

OPTIMASI EKSTRAKSI PROTOPORPHYRIN-IX DARI KERABANG TELUR PUYUH (*Coturnix Coturnix L.*)

Harry Setiawan¹, Cucun Alep Riyanto¹, Dewi K.A.K.Hastuti¹, dan
Yohanes Martono^{1,*}

¹Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Kristen Satya Wacana
Jl. Diponegoro 52-60, Salatiga 50711, Jawa Tengah, Indonesia

*Email: yohanes.martono@staff.uksw.edu

Diterima: 19 Mei 2017. Disetujui: 13 Januari 2018. Dipublikasikan: 31 Januari 2018

Abstract: The textile industry uses a lot of synthetic dyes because it is easy in staining and cheap, but has a bad impact on the environment. Awareness of the importance of protecting the environment makes textile companies try to re-use natural dyes. The quail eggshell has a protoporphyrin IX that can be used as a dye. The optimum conditions of protoporphyrin IX extraction from quail eggshell need to be studied more in terms of solvent composition, method, and extraction cycle. Quail eggshell was dried and then extracted using methanol 96% and HCl (v/v) (HCl_(concentrated) and HCl 5%, v/v). The extraction process performed for 30 minutes by using two methods, maceration and ultrasonic. Optimization of extraction cycle was carried out for up to 5 cycles. The assay protoporphyrin was done using UV-VIS spectroscopy and determined using the Lambert-Beer equation. The extract was fractionated using a chloroform in the ratio 1: 2 v/v (chloroform: extract). The organic phase was scanned using UV – Vis spectroscopy. Quail eggshell extract contained protoporphyrin. It can be seen from the spectra and has been already matched with spectra protoporphyrin standard. Optimum conditions of protoporphyrin extraction were obtained by using methanol 96% and HCl_(c) 5% (v/v). Extraction was performed using maceration method. Protoporphyrin content in the extract was 1.92×10^{-2} % w/w. Optimum protoporphyrin extraction cycle was achieved at 3 cycles. Protoporphyrin extract was fractionated with chloroform. Fractionation with chloroform caused structural changes into protoporphyrin dimethyl ester and made discoloration of extract solution.

Key words: Extraction, quail eggshell, optimization, protoporphyrin

Abstrak: Industri tekstil banyak menggunakan pewarna sintetik karena mudah dalam pewarnaan dan murah, tetapi memiliki dampak yang buruk bagi lingkungan sekitar. Kesadaran akan pentingnya menjaga lingkungan membuat perusahaan tekstil mencoba kembali menggunakan pewarna alami. Kerabang telur puyuh memiliki protoporphyrin IX yang dapat digunakan sebagai pewarna. Kondisi optimum ekstraksi protoporphyrin IX dari kerabang telur puyuh perlu diteliti lebih lagi ditinjau dari komposisi pelarut, metode, dan siklus ekstraksi. Kerabang telur puyuh dikeringkan kemudian diekstraksi menggunakan pelarut metanol 96% dan HCl (v/v) (HCl_(p) dan HCl 5%, v/v) dengan metode maserasi dan ultrasonik. Siklus ekstraksi dioptimalkan dengan variasi hingga 5 siklus. Penetapan kadar

protoporphyrin dilakukan dengan menggunakan spektroskopi UV-VIS berdasarkan persamaan Lambert-Beer. Ekstrak difraksinasi menggunakan kloroform dengan rasio 1 : 2 v/v (kloroform : ekstrak). Fase organik dipindai dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kerabang telur puyuh mengandung protoporphyrin IX, terlihat dari hasil spektra yang cocok dengan spektra protoporphyrin *standard*. Kondisi ekstraksi protoporphyrin yang optimum didapatkan dengan menggunakan pelarut metanol 96% dan HCl_(p) 5% (v/v) secara maserasi. Siklus ekstraksi protoporphyrin yang optimal adalah 3 siklus dengan kadar protoporphyrin dalam ekstrak adalah $1,92 \times 10^{-2}$ % b/b.

Kata Kunci: Ekstraksi, kerabang telur puyuh, optimasi, protoporphyrin

PENDAHULUAN

Pada masa sekarang, perusahaan tekstil banyak menggunakan pewarna yang berasal dari senyawa sintetik karena mudah dalam pewarnaan serta harga yang murah (Prabhu & Bhute, 2012), tetapi penggunaan senyawa sintetik dalam industri tekstil dapat menyebabkan pencemaran lingkungan sebab senyawa ini tidak dapat terdegradasi di alam (Prabhu *et al.*, 2011). Selain itu, pewarna sintesis juga bersifat karsinogenik dan menyebabkan alergi (Prabhu & Bhute, 2012). Oleh karena itu, perusahaan tekstil mencoba kembali untuk menggunakan zat pewarna alami karena tingginya tingkat kesadaran untuk menciptakan lingkungan yang sehat (Prabhu *et al.*, 2011; Samanta & Agarwal, 2009).

