

Efek Penambahan Gula Terhadap Kestabilan Warna Ekstrak Fikosianin *Spirulina* sp.

Sri Sedjati*, Ali Ridlo dan Endang Supriyantini

Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro.
Jl. Prof. Soedarto, SH. Kampus UNDIP Tembalang, Semarang 50275
E-mail : sedjati69@gmail.com

Abstrak

Mikroalga *Spirulina* sp. memiliki kandungan fikosianin yang berpotensi untuk digunakan sebagai pewarna alami, namun fikosianin tidak stabil terhadap suhu, cahaya, pH, dan oksigen, sehingga perlu ditambahkan pengawet. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pengawet gula terhadap kestabilan fikosianin yang diekstraksi dari *Spirulina* sp. *Spirulina* sp diekstraksi dengan aquades dan larutan buffer fosfat pH 7. Efek penambahan gula diamati selama 14 hari penyimpanan pada suhu kamar ($30\pm 3^{\circ}\text{C}$). Stabilitas pigmen diamati berdasar nilai konsentrasi relatifnya (C_R). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar fikosianin *Spirulina* sp. yang diekstraksi dengan aquades adalah $45,16\pm 1,13$ mg/g dw, sedangkan untuk ekstrak dengan pelarut buffer fosfat pH 7 adalah $760,51\pm 0,11$ mg/g dw. Penambahan gula fruktosa 5% memberikan hasil yang paling efektif selama 14 hari penyimpanan suhu kamar $30\pm 3^{\circ}\text{C}$, konsentrasi relatif yang tersisa sebesar 19,39 %, sedangkan tanpa pengawet konsentrasi relatif hanya 10,57 %. Secara umum penambahan gula (sukrosa, fruktosa dan glukosa 5% dan 10% b/v) mampu meningkatkan konsentrasi relatif menjadi 12,12-19,39%.

Kata kunci : Fikosianin, *Spirulina* sp, gula, Aktivitas Antioksidan

Abstract

Microalga *Spirulina* sp. has a high content of phycocyanin. Phycocyanin has potential as a natural blue colorant. Phycocyanin is not stable against temperature, light, pH and oxygen. Preservatives are food additives commonly used to preserve unstable food. The purpose of this research was to screening sugar preservatives for phycocyanin. The effect of selected sugar preservatives, sucrose, glucose and fructose on the stability of phycocyanin at room temperature ($30\pm 3^{\circ}\text{C}$) was studied in aqueous solution for 14 days. Pigment stability after 14 days storages was observed from concentration relative (C_R) value. The result showed that phycocyanin content in aquadest extract was $45,16\pm 1,13$ mg/g dw. The C_R value remained at approximately 12,12-19,39% after storage for 14 days at room temperature when sugar preservatives (sucrose, glucose and fructose 5% and 10% w/v) was added, while without preservatives C_R value decreased to 10,57%. The highest stability of the phycocyanin solution was found in adding fructose 5% (C_R value = 19,39%).

Keywords : Phycocyanin, *Spirulina* sp., Sugar, Antioxidant Activity

PENDAHULUAN

Kelompok pigmen fikosianin dapat mamancarkan warna biru (Prasanna *et al.*, 2007), sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai pewarna biru alami. Pemberitaan informasi tentang

bahaya/efek negatif pewarna sintetis meningkatkan kesadaran masyarakat untuk kembali menggunakan produk pewarna alami. Saat ini pewarna alami pada umumnya berbahan dasar tumbuhan tingkat tinggi seperti daun pandan, daun suji, kunyit dan hanya

dimanfaatkan secara tradisional. Secara komersial, keberadaan pewarna alami kalah bersaing dengan pewarna sintetis yang banyak dijual di pasaran.

Kendala dalam proses eksplorasi pigmen alami adalah rendahnya kestabilan warna baik ketika proses ekstraksi, pemurnian, maupun selama penyimpanan. Fikosianin akan pudar warnanya (terdenaturasi) pada suhu di atas 45°C atau pada pH di bawah 4 (stabil pada pH 4-9), namun fikosianin memiliki keunggulan, yaitu menghasilkan warna biru cerah dan cemerlang (Sarada *et al.*, 1999; Jespersen *et al.*, 2005; Yan *et al.*, 2011).

