

PHOTODEGRADATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CHLOROPHYLL *a* FROM SPIRULINA (*Spirulina sp.*) POWDER

Fotodegradasi dan Aktivitas Antioksidan Klorofil *a* dari Serbuk *Spirulina (Spirulina sp.)*

Rebecca Christiana¹, Hari Kristopo² and Leenawaty Limantara^{1,2*}

¹ Magister Biology, Satya Wacana Christian University Jl. Diponegoro 52-60, Salatiga 50711

² Ma Chung Research Center, Universitas Ma Chung, Villa Puncak Tidar N-01, Malang 65151

Received 18 February 2008; Accepted 24 March 2008

ABSTRACT

Research on chlorophyll *a* from *Spirulina (Spirulina sp.)* powder has been done in order to determine chlorophyll *a* content, to compare degradation pattern and kinetics degradation of chlorophyll *a* and crude extract as well as to investigate the difference of antioxidant activity of chlorophyll *a* with or without irradiation. Chlorophyll *a* content in spirulina powder was calculated by using Porra's equation. Irradiation and recovery ability of chlorophyll *a* were measured by using volpi light (Intralux 6100) equipped with daylight filter. The antioxidant activity of chlorophyll *a* was determined by using DPPH method. The results showed that chlorophyll *a* content was 2.886 µg/g dry weight. Chlorophyll *a* has the higher stability than crude extract against 60 minutes irradiation at room temperature. Kinetics degradation of chlorophyll *a* was based on second order while crude extract based on first order. Chlorophyll *a* and crude extract have recovery ability. The results also showed that antioxidant activity of chlorophyll *a* was increased after 60 minutes of irradiation.

Keywords: antioxidant activity, chlorophyll *a*, photodegradation, spirulina powder.

PENDAHULUAN

Spirulina merupakan salah satu mikroalga hijau biru, multiselular dan berbentuk spiral yang dapat tumbuh pada kondisi basa. Alga hijau biru ini telah digunakan sebagai suplemen makanan di beberapa negara karena memiliki kandungan fitonutrien yang cukup lengkap dan dinding sel yang mudah dicerna oleh tubuh [1,2]. Penelitian secara *in vitro* maupun *in vivo* telah membuktikan bahwa *Spirulina* mengandung senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan, yaitu kemampuan untuk mencegah atau menghambat radikal bebas yang menyebabkan kerusakan pada sel tubuh [2-7]. Senyawa yang berperan aktif sebagai antioksidan di antaranya pigmen yang memberikan warna hijau pada *Spirulina* yaitu klorofil *a* [8-13].

Klorofil *a* merupakan Mg-tetrapirrol yang tersebar luas di organisme fotosintetik tingkat rendah maupun tingkat tinggi. Pigmen fotosintetik berwarna hijau biru ini memiliki peran yang sangat penting dalam proses fotosintesis, baik sebagai penangkap cahaya, transfer energi maupun dalam konversi energi cahaya. Klorofil *a* memiliki serapan maksimum di daerah 380-430 nm dan 530-665 nm dalam pelarut organik. Serapan klorofil *a* yang luas serta kemampuannya sebagai fotosensitizer membuat molekul ini cenderung tidak stabil terhadap cahaya [14] atau mudah mengalami fotodegradasi. Penelitian mengenai pola fotodegradasi serta kinetika degradasi klorofil *a* belum banyak ditemukan, demikian pula dengan pengaruh keberadaan cahaya matahari terhadap aktivitas antioksidan klorofil *a*. Berdasarkan

latar belakang tersebut, maka tujuan penelitian adalah untuk membandingkan stabilitas klorofil *a* dan ekstrak kasar berdasarkan kinetika degradasi pada berbagai seri waktu menggunakan filter cahaya matahari buatan, menentukan kemampuan recovery klorofil *a* setelah iradiasi dengan metode spektroskopi dan menentukan perubahan aktivitas antioksidan klorofil *a* dengan dan tanpa iradiasi.

