

Quantification methods of pigments and its potential as biomarkers for estimation of phytoplankton biomass

Qadar Hasani^{1*}

¹Program Studi Sumberdaya Akuatik, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Bandar Lampung. Indonesia.

Article History

Received : December 02th, 2022

Revised : December 28th, 2022

Accepted : January 07th, 2023

*Corresponding Author:

Qadar Hasani,

Universitas Lampung, Bandar Lampung, Indonesia;

email: masqod@fp.unila.ac.id

Abstract: Pigments and chlorophyll are essential for the process of photosynthesis and are characteristic of each species of phytoplankton. This study aims to provide an overview of the pigment quantification method and its potential to identify and estimate biomass of phytoplankton. A literature review has been carried out to identify methods for the extraction and quantification of phytoplankton. The results of the study found that there are at least two main methods most commonly used for the extraction and quantification of phytoplankton, namely spectrophotometric analysis and HPLC. Spectrophotometric is considered a good and practical method for estimating chlorophyll. However the HPLC has also become the main method for investigating the taxonomic composition of phytoplankton populations. The researchers concluded that there was no significant difference in results between two methods. Spectrophotometric analysis is much cheaper and faster than HPLC, make it a good tool for routine evaluation of chlorophyll. However, the use of HPLC has been proven to be the most appropriate for determining concentration of various pigments in the community of phytoplankton. Regardless of the various advantages and disadvantages of both methods, a good understanding of each method should be a concern in terms of selecting the method to be used according to its designation.

Keywords: Biomass, chlorophyll, pigments, phytoplankton, taxonomic

Pendahuluan

Fitoplankton adalah dasar dari rantai makanan (Moruuf *et al.*, 2016; Kostryukova *et al.*, 2018) dan produsen utama di perairan (Zhou *et al.*, 2016; Sunardi *et al.*, 2017; Kostryukova *et al.*, 2018) Fitoplankton memiliki nilai ekologis yang besar karena merupakan produsen utama di lingkungan perairan (Ekpenyong, 2000). Kemampuan fitoplankton menghasilkan senyawa organik/karbohidrat (Islam *et al.*, 2020), dan menyediakan oksigen di perairan (Wu *et al.*, 2014) karena fitoplankton mengandung pigmen klorofil sehingga mampu melakukan fotosintesis (Dimowo, 2013; Moruuf *et al.*, 2016). Klorofil berfungsi sebagai katalisator dan menyerap energi cahaya (energi kinetik) untuk proses fotosintesis (Riyono, 2007).

Pigmen adalah zat warna pada tumbuhan yang terdapat dalam chloroplast atau

chromoplast (Riyono, 2007). Pigmen yang terdapat dalam chloroplast, terutama klorofil berperan sangat penting pada proses fotosintesis (Riyono, 2007; Couple *et al.*, 2015; Flander-Putrle *et al.*, 2021). Pigmen yang terkandung pada fitoplankton adalah penciri yang khas dari masing-masing spesies (Riyono, 2007). Evaluasinya sangat penting sebagai ukuran tidak langsung pertumbuhan sel, dan parameter untuk menduga tingkat trofik suatu perairan (Henriques *et al.*, 2007). Pigmen fotosintesis telah terbukti bermanfaat bagi biomarker kelimpahan, komposisi dan status fisiologis biomassa fitoplankton di lingkungan laut. Berdasarkan data pigmen, Couple *et al.* (2015) telah mengidentifikasi komposisi fitoplankton di Laut Beaufort, Samudra Arktik. Penggunaan data pigmen untuk memetakan populasi mikroalga di perairan alami telah menjadi cara yang mapan dan nyaman untuk mempelajari fitoplankton

(Sanz *et al.*, 2015). Flander-Putrlle, (2009), telah menggunakan pigmen untuk menentukan struktur komunitas fitoplankton di tiga lingkungan laut yang berbeda. Analisis pigmen adalah kandidat yang baik sebagai penanda utama (biomarker) komunitas fitoplankton di perairan (Couple *et al.*, 2015; Flander-Putrlle *et al.*, 2021).

Telaah tentang metode ekstraksi dan kuantifikasi serta penggunaan pigmen sebagai biomarker pendugaan fitoplankton, belum banyak dibahas di Indonesia. Oleh karena itu, artikel ini berupaya menelaah metode kuantifikasi pigmen dan potensinya sebagai biomarker pada pendugaan spesies fitoplankton.

Bahan dan Metode

Artikel ini adalah telaah pustaka (*literature review*) tentang pigmen sebagai biomarker pada pendugaan biomassa fitoplankton yang merupakan pokok bahasan utama pada artikel ini. Namun demikian, karena pendugaan biomassa fitoplankton dengan menggunakan pigmen sebagai biomarker tidak dapat dilakukan tanpa terlebih dahulu dilakukan ekstraksi dan kuantifikasi pigmen, maka artikel ini terlebih dahulu membahas tentang metode ekstraksi dan kuantifikasi pigmen pada fitoplankton.

Bahan utama telaah tentang metode ekstraksi dan kuantifikasi pigmen pada fitoplankton terutama diperoleh dari Buchaca *et al.* (2005); Sanz *et al.* (2015); Couple *et al.* (2015); dan Flander-Putrlle *et al.* (2021). Materi tentang metode spektrofotometri untuk pendugaan pigmen pada fitoplankton terutama bersumber dari Henriques *et al.* (2007); dan Gitelson *et al.* (2000). Sedangkan bahan bacaan tentang metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC) terutama bersumber dari Flander-Putrlle, (2009), Couple *et al.* (2015); dan Flander-Putrlle *et al.* (2021).

