

Pengaruh Pelarut, Rasio Pelarut, dan Waktu Ekstraksi Terhadap *Astaxanthin* dari *Haematococcus* sp. dengan Bantuan *Ultrasound Assisted Extraction*

Effect of Solvent, Solvent Ratio, and Extraction Time on Astaxanthin from *Haematococcus* sp. by Employing *Ultrasound Assisted Extraction*

Wilda Ayu Putri, Muhammad Ariq Al Maqdisi, Zubaidi Achmad, Faizah Hadi, Muhammad Maulana Azimatun Nur*

^aJurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik Industri, UPN Veteran Yogyakarta, Jl. Padjajaran 104, Condongcatur, Sleman, Yogyakarta, 55283, Indonesia

Artikel histori :

Diterima 3 Agustus 2023
Diterima dalam revisi 16 Oktober 2023
Diterima 19 Oktober 2023
Online 1 November 2023

ABSTRAK: Indonesia merupakan negara kepulauan dengan keanekaragaman hayati sehingga memiliki potensi bagi perairan Indonesia untuk mikroalga dapat tumbuh dan berkembang. Mikroalga *Haematococcus* sp. dikenal mengandung senyawa karotenoid, khususnya senyawa astaxanthin. Astaxanthin berkhasiat sebagai antioksidan yang dapat dimanfaatkan sebagai suplemen kesehatan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh jenis pelarut, volume pelarut, dan lama waktu ekstraksi terhadap kadar astaxanthin. Ekstraksi dilakukan dengan metode *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE). Penelitian ini menggunakan metode percobaan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) factorial dengan tiga variabel bebas yaitu jenis pelarut, volume pelarut dan waktu ekstraksi pada proses ekstraksi. Pada penelitian ini dilakukan analisis kadar astaxanthin dalam *Haematococcus* sp. yang diperoleh dari hasil kultivasi sendiri, kemudian dilakukan pengukuran kadar astaxanthin menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 478 nm. Hasil pengukuran menunjukkan kadar astaxanthin tertinggi pada variasi pelarut aseton dengan volume 10 ml lama waktu 25 menit sebesar 0,0677%.

Kata Kunci: Antioksidan; Astaxanthin; Ekstraksi; *Ultrasound Assisted Extraction*; Spektrofotometri UV-Vis.

ABSTRACT: Indonesia is an archipelagic country with biodiversity so it has the potential for Indonesian waters for microalgae to grow and develop. Microalgae *Haematococcus* sp. are known to contain carotenoid compounds, especially astaxanthin compounds. Astaxanthin is powerful as an antioxidant, which can be used as a health supplement. This research aims to determine the effect of solvent type, solvent volume, and extraction time on the astaxanthin levels. Extraction was carried out using the *Ultrasound Assisted Extraction* (UAE) method. This study uses experimental methods of a full random design (RAL) methods with three independent variables - type solvents, volume solvents and time extraction on the extraction process. In this study, analysis of astaxanthin levels in *Haematococcus* sp. obtained from self-cultivation results, then astaxanthin levels were measured using UV-Vis spectrophotometry at a wavelength of 478 nm. The measurement results showed the highest levels of astaxanthin in the variation of acetone solvent with a volume of 10 ml for 25 minutes of 0.0677%.

Keywords: Antioxidants; Astaxanthin; Extraction; *Ultrasound Assisted Extraction*; UV-Vis Spectrophotometry.

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara kepulauan dengan sumber hayati dan non-hayati yang beragam dan melimpah. Adanya keanekaragaman hayati memiliki potensi bagi perairan di Indonesia serta kondisi iklim tropis dengan intensitas cahaya matahari yang tinggi merupakan habitat yang sesuai untuk mikroalga dapat tumbuh dan berkembang. Mikroalga

merupakan mikroorganisme bersel tunggal berukuran mikroskopik. Mikroalga mampu menghasilkan stok pangan dalam waktu yang singkat, tidak membutuhkan lahan yang terlalu luas, dan mudah diproduksi dalam kehidupan sehari-hari (Hadiyanto dan Azim, 2012). Selain itu, mikroalga juga merupakan mikroorganisme fotosintetik yang dapat tumbuh dengan cepat dan mampu hidup di berbagai lingkungan yang ekstrim. Mikroalga memiliki struktur uniselular atau

* Corresponding author
Email Address: lanaazim@upnyk.ac.id

multiselular sederhana, contohnya antara lain *Spirulina*, *Chlorella*, *Nannochloropsis* dan lain-lain (Islam dkk. 2017).