METODE PENELITIAN

Bahan

Sampel yang digunakan adalah serbuk *Spirulina* produk Synergy Worldwide, USA. Bahan kimia yang digunakan aseton, metanol, dietil eter, n-heksana, buffer fosfat pH 7,6 (2,5 mM) dalam aseton, reagen DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), akuades, Na₂SO₄ anhidrat, silika gel F₂₅₄, silika gel 60 dan gas nitrogen.

Peralatan

Alat yang digunakan adalah neraca analitis, spektrofotometer UV-tampak berkas rangkap Varian Cary 50, pH meter, rotary evaporator dan alat-alat gelas.

Prosedur Kerja

Pengukuran kandungan klorofil *a* [15]

Empat puluh miligram sampel diekstraksi menggunakan buffer fosfat pH 7,6 (2,5 mM) dalam aseton. Filtrat dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL

* Corresponding author. Tel/Fax : +62-341-550171/550175
Email address : leenawaty.limantara@machung.ac.id

lalu dikenakan hingga garis tera. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 663,6 nm dan 646,6 nm menggunakan spektrofotometer UV-tampak. Kandungan klorofil *a* dihitung dalam $\mu\text{g/g}$ dengan persamaan Porra (1991):

$$\text{Klorofil } a = 12,25 A_{663,6} - 2,55 A_{646,6} \quad (1)$$

Ekstraksi klorofil *a* [16]

Tiga gram sampel dilarutkan dalam 30 mL campuran pelarut metanol : aseton dengan perbandingan 7 : 3 (v/v). Ekstrak disaring dengan kertas saring, kemudian filtrat dipartisi dalam corong pisah menggunakan dietil eter. Lapisan epifase ditambahkan Na_2SO_4 anhidrat lalu disaring. Filtrat dipekatkan dengan *rotary evaporator* kemudian dikeringkan dengan gas nitrogen.

Isolasi klorofil *a* [17]

Ekstrak kasar klorofil dilarutkan dalam 3 mL campuran pelarut aseton : dietil eter : n-heksan dengan perbandingan 2 : 3 : 6 (v/v/v). Pigmen dimurnikan dengan kromatografi kolom menggunakan silika gel 60 sebagai fase diam dan dielusi dengan aseton : dietil eter : n-heksan dengan perbandingan 2 : 3 : 6 (v/v/v). Pita berwarna hijau kebiruan ditampung kemudian pelarut diuapkan dengan gas nitrogen.

Iradiasi klorofil *a* [18]

Isolat klorofil *a* serta ekstrak kasar pada absorbansi maksimal ± 1 AU diiradiasi dengan lampu volpi (Intralux 6100) menggunakan filter cahaya matahari (intensitas cahaya $3,26 \times 10^4$ lux) pada suhu ruang. Seri lama penyinaran adalah 15, 30, 45 dan 60 menit. Pola spektra sebelum dan sesudah iradiasi dianalisis dengan spektrofotometer UV-tampak pada panjang gelombang 350-800 nm. Untuk mengetahui kemampuan *recovery* pigmen maka sampel yang telah diiradiasi dengan seri waktu 15, 30, 45 dan 60 menit kemudian diinkubasi selama waktu iradiasi yang digunakan. Absorbansi sampel sesudah iradiasi dan setelah inkubasi diukur untuk mengetahui *recovery* pigmen. Pola *recovery* dianalisis pada panjang gelombang 350-800 nm.

Uji aktivitas antioksidan metode DPPH [19]

Konsentrasi pigmen yang digunakan untuk uji antioksidan adalah 1×10^{-5} M dengan β -karoten sebagai kontrol positif. Konsentrasi klorofil *a* yang digunakan untuk uji antioksidan dengan pengaruh iradiasi adalah $1,679 \times 10^{-5}$ M.

Empat mililiter isolat klorofil *a* ditambahkan 1 mL larutan DPPH 0,1 mM dalam metanol 100 %. Larutan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm dengan spektrofotometer UV-tampak. Aktivitas antioksidan dihitung dengan persamaan :

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{A_0 - A_e}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

Persentase penghambatan sebelum dan sesudah iradiasi dibandingkan, kemudian dihitung perubahannya.