Spirulina sp. merupakan mikroalga hijau-biru yang kaya pigmen. Pigmen yang terdapat di dalam *Spirulina* sp. dikelompokkan menjadi tiga kelas: (1) klorofil a terdiri dari 1,7% dari berat sel, (2) karotenoid dan xantofil yang berkisar 0,5% dari berat sel, (3) fikobiliprotein/fikobilin yaitu fikosianin dan allofikosianin yang secara normal terdiri dari 20% protein seluler dan secara kuantitatif merupakan pigmen yang paling dominan pada *Spirulina* (Richmond, 1988).

Pigmen fikobilin merupakan pigmen yang berasosiasi dengan protein dan bersifat polar serta larut air, dapat diekstrak dengan menggunakan pelarut aquades atau buffer (Masojidek *et al.*, 2004). Berdasarkan hal tersebut, perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh penambahan bahan pengawet terhadap kestabilan fikosianin yang diekstrak sehingga bisa menambah daya simpan. Penambahan gula dicoba sebagai alternatif pengawet karena bersifat alami dan aman dikonsumsi sebagai bahan pangan.

Fikosianin harus melalui berbagai tahapan agar memenuhi syarat sebagai pewarna alami, yaitu: pengendapan dan pemurnian. Kemurnian ini diukur berdasar rasio A_{620}/A_{280} , pengukuran A_{620} adalah nilai absorbansi fikosianin ($\lambda = 620$ nm) dan A_{280} adalah nilai absorbansi protein ($\lambda = 280$ nm). Kriteria kemurnian fikosianin untuk pangan (*food grade*) minimal sama dengan 0,7. Beberapa penelitian bisa

menghasilkan kemurnian 0,7 tanpa proses pemurnian. Proses pemurnian secara kromatografi dilakukan untuk memperoleh fikosianin murni dengan tingkat kemurnian di atas 4,0 (*analytical grade*) (Rito-Palomares *et al.*, 2001; Hemlata *et al.*, 2011; Prabuthas *et al.*, 2011).

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni – November 2014, di Laboratorium Marine Station Teluk Awur, Jepara, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro. Bahan yang dipakai dalam penelitian ini adalah mikroalga *Spirulina* sp. komersial produksi Indonesia dalam bentuk kering (bubuk). Bahan-bahan kimia yang dipakai untuk ekstraksi dan analisis adalah aquades, gula (fruktosa, glukosa dan sukrosa p.a) dan kertas saring Whatman no. 42. Alat-alat yang digunakan meliputi neraca analitik, mortar dan penggerus, vortex, refrigerator, sentrifuse dan spektrofotometer UV-Vis.

Prosedur kerja penelitian terdiri dari beberapa tahap, yaitu: ekstraksi pigmen fikosianin, penambahan gula dan analisis kadar pigmen fikosianin. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode *coldmaceration* dan *freezing-thawing*. Sampel kering *Spirulina* sp. digerus dengan mortar sampai halus. Sampel dimaserasi menggunakan pelarut aquades dengan perbandingan 1:100 (w/v), kemudian dihomogenasi dengan vortex selama 1 menit. Sampel dibekukan dalam freezer selama 12 jam, setelah itu sampel beku dicairkan selama 12 jam pada suhu kamar (1 siklus metode *freezing-thawing*) (dilakukan sebanyak 2 siklus), lalu disaring. Filtrat disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Larutan disaring dengan kertas saring sehingga di peroleh ekstrak kasar fikosianin *Spirulina* sp.

Penentuan Spektra Absorbansi Pigmen Fikosianin

Filtrat diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada kisaran panjang gelombang 280 – 750 nm. Serapan maksimum fikosianin terletak

pada panjang gelombang 610 – 620 nm (Prasanna *et al.*, 2010; Saleh *et al.*, 2011).

