

EKSTRAK BIOPIGMENT BIRU FIKOSIANIN *Spirulina plantesis* SEBAGAI PEWARNA ALAMI MINUMAN RINGAN KARBONASI

BLUE BIOPIGMENT PHYCOCYANIN EXTRACTS *Spirulina plantesis* AS NATURAL COLOR OF CARBONATED SOFT DRINK

Alfredo R. Kresnaputra, Siti Irma Rahmawati^a, Mira Suprayatmi, Syarif Hidayatullah

Jurusan Teknologi Pangan dan Gizi, Fakultas Ilmu Pangan Halal, Universitas Djuanda Bogor, Jl. Tol Ciawi No.1, Kotak Pos 35 Ciawi, Bogor 16720.

^aKorespondensi : Siti Irma Rahmawati, E-mail : siti.irma.rahmawati@unida.ac.id

(Diterima oleh Dewan Redaksi: 22-08-2016)

(Dipublikasikan oleh Dewan Redaksi: 10-10-2016)

ABSTRACT

Blue Biopigment Extract Phycocyanin of *Spirulina* can be used as natural dyes, for example its a drinks. Research conducted three phases, namely the formulation of carbonated soft drinks, chemical analysis and formulation selected storage stability test. Formula carbonated soft drinks are elected according to panelists blue biopigmen phycocyanin extract concentration of 4% (F1) with the preferred color. While the flavor and aroma rated somewhat favored. Formula elected by hedonic test, followed in Phase two: the chemical analysis of the selected formula include phycocyanin total levels of 3,21 mg / mL, protein content (Bradford) amounted to 67.15 ppm, antioxidant activity (IC₅₀) is 545,6 µL, the color intensity of 1,302 ($\lambda = 615$) and 1,296 ($\lambda = 625$) and a pH of 3,30. Stability is calculating by the method of half-time. The half-life parameters total levels of phycocyanin at a temperature of a refrigerator is 67 days or 2 months, and the room temperature is 12 days. The intensity of color at refrigerator temperature that is 87 days or 3 months, and the room temperature is only 13 days. The higher the half-life, the longer the degradation phycocyanin will happen.

Keywords: Blue biopigment phycocyanin, *Spirulina platensis*, carbonated soft drinks, the half-life.

ABSTRAK

Ekstrak biopigmen biru Fikosianin *Spirulina plantesis* dapat digunakan sebagai pewarna alami, contohnya untuk minuman. Penelitian dilakukan tiga tahap yaitu formulasi minuman ringan karbonasi, analisis kimia formulasi terpilih dan uji stabilitas penyimpanan. Formula minuman ringan karbonasi terpilih menurut panelis yaitu konsentrasi ekstrak biopigmen biru fikosianin 4% (F1) dengan warna yang disukai. Sedangkan rasa dan aroma dinilai agak disukai. Formula terpilih berdasarkan uji hedonik, dilanjutkan pada penelitian tahap dua yaitu analisa kimia formula terpilih meliputi kadar total fikosianin sebesar 3,21 mg/mL, kadar protein (*Bradford*) sebesar 67,15 ppm, aktifitas antioksidan (IC₅₀) sebesar 545,6 µL, intensitas warna sebesar 1,302 ($\lambda=615$) dan 1,296 ($\lambda=625$) dan pH sebesar 3,30. Penentuan stabilitas dihitung dengan metode waktu paruh. Waktu paruh parameter kadar total fikosianin pada suhu *refrigerator* yaitu 67 hari atau 2 bulan, dan suhu ruang yaitu 12 hari. Intensitas warna pada suhu *refrigerator* yaitu 87 hari atau 3 bulan, dan suhu ruang yaitu hanya 13 hari. Semakin tinggi waktu paruh, maka semakin lama degradasi fikosianin yang akan terjadi.

Kata kunci: Biopigmen biru fikosianin, *Spirulina plantesis*, minuman ringan karbonasi, waktu paruh.

PENDAHULUAN

Produk pangan berwarna biru sangat jarang ditemukan. Biasanya pewarna biru yang digunakan adalah *brilliant blue* yang disinyalir mempunyai efek negatif jangka panjang jika terus dikonsumsi. Mikroalga merupakan sumber potensi pewarna alami contohnya dari spesies *Spirulina plantesis* yang menghasilkan pigmen berwarna hijau kebiru – biruan. Jenis pigmen yang terkandung dalam mikroalga tersebut yaitu fikosianin, klorofil-a, dan karotenoid yang dipercaya sebagai antioksidan tinggi dan agen anti – kanker (Pirenantyo dan Limantara, 2008).

Salah satu aplikasi fikosianin yaitu sebagai pewarna minuman ringan. Pada penelitian ini, akan dilakukan formulasi penambahan ekstrak biopigmen biru fikosianin dari mikroalga *Spirulina plantesis* sebagai pewarna alami minuman ringan karbonasi (soda) yang dapat diterima secara sensori dengan pengembangan sendiri dari bahan baku, formula atau racikan yang relatif sehat dan aman untuk dikonsumsi. Penentuan formulasi penambahan ekstrak fikosianin terpilih dari segi organoleptik akan dilakukan dengan uji hedonik (kesukaan).