Analisis data

Data dianalisis secara statistika deskriptif. Data kinetika degradasi dianalisis dengan Matlab versi 6.5.

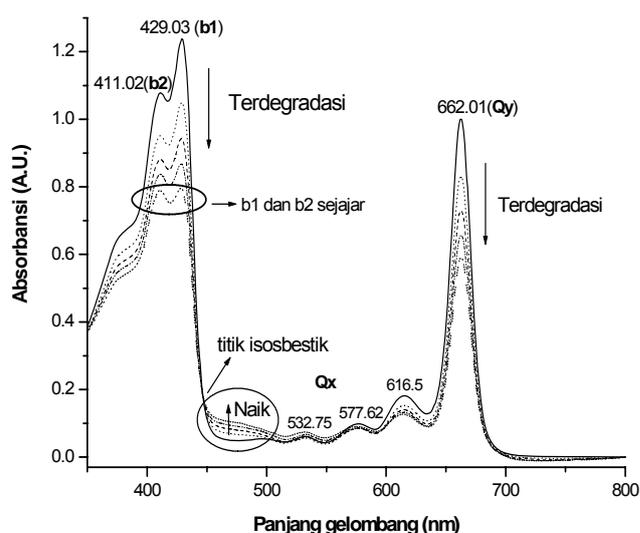
HASIL DAN PEMBAHASAN

Kandungan Klorofil *a* Serbuk Spirulina

Menurut Kabinawa [20], kandungan klorofil *a* dalam spirulina segar adalah 115 mg/10 g atau setara dengan 11.500 $\mu\text{g/g}$, namun hasil pengukuran kandungan klorofil *a* pada spirulina dalam kemasan pada penelitian ini lebih kecil bila dibandingkan literatur yaitu 2.886,1305 $\mu\text{g/g}$ (Tabel 1). Perbedaan jenis spesies spirulina yang diteliti, perbedaan kondisi lingkungan tempat pembiakan spirulina, seperti pH media, cahaya matahari serta kandungan oksigen dan nitrogen [21-22] serta penggunaan proses *spray dry* dapat mempengaruhi perbedaan tersebut.

Tabel 1. Kandungan klorofil *a* serbuk Spirulina

| Ulangan | Kandungan ($\mu\text{g/g}$ berat kering) |
|-----------|---|
| 1 | 2.930 |
| 2 | 2.852 |
| 3 | 2.876 |
| Rata-rata | 2.886 |
| SE | 99 |



Gambar 1. Pola spektra fotodegradasi klorofil *a* dalam aseton 100 % pada 350-800 nm (— 0 menit, ··· 15 menit, - - - 30 menit, - · - 45 menit, dan ····· 60 menit iradiasi)

Fotodegradasi dan Pemulihan Struktur Klorofil *a*

Klorofil *a* memiliki serapan maksimum pada daerah biru (Soret) (400-450 nm) dan merah (Q_y) (650-700 nm) dari spektrum tampak. Klorofil *a* merupakan molekul yang tidak stabil terhadap cahaya [14], hal ini dapat dilihat dari perubahan spektra klorofil *a* pada daerah Soret dan Q_y klorofil *a*. Iradiasi yang dilakukan selama 1 jam dengan selang waktu pengukuran tiap 15 menit pada suhu ruang. Jika dilihat pada spektra, terdapat satu titik isosbestik pada spektra fotodegradasi klorofil *a* (Gambar 1). Titik isosbestik adalah keadaan dimana molekul yang berbeda berada pada kesetimbangan dan memiliki koefisien serapan molar (koefisien ekstingsi) yang sama [24].

Berdasarkan Tabel 2 dapat dilihat bahwa persentase degradasi pada daerah Q_y lebih besar daripada daerah Soret (b_1 dan b_2). Serapan maksimum klorofil *a* pada daerah b_1 (429,03 nm) terdegradasi lebih cepat dibandingkan daerah b_2 (411,02 nm).

