan |
| A-Waktu | 0.456 | 1 | 0.456 | 8.81 | 0.0209 | |
| B-Ukuran partikel | 1.56 | 1 | 1.56 | 30.16 | 0.0009 | |
| C-Rasio Bahan Baku | 0.6308 | 1 | 0.6308 | 12.19 | 0.0101 | |
| AB | 0.0667 | 1 | 0.0667 | 1.29 | 0.2936 | |
| AC | 0.0036 | 1 | 0.0036 | 0.0704 | 0.7984 | |
| BC | 4.81 | 1 | 4.81 | 92.98 | < 0.0001 | |
| A ² | 11.76 | 1 | 11.76 | 227.19 | < 0.0001 | |
| B ² | 35.67 | 1 | 35.67 | 689.27 | < 0.0001 | |
| C ² | 11.94 | 1 | 11.94 | 230.67 | < 0.0001 | |
| Residual | 0.3623 | 7 | 0.0518 | | | |
| <i>Lack of Fit</i> | 0.284 | 3 | 0.0947 | 4.84 | 0.081 | tidak signifikan |

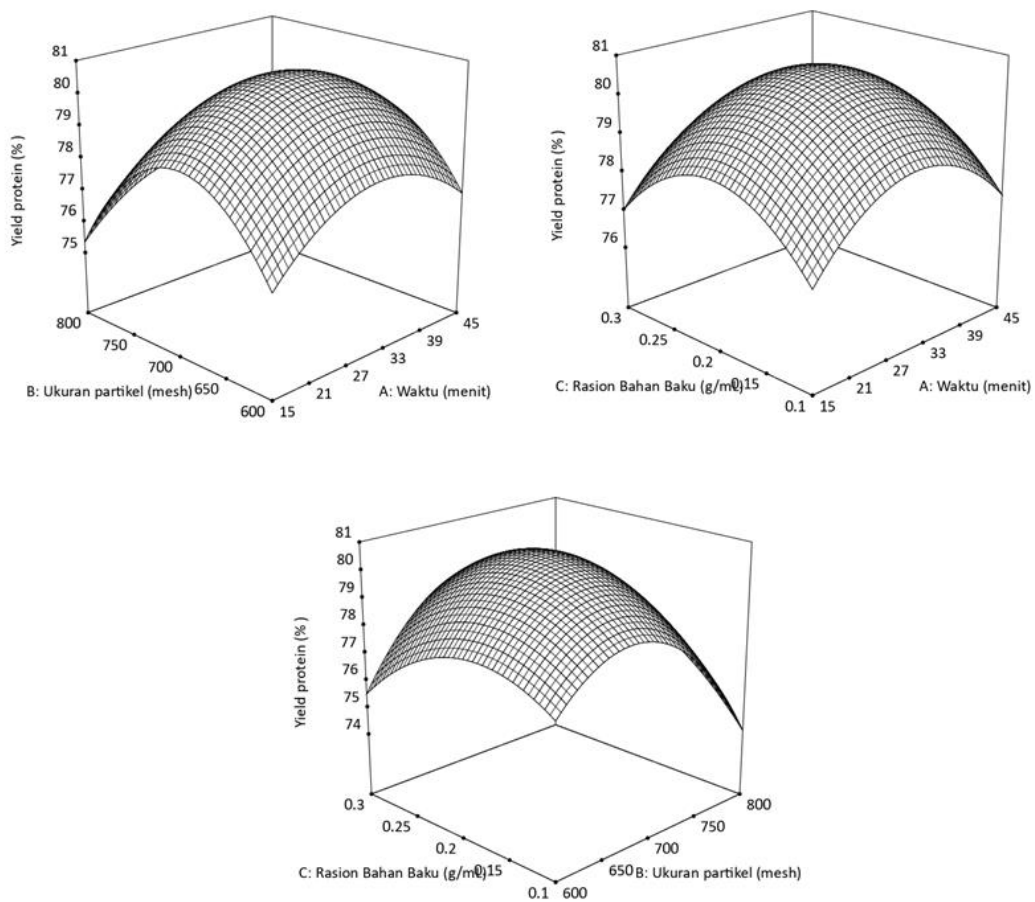
Berdasarkan Tabel 3, juga dapat dinyatakan bahwa model yang terbentuk signifikan dan *lack of fit* tidak signifikan. Hal ini memberikan indikasi bahwa model dapat digunakan untuk mempelajari pengaruh variabel terhadap yield. Tabel 3 juga memberikan informasi bahwa ukuran partikel merupakan variabel yang paling signifikan dibandingkan dengan waktu ekstraksi dan rasio bahan-pelarut. Hal ini ditunjukkan oleh nilai *p-value* yang lebih kecil dibandingkan dengan *p-value* variabel lainnya, Sementara itu, terbentuk kesesuaian antara data percobaan dengan data yang diperoleh dari model yang terbentuk. Hal ini ditunjukkan oleh parity plot seperti dalam Gambar 1.