Mengingat kestabilan biopigmen biru fikosianin sangat dipengaruhi suhu, maka penting dilakukan penentuan stabilitas setelah diaplikasikan ke dalam produk pangan sebenarnya. Penelitian Mohhammad, 2007 sebelumnya hanya mengamati kestabilan fikosianin dalam bentuk murni sebelum diaplikasikan.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah cairan hasil ekstraksi biopigmen biru fikosianin *Spirulina plantesis* (*aquos extract*) dari metode ekstraksi terbaik yaitu pembekuan atau *freezing* pada penelitian sebelumnya, air

soda, sirup fruktosa, air, asam sitrat, pemantap *gum arabic*, botol kaca, dan bahan – bahan yang digunakan untuk analisis kimia serta stabilitas produk yaitu *aquades*, pereaksi DPPH (1,1-*diphenyl-2-picryl hydrazyl*), asam askorbat, methanol p.a, alkohol 95%, pereaksi CBB (*Comassie Brilliant Blue*), pereaksi BSA (*Bovine Serum Albumin*), *buffer* sitrat pH 5, etanol absolute (95%), dan asam fosfat pekat (85%).

Alat yang digunakan adalah timbangan kasar, panci, pengaduk, saringan, termometer, dan alat – alat yang digunakan untuk analisis kimia serta stabilitas produk yaitu kulkas, neraca analitik, *sentrifuge*, spektrofotometer *Hitachi U-2900*, labu takar, tabung reaksi, gelas piala, pH meter, pipet volumetrik, dan *vortex*.

TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di laboratorium *Surfactant and Bioenergy Research Centre* (SBRC), Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM), Institut Pertanian Bogor (IPB), Kampus IPB Baranang Siang, Bogor, Jawa Barat. Penelitian dilaksanakan selama kurang lebih 2 bulan terhitung pada bulan April hingga Mei 2016.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan tiga (3) tahap yaitu :

1. Formulasi minuman ringan karbonasi dengan tiga (3) formula penambahan ekstrak biopigmen biru fikosianin hasil *trial and error* yaitu 4% (F1), 2% (F2) dan 1% (F3) lalu dilakukan uji hedonik (kesukaan). Berikut tabel formulasi minuman ringan karbonasi :

Tabel 1. Formulasi Pewarna Ekstrak Biopigmen Biru Fikosianin *Spirulina plantesis* untuk Minuman Ringan Karbonasi

Bahan	Formula Minuman Ringan Karbonasi untuk 1000 ml air		
	F1 (ml)	F2 (ml)	F3 (ml)
Ekstrak Biopigmen Biru Fikosianin <i>Spirulina plantesis</i>	40 (4%)	20 (2%)	10 (1%)
Air soda mineral (40%)	400	400	400
Sirup Fruktosa (10%)	100	100	100
Asam sitrat (0.05%)	0,5	0,5	0,5
Pemantap <i>Gum Arabic</i> (0.3%)	3	3	3
Air	456,5	476,5	486,5

2. Analisa kimia formula terpilih yaitu:

a) Kadar Total Fikosianin

Analisis biopigmen biru fikosianin yang terkandung di dalam minuman ringan karbonasi dilakukan dengan mengukur spektrum pigmen fikobiliprotein secara spektrofotometri panjang gelombang 615 nm dan 625 nm. Pada penentuan stabilitas juga dilakukan pengukuran intensitas warna (absorbansi) pada panjang gelombang 615 nm, karena fikosianin memiliki sifat serapan spektroskopik pada panjang gelombang 610 – 620 nm. Blanko yang digunakan yaitu *aquades*. Konsentrasi fikosianin (PC) dalam satuan mg/mL dihitung dengan

persamaan Bennet dan Bogoard (1973), yaitu :

$$PC = \frac{(A_{615}) - 0.474(A_{625})}{5.34} \times FP \quad (1)$$

b) Kadar Protein (Metode Bradford)

Uji Bradford adalah suatu uji untuk mengukur konsentrasi protein total dengan secara kolorimetri dalam suatu larutan (Bradford, 1976). Dalam uji Bradford melibatkan pewarna *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) yang berikatan dengan protein dalam suatu larutan yang bersifat asam sehingga memberikan warna (kebiruan).

Sampel minuman ringan karbonasi yang mengandung biopigmen fikosianin merupakan pigmen yang berasosiasi dengan protein dan larutan standar sebanyak 0,1 ml direaksikan dengan 5 ml reagen Bradford, lalu divortex. Karena menghasilkan warna, sehingga secara kolorimetri dapat diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 465 - 595 nm (cahaya tampak). Larutan standar yang digunakan yaitu BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan beberapa konsentrasi yaitu 0, 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm.

C) Aktivitas Antioksidan DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan minuman ringan karbonasi dilakukan menggunakan radikal bebas yang stabil yaitu DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) sesuai dengan metode Molyneux (2004). Sampel minuman ringan karbonasi dibuat deret konsentrasi yaitu 0, 5, 10, 25, 50 dan 100 µL. Semua stok solusi dilarutkan dalam metanol p.a.

Sebanyak 5 mL, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah larutan 1 mL DPPH 1 mM.