Analisis Kadar Fikosianin

Filtrat fikosianin diukur absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 280 nm, 620 nm dan 650 nm. Kadar fikosianin dihitung dengan metode Bennet dan Bogorad (1973), sebagai berikut :

$$PC(mg.mL^{-1}) = \frac{(A_{620} - (0.7 \times A_{650}))}{7.38}$$

$$PC(mg/g) = PC(mg.mL^{-1}) \times V_p/DW$$

Di mana :

- PC : Kadar *Phycocyanin*
- A_{620} : Nilai Absorbansi pada (λ) 620 nm
- A_{650} : Nilai Absorbansi pada (λ) 650 nm
- V_p : Volume pelarut (ml)
- DW : Berat kering (g)

Uji Kestabilan Warna

Stabilitas larutan fikosianin selama masa penyimpanan suhu kamar dilakukan dengan menambahkan bahan pengawet gula (sukrosa, glukosa, fruktosa, masing-masing dengan konsentrasi 5% dan 10% (b/v)). Sebagai pembanding adalah pengawet sintetis asam benzoat (kontrol positif) dan tanpa gula (kontrol negatif). Masing-masing gula ditambahkan ke dalam 10 ml larutan ekstrak fikosianin dan disimpan pada suhu kamar $30 \pm 3^\circ C$. Kestabilan warna fikosianin diuji dengan menghitung konsentrasi relatif pigmen

fikosianin selama masa penyimpanan yang telah ditentukan.

$$C_R(\%) = \frac{C}{C_0} \times 100$$

Di mana :

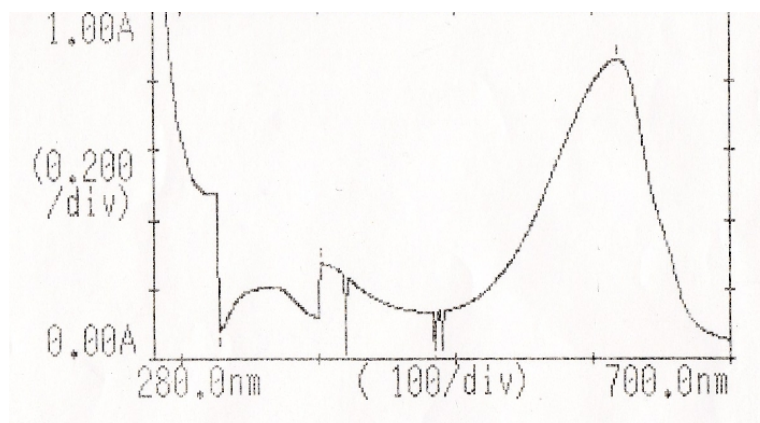
- C_R : konsentrasi relatif
- C_0 : konsentrasi awal
- C : konsentrasi pada waktu penyimpanan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fikosianin yang diekstrak dengan pelarut aquades menghasilkan pola spektra dengan puncak serapan 620 nm.

Parameter kemurnian (A_{620}/A_{280}) merupakan ukuran relatif berdasarkan rasio absorbansi pada panjang gelombang 620 nm dan 280 nm.

Tanpa proses pemurnian, ekstrak kasar fikosianin sudah bisa mencapai tingkat kemurnian lebih dari 0,7 (Tabel 1). Hasil ini sesuai dengan penelitiannya sebelumnya, kandungan fikosianin pada *Spirulina* sp. berkisar 1-10% berat kering (Sedjati *et al.*, 2012) Kandungan pigmen fikosianin yang tinggi tersebut menjadi daya tarik bagi pengembangan dan dianggap memiliki pasar potensial dalam industri pangan dan kesehatan, karena pigmen fikosianin juga memiliki karakteristik antioksidan (Chrismandha *et al.*, 2006).