Perbandingan persentase fotodegradasi daerah b_1 terhadap Q_y kurang lebih sama tiap 5 menitnya yaitu sekitar 0,86-0,88 %. Pengamatan dihentikan pada menit ke 60 ketika interaksi antara daerah b_1 dan b_2 sama yaitu pada absorbansi sekitar 0,79 (Tabel 3). Berdasarkan hasil pengamatan, produk degradasi klorofil *a* bukan berupa feofitin *a*, feoforbid *a*, atau klorofilid *a* jika merujuk pada pola spektranya. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Endo dkk. [25] dan Merzlyak dkk. [26]. Klorofil *a* dimungkinkan mengalami pembukaan cincin tetrapirrol menjadi tetrapirrol linier, namun belum terdegradasi lebih lanjut hingga menjadi molekul sederhana penyusunnya seperti CO_2 , H_2O dan NH_3 . Dugaan ini dikuatkan dengan adanya kemampuan pemulihan struktur dari klorofil *a*. Fotodegradasi klorofil *a* terjadi sangat cepat dan dipengaruhi juga oleh kelarutan oksigen dalam aseton

Tabel 2. Persentase fotodegradasi klorofil *a* pada daerah Q_y dan Soret (b_1 dan b_2)

| Waktu (menit) | Fotodegradasi (%) \pm SE | | | |
|---------------|----------------------------|--------------------|--------------------|-------------|
| | b_1 | b_2 | Q_y | $b_1 : Q_y$ |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 15,064 \pm 0,231 | 11,696 \pm 0,310 | 16,991 \pm 0,398 | 0,886 |
| 30 | 23,637 \pm 0,306 | 18,051 \pm 0,465 | 27,027 \pm 0,159 | 0,874 |
| 45 | 29,704 \pm 0,360 | 22,208 \pm 0,380 | 34,477 \pm 0,666 | 0,861 |
| 60 | 35,631 \pm 0,318 | 26,717 \pm 0,387 | 40,915 \pm 0,228 | 0,870 |

Tabel 3. Purata absorbansi klorofil *a* pada serapan maksimum

| Waktu (menit) | $b_1 \pm$ SE | $b_2 \pm$ SE | $Q_y \pm$ SE |
|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 0 | 1,23805 \pm 0,000 | 1,07855 \pm 0,012 | 1 \pm 0,000 |
| 15 | 1,05252 \pm 0,005 | 0,95382 \pm 0,007 | 0,83007 \pm 0,004 |
| 30 | 0,94576 \pm 0,002 | 0,88450 \pm 0,005 | 0,72973 \pm 0,003 |
| 45 | 0,87136 \pm 0,007 | 0,83988 \pm 0,005 | 0,65523 \pm 0,007 |
| 60 | 0,79764 \pm 0,005 | 0,79085 \pm 0,005 | 0,59085 \pm 0,005 |

yang cukup tinggi, yaitu sekitar 10 kali dari kelarutannya dalam air [27]. Oksigen diketahui menjadi salah satu penyebab degradasi dan pemudaran warna klorofil *a* [28].

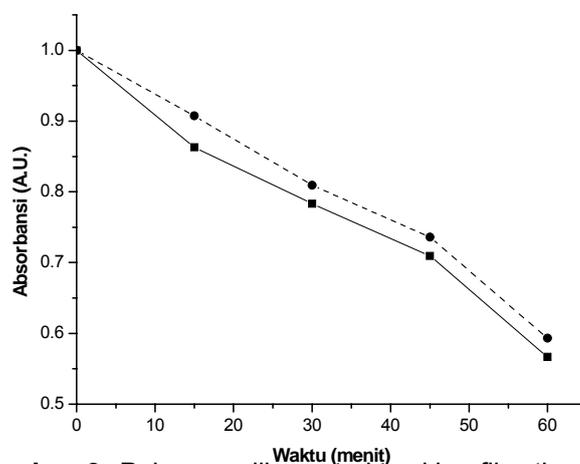
Menurut Matile dkk. [29], proses oksidasi mengakibatkan klorofil *a* kehilangan ion Mg^{2+} , kemudian terbentuk feoforbid *a*, proses ini terjadi sangat cepat. Oksidasi terjadi pada ikatan metin antara C4 dan C5 yang menyebabkan terbentuknya tetrapirrol linier. Penambahan atom O pada C5 membentuk gugus formil (HCO-) sedangkan pada C4 membentuk gugus laktam.