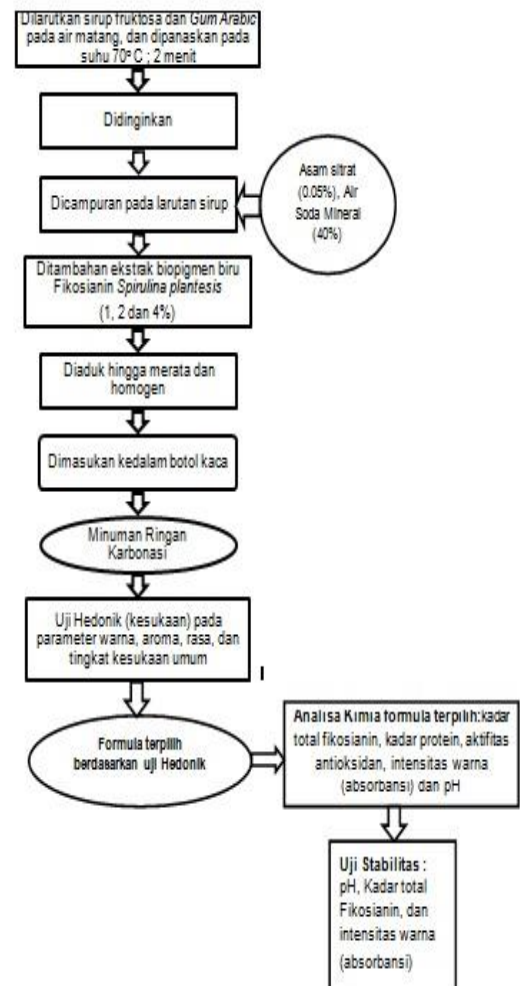
Blanko disediakan dengan mencampur metanol dan DPPH dengan perbandingan yang sama seperti sampel. Tabung reaksi tersebut diinkubasi dalam suhu 37°C selama 30 menit dan diukur absorbansi pada $\lambda=517$ nm. Absorbansi yang rendah menunjukkan tingginya penangkal radikal bebas. Besarnya aktivitas penangkal radikal bebas ditentukan menggunakan rumus (%inhibisi) = $((AA-AB)/AA) \times 100$; dimana AA adalah absorbansi blanko dan AB adalah absorbansi sampel.

d) Tingkat Keasaman atau pH

Sebelum dilakukan analisis pH, sampel harus dipastikan sudah dalam keadaan homogen dan encer. Elektroda pada pH-meter dibilas dengan air destilata, dikeringkan dengan tissue, lalu dimasukkan ke dalam gelas piala berisi sampel. Pembacaan skala pH dibiarkan beberapa saat sampai pembacaan stabil, dan dilakukan duplo.

3. Penentuan stabilitas penyimpanan, produk akan disimpan pada dua tingkat suhu yang berbeda yaitu 5 °C (suhu refrigerator), dan 25 °C (suhu ruang). Pengamatan dilakukan setiap 3 hari sekali selama 15 hari yaitu hari ke - 0, 3, 6, 9, 12 dan 15. Parameter yang diamati adalah pH, kadar total fikosianin, dan intensitas warna (absorbansi) dari minuman ringan karbonasi. Analisis yang dilakukan yaitu menggunakan metode pendekatan waktu paruh ($t_{1/2}$).

Berikut kerangka tahap penelitian dan diagram alir pembuatan minuman ringan karbonasi, disajikan pada gambar 1:



Gambar 1. Kerangka Tahap Penelitian dan Diagram Alir Pembuatan Minuman Karbonasi (Modifikasi Nanda Lindy T.E, 2008)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Formulasi Minuman Ringan Karbonasi

Dilakukan uji organoleptik menggunakan metode uji hedonik (kesukaan) dengan sebaran skala penilaian yaitu (1) sangat tidak suka, (2) tidak suka, (3) agak tidak suka, (4) netral, (5) agak suka, (6) suka, dan (7) sangat suka (Sarastani, 2008). Jumlah panelis yang digunakan sebanyak 20 orang. Data yang diperoleh kemudian diolah menggunakan analisis sidik ragam

(ANOVA) pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$), jika $p < 0,05$ (berbeda nyata) maka dilakukan uji lanjut yaitu *Duncan*. Formula penambahan konsentrasi ekstrak

fikosinin yang didapatkan berdasarkan hasil *trial and error* yaitu 4%, 2% dan 1%. Berikut hasil uji organoleptik minuman ringan karbonasi.

Tabel 2. Hasil Uji Organoleptik Minuman Ringan Karbonasi dengan Ekstrak Biopigmen Biru Fikosianin

Parameter	F1 (324)	F2 (247)	F3 (518)
Warna	5,90 ^a	4,85 ^b	3,00 ^c
Rasa	5,00 ^a	4,55 ^a	4,00 ^a
Aroma	5,30 ^a	4,75 ^{ab}	4,25 ^b
Tingkat Kesukaan Umum	5,45 ^a	4,65 ^b	4,35 ^b

Keterangan : Huruf yang sama pada kolom yang sama artinya tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 0,05 ($p < 0,05$).

a) Warna

Warna merupakan estetika produk pangan yang tampil lebih dulu dibandingkan parameter lainnya (Winarno, 2008). Nilai kesukaan pada parameter warna minuman ringan karbonasi yaitu berkisar antara 5,90 – 3,00 (suka sampai agak tidak suka). Berdasarkan analisis sidik ragam (ANOVA) formula konsentrasi ekstrak biopigmen biru fikosianin berpengaruh nyata terhadap kesukaan warna ($p < 0,05$), maka dilanjutkan uji *Duncan*. Ketiga formula berbeda nyata. Nilai kesukaan tertinggi pada parameter warna yaitu formula penambahan konsentrasi ekstrak fikosianin 4%. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak fikosianin yang ditambahkan, maka semakin pekat warna yang dihasilkan.

b) Rasa

Nilai kesukaan pada parameter rasa minuman ringan karbonasi berkisar antara 5,00 – 4,00 (agak suka sampai biasa). Berdasarkan analisis sidik ragam (ANOVA) formula konsentrasi ekstrak biopigmen biru fikosianin tidak berpengaruh nyata terhadap kesukaan rasa ($p > 0,05$), maka tidak dilanjutkan uji