Pembahasan tentang pigmen sebagai biomarker pada pendugaan biomassa fitoplankton yang meliputi: data tentang beberapa pigmen yang dapat digunakan sebagai biomarker, kelompok fitoplankton yang dijadikan penanda, dan algoritma untuk pigmen yang berpartisipasi pada klorofil-a dan biomassa kelompok fitoplankton yang dominan, diperoleh dari sumber Anderson *et al.* (2000) dan Flander-

Putrlle (2009). Data atau informasi tersebut selanjutnya dibahas dengan telaah dari sumber-sumber lain seperti Jeffrey *et al.* (1999); dan Rodriguez *et al.* (2002).

Hasil dan Pembahasan

Telaah tentang metode ekstraksi dan kuantifikasi pigmen pada fitoplankton

Biomassa fitoplankton dapat diartikan sebagai jumlah organ tubuh atau individu, atau sel per satuan volume. Tetapi karena populasi plankton sangat bervariasi terkait distribusi dan ukurannya, jumlah sampel saja tidak memberikan gambaran yang memadai tentang dinamika populasi atau keragaman dan struktur sebuah ekosistem perairan (APHA 2017). Penggunaan pigmen fotosintesis sebagai prediktor biomassa fitoplankton diketahui secara luas dan terutama karena pigmen khusus yang dikandungnya dan penentuannya sangat sederhana dan mudah dilakukan (Couple *et al.*, 2015; Flander-Putrlle *et al.*, 2021). Semua pigmen, klorofil-a adalah ukuran yang paling banyak digunakan dari biomassa fitoplankton karena mengandung kira-kira 1-2% berat kering alga fitoplanktonik dan merupakan indikator yang disukai untuk perkiraan biomassa alga (APHA, 2017).

Alasan yang paling penting untuk memilih klorofil a dalam penentuan biomassa fitoplankton adalah bahwa pigmen fotosintesis utama pada semua organisme fotosintesis yang berkembang dengan oksigen sementara pigmen alga lainnya (klorofil b dan c, karotenoid dan phycobillins) memiliki distribusi dan distribusi yang terbatas (Buchaca *et al.*, 2005). Oleh karena itu, dianggap sebagai pigmen tambahan atau pigmen sekunder. Keanekaragaman pigmen dapat dihitung sesuai dengan cara pigmen tumbuhan didistribusikan di antara spesies molekuler yang berbeda. Diasumsikan bahwa rasio pigmen sederhana D430/D665 (atau rasio Indeks Margalef) memberikan perkiraan kasar keragaman tersebut.

Pengukuran langsung kadar karbon fitoplankton biasanya tidak mungkin dilakukan pada sampel alami (Buchaca *et al.*, 2005). Oleh karena itu, biomassa fitoplankton diperkirakan menggunakan pengganti lainnya. Perhitungan dan penilaian volume sel secara mikroskopik dan pengukuran konsentrasi klorofil a (Chl a)

adalah metode yang paling umum digunakan. Namun, kedua metode tersebut memiliki keuntungan dan keterbatasan teknis. Metode mikroskopis memberikan informasi rinci tentang komposisi dan keragaman kumpulan fitoplankton. Namun, pengukuran volume spesies sangat sulit, dan sangat bergantung pada keterampilan taksonomi para peneliti dan penggunaan sampel yang diawetkan. Fiksasi dapat mengubah volume sel tergantung pada spesies dan sifat dan konsentrasi fiksatif yang digunakan. Selanjutnya, ketidakpastiannya sangat tinggi terhadap organisme kecil (<5 mm).

Perkembangan teknik seperti mikroskop epifluoresensi (Daley & Hobbie, 1975), mikroskop elektron, analisis kromatografi pigmen (Abaychi & Riley, 1979), metode flow cytometry (Olson *et al.*, 1985) dan teknik imunofluoresensi (Buchaca *et al.*, 2005), telah memperbaiki secara substansial fraksi plankton terkecil, walaupun analisis terhadap Tingkat spesies masih jauh sulit dicapai untuk picoplankton. Analisis pigmen yang menggunakan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) selanjutnya mulai dikembangkan oleh para peneliti untuk memfasilitasi pemisahan, identifikasi dan kuantifikasi karotenoid spesifik atau pigmen penanda (*pigment marker*) (Sanz *et al.*, 2015; Couple *et al.*, 2015; Flander-Putrlle *et al.*, 2021). Klasifikasi kemitaksan komunitas fitoplankton dari analisis pigmen marker memungkinkan perhitungan kelimpahan relatif terhadap taksa yang berbeda (Jeffrey *et al.*, 1997).

Metode spektrofotometri

Beberapa metode dapat ditemukan pada berbagai literatur yang mengulas tentang ekstraksi dan kuantifikasi fitoplankton, sebagian besar menggunakan analisis spektrofotometri, yang dianggap alat yang baik dan praktis untuk evaluasi/pendugaan klorofil. Langkah umum untuk semua tahapan, berdasarkan spektrofotometri, adalah yang berikut: 1) pemisahan sel mikroalga dari supernatan; 2) ekstraksi pigmen dengan pelarut organik dan; 3) penentuan spektrofotometri konsentrasi klorofil dalam ekstrak (Gitelson *et al.*, 2000).

Beberapa faktor yang perlu diperhatikan untuk memaksimalkan hasil ekstraksi pigmen,

antara lain adalah: i) pelarut yang akan digunakan, ii) teknik gangguan dinding sel, iii) waktu ekstraksi dan iv) penggunaan korelasi empiris yang berbeda. Mikroalga laut *Nannochloropsis gaditana* adalah bahan biologis yang digunakan untuk penelitian ini karena klorofil adalah pigmen paling melimpah dalam strain ini. Metanol terbukti menjadi pelarut yang paling sesuai untuk mengekstrak klorofil dari strain ini, setelah 24 jam ekstraksi. Selanjutnya kemampuan lisis pelarut dan penggunaan teknik gangguan dinding sel tambahan mendukung hasil ekstraksi. Teknik pembekuan/unfreezing dengan cairan N₂ ternyata lebih efisien daripada penggunaan ultrasound selama 15 menit. Untuk mengekstrak lebih banyak pigmen polar, seperti karotenoid, pelarut hidrofilik seperti metanol memainkan peran utama dalam ekstraksi, yang tidak begitu dipengaruhi oleh penggunaan metode gangguan fisik atau mekanis (Henriques *et al.*, 2007).