Haematococcus sp. saat ini merupakan salah satu jenis mikroalga yang diminati karena memiliki kandungan super antioksidan yang dikenal dengan nama astaxanthin. Antioksidan merupakan senyawa yang mampu untuk menetralkan dan menyerap radikal bebas sehingga mampu mencegah penyakit-penyakit degeneratif. Berdasarkan evaluasi yang telah dilakukan astaxanthin memiliki kekuatan antioksidan 50-100 kali lebih kuat dibandingkan vitamin E (Ekpe dkk., 2018). Kandungan antioksidan pada astaxanthin ini juga dapat dijadikan sebagai alternatif obat terapi untuk penderita Covid-19, dimana sebagai agen antiapoptosis yang menghambat peristiwa kematian sel pada penderita Covid-19 (Fakhri dkk., 2020). Untuk memenuhi kebutuhan antioksidan di Indonesia saat ini, Indonesia masih mengimpor kebutuhan vitamin E dan vitamin C. Untuk mengurangi jumlah impor tersebut, maka pada penelitian ini diharapkan dapat membantu mengurangi ketergantungan terhadap impor bahan sumber antioksidan.

Berbagai penelitian dalam skala laboratorium telah dilakukan untuk mengambil astaxanthin dari *Haematococcus* sp.. Metode ekstraksi yang dilakukan saat ini masih bergantung dengan pemilihan pelarut, dan memerlukan pelarut organik serta memakan waktu yang lama. Untuk mengatasi hal tersebut, saat ini telah banyak berkembang metode ekstraksi yang lebih efisien, membutuhkan pelarut sedikit, dan bersifat ramah lingkungan. Metode ekstraksi dilakukan dengan tujuan untuk menghancurkan dinding sel (*cell disruption*) mikroalga, yakni dengan cara mekanis, kimia. Dengan cara mekanis ini dapat dilakukan dengan metode gelombang ultrasonik, *microwave*, serta *bead milling*. Sedangkan secara kimia menggunakan larutan asam dan basa (Pinto dkk.,2001). Penelitian sebelumnya menyelidiki pengaruh waktu ekstraksi dan jenis pelarut terhadap yield astaxanthin dari *Haematococcus pluvialis* (Haque et al., 2016) Namun demikian, penelitian tersebut belum dapat menjawab kondisi optimal ekstraksi *Haematococcus* sp. sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut terkait kondisi optimal ekstraksi *Haematococcus* sp. Diduga faktor lain seperti lama waktu ekstraksi dan rasio pelarut terhadap biomassa berpengaruh terhadap hasil astaxanthin. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh rasio volume pelarut dengan biomassa, jenis pelarut yaitu etanol, metanol, dan aseton dan mengetahui pengaruh lamanya waktu ekstraksi yang dibutuhkan terhadap kadar astaxanthin yang diperoleh.

1. Metode Penelitian

2.1. Persiapan Bahan baku

Sampel (*Haematococcus* sp.) yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Haematococcus* sp. yang sudah memasuki red phase, kemudian disaring dan dikeringkan menggunakan oven selama 5 jam pada suhu 60 °C. Setelah kering, sampel dihaluskan menggunakan mortar sampai menjadi halus seperti bubuk sehingga diperoleh serbuk *Haematococcus* sp.. Sampel disimpan pada botol agar tetap

kering sampai siap digunakan. Selain itu digunakan juga Aquadest, Aluminium foil, Asthin Force 6 mg dan pelarut berupa Etanol teknis 96%, Metanol teknis 99,9%, dan Aseton.