Perubahan pola spektra merupakan salah satu indikasi terbentuknya produk degradasi klorofil *a*. Dapat dilihat pada kenaikan serapan pada 450-500 nm. Merujuk pada penelitian Limantara dkk. [18], produk degradasi ini merupakan 3-asetil-klorofil *a*.

Degradasi klorofil *a* mengikuti pola orde kedua dengan tetapan laju (k) yaitu $0,0117 \text{ A.U.}^{-1} \text{ menit}^{-1}$. Berdasarkan nilai k dapat diperoleh waktu paruh degradasi yaitu sebesar 85,4701 menit.

Klorofil *a* yang mengalami kerusakan akibat iradiasi memiliki kemampuan untuk menata kembali struktur molekulnya. Hal tersebut dibuktikan dengan adanya kenaikan absorbansi setelah inkubasi dalam gelap selama selang waktu yang digunakan untuk iradiasi (Gambar 2).

Persentase pemulihan struktur klorofil *a* dapat dilihat pada Tabel 4. Berdasarkan hasil penelitian, kemampuan pemulihan struktur klorofil maksimal dari klorofil *a* pada menit ke 15 yaitu 4,258 % dan menurun hingga 2,926 % pada menit ke 60. Sekitar 95 % kerusakan terjadi selama iradiasi klorofil selama 15 menit pertama, kepekaan klorofil terhadap cahaya molekul ini mudah sekali terdegradasi dan sulit untuk mengalami *recovery*. Tingkat kerusakan klorofil *a* pada menit ke 60 cukup besar sehingga kemampuan pemulihan struktur yang dimilikinya semakin kecil.



Gambar 2. Pola pemulihan struktur klorofil *a* tiap seri waktu (--- iradiasi --- pemulihan struktur)

Tabel 4. Persentase recovery klorofil *a*

| Waktu (menit) | Pemulihan struktur (%) \pm SE |
|---------------|---------------------------------|
| 0 | 0 |
| 15 | 4,258 \pm 0,512 |
| 30 | 3,095 \pm 0,671 |
| 45 | 3,462 \pm 0,512 |
| 60 | 2,926 \pm 0,029 |

Fotodegradasi dan Pemulihan Struktur Ekstrak Kasar

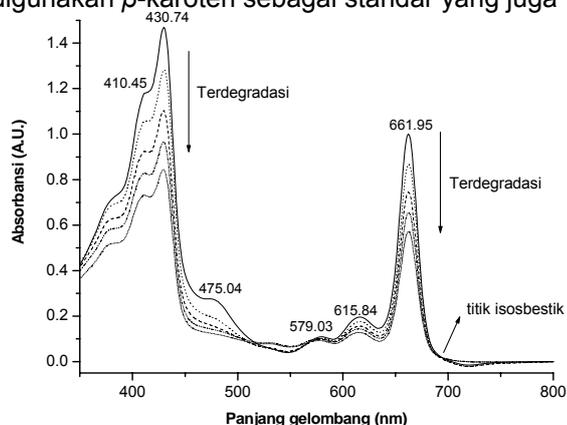
Perbedaan serapan pada ekstrak kasar dan klorofil *a* terletak pada 450-500 nm yang diidentifikasi sebagai serapan dari karotenoid (Gambar 3). Pengaruh keberadaan karotenoid sebagai fotoprotektor klorofil *a* dapat dilihat pada persentase fotodegradasi ekstrak kasar (Tabel 5). Daerah serapan karotenoid lebih cepat terdegradasi dibandingkan dengan serapan klorofil *a* pada 662 nm. Hal ini terjadi karena proses disipasi energi oleh karotenoid terhadap reaktivitas singlet oksigen yang terbentuk ketika klorofil *a* tereksitasi oleh adanya cahaya [14].