Duncan. Nilai kesukaan tertinggi pada parameter rasa yaitu formula penambahan konsentrasi ekstrak fikosianin 4%.

c) Aroma

Nilai kesukaan pada parameter aroma minuman ringan karbonasi berkisar antara 5,30 – 4,25 (agak suka). Berdasarkan analisis sidik ragam (ANOVA) formula konsentrasi ekstrak biopigmen biru fikosianin berpengaruh nyata terhadap kesukaan aroma ($p < 0,05$), maka dilanjutkan uji *Duncan*. Formula penambahan konsentrasi ekstrak fikosianin 4% tidak berbeda nyata atau sama dengan formula penambahan konsentrasi ekstrak fikosianin 2%, namun berbeda nyata dengan formula penambahan konsentrasi ekstrak fikosianin 1%, sedangkan formula penambahan konsentrasi ekstrak fikosianin 2% dan 1% tidak berbeda nyata atau sama. Minuman ringan karbonasi ini sebelumnya telah ditambahkan perisa *mint* dengan konsentrasi yang sama. Adanya penambahan perisa diharapkan mampu menutupi aroma amis laut yang terkandung dalam fikosianin.

d) Tingkat Kesukaan Umum

Nilai kesukaan pada parameter tingkat kesukaan umum minuman ringan

karbonasi meliputi parameter keseluruhan warna, rasa, dan aroma berkisar antara 5,45 – 4,35 (agak suka). Berdasarkan analisis sidik ragam (ANOVA) formula konsentrasi ekstrak biopigmen biru fikosianin berpengaruh nyata terhadap kesukaan umum ($p < 0,05$), maka dilanjutkan uji *Duncan*. Formula penambahan konsentrasi ekstrak fikosianin 4% berbeda nyata dengan formula penambahan konsentrasi ekstrak fikosianin 2% dan 1%, sedangkan formula penambahan konsentrasi ekstrak fikosianin 2% dan 1% tidak berbeda nyata atau sama. Nilai kesukaan tertinggi pada parameter tingkat kesukaan umum yaitu formula penambahan konsentrasi ekstrak fikosianin 4%.

Panelis menilai formula penambahan konsentrasi ekstrak fikosianin 4% sebesar 5,45 yaitu mendekati suka. Secara keseluruhan perlu adanya alternatif pemilihan perisa lainnya untuk meningkatkan kembali tingkat kesukaan panelis terhadap minuman ringan karbonasi ekstrak fikosianin ini, seperti dengan penambahan perisa *citrus* atau *cola*.

Analisa Kimia Formula Terpilih

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam (ANOVA), formula konsentrasi ekstrak biopigmen biru fikosianin berpengaruh nyata ($p < 0,05$) hanya terhadap parameter warna, aroma dan tingkat kesukaan umum dari minuman ringan karbonasi. Pada penelitian tahap dua, untuk formula terpilih yaitu formula penambahan konsentrasi ekstrak fikosianin 4% (F1) dilakukan karakterisasi mutu kimiawinya yaitu kadar total fikosianin, kadar protein, aktivitas antioksidan dan intensitas warna (absorbansi). Berikut hasil karakteristik mutu kimiawi formula penambahan ekstrak fikosianin 4% (F1) terpilih minuman ringan karbonasi pada tabel 3:

Tabel 3. Karakteristik Mutu Kimiawi Formula Penambahan Ekstrak Fikosianin 4% (F1) Terpilih Pada Produk Minuman Ringan Karbonasi

Parameter	Nilai*
Total Fikosianin (mg/mL)	3,21
Protein (ppm)	67,15
Aktivitas Antioksidan (IC ₅₀) (μL)	545,6
Intensitas Warna (absorbansi)	A 615
	A 625
	1,302
pH	1,296
	3,30

*Rata-rata dua (2) kali ulangan

a) Total Fikosianin

Fikosianin merupakan biopigmen terbesar yang terkandung di dalam *Spirulina plantesis*. Total fikosianin yang terkandung dalam formula penambahan konsentrasi ekstrak fikosianin 4% (F1) terpilih minuman ringan karbonasi yaitu sebesar 3,21 mg/mL. Fikosianin dapat dipilih sebagai pewarna biru alami alternatif pewarna sintetis yang biasa digunakan yaitu *Brilliant blue* karena mempunyai warna biru yang cerah dan cemerlang.

b) Kadar Protein

Protein yang terkandung dalam formula penambahan konsentrasi ekstrak fikosianin 4% (F1) terpilih minuman ringan karbonasi merupakan protein yang berasosatif dengan biopigmen fikosianin. Semakin tinggi kadar total fikosianin yang terkandung di dalamnya, maka kadar protein juga semakin tinggi. Kandungan protein yang terkandung yaitu sebesar 67,15 ppm, dianalisa menggunakan metode *Bradford*. Kurva deret standar *Bovine Serum Albumine* (BSA) dapat dilihat pada lampiran 5. Dibandingkan dengan minuman ringan karbonasi dipasaran

yang relatif minim zat gizi, dengan penambahan ekstrak fikosianin telah menciptakan minuman yang mempunyai zat gizi salah satunya dari protein.