Zat pewarna alami didapatkan dari bahan – bahan alam seperti hasil ekstrak tumbuhan atau hewan (Kwartiningsih, Setyawardhani, Wiyanto, & Triyono,

2009) contohnya adalah pigmen dalam kerabang telur puyuh. Kerabang telur puyuh belum banyak dimanfaatkan padahal memiliki pigmen protoporphyrin IX (Gosler *et al.*, 2006 dalam Gosler, Connor, & Bonser, 2011) yang dapat digunakan sebagai pewarna alami. Protoporphyrin IX merupakan pigmen utama dalam telur yang berwarna coklat (Zhao, Xu, Liu, Li, & Yang, 2006). Kondisi dalam mengekstraksi protoporphyrin IX perlu diperhatikan agar proses ekstraksi dapat dilakukan secara efektif dan efisien.

Pengukuran protoporphyrin IX pada ekstrak kerabang telur puyuh dapat ditentukan dengan pengukuran panjang gelombang maksimal menggunakan spektroskopi UV – Vis (Mukhriani, 2014) dengan menggunakan nilai absorptivitas molar (ϵ) dari protoporphyrin IX dalam HCl 1,5 M (Hunter, Sampson, & Ferreira, 2008) dan distandardisasi dengan cara membandingkan kurva absorbansi

panjang gelombang maksimum dengan kurva *standard* protoporphyrin IX dalam metanol - HCl.

Protoporphyrin IX dapat diekstraksi dari kerabang telur ayam (Dean *et al.*, 2011), kerabang telur puyuh jepang (Duval, Cassey, Miksík, Reynolds, & Spencer, 2013), dan telur – telur dari unggas yang lain (Thomas, Hauber, Hanley, Waterhouse, Fraser, & Gordon, 2015). Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi protoporphyrin IX beragam, seperti HCl 2 M dan asetat (Dean, Miller, & Brückner, 2011), metanol H₂SO₄ 8,5% (Duval *et al.*, 2013), dan methanol H₂SO₄ 5% (Cassey *et al.*, 2012). Protoporphyrin IX dimetil ester dapat diidentifikasi lebih lanjut dengan melakukan fraksinasi menggunakan klorofom. Setelah itu, dipindai dengan spektrofotometer UV – Vis (Grinsten, 1947). Ekstraksi protoporphyrin IX dengan menggunakan ultrasonik banyak dilakukan pada sampel bakteri (Wang *et al.*, 2016), alga (Pasquet *et al.*, 2011), dan sel hewan (Wang, Hannafon, Lind, & Ding, 2015).

Pada penelitian - penelitian tersebut, penelitian mengenai kondisi optimum ekstraksi protoporphyrin IX dari kerabang telur puyuh Indonesia yang ditinjau dari pelarut dan metode yang digunakan belum pernah dilakukan. Berdasarkan latar belakang tersebut,

maka perlu dilakukan penelitian untuk memperoleh ekstrak protoporphyrin IX dari kerabang telur puyuh Indonesia, menstandarisasi ekstrak kerabang telur puyuh berdasarkan kandungan dan spektra protoporphyrin IX, dan menentukan kondisi optimum ekstraksi protoporphyrin IX (metode ekstraksi) dari kerabang telur puyuh.

METODE

Alat dan Bahan

Sampel limbah kerabang telur puyuh diperoleh dari pedagang di Pasar Projo Ambarawa. Bahan yang digunakan diantaranya metanol, HCl, NaCl, dan klorofom. Semua bahan yang digunakan berderajat PA (*pro-analysis*) diperoleh dari E-Merck, German.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya Spektrofotometer (Optizen, 2120), neraca dengan ketelitian 0,01g (Ohaus, TAJ602), neraca analitis dengan ketelitian 0,1 mg (Ohaus, PA214), *moisture analyzer* (Ohaus, MB 25), pH meter (Hanna HI 9812), corong pisah, dan ultrasonikator (Krisbow *Ultrasonic cleaner* DSA50-GL₂-2.5L).

Metoda yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Preparasi Sampel (Kombado, 2014)

Kulit telur puyuh dikeringkan dalam *drying cabinet* selama 24 jam. Setelah kering sampel dihaluskan dan diayak (20 mesh).