2.2. Proses Ekstraksi *Haematococcus* sp.

Proses ekstraksi dari *Haematococcus* sp. diawali dengan penimbangan serbuk *Haematococcus* sp. sebanyak 0,1 gram, kemudian memasukkannya kedalam erlenmeyer 100 ml. Pelarut dengan variasi etanol, metanol, dan aseton ditambahkan dengan variasi volume pelarut sebanyak 10 ml, 20 ml, dan 30 ml kedalam erlenmeyer 100 ml kemudian digojok hingga larut. Kemudian campuran diekstraksi menggunakan *Ultrasound batch* yang telah dinyalakan dan suhu telah mencapai 60 °C. Ekstraksi berlangsung selama variasi waktu 15, 20, dan 25 menit. Setelah di ekstraksi, hasil ekstraksi dituang ke dalam centrifuge tube 15 ml. Ekstrak diambil dengan cara sentrifugasi yaitu hasil ekstraksi di sentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Hasil sentrifugasi berupa filtrat, kemudian mengecek absorbansinya dengan panjang gelombang 478 nm. Panjang gelombang dipilih 478nm karena pada panjang gelombang tersebut dapat membaca pigmen *astaxanthin* dengan hasil tertinggi (Armenta dkk., 2009). Proses ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali sampai memperoleh filtrat berwarna putih jernih. Filtrat yang diperoleh dipekatkan menggunakan *water bath memmert* dengan suhu air menyesuaikan titik didih jenis pelarut. Ekstrak yang didapat dikemas didalam botol gelap.

2.3. Pembuatan Kurva Baku Standar

Karakterisasi dan identifikasi astaxanthin menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dilakukan dengan cara menghasilkan larutan stok untuk membuat kurva standar astaxanthin. Untuk membuat larutan stok ini, astaxanthin standar sebanyak 1,25 mg dilarutkan dalam 50 ml pelarut aseton hingga mencapai konsentrasi 25 ppm. Selanjutnya, larutan ini diencerkan dengan mengambil sejumlah larutan stok, yaitu 0,24; 0,4; 0,56; 0,72; dan 0,88 ml, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur berkapasitas 10 ml. Selanjutnya, pelarut aseton ditambahkan ke dalam labu ukur hingga mencapai tanda batas, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi masing-masing 0,6; 1; 1,4; 1,8; dan 2,2 ppm. Absorbansi larutan ini diukur pada panjang gelombang 478 nm, dan data yang diperoleh digunakan untuk membuat kurva linier yang menghubungkan konsentrasi yang diukur dengan absorbansi yang diperoleh.

2.4. Analisis

Ekstrak pigmen astaxanthin yang diperoleh dimasukkan ke dalam kuvet yang diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. Hasil absorbansi kemudian dikonversi dalam satuan konsentrasi dengan persamaan :

$$y = bx + a$$

Keterangan :

y = absorbansi

x = konsentrasi *astaxanthin* total

Konsentrasi pigmen astaxanthin diukur pada panjang gelombang 478 nm untuk pembuatan kurva linear dengan syarat korelasi nilai (r) yaitu $r > 0,998$ (Farmakope, 1995). Dalam menetapkan kadar Astaxanthin Total digunakan rumus:

$$\text{Kadar Astaxanthin Total} = \frac{(X) \times V}{W} \times 100\%$$

Keterangan :

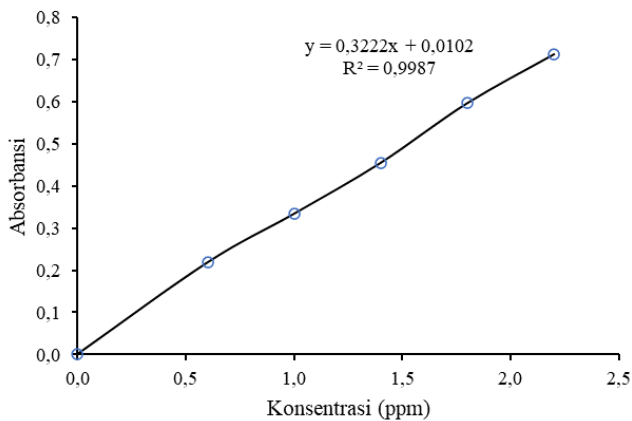
X = Konsentrasi astaxanthin total

W= Massa sampel

V= Volume sampel

2. Hasil dan Pembahasan

Pada percobaan ini sebanyak 0,1 gram bubuk *Haematococcus* sp. diekstraksi menggunakan pelarut Etanol, Metanol, dan Aseton dengan volume pelarut 10, 20, dan 30 ml pada waktu ekstraksi 15, 20, dan 25 menit.