Degradasi ekstrak kasar mengikuti pola orde pertama dengan tetapan laju (*k*) 0,0093 menit dan waktu paruh degradasi 74,5161 menit. Berdasarkan waktu paruh, ekstrak kasar terdegradasi lebih cepat bila dibandingkan dengan klorofil *a* (85,4701 menit).

Seperti halnya klorofil *a*, ekstrak kasar juga memiliki kemampuan pemulihan struktur. Persentase pemulihan struktur pada ekstrak kasar meningkat pada menit ke 15 hingga 45, namun menurun drastis pada menit ke 60 (Tabel 6). Gambar 4 menunjukkan pola pemulihan struktur ekstrak kasar selama iradiasi 60 menit. Kemampuan pemulihan struktur maksimum terjadi pada menit ke 45 dan minimum pada menit ke 60.

Aktivitas Antioksidan Klorofil *a*

Dalam pengukuran aktivitas antioksidan klorofil *a* digunakan β -karoten sebagai standar yang juga



Gambar 3. Pola spektra fotodegradasi ekstrak kasar dalam aseton 100 % pada 350-800 nm (— 0 menit, ··· 15 menit, --- 30 menit, - · - 45 menit, dan ····· 60 menit iradiasi)

Tabel 5. Persentase fotodegradasi ekstrak kasar dan klorofil *a*

| Waktu (menit) | Fotodegradasi (%) \pm SE | | |
|---------------|-----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | Ekstrak kasar (λ_{662}) | Klorofil <i>a</i> (λ_{662}) | Daerah karotenoid (λ_{475}) |
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 13,050 \pm 0,703 | 16,991 \pm 0,398 | 28,828 \pm 0,457 |
| 30 | 23,783 \pm 0,472 | 27,027 \pm 0,159 | 41,575 \pm 1,488 |
| 45 | 34,358 \pm 0,437 | 34,477 \pm 0,666 | 48,090 \pm 0,199 |
| 60 | 42,743 \pm 0,402 | 40,915 \pm 0,228 | 54,769 \pm 0,084 |

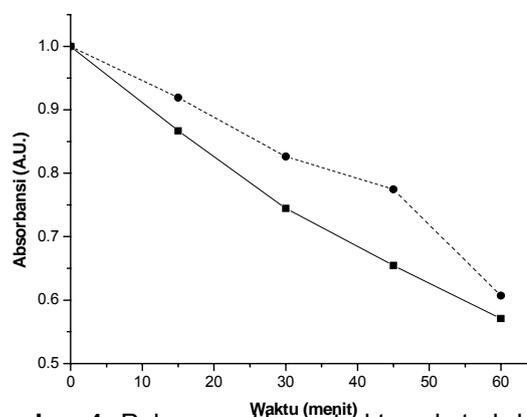
Tabel 6. Persentase recovery ekstrak kasar

| Waktu (menit) | Pemulihan struktur (%) \pm SE |
|---------------|---------------------------------|
| 0 | 0 |
| 15 | 5,044 \pm 0,544 |
| 30 | 7,993 \pm 0,616 |
| 45 | 11,666 \pm 0,017 |
| 60 | 3,411 \pm 0,534 |