Gambar 1. Parity plot

Pengaruh Variabel Ekstraksi Terhadap Yield

Pengaruh variabel ekstraksi terhadap yield dapat diamati dalam Gambar 2. Variabel terpenting dalam ekstraksi menggunakan metode UAE antara lain ukuran partikel, rasio bahan/pelarut, dan waktu ekstraksi.



Gambar 3. Pengaruh variabel proses terhadap yield protein

Peningkatan waktu ekstraksi dapat mengakibatkan terjadinya kontak antara bahan baku dengan pelarut menjadi lebih lama. Semakin lama ekstraksi terjadi maka semakin banyak pula senyawa yang terekstrak. Semakin lama waktu ekstraksi maka semakin besar rendemen yang didapatkan. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa penambahan energi pada UAE mampu memberikan peningkatan *yield* [29,30,43].

Sementara itu, semakin besar ukuran partikel bahan baku dalam mesh, maka semakin cepat proses ekstraksi dan semakin besar *yield* ekstraksi. Semakin besar ukuran dalam mesh, maka semakin besar luas area kontak antara pelarut dan bahan baku, akibatnya proses difusi akan semakin cepat. Hal ini sesuai dengan Prasedya dkk yang menyatakan ukuran partikel memegang peranan yang sangat penting dalam proses ekstraksi. Akan tetapi, semakin besar ukuran partikel dalam mesh, juga bisa menurunkan *yield*, karena terjadinya agregasi dalam proses yang dapat mengakibatkan kecepatan difusi menurun [42].

Rasio bahan dan pelarut merupakan salah satu faktor yang berpengaruh dalam proses ekstraksi zat bioaktif. Rasio yang tinggi juga berpengaruh pada peningkatan bidang kontak antara bahan dan pelarut yang dapat meningkatkan *yield*. Hal ini sesuai dengan Kumar dkk yang menyatakan bahwa semakin tinggi nilai rasio, maka *yield* akan semakin besar [43].