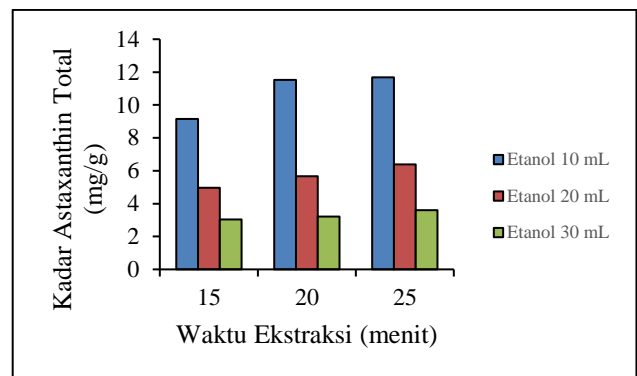


Gambar 1. Kurva baku ekstrak astaxanthin

Gambar 1 merupakan kurva baku ekstrak astaxanthin yang diekstrak menggunakan campuran pelarut metanol, aseton, dan etanol. Hasil absorbansi terhadap konsentrasi ekstrak adalah linier dengan R^2 lebih dari 99% sehingga dapat digunakan sebagai kurva baku dalam ekstraksi ini.

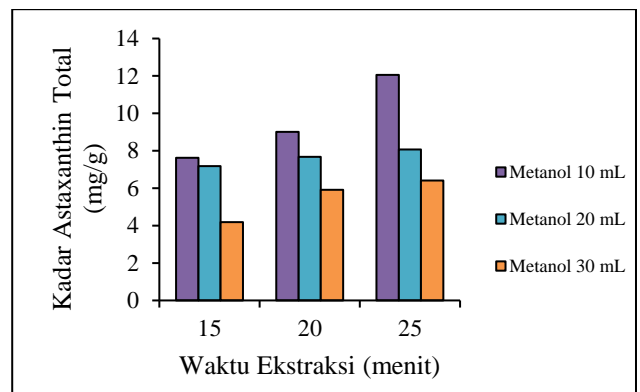
3.1. Pengaruh Jenis Pelarut Etanol, Volume Pelarut dan Waktu Ekstraksi terhadap Kadar Astaxanthin Total

Dari Gambar 2 dapat dilihat bahwa kadar astaxanthin terbaik pada waktu ekstraksi 25 menit. Hal ini disebabkan semakin lama waktu ekstraksi maka kadar astaxanthin akan semakin meningkat dikarenakan pigmen *Haematococcus* sp. berkontak terus dengan pelarut selama proses ekstraksi. Sedangkan ditinjau dari segi volume pelarut, dapat dilihat bahwa volume pelarut terbaik yaitu pada volume 10 ml, semakin kecil volume pelarut yang digunakan maka ekstraksi berlangsung sensitif sehingga kadar astaxanthin yang dihasilkan semakin banyak. Dari hasil data tersebut diperoleh bahwa waktu ekstraksi yang terbaik yaitu pada waktu 25 menit dengan volume pelarut 10 ml yaitu sebesar 11.67 mg/g.