Protein yang dihasilkan *Spirulina* secara biologi memiliki 8 jenis asam amino esensial yaitu isoleusin, lisin, leusin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofan, dan valin. Kebanyakan dari tumbuhan konsumsi tidak lengkap asam aminonya karena kurangnya satu atau lebih jenis asam amino esensial (Henrikson, 1997).

c) Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan pada formula penambahan konsentrasi ekstrak fikosianin 4% (F1) terpilih minuman ringan karbonasi sebesar 545,6 μL yang diimplementasikan kedalam nilai IC_{50} . Hasil dari metode analisa antioksidan DPPH umumnya diimplementasikan dalam bentuk nilai IC_{50} (*inhibition concentration*) yang didefinisikan sebagai konsentrasi dari senyawa antioksidan yang dapat menyebabkan hilangnya 50% aktivitas DPPH (Andayani, 2008). Semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Suatu senyawa dapat dikatakan memiliki aktivitas antioksidan apabila senyawa tersebut mampu mendonorkan atom hidrogennya untuk berikatan dengan DPPH membentuk DPP Hidrazin, ditandai dengan semakin hilangnya warna ungu (menjadi kuning pucat).

Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 μL , kuat untuk IC_{50} antara 50 – 100 μL , sedang jika IC_{50} bernilai 101 - 150 μL , dan lemah jika IC_{50} bernilai 150-200 μL (Molyneux, 2004). Artinya minuman ringan karbonasi dengan penambahan ekstrak fikosianin 4% memiliki aktifitas antioksidan yang lemah. Namun jika dibandingkan dengan penelitian Masluha (2013) mengenai produk sejenis golongan minuman ringan lainnya yaitu *jelly drink Spirulina platensis*, hanya memiliki aktifitas antioksidan yaitu

sebesar 1625 μL . Artinya untuk menurunkan 50% aktivitas radikal bebas, dibutuhkan lebih sedikit minuman ringan karbonasi ekstrak fikosianin daripada minuman ringan *jelly drink Spirulina platensis*. Beberapa komponen *Spirulina* sp. yang diduga memiliki aktivitas antioksidan adalah senyawa fenolat, karotenoid, pigmen fikobiliprotein, klorofil, dan turunan klorofil (Estrada *et al.*, 2001). Fikosianin (fikobiliprotein) adalah antioksidan alami atau primer dari kelompok *phytochemical* (Hamid *et al.*, 2010).

d) Intensitas Warna dan pH

Intensitas warna pada formula penambahan konsentrasi ekstrak fikosianin 4% (F1) terpilih minuman ringan karbonasi diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 615 dan 625 nm. Fikosianin yang terkandung di dalam minuman ringan karbonasi memiliki sifat spektroskopik yang unik, yaitu mempunyai serapan maksimum pada panjang gelombang tertentu. Serapan maksimum fikosianin terletak pada panjang gelombang 610 – 620 nm (Sedjati, *et al.*, 2012). Intensitas warna yang dihasilkan pada panjang gelombang 615 nm sebesar 1,302 dan pada 625 nm sebesar 1,301.

Formula penambahan konsentrasi ekstrak fikosianin 4% (F1) terpilih minuman ringan karbonasi mempunyai pH sebesar 3.30. Tingkat keasamaan tersebut sesuai dengan minuman ringan karbonasi yang beredar di pasaran. Menurut Trisnanto (2008), minuman ringan maupun yang bersoda memiliki pH rendah ($\text{pH} < 4.5$).

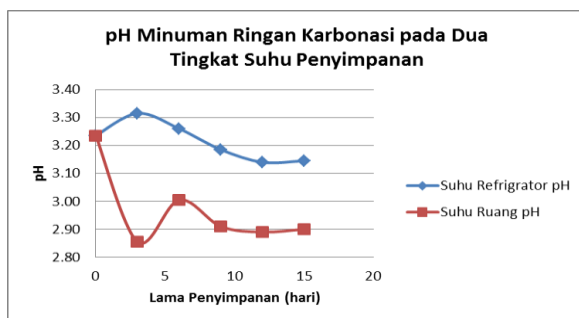
Penentuan Stabilitas Minuman Ringan Karbonasi

Penentuan stabilitas menggunakan metode pendekatan waktu paruh ordo satu (1). Penggunaan Orde Satu (1) didasarkan pada reaksi redoks yang

mengakibatkan struktur fikosianin mudah terurai pada suhu ruang (Doke, 2005). Beberapa penurunan mutu produk pangan selama penyimpanan yang mengikuti kinetika reaksi Orde Satu (1) yaitu kehilangan/kerusakan vitamin, inaktivasi/pertumbuhan mikroba, kerusakan warna oksidatif, dan kerusakan tekstur karena panas (Hariyadi, 2011).

a) pH

Tingkat keasamaan atau pH minuman ringan karbonasi pada formulasi terpilih dengan ekstrak fikosianin 4% yang disimpan pada suhu *refrigerator* selama kurang lebih dua minggu cenderung relatif stabil dikisaran 3,27 – 3,11 pada hari ke - 15 dibandingkan pada suhu ruang yang cenderung menurun mendekati asam semakin lamanya penyimpanan hingga mencapai 2,89.