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa kondisi optimum ekstraksi protein dari *Spirulina Sp* dicapai pada kondisi rasio bahan baku-pelarut 0.2 g/mL, ukuran partikel bahan baku 700 mesh dan waktu ekstraksi 30 menit, yang memberikan nilai *yield* tertinggi 80,87 %. Penelitian ini juga menunjukkan bahwa ukuran partikel merupakan variabel yang berpengaruh secara signifikan dibandingkan dengan waktu ekstraksi dan rasio bahan terhadap pelarut.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] S. Kulkarni, Z. Nikolov, Process for selective extraction of pigments and functional proteins from *Chlorella vulgaris*, *Algal Res.*, vol. 35, pp. 185–193, 2018. doi:10.1016/j.algal.2018.08.024.
- [2] M. Rizwan, G. Mujtaba, S. Ahmed, K. Lee, N. Rashid, Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond : A review, *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 92, pp. 394–404, 2018. doi:10.1016/j.rser.2018.04.034.
- [3] R. Chandra, H.M.N. Iqbal, G. Vishal, H. Lee, S. Nagra, *Algal Biorefinery: A Sustainable Approach to Valorize Algal-based Biomass towards Multiple Product Recovery*, *Bioresour. Technol.*, 2019. doi:10.1016/j.biortech.2019.01.104.
- [4] G. Panis, J.R. Carreon, Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis* : A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line, *ALGAL*, vol 18, pp. 175–190, 2016. doi:10.1016/j.algal.2016.06.007.
- [5] A. Krishna, K. Wayne, K. Rambabu, Y. Tao, D. Chu, P. Show, Food Science and Human Wellness Microalgae : A potential alternative to health supplementation for humans, *Food Sci. Hum. Wellness.*, vol. 8, pp. 16–24., 2019. doi:10.1016/j.fshw.2019.03.001.
- [6] L. Soto-sierra, P. Stoykova, Z.L. Nikolov, Extraction and fractionation of microalgaebased protein products, *Algal Res.*, vol. 36, pp. 175–192, 2018. doi:10.1016/j.algal.2018.10.023.
- [7] K.W. Chew, J.Y. Yap, P.L. Show, N.H. Suan, J.C. Juan, T.C. Ling, D.J. Lee, J.S. Chang, Microalgae biorefinery: High value products perspectives, *Bioresour. Technol.*, vol. 229, pp. 53–62, 2017. doi:10.1016/j.biortech.2017.01.006.
- [8] S. Bleakley, M. Hayes, *Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production*, *Foods.*, vol. 6, pp. 33, 2017. doi:10.3390/foods6050033.
- [9] S.P. Slocombe, M. Ross, N. Thomas, S. Mcneill, M.S. Stanley, *Bioresource Technology A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass*, *Bioresour. Technol.*, vol. 129 pp. 51–57., 2012. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.163.