Gambar 2. Pengaruh waktu ekstraksi dan volume pelarut terhadap kadar astaxanthin dengan variasi jenis pelarut etanol

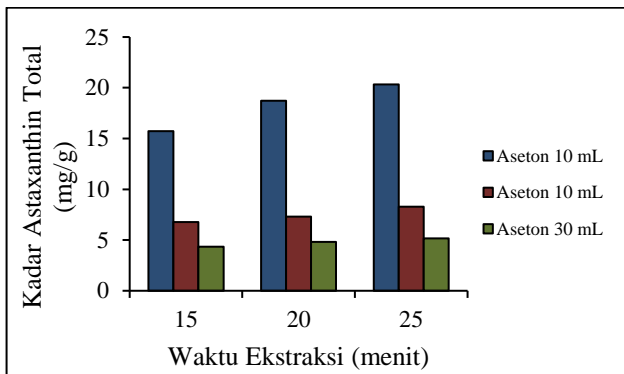
3.2. Pengaruh Jenis Pelarut Metanol, Volume Pelarut dan Waktu Ekstraksi terhadap Kadar Astaxanthin Total



Gambar 3. Pengaruh waktu ekstraksi dan volume pelarut terhadap kadar astaxanthin dengan variasi jenis pelarut metanol

Dari Gambar 3 dapat dilihat bahwa kadar astaxanthin terbaik pada waktu ekstraksi 25 menit. Semakin lama waktu ekstraksi maka pigmen astaxanthin yang dihasilkan akan semakin banyak akibat pelarut dengan bahan berkontak terus dengan panas dari proses ekstraksi. Pada jenis pelarut metanol ini, waktu ekstraksi terbaik pada 25 menit juga dipengaruhi oleh perbandingan jumlah rasio pelarut serta sifat kepolaran dari jenis pelarut. Sedangkan ditinjau dari segi volume pelarut yaitu pada volume 10 ml. Semakin kecil volume pelarut yang digunakan maka ekstraksi berlangsung baik pada berbagai waktu ekstraksi. Dari hasil data tersebut diperoleh bahwa waktu ekstraksi yang terbaik yaitu pada waktu 25 menit dengan volume pelarut 10 ml yaitu sebesar 12,05 mg/g.

3.3. Pengaruh Jenis Pelarut Aseton, Volume Pelarut dan Waktu Ekstraksi terhadap Kadar Astaxanthin Total



Gambar 4. Pengaruh waktu ekstraksi dan volume pelarut terhadap kadar astaxanthin dengan variasi jenis pelarut aseton

Dari Gambar 4 dapat dilihat bahwa kadar astaxanthin terbaik pada waktu ekstraksi 25 menit. Jenis pelarut aseton memiliki nilai kepolaran yang baik sehingga didapat kadar astaxanthin pada volume 10 ml dan 20 ml dengan waktu 15, 20, dan 25 menit semakin meningkat.

Dapat dilihat pada Gambar 3 bahwa volume pelarut terbaik yaitu pada volume 10 ml, semakin kecil volume pelarut yang digunakan maka ekstraksi berlangsung sensitif sehingga kadar astaxanthin yang dihasilkan semakin banyak. Dari hasil data tersebut diperoleh kadar astaxanthin optimum yang terbaik yaitu pada waktu 25 menit dengan volume pelarut 10 ml yaitu sebesar 20,31 mg/g.

Berdasarkan hasil percobaan dapat dilihat bahwa semakin lama waktu ekstraksi maka kadar yang dihasilkan semakin meningkat, hal ini disebabkan lamanya waktu operasi pada proses ekstraksi. Lama waktu operasi menyebabkan waktu kontak antara pelarut dengan bahan baku semakin lama sehingga proses pelarutan dari kadar oleh bahan baku mikroalga *Haematococcus* sp. terjadi terus menerus sampai pelarut jenuh terhadap bahan baku tersebut. Namun jika waktu proses ekstraksi terlalu lama juga dapat mengalami kerusakan dan mengurangi hasil kadar yang diperoleh. Sama halnya juga dengan volume pelarut, semakin banyak volume pelarut maka kadar akan semakin kecil. Hal ini disebabkan oleh pengaruh dari penambahan rasio bahan pelarut. Pada saat rasio bahan pelarut 0,1 : 10 ml, maka ekstraksi akan berlangsung sempurna. Namun, pada saat rasio bahan pelarut 0,1 : 30 ml, efektifitas volume yang masuk ke dinding sel semakin sedikit sehingga kadar yang dihasilkan semakin menurun akibat kontak antara volume pelarut dan biomassa yang semakin kecil. Untuk jenis pelarut yang digunakan, hasil kadar yang diperoleh berbeda-beda dari masing-masing jenis pelarut. Hal ini disebabkan karena sifat kepolaran dan tidaknya pelarut yang digunakan. Semakin polar pelarut, maka daya ekstraksi akan semakin bagus.