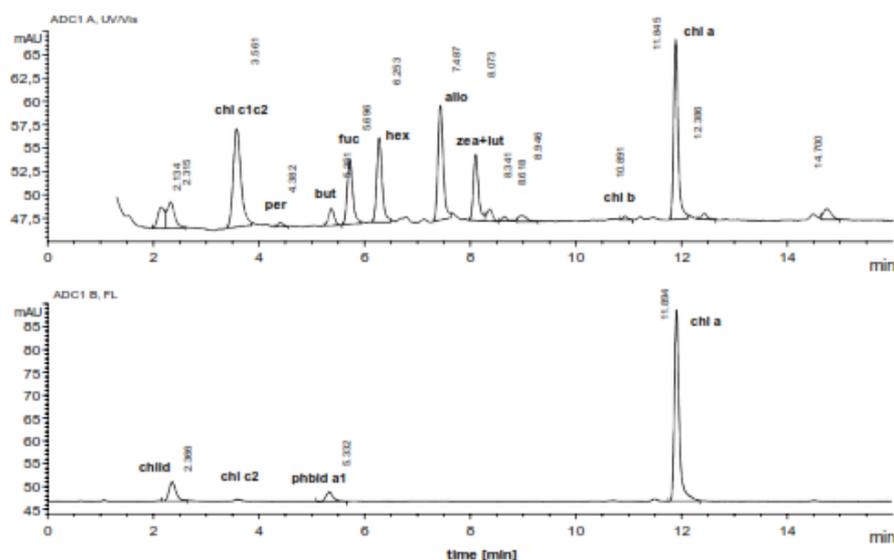
Metode untuk evaluasi klorofil sebagian besar ditemukan dalam literatur dikembangkan untuk mengevaluasi tingkat trofik perairan. Klorofil a biasanya merupakan parameter yang digunakan sebagai indikator trofik, terutama karena hubungan antara kandungan pigmen ini dan jumlah biomassa alga cukup langsung. Biomassa alga sangat terkait dengan bukti eutrofikasi yang terlihat, biasanya berdasarkan fenomena ini. Kuantifikasi klorofil a lebih mudah daripada biomassa alga itu sendiri (Gitelson *et al.*, 2000). dan dapat digunakan sebagai metoda kuantifikasi kuantitatif secara tidak langsung. Kelemahan evaluasi ini adalah variabilitas kandungan klorofil pada masing-masing spesies (dari 0,1 sampai 9,7% berat kering sel), serta pemilihan metode kuantifikasi yang sesuai, dengan mempertimbangkan perbedaan daya tahan dinding sel. Sebenarnya, sumber bahan biologis menentukan pemilihan metode terbaik.

Penelitian yang dilakukan Henriques *et al.*, (2007), telah mengamati dua metode ekstraksi yang berbeda untuk kuantifikasi klorofil a, dengan menggunakan etanol dan menggunakan etanol dingin. Perbedaan yang diamati pada hasil ekstraksi dapat menjelaskan komposisi fitoplankton, sesuai dengan jenis/strain alga yang dominan. Metode ekstraksi

etanol memberikan hasil yang lebih baik terhadap Chlorophyceae dan Dinophyceae sebagai strain yang dominan, sedangkan metode ekstraksi metanol terbukti memberikan hasil yang baik untuk jenis lainnya seperti Bacillariophyceae. Ini berarti bahwa potensi pelarut ekstraktif bergantung pada hidrasi dan permeabilitas dinding sel mikroalga. Terlepas dari pengaruh kekuatan dinding sel dalam evaluasi klorofil, modifikasi pigmen selama proses ekstraksi serta pengaruh pigmen selain klorofil, dapat mempersulit penentuannya dan dapat menyebabkan kesalahan dalam estimasi.

Pemilihan pelarut untuk mempromosikan ekstraksi merupakan isu yang sangat penting karena menentukan tingkat afinitas terhadap

komposisi kimia dari zat yang akan diekstraksi. Terlepas dari kemampuan disolusi terhadap senyawa yang akan diekstraksi dan dihitung, pelarut juga memainkan peran penting dalam lisis sel. Pelarut yang lebih agresif dapat meningkatkan hasil ekstraksi dalam sel dengan dinding yang kuat. Metanol adalah pelarut pertama yang digunakan untuk mengekstrak klorofil, namun karena toksisitasnya telah diganti dengan yang lain. Sampai tahun 1995 evaluasi kandungan klorofil dilakukan dengan menggunakan metode ekstraksi dengan aseton. Sejak itu, penggunaan etanol sebagai pelarut ekstraksi mulai disarankan Henriques *et al.*, (2007).



Gambar 1. Kromatogram dari pigmen klorofil dan karotenoid dengan menggunakan UV/Vis detector (*gambar atas*), dan degradasi produk klorofil dengan menggunakan spectrofluorimetric detector (*gambar bawah*). Dari nilai puncak tunggal kita dapat menentukan kualitas (posisi puncak) dan kuantitas (area puncak) dari pigmen fitoplankton (Gitelson *et al.*, 2000)

Metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Beberapa metode pengukuran kadar karbon dan biomassa yang telah dikembangkan sebelumnya memiliki berbagai kelemahan. Perhitungan dan penilaian volume sel dengan mikroskop dan pengukuran konsentrasi klorofil a (Chl a) adalah metode yang paling umum digunakan (Buchaca *et al.*, 2005). Namun, kedua metode tersebut memiliki keuntungan dan keterbatasan teknis. Metode mikroskopis memberikan informasi rinci tentang komposisi

dan keragaman kumpulan fitoplankton. Namun, pengukuran volume spesies sangat sulit, dan sangat bergantung pada keterampilan taksonomi para peneliti dan penggunaan sampel yang diawetkan. Fiksasi dapat mengubah volume sel tergantung pada spesies dan sifat dan konsentrasi fiksatif yang digunakan. Selanjutnya, ketidakpastiannya sangat tinggi terhadap organisme kecil (<5 mm).