Ekstraksi Protoporphyrin IX (Wang et al., 2007)

Lima puluh gram serbuk telur puyuh dimaserasi dalam metanol 96%-HCl 5% (v/v) (HCl_(p) dan HCl 5%). Sampel diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi dan ultrasonik. Maserasi dilakukan secara bertingkat dengan waktu masing-masing selama 30 menit. Perbandingan yang digunakan antara sampel dan pelarut tiap waktu maserasi adalah 1:10 (*b/v*). Setelah proses ekstraksi, ekstrak dipindai dengan spektrofotometer UV-VIS pada kisaran panjang gelombang 200 – 700 nm untuk menentukan panjang gelombang maksimal.

Fraksinasi Protoporphyrin IX (Duval et al., 2013)

Fraksinasi larutan ekstrak dilakukan dengan menambahkan kloroform pada rasio kloroform : fase aqueous = 1:2, v/v. Fase organik diambil dan ditambahkan 10 mL NaCl 10% lalu dikocok dengan kuat, kemudian fase organik dipisahkan. Fase organik dipindai dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada kisaran

panjang gelombang 200 – 700 nm untuk menentukan panjang gelombang maksimal.

Standardisasi ekstrak kerabang telur puyuh berdasarkan kandungan protoporphyrin IX dilakukan dengan pemindaian ekstrak kerabang telur puyuh pada kisaran panjang gelombang 200–700nm.

Kandungan protoporphyrin IX dalam ekstrak kerabang telur puyuh diukur berdasarkan persamaan 1 berikut:

$$A_{407} = \epsilon \cdot b \cdot C \dots\dots\dots(1)$$

Keterangan :

- A₄₀₇ : Absorbansi ekstrak pada panjang gelombang 407 nm.
- E : absortivitas molar porfirin dalam pelarut 1,5M HCl pada panjang gelombang 407 nm (297.000 L mol⁻¹cm⁻¹)
- B : panjang jalan masuk sinar atau lebar kuvet yaitu 1cm
- C : konsentrasi protoporphyrin IX dalam ekstrak kerabang telur puyuh (L mol⁻¹)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses ekstraksi menjadi langkah awal yang penting. Penentuan pelarut, metode, serta siklus pada proses ekstraksi berpengaruh pada hasil serta konsentrasi dari senyawa yang akan diisolasi (Mukhriani, 2014). Ekstraksi protoporphyrin menggunakan metode maserasi dengan pelarut methanol – HCl (Kennedy & Ververs, 1973). Penggunaan pelarut ini akan menyebabkan metilasi pada kelompok karboksil dan hidrolisis

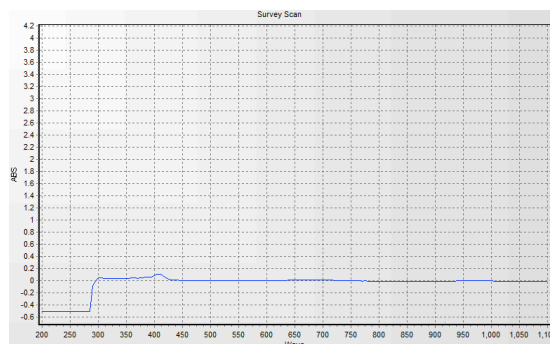
atau transmetilasi ester atau pembentukan ikatan glikosida, selain itu dapat menghilangkan logam yang terdapat di protoporphyrin seperti zinc (Gorchein, Lim, & Cassey, 2008).

Pelarat metanol-HCl (HCl(p) dan HCl 5%)

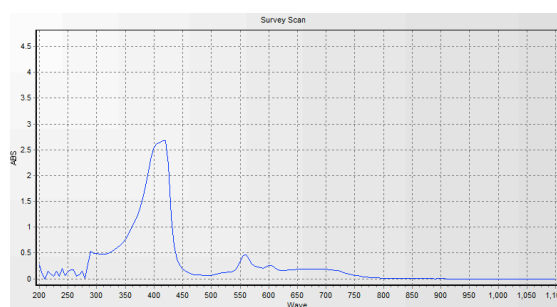
Spektra hasil pemindaian ekstrak HCl 5% dan HCl_(p) menunjukkan hasil yang sangat berbeda (**Gambar 1**). Ekstraksi dengan menggunakan metanol – HCl 5% tidak dapat mengekstrak sepenuhnya protoporphyrin IX ditunjukkan dengan tidak adanya titik puncak yang signifikan pada panjang gelombang 421 nm (**Gambar 1a**).

Hal ini dikarenakan hampir 95% komponen pada kerabang telur puyuh adalah CaCO₃ (Mann & Mann, 2015) sehingga HCl habis bereaksi dengan CaCO₃ terlebih dahulu sebelum dapat mengekstrak protoporphyrin IX. HCl menjadi komponen yang penting dalam pengekstrakan yaitu untuk proses demetalisasi sehingga protoporphyrin IX dapat memutuskan ikatannya dengan ion logam yang ada sehingga dapat terekstrak dalam bentuk protoporphyrin IX saja (Gorchein, Lim, & Cassey, 2008). Dalam penelitian ini, kadar protoporphyrin IX yang terekstrak dengan HCl 5% adalah $1,81 \times 10^{-5}$ % (b/b) sedangkan

menggunakan HCl_(p) terekstrak $1,84 \times 10^{-2}$ % (b/b).