Gambar 2. Grafik Hubungan Lama Penyimpanan terhadap perubahan pH Minuman Ringan Karbonasi Formula Terpilih Ekstrak 4% Fikosianin

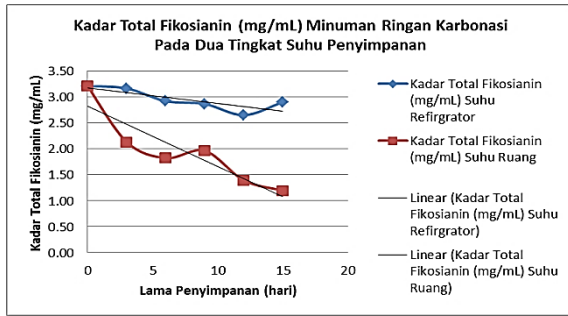
Perubahan tingkat keasamaan atau pH dapat terjadi akibat reaksi kimia yang terjadi selama penyimpanan diantaranya tumbuhnya mikroorganisme seperti bakteri asam laktat yang diikuti oleh pemecahan komponen gula menghasilkan komponen asam seperti yang terjadi pada penelitian Herold (2007). Gugus hidroksil pada pati atau gula dalam bahan dapat menyebabkan penurunan pH karena gugus hidroksil cenderung

menarik partikel bermuatan negatif. Penarikan ion negatif ke sekitar pati atau gula menyebabkan konsentrasi efektif ion H^+ dalam minuman meningkat, sehingga pH turun. Selain itu, ada faktor lain, seperti reaksi enzimatik, yang mungkin terjadi karena interaksi dari berbagai komponen yang ada pada minuman sehingga menyebabkan naiknya nilai pH pada akhir penyimpanan pada dikisaran 2,90. Kestabilan pH seharusnya berada dikisaran 3.5 – 2.9. Minuman ringan karbonasi mempunyai komposisi diantaranya gula dan asam sitrat yang dapat mempengaruhi perubahan pH selama penyimpanan.

b) Kadar Total Fikosianin

Kadar total fikosianin minuman ringan karbonasi pada formulasi terbaik dengan ekstrak fikosianin 4% yang disimpan pada suhu *refrigerator* selama kurang lebih dua minggu cenderung relatif stabil dikisaran 3,22 – 2,91 mg/mL walaupun mengalami penurunan dibandingkan pada suhu ruang yang cenderung menurun semakin lamanya penyimpanan hingga dikisaran 3,22 – 1,20 mg/mL pada hari ke - 15 penyimpanan.

Penurunan kadar total fikosianin disebabkan oleh reaksi redoks yang mengakibatkan struktur fikosianin mudah terurai pada suhu ruang (Doke, 2005). Minuman ringan karbonasi yang disimpan pada suhu ruang juga terdapat endapan putih yang diduga koagulasi protein fikosianin yang mudah rusak jika disimpan pada suhu ruang (Winarno, 1992 ; Doke 2005). Fikosianin merupakan protein alami yang stabil pada suhu rendah. Penyimpanan suhu rendah mampu menginaktivasi aktifitas mikroorganisme dan enzim sehingga tidak terjadi kerusakan struktur fikosianin.



Gambar 3. Grafik Hubungan Lama Penyimpanan terhadap perubahan Kadar Total Fikosianin Minuman Ringan Karbonasi Formula Terpilih Ekstrak 4% Fikosianin

Stabilitas kadar total fikosianin ditentukan menggunakan metode pendekatan waktu paruh.

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{k_t} \quad (2)$$

Dimana :

$t_{(1/2)}$ = Waktu Paruh (hari)

k_t = Konstanta laju penurunan mutu per hari

Nilai k_t didapat dari hasil pengamatan selama periode tertentu penyimpanan diplotkan pada grafik hubungan antara lama penyimpanan (hari) dengan rata – rata nilai mutu parameter yang akan dianalisa stabilitasnya. Pada Orde Satu, nilai mutu diubah menjadi bentuk logaritma natural (\ln) terlebih dahulu, kemudian diplot lama penyimpanan terhadap masing–masing parameter mutu dan ditentukan persamaan regresi liniernya sebagai berikut :

$$\ln Q_t = \ln Q_o - k_t \quad (3)$$

Hasil plot tersebut memberikan informasi nilai k_t (slope), $\ln Q_o$ (intercept), dan koefisien determinasi (R^2) masing–masing suhu penyimpanan. Berikut persamaan regresi linear laju penurunan mutu, nilai k_t dan waktu paruh kadar total fikosianin pada tabel 4.

Tabel 4. Persamaan Laju Kinetka Penurunan Mutu, nilai k_t dan waktu paruh Kadar Total Fikosianin (mg/mL)

Suhu Penyimpanan	Persamaan	R^2	Nilai k_t	$t_{1/2}$ (hari)
Suhu Refrigerator	$\ln Q_t = 1,1576 - 0,0101(t)$	0,6462	0,0101	69
Suhu Ruang	$\ln Q_t = 1,0584 - 0,0586(t)$	0,9003	0,0586	12

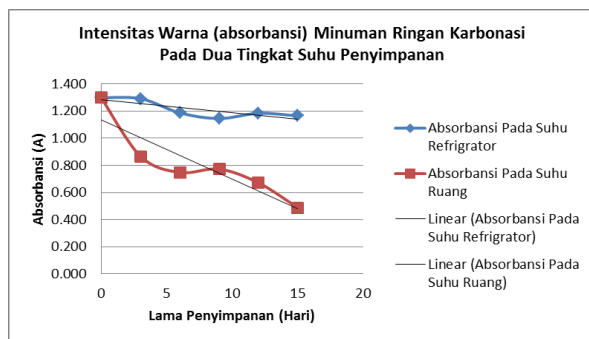
Penggunaan Orde Satu (1) didasarkan pada reaksi redoks yang mengakibatkan struktur fikosianin mudah terurai pada suhu ruang (Doke, 2005). Nilai k_t pada suhu *refrigerator* cenderung rendah dibandingkan suhu ruang. Artinya semakin tinggi nilai k_t maka laju penurunan mutu semakin meningkat dan waktu paruh akan semakin rendah. Dimana k_t adalah konstanta laju penurunan mutu atau degradasi. Koefisien determinasi (R^2) yang tinggi pada suhu ruang menunjukkan bahwa penurunan kadar total fikosianin dipengaruhi sebesar 90,03% oleh lama penyimpanan suhu ruang.