Perkembangan teknik seperti mikroskop epifluoresensi, mikroskop elektron (analisis kromatografi pigmen dan teknik

imunofluoresensi telah memperbaiki secara substansial fraksi plankton terkecil. Namun analisis terhadap tingkat spesies masih jauh sulit dicapai untuk kelompok picoplankton. Mengatasi hal para peneliti telah mengembangkan metode analisis pigmen yang menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Hal ini bertujuan untuk memfasilitasi pemisahan, identifikasi dan kuantifikasi karotenoid spesifik bahkan dapat digunakan sebagai pigmen penanda (*pigment marker*) bagi fitoplankton yang diamati (Buchaca *et al.*, 2005). Selanjutnya klasifikasi kemotaksan terhadap komunitas fitoplankton dari analisis pigmen marker memungkinkan perhitungan kelimpahan relatif terhadap taksa yang berbeda (Jeffrey *et al.*, 1997). Menggunakan analisis pigmen HPLC, Flander-Putrlle, (2009), telah menentukan struktur komunitas fitoplankton di tiga lingkungan laut yang berbeda. Penggunaan HPLC untuk analisis pigmen adalah kandidat yang baik sebagai penanda utama (biomarker) komunitas fitoplankton di perairan (Couple *et al.*, 2015; Flander-Putrlle *et al.*, 2021).

Penggunaan HPLC dibandingkan dengan teknik lain, telah terbukti paling tepat untuk menentukan konsentrasi berbagai pigmen pada komunitas fitoplankton. Pengukuran klorofil beberapa metode yang berbeda digunakan. Paling populer dalam studi fitoplankton adalah metode fluorometrik, namun metode spektrofotometri juga digunakan. Analisis pigmen HPLC, bersama dengan rasio karakteristik (K) antara konsentrasi klorofil dan konsentrasi pigmen biomarker, memungkinkan peneliti untuk memperkirakan kontribusi relatif dari kelompok fitoplankton yang berbeda terhadap total biomassa (total klorofil a). Analisis pigmen HPLC memberikan data kuantitatif tentang 50 pigmen dari semua kelas alga, termasuk jenis sel picoplankton dan rapuh yang mungkin sulit diidentifikasi dan dihitung dengan mikroskopi atau flow cytometry.

Penggunaan metode HPLC dalam kuantifikasi pigmen pada fitoplankton, Flander-Putrlle (2009) telah menggunakan Program komputer CHEMTAX yang memungkinkan peneliti untuk membagi pigmen di antara berbagai kelas alga (Couple *et al.*, 2015; Flander-Putrlle *et al.*, 2021). Pigmen fotosintesis telah terbukti bermanfaat sebagai biomarker kelimpahan, komposisi dan status fisiologis

biomassa fitoplankton di lingkungan laut, walaupun tidak dapat dianggap sebagai penanda diagnostik spesifik dari kelompok fitoplankton masing-masing filogenetik. Oleh karena itu, penggunaan harus dilakukan dengan hati-hati (Jeffrey *et al.*, 1997). Beberapa penelitian telah menunjukkan kesepakatan yang baik antara penilaian chemotoksik fitoplankton dan mikroskop konvensional (Gieskes & Kraay 1986). Perbandingan seperti yang dilakukan di Teluk Trieste mengkonfirmasi pendekatan biomarker sebagai alat yang sangat menjanjikan untuk menyelidiki fitoplankton di daerah tersebut.

Penggunaan metode HPLC masih juga memiliki kekurangan. Salah satu kekurangan metode HPLC, dan semua metode lain untuk penentuan pigmen fitoplankton, adalah variabilitas konsentrasi pigmen dalam sel. Biasanya bervariasi dengan kualitas dan intensitas cahaya yang berbeda, ketersediaan nutrisi dan status fisiologis sel. Tidak semua pigmen biomarker sepenuhnya spesifik untuk kelompok fitoplankton tertentu. Namun, tidak semua spesies kelompok fitoplankton tertentu mengandung pigmen aksesori yang sama. Kekurangan HPLC lainnya sebagai metode untuk penentuan komunitas fitoplankton dibandingkan dengan penggunaan mikroskopi adalah organisme fitoplankton tidak dapat ditentukan ke tingkat spesies. Beberapa spesies dan kelompok fitoplankton terlalu kecil untuk diamati oleh mikroskop, namun karena mengandung pigmen biomarker, mereka dapat dideteksi dengan HPLC. Oleh karena itu kombinasi metode, analisis pigmen HPLC dan mikroskopi, untuk penentuan struktur fitoplankton secara lengkap dalam ekosistem laut, direkomendasikan (Buchaca *et al.*, 2005).