Gambar 1. Spektra Ekstrak Kasar Fikosianin yang Diekstraksi dengan Aquades (sampel:pelarut =1:100 b/v, pengenceran 5x, puncak $\lambda=620$ nm)

Tabel 1. Kadar dan Kemurnian Fikosianin

Pelarut	[PC] (ppm)	[PC] (mg/g sampel DW)	Kemurnian (Rasio A620/A280)
Aquades	451,65±11,26	45,16	1,61±0,05

Tabel 2. Konsentrasi Relatif Pigmen Fikosianin setelah Penambahan Gula selama Penyimpanan Suhu Kamar 30±3°C

Jenis pengawet		Konsentrasi Relatif PC (%) Hari ke-				
		0	2	5	9	14
PC+Fruktosa	5%	100,00	96,93	65,41	35,32	19,39
	10%	100,00	97,46	64,06	22,14	17,15
PC+Glukosa	5%	100,00	93,15	43,92	22,77	13,18
	10%	100,00	96,20	64,25	35,54	12,12
PC+Sukrosa	5%	100,00	80,04	73,33	44,33	16,42
	10%	100,00	93,75	66,63	37,46	17,53
PC+A. Benzoat	200 ppm	100,00	92,29	70,44	37,84	25,80
Kontrol negatif		100,00	75,57	47,66	22,38	10,57

Kelemahan fikosianin adalah mudah pudar karena proses degradasi alamiah. Penambahan bahan pengawet gula diharapkan dapat memperpanjang daya simpannya. Penentuan konsentrasi pengawet asam benzoat (200 ppm) dan gula pasir (5% dan 10%) berdasarkan peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) no. 36 Tahun 2013 tentang dosis bahan tambahan makanan. Konsentrasi maksimum asam benzoat yang diijinkan adalah 400 ppm untuk minuman berperisa berkarbonase atau tidak berkarbonase. Peraturan penambahan gula pasir pada bahan makanan minimal 3% dari bahan makanan.

Bahan pengawet gula yang menghasilkan penurunan konsentrasi relatif terkecil adalah pengawet gula fruktosa 5% yang dicoba selama penelitian. Penambahan fruktosa sebanyak 5% mampu menghasilkan konsentrasi relatif dua kali lipat dibanding kontrol negatif (tanpa pengawet). Kemampuan 5% fruktosa dalam mempertahankan kestabilan pigmen fikosianin mendekati asam benzoat 200 ppm.

Fikosianin dalam pelarut aquades lebih stabil dengan pengawet asam

benzoat (200 ppm) pada suhu 30 ± 3°C . Konsentrasi fikosianin tanpa penambahan pengawet menunjukkan penurunan yang tinggi setelah 5 hari, konsentrasi fikosianin yang hilang adalah sebanyak 52%. Setelah 14 hari masa penyimpanan, warna pigmen fikosianin hilang sebanyak 90%. Warna biru semakin pudar seiring bertambahnya waktu penyimpanan. Hal tersebut terjadi karena nilai pH mempengaruhi kestabilan ikatan billiprotein dalam larutan. Menurut Duangsee *et al.* (2009), struktur kimia fikosianin akan terbuka pada pH ≤ 4,5 karena rusaknya ikatan hidrogen yang ada. Fikosianin tidak akan larut lagi pada larutan dengan pH kurang dari 3.

Nilai pH dalam larutan fikosianin yang ditambah gula berkisar 6-7, sedangkan yang ditambah asam benzoat berkisar 4-5. Beberapa pendapat menguatkan asumsi ini, pada pH rendah (asam) struktur molekul fikosianin akan mengembang, karena protein yang terdenaturasi, menggumpal dan mengendap sehingga struktur fikosianin rusak. Hal tersebut menyebabkan intensitas warna dan pembacaan absorbansi dengan spektrofotometer menurun (Duangsee *et al.*, 2009). Semakin banyak protein yang mengendap maka nilai absorbansi dari fikosianin akan rendah

dan sebaliknya (Bhaskar *et al.*, 2005). Fikosianin dalam bentuk larutan, ditemukan sebagai gabungan yang kompleks dari monomer, trimer, hexamer dan oligomer lainnya (Chaiklahan *et al.*, 2014). Degradasi fikosianin bergantung pada kesatuan bagian dari protein, yang dipengaruhi oleh beberapa parameter seperti cahaya, suhu, pH dan konsentrasi protein (Jespersen *et al.*, 2005).