(a)



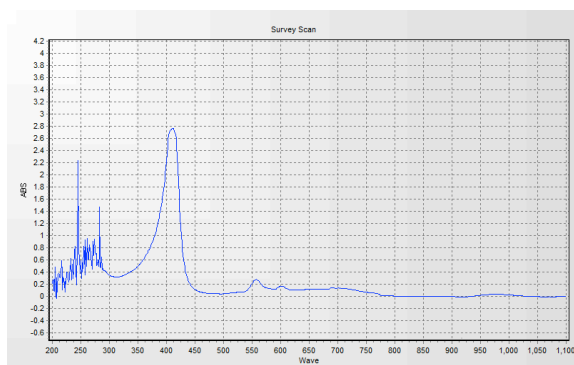
(b)

Gambar 1. (a) Spektra protoporphyrin IX pada pelarut metanol – HCl (HCl 5%) pada kisaran panjang gelombang 200 – 700 nm dengan tidak terdapat panjang gelombang maksimum. (b) Spektra protoporphyrin IX pada pelarut metanol – HCl (HCl_(p)) pada kisaran panjang gelombang 200 – 700 nm dengan panjang gelombang maksimum 421 nm.

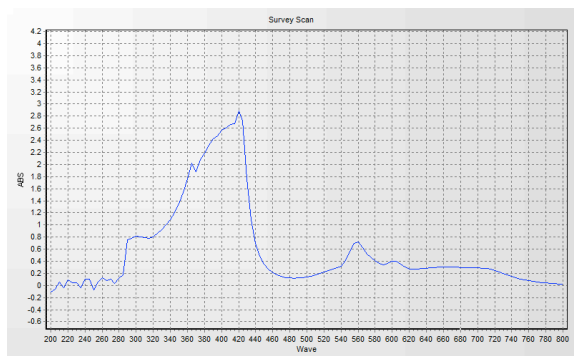
Metode ekstraksi secara maserasi dan ultrasonik

Spektra protoporphyrin IX dari kedua metode ekstraksi menunjukkan hasil yang berbeda (**Gambar 2**). Spektra yang memiliki kesamaan dengan spektra protoporphyrin IX standard adalah spektra yang menggunakan metode maserasi (**Gambar 2a**). Spektra dari metode ultrasonik menunjukkan hasil

yang berbeda dari spektra standard protoporphrin IX tetapi memiliki nilai panjang gelombang yang sama dengan protoporphrin IX (**Gambar 2b**).



(a)



(b)

Gambar 2. (a) Spektra protoporphrin IX menggunakan metode maserasi pada kisaran panjang gelombang 200 – 700 nm dengan panjang gelombang maksimum 421 nm. (b) Spektra protoporphrin IX menggunakan metode ultrasonik pada kisaran panjang gelombang 200 – 700 nm dengan panjang gelombang maksimum 421 nm.

Pada spektra ekstrak protoporphrin yang diekstraksi secara ultrasonik, hampir terbentuk puncak panjang gelombang yang lain dan mengalami perubahan bentuk pada bentuk spektranya, ultrasonik memberikan energi sehingga membuat kromofor pada struktur

protoporphrin IX mengalami perubahan kompleks donor – aseptor elektron intramolekular, perubahan kompleks kromofor tak jenuh terkonjugasi dan perubahan dalam disosiasi atau protonasi pada gugus karboksil (Kaiser & Berhe, 2014).

Hal ini membuat struktur protoporphrin IX terdekomposisi dan diduga berubah menjadi bentuk isoporphrin (Xu *et al.*, 2015). Kadar protoporphrin IX yang didapat dengan metode ultrasonik adalah $1,88 \times 10^{-2} \%$ (b/b) sedangkan kadar protoporphrin yang didapat menggunakan metode maserasi adalah $1,92 \times 10^{-2} \%$ (b/b).