Pigmen sebagai biomarker pada pendugaan biomassa fitoplankton

Penggunaan analisis pigmen HPLC telah menjadi alat utama untuk menyelidiki komposisi taksonomi populasi alami fitoplankton. Hasil penelitian Andersen *et al.*, (1996) telah membandingkan, untuk pertama kalinya, komposisi taksonomi berdasarkan penanda (*signature*) pigmen HPLC dengan identifikasi taksonomi mikroskopik elektron langsung dari dua kumpulan sampel lapangan oligotrofik laut terbuka. Observasi mikroskopis elektron di

lokasi di Samudera Atlantik dan Pasifik (Hydroslalion Sand Station ALOHA) setuju dengan partisi taksonomi berdasarkan algoritma HPLC pada sampel kolom air bagian atas, namun terjadi ketidaksepakatan yang meningkat antara kedua metode tersebut pada sampel air pada bagian yang lebih dalam. Disparitas ini mungkin berasal dari perubahan yang bergantung pada kedalaman pada kandungan pigmen esensial dan rasio pigmen-terhadap-klorofil tambahan. Kedua lokasi, ultra plankton eukariotik mirip dengan komposisi taksonomi, setidaknya di tingkat kelas, dan Prymnesiophyceae dan Pelagophyceae yang baru dijelaskan adalah dua kelompok paling melimpah.

Penelitian tentang menggunakan metode HPLC untuk analisis pigmen pada fitoplankton untuk melihat potensinya sebagai pigmen penanda (biomarker pigmen) pada komunitas fitoplankton dan/atau fitobenthos telah banyak dilakukan. Penelitian yang dilakukan Bianchi *et al.*, (1997) berkaitan dengan potensi penggunaan biomarker terhadap pigmen klorofil dan karotenoid yang Dominan di laut Baltik. Selanjutnya, Bucaca *et al.*, (2005) membandingkan hasil analisis pigmen menggunakan metode HPLC dan estimasi biofolume pada fitoplankton di danau oligotropik. Kemudian, Couple *et al.*, (2015) yang meneliti tentang pigmen penanda (*pigment signature*) pada komunitas fitoplankton di laut Beaufort. Selan itu, Flander-Putrlle (2009) memberikan gambaran tentang kondisi ekologi laut dengan pendugaan populasi fitoplankton menggunakan metode HPLC. Hasil penelitian Andersen *et al.* (1996) juga yang membandingkan komunitas fitoplankton dengan menggunakan pigmen signature dengan membandingkan antara metode HPLC dan observasi menggunakan mikroskop electron pada danau oligotropik. Sementara itu, Rodrigueza *et al.*, (2002) yang menduga komunitas fitoplankton dengan metode HPLC dengan analisis perangkat lunak CHEMTAX. Kemudian, Zapatal *et al.*, (2000) menggunakan metode HPLC untuk memisahkan pigmen klorofil dan karotenoid pada berbagai fitoplankton laut.

Berbagai penelitian yang telah dijelaskan di atas, para peneliti telah memberikan kesimpulan bahwa metode HPLC dapat digunakan untuk memisahkan pigmen yang

diketahui secara kuantitatif, sehingga memberikan tanda pigmen untuk setiap sampel (Wright *et al.*, 1991). Kelompok alga tertentu, kelas taksonomi yang paling umum, dicirikan oleh pigmen fotosintesis yang spesifik. Sebagai contoh, anggota Class Prymnesiophyceae menghasilkan klorofil a, klorofil c1 + cz atau c2 +c3, dan banyak karotenoid termasuk [3-karoten, diatokantin, diadinoksanthin, fucoxanthin, 19'-hexanoyloxyfucoxanthin. Dengan algoritma, seseorang dapat memfraksinasi pigmen pigmen HPLC dan menetapkan proporsi relatif terhadap taksa tertentu. Pelabelan radio (¹⁴C) pigmen khusus takson dapat digunakan untuk menentukan tingkat pertumbuhan berbagai kelas alga (Gieskes dan Kraay, 1989). Penggunaan gabungan dari teknik ini memungkinkan seseorang untuk memperkirakan biomassa klorofil dan pertumbuhan kelompok taksonomi individual. Misalnya, penemuan baru-baru ini Prochlorococcus, dengan pigmen divinil klorofil yang unik (Chisholm *et al.*, 1992), telah memungkinkan penyidik untuk menilai kontribusinya terhadap biomassa fitoplankton dan produktivitas primer di perairan samudra (Goericke & Welschmeyer, 1993).

Bila diterapkan pada percobaan pengenceran, analisis pigmen HPLC dapat memberikan tingkat pertumbuhan taklimat spesifik dan tingkat pengembalaan fitoplankton (Flander-Putrlle, 2009). Interpretasi data Hasil dari teknik ini mengharuskan seseorang untuk berasumsi bahwa pigmen yang ditemukan pada mono-specific culture yang mewakili kelas alga utama sama dengan yang ditemukan di berbagai kelas alga dari populasi fitoplankton alami. Pendekatan penanda pigmen untuk memperkirakan biomassa kelompok fitoplanktonik spesifik didasarkan pada analisis pigmen rinci dari spesies terpilih yang ditemukan. Pendekatan ini mengasumsikan bahwa: (i) spesies kelompok taksonomi yang tumbuh di daerah sampel menghasilkan pigmen yang sama dalam rasio kira-kira seperti pada budaya, dan (ii) kelompok alga yang tidak dikenal dalam sampel mewakili bagian yang tidak signifikan. Asumsi ini tidak dapat divalidasi secara internal (menggunakan HPLC), dan dapat diuji hanya sebagian dengan mikroskop cahaya atau flow cytometry karena beberapa karakter taksonomi bergantung pada pengamatan mikroskopis elektron.

Tabel 1. Berbagai pigmen yang dapat digunakan sebagai biomarker pendugaan kelompok fitoplankton beserta konstantanya (K) (Flander-Putrlle, 2009).