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa jenis pelarut berpengaruh terhadap hasil ekstraksi astaxanthin. Diperoleh dari laporan sebelumnya bahwa aseton memberikan yield lebih tinggi dari etanol, sesuai dengan hasil penelitian ini (Sharayei et al., 2021). Ruen ngam et al. (2010) juga melaporkan bahwa pelarut aseton memberikan yield tertinggi dibanding metanol, dan etanol untuk ekstraksi astaxanthin berbantuan UAE. Aseton dapat memberikan yield tinggi karena strukturnya memiliki kemiripan dengan astaxanthin yang banyak tersusun atas asam karboksilat (Zhao et al., 2019).

UAE dapat membantu proses ekstraksi karena dapat menghancurkan dinding sel *Haematococcus pluvialis* sehingga pelarut dapat dengan mudah mengekstrak pigmen. Zou et al. (2013) melaporkan bahwa ekstraksi astaxanthin dengan UAE dan etanol dapat memberikan yield sebesar 27 mg/g, sementara dengan metode konvensional diperoleh yield sebesar 16 mg/g. Dari hasil percobaan ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa jenis pelarut terbaik pada proses ekstraksi adalah pelarut aseton 10 ml dengan waktu maksimum ekstraksi adalah 25 menit. Semakin tinggi kadar total astaxanthin yang dihasilkan berarti antioksidan yang dihasilkan dari ekstrak *Haematococcus* sp. tinggi.

4. Kesimpulan

Dari Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa semakin polar jenis pelarut, maka akan semakin tinggi kadar yang dihasilkan. Untuk rasio massa volume pelarut, semakin kecil volume pelarut maka kadar astaxanthin yang diperoleh semakin tinggi, didapat hasil kadar astaxanthin optimum pada volume pelarut 10 ml. Lama waktu ekstraksi yang dibutuhkan terhadap kadar astaxanthin *Haematococcus* sp. berpengaruh dalam proses ekstraksi. Semakin lama waktu ekstraksi kadar astaxanthin akan semakin meningkat. pada penelitian ini didapat hasil kadar astaxanthin optimum pada pelarut aseton dengan waktu 25 menit sebesar 20,31 mg/g.

Daftar Pustaka

- Adang Firmansyah, Wiwin Winingsih, Zenith Virginia Ababiel, Nella Nurmeilasari, Ati Setiasih. 2019. Produksi Astaxanthin dari Mikroalga *Haematococcus pluvialis* Menggunakan Ekstraksi Karbon Dioksida Superkritikal yang Dimodifikasi. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi Indonesia*. 8 (No. 2).
- Agus Budiyanto, Yulianingsih. "Pengaruh Suhu Dan Waktu Ekstraksi Terhadap Karakter Pektin Dari Ampas Jeruk Sia m (*Citrus Nobilis* L)." Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian. Bogor., 2008.
- Antonio Molino, dkk. 2018. "Extraction of Astaxanthin From Microalga *Haematococcus Pluvialis* In Red Phase by Using Generally Recognized As Safe Solvents and Accelerated Extraction." *Journal of biotechnology*, v. 283., pp. 51-61.
- Adhik Wati dan Sylvia Anggraeni Motto. Ekstraksi Minyak dari Mikroalga Jenis *Chlorella* sp Berbantuan Ultrasonik.