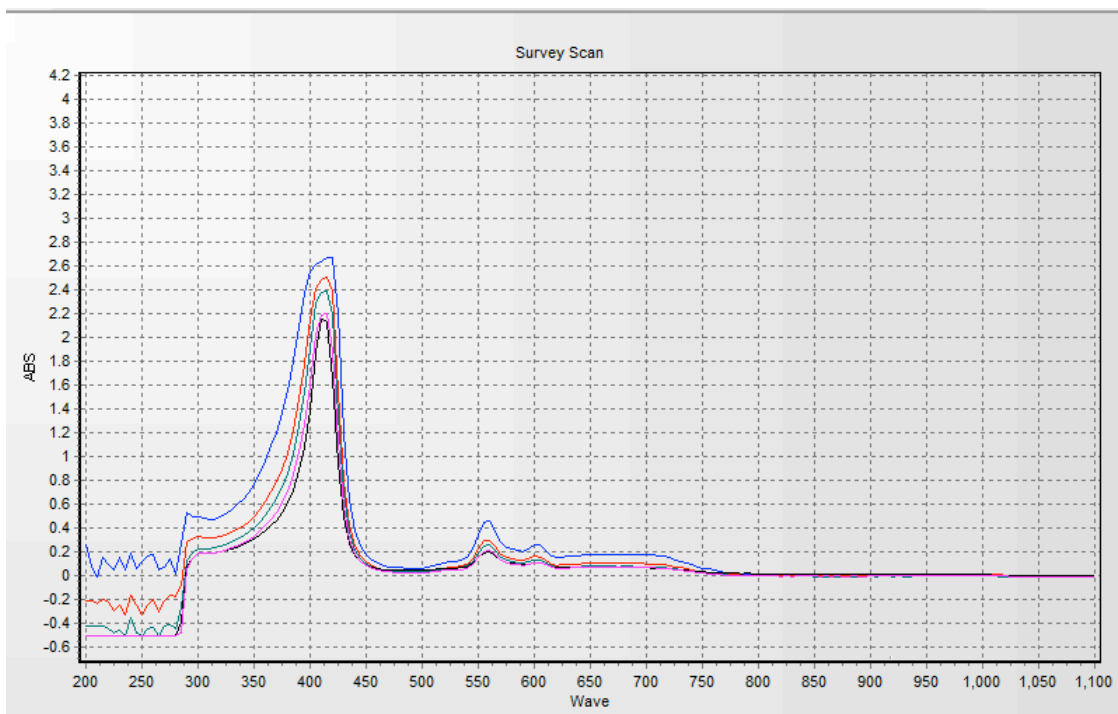
Siklus ekstraksi

Siklus yang digunakan adalah 5 kali. Pada setiap siklus tidak terjadi perubahan bentuk spektra, tetapi mengalami penurunan intensitas penyerapan radiasi elektromagnetik dalam nilai absorbansi. Pada spektra terjadi pergeseran secara hipokromik, pergeseran spektra ini menunjukkan perubahan nilai intensitas yang semakin kecil yang disebabkan oleh perubahan pelarut atau berkurangnya konsentrasi senyawa yang terlarut (Musiam & Alfian, 2017).

Pada siklus pertama didapatkan kadar protoporphrin IX $1,84 \times 10^{-2} \%$, pada siklus kedua $1,82 \times 10^{-2} \%$, pada siklus

ketiga $1,79 \times 10^{-2} \%$, pada siklus keempat $1,72 \times 10^{-2} \%$ dan pada siklus kelima $1,56 \times 10^{-2} \%$. Penambahan siklus ekstraksi masih dapat dilakukan untuk

memaksimalkan pengambilan protoporphyrin IX karena pada siklus kelima masih banyak terdapat protoporphyrin IX.

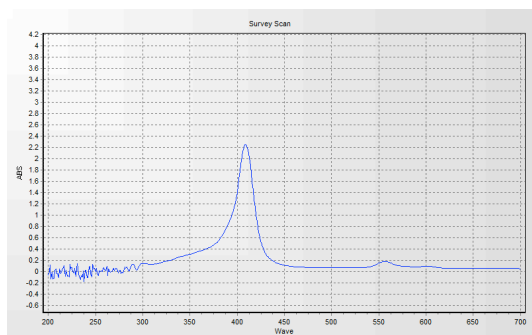


Gambar 3. Spektra 5 siklus ekstraksi protoporphyrin IX pada kisaran panjang gelombang 200 – 700 nm terdapat panjang gelombang maksimum 421nm siklus 1 (–), siklus 2 (–), siklus 3 (–) siklus 4 (–), siklus 5 (–)

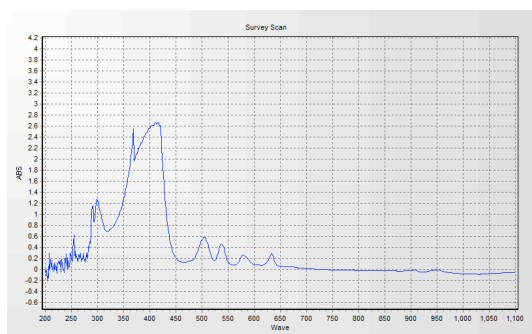
Fraksinasi kloroform

Pada proses fraksinasi dengan kloroform, ekstrak yang berwarna biru kehijauan berubah menjadi cokelat. Kedua sampel dipindai dengan menggunakan spektroskopi UV – Vis untuk mengetahui spektranya. Hasil pemindaian spektra ditunjukkan pada **Gambar 4a.** dan **Gambar 4b.**