Kelompok Fitoplankton	Pigmen Biomarker	K
Diatom	Fucoxanthin	1,2 ^a
Prymnesiophyta	19'-hexanoyloxyfucoxanthin	1,1 ^a
Dinoflagellata	peridinin	1,5 ^a
Cyanophyta	Zeaxanthin + lutein	1,7 ^b
Silicoflagellata	19'-butanoyloxyfucoxanthin	1,6 ^c
Cryptophyta	alloxanthin	1,85 ^d
Alga hijau	Klorofil b	0,9 ^a

Tabel 2. Hubungan antara Chemotaksonomik beberapa pigmen yang terdeteksi sebagai biomarker (Flander Putrlle, 2009)

Pigmen	Organisme
19'-hexanoyloxyfucoxanthin	Prymnesiophyta, Chrysophyta
19'-butanoyloxyfucoxanthin	Chrysophyta, Prymnesiophyta
Fucoxanthin	Diatom, Prymnesiophyta, Chrysophyta
Peridinin	Dinoflagellata
Zeaxanthin	Cyanobacteria
Lutein, chlorophyll b	Alga hijau

Distribusi dan komposisi kumpulan fitoplankton dipelajari di Selat Gerlache (Semenanjung Antartika) selama pengambilan contoh menggunakan kapal FRUELA 95 (Desember 1995) dan FRUELA 96 (Januari 1996), dengan menggunakan metode mikroskop cahaya dan analisis pigmen HPLC (Rodrigueza *et al.*, 2002). Berdasarkan ukuran dan komposisi fitoplankton, pada bagian barat daya Selat Gerlache, pola peningkatan pigmen Chl a, Chl b, dan Chl c, dan fucoxanthin sebagai karotenoid utama menandai terjadinya peningkatan populasi/booming *Pyramimonas*. Dan peningkatan meningkat dari Chl b, violaxanthin, dan dua karotenoid yang tidak diketahui (yang disebut-sebut sebagai loroxanthin dan loroxanthin-ester) diamati yang sejajar dengan distribusi *Pyramimonas*. Lutein pigmen marker, biasanya dikaitkan dengan klorofit dan prasinoxanthin-kekurangan prasinophyceans, hanya terdeteksi pada konsentrasi sangat rendah.

Pendugaan pigmen menggunakan metode HPLC juga dapat digunakan sebagai biomarker pada tumbuhan makroalga. Hal ini pernah diuji cobakan oleh Bianchi *et al.*, (1997) menemukan fakta bahwa Pigmen tanaman yang diekstraksi dari sebelas makroalga berbeda dari menggunakan HPLC. Rasio pigmen berbeda ditemukan pada alga Phaeophyceae, Chlorophyceae, dan Rhodophyceae dapat

memberikan penanda yang berguna untuk membedakan antara komunitas makroalga dan fitoplankton pada daerah subtidal Laut Baltik. Rasio pigmen Fucoxanthin/klorofil-a (Chl-a) pada Phaeophyceae berkisar antara 0,34 sampai 0,64 dibandingkan dengan nilai yang lebih besar dari 1,00 pada fucoxanthin yang dikandung oleh fitoplankton. Demikian pula, untuk alga Chlorophyceae memiliki rasio Chl-b/a yang berkisar antara 0,20 sampai 0,30 sedangkan yang biasanya ditemukan fitoplankton klorofit adalah 0,9. Meskipun Bianchi *et al.*, (1997) tidak bisa menyelesaikan pendugaan pigmen phycobilin pada Rhodophyceae dominan menggunakan metode HPLC ini, namun Rasio zeaxanthin/Chl-a mungkin terbukti berguna dalam membedakan antara berbagai jenis fitoplankton. Akhirnya, konsentrasi yang lebih tinggi dari photoprotectant pigmen β , β ,-karoten dalam jaringan gamet versus vegetatif Ganggang coklat *Fucus vesiculosus* mungkin menunjukkan bahwa makroalga ini telah mengembangkan mekanisme untuk melindunginya bahan genetik dari radiasi UV saat tumbuh di permukaan. Rasio pigmen makroalga ini mungkin terbukti sangat berguna dalam membedakan antara input makroalgal versus planktonik dengan komunitas bentik di Laut Baltik.

Penggunaan HPLC untuk memperkirakan kontribusi kuantitatif kelompok fitoplankton

yang berbeda terhadap klorofil total (Chl) a, dengan menggunakan pigmen marker, pada beberapa tahun terakhir telah menarik perhatian para peneliti (Andersen *et al.*, 1996). Namun, idealnya, distribusi kelompok mikroalga yang disimpulkan dari pigmen marker harus dikontraskan secara hati-hati dengan pengamatan mikroskopi (*atau flow cytometry*) karena beberapa karotenoid dan klorofil dibagi di antara kelas alga yang berbeda (Jeffrey *et al.*, 1999). Alloxanthin dan Divinyl (DV) Chl adalah pigmen penanda spesifik untuk *Proklorokokogen marinus* dan cryptophytes; Namun, abuntarian diatom dan haptophytes, diperkirakan dari fucoxanthin dan 190-hexanoyloxyfucoxanthin, secara berulang-ulang, mungkin rentan terhadap kesalahan karena lainnya kelas alga

(chrysophytes, dino fl agellates, dll.) berkontribusi pada kolam karotenoid ini.

Komposisi pigmen dan rasio pigmen dipengaruhi oleh faktor. Distribusi pigmen dapat sangat bervariasi antara anggota kelas tunggal (Zapata & Garrido, 1997), dan bahkan antara strain dari satu spesies misalnya *Phaeocystis* (Bidigare *et al.*, 1996; Andersen *et al.*, 1996). Semua pernyataan ini harus diingat saat menafsirkan kelimpahan relatif kelas fitoplankton dari konsentrasi pigmen. Tabel 3 adalah ringkasan tentang distribusi pigmen fotosintetik pada fitoplankton laut berdasarkan kelompok alga utamanya, serta tabel tentang algoritma untuk pigmen yang berpartisipasi pada clorofil-a dan biomasaa kelompok fitoplankton dominan.