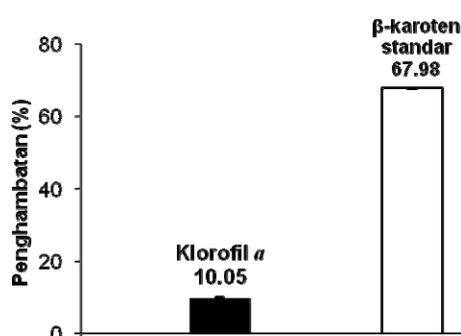
merupakan pigmen fotosintetik serta diketahui memiliki aktivitas antioksidan [14]. Pengukuran aktivitas antioksidan pigmen dilakukan dengan menggunakan metode DPPH.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan β -karoten sekitar 6 kali lebih besar dari klorofil *a* (Gambar 5). Hasil tersebut tidak jauh berbeda dengan penelitian yang dilakukan Buratti dkk. dengan menggunakan metode elektrokimia [9] bahwa aktivitas antioksidan β -karoten 5 kali lebih besar dari aktivitas antioksidan klorofil *a*. Jika melihat keberadaan klorofil yang jauh melimpah di alam dibandingkan β -karoten maka klorofil *a* dapat dijadikan salah satu sumber antioksidan yang potensial, misalnya kandungan klorofil dalam bayam sebesar 1250 μ g/g berdasarkan berat basah namun kandungan karotenoid total hanya 364 μ g/g, sementara itu kandungan klorofil pada kacang hijau sebesar 52 μ g/g dan karotenoid total sebesar 8,6 μ g/g berat basah [30].

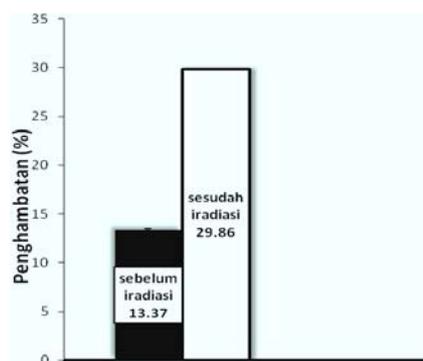
Penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari penyinaran selama 60 menit terhadap



Gambar 4. Pola pemulihan struktur ekstrak kasar tiap seri waktu (--- iradiasi, - - - pemulihan struktur)



Gambar 5. Histogram purata persentase penghambatan pigmen pada konsentrasi 1×10^{-5} M



Gambar 6. Histogram purata persentase penghambatan sebelum dan sesudah iradiasi selama 60 menit pada suhu ruang. Konsentrasi awal pigmen yaitu $1,679 \times 10^{-5}$ M.

aktivitas antioksidan klorofil *a*. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa dengan penyinaran selama 60 menit, aktivitas antioksidan klorofil *a* mengalami peningkatan sebesar 16,49 % (Gambar 6).

Kenaikan aktivitas antioksidan klorofil *a* akibat fotodegradasi mengindikasikan terbentuknya senyawa turunan klorofil *a* yang memiliki serapan di luar 350-800 nm. Senyawa turunan ini memiliki efektifitas yang lebih tinggi untuk menangkap radikal bebas stabil 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (α, α -difenil- β -pikrilhidrazil) serta memiliki kemampuan sebagai donor hidrogen yang lebih baik bila dibandingkan dengan klorofil *a*. Untuk mengetahui lebih lanjut senyawa turunan klorofil *a* tersebut diperlukan analisa struktur.

KESIMPULAN

Kandungan klorofil *a* pada sampel kapsul Spirulina lebih kecil bila dibandingkan dengan yang segar. Klorofil *a* memiliki stabilitas lebih tinggi dibandingkan ekstrak kasar setelah mengalami iradiasi selama 60 menit. Meskipun mengalami fotodegradasi, struktur klorofil *a* memiliki kemampuan pemulihan struktur setelah diinkubasi dalam gelap. Aktivitas antioksidan klorofil *a* mengalami peningkatan sebesar 16,49 % meski mengalami iradiasi selama 60 menit. Bila dibandingkan dengan senyawa induknya, senyawa turunan klorofil *a* yang terbentuk akibat fotodegradasi memiliki kemampuan menghambat radikal bebas DPPH yang lebih tinggi dan lebih efektif sebagai donor hidrogen.

UCAPAN TERIMA KASIH

Sebagian dari dana penelitian diperoleh Leenawaty Limantara atas dukungan Alexander van Humboldt, Jerman dan TWAS, Italia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jensen, S. and Knutsen, G., 1993, *J. Appl. Phycology*, 5, 495-504.