Pada **Gambar 4b.** terlihat adanya perubahan pola serapan radiasi elektromagnetik pada kisaran panjang gelombang 407 nm, 507 nm, 540 nm, 575 nm, dan 631 nm. Perubahan panjang gelombang maksimum dikarenakan terjadinya perubahan pada sisi kromofor di protoporphyrin IX (Kaiser & Berhe, 2014).



(a)



(b)

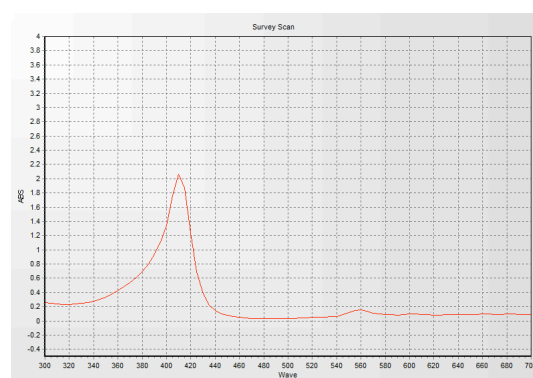
Gambar 4. (a) Spektra protoporphyrin IX pada fraksi metanol HCl pada kisaran panjang gelombang 200 – 700 nm dengan panjang gelombang maksimum 421 nm. (b) Spektra protoporphyrin IX pada fraksi kloroform pada kisaran panjang gelombang 200 – 700 nm dengan panjang gelombang maksimum 407 nm, 507 nm, 540 nm, 575 nm, 631 nm

Perbedaan warna yang diserap menghasilkan perubahan pada panjang gelombang maksimum sehingga menyebabkan terjadinya perubahan warna pada larutan ekstrak (Day & Underwood, 2002). Pada proses fraksinasi dengan kloroform, protoporphyrin mengalami alkoholisis (gugus asam karboksilat) sehingga menjadi dimetil ester protoporphyrin (Arita, Dara, & Irawan, 2008). Dimetil ester protoporphyrin memiliki 5 panjang gelombang maksimal, yaitu pada 407 nm,

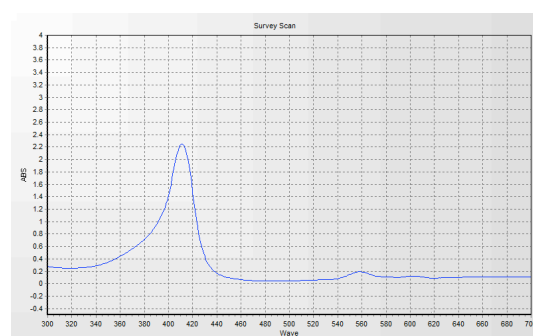
507 nm, 540 nm, 575 nm dan 631 nm (Grinsten, 1947).

Stabilitas ekstrak protoporphyrin IX

Setelah proses ekstraksi, diambil salah satu sampel lalu dilakukan penyimpanan di dalam lemari pendingin selama 14 hari untuk menguji stabilitas protoporphyrin IX yang sudah terekstrak tersebut. Pada hari pertama didapatkan absorbansi pada 411 nm adalah 2,066 dan pada hari ke – 14 didapatkan nilai absorbansi 411 nm sebesar 2,244.



(a)



(b)

Gambar 5. (a) Spektra protoporphyrin IX pada hari ke – 0 pada kisaran panjang gelombang 200 – 700 nm dengan panjang gelombang maksimum 421 nm. (b) Spektra protoporphyrin IX pada hari ke – 14 pada kisaran panjang gelombang 200 – 700 nm dengan panjang gelombang maksimum 421 nm

Kenaikan nilai absorbansi ini dapat terjadi karena ketika pengukuran terjadi penguapan pelarut metanol sehingga menyebabkan protoporphyrin IX menjadi lebih pekat. Pola spektra ekstrak protoporphyrin IX tidak mengalami perubahan yang bermakna (**Gambar 5**). Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak protoporphyrin IX stabil selama 14 hari pada penyimpanan dalam lemari pendingin.