- Armenta, R.E., Guerrero, S. & Legarreta. 2009. Stability Studies on Astaxanthin Extracted from Fermented Shrimp Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(14):6095-6099. doi: 10.1021/jf901083d.
- Atmadja WS, Kadi A, Sulistijo, Rachmaniar. 1996. Pengenalan Jenis-Jenis Rumpun Laut Indonesia. Puslitbang Oseanologi-LIPI, Jakarta.
- Atmadja WS, Kadi A, Sulistijo, Rachmaniar. 1996. Pengenalan Jenis-Jenis Rumpun Laut Indonesia. Puslitbang Oseanologi-LIPI, Jakarta.
- Bauer, Andreas & Minceva, Mirjana. 2020. Extraction of astaxanthin from the microalgae *Haematococcus pluvialis*. *Chemie Ingenieur Technik*. 92. 1237-1238. 10.1002/cite.202055464.
- B Sembiring. 2007. Teknologi penyediaan simplisia terstandar tanaman obat. 2007. *Warta Puslitbangbun*. 13 (2) : 4-8.
- Chen, C.Y., Yeh, R. Aisyah, R, D.J. Lee and J.S. Chang. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour. Technol.*, 102 : 71-81.
- Choubert, G. dan Heinrich, O., 1993, "Carotenoid Pigments of the Green Alga *Haematococcus pluvialis*: Assay on Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Pigmentation in Comparison with Synthetic Astaxanthin and Cantaxanthin", *Aquaculture*, 112(2-3(, 217-226).
- Depkes RI, 1995, Farmakope Indonesia Edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Dong, Shengzhao & Huang, Yi & Zhang, Rui & Wang, Shihui & Yun, Liu. (2014). Four Different Methods Comparison for Extraction of Astaxanthin from Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *TheScientificWorldJournal*.
- Daniar Kusumawati, Ketut Mahardika, dan Ketut Maha Setiawati. 2003. Aplikasi Astaxanthin dari *Haematococcus* pada Benih Kerapu Sunu (*Plectropomus leopardus*) Terhadap Total Karotenoid dan Profil Darah. *Media Akuakultur*, 14 (2) : 113-122.
- Ekpe, L., Inaku, K.O., Ekpe, V. & Contact, L. 2018. Antioxidant effects of astaxanthin in various diseases??? a review. *Journal of Molecular Pathophysiology*. 7(1):1-6. doi: 10.5455/jmp.20180627120817
- Enesty Winnie Winata, Yunianta Yunianta. 2015. Ekstraksi Buah Murbei (*Morus alba* L.) METODE ULTRASONIC BATH (KAJIAN WAKTU DAN RASIO BAHAN : PELARUT). *Jurnal pangan dan agroindustry*. 3 (2).
- Fakhri, S., Nouri, Z., Moradi, S. Z., dan Farzaei, M.H., 2020, *Astaxanthin*, COVID-19 and immune response: Focus on oxidative stress, apoptosis and autophagy, *Phytother. Res.*, 1-3.
- Hadiyanto dan Azim, M., 2012, "Mikroalga Sumber Pangan dan Energi Masa Depan", *UNDIP Press*, Semarang.
- Haque, F., Dutta, A., Thimmanagari, M., dan Chiang, Y.W., 2016 "Intensified Green Production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*" ., 99, 1-11.
- Huang, Wen-Can, Liu Hui, Sun Weiwei, Xue Changhu, Mao Xiangzhao., 2018 Effective Astaxanthin Extraction from Wet *Haematococcus pluvialis* Using Switchable Hydrophilicity Solvents, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*.
- Islam MA, Heimann K, Brown RJ (2017) Microalgae biodiesel : Current status and future needs for engine performance and emissions. *Renew Sustain Energy Rev* 79: 1160–1170. doi: 10.1016/j.rser.2017.05.041.
- Ismaningdyah Kurniawati, Maftuch dan Anik Martinah Hariati. 2016. Penentuan Pelarut dan Lama Ekstraksi Terbaik pada Teknik Maserasi *Gracilaria* sp. serta Pengaruhnya Terhadap Kadar Air dan Rendemen. *Samakia: Jurnal Ilmu Perikanan* Volume 7, No. 2.
- Kobayashi, M., Karimura, Y., Sakamoto, Y., dan Tsuji, Y., 1997, "Selective Extraction of Astaxanthin and Chlorophyll from the Green Alga *Haematococcus pluvialis*", *Biotechnol. Tech.*, 11 (9), 657-660.
- Kusumawati, D. & Setiawati, K.M. (2017). The use of carotene materials as the source of red color pigmentation on leopard grouper larvae (*Plectropomus leopardus*). *Aquacultura Indonesiana*, 17(2), 35-45.
- Kim, D.Y., D. Vijayan, R. Praveenkumar, J.I. Han, K. Lee, J. Y. Park, W.S. Chang, J. S. Lee and Y. K. Oh. 2016. Cell-wall disruption and lipid/Astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. *Bioresour. Technol.* 199 : 300–310.
- Maulida Rosa Umairana, A. Shofy Mubarak dan Endang Dewi Masithah, 2013. Pengaruh Konsentrasi Pupuk Daun Turi Putih (*Sesbania grandiflora*) Terhadap Populasi *Chlorella* sp. *Journal of Aquaculture and fish health*. 1 (No. 1).
- Mario Chronis, Vasiliki Maria Christopoulou, Sofia Papadaki, Marina Stramarkou, Magdalini Krokida. 2021. Optimazation of Mild Extraction Methods for the Efficient Recovery of Astaxanthin, a Strong Food Antioxidant Carotenoid from Microalgae. *AIDIC*.
- Mohamed Ali Ar-Farsi and Chang Yong Lee . " Optimization of phenolics and dietary fibre extraction from date seeds". *Journal of Food Science and Technology*, Cornell University, Geneva, New York, USA.. 108, 2008 : 977 – 985
- Molino A, Mehariya S, Iovine A, Larocca V, Di Sanzo G, Martino M, Casella P, Chianese S, Musmarra D. Extraction of Astaxanthin and Lutein from Microalga *Haematococcus pluvialis* in the Red Phase Using CO₂ Supercritical Fluid Extraction Technology with Ethanol as Co-Solvent. *Mar Drugs*. 2018
- Melia Verdiana, I Wayan Rai Widarta, dan I Dewa Gede Mayun Permana. 2018. Pengaruh Jenis Pelarut pada Ekstraksi Menggunakan Gelombang Ultrasonik Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Lemon (*Citrus limon* (Linn.) Burm F.). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. 7 (No.4) : 213-222.