KESIMPULAN

Penambahan pengawet gula pada ekstrak kasar pigmen fikosianin yang lebih efektif adalah fruktosa 5%. Konsentrasi relatif (C_R) selama 14 hari penyimpanan suhu kamar untuk fruktosa 5% adalah 19,39%, bernilai lebih tinggi dibanding tanpa gula ($C_R=10,57\%$).

DAFTAR PUSTAKA

- Bhaskar, S.U., Gopaldaswamy, G. and Raghu, R. A. 2005. Simple method for efficient extraction and purification of Fikosianin from *Spirulina platensis* Geitler. *Indian Journal of Experimental Biology*. 43(3): 277-279.
- Bennett, A. and L. Bogorad. 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J. Cell. Biol.* 58: 419-435.
- Chaiklahan, R., N. Chirasuwan, and B. Bunnag. 2012. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *J. Process Biochem.* 47: 659-664.
- Duangsee, R., Phoopat, N. And Ningsanond S. 2009. Phycocyanin Extraction From *Spirulina platensis* and Extract Stability Under Various pH and Temperature. *As. J. Food Ag-Ind.* 2(4): 819-826.
- Edwards, M.R., C. Hauer, R.F. Stack, L.E. Eisele, R. MacColl. 1997. Thermophilic C-phycocyanin: effect of temperature, monomer stability, and structure. *J. Bioch et Bioph.* 1321: 157-164.
- Estrada, J.E.P., P.B. Bescos, A.M. V. Fresno. 2001. Anti oxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco* 56: 497-500.
- Hamid, A.A., O.O Aiyelaagbe, L.A. Usman, O.M. Ameen, A. Lawal. 2010. Antioxidant : its Medidal and Pharmacological Applications. *African Journal of pure and applied chemistry* vol.4(8), pp. 142-151
- Hemlata, G. Pandey, F. Bano.T. Fatma. 2011. Studies of *Anabaena* sp. NCCU-9 with special reference to phycocyanin. *J. Algae Biomass Utiln.* 2(1): 30-51.
- Jespersen, L., L.D. Stremdahl, K. Olsen, L.H.Skibsted. 2005. Heat and light stability of three natural blue colorant for use in confectionery and beverages. *Europ. Food Res. Technol.* 220(3-4): 261-266.
- Masojidek, J., M. Koblizek, G. Torzillo. 2004. Photosynthesis in microalgae *in*: A. Richmond (Ed). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blakwell Science Ltd., Iowa. p.20-39.
- Prabuthas, P., Majumdar S., Srivastav P.P., Mishra H.N. 2011. Standarization of rapid and economical method for nutraceuticals extraction from algae. *J. Stored Products and Post Harvest Res.* 2(25): 93-96.
- Prasanna, R., A. Sood, A. Suresh, S. Nayak, B.D. Kaushik. 2007. Potential and applications of algal pigment in biology. *.Acta Botan. Hungaria* 49 (1-2): 131-156.
- Prasanna, R., A. Sood, P. Jaiswal, S. Nayak, V. Gupta, V. Chaudhary, M. Joshi, C. Natarjan. 2010. Rediscovering cyanobacteria as valuable sources of bioaktive compounds. *Appl. Biochem. Microbiol.* 46 (2): 119-134.
- Rito-Palomoras, M., Nunez L., Amador D. 2001. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of prototype process for C-phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*. *J. Chem. Techn. Biotechnol.* 76: 1273-1280.
- Sarada, R., M.G. Pillai, G.A. Ravishankar. 1999. Phycocyanin from *Spirulina* sp.: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficiency of extraction methods and

- stability studies on phycocyanin. J.Proc. Biochem. 34:795-801.
- Sedjati, Sri, Ervia Yudiati dan Suryono. 2012. Profil Pigmen Polar dan Non Polar Mikroalga Laut *Spirulina* sp dan Potensinya sebagai Pewarna Alami. Jurnal Ilmu Kelautan., Vol. 17 (3) 176 – 181.
- Yan, S., Zhu LP, Su HN, Zhang XY, Chen XL, Zhou BC, Zhang YZ. 2011. Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phycocyanin and allophycocyanin with high purity and recovery from *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. J. Appl. Phycol. 23: 1-6.