Menurut Samiullah, Roberts, & Chousalkar (2016), protoporphyrin IX dalam bubuk kerabang telur segar dan pada kerabang telur yang telah disimpan dalam kondisi dingin ($20 - 25^{\circ}\text{C}$) diatas 6-7 tahun tidak mengalami perubahan sama sekali, tetapi ketika umur penyimpanan kerabang telur mencapai kurang lebih 150 tahun, akan mengalami degradasi warna yang disebabkan oleh infeksi jamur pada kerabang telur dan terjadi reaksi dengan senyawa kimia pada tempat penyimpanan tersebut (Cassey, Maurer, Duval, Ewen, & Hauber, 2010). Namun demikian, tingkat kestabilan

protoporphyrin IX pada ekstrak kerabang telur puyuh perlu diteliti lebih lagi untuk menentukan tingkat kestabilan terbaik dari protoporphyrin IX tersebut.

KESIMPULAN

Protoporphyrin IX dapat diekstraksi dari kerabang telur puyuh dengan kadar mencapai $1,92 \times 10^{-2} \%$ (b/b). Kondisi optimum untuk melakukan ekstraksi protoporphyrin IX dari kerabang telur puyuh adalah menggunakan pelarut metanol-HCl 5 % v/v ($\text{HCl}_{(p)}$) dengan metode maserasi. Penelitian lebih lanjut dapat dilakukan untuk aplikasi protoporphyrin IX sebagai pewarna tekstil.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Kemenristek DIKTI melalui pembiayaan Penelitian Dosen Pemula tahun 2017 dengan nomor kontrak 058/SPK-PDP/PRV/4/2017 yang telah membantu pembiayaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Arita, S., Dara, M. B., & Irawan, J. 2008, Pembuatan metil ester asam lemak dari CPO off grade dengan metode esterifikasi-transesterifikasi, *Jurnal*

Teknik Kimia, vol. 15, no.2, hh. 34-43.

Cassey, P., Maurer, G., Duval, C., Ewen, J. G., & Hauber, M. E.. 2010, Impact

- of time since collection on avian eggshell color: a comparison of museum and fresh egg specimens. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, vol. 64, no.10, hh. 1711-1720. <http://dx.doi.org/10.1007/s00265-010-1027-8>
- Cassey, P., Thomas, G. H., Portugal, S. J., Maurer, G., Hauber, M. E., Grim, T., Lovell, P. G., & Mikšik, I. 2012, Why are birds' eggs colorful? Eggshell pigments co-vary with life-history and nesting ecology among British breeding non-passerine birds. *Biological Journal of the Linnean Society*, vol. 106, no.3, hh. 657-672. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8312.2012.01877.x>
- Day, R. A. Jr & Underwood, A. L. 2002, Spektrofotometri. In H. Wibi H., S.T. & L. Simarmata, S. T. (Eds.), *Analisis Kimia Kuantitatif*. Edisi Keenam (hh. 382-421). Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Dean, M. L., Miller, T. A, & Brückner, C. 2011, Egg-citing! Isolation of protoporphyrin IX from brown eggshells and its detection by optical spectroscopy and chemiluminescence. *Journal of Chemical Education*, vol. 88, no.6, hh. 788 – 792. <http://dx.doi.org/10.1021/ed100093h>
- Duval, C., Cassey, P., Mikšik, I., Reynolds, S. J., & Spencer, K. A. 2013, Condition-dependent strategies of eggshell pigmentation: an experimental study of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*), *The Journal of Experimental Biology*, vol. 216, hh. 700 – 708. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.077370>
- Gorchein, A., Lim, C. K., & Cassey, P. 2008, Extraction and Analysis of Colorful Eggshell Pigments Using HPLC and HPLC/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Biomedical Chromatography*, vol. 23, no.6, hh. 602-606. <http://dx.doi.org/10.1002/bmc.1158>
- Gosler, A. G., Connor, O. R. & Bonser, R. H. C. 2011, Protoporphyrin and Eggshell Strength: Preliminary Findings from A Passerine Bird. *Avian Biology Research*, vol. 4, no.4, hh. 214-223. <https://dx.doi.org/10.3184/175815511X13207833399666>
- Grinsten, M. 1947, Studies of Protoporphyrin : VII. A Simple and Improved Method for The Preparation of Pure Protoporphyrin from Hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 167, hh. 515-519.