Waktu paruh ($t_{1/2}$) kadar total fikosianin pada minuman ringan karbonasi yang disimpan pada suhu *refrigerator* yaitu selama 69 hari atau sekitar 2 bulan. Sedangkan jika disimpan pada suhu ruang hanya selama 12 hari.

c) Intensitas Warna

Intensitas warna biru (absorbansi) minuman ringan karbonasi pada formulasi terbaik dengan ekstrak fikosianin 4% yang disimpan pada suhu *refrigerator* selama kurang lebih dua minggu cenderung relatif stabil dikisaran 1,299 – 1,166 dibandingkan pada suhu ruang yang cenderung menurun dan memudar warnanya hingga mencapai absorbansi

0,488 pada hari ke-15. Hal ini serupa dengan pernyataan Doke (2005), bahwa biopigmen fikosianin akan mengalami penurunan absorbansi dan pemudaran warna pada suhu ruang. Intensitas warna diukur pada panjang gelombang 615 nm, yaitu panjang gelombang serapan spesifik dari biopigmen biru fikosianin.



Gambar 3. Grafik Hubungan Lama Penyimpanan terhadap perubahan Intensitas Warna Minuman Ringan Karbonasi Formula Terpilih Ekstrak 4% Fikosianin

Stabilitas intensitas warna juga ditentukan menggunakan metode pendekatan waktu paruh Ordo Satu (1). Berikut persamaan regresi linear laju penurunan mutu, nilai k_t dan waktu paruh intensitas warna pada tabel 5.

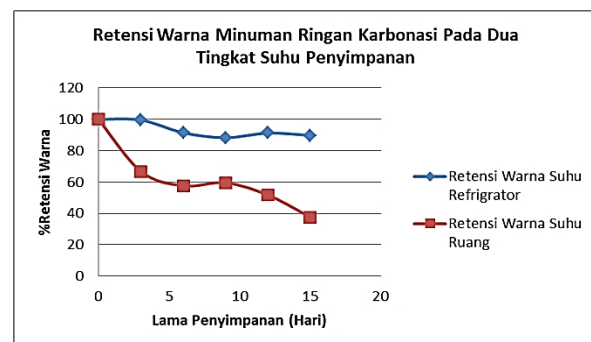
Tabel 5. Persamaan Laju Kinetka Penurunan Mutu, nilai k_t dan waktu paruh Intensitas Warna

Suhu Penyimpanan	Persamaan	R ²	k_t	$t_{1/2}$
Suhu Refrigerator	$\ln Q_t = 0,2511 - 0,0079(t)$	0,6884	0,0079	87
Suhu Ruang	$\ln Q_t = 0,164 - 0,0536(t)$	0,8786	0,0536	13

Nilai k_t pada suhu *refrigerator* cenderung rendah dibandingkan suhu ruang. Artinya semakin tinggi nilai k_t maka laju

penurunan mutu semakin meningkat dan semakin rendah waktu paruh. Koefisien determinasi (R^2) yang tinggi pada suhu ruang menunjukkan bahwa penurunan intensitas warna (absorbansi) dipengaruhi sebesar 87,86% oleh lama penyimpanan suhu ruang.

Waktu paruh ($t_{1/2}$) intensitas warna dari minuman ringan karbonasi yang disimpan pada suhu *refrigerator* yaitu selama 87 hari atau sekitar 3 bulan. Sedangkan jika disimpan pada suhu ruang selama 13 hari. Berikut disajikan juga gambar grafik lama penyimpanan terhadap presentase retensi warna di dua tingkat suhu penyimpanan pada gambar 4.



Gambar 4. Grafik Hubungan Lama Penyimpanan terhadap Presentase Retensi Warna Minuman Ringan Karbonasi Formula Terpilih Ekstrak 4% Fikosianin

Dapat dilihat pada grafik, presentase retensi warna pada suhu *refrigerator* cenderung relatif stabil jika dibandingkan suhu ruang. Presentase retensi warna dihitung menggunakan rumus $\%Retensi\ Warna = (Absorbansi / Absorbansi\ awal) \times 100\%$.

Perlakuan pengawetan suhu rendah menyebabkan intensitas warna biru fikosianin yang disimpan pada suhu rendah atau *refrigerator* relatif stabil dibandingkan pada suhu ruang. Biopigmen pada suhu ruang akan lebih cepat mengalami perubahan warna atau penurunan warna daripada penyimpanan dingin (Wijaya, *et al.*, 2001 ; Doke, 2005). Semakin tinggi waktu paruh, maka

semakin lama fikosianin mengalami degradasi selama penyimpanan. Penelitian ini melanjutkan penelitian yang telah dilakukan oleh Mohammad (2007), mengenai stabilitas biopigmen fikosianin, bahwa fikosianin relatif stabil pada suhu dingin dibandingkan suhu ruang, walaupun telah diaplikasikan pada produk minuman ringan berkarbonasi dan didapat informasi pasti berapa lama waktu paruh ($t_{1/2}$) dari fikosianin selama penyimpanan. Waktu paruh yang tinggi menunjukkan bahwa suatu zat akan terurai hingga 50% dari konsentrasi awal dalam waktu yang relatif lama. Artinya fikosianin dapat terurai hingga 50% dari konsentrasi awal dalam waktu yang relatif lama.