Tabel 3. Ringkasan tentang distribusi pigmen fotosintetik pada fitoplankton laut berdasarkan kelompok alga utamanya (Andersen *et al.* 1996)

Kelompok Alga	Pigment utama yg tampak
Prochlorophyta	Divinyl chlorophylls a dan b ; monovinyl chlorophylls b; zeaxanthin, α -carotene; chlorophyll c-like pigment
Cyanobacteria	monovinyl chlorophylls a; zeaxanthin; β -carotene; phycoerythrin, Phycocyanin; allophycocyanin.
Diatom	monovinyl chlorophylls a; chlorophyll c1 dan c2; fucoxanthin+diadinoxanthin ; datoxanthin; β -carotene.
Prymnesiophyta	monovinyl chlorophylls a; chlorophyll c1+c2 or c2+c3; 19'-butanoyloxyfucoxanthin ; fucoxanthin; diadinoxanthin; datoxanthin; β -carotene.
Pelagophyta	monovinyl chlorophylls a; chlorophyll c2+c3; 19'-butanoyloxyfucoxanthin ; datoxanthin; fucoxanthin; diadinoxanthin; β -carotene.
Chrysophyta	monovinyl chlorophylls a; chlorophyll c1 dan c2; fucoxanthin+violaxanthin ; β -carotene.
Chryptophyta	monovinyl chlorophylls a; chlorophyll c2; alloxanthin ; phycoerythrin or Phycocyanin; crocoxanthin; monadoxanthin; α -carotene
Dinoflagellata	monovinyl chlorophylls a; chlorophyll c2; peridinin ; dinoxanthin; diadionoxanthin; diathoxanthin; β -carotene.
Prasinophyta	monovinyl chlorophylls a dan b; prasinoxanthin ; chlorophyll c-like pigment (Mg3,8 DVPa5), zeaxanthin; neoxanthin; violaxanthin; α and β -carotene.
Chlorophyta	monovinyl chlorophylls a dan b; lutein ; neoxanthin; violaxanthin; antheraxanthin; zeaxanthin; α and β -carotene.

Tabel 4. Algoritma untuk pigmen yang berpartisipasi pada clorofil-a dan biomassa kelompok fitoplankton dominan (Andersen *et al.* 1996)

Kelompok Alga	Persamaan
Prochlorophyta	$[Chl\ a]_{pro} = [divinyl\ chlorophyll\ a]$
Prymnesiophyta	$[Chl\ a]_{prym} = 1,3 \times [19'\text{-hex}]_{prym}$
Pelagophyta	$[Chl\ a]_{pel} = 0,9 \times [19'\text{-but}]_{pel}$
Dinoflagellata	$[Chl\ a]_{dino} = 1,5 \times [peridinin]$
Diatom	$[Chl\ a]_{diat} = 0,8 ([fucox] - (0,02[19'\text{-hex}]_{prym} + 0,14 [19'\text{-but}]_{pel}))$
Alga lainnya	$[Chl\ a]_{others} = [Chl\ a]_{total} - [Chl\ a]_{pro} + prym + pel + dino + diat$

Kelompok Alga	Persamaan
	Dimana,
	$[19'\text{hex}]_{\text{prym}} = (P/(P-C)) + ([19'\text{hex}]_{\text{total}} - ([19\text{-but}]_{\text{total}} + C))$
	$[19'\text{-but}]_{\text{pel}} = (P/(P-C)) + ([19'\text{-but}]_{\text{total}} - ([19'\text{hex}]_{\text{total}} + 1/P))$
	$P = [19'\text{-hex}]_{\text{prym}} / [19'\text{but}]_{\text{prym}} = 54,27$
	$C = [19'\text{hex}]_{\text{pel}} / [19'\text{but}]_{\text{pel}} = 0,14$

Metode HPLC untuk memperkirakan kontribusi kuantitatif kelompok fitoplankton yang berbeda terhadap klorofil total (Chl) a, dengan menggunakan pigmen marker (Andersen *et al.*, 1996). Namun, idealnya, distribusi kelompok mikroalga yang disimpulkan dari pigmen marker harus dikontraskan secara hati-hati dengan pengamatan mikroskopi (*atau flow cytometry*) karena beberapa karotenoid dan klorofil dibagi di antara kelas alga yang berbeda (Jeffrey *et al.*, 1999).

Kesimpulan

Studi ini memaparkan dua metode utama ekstaksi dan kuantifikasi yang paling umum digunakan oleh para peneliti untuk mengekstraksi dan mengidentifikasi kandungan pigmen pada komunitas fitoplankton, yaitu analisis spektrofotometri dan HPLC. Jika membandingkan kualitas hasil antara pednugaan kandungan klorofil dengan metode spektrofotometri dan menggunakan metode HPLC. Para peneliti menyimpulkan bahwa evaluasi kandungan klorofil dengan metode spektrofotometri memberikan hasil yang sangat baik, bagitu juga dengan metode HPLC. Selanjutnya, para peneliti juga menyepakati bahwa dengan tidak adanya perbedaan yang signifikan antara kedua metode tersebut, maka analisis spektrofotometri jauh lebih murah dan jauh lebih cepat daripada analisis HPLC, menjadikannya alat yang baik untuk evaluasi rutin klorofil. Namun demikian, dibandingkan dengan teknik lain, penggunaan HPLC telah terbukti paling tepat untuk menentukan konsentrasi berbagai pigmen pada komunitas fitoplankton. Pengukuran klorofil beberapa metode yang berbeda digunakan (yang paling populer dalam studi fitoplankton adalah metode fluorometrik), namun metode spektrofotometri juga digunakan. Analisis pigmen HPLC, bersama dengan rasio karakteristik (K) antara konsentrasi klorofil dan konsentrasi pigmen biomarker, memungkinkan peneliti untuk memperkirakan

kontribusi relatif dari kelompok fitoplankton yang berbeda terhadap total biomassa (total klorofil a). Terlepas dari berbagai kelebihan dan kekurangan berbagai metode tersebut pemahaman yang baik terhadap setiap metode patut menjadi perhatian dalam hal pemilihan metode yang akan digunakan sesuai dengan peruntukannya.