- Hunter, G. A. Sampson, M. P., & Ferreira, G. C. 2008, Metal Ion Substrate Inhibition of Ferrochelatase. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no.35, hh. 23685-23691. <https://dx.doi.org/10.1074/jbc.M803372200>
- Kaiser, M., & Berhe, A. A. 2014, How does sonication affect the mineral and organic constituents of soil aggregates?. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, vol. 000, hh. 1-17. <http://dx.doi.org/10.1002/jpln.201300339>
- Kennedy, G. Y. & Verves, H. G. 1973, Eggshell pigments of the Araucano fowl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comporative Biochemistry*, vol. 44, hh. 11-25. [http://doi.org/10.1016/0305-0491\(73\)90336-2](http://doi.org/10.1016/0305-0491(73)90336-2)
- Kombado, A. R. 2014, *Limbah Kerabang Telur Puyuh (Cortunix cortunix japonica) sebagai Pewarna Alami Kain Batik (Pengaruh Jenis Fiksatif terhadap Ketuaan dan Ketahanan Luntur. Ditelaah dengan Metode Pengolahan Citra Digital RGB)*. Skripsi. Salatiga: Universitas Kristen Satya Wacana.
- Kwartiningsih, E., Setyawardhani, D. A., Wiyatno, A. & Triyono, A. 2009, Zat Warna Alami Tekstil dari Kulit Buah Manggis. *Ekuilibrium*, vol. 8, no.1, hh. 41-47.
- Mann, K. & Mann, M. 2015, Proteomic analysis of quail calcified eggshell matrix: a comparison to chicken and turkey eggshell proteomes. *Proteome Science*, hh. 13-22. <https://dx.doi.org/10.1186/s12953-015-0078-1>
- Mukhriani, T. 2014, Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*, vol. 7, no.2, hh. 361-367.
- Musiam, S., & Alfian, R. 2017, Validasi Metode Spektrofotometri IV pada Penetapan Kadar Asam Mefenammat dalam Sediaan Tablet Generik. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, vol. 2, no.1, hh. 31-43.
- Pasquet, V., Chérouvrier, J. R., Farhat, F., Thiéry, V., Piot, J. M., Bérard, J. P., Kaas, R., Serive, B., Patrice, T., Cadoret, J. P., & Picot, L. 2011, Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochemistry*, vol. 46, no.1, hh. 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.009>

- Prabhu, K. H., & Teli, M. D. 2011, Eco-dyeing using *Tamarindus indica* L. seed coat tannin as a natural mordant for textiles with antibacterial activity. *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 18, no.6, pp. 864-872. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.10.014>
- Prabhu, K. H., & Bhute, A. S. 2012, Plant based natural dyes and mordants : A Review. *Journal of Natural Product and Plant Resource.*, vol. 2, no.6, pp. 649 – 664.
- Samiullah, S., Roberts, J. & Chousalkar, K. 2016, Infectious bronchitis virus and brown shell colour: Australian strains of infectious bronchitis virus affect brown eggshell colour in commercial laying hens differently. *Avian Pathology*, vol. 45, no.6, pp. 552-558. <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2016.1184744>
- Samanta, A. K., & Agarwal, P. 2009, Application of Natural Dyes on Textiles. *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, vol. 34, pp. 384-399.
- Thomas, D. B., Hauber, M. E., Hanley, G., Waterhouse, G. I. N., Fraser, S. & Gordon, K. C. 2015, Analysing avian eggshell pigments with Raman spectroscopy. *The Journal of Experimental Biology*, vol. 218, pp. 2670-2674. <https://dx.doi.org/10.1242/jeb.124917>
- Wang, S., Hannafon, B. N., Lind, S. E., & Ding, W. Q. 2015, Zinc protoporphyrin suppresses beta-catenin protein expression in human cancer cells: the potential involvement of lysosome-mediated degradation. *PLoS One*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127413>
- Wang, Y., Wu, X., Chen, J., Amin, R., Lu, M., Bhayana, B., Zhao, J., Murray, C. K., Hamblin, M. R., Hooper, D. C., & Dai, T. 2016, Antimicrobial blue light inactivation of gram-negative pathogens in biofilm: In vitro and in vivo studies. *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 213, no.9, pp. 1380-1387. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw070>
- Wang, X. T., Deng, X. M., Zhao, C. J., Li, J. Y., Xu, G. Y., Lian, L. S. & Wu, C. X. 2007, Study of the deposition process of eggshell pigments using an improved dissolution method. *Poultry Science*, vol. 86, no.10, pp. 2236–2238. <https://doi.org/10.1093/ps/86.10.2236>

Xu, H., Sun, X., Yao, J., Zhang, J., Zhang, Y., Chen, H., Dan, J., Tian, Z. & Tian, Y. 2015, The decomposition of protoporphyrin IX by ultrasound is dependent on the generation of hydroxyl radicals. *Ultrasonics Sonochemistry*, vol 27, hh. 623-630.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.04.024>

Zhao, R, Xu, G. Y., Liu, Z. Z., Li, J. Y. & Yang, N. 2006, A Study on Eggshell Pigmentation: Biliverdin in Blue-Shelled Chickens. *Poultry Science*, vol. 85, no.3, hh. 546-549. <https://doi.org/10.1093/ps/85.3.5>.