- [10] T.M.M. Bernaerts, L. Gheysen, C. Kyomugasho, Z. Jamsazzadeh Kermani, S. Vandionant, I. Foubert, M.E. Hendrickx, A.M. Van Loey, Comparison of microalgal biomasses as functional food ingredients: Focus on the composition of cell wall related polysaccharides, *Algal Res.*, vol. 32, pp. 150–161, 2018. doi:10.1016/j.algal.2018.03.017.
- [11] C. Sa, A. Violeta, C. Laroche, B. Zebib, O. Merah, P. Pontalier, C. Vaca-garcia, Aqueous extraction of proteins from microalgae : Effect of different cell disruption methods, 3, pp. 61–65, 2014. doi:10.1016/j.algal.2013.12.004.
- [12] R. Zhang, J. Chen, X. Zhang, Extraction of intracellular protein from *Chlorella pyrenoidosa* using a combination of ethanol soaking, enzyme digest , ultrasonication and homogenization techniques, *Bioresour. Technol.*, vol. 47, pp. 267–272, 2018, doi:10.1016/j.biortech.2017.09.087.
- [13] M. Yu, M. Chen, J. Gui, S. Huang, Y. Liu, H. Shentu, J. He, Z. Fang, W. Wang, Y. Zhang, Preparation of *Chlorella vulgaris* polysaccharides and their antioxidant activity in vitro and in vivo, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 137, pp 139–150., 2019. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.06.222.
- [14] P. Santhakumaran, S.M. Ayyappan, J.G. Ray, Nutraceutical applications of twenty-five species of rapid-growing green-microalgae as indicated by their antibacterial, antioxidant and mineral content, *Algal Res.*, vol. 47, pp. 101878, 2020. doi:10.1016/j.algal.2020.101878.
- [15] T. Lafarga, J.M. Fernández-Sevilla, C. González-López, F.G. Acien-Fernández, Spirulina for the food and functional food industries, *Food Res. Int.*, vol. 137, pp. 109356, 2020. doi:10.1016/j.foodres.2020.109356.
- [16] Z. Zhao, M.A. Rasool, C. Chen, S. Ma, L. Wang, G. Huang, Identification and screening of multiple tropical microalgal strains for antioxidant activity in vitro, *Food Biosci.* 36 (2020) 100649. doi:10.1016/j.fbio.2020.100649.
- [17] M.R. Gauthier, G.N.A. Senhorinho, J.A. Scott, Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants, *Algal Res.* 52 (2020) 102104. doi:10.1016/j.algal.2020.102104.
- [18] J.R. Benavente-Valdés, C. Aguilar, J.C. Contreras-Esquivel, A. Méndez-Zavala, J. Montañez, Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species, *Biotechnol. Reports.* 10 (2016) 117–125. doi:10.1016/j.btre.2016.04.001.
- [19] L. Vernès, M. Abert-Vian, M. El Maâtaoui, Y. Tao, I. Bornard, F. Chemat, Application of ultrasound for green extraction of proteins from spirulina. Mechanism, optimization, modeling, and industrial prospects, *Ultrason. Sonochem.* 54 (2019) 48–60. doi:10.1016/j.ultsonch.2019.02.016.
- [20] S.U. Kadam, C. Alvarez, B.K. Tiwari, C.P.O. Donnell, Extraction and characterization of protein from Irish brown seaweed *Ascophyllum nodosum*, *FRIN.* (2016). doi:10.1016/j.foodres.2016.07.018.
- [21] E. Suarez Garcia, J. van Leeuwen, C. Safi, L. Sijtsma, M.H.M. Eppink, R.H. Wijffels, C. van den Berg, Selective and energy efficient extraction of functional proteins from microalgae for food applications, *Bioresour. Technol.* 268 (2018) 197–203. doi:10.1016/j.biortech.2018.07.131.
- [22] E. Barbarino, S.O. Louren, An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae, (2014). doi:10.1007/s10811-005-1641-4.
- [23] I. Lavilla, C. Bendicho, *Fundamentals of Ultrasound-Assisted Extraction*, Elsevier Inc., 2017. doi:10.1016/B978-0-12-809380-1.00011-5.
- [24] M.M. Poojary, F.J. Barba, B. Aliakbarian, F. Donsi, G. Pataro, D.A. Dias, P. Juliano, Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds, *Mar. Drugs.* 14 (2016) 1–34. doi:10.3390/md14110214
- [25] C. Grosso, P. Valentão, F. Ferreres, P.B. Andrade, Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds, *Mar. Drugs.* 13 (2015) 3182–3230. doi:10.3390/md13053182.
- [26] I. Michalak, K. Chojnacka, Algae as production systems of bioactive compounds, *Eng. Life Sci.* 15 (2015) 160–176. doi:10.1002/elsc.201400191.
- [27] K. Zocher, J. Lackmann, J. Volzke, L. Steil, M. Lalk, K. Weltmann, K. Wende, J.F. Kolb, Pro fi ling microalgal protein extraction by microwave burst heating in comparison to spark plasma exposures, *Algal Res.* 39 (2019) 101416. doi:10.1016/j.algal.2019.101416.