Referensi

- [APHA] American Public Health Association Inc. (2017). Standard method for the examination of water and wastewater. 23th Ed. Washington DC.
- Andersen, Robert, R., Bidigare R.R., Keller M.D., & Latasat, M. A. (1996). Comparison of HPLC Pigmen Signatures and Electron Microscopic Observations for Oligotrophic water of The Nort Atlantic and Pasific Oceans. *Deep-Sea Research II*, 43 (2-3): 517-537. DOI: [https://doi.org/10.1016/0967-0645\(95\)00095-X](https://doi.org/10.1016/0967-0645(95)00095-X)
- Bianchi, T.S., Kautsky, L., & Argyrou, M. (1997). Dominan Chlorophylls and Carotenoid in Macroalgae of The Valtic Sea (Baltic Proper): Their Use as Potential Biomarkers. *Sarsia* (82): 55-62. DOI: <https://doi.org/10.1080/00364827.1997.10413637>
- Buchaca, T., Felip M., & Catalan, J. (2005). A comparison of HPLC pigment analyses and biovolume estimate of phytoplankton groups in an oligotrophic lake. *Journal of Plankton Research*. 27 (1): 91-101. DOI: doi.org/10.1093/plankt/fbh154
- Dimowo, B.O. (2013). The Phytoplankton Species Composition and Abundance of Ogun River, Abeokuta, Southwestern Nigeria. *Int. J. Aquac.*: 3-7. DOI:10.5376/ija.2013.03.0002.
- Ekpenyong, E. (2000). Algal biomass and pigment diversity in typical tropical fish pond. *Tropical Ecology*, 41(1): 89-94.

- Flander-Putrlle, V. (2009). Examples of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) application in marine ecology studies in the northern Adriatic. *Natura Sloveneae*, 12 (1): 5-23.
- Flander-Putrlle, V., Francé, J., & Mozetic, P. (2021). Phytoplankton Pigments Reveal Size Structure and Interannual Variability of the Coastal Phytoplankton Community (Adriatic Sea). *Water*, 14 (23): 1-29. Doi: <https://doi.org/10.3390/w14010023>
- Gitelson, A., Grits, Y., & Etzion, D. (2000). Optimal properties of *Nannochloropsis* sp and application to remote estimation of cell mass. *Biotechnology Bioengineering*, 69 (5): 516 -525. DOI: 10.1002/1097-0290(20000905)69:53.0.CO; 2-I
- Henriques M., Silva, A., & Rocha, J. (2007). Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. A Méndez-Vilas (Ed.):* 586-593.
- Islam A, Basak SS, & Hossain Z. (2020). Fish and plankton biodiversity in the Kishoreganj haor, Kishoreganj, Bangladesh. *Genet. Aquat. Org.*, 4(1): 39–48. Doi: 10.4194/2459-1831-v4_1_04
- Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C. & Wright, S.W. (1997) Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. UNESCO, Paris.
- Jeffrey, S.W., Wright, S.W., & Zapata, M., (1999). Recent advances in HPLC pigment analysis of phytoplankton. *Marine and Freshwater Research*, (50): 879–896. <https://doi.org/10.1071/MF99109>
- Kostryukova. A.M., Krupnova, T.G., Mashkova. I.V., Gavrilkina, S.V., & Egorov. N.O. (2018). Phytoplankton diversity in three lakes of South Ural, Russia. *Biodiversitas*, 19 (4):1459–1467. DOI:10.13057/biodiv/d190436.
- Riyono, S. H. (2007). Beberapa Sifat Umum dari Klorofil Fitoplankton. *Oseana*, 32 (1): 23-31.
- Rodrigueza, F., Varela, M., & Zapata M. (2002). Phytoplankton assemblages in the Gerlache and Bransfield Straits (Antarctic Peninsula) determined by light microscopy and CHEMTAX analysis of HPLC pigment data. *Deep-Sea Research*, 2 (49): 723–747. [https://doi.org/10.1016/S0967-0645\(01\)00121-7](https://doi.org/10.1016/S0967-0645(01)00121-7)
- Sanz, N., Garcia-Blanco, A., Gavalas-Olea, A., Loures, P., & Garrido, J.L. (2015). Phytoplankton pigment biomarkers: HPLC separation using a pentafluorophenyl octadecyl silica column. *Methods in Ecology and Evolution*, 6: 1199–1209. DOI: 10.1111/2041-210X.12406
- Sunardi, S., Febriani, R., Irawan, B., & Saputri, M.S. (2017). The Dynamic of Phytoplankton Community Structure in Face of Warming Climate in A Tropical Man-Made Lake. *Biosaintifika J. Biol. Educ.* 9(1):140. DOI:10.15294/biosaintifika.v9i1.7725
- Wu, N., Schmalz, B., & Fohrer, N. (2014). Distribution of phytoplankton in a German lowland river in relation to environmental factors. *J. Plankton Res.* 33(5): 807 – 820. DOI:10.1093/plankt/fbq139
- Zapatal, M., Rodriguez, F., & Garrido, J.L., (2000). Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine containing mobile phases. *Marine Ecology Progress Series.* (195): 29-45.
- Zhou, W., Gao, J., Liao, J., Shi, R., Li, T., Guo, Y., & Long, A. (2016). Characteristics of phytoplankton biomass, primary production and community structure in the modaomen channel, pearl river estuary, with special reference to the influence of saltwater intrusion during neap and spring tides. *PLoS One*, 11(12). DOI: 10.1371/journal.pone.0167630.