- Kozlenko, R. and Henson, R. H., 1998, *Healthy & Nat. J.*, 3, 5.
- Manoj, G., Venkataraman, L. V. dan Srinivas, L., 1992, *In : Seshadri and Bai. Spirulina. MCRC*, 48-154.
- Miranda, M. S., Cintra, R. G., Barros, S. M. and Mancini-Filho, J., 1998, *Braz. J. Med. Biol. Res*, 31, 1057-1079.
- Moore, A., 2001, *EMBO Reports, European Molecular Biology Organization*. 21, no. 61.
- Torres-Duran, P. V., Miranda-Zamora, R., Paredes-Carbajal, M. C., Mascher, D., Castillo, B., Diaz-Zagoya, J. C. and Juarez-Oropeza, M. A., 1999, *J. Ethnopharmac.*, 64, 141-147.
- Zhi-gang, Z., Zhi-li, L., and Xue-xian, L., 1997, *Acta. Botanica Sinica*, 39, 77-81.
- Brotosudarmo, T. H. P. dan Limantara, L., 2002, <http://www.kompas.com/kompas-cetak/0210/29/iptek/klor30.htm>
- Buratti, S., Pallegriani, N., Brenna, O. V. and Mannino, S., 2001, *J. Agric. Food Chem*, 49, 5136-5141.
- Limantara, L., 2004, *Prosiding Seminar Nasional Aplikasi Sains dan Matematika dalam Industri*, hal. 153-168.UKSW.
- Okai, Y. and Higashi-Okai, K., 2001, *J. Food Sci.*, 81(15), 1443-1446.
- Nakamura, Y., Murakami, A., Koshimizu, K. dan Oshigashi, H., 1996, *Canc. Letters*, 108, 247-255.
- Lanfer-Marquez, U. M., Barros, R. M. C. and Sinnecker, P., 2005, *J. Food Res. Int.*, 38, 885-891.
- Gross, J., 1991, *Pigment in Vegetables, Chlorophyll and Carotenoids*, Van Nostrand Reinhold, New York
- Porra, R. J., 1991, *Recent Advances and Re-assessment in Chlorophyll Extraction and Assay Procedures for Terrestrial, Aquatic, and Marine Organism, Including Recalcitrant Algae*, CRC Press, London.
- Rowan, K. S., 1989, *Photosynthetic Pigments of Algae*, Cambridge University Press, Cambridge.

17. Wang, B., Yu, Z. R. and Hwang, L. S., 1995, *J. Chinese Agricul. Chem. Soc.*, 33(5), 550-560.
18. Limantara, L., Koehler, P., Wilhelm, B., Porra, R.J. and Sheer, H., 2006, *Photochem. Photobiol*, 82, 770-780.
19. Lee, J. H., Park, J. H., and Choi, J. S., 1996, *in* : Amin, I., Norazaidah, Y., dan Hainida, K. I. E., 2006, *Journal Food Chem.*, 94, 47-52.
20. Kabinawa, I. N. K., 2006, *Spirulina Ganggang Penggempur Aneka Penyakit*, PT. AgroMedia Pustaka, Jakarta,.
21. Craig, I. W. and Carr, G., 1968, *Biochem. J*, 106, 361.
22. El-Baky, H. H. A., 2003, *J. Med. Sci.*, 3(4), 314-324.
23. Anonim, 1997, *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, Second edition.
24. Endo, Y., Usuki, R., and Kaneda, T., 1984, *Agricultural Biol.Chem*, 48 (4), 985-989.
25. Merzlyak, M. N., Pogosyan, S. I., Lekhimena, L., Zhigalova, T. V., Khozina, I. F., Cohen, Z., and Khruschev, S. S., 1996, *Russian J. Plant Physiology*, 43, 2, 160-168.
26. Fiedor, J., Fiedor, L., Kammhuber, N., Scherz, A., and Scheer, H., 2002, *Photochem. Photobiol.*, 76 (2), 145-152.
27. Douglas, B. M., 2002, *Colour in Food*, CRC Press, Cambridge.
28. Matile, P., Hörtensteiner, S., and Thomas, H., 1999, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 67-95.
29. Feruzzi, M. G. and Blakeslee, J., 2007, *Nutrition Res.*, 27, 1-12.