- [28] K. Wayne, S. Reen, S. Ying, L. Zhu, P. Loke, Enhanced microalgal protein extraction and purification using sustainable microwave-assisted multiphase partitioning technique, *Chem. Eng. J.* 367 (2019) 1–8. doi:10.1016/j.cej.2019.02.131.
- [29] J.L. Garcia-moscoso, W. Obeid, S. Kumar, P.G. Hatcher, The Journal of Supercritical Fluids Flash hydrolysis of microalgae (*Scenedesmus* sp .) for protein extraction and production of biofuels intermediates, *J. Supercrit. Fluids.* 82 (2013) 183–190. doi:10.1016/j.supflu.2013.07.012.
- [30] V. Raguraman, Unraveling rapid extraction of fucoxanthin from *Padina tetrastromatica*: Purification, characterization and biomedical application, *Process Biochem.* (2018). doi:10.1016/j.procbio.2018.08.006.
- [31] Z. Meng, J. Zhao, H. Duan, Y. Guan, L. Zhao, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Green and efficient extraction of four bioactive flavonoids from Pollen Typhae by ultrasound-assisted deep eutectic solvents extraction, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 161 (2018) 246–253. doi:10.1016/j.jpba.2018.08.048.
- [32] J. Reboleira, R. Freitas, S. Pinteus, J. Silva, C. Alves, R. Pedrosa, S. Bernardino, *Spirulina*, Elsevier Inc., 2019. doi:10.1016/B978-0-12-812491-8.00055-2.
- [33] T.R.I. Prariono, M. Kawaroe, D.W. Sari, D.I.N.A. Augustine, Fatty Acid Content of Indonesian Aquatic Microalgae, *HAYATI J. Biosci.* 17 (2010) 196–200.
- [34] K.S. Khoo, K.W. Chew, C.W. Ooi, H.C. Ong, T.C. Ling, P.L. Show, Extraction of natural astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using liquid biphasic flotation system, *Bioresour. Technol.* 290 (2019) 121794. doi:10.1016/j.biortech.2019.121794.
- [35] S. Wang, Y. Meng, J. Liu, X. Cao, S. Xue, Accurate quantification of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using DMSO extraction and lipase-catalyzed hydrolysis pretreatment, *Algal Res.* 35 (2018) 427–431. doi:10.1016/j.algal.2018.08.029.
- [36] G. Prabakaran, P. Sampathkumar, M. Kavisri, M. Moovendhan, Extraction and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluation of its anticancer, antidiabetic and anti-inflammatory effect, *Int. J. Biol. Macromol.* 153 (2020) 256–263. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.009.
- [37] S.K. Rathnasamy, D. Sri Rajendran, H.B. Balaraman, G. Viswanathan, Functional deep eutectic solvent-based chaotic extraction of phycobiliprotein using microwave-assisted liquid-liquid micro-extraction from *Spirulina (Arthrospira platensis)* and its biological activity determination, *Algal Res.* 44 (2019) 101709. doi:10.1016/j.algal.2019.101709.
- [38] C.M. Verdasco-Martín, A. Díaz-Lozano, C. Otero, Advantageous enzyme selective extraction process of essential spirulina oil, *Catal. Today.* 346 (2020) 121–131. doi:10.1016/j.cattod.2019.02.066.
- [39] A. Käferböck, S. Smetana, R. de Vos, C. Schwarz, S. Toepfl, O. Parniakov, Sustainable extraction of valuable components from *Spirulina* assisted by pulsed electric fields technology, *Algal Res.* 48 (2020). doi:10.1016/j.algal.2020.101914.
- [40] X. Cheng, Z.B. Qi, T. Burdyny, T. Kong, D. Sinton, Low pressure supercritical CO₂ extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* demonstrated on a microfluidic chip, *Bioresour. Technol.* 250 (2018) 481–485. doi:10.1016/j.biortech.2017.11.070 doi:10.4308/hjb.17.4.196
- [41] Y. Fan, Z. Niu, C. Xu, L. Yang, F. Chen, H. Zhang, Biocompatible protic ionic liquidsbased microwave-assisted liquid-solid extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, *Ind. Crops Prod.* 141 (2019) 111809. doi:10.1016/j.indcrop.2019.111809.
- [42] E. S. Prasedya^{1,2}, A. Frediansyah^{3,4}, N. W. R. Martyasari¹, B. K. Ilhami¹, A. S. Abidin¹, H. Padmi², Fahrurrozi⁵, A. B. Juansillero⁵, S. Widyastuti⁶ & A. L. Sunarwidhi⁷, Effect of particle size on phytochemical composition and antioxidant properties of *Sargassum cristaefolium* ethanol extract, 11:17876, 2021, doi.org/10.1038/s41598-021-95769-y
- [43] Kumar, Y., Singhal, S., Tarafdar, A., Pharande, A., Ganesan, M., Prarabdh C. Badgular, P.C. (2020). Ultrasound assisted extraction of selected edible macroalgae: Effect on antioxidant activity and quantitative assessment of polyphenols by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Algal Research*.