- Ni Putu Noviantari, Lutfi Suhendra, dan Ni Made Wartini. 2017. Pengaruh Ukuran Partikel Bubuk dan Konsentrasi Pelarut Aseton Terhadap Karakteristik Ekstrak Warna *Sargassum polycystum*. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. 5 (No. 3)
- Nurzarah Tazar, Fidela Violalita, dan Mimi Harni. 2018. Pengaruh Metoda Ekstraksi Terhadap Karakteristik Ekstrak Pekat Pigmen Antosianin dari Buah Senduduk (*Melastoma malabathricum* L.) serta Kajian Aktivitas Antioksidannya. *Jurnal Penelitian Pertanian POLITEKNIK Pertanian Negeri Pakayumbuh*. 17 (No. 1).
- Pinto, M. M. M., Raposo, M. F. J., Young, A. J., dan Morais, R., 2001, "Evaluation of Different Cell Disruption Processes on Encysted Cells of *Haematococcus pluvialis* : Effect on Astaxanthin Recovery and Implications for Bio-Availability", *J. Appl. Phycol.*, 13, 19-24.
- Raposo, M.F.D., R.M.S.C. de Morais and A.M.M.B. de Morais. 2013. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sci*. 93 (15) : 479-486.
- Rahman Karnila dan Ivan Heriasyah. 2020. Buku Referensi Astaxanthin. Oceanum Press, Riau.
- Ruen-ngam, D., Shotipruk, A., & Pavasant, P. (2010). Comparison of extraction methods for recovery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Separation Science and Technology*, 46(1), 64-70.
- Sharayei, P., Azarpazhooh, E., Zomorodi, S., Einafshar, S., & Ramaswamy, H. S. (2021). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of astaxanthin from green tiger (*Penaeus semisulcatus*) shrimp shell. *Ultrasonics Sonochemistry*, 76, 105666.
- Zhao, T., Yan, X., Sun, L., Yang, T., Hu, X., He, Z., ... & Liu, X. (2019). Research progress on extraction, biological activities and delivery systems of natural astaxanthin. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 354-361.