Faktor yang mempengaruhi stabilitas biopigmen pada kondisi penyimpanan diantaranya suhu, lama penyimpanan, pH, penyinaran, serta pengaruh oksidator atau reduktor. Biopigmen akan stabil pada suhu rendah dan tanpa penyinaran (Doke, 2005 ; Arylza, 2003 ; Wijaya *et al*, 2001).

KESIMPULAN

Formula konsentrasi ekstrak biopigmen fikosianin untuk minuman ringan karbonasi yang diperoleh dari hasil *trial and error* yaitu 4, 2 dan 1%. Minuman ringan karbonasi dengan penambahan konsentrasi ekstrak fikosianin 4% (F1) merupakan produk terpilih menurut tingkat kesukaan panelis dengan warna dan tingkat kesukaan umum keseluruhan yang dinilai suka, sedangkan rasa dan aroma dinilai agak suka.

Karakteristik kimiawi minuman ringan karbonasi dengan ekstrak fikosianin 4% (F1) memiliki kadar total fikosianin sebesar 3,21 mg/mL, dan kadar protein sebesar 67,15 ppm. Aktifitas antioksidan (IC_{50}) sebesar 545,6 ppm. Intensitas warna pada panjang gelombang 615 nm sebesar 1,302 dan 625 nm sebesar 1,296 serta tingkat keasaman atau pH sebesar 3,30.

Penentuan stabilitas masa simpan minuman ringan karbonasi formula

terpilih pada parameter tingkat keasaman atau pH relatif stabil pada suhu *refrigerator* dibandingkan suhu ruang. Kadar total fikosianin dan intensitas warna (absorbansi) minuman ringan karbonasi yang disimpan pada suhu dingin relatif stabil dibandingkan suhu ruang. Waktu paruh parameter kadar total fikosianin yang disimpan pada suhu *refrigerator* yaitu 69 hari atau 2 bulan, sedangkan pada suhu ruang yaitu 12 hari. Untuk parameter intensitas warna (absorbansi), waktu paruh pada suhu *refrigerator* yaitu 87 hari atau 3 bulan, sedangkan pada suhu ruang yaitu 13 hari. Kadar total fikosianin dipilih sebagai parameter mutu kritis dalam perhitungan waktu paruh karena mempunyai waktu paruh lebih pendek.

DAFTAR PUSTAKA

- Bennet A, Bogorad L. 1973. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell Biology* 58: 419-435.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganisms quantities of protein in utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72:248-254.
- Doke JM. 2005. An improved and efficient method for the extraction of phycocyanin from *Spirulina sp.* *Journal of Food Engineering*. Vol. 1. Issue 5. Article 2.
- Estrada, J,E.P., P.B. Bescos and 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, dan A. Lawal. 2010. Antioxidant : its Medidal and Pharmacological Applications. *African Journal of Pure and Applied Chemistry* vol.4(8):142-151.

- Hariyadi P. 2011. *Prinsip-prinsip Penetapan dan Pendugaan Masa Kadaluarsa Produk Pangan Dalam: Modul Pelatihan Pendugaan dan Pengendalian Masa Kadaluarsa Bahan dan Produk Pangan*. 20 Mei 2011, Bogor.
- Herold. 2007. Formulasi Minuman Fungsional Berbasis Kumis Kucing (*Orthosiphon aristatus* Bl. Miq) yang Didasarkan pada Optimasi Kapasitas antioksidan, Mutu Citarasa, dan Warna. [skripsi]. Bogor : IPB.
- Masluha D. 2013. Formulasi *Jelly Drink* Berbasis Rumput Laut (*Euचेuma cottonii*) dan *Spirulina platensis* [skripsi]. Bogor. IPB.
- Mohammad J. 2007. Produksi dan Karakterisasi Biopigmen Fikosianin dari *Spirulina fusiformis* Sera Aplikasinya Sebagai Pewarna Minuman [skripsi]. Bogor: Departemen Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Kelautan (FPIK). Institut Pertanian Bogor (IPB).
- Molyneux P. 2004. The use of stable free radical *diphenylpicrylhydrazyl* (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science Technology* 26: 211-219.
- Nanda Lindy T.E. 2008. Aplikasi Ekstrak Antosianin Buah Duwet (*Syzigium Cumini*) Pada Produk Jelly, Yogurt Dan Minuman Berkarbonasi [skripsi]. Bogor: Program Studi Teknologi Pangan, Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor (IPB).
- Pirenantyo P dan Limantara L. 2008. Pigmen senyawa *Spirulina* sebagai senyawa anti kanker. *Indonesia Journal of Cancer* (4): 155 - 163.
- Sarastani D. 2008. *Modul Praktikum Analisis Organoleptik*. Bogor: Supervisor Jaminan Mutu Pangan. Direktorat Program Diploma IPB.
- Sedjati S, Yudiati E, Suryono. 2012. Profil pigmen polar dan non polar mikroalga laut *Spirulina* sp. dan potensinya sebagai pewarna alami. *Ilmu Kelautan* 17 (3)176-181.
- Trisnanto S. 2008. *Sanitasi & hygiene pada Proses Minuman RTD*. Majalah Food.
- Wijaya LS, Widjanarko SB, Susanto T. 2001. Ekstraksi dan karakterisasi pigmen dari kulit buah rambutan *Naphelium lappaceum* var. Binjai. *Jurnal Biosains*. Vol.1 no.2.
- Winarno FG. 2008. *Kimia Pangan dan Gizi*. Bogor (ID): M-BRIO Press.